

セレン欠乏ラット胆汁中過酸化水素量と肝スーパーオキシドジスムターゼ活性との関係

松本謙一郎,* 宇井伊織, 餅田貴行, 坂本礼子, 遠藤和豊

Relation of Bile Hydrogen Peroxide Level and Liver Super Oxide Dismutase Activity in Selenium-Deficient RatsKen-ichiro MATSUMOTO,* Iori UI, Takayuki MOCHIDA,
Reiko SAKAMOTO, and Kazutoyo ENDO*Department of Physical Chemistry, Showa Pharmaceutical University, 3-3165
Higashi-Tamagawagakuen, Machida, Tokyo 194-8543, Japan*

(Received December 21, 2001; Accepted March 15, 2002)

The relationship of hydrogen peroxide (H_2O_2) levels in bile with liver SOD and GSH-Px activity in selenium (Se)-deficient rats is discussed. Normal rats and 7 groups of rats fed a Se-deficient diet with different feeding periods were examined. H_2O_2 levels in bile were measured using the spin-trapping method with electron spin resonance (ESR). Bile H_2O_2 levels in the initial stage (20–60 min from start of the cannulation) of measurement were increased depending on the length of the feeding period with the Se-deficient diet and absence of Se. Bile H_2O_2 levels in the later stage (60–120 min) of measurement first increased with the length of feeding with the Se-deficient diet and then decreased with longer feeding periods. Bile H_2O_2 levels immediately after the operation were relatively low in almost all cases. The operation may result in oxidative stress to generate H_2O_2 . Liver GSH-Px activity decreased depending on the length of the feeding period with the Se-deficient diet and existence of Se. Liver SOD activity increased in Se-deficient groups. It is suggested that the H_2O_2 levels in bile are related to decreased GSH-Px activity, SOD activity, and also the oxidative stress caused by surgery. Therefore the H_2O_2 levels in bile can be used as an index of sensitivity to oxidative stress. Although severe oxidative stress may decrease SOD activity, Se deficiency can induce liver SOD activity.

Key words—oxidative stress; X-band ESR; Fenton's reaction; spin trapping; hydroxyl radical; glutathione peroxidase

緒 言

グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) は活性中心にセレン (Se) を含有する酵素で, 生体内で生成する過酸化水素 (H_2O_2) を水 (H_2O) に還元する働きをしている。また, 膜結合型の GSH-Px は, 膜脂質構成脂肪酸及び遊離脂肪酸のヒドロペルオキシド (L-OOH) を対応するアルコールへ還元することができる。これらの働きにより, 細胞を構成する成分を酸化変性から守り, 特に生体膜の安定化のために非常に重要な役割を担っている。赤血球膜の防御においては, カタラーゼ (CAT) よりも重要と考えられている。¹⁾ 活性中心である Se が欠乏すると, GSH-Px の活性は減少し, 生体内で H_2

O_2 を分解する機能が低下する。最近, 本研究室でも, 8 週齢の雄の Se 欠乏ラットにおいて正常ラットに比べて胆汁中の H_2O_2 が有意に増加する事を報告した。²⁾ H_2O_2 が増加すれば, Harber-Weiss 反応や Fenton 反応を介してヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) の生成が増加すると予想される。 $\cdot OH$ は活性酸素種の中でも特に反応性が高く, 脂質, タンパク質, 核酸の機能を酸化的に障害する。

好気性生物が酸素を利用する過程では, 常にスーパーオキシド ($\cdot O_2$) の生成を余儀なくされている。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は, この $\cdot O_2$ を H_2O_2 と O_2 に不均化する。ここで生成された H_2O_2 は GSH-Px や CAT によって速やかに H_2O へ分解される。哺乳動物では Cu/Zn-SOD と Mn-SOD の存在が知られており, 前者は主に細胞質に後者はミトコンドリアに存在する。Mn-SOD は種々の酸化的ストレスによって誘導されることが

知られており、Se 欠乏ラットにおいても SOD 活性の上昇が予想される。しかし Se 欠乏に伴う酸化ストレスの場合には、SOD 活性の上昇が、GSH-Px 活性の低下した状態においてむしろ H_2O_2 量を増加してしまうと予想される。そのため最終的には $\cdot\text{OH}$ の生成を増加するものと思われ、生体にとってはかえって逆効果をもたらす可能性がある。同時に Cu/Zn-SOD は H_2O_2 によって失活することが知られている。そのため Se 欠乏による酸化ストレスの下では、逆に総合的な SOD 活性が低下する可能性も十分に考えられる。

そこで本研究では、Se 欠乏餌による飼育開始時期の異なるラットを用いて、肝臓での GSH-Px 活性の低下に伴う酸化ストレスが肝臓の SOD 活性に及ぼす影響を調べることにした。また同時に、肝臓の SOD 活性が、胆汁中 H_2O_2 レベルへ及ぼす影響を検討した。

実験の部

1. 試薬 5,5-dimethyl-1-pyrrole-N-oxide (DMPO) はラボテック株式会社(東京)より購入した。キサントンオキシダーゼ (XOD) 及び SOD は Roche Diagnostics Co. (Indianapolis, IN) より購入した。その他の試薬は特級試薬を使用した。

2. 動物 ㈱日本医科学動物資材研究所(東京)から 8 週齢の Wistar 系雄ラットを購入し、正常群として実験に使用した。同所より 7 週齢の Wistar 系雄ラットを購入し、Se 欠乏餌(オリエンタル酵母株式会社, 東京)と超純水を与えて 8 週齢に至るまで 1 週間飼育した (SeD'7-8 群)。同様に 6, 5, 4, 及び 3 週齢のラットを購入し、それぞれ 8 週齢に至るまで 2, 3, 4, 及び 5 週間、Se 欠乏餌と超純水を与えて飼育した (SeD'6-8 群, SeD'5-8 群, SeD'4-8 群, SeD'3-8 群)。同所より妊娠 15 日目の Wistar 系ラットを購入し、Se 欠乏餌と超純水を与えて飼育を開始した。仔ラットを 4 週齢で離乳するまでは、親ラットに同様の餌と水を与え続けた。離乳後の仔ラットは、同様の餌と水を与えて 8 週齢に至るまで飼育した (SeD 群)。また超純水に Na_2SeO_4 を添加して、Se として 0.1 ppm に調製した飲料水を与えて SeD 群と同様に飼育したものを SeC 群とした。各ラットは実験の前日から一晩絶食した後に実験に使用した。8 週齢における平均体重 \pm 標準偏差

(一晩絶食後) は、正常群で $218.8 \pm 7.5 \text{ g}$ ($n=12$)、SeD'7-8 群で $210.9 \pm 3.9 \text{ g}$ ($n=7$)、SeD'6-8 群で $212.4 \pm 8.9 \text{ g}$ ($n=6$)、SeD'5-8 群で $211.1 \pm 11.4 \text{ g}$ ($n=6$)、SeD'4-8 群で $203.4 \pm 9.5 \text{ g}$ ($n=8$)、SeD'3-8 群で $159.0 \pm 22.1 \text{ g}$ ($n=7$)、SeC 群で $123.8 \pm 10.3 \text{ g}$ ($n=4$)、SeD 群では $129.1 \pm 25.1 \text{ g}$ ($n=5$) であった。

3. 胆汁中 H_2O_2 の測定 ラットをネンブタール (50 mg/kg b.w., ip) で麻酔し、胆管にカニューレションを施した。直ちに胆汁 25 μl をマイクロチューブに採取し、DMPO 5 μl 、超純水 5 μl 、0.5 mM 硫酸鉄水溶液 5 μl を添加して、ボルテックミキサーで攪拌した。反応溶液をキャピラリーに吸い取り、X-バンド ESR (FA-100, JEOL, 東京) で、反応開始から約 1 分後に ESR スペクトルを測定した (マイクロ波周波数 9.4 GHz, マイクロ波出力 10 mW, 磁場変調幅 0.1 mT, 変調周波数 100 kHz)。ここでは、胆汁中の H_2O_2 と鉄との反応で生じた $\cdot\text{OH}$ を DMPO でトラップし、生じた DMPO-OH アダクトの ESR シグナルを測定した。内部標準のマンガンのシグナル強度を 1 として、DMPO-OH の 4 本線シグナルのうち、低磁場側から 2 番目のピークの相対強度を求め、これを H_2O_2 レベルとして評価した。以後、手術開始 (開腹) から 2 時間経過するまで、約 5 分間隔で胆汁を採取して測定を繰り返し行った。手術開始から約 15 分-25 分の間で傷口を縫合した。

4. 肝臓中の GSH-Px 活性及び SOD 活性の測定 胆汁中 H_2O_2 の測定を終えたラットは、断頭により屠殺し、肝臓を氷冷した生理食塩水で十分に灌流した後に摘出した。肝臓の一部に超純水を加えてホモジナイズし試料とした。GSH-Px 活性は Paglia と Valentine の方法³⁾の変法により測定した。SOD 活性は Mitsuta らの方法⁴⁾の変法により測定した。肝ホモジネート中の蛋白量を BIO-RAD (CA, USA) の蛋白定量キットを用いて測定し、GSH-Px 及び SOD 活性はタンパク量で補正した値を示した。GSH-Px 及び SOD 活性の測定には、各群 4 匹のラットを用いた。

結 果

胆汁中 H_2O_2 レベルを経時的に観察した結果、ラットによってほとんど検出されないもの、断続的に

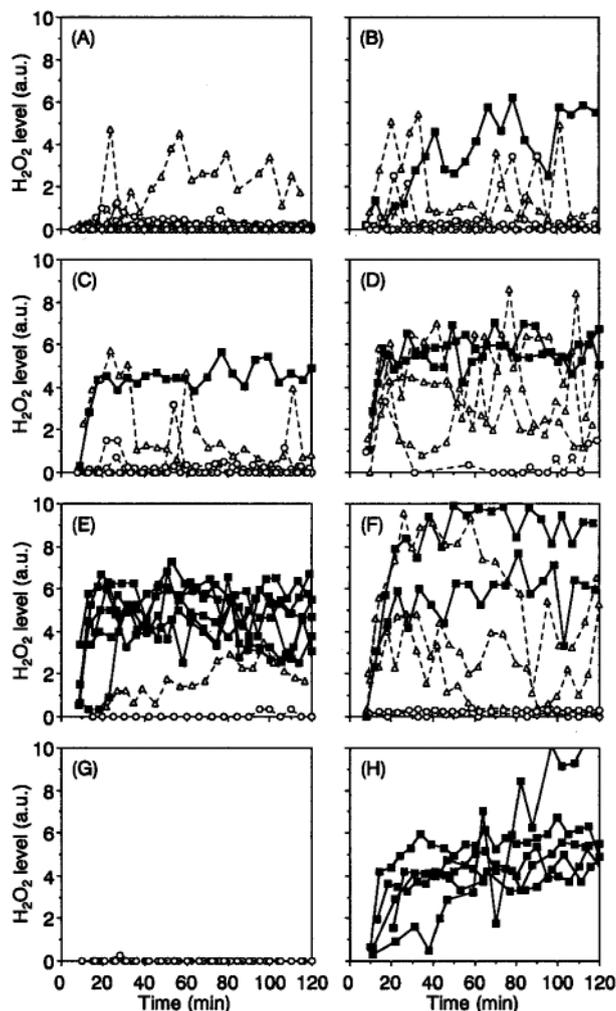


Fig. 1. Time Courses of Bile H_2O_2 Level in an Individual Rat

(A) Normal group, (B) SeD'7-8 group, (C) SeD'6-8 group, (D) SeD'5-8 group, (E) SeD'4-8 group, (F) SeD'3-8 group, (G) SeC group, (H) SeD group. Dotted line with open circles indicates the case that H_2O_2 in bile was not detected or was detected at very low level. Dotted line with open triangles indicates the case that H_2O_2 in bile was detected intermittently. Solid line with closed squares indicates the case that H_2O_2 in bile was detected continuously.

検出されるもの、持続的に検出されるものの3つの場合が見られた (Fig. 1)。ほとんど検出されないと判断したものは点線と○で、断続的に検出されたと判断したものは点線及び△で示した。また、持続的に検出されたと判断したものは実線と■で示した。正常群では、測定を行った12匹のうち一匹のみに断続的に検出されるものが見られたが、その他は検出されないか、検出されても非常に低いレベルであった。SeD'7-8群においては、断続的に検出されるものの割合が増え、そのレベルも正常群に比べて大きくなり、測定を行った7匹中1匹に持続的に観測されるものも見られた。SeD'6-8群においては、

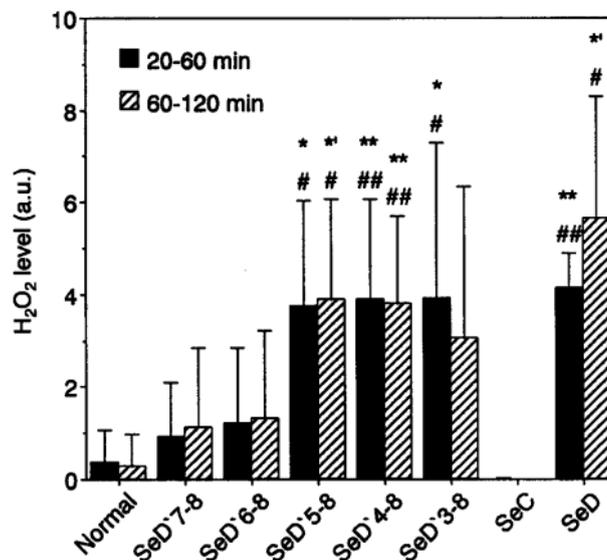


Fig. 2. Averaged H_2O_2 Levels after Cannulation

Closed column indicates averaged H_2O_2 levels within 20-60 after opening abdominal cavity. Striped column indicates averaged H_2O_2 levels within 60-120 after opening abdominal cavity. # and ## indicate significance compared with the normal group at $p < 0.05$ and 0.005 , respectively. *, **, and *** indicate significance in comparison with the SeC group at $p < 0.05$, 0.01 , and 0.005 , respectively. Values are indicated as mean \pm SD.

SeD'7-8群と同様の傾向が見られた。SeD'5-8群では全く検出されないものではなく、断続的に検出されるものと持続的に検出されるものの割合が増加した。またそれらの検出レベルもSeD'6-8群、SeD'7-8群に比べて高くなる傾向が見られた。SeD'4-8群においてはほとんどが持続的に検出されたが、ほとんど検出されないものが8匹中に1匹だけ見られた。SeD'3-8群では、ほとんど検出されないものが7匹中に2匹見られた。またSeD'4-8群に比べて断続的に検出されるものの割合が増えた。SeD'3-8群では、断続的に検出されるものも持続的に検出されるものも、 H_2O_2 レベルのバラツキが他の群よりも大きい傾向が見られた。SeC群においては、測定を行った4匹で H_2O_2 の検出されたものはいなかった。SeD群においては、測定を行った5匹すべてのラットで持続的に検出された。

カニュレーション手術開始(開腹)後20-60分、及び60-120分の平均 H_2O_2 レベルを求めFig. 2に示した。開腹後20-60分の H_2O_2 レベルは、Se欠乏餌による飼育期間に伴って大きくなる傾向が見られ、SeD'5-8群、SeD'4-8群、SeD'3-8群では、正常群及びSeC群と比較して有意に上昇していた。しかしながら開腹後60-120分の H_2O_2 レベルは、

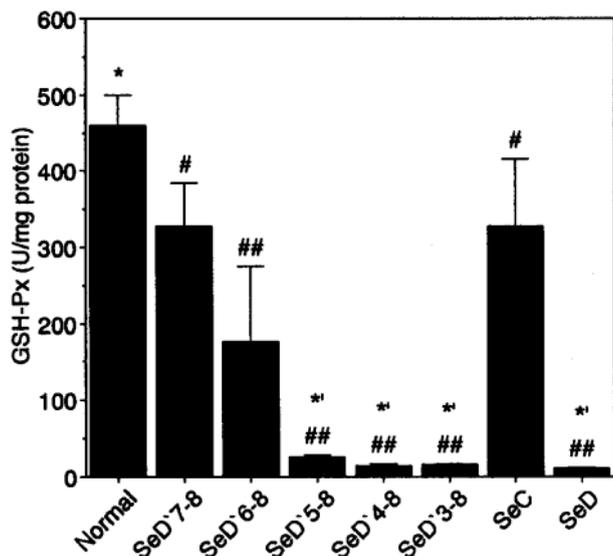


Fig. 3. Changes of Liver GSH-Px Activity due to Various Feeding Period with Se-Deficient Diet

and ## indicate significance in comparison with the normal group at $p < 0.05$ and 0.005 , respectively. * and ** indicate significance in comparison with the SeC group at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively. Values are indicated as mean \pm SD.

正常群, SeD'7-8 群, SeD'6-8 群, SeD'5-8 群までは順に高くなったが, SeD'4-8 群, SeD'3-8 群では低下する傾向が見られ, SeD'3-8 群では正常群とも SeC 群とも有意な差が見られなかった。H₂O₂ レベルは開腹後 20-60 分でも 60-120 分でも SeD 群で最も高かった。

各群の肝臓中 GSH-Px 活性を Fig. 3 に示した。GSH-Px 活性は, Se 欠乏餌による飼育期間が長いほど低下した。SeC 群では正常群よりもやや低い値を示し, SeD'7-8 群と同程度であった。セレン酸として飲料水に与えていた Se 濃度 (0.1 ppm) では GSH-Px 活性を正常レベルまで上げるには十分でなかったと言える。

各群の肝臓中の SOD 活性を Fig. 4 に示した。正常群, SeC 群ではほぼ同程度で比較的低い値を示した。Se を欠乏させた群では, 正常群及び SeC 群に比べて高い値を示しており, SeD'6-8 群では正常群と SeC 群の両群に対して有意差が認められた。SeD'4-8 群及び SeD'3-8 群においても SeC 群に対してのみ有意差が見られた。

考 察

正常群においても H₂O₂ が検出されることがあったが, それらは手術直後の一時的なものか, あるい

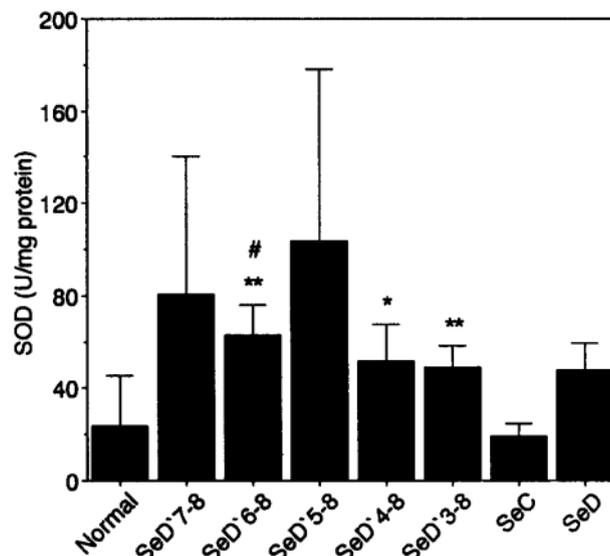


Fig. 4. Changes of Liver SOD Activity due to Various Feeding Period with Se-Deficient Diet

indicates significance in comparison with the normal group at $p < 0.05$. * and ** indicate significance compared with the SeC group at $p < 0.05$ and 0.005 , respectively. Values are indicated as mean \pm SD.

は断続的なものでも比較的低いレベルであった。その他の群においては, 断続的に検出される場合や持続的に検出される場合がしばしば見られた。しかしながら, いずれの場合にせよ手術直後には低いレベルを示した。持続的に検出される場合には約 15-25 分程でプラトーに達する事が分かった。胆汁流量は比較的個体差が大きく, いずれの場合でもカニキュレーション直後はやや多いが, 約 10 分後から実験終了まではほぼ一定の流量 (例えば, 正常群で $11.1 \pm 1.7 \mu\text{l}/\text{min}$; $n = 12$, SeD'3-8 群で約 $8.26 \pm 2.72 \mu\text{l}/\text{min}$; $n = 4$) を保った。カニキュレーション直後の胆汁流量が多いのは, 胆管の結紮により胆管内に一時的に溜まっていた胆汁が出てくるため, 手術直後の過酸化水素レベルが低いこととは無関係と思われる。つまり胆汁中における H₂O₂ の検出には開腹手術による酸化的ストレスが深く関わっている事が示唆された。Se が欠乏したからといってすぐに生体内で H₂O₂ が増加するわけではなく, Se の欠乏は H₂O₂ の発生しやすい環境を作っていると言える。あるいは, Se を有することにより酸化的ストレスからの回復が比較的早いものであると考えられる。そのため胆汁中 H₂O₂ レベルは直接的な酸化的ストレスの指標というよりも, むしろ生体の酸化的ストレスに対する感受性の指標と考えることがで

きる。

本実験で用いた正常群ラットは、購入直後から、あるいは購入後一日置いた後に、一晚絶食をして実験に用いている。一晚の絶食期間では動物が新たな実験環境に対して馴化されるとは言い切れないが、動物の輸送とそれに伴う環境の変化は胆汁中過酸化水素レベルとは関係が薄いと思われる。動物の神経的な活動が生体内の過酸化水素量に影響を及ぼす可能性は十分に考えられるが、上に述べるように本測定法は生理的に発生する過酸化水素を検出できるものではなく、むしろ物理的な刺激や運動等に伴う呼吸数の変化、あるいは手術等による生体内酸素分圧の大幅な変化によって影響を及ぼされると考えられる。

GSH-Px 活性は、Se 欠乏餌による飼育期間が長いほど低下する傾向にあり、これは H_2O_2 が分解されにくくなっている事を示す。しかしながら胆汁中 H_2O_2 の持続的に検出される割合を考えると、Se 欠乏餌での飼育期間の延長に伴って SeD'4-8 群まではその割合が増えるものの、SeD'3-8 群では再び断続的に検出される場合や全く検出されない場合が多く見られるようになる。手術開始後 20-60 分の平均 H_2O_2 レベルを見ると、Se 欠乏餌による飼育期間の延長に伴って大きくなっているが、手術開始後 60-120 分の平均 H_2O_2 レベルは SeD'3-8 群では再び H_2O_2 レベルが低下する傾向が見られた。すなわち、GSH-Px 活性の低下によって胆汁中 H_2O_2 レベルは増加しやすくなるものの、GSH-Px 活性の低い状態の延長に伴って H_2O_2 レベルを上昇させないための何らかの代替機能が働く可能性を示している。

SOD 活性は正常群と SeC 群で比較的低く、Se 欠乏により増加する傾向が見られている。すなわち Se 欠乏に伴う胆汁中 H_2O_2 レベルの上昇には、GSH-Px 活性の低下に加えて、SOD 活性の上昇も影響を及ぼしていると考えられる。胆汁中 H_2O_2 は検出される場合と検出されない場合があり、値のバラツキが非常に大きく、他の因子と単純に相関関係を示すことが困難と思われる。そのため今回は有意な相関関係は得られていないが、SOD 活性は SeD'6-8 群よりも SeD'4-8 群や SeD'3-8 群で低くなる傾

向が見られ、開腹後 60-120 分で胆汁中 H_2O_2 が検出される可能性に対して SOD 活性が影響している可能性がある。

Se 欠乏を介する酸化ストレスは Mn-SOD の誘導を起こすものと思われる。しかしながら GSH-Px の活性低下により H_2O_2 の消去能が低下した状態においては、それはかえって酸化ストレスを与える方向に働いてしまうことになる。 H_2O_2 が増加すれば、Cu/Zn-SOD の失活により総合的な SOD 活性が再び引き下げられると考えられる。今回用いた SOD 活性測定法は、正確には $\cdot O_2^-$ 消去活性を測定するもので、SOD 様活性と言うべきところであり、Mn-SOD と Cu/Zn-SOD を区別することはできない。このことを確かめるためには、SOD の遺伝子レベルでの発現を調べる必要がある。

今回の結果から、胆汁中 H_2O_2 レベルは、手術や SOD 活性等によっても影響を受けやすいことが示された。つまり胆汁中 H_2O_2 レベルは、GSH-Px の低下の度合い、与えられる酸化ストレスの大きさ、SOD 活性あるいはその他の生体内の抗酸化機能等との兼ね合いによって決まるものと予想される。そのため、動物の性別、週齢、餌、飼育環境の違いなどに留意した上で、胆汁中 H_2O_2 レベルを生体の酸化ストレスに対する感受性の指標として用いることが可能と考えられる。

謝辞 本研究の一部は科学研究助成費奨励研究 (A) 及び昭和薬科大学共同研究助成金により行われました。

REFERENCES

- 1) Gohen G., Hochstein P., *Biochemistry*, **2**, 1420-1428 (1963).
- 2) Ueda Y., Matsumoto K., Endo K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 699-702 (2000).
- 3) Paglia D. E., Valentine W. N., *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158-169 (1967).
- 4) Mitsuta K., Mitzuta Y., Kohno M., Hiramatsu M., Mori A., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 187-191 (1990).