

# ラット臓器の脂質過酸化反応に およぼす放射線照射の影響

岡山大学医学部放射線医学教室（主任：山本道夫教授）

渡 辺 節 生

〔昭和48年3月30日受稿〕

放射線の生体における作用機序を考えると、過酸化物の占める役割は非常に重要なことである。放射線による生体内での脂質過酸化物の誘起は各種臓器でみられているが<sup>1) 2)</sup> 逆の報告もある<sup>3)</sup> しかし *in vitro* における臓器への放射線照射により、脂質過酸化物の形成がみられ、脂質過酸化物が細胞毒として作用することが明らかにされている<sup>4) 5)</sup> 生体内でも同様の効果が見られるとすれば、生じた脂質過酸化物が放射線障害の因子となる予想は当然成立つ。

生体内の脂質過酸化反応は基質となる脂質、反応促進因子、反応抑制因子（抗酸化剤など）の観点からその作用機序が検討されている<sup>6) 7)</sup> しかし非酵素的反応とみられた脂質過酸化反応で最近エネルギー依存性の反応が細胞分画内で活性の高いミクロゾームに認められ<sup>8)</sup> 生体代謝の意味から注目される。

一方、放射線による脂質の代謝変動について多数の報告がみられるが<sup>9) 10) 11) 12) 13)</sup> 脂質過酸化物の基質である脂肪酸の変動についてはあまり報告がみられない<sup>14)</sup> この意味から、放射線照射にともなう脂肪酸構成の変動と脂質過酸化反応の相関性を検討することは、放射線障害の一因を究明する一助となると考えた。

第1編では、放射線全身照射にともなう脂質過酸化物形成能を検討し、第2編では、これをもとに肝、脾、心、腎各臓器における脂質過酸化能と脂肪酸構成の変動の相関性について研究した。第3編では、さらに放射線防護物質として臨床的に使用されている薬剤を投与し、放射線照射にともなう脂質過酸化反応の動態を追究した。

## 第 1 編

### 放射線全身照射ラット臓器の 脂質過酸化物形成能について

岡山大学医学部放射線医学教室（主任：山本道夫教授）

渡 辺 節 生

#### 緒 言

脂質過酸化物の測定には、thiobarbituric acid (TBA) 法が用いられている。TBA 反応は Wilbur ら<sup>15)</sup> によってはじめて記載され、その後幾多の

改良が加えられている。著者は脂質過酸化物を Hunter ら<sup>16)</sup> の方法に従って測定し TBA 値を求めた。ところで、正常組織には脂質過酸化物は存在しないのが普通といわれ<sup>17)</sup> Bernheim ら<sup>17)</sup> によれば臓器ホモジネートを好氣的条件下で incubate すると過

酸化物が生じるという。この場合、TBA値はincubationによる脂質過酸化物形成能を反映するものであると考えられる。

TBA反応促進物質としてアスコルビン酸、鉄イオンなどがあり、放射線照射をおこなった場合でも、これらの物質を加えないendogenousではTBA値は低く、脂質過酸化物が存在しているか否か判定しがたい。しかしながらアスコルビン酸、鉄イオンを加えてincubationすることにより、著明なTBA値の促進もたらされることが知られている。<sup>7) 8)</sup>これらのことは放射線照射による直接的な脂質過酸化物の形成の有無よりも、脂質過酸化物形成能の差を検討していることになる。そこで著者は反応誘起剤として、アスコルビン酸、鉄イオンの添加の有無によって放射線照射ラットと対照との間に相違が生ずるか否かについて検討した。

#### 材料および実験方法

(1) 実験動物： オリエンタル固型餌料MFを用いて飼育したウイスター系健康雄性ラット(体重180g前後、8週令)を使用した。

(2) 放射線照射方法：

東芝製KXC, 19型深部X線治療装置を使用した。照射条件は管電圧200KVP, 管電流25mA, 濾過板0.5mm Cu+0.5mmAl, FSD 50cm, 線量率76.0R/minである。本実験で特にことわらない場合、X線照射は650R全身照射を行った。

(3) 臓器摘出： 対照およびX線照射後48時間目に断頭放血して、肝、脾、心、腎の各臓器を摘出し実験に供した、なお各群とも2匹あてを使用した。

(4) 脂質過酸化反応(TBA値の測定)：とり出した臓器をすみやかに氷却した0.15M KCl-10mM Tris-HCl液(pH 7.4)(KT液)にて細切洗滌後、組織の10倍量のKT液を入れテ

フロンホモゲナイザーでホモゲナイズしたものに、無添加、アスコルビン酸(0.5mM)もしくはFe<sup>+</sup>(硫酸第一鉄アンモニウム, 0.5mM)を添加した3群について実験を行った。反応液(KT液, 0.05g tissue eq. 全量2ml)は37℃で、TAIYO incubator M-1Nを用いて激しく振盪させた。経時的に120分まで反応を行い、Hunterらの方法<sup>10)</sup>によってTBA値を求めた。

すなわち反応液2mlに対し、40%トリクロル酢酸0.5mlを加えて反応停止後、5NHCl(0.25ml, 2% TBA 0.5ml)を混和し、沸湯水で10分間加熱後に急冷し、それを遠心沈澱して上澄について535mμと600mμの吸光度を求めた。なお吸光度は島津製自記分光光度計UV-200で測定した。各臓器における吸光度曲線の1例を図1に示す。なお、TBA値はOD 535-600/g蛋白質量で示し、蛋白質の測定はBiuret法<sup>10)</sup>で行った。

(5) 照射線量および照射後経過時間：照射群では300R, 650R, 1000R, 1500Rの四群について全

Fig.1

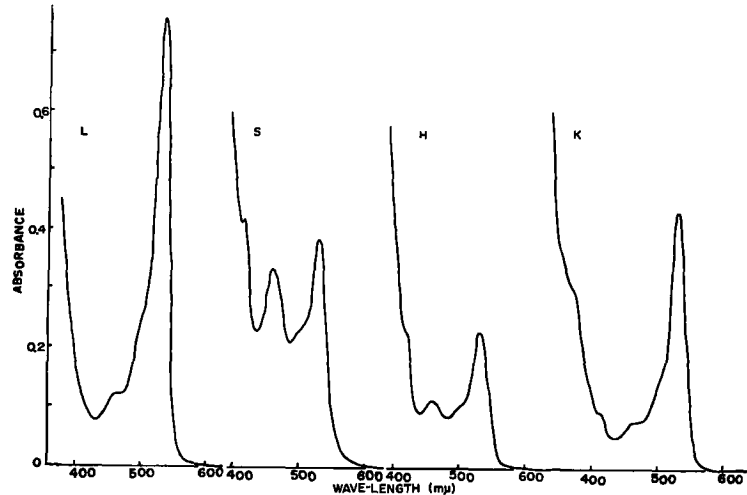


Fig.1

Visible absorption spectra of supernatant of the reaction mixture in the TBA test.

Homogenates of liver(L), spleen(S), heart(H) and Kidney(K) were incubated with the KT-solution in the presence of Fe<sup>+</sup> at 37° for 60', and then the incubation stopped by the addition of TBA test solution. The mixture heated in waterbath at 100°, cooled, and centrifuged.

Absorption of the supernatant was measured in dilution of fivefold in the cases of liver and kidney.

身照射を行ない、その後食餌を与えた群と臓器摘出時まで水のみ与えた絶食群について48時間後に各臓器を摘出し、TBA値を測定した。650R全身照射群については直後、24時間後、48時間後、72時間後に各臓器し、同様にTBA値を測定した。

### 実験結果

(1) incubation 時間について：650R全身照射群および対照群について実験を行った結果、経時的なTBA値の測定では、脂質過酸化反応は肝において図2に示めす如く、endogenous、アスコルビン酸添加群では、120分までゆるやかに進行するのに対して、 $Fe^{*}$ 添加群では急速な反応がみられ、30分においてすでに反応は最高に達した。照射群ではこれらの反応はすべて時間的に促進がみられる。

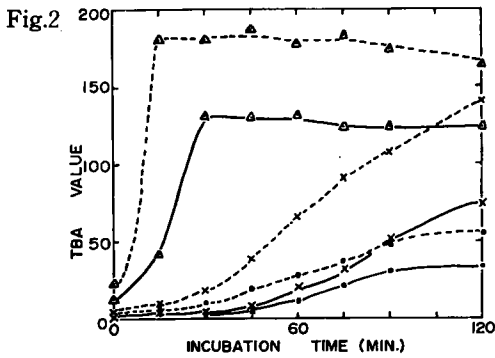


Fig.2-5

Lipid peroxidation of tissue homogenates prepared from normal(—) and irradiated rats(---) 48 hours after whole-body exposure.

Homogenates of liver(Fig.2), spleen(Fig.3), heart(Fig.4) and/or kidney(Fig.5) were incubated in the presence of  $Fe^{*}$  ( $\Delta$ ) or ascorbate( $\times$ ) and in the absence( $\bullet$ ) of them at  $37^{\circ}$ .

TBA value was measured as in Fig.1.

脾(図3)においては各群とも漸増傾向の曲線が得られたが、 $Fe^{*}$ 添加群では45分値より反応の再促進が認められた。照射群では対照に比して著しい反応が認められた。endogenousとアスコルビン酸添加群の比較ではendogenousが高い値を示めしアスコルビン酸による反応の抑制がうかがわれるがこのような傾向は時に反応初期の心においても認めうる。

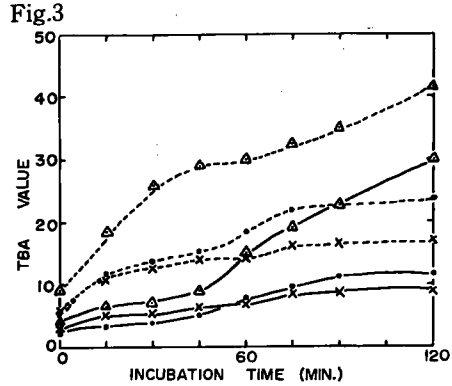


Fig.4

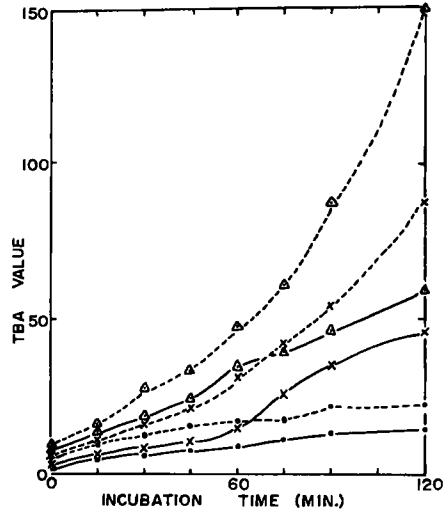
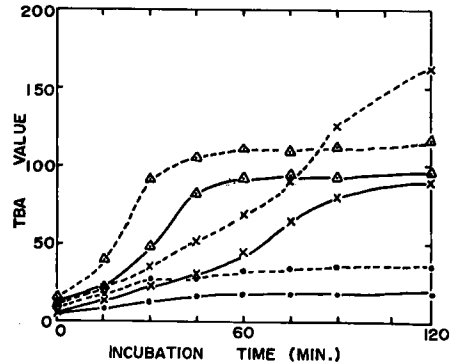


Fig.5



心(図4)においても同様に漸増傾向を示めすが、時間経過につれて照射群のアスコルビン酸、 $Fe^{*}$ 添加群の上昇が著しい。

腎(図5)においては肝に類似の上昇カーブを示めし、 $Fe^{*}$ 添加群は照射群で45分以後、対照は60分において反応は一応上昇きっている。全体的にみ

Fig.6

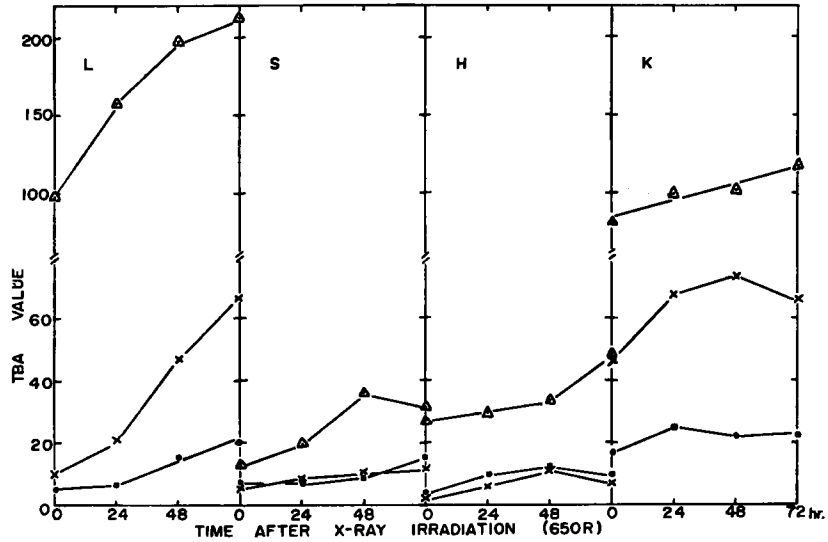


Fig.6

Lipid peroxidation of rat tissue homogenates at various intervals after whole-body irradiation(650R). Homogenates of liver(L), spleen(S), heart(H) and kidney(K) were incubated in the presence of Fe<sup>+</sup> (Δ) or ascorbate(×) and in the absence (•) of them for 60 minutes at 37°. TBA value was measured as in Fig.1.

Fig.7

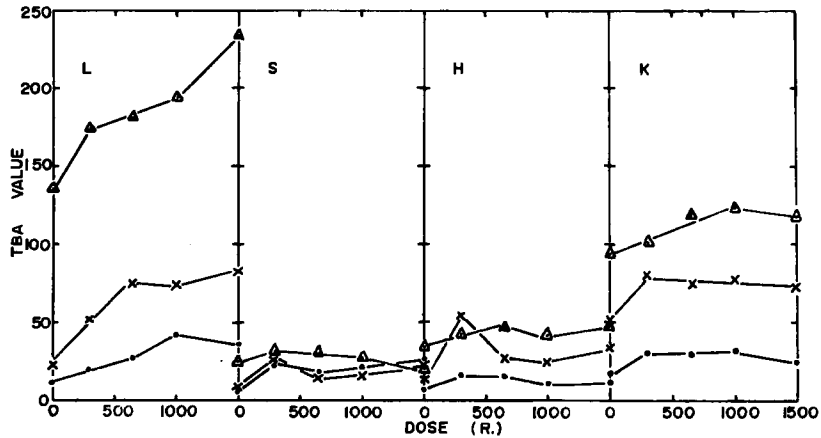


Fig.7

TBA values of lipid peroxidation in rat tissue homogenates 48 hours after whole-body irradiation.

Rats were fed, and livers(L), spleens(S), hearts(H) and kidneys (K) from two rats were pooled for homogenization. TBA value was measured after incubation for 60 minutes at 37° in the presence of Fe<sup>+</sup> (Δ) or ascorbate(×) and in the absence (•) of them.

Fig.8

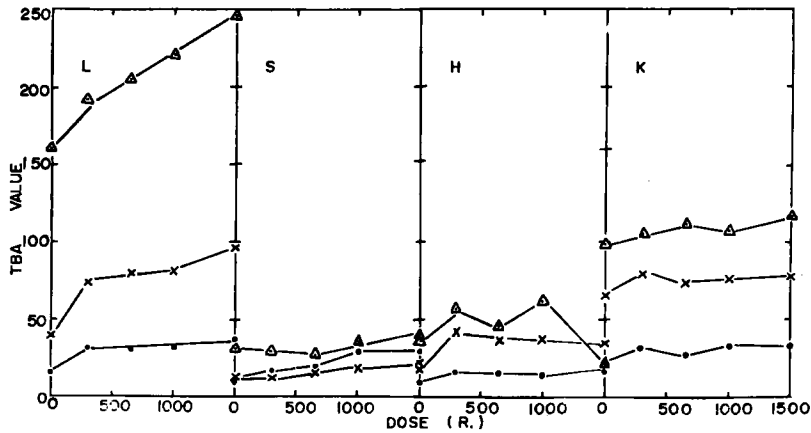


Fig.8

TBA values of lipid peroxidation in rat tissue homogenates 48 hours after whole-body irradiation.

Rats were fasted, and livers(L), spleens(S), hearts(H) and kidneys(K) from two animals were pooled for homogenization.

TBA value was measured after incubation for 60 minutes at 37° in the presence of Fe<sup>+</sup> (△) or ascorbate(×) and in the absence(•) of them.

ると、対照では endogenous の反応はゆるやかでアスコルビン酸および Fe<sup>+</sup> 添加によって反応の促進がみられ、肝、腎においては、endogenous < アスコルビン酸 < Fe<sup>+</sup> の順に高い値が得られたが、脾、心において endogenous とアスコルビン酸添加群の差は反応初期ではみられ難い。照射群の TBA 値は各臓器とも各反応系において対照より高い値を示めし、X 線照射群で有意の差が示めされた。また、照射にもなって反応の立ち上がりが早くなっており、ラグタイムの短縮が認められた。各臓器の Fe<sup>+</sup> 添加条件下における TBA 値の高低は、endogenous では少差であるにもかかわらず、肝、腎で著しい反応の増加がみられ、脾、心においてはこれらより低い値が得られた。反応時間 0 時における TBA 値は、照射群においてはすべての実験群でわずかなりとも増加している。このことは X 線照射により組織内に脂質過酸化物が形成されていることを示めす様にも考えられるが、逆に反応系を作るための操作時間が incubation の効果をあらわしているとも考えられる。

(2) X 線照射後の経過時間について： X 線照射後臓器摘出までの時間的影響を直後、24、48、72 時間目の臓器において、60 分 incubation の TBA 値で

検討した。肝においては時間の経過につれ、72 時間目まで endogenous、アスコルビン酸添加群、Fe<sup>+</sup> 添加群のいずれの値も上昇しているが、脾、心、腎ではあまりきわだった上昇は認めなかった(図 6)。

(3) X 線照射線量について： 図 7 に食餌投与ラット、図 8 に絶食ラットにおける照射線量依存の TBA 値の変動を示めす。両群とも肝では線量の増加につれて TBA 値の上昇がみられたが、脾、心、腎では有意の変動はみられなかった。

#### 考 察

Kohn ら(1944年)<sup>19)</sup> が動物組織中の過酸化脂質が TBA により赤色に発色することを発見して以来、種々検討され TBA 法が真の過酸化脂質の測定に使用されている。脂質過酸化反応の生成物はマロンアルデヒドとされ<sup>20) 21) 22) 23)</sup> その中間過程の機構は脂質の自動酸化の研究により論議され明らかにされて来た。

いずれにしても本実験における TBA 値発色物はマロンアルデヒドとして、その吸収曲線(図 1)は従来報告されている曲線と一致している<sup>21) 22)</sup> 従って本実験条件下での TBA 反応による TBA 値は脂質過酸化反応生成物量を測定しうることを示す。

正常組織には脂質過酸化物は存在しないとされているが<sup>27)</sup> 組織ホモゲネイトを好氣的条件下で incubate すると過酸化物を生ずる<sup>27)</sup> 本実験条件下において、正常臓器ではごく僅かである TBA 値に incubation によつての増加がみられる。反応促進因子として知られる Fe<sup>+</sup> 添加では incubation によつて著しい反応がみられる。このことは Barber<sup>24)</sup> が lipid peroxide potential として述べているごとく脂質過酸化形成能をみることになる。

放射線照射により過酸化脂質が形成されることは一般的に認められていることである<sup>11) 21)</sup> しかし本実験においても X 線照射により incubation を行なわずとも、対照に比して TBA 値がより高値に認められ過酸化物の形成が予想される。これも測定までの標準準備時間による incubation の効果をあらわしている可能性もある。従つて脂質過酸化反応能をみることにより、放射線照射効果を論じることになる。

このように反応活性で放射線照射効果をみる時、endogenous での反応系では僅かの反応しかみられず、アスコルビン酸、Fe<sup>+</sup> 添加においてより増巾された反応系でみる方が有意であろう。このような観点から対照群と X 線照射群を比較したところ、endogenous、Fe<sup>+</sup> において同様の反応活性の上昇がみとめられ、照射の効果が認められた。このことは、endogenous では逆に細胞内に存在する金属イオンによつて反応促進がおこっている可能性も示唆される。本実験において、肝、腎のように著明な Fe<sup>+</sup> 誘起の脂質過酸化能が認められる臓器では、アスコルビン酸添加でも同様の増巾効果が認められたが、より低い TBA 値しか得られない脾、心では、その効果が incubation 初期では認められなかった。

アスコルビン酸は Fe<sup>+++</sup> → Fe<sup>+</sup> の還元作用により脂質過酸化反応を促進するとも言われているが<sup>28)</sup> その作用機序は明らかでない。しかし、Fe<sup>+</sup> との関係は認められている<sup>25) 26)</sup>

脂質過酸化反応は基質、促進因子、阻害因子等の関連において考察されている。基質に関することは第 2 編<sup>27)</sup> で論ずるが、今阻害因子を考えた場合、組織レベルで比較した TBA 値が高低を示すにもかかわらず、抽出した lipid では変化が認められないという報告<sup>28) 29)</sup> もあり、阻害因子の存在が考えられる。事実癌細胞など脂質過酸化反応の低いものでは阻害因子が報告されている<sup>30)</sup> 又 X 線照射で阻害因子が破壊され、脂質過酸化反応をまねくという報告もあるが<sup>31)</sup> 本実験では各臓器において X 線照射により高値

の差はあれ、一様に脂質過酸化反応の増加が認められた。

本実験でもう一つ留意する点は誘導時間の問題である。一般に脂質過酸化反応は誘導時間のあるのが特徴とされている。lag のあるなしについて多くの報告がなされている<sup>32) 33) 34)</sup> このことは又反応中の阻害因子の破壊との関連を示唆している<sup>35)</sup> しかし lag のあるなしは実験条件で著しく影響され、単に阻害因子の破壊とも考えられず、基質の構造的な関連が予想されている<sup>36)</sup> 照射肝より分離したミトコンドリアの脂質では照射後時間の経過とともに lag の減少がみられている<sup>14) 36)</sup> lag の減少は脂質過酸化反応の活性の度合をあらわしているものと考えられ、脂質過酸化反応の連鎖反応性から考えてもこの lag に注目した方がより脂質過酸化反応能を示しうるかも知れない。本実験では X 線照射にともない lag の減少が認められている。

以上のような X 線照射による脂質過酸化能の増加は、照射線量によつて、肝では相関性がうかがわれるが、他の臓器では認めがたい。このことは肝における脂質代謝が X 線照射により影響を受け易いことを意味し、事実第 2 編にのべるごとく肝の脂質量に変動がみられている。特に基質と目されているリン脂質の増加がみられる。又肝においては照射後の経時的な変化が著しく、他の臓器では余りみられなかった。これらのことは特に肝における脂質過酸化反応が、X 線照射によつて依存的に変動しうるものが考えられる。このような脂質過酸化反応の肝における傾向は他の研究報告と類似している<sup>29) 37)</sup>

## 結 論

650R X 線全身照射にともなうラット各臓器の脂質過酸化反応を、TBA 反応によつて測定し、次の結果を得た。

(1) 肝、脾、心、腎各臓器における脂質過酸化反応は incubation により、endogenous ではごく僅かの TBA 値を示し、Fe<sup>+</sup> 添加により更に著しい反応の促進をみる。Fe<sup>+</sup> 添加による反応増加の高い肝、腎においてはアスコルビン酸添加でも同様反応の促進がみられたが、脾、心の反応初期では無添加群と有意の差は得られなかった。

(2) 照射動物よりの各臓器は対照に比して、いずれの場合も脂質過酸化反応の活性増大がみられた。

(3) Fe<sup>+</sup> 添加の TBA 値は無添加に比して高 TBA 値をしめし、X 線照射による反応の促進を拡大観

察出来ると思われる。

(4) 照射にともなう脂質過酸化反応促進の変化は誘導時間の短縮となってみられる。

(5) 線量依存性の変化は肝においてのみ観察され、又照射後の経時変化も肝においてのみ増大がみられた。

(6) 以上の結果、X線全身照射にともなう脂質過

酸化反応は特に肝で有意義な変化を示すものと思われる。

稿を終るに当たり御懇切なる御指導、御校閲を頂いた恩師山本道夫教授、田辺正忠助教授、山本剛禧博士、並びに御助言、御指導を頂いた癌研代謝部内海耕隼助教授に心からの感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Furnica, M., and Danicel, M., : *Fiziologia Norm. Patol.*, **14**, 173, 1968.
- 2) Zhulanova, Z.I., and Romantser, E.F., : *Biochem. J.*, **102**, 23, 1966.
- 3) Horgan, V.J., and Philpot, J.St.J., : *Int. J. Rad. Biol.*, **5**, 167, 1962.
- 4) Horgan, V.G., Philpot, J.St.L., Porter, B.W., and Roodyn, D.B., : *Biochem. J.*, **67**, 551, 1957.
- 5) Wyss, O., Wiesen, C., and Scheiberger, G.E., : *Rad. Res. Suppl.*, **3**, 184, 1963.
- 6) Philpot, J.St.L., and Roodyn, D.B., : *Int. J. Rad. Biol.*, **1**, 372, 1959.
- 7) 松平寛通, : 放射線細胞生物学, 朝倉書店, 東京, p 122, 1968.
- 8) 本庄市次郎, 崔英哲, : 基礎放射線生物学, 南江堂, 東京, 1966.
- 9) Pederson, T.C., and Aust, S.D., : *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **48**, 789, 1972.
- 10) 山本道夫, : 日医放会誌, **23**, 313, 1963.
- 11) 森野靖雄, : 岡山医学会雑誌, **83**, 537, 1971.
- 12) Bartsch, G.G., and Gerber, G.B., : *J. Lipid Res.*, **7**, 204, 1966.
- 13) Gould, R.G., and Lilly, E.H., : *Am. J. Physiol.*, **196**, 1231, 1959.
- 14) Utumi, K., Yamamoto, G., Yamamoto, M., and Tanabe, M., : *Nippon Acta Radiol.*, **26**, 345, 1966.
- 15) Wilbur, K.M., Bernheim, F., and Shapiro, O.W., : *Arch. Biochem. Biophys.*, **24**, 305, 1949.
- 16) Hunter, F.E., Gebicki, J.M., Hoffsten, P.E., Weinsten, J., and Scott, A., : *J. Biol. Chem.*, **238**, 825, 1963.
- 17) Bernheim, F., Bernheim, M.L.C., and Wilbur, K.M., : *J. Biol. Chem.*, **174**, 257, 1948.
- 18) Gornall, A.G., Basdawill, C.L., and David, M.M., : *J. Biol. Chem.*, **177**, 751, 1949.
- 19) Kohn, H.I., and Liversedge, M., : *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* **82**, 292, 1944.
- 20) Dahle, L.K., Hill, E.G. and Holman, R.T., : *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 253, 1962.
- 21) Wills, E.D., : *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 475, 1964.
- 22) Saslaw, L.D., and Waravdekar, V.S., : *Rad. Res.*, **24**, 375, 1965.
- 23) Patton, S., Keeney, M., and Kurtz, G.W., : *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **28**, 391, 1951.
- 24) Barber, A.A., and Bernheim, F., : *Adv. Geront. Res. Vol. II. Academic Press*, N, Y, and London. 1967.
- 25) 山本剛禧, 田辺正忠, 若林弘, 橋本郷之助, 山本道夫, : 生化学, **44**, 526, 1972.
- 26) 山本剛禧, 田辺正忠, 若林弘, 橋本郷之助, 山本道夫, : 日本癌学会総会記事, 第31回総会 (名古屋), p 194, 1972.
- 27) 渡辺節生, : 岡山医学会雑誌, 印刷中.
- 28) Wills, E.D., : *Int. J. Rad. Biol.*, **17**, 217, 1970.
- 29) Dawes, E.A., and Wills, E.D., : *Int. J. Rad. Biol.*, **22**, 23, 1972.
- 30) Utumi, K., Kanemasa, Y., Yashioka, T., and Oda, T., : *Life Sciences*, **9**, 473, 1970.
- 31) Lash, E.D., : *Arch. Biochem. Biophys.*, **115**, 332, 1966.
- 32) Bieri, J.G., and Anderson, H.A., : *Arch. Biochem. Biophys.*, **90**, 105, 1960.
- 33) Recknagel, R.O., and Ghoshal, A.K., *Lab.*

- Invest., **15**, 132, 1966.
- 34) Tappel, A.L., and Zalkin, H., : Arch. Biochem. Biophys., **80**, 333, 1959.
- 35) Bernheim, F., : Rad. Res. Suppl., **3**, 17, 1963.
- 36) Kawasaki, S., : J. Radiat. Res., **6**, 111, 1965.
- 37) Ichii, S., Yago, N., Omata, S., and Kobayashi, S., : J. Rad. Res., **9**, 85, 1968.

## Effects of Irradiation on Lipid

### Peroxidation in Rat Organs.

#### Part I. Effects of whole body irradiation on lipid peroxide formation in rat organs.

Setsuo Watanabe

Department of Radiation Medicine, Okayama University Medical School, Okayama, Japan ( Director : Prof. M. Yamamoto )

#### ABSTRACT

After the whole body X-irradiation (650R) of rats, the lipid peroxide formation of various organs were estimated by the TBA reaction, and the results are presented as follows :

(1) In TBA reaction tests on the lipid peroxidation in the liver, heart, spleen and kidney with homogenates being incubated, the TBA value were slightly high with endogenous homogenates, but on the addition of Fe<sup>+</sup> the reaction was further accelerated markedly.

With liver and kidney that showed a high reaction on addition of Fe<sup>+</sup>, the reaction was similarly accelerated on addition of ascorbic acid, but with heart and spleen the reaction at initial stage did not show any significant difference from that of the group without any addition.

(2) In every organ from the irradiated animal the activity of lipid peroxide formation was greater than that in organs from non-irradiated control animals.

(3) TBA value in the group added with Fe<sup>+</sup> were higher than those in the group without any addition, suggesting that X-irradiation greatly the lipid peroxidation in organs.

(4) Change in the acceleration of lipid peroxidation accompanying the irradiation appears as a shortening of reaction-induction time.

(5) Radioactivity-dose dependent change can be observed only in the liver, and the time-lapse change after irradiation can also observed only in the liver.

(6) These results suggest that the lipid peroxidation following the whole body X-irradiation shows a significant change primarily in the liver.