

| | |
|---------|-------------------------------|
| 氏 名(本籍) | すず 木 とし 俊 ひで |
| 学位の種類 | 博 士 (農 学) |
| 学位記番号 | 農 博 第 4 6 5 号 |
| 学位授与年月日 | 平 成 5 年 3 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 研究科専攻 | 東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻 |
| 学位論文題目 | 生体老化と膜リン脂質の過酸化に関する 研究 |

| | |
|------------|-------------|
| 論文審査委員(主査) | 教 授 藤 本 健四郎 |
| | 教 授 大久保 一 良 |
| | 教 授 山 内 文 男 |
| | 助教授 宮 澤 陽 夫 |

論文内容要旨

序論

生体内ではキサントキシンオキシダーゼ、NADPHオキシダーゼ、ミトコンドリア電子伝達系およびミクロソームP-450系などでのフリーラジカルの生成が知られている。これらの系で生成するフリーラジカルは老化現象に共通する機能障害や疾患に関与する可能性のあることが数多く報告され注目を集めている。生体成分のなかで脂質、とくに生体膜を構成するリン脂質はその脂肪酸の不飽和結合がフリーラジカルで誘発される過酸化反応を受けやすく、その結果として過酸化脂質を生じ生体膜の機能変化をきたす。生体膜の過酸化は膜結合性酵素や遺伝子の正常な生理機能の発現を障害する(チトクロムP-450系、グルコース-6-ホスファターゼ、 Na^+ , K^+ -ATPアーゼ、 Ca^{2+} -ATPアーゼ活性の低下)とともに細胞構造の破壊を招くと考えられている。これらの有害反応の集積が老化の一因を担っている可能性が考えられており、これが従来から提示されている”老化フリーラジカル説”である。これまでに生体の加齢老化に伴う過酸化脂質量の変化についてはさまざまな分析法を用いて検討されているが、過酸化反応の一次産物であるヒドロペルオキシドがどの程度臓器中に蓄積存在するかについての知見が得られていないため、生体老化に伴い真に脂質過酸化反応の亢進があるのか否かについての明確な結論は得られていない。

本研究では、生体老化に伴い生体膜の主要構成脂質であり機能的にも重要なリン脂質の過酸化が起こっているかを明確にすることを第一の研究目的として行った。まず、宮澤らがヒドロペルオキシド分析の目的で開発した化学発光-高速液体クロマトグラフ(CL-HPLC)法の生体過酸化リン脂質分析への実用性を、生体脂質過酸化モデルで検討した。また、膜の主要構成リン脂質であるホスファチジルコリン(PC)とホスファチジルエタノールアミン(PE)のヒドロペルオキシド型過酸化物同時検出のための至適分析条件を確立した。その後、培養細胞系、ラット組織およびヒト血液(血漿、赤血球)について加齢老化に伴う過酸化リン脂質の変化を明らかにした。さらに、生体内で過酸化リン脂質の生成を抑制する物質の効果を検討した。

第1章 生体過酸化脂質分析への化学発光-高速液体クロマトグラフ (CL-HPLC) 法の応用

CL-HPLC法はヒドロペルオキシド型過酸化脂質を超高感度で特異的に定量可能であり、生体試料分析への応用の可能性が考えられた。そこで、肝臓脂質の過酸化モデルである四塩化炭素 (CCl₄) 投与ラットを用い、CL-HPLC法の実用性を検討した。

SD系雄ラット (5週令, 120g; 船橋農場) に CCl₄-流動パラフィン (1:1, v/v) を胃ゾンデで1回経口投与 (0.2ml/100g 体重) し、投与6時間後、24時間後および1週間後に解剖して肝臓を得た。対照ラットには流動パラフィンのみを投与した。肝臓から Fig. 1の方法で抽出した総脂質を、CL-HPLC (Fig. 2) に供してホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) を定量した。その結果、肝臓PCOOH量は、投与6時間、24時間後と経時的に増加し、1週間後でも高い量が検出された (Fig. 3)。従来、過酸化脂質測定法として利用されているTBA法による肝TBA値はCCl₄投与初期ではPCOOH量と相関したが、PCOOHと同一の経時変化は示さなかった (Fig. 3)。なお、CCl₄投与による肝PCOOHの増加は、食餌中の α -トコフェロール量を増やすことで、ある程度抑制し得ることを確認した。以上のように、肝障害モデルであるCCl₄-投与ラットの肝臓でPCOOHの著増現象がはじめて定量的に明らかにされ、CL-HPLC法が生体過酸化脂質分析に実用可能で、これまでの分析法と異なる新たな指標となる事がわかった。

第2章 ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) とホスファチジルエタノールアミンヒドロペルオキシド (PEOOH) 同時分析条件の確立

生体膜を構成する脂質の中でPEはPCと共に主成分であり、その過酸化物の同時測定系が今後の研究に必要と思われたので、その至適

分析条件を検討した。同時に、ヒドロペルオキシド基に依存する化学発光反応系の高感度化、安定化を試みた。

PCOOHとPEOOHの相互分離が可能でしかも発光効率の高いCL-HPLC条件を検討した結果、カラムはアミノ基で修飾されたシリカ(Finepak SIL-NH₂, 日本分光社製)、溶媒系としてヘキサン/2-プロパノール/メタノール/水(5:7:2:1, v/v/v/v)を流速1.0ml/minで流すことによりPCOOHとPEOOHがそれぞれ1本の発光ピークとして相互分離可能で、かつ発光反応を阻害する α -トコフェロールとBHT(総脂質の抽出溶媒中に抗酸化剤として添加)からそれぞれ分離できることを確認した(Fig. 4)。また、ヒドロペルオキシド基由来化学発光反応の反応性を、ミキシングジョイントの温度、発光試薬のpH、流速、緩衝液の種類、発光試薬(ルミノール/チトクロムc)の濃度について検討した。その結果、至適分析条件はミキシングジョイントの温度は40°C、発光試薬として50mM H₃BO₃·KCl-Na₂CO₃緩衝液(pH10)にルミノール2 μ g/mlとチトクロムc 10 μ g/mlの割合で溶解したものを流速1.1ml/minで流すのが最適であった(Fig 5)。以上の分析条件で、市販固形試料で飼育したSD系雄ラット(5ヶ月)の肝臓と脳の総脂質を分析したところ、肝臓ではPCOOHがPEOOHより多く、脳ではPEOOHがPCOOHより多く存在していることがはじめて明らかになった(Fig. 6)。

第3章 ヒト全胚由来正常二倍体細胞の老化と膜過酸化リン脂質

ヒトや動物の正常細胞(繊維芽細胞)を培養すると、その細胞は無制限に継代されないで一定の継代後に死滅する。この細胞有限増殖性が、生物個体の寿命に関与している可能性が考えられている。そこで、細胞老化に膜過酸化リン脂質に関与しているか否かを知らうとした。

ヒト全胚由来正常二倍体細胞(HE-1、最大継代回数51回、以下PDL、population doubling levelと略)をEagle MEM培地20ml(10%牛仔血清を含む)を用い37°C、95%空気、5%二酸化炭素条件下で51

PDLまで継代培養した。継代数20,30,40,45-51PDL時の細胞より総脂質を抽出し、CL-HPLCに供してPCOOHを定量した。その結果、継代培養数20PDLの若い細胞に比べて49PDLで49.8倍、50PDLで51.4倍、51PDLで81.2倍(27.8 pmol PCOOH/10⁶細胞)PCOOHの蓄積が認められた(Fig. 7)。また、培地1mlにビタミンEを0.1μg、1μgおよび10μg添加して培養したところ、0.1μg、1μgの添加で細胞のリン脂質過酸化は有意に抑制されたが、細胞増殖性、継代培養数の増加(細胞寿命の伸延)は認められなかった(Table 1)。以上の結果より、培養細胞系では膜過酸化リン脂質の顕著な蓄積が細胞死直前に認められ、これはビタミンEにより予防されるが細胞寿命に影響のないことを確認した。

第4章 ラットの加齢老化と組織過酸化リン脂質

生物個体内の組織で、加齢老化に伴い過酸化脂質の増加があるか否かを知る目的で、ラットを長期間飼育したときの組織過酸化リン脂質量の変化を調べた。あわせて、組織リン脂質組成の変化も検討した。

SD系雌雄ラット(船橋農場)を、それぞれ1,7,12および18ヶ月間市販固形飼料(F-2、船橋農場)で飼育した。これらのラットから得た肝臓、脳、心臓および肺の総脂質を抽出しCL-HPLCに供してPCOOHを定量した。その結果、肝臓と脳で加齢に伴いPCOOHの増加することをはじめ確認した(Table 2,3)。心臓と肺では加齢に伴うPCOOH量の変化は認められなかった(Table 4)。また、これらの臓器の総脂質に占めるPC含量を測定したところ、加齢に伴いPCOOHの増加した肝臓と脳でPC比が有意に減少していた(Table 2-4)。生体の主要な抗酸化成分であるα-トコフェロール量は、1ヶ月令ラットの脳と肺で少なかった他は、加齢に伴う変化は認められなかった(Table 2-4)。以上の結果から、ラットの加齢・老化では各臓器のうちとくに肝臓と脳でPCOOHの蓄積が著しいこと、およびこの両臓器で生体膜脂質中のPC比が有意に減少する事を見出した。

第5章 若年者、老人および痴呆老人の血中過酸化リン脂質

ヒトの加齢に伴う過酸化脂質量の変化を知る目的で、健常若者と健常老人の血中（血漿、赤血球）の過酸化リン脂質量を調べた。あわせて、フリーラジカルがその発症に関与すると考えられている老人性痴呆症患者の血中過酸化リン脂質を定量した。

健常老人（51-91才、平均75才、20名）、痴呆老人（46-98才、平均76才、61名）および健常若者（22-27才、平均24才、12名）の血液をそれぞれ得、血漿からはクロロホルム/メタノール抽出で、赤血球からはRose法（クロロホルム/2-プロパノール、7:11, v/v）（Fig. 8）で総脂質を抽出し、これをCL-HPLCに供して過酸化リン脂質を定量した。

若年者の血中（血漿、赤血球）過酸化リン脂質は、比較的低い値でままとまっているのに対し、老人ではばらつきが大きく、しばしば高い値を示した（Table 5、Fig. 9）。痴呆老人ではPCOOH、PEOOHともに健常若者や健常老人より有意に高い値を示し（Table 5）、健常人の約20倍の値を示す例もあった（Fig. 9）。血漿の構成脂肪酸は、健常若者より健常老人で高度不飽和脂肪酸（20:5, 22:5, 22:6）が多く、健常老人と痴呆老人では有意差がなかった（Table 6）。一方、赤血球膜の構成脂肪酸は、健常若者と比べて健常老人で血漿と同様に高度不飽和脂肪酸（20:5, 22:5, 22:6）が多かったが、健常老人と比較すると痴呆老人で高度不飽和脂肪酸（20:5, 22:5, 22:6）の有意な減少が認められた（Table 6）。以上の結果より、ヒト血中の過酸化脂質は加齢によりしばしば高い値を示し、また痴呆症患者の赤血球では著しい蓄積のあることがはじめて明らかにされた。

第6章 含セレン化合物エブセレンの過酸化リン脂質減少効果

第5章の結果も含め、生体過酸化脂質がさまざまな疾病に関与していると考えられており、過酸化脂質生成抑制、減少作用のある物質は疾病予防、抗老化への応用の可能性が考えられる。そこで含セレン化

合物であるエブセレン (PZ51:2-phenyl-1,2-benzoiso-selenazol-3(2H)-one) (Fig. 10) の *in vitro* と *in vivo* での過酸化リン脂質減少作用を検討した。

① *in vitro*: 卵黄PCリボソームおよびヒト血漿にエブセレンを0, 1, 10, 100 μ M 添加し、37°Cで30分間インキュベートした。CL-HPLCでPCOOHを定量した結果、PCリボソームのPCOOH量はエブセレン未添加区で2459 nM、エブセレン添加区で364nM(1 μ M エブセレン)、83nM(10 μ M)、10nM 以下(100 μ M)であった (Fig.11)。ヒト血漿PCOOH量はエブセレン未添加区で146nM、添加区で30nM(1 μ M エブセレン)、19nM(10 μ M)および20nM(100 μ M) (Fig. 11) であり、エブセレンの強力なPCOOH減少作用がはじめて明らかにされた。② *in vivo*: 5ヶ月令のSD系雄ラットに、エブセレン [10mg/kg(E-10)、30 mg/kg(E-30)、100mg/kg(E-100)] を胃ゾンデで経口投与した。投与2、4、8時間後に心臓採血し肝臓を生理食塩水で灌流した後摘出した。CL-HPLCでPCOOHを定量した結果、エブセレンの経口投与により、その投与量および投与後の時間に依存して血漿PCOOH量が有意に減少することを確認した (Table 7)。しかし、赤血球膜と肝臓中のPCOOH量への影響は認められなかった。

総括

生体老化における膜リン脂質過酸化を定量的に明らかにすることを目的として本研究を行った。

1. 過酸化脂質の測定法として本研究室で開発したCL-HPLC法を生体脂質過酸化モデル系（四塩化炭素投与ラット）に応用し、生体試料中のヒドロペルオキシド型過酸化脂質の定量への有用性を確認した。
2. CL-HPLC法を発展させ、生体膜の主要な構成脂質であるホスファチジルコリンヒドロペルオキシドとホスファチジルエタノールアミンのヒドロペルオキシドの同時定量法を確立した。
3. 培養細胞を用い、細胞膜でその細胞寿命の後半に顕著な過酸化リン脂質の蓄積があることをはじめて明らかにした。ビタミンEの添加は、この過酸化リン脂質の蓄積を抑制したが、細胞寿命への影響はなかった。
4. 生物個体の加齢に伴う組織過酸化リン脂質量の変化を知るため、ラットを用いて検討した結果、加齢に伴いとくに肝臓と脳で顕著な過酸化リン脂質の蓄積があることをはじめて認めるとともに、この両臓器で老化に伴いPC/総脂質比の有意な減少のあることを見出した。
5. ヒト血中（血漿、赤血球膜）過酸化リン脂質含量は、加齢によりしばしば高い値を示し、また痴呆症患者の赤血球では著しい蓄積のあることがはじめて明らかにされた。
6. 合成含セレン化合物エブセレンがラットへの経口投与により血漿過酸化リン脂質を効果的に減少させることをはじめて明らかにした。

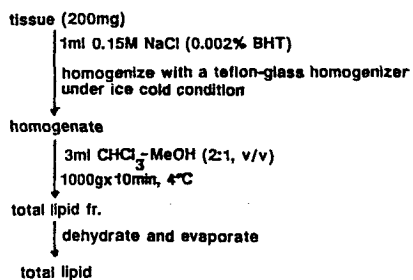


Fig.1
Extraction of total lipids from tissue organs.

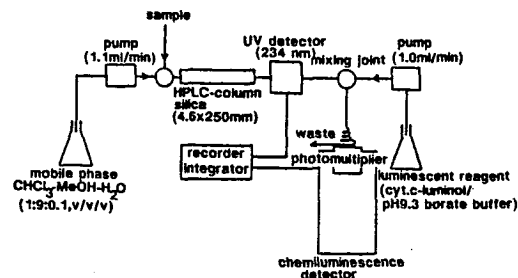


Fig.2
CL-HPLC system for the assay of phosphatidylcholine hydroperoxide.

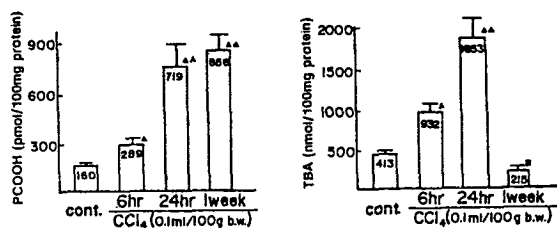


Fig.3
Liver PCOOH and TBA reactants in CCl_4 -intoxicated rats
mean \pm S.E. ^{*,**,*} $p < 0.05$

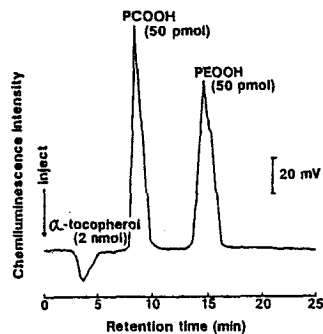


Fig.4
Chemiluminescence chromatogram of a mixture of PCOOH, PEOOH and α -tocopherol.

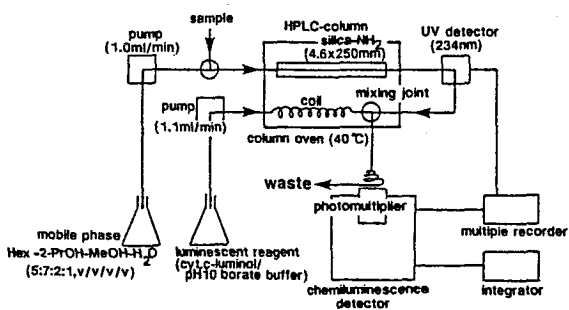


Fig.5
CL-HPLC system for the simultaneous assay of PCOOH and PEOOH.

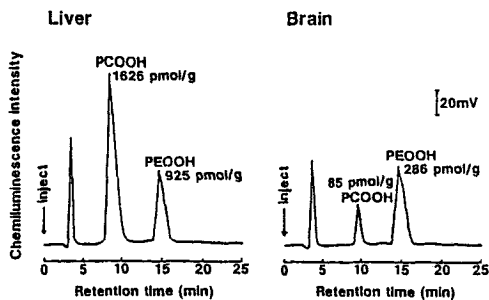


Fig.6
Chemiluminescence chromatograms of PCOOH and PEOOH detected in total lipids of rat liver and brain.

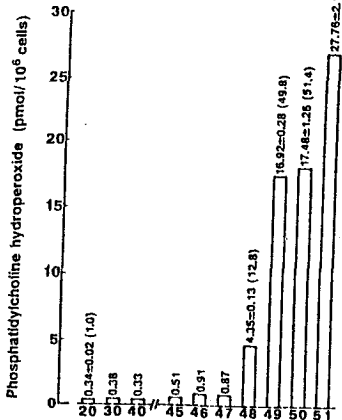


Fig.7 Changes of the content of PCOOH as a function of population doubling level of cultured human diploid cells.

Table 1 Effect of α -tocopherol on phosphatidylcholine hydroperoxide content of cultured human fetal diploid cells.

| Population doubling level | Cell numbers ($\times 10^6$ cells/flask) | | | | α -Tocopherol (ng/ 10^6 cells) | | | | PCOOH content (pmol/ 10^6 cells) | | | |
|---------------------------|-------------------------------------------|-----|----|-----------------|-----------------------------------------|-----|----|-----------------|------------------------------------|-----|-----|-----------------|
| | 0 | 0.1 | 1 | 10 ^a | 0 | 0.1 | 1 | 10 ^a | 0 | 0.1 | 1 | 10 ^a |
| 45 | 28 | 32 | 27 | 22 | <1 | 2 | 24 | 780 | 0.5 | 0.3 | 0.3 | 0.4 |
| 46 | 31 | 32 | 28 | 16 | <1 | 2 | 21 | 870 | 0.9 | 0.2 | 0.2 | 0.5 |
| 47 | 32 | 29 | 25 | 8 | <1 | 3 | 24 | 1600 | 0.9 | 0.9 | 0.3 | 0.9 |
| 48 | 29 | 29 | 23 | 6 | <1 | 2 | 20 | 1400 | 4.4 | 0.7 | 0.5 | 3.2 |
| 49 | 24 | 23 | 17 | 3 | <1 | 3 | 21 | 1500 | 16.9 | 2.1 | 0.7 | 18.7 |
| 50 | 20 | 19 | 14 | - ^b | <1 | 2 | 20 | - ^b | 17.4 | 2.2 | 0.7 | - ^b |
| 51 | 10 | 10 | 8 | - ^b | <1 | 2 | 24 | - ^b | 27.7 | 8.8 | 0.8 | - ^b |

^a α -Tocopherol (0, 0.1, 1 and 10 μ g/ml medium) was added to the medium.
^b not determined.
 Values represent the average of 3 experiments.

Table 2 Changes in lipid composition, α -tocopherol and PCOOH contents of the liver following the aging of the rat

| Rate (month) | Liver wt. (g) | TL (mg/g liver) | PC (mg/g liver) | | α -Toc (μ g/g liver) | PCOOH (pmol/g liver) |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| | | | (mg/g liver) | (mg/g TL) | | |
| Male | | | | | | |
| 1 | 7.2 \pm 0.8 ^a | 34.4 \pm 2.1 | 15.1 \pm 1.7 ^a | 468 \pm 10 ^a | 11.2 \pm 3.1 | 274 \pm 74 ^a |
| 7 | 21.9 \pm 3.9 ^a | 30.0 \pm 3.8 ^a | 13.3 \pm 2.5 | 433 \pm 52 ^a | 15.2 \pm 2.5 ^a | 674 \pm 19 ^a |
| 12 | 24.1 \pm 2.8 ^a | 38.0 \pm 4.7 ^a | 12.3 \pm 1.4 | 338 \pm 19 ^a | 9.3 \pm 2.3 ^a | 1983 \pm 388 ^a |
| 18 | 28.7 \pm 3.1 ^a | 33.0 \pm 7.8 | 9.9 \pm 1.1 ^a | 309 \pm 64 ^a | 13.2 \pm 0.9 ^a | 2558 \pm 348 ^a |
| Female | | | | | | |
| 1 | 5.6 \pm 0.5 ^a | 31.2 \pm 4.0 ^a | 13.4 \pm 2.8 | 425 \pm 32 ^a | 18.8 \pm 3.9 ^a | 409 \pm 26 ^a |
| 7 | 14.0 \pm 1.9 ^a | 28.7 \pm 5.2 ^a | 13.6 \pm 1.2 | 449 \pm 49 ^a | 33.3 \pm 4.3 ^a | 1265 \pm 172 ^a |
| 18 | 14.1 \pm 2.2 ^a | 49.6 \pm 7.0 ^a | 13.6 \pm 1.6 ^a | 274 \pm 41 ^a | 25.1 \pm 3.6 ^a | 1917 \pm 432 ^a |

Values are mean \pm SD of 6 rats per each aged group.
 Means not followed by superscript letters are significantly different ($p < 0.001$) in each column and sex.
^a Significantly different from corresponding male rat $p < 0.001$.
 TL, phosphatidylcholine; PCOOH, Phosphatidylcholine hydroperoxide; α -Toc, α -tocopherol; TL, total lipids.

Table 3 Changes in lipid composition, α -tocopherol and PCOOH contents of the brain following the aging of the rat

| Rate (month) | Brain wt. (g) | TL (mg/g brain) | PC (mg/g brain) | | α -Toc (μ g/g brain) | PCOOH (pmol/g brain) |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| | | | (mg/g brain) | (mg/g TL) | | |
| Male | | | | | | |
| 1 | 1.6 \pm 0.1 ^a | 54.2 \pm 5.2 ^a | 14.6 \pm 1.6 | 283 \pm 28 ^a | 6.3 \pm 0.9 ^a | 131 \pm 46 ^a |
| 7 | 2.1 \pm 0.1 ^a | 68.2 \pm 6.1 ^a | 14.5 \pm 2.3 | 319 \pm 24 ^a | 12.4 \pm 0.5 ^a | 168 \pm 49 ^a |
| 12 | 1.9 \pm 0.1 ^a | 71.2 \pm 4.2 ^a | 14.6 \pm 1.2 | 308 \pm 21 ^a | 11.4 \pm 1.7 ^a | 474 \pm 77 ^a |
| 18 | 1.9 \pm 0.1 ^a | 66.7 \pm 6.8 ^a | 12.3 \pm 2.2 | 177 \pm 22 ^a | 12.5 \pm 1.9 ^a | 573 \pm 144 ^a |
| Female | | | | | | |
| 1 | 1.6 \pm 0.1 ^a | 55.3 \pm 2.9 ^a | 15.1 \pm 1.9 | 267 \pm 22 ^a | 8.7 \pm 2.4 ^a | 163 \pm 41 ^a |
| 7 | 1.8 \pm 0.1 ^a | 64.4 \pm 4.1 ^a | 13.2 \pm 1.0 | 206 \pm 12 ^a | 14.3 \pm 0.4 ^a | 319 \pm 56 ^a |
| 18 | 1.8 \pm 0.1 ^a | 71.8 \pm 8.5 ^a | 14.7 \pm 2.2 | 196 \pm 8 ^a | 15.3 \pm 2.1 ^a | 576 \pm 73 ^a |

Values are mean \pm SD of 6 rats per each aged group.
 Means not followed by superscript letters are significantly different ($p < 0.001$) in each column and sex.
 Abbreviations are the same as in Table 2.

Table 4 Changes in lipid composition, α -tocopherol and PCOOH contents of the heart and lung following the aging of the male rat

| Rate (month) | Heart wt. (g) | TL (mg/g heart) | PC (mg/g heart) | | α -Toc (μ g/g heart) | PCOOH (pmol/g heart) |
|--------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| | | | (mg/g heart) | (mg/g TL) | | |
| Heart | | | | | | |
| 1 | 0.6 \pm 0.1 ^a | 23.0 \pm 1.9 ^a | 9.6 \pm 1.8 | 435 \pm 70 ^a | 13.7 \pm 1.9 ^a | 506 \pm 152 ^a |
| 7 | 1.5 \pm 0.1 ^a | 22.1 \pm 1.8 ^a | 10.8 \pm 0.6 | 491 \pm 51 | 20.4 \pm 0.5 ^a | 434 \pm 39 ^a |
| 12 | 1.5 \pm 0.1 ^a | 18.8 \pm 0.9 ^a | 10.0 \pm 0.8 | 527 \pm 68 | 21.6 \pm 1.9 ^a | 635 \pm 129 ^a |
| 18 | 1.6 \pm 0.1 ^a | 23.5 \pm 6.8 | 10.0 \pm 1.4 | 539 \pm 28 ^a | 21.4 \pm 2.1 ^a | 798 \pm 175 ^a |
| Lung | | | | | | |
| 1 | 0.9 \pm 0.1 ^a | 25.6 \pm 3.6 | 6.9 \pm 0.9 | 292 \pm 23 ^a | 18.3 \pm 3.1 | 145 \pm 43 |
| 7 | 1.8 \pm 0.2 ^a | 24.6 \pm 5.0 | 5.8 \pm 0.8 | 230 \pm 44 ^a | 22.0 \pm 0.8 ^a | 125 \pm 39 |
| 12 | 2.0 \pm 0.2 ^a | 24.0 \pm 4.9 | 5.6 \pm 0.4 | 236 \pm 46 | 16.8 \pm 2.5 | 88 \pm 40 |
| 18 | 2.3 \pm 0.1 ^a | 20.5 \pm 2.6 | 5.9 \pm 0.5 | 268 \pm 14 | 17.9 \pm 1.3 ^a | 92 \pm 37 |

Values are mean \pm SD of 6 rats per each aged group.
 Means not followed by superscript letters are significantly different ($p < 0.001$) in each column and sex.
 Abbreviations are the same as in Table 2.

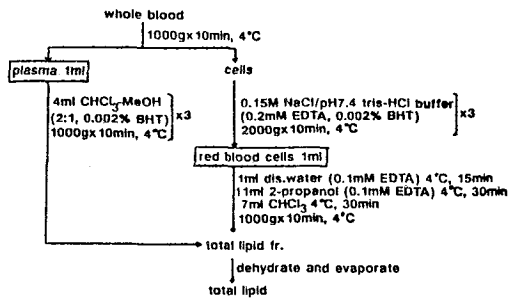


Fig.8
Extraction of total lipids from plasma and red blood cells.

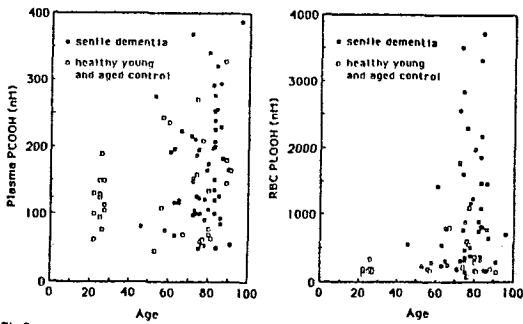


Fig.9
Phospholipid hydroperoxides content of human plasma and red blood cells.

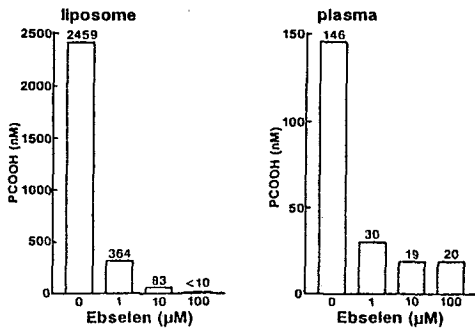


Fig. 11
Changes of PCOOH content of liposome and human plasma incubated with ebselen.

Table 5
Thiospholipid hydroperoxide content of human blood plasma and erythrocyte membrane.

| Subject | plasma | | RBC membrane | | |
|------------------------------------|----------------|------------|----------------|----------------|----------------------|
| | PCOOH (nM) | PEOOH (nM) | PCOOH (nM RBC) | PEOOH (nM RBC) | PCOOH+PEOOH (nM RBC) |
| healthy young (av.24 years,n=20) | 120 ± 9 (1.0) | <10* | 93 ± 17 (1.0) | 121 ± 20 (1.0) | 214 ± 19 (1.0) |
| aged control (av.75 years,n=20) | 140 ± 18 (1.2) | <10* | 162 ± 52 (1.7) | 186 ± 40 (1.5) | 348 ± 46 (1.6) |
| Senile dementia (av.75 years,n=61) | 170 ± 11 (1.4) | <10* | 476 ± 70 (5.1) | 494 ± 62 (4.1) | 970 ± 66 (4.5) |

* below 10nM, mean ± SE, * p < 0.005.

Table 6
Polyunsaturated fatty acid profiles of total lipids in human blood plasma and erythrocyte membrane.

| Subject | fatty acids | | | | |
|-----------------|------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | Linoleate (18:2) | Arachido nate (AA,20:4) | Eicosapenta enoate (EPA,20:5) | Docosapenta enoate (DPA,22:5) | Docosahexa enoate (DHA,22:6) |
| Plasma | | | | | |
| young | 32.6 ± 1.3 | 4.6 ± 0.4 | 0.6 ± 0.1 | 0.2 ± 0.03 | 2.0 ± 0.2 |
| aged control | 28.4 ± 1.1* | 6.1 ± 0.4 | 3.6 ± 0.2* | 0.7 ± 0.1* | 5.0 ± 0.5* |
| senile dementia | 23.8 ± 1.0* | 6.7 ± 0.3 | 3.1 ± 0.3* | 0.7 ± 0.1* | 6.0 ± 0.2* |
| Erythrocytes | | | | | |
| young | 20.0 ± 2.9 | 9.3 ± 0.9 | 1.0 ± 0.2 | 0.8 ± 0.2 | 4.8 ± 0.6 |
| aged control | 6.7 ± 0.3** | 12.2 ± 0.3 | 3.1 ± 0.1* | 2.1 ± 0.1* | 11.5 ± 0.4** |
| senile dementia | 13.7 ± 0.7* | 11.8 ± 0.5 | 2.4 ± 0.2* | 1.6 ± 0.2 | 9.2 ± 0.8* |

mean ± SE, *,** p < 0.005.

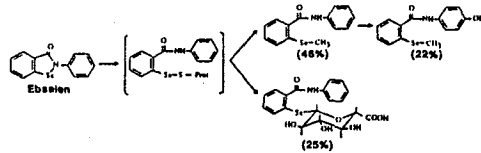


Fig.10
Biotransformation of oral ebselen in rat plasma.

H. Flecher et al. Toxicologia (1990)

Table 7
Changes of plasma phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH) content of rats after oral-administration of ebselen.

| system | PCOOH nM | | | |
|-------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | time after dose of ebselen | | | |
| +ebselen | 2 hr | 4 hr | 8 hr | |
| | E- 10 | 26.3 ± 4.4*(0.54) | 6.7 ± 1.9* (0.14) | 42.9 ± 3.7*(0.88) |
| | E- 30 | 5.6 ± 1.1*(0.11) | 7.4 ± 1.1* (0.16) | 11.1 ± 1.1*(0.23) |
| | E-100 | 3.3 ± 0.7*(0.07) | 4.8 ± 1.5* (0.10) | 16.9 ± 4.8*(0.33) |
| control(-ebselen) | 48.8 ± 10.0* (1.00) | | | |

Values are mean ± SD of 5 rats per group.
Means not follow by common superscript letters are significantly different at p<0.005 according to Student's t-test.

審査結果の要旨

生体中の電子伝達系を始めとする代謝系では、フリーラジカルの生成が知られており、これらは通常、各種消去系の作用により一定のレベルで抑えられていると考えられている。しかし、フリーラジカルの生成と消去のバランスが崩れた時には、フリーラジカルは膜脂質の過酸化を惹起し、ひいては機能障害を引き起こす。こうしたフリーラジカルが、老化の原因ではないかという考えは広く受け入れられており、生体の加齢に伴う過酸化脂質量の変動についても多くの報告がある。しかし、従来生体中の脂質ヒドロペルオキシドを特異的に定量する方法は確立されていなかった。そこで、本研究では、最近開発された化学発光—高速液体クロマトグラフ (CL-HPLC) 法を応用し、生体老化に伴うリン脂質ヒドロペルオキシドの変動について検討したものである。

第1に、CL-HPLC法の臓器リン脂質ヒドロペルオキシド測定の実用性について検討するため、肝脂質過酸化亢進のモデルである四塩化炭素投与ラットについて、定量を試みた。その結果、四塩化炭素投与に伴い肝臓のホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) は顕著に増加したが、そのレベルは従来用いられてきたチオバルピツール酸 (TBA) 値の約 10^{-3} であり、TBA値は組織不飽和脂肪酸含量の影響を強く受け、必ずしもヒドロペルオキシド量を反映していないことが明らかになった。

第2に、最大51回の継代寿命を示すことが知られているヒト全胚由来正常二倍体細胞の継代に伴うPCOOH量の変動を調べたところ、47代まではほとんど変化が見られなかったが、その後急激に増加し、51代で幼若細胞の80倍に達した。ビタミンEを培地に添加したところ、PCOOHの蓄積は効率よく抑えられたが、継代に伴う細胞増殖の低下および寿命の延長は認められなかった。

第3に、ラットを長期間飼育したときの組織過酸化脂質量の変動を調べ、肝臓および脳では加齢と共に増加するが、心臓や肺では変化がなく、組織過酸化は臓器によって異なることを初めて明らかにした。また、過酸化脂質が増加した組織でも、ビタミンEレベルの低下は認められなかった。

第4に、ヒトの老化および痴呆性疾患に伴う血中の過酸化脂質の変動を調べたところ、若年者では低レベルだったが、老人では高い値をしばしば示す例があり、特に痴呆老人では有意に正常老人より高かった。

以上の研究結果は、従来明確でなかった加齢に伴う生体脂質ヒドロペルオキシドの変動について多くの新しい知見を加えるもので、老化と過酸化脂質の関係を探る上で重要な貢献をするものとして、著者に博士 (農学) を授与するに値するものと判定した。