

生体抗酸化能の評価に関する基礎的検討

川村武、藤村茂、小山田由美¹⁾

宮城大学看護学部

キーワード

抗酸化、過酸化脂質、自動酸化

anti-oxidant, lipid-peroxide, auto-oxidation

要 旨

生体で起る酸化的ストレスが種々の組織障害を齎すことは近年多くの疾患との関わりに於いて指摘されるようになった。一方の生体防御機構としての抗酸化能については、それらにかかわる因子が多岐にわたることや、諸因子が相互に複雑な関連を示すことからその全貌については必ずしも明らかでない。従ってそれら複数の因子を総括した生体の示す総抗酸化能としてみることも種々の障害発現との関連においては意義のあるものと考えられる。そこで血清の示す総抗酸化能の指標として牛脳組織中不飽和脂肪酸の自動酸化における血清の抑制率を用いて、生体の示す抗酸化能を性、年齢別に検討を行い、さらにこれまで生体で起った脂質過酸化反応の反映として一般に広く用いられてきた血清過酸化脂質との関連について検討し考察した。

Fundamental Study of Biological Anti-oxidant Activity

Takeshi Kawamura, Shigeru Fujimura, Yumi Oyamada¹⁾

Miyagi University School of Nursing

Abstract

Lipid per-oxidation in the body is suggested to cause the various bodily injury, on the other hand the some known anti-oxidants will act cooperatively in vivo, so as to provide greater protection against clinical damage, than could be provided by any single anti-oxidant acting alone. However, very little is known about the total anti-oxidant activity in vivo. So the aim of this study was to investigate whether the total anti-oxidant activity of serum contributes the bodily lipid per-oxidation. Total anti-oxidant activity was measured by the biological anti-oxidant assay i.e. an autooxidizing system against which the inhibitory effect of serum can be measured. The assay described in the present paper is based on the spontaneous auto-oxidation of standard ox-brain homogenates. We compared the total anti-oxidant activity with the lipid peroxide levels of serum, which might reflect the lipid per-oxidation in the body.

1) 東北大学医療技術短期大学部

緒 言

生体が示す抗酸化能は生体で起る過酸化反応に対して防衛的に働く役割を担っていると考えられるが、このような抗酸化能は臨床的にみると障害発現との関連において防衛に大きな役割を果たしているものと考えられる。実際我々はこれまでストレスによる胃粘膜障害発現について胃粘膜局所に於ける脂質過酸化反応が関与していることを認め報告してきたが¹⁾同時に生体の抗酸化能も亢進を示すことを認めている²⁾。すなわちラット水浸拘束ストレス負荷実験においてはストレス負荷後胃粘膜内過酸化脂質の増加とともに胃粘膜障害発現を認めるが、同時に抗酸化能の亢進を示した。従って両者の均衡破綻が結果として障害発現にかかわってくるものと推察され、生体の抗酸化能を知ることは障害発現の危険度を予測することも可能ではないかと考えられる。本研究の目的は従って血清中の総抗酸化能の測定と、脂質過酸化反応の結果としての血清過酸化脂質との関連を明確にし、評価することにある。

脂質過酸化反応の抑制には水素引き抜きに始まる開始反応を抑制する機構³⁾とそれに引き続いて起る酸素添加による連鎖反応の阻止機構⁴⁾が考えられる。またそれぞれに関わる因子も多岐にわたり、両者を明確に区別出来ない点も多い。ここでは主として開始反応に関わる抑制、すなわち脳組織の自動酸化の抑制率について検討した。これまでの若干の検討からはこれらの抗酸化能は性、年齢によっても異なると考えられることから、まずそれぞれの基準範囲を設定し、血清過酸化脂質との比較検討を試みた。

方 法

血清の自動酸化反応抑制率(preventive antioxidant activity, AOA)はStocksら³⁾の方法に従い、新鮮牛脳組織の自動酸化に対する血清の抑制率として求めた。すなわち脳組織を冷却0.15mol/l NaClにて洗浄し血液を除去した後細切し、4倍量のphosphate-saline緩衝液にて氷冷下にホモジネートした。その後1000 G, 20分の遠心上清を粗基質とし、使用時まで-20℃の条件下に保存した。AOAの測定は粗基質を室温にて溶解し、3倍量のphosphate-saline緩衝液にて8.3%基質とした。その5 mlに検体血清を50μl添加し37℃で60分のインキュベーションによる自動酸化を行った。反応開始後0分および60分の過酸化脂質を測定して、血清無添加を対照とする以下の計算式により血清のAOAを求めた。過酸化脂質の測定はチオバルビツ-

ル酸反応物質(thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)をマロンジアルデヒド(malondialdehyde, MDA)として測定する八木法⁵⁾にて行った。

$$AOA = \left(1 - \frac{n \text{ mol of MDA/ml (sample)} - n \text{ mol of MDA/ml (0 time)}}{n \text{ mol of MDA/ml (control)} - n \text{ mol of MDA/ml (0 time)}}\right) \times 100$$

インキュベーション時間によるMDAの変化はFig-1に示すように時間とともに経時的な増加を示し、ほぼ60分にて平衡に達したことから判定の測定時間は60分後とした。また脳組織の自動酸化によるMDA測定の再現性は低濃度、中濃度および高濃度についてそれぞれの変動係数(coefficient variation, CV)は8.3、5.5および2.9% (各n=10)と良好な結果をしめした。

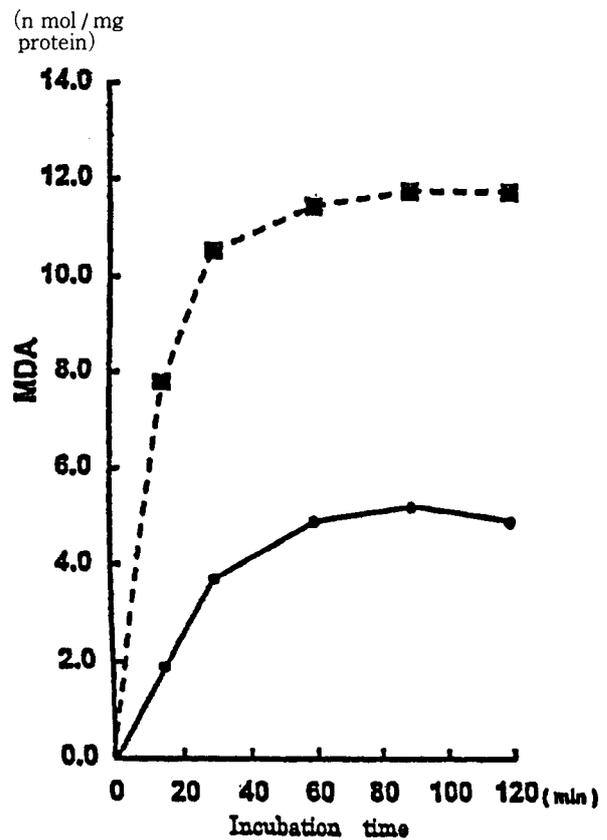


Fig. 1

Time course of lipid auto-oxidation in a standard ox-brain homogenate with and without added serum. To 5 ml volumes of a standard ox-brain homogenate were added: 50 μl of normal human serum (●) or 5 μl of phosphate-saline buffer (■). Incubation was at 37°C. MDA: malondialdehyde

健康対象者は特記すべき既往歴をもたない健康な20歳代男性(平均22.6歳)、10名、20歳代女性(平均22歳)、8名、40-50歳代男性(平均48.6歳)、6名、40-50歳代女性(平均47.6歳)、6名とした。

血清過酸化脂質の測定はメチレンブルー誘導体(10-

N-methylcarbonyl-3, 7-dimethylamino-10-H-phenothiazine, MCDP) を基質としてヘモグロビンを触媒とするヒドロペルオキシドとの反応をみる新八木法⁶⁾により、生成するメチレンブルーの呈色度を675nmで測定した。

有意差の検定はStudent t-testを用い、5%以下を有意差有りとした。

結 果

20歳代および40-50歳代のAOAはFig.2に示したが、年代別では20歳代において男子が、48.2±17.4%、女子が68.2±20.6%であるのに対して、40-50歳代の男子が68.2±11.2、女子が82.6±12.4%といずれも20歳代において有意に低い値を示した。また性別での検討では女性に比して男性においてAOAは低い値を示した。

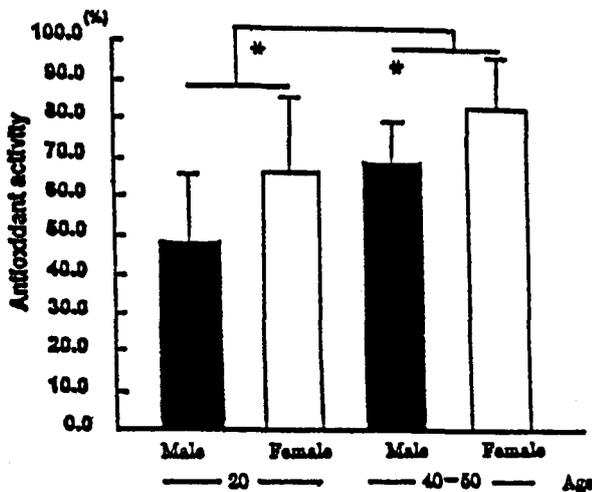


Fig. 2

Antioxidant activity (AOA) of normal human serum in the 20 and 40 to 50 year age groups and the sexes. AOA are shown as mean±SD.

* p<0.05

血清過酸化脂質の測定では年代別の検討において、AOAの所見と同様に20歳代において4.19±1.70nmol/mlの値を示したのに対して、40-50歳代では6.85±2.76nmol/mlと有意に低値を示した。さらに性別での検討においては特に40-50歳代においてAOAとは異なり女性において5.01±2.31nmol/mlと男性の7.66±2.59nmol/mlに比較して有意に高値を示した (Fig.3)。

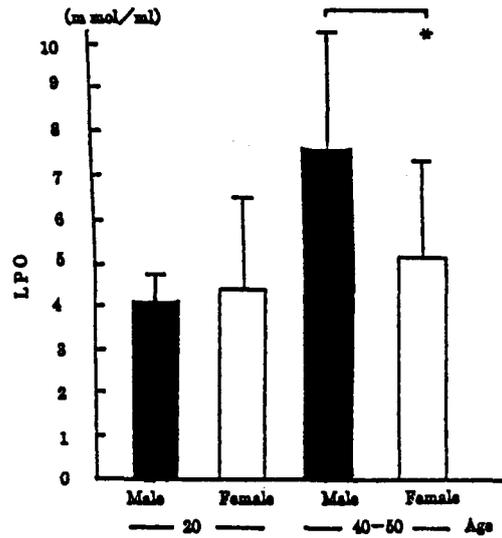


Fig. 3

Lipid peroxide levels of normal human serum in the 20 and 40 to 50 year age groups and the sexes. Lipid peroxide levels are shown as mean ± SD.

LPO: Lipid peroxide

* p<0.05

考 察

生体が示す抗酸化能は生体において起る過酸化反応に対して合目的な役割を担うものと考えられ、抗酸化作用を示す因子に関して既に多くの報告がみられる⁷⁾。我々はラットを用いたストレス実験潰瘍においてその事を確認し報告してきた²⁾。すなわちストレス負荷により胃粘膜局所における過酸化反応が亢進し胃粘膜障害も発現するが、同様のことはヒトにおいても認められており⁸⁾、手術侵襲時に合併することで知られる胃粘膜障害も脂質過酸化反応の亢進によるものと推察される。一方このようなストレス負荷時には防御機構としてビタミンEを始めとして多くのスカベンジャーが動員されることが認められており、抗酸化能の亢進が示唆される。しかしどのような因子がどのような役割をもって関わっているかについては未だ未知の因子⁹⁾も含めて必ずしも明確ではない。例えばビタミンE (VE) の関与については我々の検討したVE欠乏ラットによる実験からも明らかではあるが、ストレス負荷後に著明な上昇を示すカタラーゼについては明らかな抗酸化機構への関与を示すことは出来なかった¹⁰⁾。その他複数の因子が関わっていると思われるが、いずれにしてもストレス負荷により総抗酸化能として著明に亢進することは我々の構築した不飽和脂肪酸とその酸化物を同時に測定できる化学発光HPLC (high

performance liquid chromatography) システムによる検討から明らかであり²⁾、生体の総抗酸化能を知ることは障害発現との関連において重要である。今回脳組織の自動酸化を指標としてみるBioassay法が総抗酸化能の測定法として臨床的な意義をもっているかについて、健常者を対象とした基礎的検討をおこなった。その結果過酸化脂質との関連において総抗酸化能が深くかかわっていることが示唆された。すなわち20歳代と40-50歳代との比較において、従来から加齢により血清過酸化脂質が増加することが指摘されているように、40-50歳代において高値を示したが、同時にAOAも高値を示したことは過酸化脂質の増加に対応した変化と解釈される。一方の性別での検討では40-50歳代の過酸化脂質が女性において男性に比して低い値を示し、このことも従来より女性の動脈硬化性病変が男性に比して起りにくいことと関連して指摘されているところであるが、AOA値からみると女性において男性よりも高く、このような抗酸化能の高値が過酸化脂質が低い理由になっていることも考えられる所見である。また抗酸化能の高値が脂質過酸化反応に関わっていることを示すものと思われる。何れにしても今回の検討は例数が少なく、また各種疾患との関連においてもさらに検討が必要であるが、それらの判定にあたってはまず性、年齢別の明確な基準値の設定が必要であることは明らかである。

結 語

- 1) 20歳代と40-50歳代との比較では40-50歳代において血清過酸化脂質および総抗酸化能の高値を認めた。
- 2) 男性と女性との比較においては女性において血清過酸化脂質の低値と総抗酸化能の高値を認めた。
- 3) 血清総抗酸化能の基準値設定は性、年齢別に行う必要がある。

文 献

1. Kawamura T, Koizumi F, Ishimori A : Lipid peroxide in experimental ulcer with vitamin E and B₂. *Dig Dis Sci* 33 (7) : 903, 1988
2. 川村 武、大久良晴、溝延克実、蝦名弘子 : ストレス負荷時の胃粘膜局所における抗酸化能。過酸化脂質研究、19 (2) : 173-174, 1995
3. Stocks J, Gutteridge J M J, Rosemary J Sharp, Dormandy T L : Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin Sci Mol Med* 47 : 215-222, 1974
4. Wayner D D M, Burton G W, Ingold K U, Barclay L R C, Locke S J : The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 924 : 408-419, 1987
5. 八木国夫 : Thiobarbituric acid 蛍光法による血漿または血清中の過酸化脂質の微量定量法。ビタミン 49 : 403, 1975
6. Ohishi N, Yagi K : A new assay method for lipid peroxides using a methylene blue derivative. *Biochem Int* 10 : 205, 1985
7. Jones A F, Winkles JW, Jennings PE, Lunec J, Barnett AH : Serum antioxidant activity in diabetes mellitus. *Diab Research* 7 : 89 - 92, 1988
8. 川村 武、大久良晴、阿部裕子、石森章、標葉隆三郎、横田憲一 : 食道癌手術と過酸化脂質。臨床病理 40(8) : 881-884, 1992
9. Asayama K, Uchida N, Nakane T, Hayashibe H, Dobashi K, Amemiya S, Kato K, Nakazawa S : Antioxidants in the serum of children with insulin dependent diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med* 15 : 597-602, 1993
10. 川村 武、大久良晴、溝延克実、船渡忠男、佐々木 毅 : ラット水浸拘束ストレス負荷時の胃粘膜局所抗酸化能とカタラーゼ活性亢進。過酸化脂質研究 20(2) : 166-170, 1996