

細胞培養における二価鉄誘導脂質過酸化反応に関する研究 : 基礎的検討

山本 剛 禧

Ferrous Iron-induced Lipid Peroxidation in Cell Culture: preliminary experiments

Goki YAMAMOTO

To study the effect of Fe^{2+} on the cell culture, preliminary experiments related to the lipid peroxidations of 3T3 cells and calf serum were carried out. Amounts of lipid peroxides, as thiobarbituric acid (TBA)-reactive substances, were measured by means of the TBA color reaction under the acidic conditions by acetic acid, and were expressed as TBA value.

The TBA value of calf serum in the phosphate buffered saline (PBS) with ethyrendiaminetetraacetate (EDTA) was lower than that of the control. The value in the presence of Fe^{2+} showed significantly high level, but it was almost prevented by the addition of EDTA. Besides, Fe^{2+} -induced lipid peroxides of serum in the PBS during the incubation at 37°C were capable to measure by the application of EDTA. The TBA values of trichloroacetic acid (TCA) precipitates isolated from serum in the PBS and the culture medium were lower than that of control serum, but no difference was observed between the both TCA precipitates. The results suggested that the impurities in the culture medium were removed by TCA precipitation. Effects of Fe^{2+} and EDTA on the TBA value of TCA precipitates were observed similarly to the case of control serum.

Fe^{2+} -induced lipid peroxidation of the cells in the PBS, which the peroxidation was stopped by the addition of EDTA, was observed, and it was accompanied with the lag time of induction period. The TBA value of the cells was more prevented by EDTA.

The method in this paper may not be capable for the quantitative measurements of lipid peroxides in cells or serum, but is applicable to measure the changes of relative amounts of lipid peroxides.

Key Words : Lipid Peroxidation, Ferrous Iron, Cell Culture

はじめに

生体内における過酸化脂質の生成と老化との関係,あるいは各種疾患が臓器や組織における過酸化脂質由来の障害に起因することなど,広範囲の生体现象が過酸化脂質と関連していることが数多く報告されている^{1),2)}。種々の因子による過酸化脂質の誘導に鉄は重要な関係があり,組織ホモジネートの脂質過酸化反応においては,内在性の鉄が触媒作用を示す唯一の金属と考えられている³⁾。また,鉄は *in vivo* でも過剰に投与すると脂質過

酸化を促進する^{4),5),6)}。しかし,鉄の作用機序について明確であるとはいえない。

細胞培養レベルでの二価鉄誘導脂質過酸化反応を研究する目的で,基礎的検討として,使用細胞と培地に用いられる仔牛血清の二価鉄誘導の脂質過酸化物の測定が可能であるかどうかを追求した。

実験材料及び方法

細胞および培養法:細胞はマウス線維芽細胞由来の NIH3T3 細胞を使用した。培養液としてダル

ベッコ変法イーグル倍地 (10g/l, 日水製薬) にグルコース (4g/l), 炭酸水素ナトリウム (1.5g/l), penicillin (10万単位/l, 明治製菓), streptomycin (100mg/l, 明治製菓) 及び10%非動化仔牛血清 (Gibco) を加えたものを用いた。培養は CO₂ incubator (Sanyo Electric Co.) を使用し, dish (60mm×15mm) で, 培養液 5 ml, 95% air + 5% CO₂, 37°C の条件で行った。細胞継代並びに細胞採取の際, トリプシン液 (trypsin (1:250, DIFCO), 1.0g/l), NaCl (8.0g/l), KCl (0.4g/l), Na₂HPO₄·12H₂O (0.6g/l), KH₂PO₄ (0.03g/l), CaCl₂·2H₂O (0.016g/l), glucose (2.0g/l) で単細胞化を行った。

過酸化脂質の測定: 過酸化脂質はチオバルビツール酸 (TBA) 法を用い酢酸酸性条件下での蛍光法^{7,8)}で検量した。即ち, 血清0.05ml を PBS (NaCl (8.0g/l), KCl (0.2g/l), Na₂HPO₄·12H₂O (1.15g/l), KH₂PO₄ (0.2g/l), MgCl₂·6H₂O (0.1g/l), pH7.4) に混和 2 ml とし, 0.5ml の TBA 試薬 (0.67% TBA, 50%酢酸, 使用直前調剤) を加え, 96°C, 60分加熱発色させた。急冷後, 0.5ml の40%三塩化酢酸 (TCA) を加え混合, 3000 rpm, 15分遠心した。得られた上清について, 励起光 (EX_{515nm}) による蛍光 (EM_{556nm}) の相対蛍光値を蛍光分光光度計 (日立, F-2000) で測定した。マロンジアルデヒド (MDA) への換算は MDA 標準液 (1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane malonaldehyde tetraethyl acetal) の検量線を用いて行い, TBA 値とした。

対照, エチレンジアミン四酢酸 (EDTA, 終末濃度 1 mM), Fe²⁺ (硫酸第一鉄アンモニウム, 同 0.05mM), EDTA + Fe²⁺ 各添加群の 4 群における加熱発色を試みた。

細胞を採集し, 遠心にて細胞を集め, PBS で洗浄後 PBS に浮遊し, その 2 ml を用いて上記同様の操作を行った。蛋白量は Lowry 法⁹⁾で定量した。

細胞の脂質過酸化反応の測定: 37°C で, PBS 中の Fe²⁺ (0.05mM) 誘導反応を経時的に EDTA (1 mM) で停止し, TBA 値を求めた。

TCA 沈澱操作: 10% 血清を含む PBS と培養

液の 0.5ml に対し 0.1ml の 40% TCA を加えたのち 6.7% TCA を 2 ml 加え混和, 3000rpm, 15分遠心した。上清を吸引して除き, 沈渣を 2 ml の 6.7% TCA で洗浄, 遠心した。その沈渣を PBS 2 ml に溶解し使用した。

結 果

血清の酢酸酸性条件⁷⁾での TBA 発色加熱反応で得られる TBA 値は Fe²⁺ の存在によって著しい高 TBA 値が示される。図 1 は仔牛血清 0.1ml

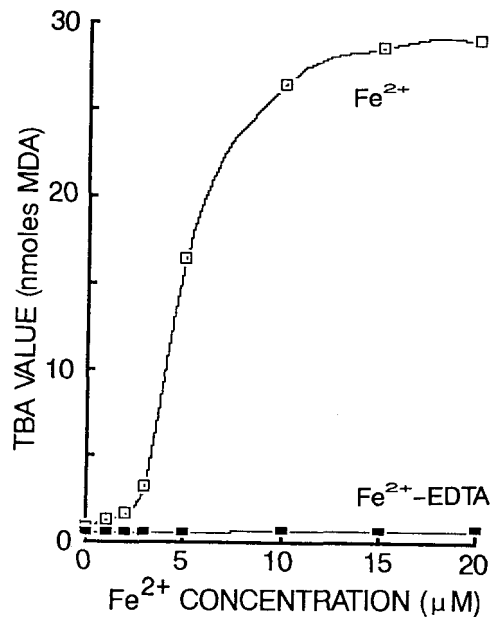


Fig. 1. TBA values of calf serum (0.1ml) obtained by the TBA reactions with various concentrations of Fe²⁺ and / or EDTA (1mM).

(4 ml PBS 反応系) を用いて, 各濃度の Fe²⁺ 添加で得られた TBA 値を示す。Fe²⁺ 2μM までわずかの TBA 値の増加がみられたのち, 急激な TBA 値の増加が示され, 血清 0.1ml では Fe²⁺ 15μM でプラトーに達した。基準として用いた Fe²⁺ 50μM でも同値を示した。これらの TBA 値は EDTA 添加で抑制され, Fe²⁺ 0 濃度で 0.46nmolesMDA, 20 μM 濃度で 0.84nmolesMDA と直線的増加が濃度に依存して認められた。

細胞の PBS 中での 50 μM Fe²⁺ 誘導脂質過酸化

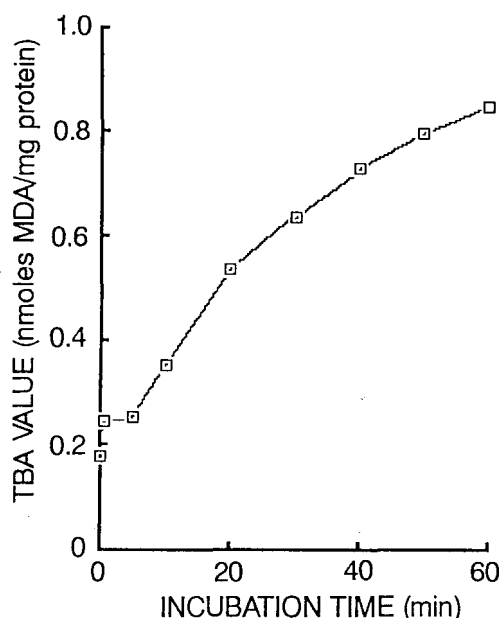


Fig. 2. Fe^{2+} -induced lipid peroxidation of 3T3 cells in phosphate buffered saline (pH7.4) at 37°C .

After preincubation, lipid peroxidation was started by the addition of Fe^{2+} (0.05mM), and stopped by the addition of EDTA (1mM). Used protein of cells was 0.59mg / 2ml.

反応 (0.59mg蛋白/2ml) を EDTA で誘導反応を止め計測された経時曲線を図2に示す。5分の誘導期の lag 時間がみられたのち、TBA 値の上昇がみられ、60分ではプラトーに達しなかった。細胞でも EDTA の添加でミトコンドリア同様⁹⁾ Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応の測定が可能であり、産生過酸化脂質の検量が行えることが示された。

血清 (0.05ml) について、 Fe^{2+} (50 μM) で 37°C 、60分培養 (2 mlPBS 系) して過酸化脂質が誘導されるかどうかを実験した (表1)。TBA 発色反応時の EDTA 添加でおよそ30%の TBA 値の抑制がみられた。 Fe^{2+} の存在は、培養に関係なく高 TBA 値がみられたが、EDTA 添加のその抑制 TBA 値は培養血清 (1.30nmolesMDA) で培養しなかった血清 (0.48nmolesMDA) と比べてより高値の TBA 値が得られ、その差 (0.82nmolesMDA) は Fe^{2+} 誘導過酸化脂質量を示すものと考えた。

細胞の TBA 値 (表1) は TBA 発色反応時の

Table 1. Fe^{2+} -induced lipid peroxides of calf serum and cells.

Incubation	TBA Value (nmolesMDA)		
	Serum (/0.05ml)	Serum (/0.05ml)	Cells (/mg protein)
	-	+	+
Control	0.40	0.42	0.74
EDTA	0.27	0.28	0.21
Fe^{2+}	13.96	13.06	4.66
EDTA	0.48	1.30	0.62

Each 2ml of the incubation mixture (phosphate buffered saline, pH7.4) contained serum (0.05ml) or cells (0.53mg protein) was incubated at 37°C for 60 min with or without Fe^{2+} (0.05mM), and was chilled immediately. After addition of EDTA (1mM), the TBA color reactions were carried out.

Table 2. TBA values of serum, the precipitates (PBS-ppt) from serum in the phosphate buffered saline (pH7.4) and the precipitates (medium-ppt) from serum in the culture medium by the addition of trichloroacetic acid.

	TBA Value (nmolesMDA / 0.05ml serum)		
	Control	PBS-ppt	Medium-ppt
None	0.39 \pm 0.03	0.33 \pm 0.04	0.31 \pm 0.04
EDTA(1mM)	0.29 \pm 0.02	0.20 \pm 0.03	0.20 \pm 0.02
Fe^{2+} (0.05mM)	13.82 \pm 0.90	13.74 \pm 1.06	13.33 \pm 0.61
EDTA, Fe^{2+}	0.43 \pm 0.03	0.38 \pm 0.03	0.37 \pm 0.02

Precipitations (n=10) were carried out from 0.5ml of the mixtures contained 10% serum.

EDTA の添加で約70%抑制がみられ、その度合いは血清より大であった。TBA 発色反応時の Fe^{2+} 存在は血清同様高 TBA 値がみられ、EDTA 添加では対照 (0.74nmolesMDA) より Fe^{2+} (0.05mM) 37°C 60分の誘導では低値 (0.62nmolesMDA) が示された。先の実験で EDTA 存在下で過酸化反応が測定できることから EDTA 添加群との差 (0.41 nmolesMDA) が誘導過酸化脂質量と考えた。

細胞培養液での血清過酸化脂質を測定する目的で TCA 沈澱法を検討した。培養液の混在は蛍光法での TBA 値測定では著しい蛍光を示し不可能である。血清そのものでも TBA 発色に影響する夾雑物質の除去を考慮して測定されている^{10), 11)}。

前報⁷⁾で TCA 沈殿物 (TCA-ppt) で Fe^{2+} 並びに EDTA の効果が対照血清と同じ傾向を示すことが観察されたことから、培養液を用いて検討した (表 2)。対照血清 TBA 値に対し、血清を 10% に PBS に混和したもの (PBS-ppt), 10% 血清の培養液 (medium-ppt) の二者の TCA-ppt の TBA 値を比較した。対照血清の TBA 値と両 TCA-ppt の間に有意の差 (危険率 1% 以下) がみられたが、両 TCA-ppt 間では有意の差はみられなかった。この対照との有意差 (危険率 1% 以下) は加熱発色時の EDTA 添加群, EDTA + Fe^{2+} 添加群でもみられたが、 Fe^{2+} 添加群では三者で同じ TBA 値が得られた。EDTA 添加の TBA 値から得られる抑制率は両 TCA-ppt が対照より高率であった。両 TCA-ppt で EDTA + Fe^{2+} 添加の TBA 値の EDTA 添加群に対する増加率は同率であった。

考 察

仔牛血清の過酸化脂質を本報で用いた酢酸酸性条件での TBA 法を用いて測定するとき、その TBA 発色加熱の際 Fe^{2+} の存在で血清量に対して Fe^{2+} 濃度がある濃度を超えると急激な発色がみられ TBA 値はプラトーに達した。このような曲線は前報⁷⁾のヒト血清でもみられたが、 Fe^{2+} 誘起の発色増加は EDTA によって殆んど抑制されることから低濃度の Fe^{2+} では血清中にそれにキレートする因子の存在が考えられる。高濃度の Fe^{2+} で TBA 値がプラトーに達したことはその TBA 値は TBA 発色反応中に血清のもつ過酸化しうる脂質量を表しているものと考えられる。この Fe^{2+} による作用機序は明らかでないが、少なくとも EDTA で Fe^{2+} をキレートすることにより発色は抑えられることが示された。しかし EDTA- Fe^{2+} 存在下の TBA 値も低値を示すものの Fe^{2+} 濃度に依存して若干の上昇値がみられ、主として使用した Fe^{2+} (0.05mM) 濃度では対照血清の TBA 値よりも高値を示した。対照血清も EDTA で TBA 値が低値となることから Fe^{2+} 様因子の存在によって TBA 反応中に誘起された TBA 値を示している可能性があり、酢酸酸性条件下の血清の TBA 値測定はその誘起因子量を反映しているの

かもしれない、さらに検討が要求される。従って血清の Fe^{2+} 誘導過酸化脂質を測定する際にはブランクとして EDTA- Fe^{2+} 存在下の TBA 発色反応が必要であり、この方法を用いることによって仔牛血清で PBS (37°C) 中で Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応が起こることが示された。

3T3細胞でもミトコンドリア同様⁸⁾ Fe^{2+} 誘導反応を EDTA で止めることにより脂質過酸化反応曲線を究明できることが明らかとなった。しかし、細胞でも酢酸酸性条件での TBA 発色反応中に Fe^{2+} , EDTA 効果は血清同様みられ、しかも 37°C, 60分で Fe^{2+} 0.05mM で誘起されたと考えられる TBA 値 (+EDTA) は、血清の場合と異なって、対照細胞の TBA 値より低値を示し、細胞には TBA 発色反応中に影響する誘起因子が多く含まれていると考えられ、EDTA 添加 TBA 値での比較が必要である。実験によって細胞の TBA 値、 Fe^{2+} の誘導差がみられたが、増殖期の細胞とプラトー期の細胞の差、更にはトリプシン処理の影響が考えられ検討が必要である。

培養液の組成はその混在によって、TBA 反応後かなりの蛍光が示され、微量の TBA 値の測定はできなかった。血清では TBA 反応に影響を及ぼす夾雑物をリンタングステン酸沈殿物を用いることによって除く努力が払われている¹⁰⁾。前報⁸⁾でリンタングステン酸沈殿物と TCA-ppt の Fe^{2+} 効果を検討したが、血清と同様の Fe^{2+} , EDTA 効果が TCA-ppt ではみられたが、リンタングステン酸沈殿物では異なった効果が観察された。血清と TCA-ppt の PBS-ppt, medium-ppt を比較検討した結果は、血清と TCA-ppt の TBA 値間では有意の差が認められたが、PBS-ppt と medium-ppt では各 TBA 値に差はみられず、 Fe^{2+} , EDTA 効果は血清と同傾向を示し、 Fe^{2+} 誘導過酸化脂質をみるには TCA-ppt が適していると考えられる。TCA-ppt でも EDTA 効果がみられることは、TCA 沈澱法によって血清中の TBA 発色に影響する因子が除かれるとともに培養液中の夾雑物も取り除かれるが、なお TBA 発色反応中の誘導因子は蛋白結合物として残存していることを示唆する。また、 Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応が TCA によって

停止できることから⁸⁾残存 TCA が TBA 発色反応に影響を及ぼしていることも考えられる。いずれにしても Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応が酢酸酸性下の本 TBA 法によって EDTA を用いることにより測定できることが示されるとともに、本法は過酸化脂質の絶対定量には更に考慮を必要とするが、 Fe^{2+} が関与する相対的な量的変化の追求に使用できることが示された。

ま と め

培養細胞を実験材料にして Fe^{2+} の細胞に対する影響を脂質過酸化反応面から究明するために、細胞並びに培養液に付加される仔牛血清の Fe^{2+} 誘起の過酸化脂質が酢酸酸性条件下の蛍光法で測定可能かどうかを検討した。細胞及び血清において、鉄キレート剤である EDTA を添加して TBA 発色加熱反応を行うことによって Fe^{2+} 誘起の過酸化脂質の測定が可能であり、細胞及び血清において、PBS 中での Fe^{2+} 誘導の脂質過酸化反応が測定できることが示された。培養液中の、本法で、TBA 値に影響を及ぼす夾雑因子は TCA による沈澱蛋白部分を用いることで除かれ、その TCA 沈澱物が TBA 発色反応における Fe^{2+} , EDTA 効果について血清と同じ傾向を示すことから、TCA 沈澱物で培養液中の血清過酸化脂質の相対的定量ができることが示された。

文 献

- 1) 八木国夫, 五島雄一郎編集: 過酸化脂質と疾患。医学書院, 東京, 1981
- 2) 内山充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編著: 過酸化脂質と生体。学会出版センター, 東京, 1985
- 3) Barber, A. A.: Lipid peroxidation in rat tissue homogenates; Interaction of iron and ascorbic acid as the normal catalytic mechanism. *Lipids*, 1: 146-151, 1966
- 4) Golberg, L., Marti, L. E. and Batchelor, A.: Biochemical changes in the tissue of animals injected with iron. 3. Lipid peroxidation. *Biochem. J.*, 83: 291-298, 1962
- 5) Bacon, B. R., Tavill, A.S., Brittenham, G. M., Park, C. H. and Recknagel, R. O.: Hepaticlipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. *J. Clin. Invest.*, 71: 429-439, 1983
- 6) 栗井道泰: 鉄過剰症における臓器障害とその機序。 *Jpn J. Clin. Hematol.*, 30: 1115-127, 1989
- 7) 山本剛禧: チオバルビツール酸法による血清過酸化脂質の測定: 比色法と蛍光法の比較並びに二価鉄の影響。 *岡山大医短紀要*, 2: 51-61, 1991
- 8) 山本剛禧: チオバルビツール酸 (酢酸酸性) 法によるミトコンドリアの二価鉄誘導脂質過酸化反応の測定。 *岡大医短紀要*, 3: 43-47, 1992
- 9) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-75, 1951
- 10) Yagi, K.: A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemical Medicine*, 15: 212-216, 1976
- 11) 金田尚志, 植田伸夫編集: 過酸化脂質実験法, 医歯薬出版株式会社, 東京, 1983

(1992年10月20日受理)