

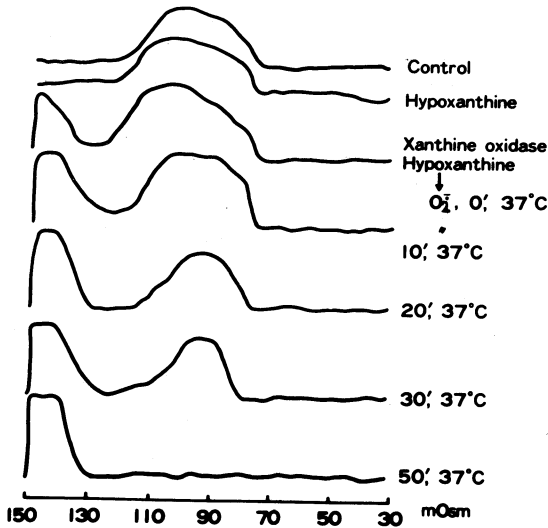
### 3. 酸化性膜障害

上坂 伸宏\* 今井 安男\*\*

我々は OHP 療法中にみられる酸素毒性に関して、赤血球に焦点をあてて二三の報告をしてきた<sup>(1)</sup>。今回は、一つのモデル系として hypoxanthine-Xanthine Oxidase 系を用いて活性酸素 (主として  $O_2^-$ ) を生成し、その赤血球膜に及ぼす影響を調べた。実験は  $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH } 7.3$  で行った。溶血実験を CPC 法によって行い<sup>(2)</sup>、活性酸素によって引きおこされた浸透圧脆弱性変化を見出した (Fig. 1)。活性酸素との反応時間に依存した浸透圧脆弱性の著しい増加が見られる。

いる事は、この変化が単なる活性酸素による直接作用のみならず、それを引き金として進行する膜内での連鎖的反応による事を示唆する。以下の他の測定法による結果も同様な時間経過を有する。尚、hypoxanthine や Xanthine Oxidase のみの場合、又、それらの反応物によっては変化がおこらない事、即ち、活性酸素に因る変化である事は確認した。活性酸素により変化した赤血球は、著明な形態変化を伴った体積変化を示し、又、ヘモグロビン (Hb) はメト化している。走査型電子顕微鏡写真で、膜の内方陥没により cup 状となった赤血球 (stomatocyte) が見出された。ヘマトクリット法による体積変化を Fig. 2 (A) に示す。300 mOsM 溶液 (○, ●) と 600 mOsM 溶液 (△, ▲) を用いて、各 control (○, △) と、活性酸素と反応させた赤血球 (▲, ●) を比較した。活性酸素と反応した赤血球は、明確な体積増加を示すと共に、浸透圧に対する反応性を保持している事も明らかである。この結果は浸透圧脆弱性増加現象と良い対応を示す。Ht を一定にし、Brookfield の回転粘度計を用いて粘度を測定したのが Fig. 2 (B) である (○, ● は上記に同じ)。Ht が一定にもかかわらず、明らかに粘度の上昇がみられる。これは主として形態変化に伴うものと考えられ、前記の stomatocyte 形成の結果からもうなづける。これら巨視的变化に対応して、膜レベルではどのような変化がおこっているかを調べる為にスピラベル法による実験をした。Fig. 3 は各種脂肪酸ラベル (5 NS, 12 NS, 16 NS) で赤血球をラベルした時の ESR スペクトルを示す。ESR スペクトルの最大分離巾 (overall splitt-

Fig. 1



水溶液中での活性酸素の寿命が短い事に留意すると、この変化が50分にわたる時間経過を持って

\* 京大, 医, 生理  
\*\* 明治鍼灸短大, 臨床医学

ing,  $2T_{11}$ ) は膜の流動性を反映している。同図は、膜内の“深さ”によって流動性が局所的に異なり、膜の表面に近い方が流動性が低く、ラベルの回転が異方的である事を示している<sup>(6)</sup>。活性酸素が赤血球膜に及ぼす効果を、12 NS を用いて調べたのが Fig. 4 である。(1)は control で、(2)(3)(4)の順に活性酸素の量が多くなっている。 $2 T_{11}$ が約 1~1.5 G ほど狭くなっているだけでなく、(↑), (↓)印に示される如く、新しいピークが出現している。この新ピークの分離巾は 61 G であり、この様に大きな分離巾は、通常、37°C の脂質膜では得られない。即ち、膜の脂質が凍結状態に近い約 5°C 以下の状態でないとい得られない。同じ実験を 5 NS と 16 NS を用いて行ったが、新ピークはみられなかった (但し、5 NS の場合は  $2 T_{11}$  が約 54 G である為に重なりあって明確にならなかったのかもしれない)。16 NS で新ピークが見出されなかった事と、アルブミンをスピララベルした時は、 $2 T_{11}$  が 37°C で約 61 G である事を思いおこすと<sup>(4)</sup>、新ピークは何らかの蛋白因子に起因する可能性がある。12 NS で活性酸素による変化を確かめてから (Fig. 4 (1))、Ghost 膜を作りスペクトルを記録した (Fig. 4 (2))。Ghost 膜を作る過程でスピララベルがはがれる為に、明確なスペクトルではないが、新ピークが残っている事は確からしい。尚、活性酸素により変化した赤血球で作った ghost 膜には、メト化した Hb が固着しており、容易にはがれない事を付記する。この ghost 膜に 12 NS を再び追加して得たのが Fig. 4 (3) のスペクトルである。新ピークはみられず、約 1.5 G の  $2 T_{11}$  の減少を別にすれば、control のスペクトルと同じである (Fig. 3 (1) 参

照)。Ghost 膜を先に作り、それをスピララベルしてから活性酸素と反応させた場合も、新ピークは見出されなかった。以上の結果は、新ピークが ghost 膜を作る過程で膜からはがれやすい蛋白、又は、Hb に起因する事を示唆している。即ち、これらの蛋白と脂質の相互作用の結果として、12 NS が蛋白に再分配されたか、又は、前記の如く考えにくい事ではあるが、膜内の局所に凍結状態に近い rigid な脂質の core が形成された為と考えられる。そこで、脂肪酸のように簡単に再分配されない大きな分子である phosphatidylcholine spin label (PC\*) を用いて実験をした<sup>(5)</sup>。Fig. 6 (1) は (PC\*) のリポゾームの ESR スペクトルであり、これを赤血球にラベルしたのが同図(2)である。この赤血球を活性酸素と反応させたが、同図(3)に見られるように、新ピークは見出されなかった。即ち、脂質内の局所的な rigid core の存在はほぼ否定される。以上、活性酸素による赤血球の巨視的变化に対応して、膜レベルでは、脂質部分の流動性変化のみならず、ある種の蛋白質の膜内再配位を含む大きな構造変化をきたし、動的な脂質と蛋白の相互作用がおこっている事を示した。

- (1) Y. Imai, N. Uyesaka et al. VIth International congress on hyperbaric medicine and offshore medicine (1977)
- (2) R. Harada, E. Kimura et al. J. Physiol. 19: 306, 1969.
- (3) (a) W. L. Hubbel, H. M. McConnell: J. Am. Chem. Soc. 93: 314, 1971.  
(b) N. Uyesaka et al.: J. Memb. Biol. 27: 283, 1976.
- (4) J. D. Morrisett et al.: J. Biol. Chem. 250: 2487, 1975.
- (5) K. Tanaka, S. Ohnishi: Biochim. Biophys. Acta. 426: 218, 1976.

Fig.2

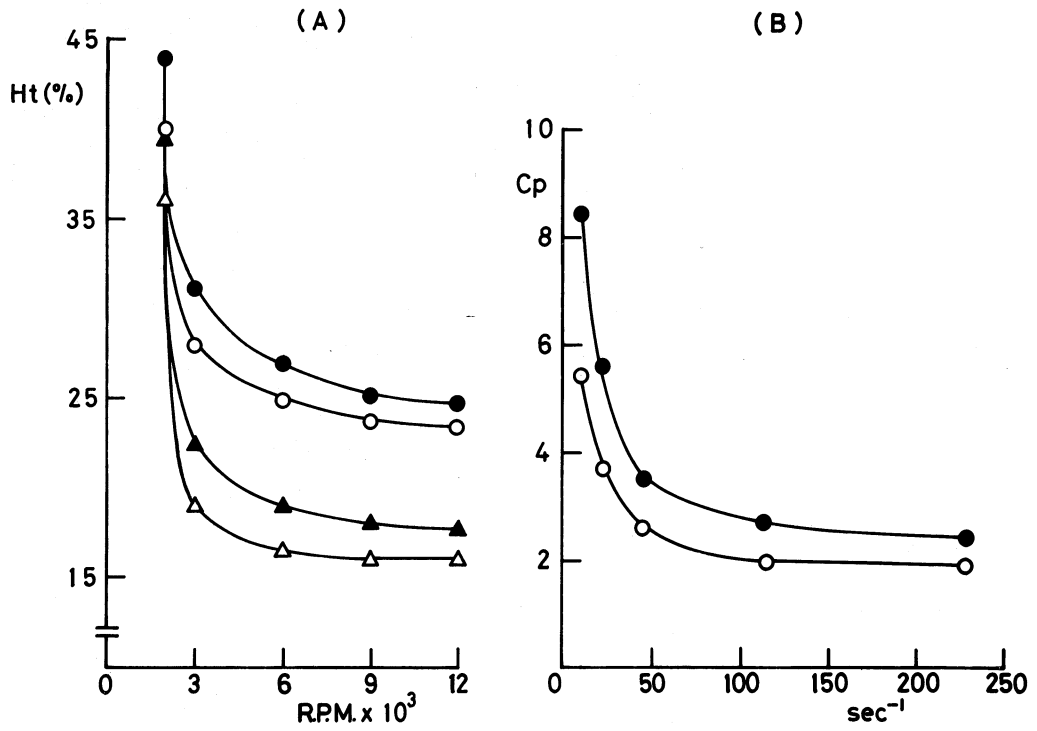


Fig.3

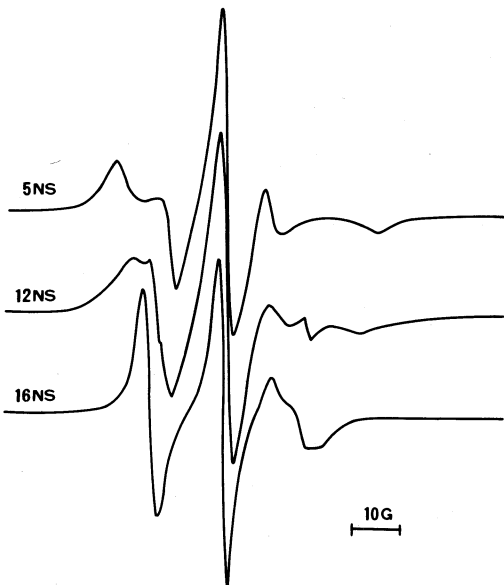


Fig.4

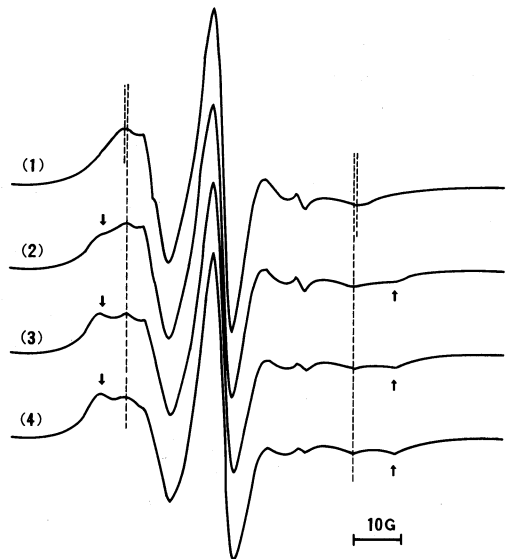


Fig.5

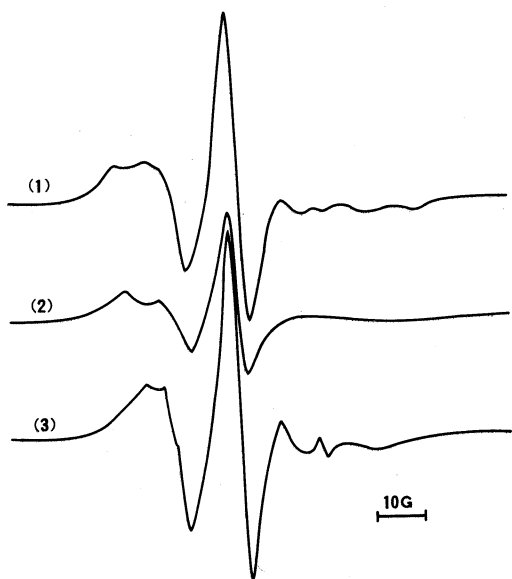


Fig.6

