

氏 名（本籍）	あら 荒	い 井	ひろ 啓	ゆき 行
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医	博	第 9 5 0	号
学位授与年月日	昭 和 6 1 年 3 月 2 5 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学研究科 (博士課程) 内科学系専攻			
学 位 論 文 題 目	脳組織におけるフリーラジカル反応機構に関する 研究			

(主 査)

論文審査委員 教授 小 暮 久 也 教授 後 藤 由 夫

教授 岩 崎 祐 三

論文内容要旨

目 的

脳虚血, Neuronal ceroid lipofuscinosisをはじめとする神経疾患や, 高圧酸素による中枢神経毒性の病態形成との関連において, Free radical 反応, 特に脂質過酸化反応の関与が, 指摘されている。これまでの研究では, 過酸化脂質の定量, 抗酸化性物質や共役ジェンの測定, 脂肪酸組成の変化などを指標として, In Vivo および In Vitro で過酸化反応が検討されてきたが, いまだ, 不明な点が多く, 詳細は明らかにされていない。そこで, 本研究は, Brain homogenate に酸素を曝露する反応系を用いて, 脳組織における Free radical 反応機構, 特にその initiator の生成機序を明らかにすることを目的として行われた。

方 法

Wistar 系 rat 雄 (体重 250~300 g) の脳を用い, 0.1 M Tris-HCl buffer PH 7.4 中で, 10% Brain homogenate を作成し, これに, 37°C で純酸素を曝露する反応系を用いて, 以下のような実験を行なった。(1) Oxygenated brain homogenate における Free radical 反応, 特に脂質過酸化反応を確かめるため, 過酸化脂質定量, 脂肪酸組成分析を行ない, また Di-tert-butylhydroquinone (1×10^{-4} M) の化学発光に及ぼす影響を検討した。(2) 化学発光にあづかる励起種を明らかにするため, 発光スペクトル分析を行なった。(3) Free radical 反応機序を明らかにするため, Fe^{3+} (1 mM), Ascorbate (1 mM), NADPH (2 mM), Deferoxamine (1.5 mM or 0.36 mM), Ascorbate oxidase (30 U/ml), Superoxide dismutase (5.7×10^{-7} M), Catalase (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および Ceruloplasmin (0.3 mg/ml) を Brain homogenate に添加し, 過酸化脂質生成および化学発光に対する影響を検討した。同様に, 種々の濃度の Ascorbate (0.01~10 mM) の作用も検討した。また, 外因性に Fe^{3+} -ADP を Brain homogenate に添加し, Fe^{3+} -ADP の Fe^{2+} -ADP への還元反応を 520 nm における吸収により測定した。(4) 生成した脂質ラジカルを直接捕捉するために, Electron Spin Resonance (ESR) spectrometry を行なった。(5) Free radical 反応が, 脳蛋白質分子に与える影響を調べるため, 脳蛋白の SDS-polyacrylamide gel electrophoresis を行なった。

結 果

I, Brain homogenate の Oxygenation に伴ない, 過酸化脂質生成量は増加し, 逆に多価不飽和脂肪酸である Docosahexaenoic acid ($\text{C}_{22:6}$) や Arachidonic acid ($\text{C}_{20:4}$) は減少した。ま

た、Radicalトラップ剤であるDi-tert-butylhydroquinoneは、化学発光を抑制した。このことは、Oxygenated brain homogenateにおいて確実にFree radical反応、特に脂質過酸化反応が起きていることを意味し、化学発光をFree radical反応の指標と考えることができると結論された。Deferroxamineは化学発光をほぼ完全に抑制し、またAscorbate oxidaseも非常に強い抑制を示した。これに対して、Superoxide dismutaseやCatalaseによってはあまり抑制は認められなかった。Ceruloplasminは、中等度の抑制作用を示した。0.01~1.2mMのAscorbate添加は、化学発光に対して、促進的に作用したが、1.2 mM以上のAscorbateは、徐々にその抑制を強めた。これらの結果より、Free radical反応のinitiationには、鉄イオンおよび還元型Ascorbateが最も、重要な働きをしているものと思われた。

一方、 Fe^{3+} -ADPをBrain homogenateに添加すると、 Fe^{3+} -ADPはすみやかな還元を受け、 Fe^{2+} -ADPとなる事が確認された。また、あらかじめBrain homogenateに、Ascorbate oxidase (29U/ml)を添加しておくと、初期の還元反応は消失し、後のゆっくりした還元反応のみが残った。後者はNADPH (2mM)添加により増強された。即ち、脳組織は、Ascorbate依存性のすみやかな、またNADPH依存性のゆっくりした Fe^{3+} の還元活性を有するものと考えられた。従って、initiation反応機構として、以下のような機序を想定することが可能であると思われる。

(1)還元型として存在しているAscorbateが、脳組織内に微量に存在していると考えられる3価の遊離鉄や、Nucleotideなどとゆるく結合している3価の鉄イオンを一電子還元し、2価の鉄イオンが、生成される。

(2)生成された2価の鉄イオンは、続いて O_2 と配位し、よりエネルギー準位の高いPerferryl-ion型の鉄錯体を形成する。

(3)生成したPerferryl ionは、隣接する脂質より電子を引き抜き、脂質過酸化反応が開始される。

II, Brain homogenateからの発光スペクトル分析より、主たる励起種は、励起インドール化合物であると思われた。この励起インドール化合物は、脂質ラジカルとのinteractionにより生成されるものと思われた。SDS-polyacrylamide gel電気泳動上、脳蛋白の泳動パターンに、著明な変化が認められなかったのも、このような、Lipid-protein interactionが生じ、得たエネルギーは、化学発光という形で失われ、蛋白の構造が守られたためと思われた。従って、Lipid-protein interactionは、生体膜の構造維持という点で重要な現象であると思われた。

審 査 結 果 の 要 旨

虚血性神経細胞障害, Neuronal ceroid lipofuscinosis また高圧酸素療法による中枢神経毒性の pathogenesis の1つとして, free radical 反応, 特に脂質過酸化反応の関与が指摘されている。free radical 反応はまた, 隣接するタンパク質分子, アミノ酸および核酸などにも障害を与え, 細胞を不可逆的な死に至らしめる可能性も考えられている。そこで, 本研究は, Brainhomogenate に, 酸素を曝露する反応系を用いて, 脳組織における free radical 反応, 特にその, initiation 機構を明らかにするために行なわれた。Wistar 系 rat 雄(体重250~300 g)の脳を用い, 0.1 M Tris-HCl buffer pH7.4中で, 10% brain homogenate を作成し, これに37℃で, 純酸素を曝露する反応系を用いて, 以下のような実験を行なった。(1)Brain homogenate の酸素化に伴う過酸化脂質生成量の変化および脂肪酸組成分析。(2)Oxygenated brain homogenate からの化学発光にあづかる励起種を明らかにするための発光スペクトル分析。(3) Fe^{3+} (1 mM), Ascorbate (1mM), NADPH (2mM), Deferroxamine (0.36mM), Ascorbate oxidase (30U/ml), Superoxide dismutase (5.7×10^{-7} M), Catalase (20 μ g/ml) およびCeruloplasmin (0.3mg/ml) が brain homogenate の酸素化に伴う過酸化脂質生成および化学発光強度に及ぼす影響の検討。(4)Electron Spin Resonance (ESR) spectrometry による Ascorbate free radical と脂質ラジカルの捕捉。(5) $\alpha \cdot \alpha'$ -dipyridyl (0.87mM) による脳組織における鉄還元活性の証明。(6)SDS-polyacrylamide gel electrophoresis による脳蛋白質分子の構造的変化の検討。これらの実験により, brain homogenate への酸素の曝露は, 過酸化脂質の生成と多価不飽和脂肪酸の選択的減少をもたらし, 脂質過酸化反応の存在を裏付けた。一方, 鉄キレート剤であるDeferroxamine は, 化学発光および過酸化脂質生成をほぼ完全に抑制し, Ascorbateoxidase もこれらを強く抑制した。これに対して, Superoxide dismutase や Catelase は, 有意な抑制を示さなかった。脳組織は, 主に, Ascorbate 依存性に, 鉄還元活性を示した。発光スペクトル分析より, 主たる発光本体は励起インドール化合物であり, free radical 反応により蛋白質が励起を受けている可能性が示唆されたが, 脳蛋白質の電気泳動パターンには著明な変化は認められなかった。

以上より, 脳組織における free radical 反応は, 鉄触媒性に開始され, しかも, 鉄(三価鉄)は, 主としてAscorbate により還元を受け, 二価鉄-酸素複合体を形成することは, 確実なことと思われた。鉄酸素錯体を initiator として開始された free radical 反応は, 脂質と蛋白質の相互作用により化学発光を生じて termination を起しながら, ゆっくりと進行することを明らかにし得た。よって, 本研究は, 学位授与に値するものと考ええる。