

An Experimental Study of the Effect of Active Oxygen on Cultured Glial Cells from Fetal Mouse Brain

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7973

脳細胞に対する活性酸素の影響

—マウス胎児脳由来培養グリア細胞による研究—

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任：山本信二郎教授)

北 林 正 宏

(昭和62年9月1日受付)

マウス胎児脳に由来する培養グリア細胞を用いて、活性酸素が惹起する細胞障害を生化学的、形態学的に検討した。活性酸素の発生にはキサンチン-キサンチンオキシダーゼ (Xanthine-Xanthine oxidase, Xa-XOD) 系を用いた。細胞障害度は ^{51}Cr で標識した培養細胞から遊出する ^{51}Cr を測定し定量的に評価した。Xa-XOD系を作用させた後、遊出 ^{51}Cr から算出した細胞障害度は経時的に増加し、特に4時間以後著明な増加を示した。培養細胞内の過酸化脂質量は経時的に増加し、特に8時間以後著明な増加を認めた。培養細胞内の acid phosphatase (ACP-ase) 活性値は経時的に減少した。これと対称的に培養液中の ACP-ase 活性値は経時的に増加し、それは細胞障害度の時間的推移と類似した。透過型電顕による検索では、Xa-XOD系を適用された細胞には胞体の空胞化、ライソゾーム顆粒の減少、およびミトコンドリアの膨化を、また一部には細胞膜の破壊が認められた。4種の活性酸素にそれぞれ拮抗する特異的スカベンジャーを反応させた実験ではスーパーオキシドジスムターゼ+カタラーゼが最も著明な細胞障害抑制効果を示し、カタラーゼ単独投与がこれに次いだ。以上の成績より、Xa-XOD系による細胞障害の機序においては、過酸化水素を中心とした活性酸素が生体膜の脂質過酸化反応をひきおこし、これが膜構造の破綻からライソゾームの破壊へと進行し、遊出した加水分解酵素がさらに細胞破壊を加速するものと考えられた。

Key words ischemic brain damage, cultured glial cells, active oxygen, lipid peroxide, electron microscopy

脳虚血は、脳血栓や脳塞栓、クモ膜下出血などの脳血管障害をはじめ頭部外傷、脳腫瘍など多くの頭蓋内疾患に共通してみられる現象である。虚血による脳障害の研究の流れの中で、虚血における脳組織の生化学的变化ではエネルギー産生系、Cyclic-AMP、アミノ酸-蛋白合成系、モノアミン、脂質、電解質その他に関して数多くの報告がなされてきた^{1)~5)}。このなかでもエネルギー産生系の研究において虚血時における電子伝達系の障害から活性酸素の生成の可能性が注目されるようになってきた。Demopoulosら⁶⁾、Siesjöら⁷⁾はフリーラジカル反応によって生ずる脂質の過酸化が虚血性脳障害を惹起すると報告した。一方、Flammら⁸⁾やWesterbergら⁹⁾はこのような脂質の過酸化の

結果生ずる生体膜の障害に注目した。以来、脳虚血と活性酸素に関する研究が数多く報告されている^{10)~14)}。

培養細胞による生体内の防御機構から切り離れた環境での *in vitro* の実験は、活性酸素による細胞の脂質過酸化反応を数量化し、脂質過酸化と細胞機能への効果を定量化するためには有利である。グリア細胞は、脳組織の基質をなしその代謝に最も重要な役割を果たす。本研究では、著者はマウスの胎児脳に由来する培養グリア細胞を用いて、活性酸素により惹起される細胞障害の病態を生化学的および形態学的に検索した。また各種活性酸素に対する特異的スカベンジャーを作用させた細胞障害抑制実験から、細胞障害に主な役割

Abbreviations: ACP-ase, acid phosphatase; DABCO, 1, 4-diazabicyclo [2, 2, 2] octane; MDA, malon dialdehyde; SOD, superoxide dismutase; Xa, Xanthine; XOD, xanthine oxidase.

を果たす活性酸素種についても検索した。

材料および方法

I. 胎児マウス脳グリア細胞の培養

加藤ら¹⁵⁾の方法に準じて胎児マウス脳の培養を行った。妊娠 17~18 日目の BALB/C 純系マウスを開腹して無菌的に胎児脳を摘出し、これを細切したのちトリプシン処理とピペッティング操作により単離細胞とした上で、15% 牛胎児血清 (GIBCO) を含む NCTC (和光) 加 MEM (日水) 培養液¹⁶⁾に移した。培養瓶として

Falcon 3024 plastic culture bottle (75 cm²) を用い、5% CO₂ 培養器 (36°C, 湿度 100%) にて培養した。12~16 代の培養後、PAP (パーオキシダーゼ・抗パーオキシダーゼ) 法にて GFAP (glial fibrillary acidic protein) を染色し細胞がグリア細胞であることを確認した。この系を用い、以後血清を含まない NCTC 加 MEM 培養液で平板培養し実験を行った。

II. 活性酸素発生系とキサンチンオキシダーゼ活性の測定

活性酸素発生系として Xa-XOD 系を用いた¹⁷⁾。無血

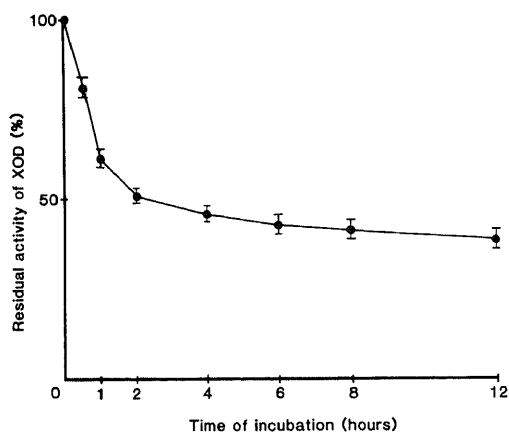


Fig. 1. Changes of the xanthine oxidase activity in the xanthine-xanthine oxidase system incubated at 37°C in 5% CO₂ -humidified air. Each point represents mean \pm S.D. (n=5).

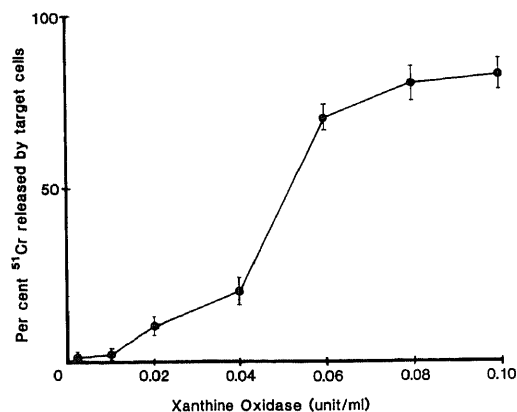


Fig. 2. Effect of the xanthine-xanthine oxidase system in different concentrations of xanthine oxidase on the release of ⁵¹Cr from ⁵¹Cr-labelled glial cells. Release of ⁵¹Cr was measured after the incubation for 8 hours. Each point represents mean \pm S.D. (n=5).

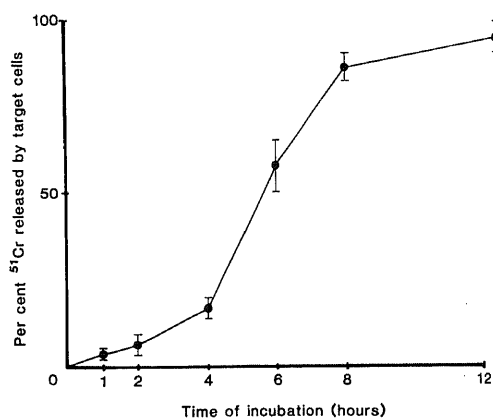


Fig. 3. Changes of the per cent ⁵¹Cr release from ⁵¹Cr-labelled glial cells in the xanthine-xanthine oxidase system. The concentration of xanthine oxidase was fixed at 0.8 unit/ml. Each point represents mean \pm S.D. (n=5).

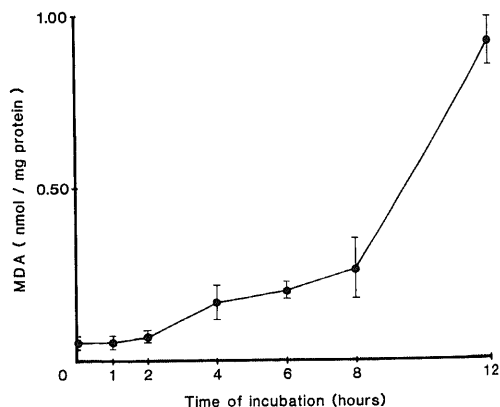


Fig. 4. Changes of the malon dialdehyde produced within cultured glial cells in the xanthine-xanthine oxidase system. The concentration of xanthine oxidase was fixed at 0.08 unit/ml. Each point represents mean \pm S.D. (n=5).

清培養液に 1 mM の Xa (和光純薬) を加えて 0.05 mM の濃度とし、これに種々量の XOD (ペーリンガーマンハイム山之内: 比活性 0.4 u/mg) を添加することにより調節的に活性酸素を発生させた。また、Xa-XOD 系を培養液に添加した時の培養液内における XOD 活性の時間的推移を測定した。XOD の活性は Xa から生成される尿酸値を 293 nm における吸光度の増加としてとらえ数量化した。上記 Xa 加培養液 5 ml に XOD を 0.4 unit 加え、培養器内にて保温し、1, 2, 4, 6, 8 および 12 時間後に 0.5 ml を採取し、光路 1 cm のキュベット内でリン酸バッファー (pH 7.4) 1.2 ml と 1 mM の Xa 溶液 0.3 ml と共に攪拌混和後 293 nm の吸光度変化を経時的に測定、記録した。Xa 無添加とし XOD のみを含む培養液を同様に保温したものから 0.5 ml を採取し、対照群とした。対照群では 12 時間の測定中 XOD 活性の変動を認めなかった。おのおの測定した活性値を対照群の活性値に対する百分率で表した。

III. Xa-XOD 系作用下の細胞障害度の検定

細胞障害の評価は Brunner ら¹⁸⁾ の方法に準じて、⁵¹Cr で標識した細胞から遊出する ⁵¹Cr を定量的に測定することによりおこなった。すなわち、細胞障害度は活性酸素発生源無添加で培養を続けた細胞から遊離する ⁵¹Cr を自然解離放射能とし、同量の標識細胞懸濁液に 3 ml の蒸留水を加えたのち凍結-融解操作を 3 回

繰返すことによって遊離する ⁵¹Cr を最大解離放射能として、以下の式により求めた。

$$\text{細胞障害度} = \frac{\text{解離 cpm} - \text{自然解離 cpm}}{\text{最大解離 cpm} - \text{自然解離 cpm}} \times 100(\%)$$

⁵¹Cr の放射能の測定には scintillation counter (ALOKA TDC-601) を用いた。

Xa-XOD 系における活性酸素発生量は XOD の量に依存する。そこで、XOD 量と細胞障害度の関係をみるため培養液 1 ml あたり XOD を 0.02 unit~0.10 unit の種々の量を添加し、作用 8 時間後における培養細胞の障害度を測定した。また、XOD 添加後の培養時間と細胞障害度の関係をみる目的で、培養液 1 ml あたり XOD 0.08 unit を添加し、培養 1, 2, 4, 6, 8 および 12 時間後の細胞障害の程度をそれぞれ測定した。

IV. 過酸化脂質および蛋白の定量

過酸化脂質の定量は八木¹⁹⁾の方法に準じておこない、チオバルビツール酸と反応する malon dialdehyde (MDA) として測定した。培養液 1 ml あたり 0.08 unit の XOD を添加し、1, 2, 4, 6, 8 および 12 時間後における培養細胞中に生成、蓄積した過酸化脂質量を定量した。また、総蛋白量を Lowry 法²⁰⁾により求め単位蛋白量あたりの過酸化脂質量を計算した。

V. 酸性フォスファターゼ活性の測定

培養液中および細胞内の酸性フォスファターゼ (acid phosphatase, ACP-ase) 活性を Bessey-Lowry 法²¹⁾に従い、p-ニトロフェニルリン酸を基質とし、37°C にて 1 時間の反応後 410 nm の吸光度を測定して求めた。1 mM の Xa 溶液 0.05 ml/ml・培養液と XOD 0.08 unit/ml・培養液を添加後、1, 2, 4, 6, 8, 12 時間培養を続け、各時間において細胞と培養液を遠心分離しそれぞれの ACP-ase 活性を測定した。細胞は 5 ml の 1% Triton X-100 (和光) でホモジナイズし酵素測定用の試料液とした。

VI. 電子顕微鏡による観察

正常培養細胞および活性酸素作用後の障害培養細胞について透過型電子顕微鏡による形態学的観察を行った。正常細胞および実験 2 時間後の障害細胞の電顕用試料作製は以下の方法によった。すなわち、ラプテック・ティシュー・チェンバー・スライド上に発育した細胞を、2.5% グルタルアルデヒドで 1 時間、1% 四酸化オスミウムで 1 時間、後固定したのち、型の如く脱水した。次いでエポキシ樹脂を満したビームカプセルをスライドガラス上に倒立させて 80°C にて 24 時間重合し、エポキシ樹脂に付着させた細胞をガラス面より剥がし、薄切薄片を作製した。実験 8 時間にはほとんどの細胞は障害され培養器底面より剥がれて浮遊するた

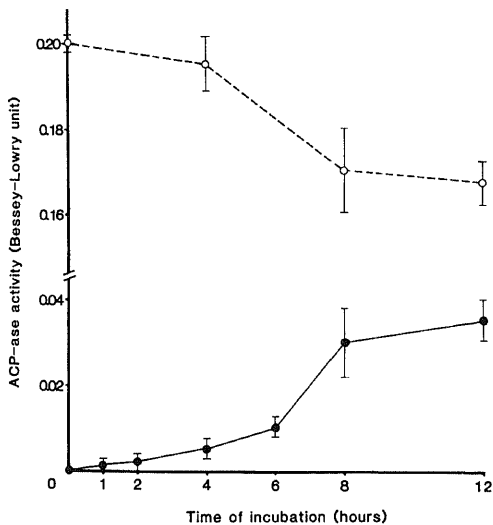


Fig. 5. Changes of the ACP-ase activity in the medium (closed circle) and in the cultured glial cells (open circle) during incubation with the xanthine-xanthine oxidase system. Each point represents mean \pm S.D. (n=5).

め、浮遊細胞を遠沈管にうつし、固定遠沈法²²⁾により薄切々片を作製した。これらに対し酢酸ウラニルと鉛の二重染色を行ったのち、電子顕微鏡（日立 H-600）により観察した。

VII. 各種スカベンジャーの細胞障害抑制作用

Xa-XOD 系の細胞障害作用におよぼす各種スカベンジャーの影響を検討するため、スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) (Sigma), カタラーゼ (和光), マニトール (D-mannitol) (和光), 1, 4-ジアザビシクロオクタン (1, 4-diazabicyclo [2, 2, 2] octane, DABCO) (和光) を、単独、あるいは組合わせて、表 1²³⁾²⁴⁾ の如く培養液中に添加して培養を続け、スカベンジャーを加えない場合の 8 時間後における細胞障害を対照として比較した。

VIII. 統計学的検定

成績はすべて mean±S.D. として表した。統計学的

処理はデータの正規性、等分散を検定し確認の後、2 群間の平均値の差の検定は t 検定を用い、多群間の平均値の差の検定は分散分析後 Scheffé の方法により、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

成 績

I. Xa-XOD 系を添加した培養液における XOD 活性の時間的推移

図 1 は Xa 添加後の各時間における XOD 活性を、各測定活性値の減衰を対照群の活性値に対する百分率で示したものである。XOD 活性は培養液中への Xa 添加後、12 時間までで約 40% となるがその間は指数曲線的に減衰を示した。すなわち、1 時間後の活性は $61.7 \pm 1.8\%$ ($n = 5$, 以下同じ)、2 時間後 $50.8 \pm 1.7\%$ と低下したあと、4, 6, 8 時間後にはそれぞれ $45.6 \pm 1.7\%$, $42.5 \pm 1.8\%$, $41.3 \pm 1.7\%$ で、12 時間後においては $38.5 \pm 1.7\%$ であった。

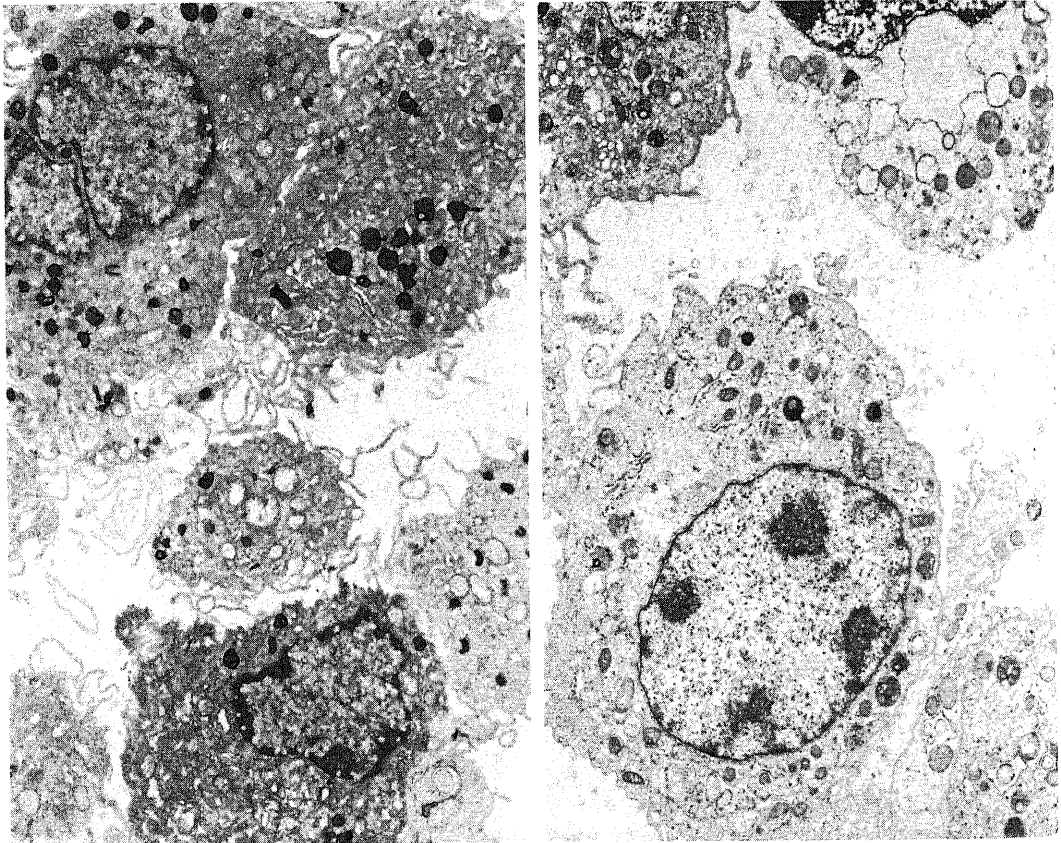


Fig. 6. Left: Electron micrograph of cultured untreated glioblastoma cells showing numerous lysosomes and microvillous projections. $\times 6,000$. Right: Electron micrograph of cultured glioblastoma cells 2 hours after the effect of the xanthine-xanthine oxidase system showing a remarkable decrease of lysosomes and microvillous projections. $\times 6,000$.

II. Xa-XOD 系の作用による細胞障害度の測定

⁵¹Cr の遊出からみた細胞障害は、Xa 単独あるいは XOD 単独添加において認められなかった。

図 2 は、Xa 存在下種々の濃度に XOD を添加し、8 時間後における細胞障害の程度を示す。細胞障害度は添加された XOD 量の増加とともに S 字状に高まり、0.02 unit/ml で $11.3 \pm 2.7\%$ (n=5, 以下同じ)、0.04 unit/ml で $20.8 \pm 3.9\%$ を示したあと、0.06 unit/ml で $69.5 \pm 4.1\%$ と著明な上昇を認めた。これにつづく 0.08, 0.10 unit/ml では、それぞれ $81.2 \pm 5.0\%$, $82.6 \pm 4.4\%$ とプラトーに近いゆるやかな上昇を示した。

上記の結果より、以下の実験では 0.05 mM Xa・培養液を 5 ml と XOD を 0.08 unit/ml・培養液の量で用いることを標準とした。

図 3 は、上述の Xa-XOD 系下、細胞障害と時間の関係を表す。細胞障害度は時間とともに S 字状の上昇を示し、1, 2, 4 時間後にはそれぞれ $3.5 \pm 1.8\%$ (n=

5, 以下同じ)、 $6.0 \pm 3.4\%$, $16.8 \pm 3.1\%$ を示したあと、6 時間後には $58.1 \pm 7.3\%$, 8 時間後には $85.2 \pm 4.3\%$ と著しく高まり 12 時間後では $95.9 \pm 4.7\%$ であった。

III. Xa-XOD 系を作用させた培養細胞における細胞内過酸化脂質

図 4 は MDA として検出した細胞内過酸化脂質量の XOD 添加後の経時的な増加を示す。すなわち MDA は 1, 2 時間後にはそれぞれ 0.05 ± 0.02 (n=5, 以下同じ)、 0.06 ± 0.02 nmol/mg・protein であったが、その後ゆっくり増加して 4, 6, 8 時間後にはそれぞれ 0.16 ± 0.05 , 0.19 ± 0.03 , 0.26 ± 0.08 nmol/mg・protein となり、このあと急速に増加して 12 時間後には 0.92 ± 0.07 nmol/mg・protein となった。

IV. Xa-XOD 系を作用させた培養細胞および培養液中の酸性フォスファターゼ活性

図 5 は、Xa-XOD 系の作用による細胞培養系の ACP-ase 活性変化を、培養液と細胞とに分けて測定

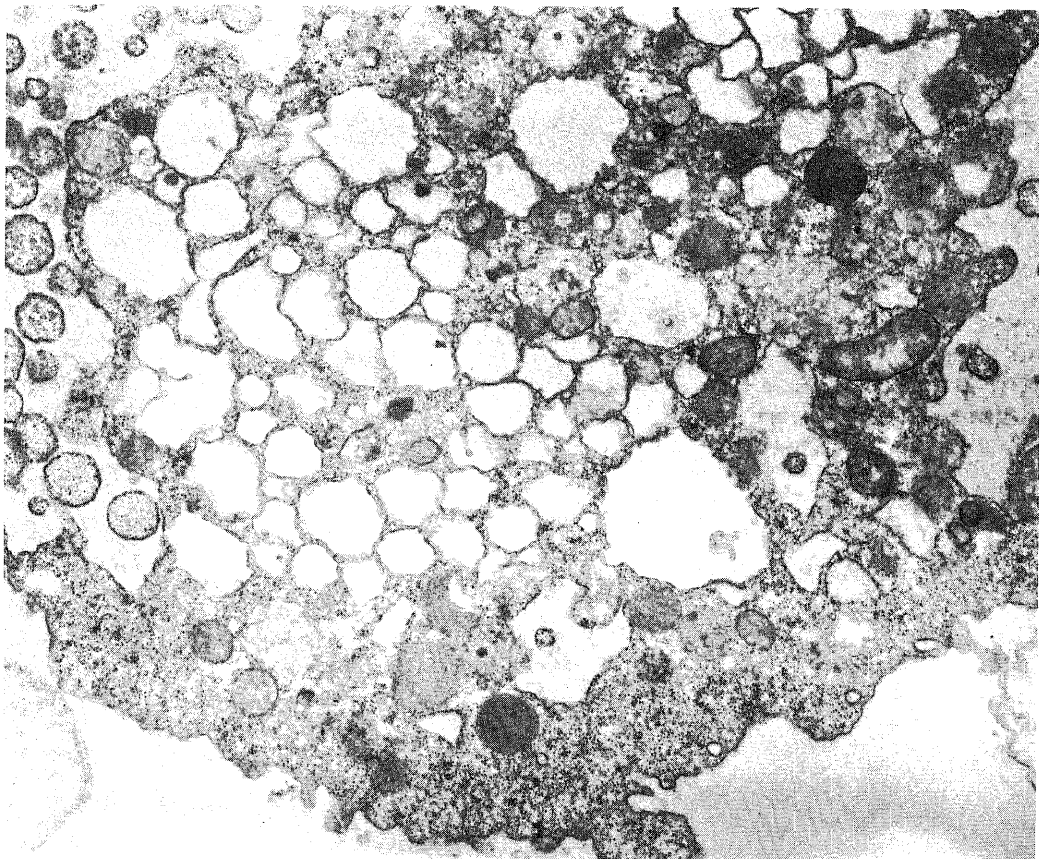


Fig. 7. Electron micrograph of cultured glial cells 8 hours after the experiment showing a marked vacuolation of the cytoplasm. $\times 13,700$.

し、その時間的推移を示す。黒丸で示した培養液中の ACP-ase 活性値は時間とともに S 字状に上昇し、1, 2, 4, 6 時間後にはそれぞれ 0.001 ± 0.001 ($n=5$, 以下同じ), 0.002 ± 0.002 , 0.005 ± 0.002 , 0.010 ± 0.002 unit (Bessey-Lowry) を示し、8 時間後には 0.030 ± 0.008 unit と著しく高まり、12 時間後には 0.035 ± 0.005 unit となった。一方、白丸で示した細胞中の ACP-ase 活性値は時間とともに逆 S 字状に低下し、4 時間後で 0.195 ± 0.006 unit, 8, 12 時間後にはそれぞれ 0.170 ± 0.010 , 0.167 ± 0.005 unit となった。

V. 透過型電子顕微鏡による観察

電顕所見では、正常培養細胞の多くは胞体の周囲に多数の microvilli 様突起を持ち、胞体内に多数のライソゾーム (Lysosome) が認められた (図 6 左)。Xa-XOD 系を添加した培養液中で 2 時間培養した細胞では、細胞周囲の microvilli 様突起の減少とともに胞体内のライソゾームの減少を認めた。核のクロマチン濃度は軽度低下した像を示した (図 6 右)。Xa-XOD

系を添加した培養液中で 8 時間培養した細胞では、細胞周囲の microvilli 様突起はほとんど消失し、胞体の空胞化、ライソゾーム顆粒の消失、また一部には細胞膜の破壊された像が認められた (図 7)。またミトコンドリアは膨化し、粗面小胞体の拡大と、核のクロマチンの著しい稀薄化が認められた (図 8)。

VI. Xa-XOD 系の作用による細胞障害に対する各種スカベンジャーの影響

表 1 上段は、各種スカベンジャーを添加し、 ^{51}Cr 遊出より評価される Xa-XOD 系の細胞障害におよぼす影響を示す。スカベンジャー無添加では $86.8 \pm 4.4\%$ ($n=5$, 以下同じ) の細胞障害度を示すのに対し、SOD 30 unit/ml, カタラーゼ $10 \mu\text{g/ml}$, SOD 30 unit/ml + カタラーゼ $10 \mu\text{g/ml}$, マニトール 1 mM, DABCO 1 mM を加えた場合のおおのの細胞障害度は順に、 71.5 ± 2.3 , 23.8 ± 3.1 , 20.7 ± 1.8 , 54.1 ± 2.9 , $66.1 \pm 3.2\%$ であった。細胞障害抑制効果は SOD + カタラーゼ, カタラーゼ, マニトール, DABCO, SOD の順に

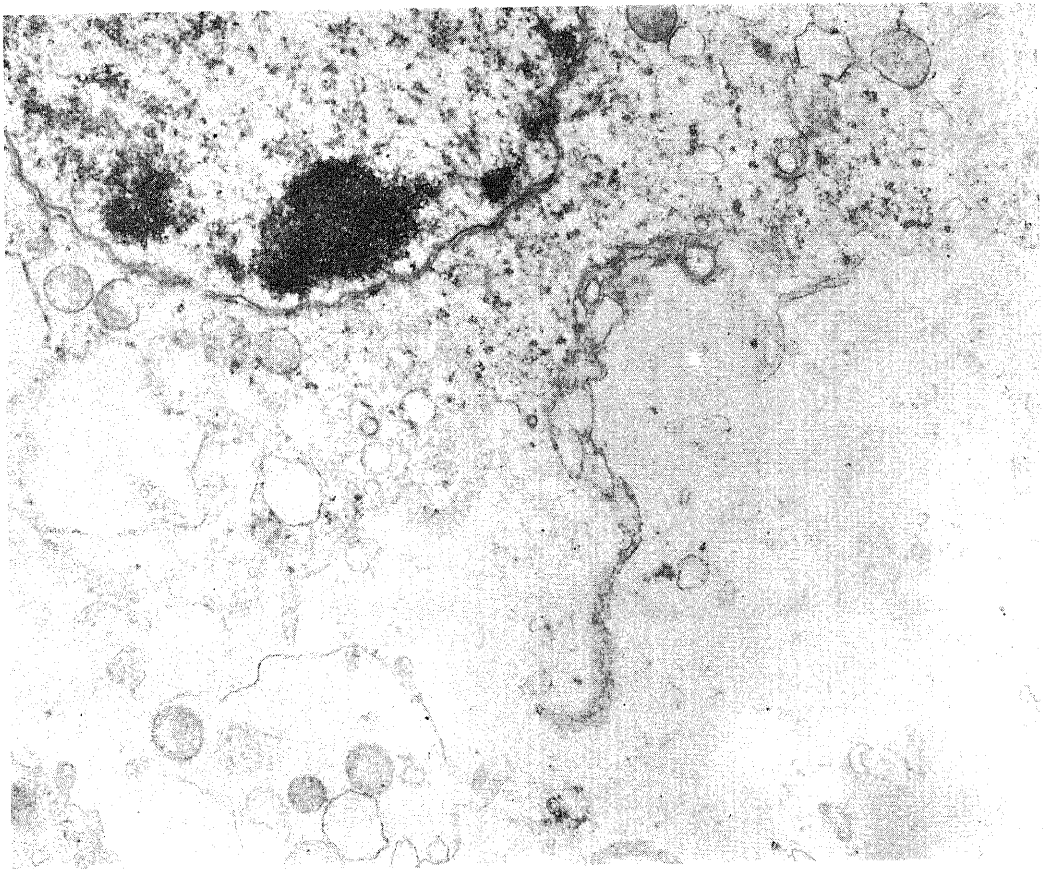


Fig. 8. Electron micrograph of cultured glial cells 8 hours after the experiment showing a cellular disintegration with the disruption of plasma membranes. $\times 13,700$.

強く認められた。

表1下段は、表1上段の各10倍濃度の各種スカベンジャーの影響を示す。SOD 300 unit/ml,カタラーゼ 100 μg/ml, SOD 300 unit/ml+カタラーゼ 100 μg/ml, マニトール 10 mM, DABCO 10 mM の添加ではそれぞれ 72.5±5.5 (n=5, 以下同じ), 12.5±2.8, 10.7±1.6, 63.2±2.1, 70.6±6.6%の細胞障害度で

あった。細胞障害抑制効果はSOD+カタラーゼ,カタラーゼ, マニトール, DABCO, SOD 添加群の順であった。

両濃度ともにSOD+カタラーゼ添加群で最も顕著な細胞障害抑制効果がみられ,カタラーゼ単独添加群がこれに次いだ。両濃度ともに,この両者の細胞障害度の値はマニトール, DABCO, およびSOD 添加群の

Table 1. Cultured glial cell damage by Xa-XOD system and the effect of scavengers

Experiment system			Percent specific release of ⁵¹ Cr	
No scavenger		n=5		86.8±4.4
SOD	30 u/ml	n=5	***	71.5±2.3 [○]
Catalase	10 μg/ml	n=5	***	23.8±3.1 [○]
SOD + Catalase	30u/ml + 10 μg/ml	n=5	***	20.7±1.8 [○] NS
Mannitol	1 mM	n=5	***	54.1±2.9 [○]
DABCO	1 mM	n=5	***	66.1±3.2 [○]
SOD	300 u/ml	n=5	***	72.5±5.5 [*]
Catalase	100 μg/ml	n=5	***	12.5±2.8 [○]
SOD + Catalase	300u/ml + 100 μg/ml	n=5	***	10.7±1.6 [○] NS
Mannitol	10 mM	n=5	***	63.2±2.1 [○]
DABCO	10 mM	n=5	***	70.6±6.6 [●]

Each value represents mean ± S. D. * , NS ; ● , p<0.05
 ○ , P<0.001 vs. no scavenger ; *** , P<0.001 ; NS, not significant by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison.
 Xa-XOD, xanthine-xanthine oxidase ; SOD, superoxide dismutase ;
 DABCO, 1, 4-diazabicyclo [2, 2, 2] octane.

Table 2 Dose dependency of each scavenger

Scavenger		Percent specific release of ⁵¹ Cr	
		High dose	Low dose
SOD	n=5	72.5±5.5	NS 71.5±2.3
Catalase	n=5	12.5±2.8	*** 23.8±3.1
SOD + Catalase	n=5	10.7±1.6	*** 20.7±1.8
Mannitol	n=5	63.2±2.1	NS 54.1±2.9
DABCO	n=5	70.6±6.6	NS 66.1±3.2

Each value represents mean ± S. D. *** p<0.001 ; NS, not significant by t-test ; SOD, superoxide dismutase ; DABCO, 1, 4-diazabicyclo [2, 2, 2] octane.

細胞障害度の値よりもそれぞれ有意に ($p < 0.001$) 低値であった。またこの両者においてのみ dose-dependent の関係が認められた ($p < 0.001$) (表 2)。

考 察

脳虚血は脳梗塞やクモ膜下出血などの脳血管障害をはじめ頭部外傷、脳腫瘍など多くの頭蓋内疾患に共通してみられ、脳の機能障害の大きな要因である。脳が虚血性の障害に陥った場合、その障害の回復には血行再建が不可欠である。しかし、いったん障害された脳組織は血流が再開することにより、かえって組織の障害がすすむ場合がある。虚血性脳障害の可逆性をめぐる研究が展開され、虚血時の組織の生化学的変化を探ろうとする試みの中で Demopoulos ら⁶⁾は、脳内遊離基の発生とそれにひき続いて起こる脂質の過酸化が虚血性脳障害の主因をなすという説を提唱した。一方、Siesjö ら⁷⁾は、血流再開モデルにおけるミトコンドリアのエネルギ代謝を中心とする生化学的研究から同様の説に到達した。また Flamm ら⁸⁾、Westerberg ら⁹⁾は、活性酸素による脂質の過酸化過程の結果生ずる生体膜の障害が脳虚血時の細胞障害の機序であると述べた。一方、小暮ら¹¹⁾¹²⁾は、遊離基反応は当初考えられた虚血時の現象ではなく血流再開後に起こる現象であることを示唆した。脳虚血にともなう活性酸素の生成機序について、Fridovich²⁵⁾は電子伝達系からの電子の leakage の増大、還元物質の血流再開後の自動酸化、集合顆粒白血球からの放出、という 3 つの可能性を挙げた。しかし生体はその組織内のみならず血液中にも、有害作用に対する、なんらかの防御機構を備えている²⁶⁾。

本研究では、胎児マウス脳由来の培養グリア細胞を用いることにより、活性酸素に対する生体の防御機構の影響を最少限に押え、活性酸素による細胞障害を適確に評価し得た。活性酸素の発生源として用いた Xa-XOD 系¹⁷⁾はスーパーオキシドのみならず過酸化水素も発生し、さらに両者の反応によりハイドロキシルラジカルや一重項酸素も発生することが知られている²⁷⁾²⁸⁾。また、Xa-XOD 系におけるスーパーオキシドの発生量は XOD の活性とその量により規定される。ところが XOD 自身は、発生したスーパーオキシドにより失活するという側面を有する²⁹⁾。本実験系では、XOD 活性は 2 時間で半減するがその後減少の程度を減じて維持し、12 時間後も約 40% の値を示すことが証明された。スーパーオキシド発生量も同様の傾向を示すものと思われる。しかし、⁵¹Cr をラベルした細胞群に Xa-XOD 系を作用させると、⁵¹Cr 遊出より評価される細胞障害は時間とともに進行し、特に 4 時

間以降において著明であった。このことは、Xa-XOD 系で発生するスーパーオキシド以外の活性酸素の作用、ならびに一旦障害されかかった細胞は、それ自体で障害が連続的に進行する可能性を示す。Seligman ら³⁰⁾は、人工膜を用いた実験において、膜脂質が膜内で過酸化を受け、いったん開始した膜の過酸化反応は自触媒的に進行し拡大していくことを確めた。生体内においては、不飽和脂肪酸はリン脂質の形をとり主に生体膜に含まれる。一方、活性酸素は一般に疎水環境で長い寿命を有する。以上より、活性酸素がおよぼす細胞障害の作用機序として、脂質過酸化反応により生体膜に変化をきたすことが考えられる。

Seligman ら³⁰⁾は、前述の人工膜の実験において、その二重結合の cis 型結合が trans 型結合に変化することで膜の柔軟性やイオン透過度など膜の物理的特性が変化し、次いで過酸化による脂肪酸の分解が起こることを観察した。本実験において、Xa-XOD 系作用後の細胞内過酸化脂質量および細胞障害によって遊出する ⁵¹Cr 量はいずれも時間とともに増加を示した。これらの経時変化を比較すると、急速な増加は細胞内過酸化脂質では 8 時間目、遊出 ⁵¹Cr では 4 時間目以降にみられ、両者に 4 時間の時間的ずれがある。さらに電顕的には 2 時間ですでに細胞に変性がみられるなどの事実は生化学的反応による変化に形態学的変化が先行することを示唆する。

Fong ら³¹⁾は、単離したライソゾームに活性酸素生成系を作用させると脂質の過酸化とともにライソゾームの自己融解が起り、種々の加水分解酵素が流出してくるのを認めた。Tappel³²⁾らは、過酸化脂質の形成によって細胞膜内小器官の膜が変性しその結果ライソゾーム酵素が流出してくるのを認めた。Desai ら³³⁾は、ラット肝臓のライソゾームをリノール酸と過酸化水素とともに保温することにより、あるいはライソゾームに紫外線または γ 線を照射することにより活性酸素が生じ、ライソゾーム中の加水分解酵素が流出するのを認めた。本実験において、Xa-XOD 系の作用後、細胞中の ACP-ase 活性は時間とともに減少し、これと対称的に培養液中の ACP-ase 活性は時間とともに増加した。この減少と増加の時間的推移はよく対応しており、ACP-ase が細胞内より培養液中に流出したものと推定される。また、この培養液中 ACP-ase 活性の時間曲線は遊出 ⁵¹Cr 量の時間曲線とよく一致する経時変化を示した。このことは、細胞障害の進展における加水分解酵素の重要性とともに、障害の場としてライソゾームの関与を示唆するものである。Xa-XOD 系作用による細胞障害過程においては、生体膜に脂質の過酸化反応が始まると膜構造は早期に変化し、過酸化脂

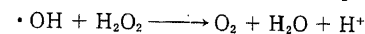
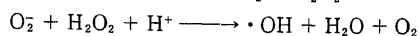
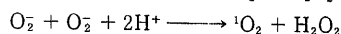
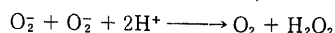
質の生成と蓄積に先行してライソゾーム膜の破壊が進行し、そこから流出した種々の加水分解酵素がさらに細胞障害を加速するものと考えられる。

活性酸素により障害された細胞の形態学的変化に関する報告は少ない。長田ら³⁴⁾は、遊離基が重要な役割を果たす四塩化炭素による肝細胞障害を電顕的に観察し、滑面小胞体内に高電子密度の物質の出現と核周囲へのクロマチンの凝集およびミトコンドリアにおける膨化、マトリックス密度低下、およびクリステの乱れと消失などの変化をみた。また小川ら³⁵⁾は、同様の障害肝細胞においてライソゾームの ACP-ase 活性が減少していることを形態学的に証明した。Dabholkar ら³⁶⁾³⁷⁾は、抗酸化作用を持つビタミン E の欠乏時における肝細胞を電顕的に観察し、脂質の過酸化の影響と考えられる多数の脂肪滴と脂質性色素体およびセロイドなどを認めた。彼らは、また大脳においてもライソゾームの標的酵素である ACP-ase の活性の減少を認め、ビタミン E の補充によって形態学および酵素学的な回復を認めた。Molenaar ら³⁸⁾は、ビタミン E 欠乏時の肝細胞を電顕的に観察し、ミトコンドリア外膜のコントラストの低下と厚さの減少および外膜を構成する蛋白粒子の縮小を認め、これらの形態変化は遊離基の攻撃により好オスミウス性の不飽和脂肪酸が減少し、同時に外膜蛋白質が障害された結果であると推定した。

本研究における電顕的観察では、正常のマウス培養グリア細胞は、細胞周囲に多数の microvilli 様突起を持ち胞体内には多数のライソゾーム顆粒を含んでいた。しかし、活性酸素発生系を 2 時間作用させた細胞では、細胞周囲の microvilli 様突起の数は著明に減少しその長さは短縮を示した。しかし、細胞膜はいまだ破壊されておらず、ライソゾーム顆粒は減少しているものの細胞内小器官の形態は保たれていた。8 時間後では、胞体内の空胞化が著明となり細胞膜も一部破壊され、ライソゾーム顆粒の著明な減少が認められた。これらの微細構造変化は障害細胞における細胞内および培養液中の ACP-ase 活性、遊出 ⁵¹Cr および細胞内過酸化脂質などの生化学的変化およびそれらの時間的推移とよく対応する。

活性酸素に関する研究は、McCord ら³⁹⁾によるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の発見以来急速に進展した。活性酸素とは、単一の分子種ではなく 4 分子種を包括する名称である。すなわち、酸素一分子 (O₂) が 4 個の電子 (e⁻) と 4 個の水素原子核 (H⁺) と作用し安定な 2 分子の水 (H₂O) がつくられる時、その還元中間産物であるスーパーオキシドラジカルアニオン (superoxide radical anion, O₂⁻) や過酸化

水素 (hydrogen per-oxide, H₂O₂) あるいはそれら両者の反応によって派生するハイドロキシルラジカル (hydroxyl radical, ·OH) は化学的に高い反応性を有し、生体に対し強い毒性を示す。これらの 3 種類の分子種に励起状態の酸素である一重項酸素 (singlet oxygen, ¹O₂) を加えた 4 種がまとめて活性酸素と呼ばれる。これら 4 種の活性酸素は、



のごとく反応する。しかもこれらの各種活性酸素には特異的にはたらくスカベンジャーとしてスーパーオキシドには SOD, タイロンなど、過酸化水素にはカタラーゼ、パーオキシダーゼなど、ハイドロキシルラジカルにはマニトール等の糖類、メタノール、エタノールなど、さらに一重項酸素には DABCO, β-カロチンなどがあげられる²⁶⁾²⁷⁾。Nathan ら²⁸⁾は、リンパ腫細胞に対する白血球攻撃の抑制実験に種々のスカベンジャーを使用し、その結果から最終的に腫瘍細胞を殺しているのは過酸化水素であると述べた。一方、Misra ら⁴⁰⁾は、同様にスカベンジャーを用いた抑制実験から大腸菌: E. coli, B 株の放射線による殺菌は、最終的にハイドロキシルラジカルが行っていると報告した。

本実験において、Xa-XOD 系の活性酸素のどれが細胞障害をきたすかが問題になる。各活性酸素種に対する特異的スカベンジャーとして、スーパーオキシドに対する SOD, 過酸化水素に対するカタラーゼ、ハイドロキシルラジカルに対するマニトール、一重項酸素に対する DABCO を用いて、細胞障害の抑制効果を検討した。この結果、カタラーゼ添加群と SOD+カタラーゼ添加群において、他のスカベンジャー添加群よりも有意な抑制効果があり、しかもこの両者においてのみ dose-dependent の有意差が認められた。SOD 単独添加群に著明な細胞障害抑制効果がないのは、この物質はスーパーオキシドを除去するが同時に過酸化水素を発生させるためと考えられる。しかし、SOD にカタラーゼを添加すると上述の過酸化水素の発生を抑制し、細胞障害抑制効果を増大するものと考えられる。

結 論

マウス胎児脳に由来する培養グリア細胞を用いて、活性酸素による細胞障害を生化学的ならびに形態学的に検索した。

1. 活性酸素の発生源として Xa-XOD 系を用いた。培養細胞を用いた in vitro の実験系のため、生体

が持つ活性酸素に対する防御機構の影響を受けずに、活性酸素の細胞障害効果を評価し得えた。

2. 培養細胞に⁵¹Crを標識処理後、Xa-XOD系を作用させた。遊出⁵¹Cr量から算出した細胞障害度は経時的な増加を示し、特に4時間以後著明であった。

3. Xa-XOD系作用後、培養細胞内の過酸化脂質量は経時的な増加を示し、特に8時間以後著明であった。

4. Xa-XOD系作用後、培養細胞内のACP-ase活性値は経時的に減少し、これと対称的に培養液中のACP-ase活性値は経時的に増加した。後者の時間的推移は遊出⁵¹Crからみた細胞障害度の時間的推移と類似した。

5. 透過型電子顕微鏡による障害培養細胞の観察では、胞体の空胞化、ライソゾーム顆粒の消失、およびミトコンドリアの膨化を、また一部には細胞膜の破壊された像を認めた。

6. 活性酸素種別に拮抗する特異的スカベンジャーを用いた障害抑制実験では、SOD+カタラーゼに最も著明な細胞障害抑制効果を認め、カタラーゼ単独投与がこれに次いだ。

以上の成績から、Xa-XOD系の作用による培養グリア細胞の障害過程では、過酸化水素を中心とした活性酸素が生体膜脂質に過酸化反応をひきおこすことにより膜構造の破綻からライソゾームの破壊へと進行し、遊出した加水分解酵素が細胞破壊をさらに加速するものと推定された。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師山本信二郎教授に深く感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり、御協力を頂きました脳神経外科学教室諸兄に感謝の意を表します。終始、御指導、御助言頂きました、金沢大学医学部第一生化学教室米山良昌教授、同松川茂講師ならびに教室員の皆様へ心から感謝致します。

本論文の要旨は、第55回日本生化学会（1982年10月、大阪）において発表した。

文 献

- 1) Lowry, O. H., Passonneau, J. V., Hasselberger, F. X. & Schulz, D. W.: Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J. Biol. Chem.*, **239**, 18-30 (1964).
- 2) Hinzen, D. H., Müller, U., Sobotka, P., Gebert, E., Lang, R. & Hirsch, H.: Metabolism and function of dog's brain recovering from longtime ischemia. *Am. J. Physiol.*, **223**, 1158-1164 (1972).
- 3) Kobayashi, M., Lust, W. D. & Passonneau, J. V.: Concentrations of energy metabolites and

cyclic nucleotides during and after bilateral ischemia in the gerbil cerebral cortex. *J. Neurochem.*, **29**, 53-59 (1977).

- 4) Cooper, H. K., Zalewska, T., Kawakami, S., Hossmann, K. A. & Kleihues, P.: The effect of ischaemia and recirculation on protein synthesis in the rat brain. *J. Neurochem.*, **28**, 929-934 (1977).
- 5) Dienel, G. A., Pulsinelli, W. A. & Duffy, T. E.: Regional protein synthesis in rat brain following acute hemispheric ischemia. *J. Neurochem.*, **35**, 1216-1226 (1980).
- 6) Demopoulos, H. B.: The basis of free radical pathology. *Fed. Proc.*, **32**, 1859-1861 (1973).
- 7) Siesjö, B. K., Carlson, C., Hägerdal, M. & Nordström, C. H.: Brain metabolism in the critically ill. *Critical Care Med.*, **4**, 283-294 (1976).
- 8) Flamm, E. S., Demopoulos, H. B., Seligman, M. L., Poser, R. G. & Ransohoff, J.: Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke*, **9**, 445-447 (1978).
- 9) Westerberg, E., Åkesson, B., Rehncrona, S., Smith, D. S. & Siesjö, B. K.: Lipid peroxidation in brain tissue in vitro: Effects on phospholipids and fatty acids. *Acta Physiol. Scand.*, **105**, 524-526 (1979).
- 10) Rehncrona, S., Smith, D. S., Åkesson, B. & Siesjö, B. K.: Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺-and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J. Neurochem.*, **34**, 1630-1638 (1980).
- 11) 小暮久也: 虚血と脳代謝。虚血と細胞障害—活性酸素, フリーラジカル—(早石修, 八木國夫, 五島雄一郎編), 第一版, 51-70頁, 医歯薬出版, 東京, 1980.
- 12) 小暮久也, 吉田伸一: 虚血と過酸化反応—治療面への示唆にふれて—。脳神経, **33**, 45-57 (1981).
- 13) 吉田伸一, 伊能 睿, 浅野孝雄, 佐野圭司, 久保田勝, 島崎弘幸, 植田伸夫, 安田 寛, 島田修史: 実験的虚血による脳内遊離脂肪酸の変動と脳保護剤の効果。脳神経, **32**, 931-939 (1980).
- 14) Yoshida, S., Inoh, S., Asano, T., Sano, K., Kubota, M., Shimazaki, H. & Ueta, N.: Effect of transient ischemia on free fatty acids and phospholipids in the gerbil brain. *J. Neurosurg.*, **53**, 323-331 (1980).
- 15) 加藤泰治, 田中 亮: グリア性細胞の培養とグリアニューロン相関研究への応用。組織培養, **8**, 217-224 (1982).

- 16) **Icard, C., Liepkalns, V. A., Yates, A. J., Singh, N. P., Stephens, R. E. & Hart, R. W. :** Growth characteristics of human glioma-derived and fetal neural cells in culture. *J. Neuropathol. and Exp. Neurol.*, **40**, 512-525 (1981).
- 17) **Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S. G., Howell, L. G., Engel, P. C., Matthews, R. G., Schuman, M. & Sullivan, P. A. :** The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 891-897 (1969).
- 18) **Brunner, K. T., Muel, J., Certini, J. C. & Chapuis, B. :** Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; Inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*, **14** 181-196 (1968).
- 19) 八木國夫：過酸化脂質の測定。臨床検査, **23**, 115-120 (1979).
- 20) **Lowly, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. :** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 21) **Bessey, O. A., Lowly, O. H. & Brock, M. J. :** A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*, **164**, 321-329 (1946).
- 22) 村田長芳, 永田哲士：培養細胞の電顕的観察法。I 透過型電顕試料作製法。組織培養, **2**, 70-84 (1976).
- 23) **Nathan, C. F., Silverstein, S. C., Brukner, L. H. & Cohn, Z. A. :** Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. *J. Exp. Med.*, **149**, 100-113 (1979).
- 24) **McPhail, L. C., DeChateret, L. R. & Jhonston, Jr., R. B. :** Generation of chemiluminescence by a particulate fraction isolated from human neutrophils. *J. Clin. Invest.*, **63**, 648-655 (1979).
- 25) **Fridovich, I. :** Hypoxia and oxygen toxicity. In S. Fahn, J. N. Davis & L. P. Rowland (eds.), *Advances in neurology*, **26**, Cerebral hypoxia and its consequences, p 255-259, Raven Press, New York, 1979.
- 26) 浅田浩二：酸素毒性。生化学, **48**, 226-257 (1976).
- 27) 早石 修：活性酸素について。虚血と細胞障害—活性酸素, フリーラジカル—(早石 修, 八木國夫, 五島雄一郎編)。第一版, 3-24 頁, 医歯薬出版, 東京, 1980.
- 28) **Kellogg, E. W. & Fridovich, I. :** Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.*, **250**, 8812-8817 (1975).
- 29) **Lynch, R. E. & Fridovich, I. :** Auto inactivation of xanthine oxidase-The role of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta*, **571**, 195-200 (1979).
- 30) **Seligman, M. L. & Demopoulos, H. B. :** Spin-probe analysis of membrane perturbations produced by chemical and physical agents. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **222**, 640-667 (1973).
- 31) **Fong, K. L., McCay, P. B. & Poyer, J. L. :** Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. *J. Biol. Chem.*, **248**, 7792-7797 (1973).
- 32) **Tappel, A. L. :** Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.*, **32**, 1870-1874 (1973).
- 33) **Desai, I. D., Sawant, P. L. & Tappel, A. L. :** Peroxidative and radiation damage to isolated lysosomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **86**, 277-285 (1964).
- 34) 長田英輔, 池尻直幹, 谷川久一：肝細胞の変性, 壊死の超微細構造。細胞, **10**, 593-602 (1978).
- 35) 小川和郎, 田中輝男：膜破壊と機能原子団の電子顕微鏡的細胞化学。最新医学, **33**, 670-676 (1978).
- 36) **Dabholkar, A. S. & Ogawa, K. :** Ultra-cytochemical changes in the distribution of acid phosphatase and thiamine pyrophosphatase activity in the nerve cells of vitamin E deficient rats. *Acta histochem. cytochem.*, **11**, 52-63 (1978).
- 37) **Dabholkar, A. S. & Ogawa, K. :** Ultra-cytochemical changes in the distribution of acid phosphatase in the liver cells of vitamin E deficient and vitamin E supplemented rats. *Acta histochem. cytochem.*, **11**, 195-204 (1978).
- 38) **Molenaar, I., Vos, J. & Hommes, F. A. :** Effect of vitamin E deficiency on cellular membranes. *Vitamines and Hormons*, **30**, 45-82 (1975).
- 39) **McCord, J. M. & Fridovich, I. :** Superoxide dismutase-An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055 (1969).

- 40) Misra, H. P. Fridovich, I.: Superoxide radiation lethality. Arch. Biochem. Biophys., 176, 577-581 (1976).
dismutase and the oxygen enhancement of

An Experimental Study of the Effect of Active Oxygen on Cultured Glial Cells from Fetal Mouse Brain Masahiro Kitabayashi, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 96, 823—834 (1987)

Key words: Ischemic brain damage, cultured glial cells, active oxygen, lipid peroxide, electron microscopy

Abstract

A series of experiments was performed to study the biochemical and morphological aspects of cell damage induced by active oxygen, using cultured cells derived from fetal mouse brain. A xanthine-xanthine oxidase (Xa-XOD) system was used as the source for generating active oxygen. The degree of cell damage was calculated by measuring the release of ^{51}Cr from the cultured cells labeled with ^{51}Cr . After administration of the Xa-XOD system, cell damage gradually increased over time for four hours, and rapidly increased thereafter. Intracellular lipid peroxide gradually increased over time and rapidly increased after eight hours. ACP-ase activity in the cells decreased over time, while it increased in the medium. The time course of ACP-ase activity in the medium was similar to that of ^{51}Cr release. On transmission electron microscopy, the vacuolation of cytoplasm, a remarkable decrease of intracellular lysosomal granules, and the swelling of mitochondria were seen in the cultured cells exposed to the Xa-XOD system. Partial disruption of the plasma membranes was also seen in severely damaged cells. In addition, the inhibitory effects of specific scavengers against four types of active oxygen were examined. The combination of superoxide dismutase and catalase exhibited the most potent inhibitory effect, while the second was catalase alone. It is suggested that the disruption of plasma membranes and the subsequent breakdown of lysosomes developed as a result of lipid peroxidation within membranes provoked by active oxygen, particularly hydrogen peroxide. The sequential release of hydrolytic enzymes conceivably accelerates the destruction of cells.