

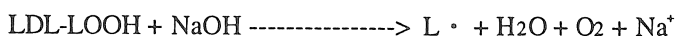
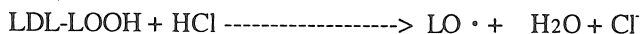
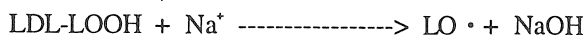
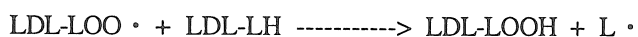
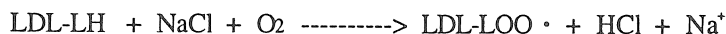
## 9549 血清LDLの脂質過酸化反応におけるNaイオンの阻害とその機構

助成研究者：豊崎 俊幸 (香蘭女子短期大学 家政科)

**研究目的：**前年度において、演者は油脂加工時あるいは油脂加工中の脂質過酸化反応に対してNaClが何らかのかたちで関与し、その結果としてNaClが脂質過酸化反応を抑制していることを偶然発見したことから、それらについて詳しく検討した結果、NaClが脂質過酸化反応を抑制している事実を確認し、併せその作用機構についても明らかにしてきた。今回は、身体における血清LDLの脂質過酸化に対して、NaClが酸化抑制効果を有するものなのかを詳しく追跡した結果、若干の知見が得られたのでそれらについて報告する。

**研究方法：**人血液から遠心分離法(40,000 rpm, 24時間)によってLDL画分を得た後、0.01Mリン酸緩衝液(pH7.4)に対して、4℃下で24時間透析し、得られた画分を実験に供した。なお、最終的に得られたLDL画分は、アガロース電気泳動によって単一なバンドとして確認した。LDL画分の脂質過酸化反応は、水溶性ラジカル発生剤であるAAPHを、脂溶性スジカル発生剤としてAMVNを、また自動酸化による誘発によって行った。NaイオンあるいはClイオンがLDLの脂質過酸化反応に関与するものかの検討は、アルギン酸あるいはキトサンビーズカラムを調整して追跡した。NaClの抗酸化効果の測定は、234nmの共役ジエンの吸収を測定することから算出した。

**研究結果と考察：**水溶性あるいは脂溶性スジカル発生剤でのLDL脂質過酸化反応は、NaCl濃度0.15M-0.2Mの範囲で抑制した。いっぽう自動酸化の場合は、NaClの抗酸化効果は確認できなかった。キトサンビーズ処理によって、水溶性および脂溶性ラジカル発生剤誘発によるLDLの脂質過酸化反応は抑制された。いっぽうアルギン酸処理によるLDLの脂質過酸化反応は抑制されなかった。これらの結果から、NaイオンがLDLの脂質過酸化反応に何らかのかたちで関与している可能性が高いと判断できた。Naイオンの脂質過酸化抑制機構については次の反応式を考えた。



このような機構によってLDLの脂質過酸化が抑制されているものと推察された。



## 9549 血清LDLの脂質過酸化反応におけるNaイオンの阻害とその機構

助成研究者：豊崎 俊幸（香蘭女子短期大学 家政科）

### 1. 研究目的

前年度において、著者は油脂加工時あるいは油脂加工中の脂質過酸化反応に対してNaClが何らかのかたちで関与し、その結果としてNaClが脂質過酸化反応を抑制していることを偶然発見し、併せその作用機構についても明らかにしてきた。この研究でのトピックスとしては、NaClが脂質過酸化反応に関与していたことである。生体にとってNaClは必要不可欠なミネラルとして平素毎日摂取している。健康面から、NaClの過剰摂取は高血圧それに付随する種々の成人病を誘発し、その中でとくに動脈硬化発症との関係が注目されている。この動脈硬化発症の引き金として、LDL(Low Density Lipoprotein)が注目されている。このLDLは身体の各組織にコレステロールを運ぶ働きをしている血清リポタンパク質の一種である。LDLは一般に悪玉コレステロールと呼ばれ、動脈硬化発症の重要な危険因子の一つであることは、多くの疫学的調査<sup>1)</sup>や多くの実験報告<sup>2-7)</sup>によって明らかにされている。さらに動脈硬化の形成に酸化LDLが重要な役割を担っていることが最近明らかにされてきた。つまり、粥状動脈硬化巣に酸化LDLの存在が免疫組織化学的に確認される<sup>8)</sup>ことや、抗酸化剤を投与することによって、動脈硬化の進展が抑制されること<sup>9)</sup>などがあげられる。このような報告から、単純にLDLの酸化を抑制することで、ある程度動脈硬化の進展を抑制させることが可能かと考えられる。そこで著者は前年度の研究成果、つまりNaClが脂質過酸化反応に対して、酸化抑制効果を有する事実から、身体における血清LDLの脂質過酸化に対して、NaClが酸化抑制効果を有するものなのかを詳しく追跡した結果、若干の知見が得られたのでそれらについて報告する。

### 2. 研究方法

#### 2.1 血清LDL画分の分離・精製

人血清LDL(d 1.019-1.063 g/ml)は、Mirellaら<sup>10)</sup>の方法に準じて分離した。すなわち、K-EDTA(1.6mg/ml)を含む人血液を遠心分離機(2000 x g、8分)で血清画分を得た後、超遠心分離機(40,000rpm、20時間)によってLDL画分を得た。得られたLDL画分は、0.01Mリ

ン酸緩衝液(pH7.4, 0.15NaClを含む)に対して、4℃下、24時間透析を行い、LDL画分を精製した。なお、LDL画分の純度はアガロース電気泳動によって単一のバンドとして確認した。

## 2.2 LDL画分のタンパク質量の測定

LDL画分のタンパク質量は、Lowry法<sup>11)</sup>によって測定した。

## 2.3 酸化LDLの調製

酸化LDL(1.019-1.063mg/ml, 0.01M EDTA-free リン酸緩衝液, pH7.4)は、恒温槽中(37℃)で、試料をマグネチックスターラーで酸素を吹き込みながら攪拌し酸化させ、経日的に一定量採取し測定試料とした。

## 2.4 リノール酸ヒドロペルオキシドの調製

リノール酸ヒドロペルオキシドの調製は、Matsudaらの方法<sup>12)</sup>に準じて調製した。すなわち、リノール酸32mM、0.1%ツイン80、50mMリン酸緩衝液(pH9.0)を含む反応液20mlに、50unitsのリボキシゲナーゼを添加し、酸素を吹き込みながら40分反応させた。反応終了後、エチルエーテルでリノール酸ヒドロペルオキシドを抽出した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。得られたリノール酸ヒドロペルオキシドは、234nmの共役ジエンの吸収および薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いて純度を決定した。TLCの展開は、*n*-ヘキサン / エチルエーテル / 酢酸(60 : 40 : 0.1, v/v/v)で行なった。TLC上の各成分の確認は、50%硫酸を噴霧後、110℃で20分加熱あるいはUV下で確認した。

## 2.5 水溶性、脂溶性ラジカル発生剤によるLDLの過酸化とNaClの抗酸化効果

水溶性のラジカル発生剤によるLDLの過酸化反応は、0.2mg/mlのLDL溶液(0.5M SDS/0.05Mリン酸緩衝液、pH7.4)を3.0mlのキュベットに入れた後、マイクロシリンジで0.5M 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride(AAPH)水溶液50μl加え、速やかに攪拌後、234nmの共役ジエンの吸収を分光光度計を用いて測定した。

脂溶性のラジカル発生剤によるLDLの過酸化反応は、水溶性ラジカル発生剤による方法と同様に行った。なお、脂溶性ラジカル発生剤として、30mM2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)(AMVN)メタノール溶液25μlを添加した。

## 2.6 リノール酸ヒドロペルオキシドとLDLとの反応およびNaClの効果

食事由来によって酸化脂質を摂取し、吸収されたヒドロペルオキシドが血中に以降し、LDLに対して影響を及ぼすことが考えられたので、予め調製したリノール酸ヒドロペルオキシドとLDLとの反応を試み、併せてNaClの抗酸化効果について検討した。25mMリノール酸溶液(0.5MSDS/0.05Mリン酸緩衝液、pH7.4)1.0mlとLDL溶液(d1.019-

1.063mg/ml, 0.1MEDTA-freeリン酸緩衝液、pH7.4) 1.0mlを3.0mlのキュベットに入れた後、37°Cで一定時間放置した後、234nmの共役ジエンの吸収を測定した。また、NaClの効果については、一定量のNaCl溶液を用いて検討した。

### 3 結果および考察

#### 3.1 ラジカル発生剤および自動酸化によるLDLの酸化

本研究では、水溶性ラジカル発生剤としてAAPMを、脂溶性ラジカル発生剤としてAMVNを、また自動酸化の3系列の酸化誘発を用いてLDLの過酸化を行った。Fig.1に示したように水溶性および脂溶性ラジカル発生剤は、添加後速やかに234nmの共役ジエンの吸収が確認され、約7分後には234nmの吸収は消失した。いっぽう、自動酸化の場合、放置時間とともに234nmの吸収も増加傾向を示した。生体においては、自動酸化誘発による脂質の過酸化はほとんど考えなくともよい。むしろ種々のラジカルが引き金となって脂質過酸化が進行する。ただ、本研究においてはin vitro系での追跡のため、実際生体内においてどのような物質がラジカル発生剤として作用しているかは不明である。

#### 3.2 AAPH、AMVNおよび自動酸化誘発によるLDLの過酸化とNaClの影響

水溶性、脂溶性ラジカル発生剤および自動酸化を用いてLDLの過酸化を誘発させ、そのときNaClが抗酸化効果を示すものかを検討し、その結果をFig.2に示した。NaCl添加濃度0.15MまではNaCl濃度増加とともに抗酸化効果が認められた。0.15M以上になると抗酸化効果はNaCl濃度上昇とともに減少傾向を示した。0.15MのNaClは生体内においては生理的食塩の濃度にほぼ一致することから、実際生体内においてもNaClの脂質に対して抗酸化効果を有しているものと推察される。脂溶性ラジカル発生剤としてAMVNを用いてLDLの過酸化を誘発させ、そのときNaClが抗酸化効果を示すものかを検討した結果、水溶性ラジカル発生剤の場合0.15Mレベルにおいて抗酸化効果が最大となったが、脂溶性ラジカル発生剤の場合、抗酸化効果を示したNaCl濃度範囲は0.15Mから0.2Mの範囲であった。いずれにしても水溶性、脂溶性ラジカル発生剤を用いて、LDLの過酸化を誘発させた場合、生体内に近い生理的レベルの範囲においてNaClの抗酸化効果が期待できる結果が得られた。いっぽう自動酸化によってLDLの過酸化を行った場合、若干であるがNaCl濃度範囲0.15Mから0.2Mにおいて抗酸化効果が確認されたが、抗酸化効果のレベルはラジカル発生剤での抗酸化効果に比して極めて低い。これらの結果から、少なくともLDLの過酸化は自動酸化誘発よりむしろラジカルが引き金となることでLDLの過酸化が進行するものと考えられ、またNaClが抗酸化的に作用する場合、その機構としてNaClが何らかのかたちでラジカル

消去を行っている可能性を強く示唆している。生体においてはNaClを摂取するとNa<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>にイオン化することから、NaCl自身が抗酸化効果を示すことは考えられない。したがって、NaイオンかClイオンのいずれかがLDLの過酸化反応に関与しているものと推察される。このことを確認するためにキトサンおよびアルギン酸を用いて検討した。

### 3.3 キトサンビーズを利用した追跡

キトサンはグルコサミンのポリマーで、分子量数百万、カニやエビなどの甲羅に含まれているキチンをアルカリ処理して作られた食物繊維である。キトサンは特異的にClイオンと結合することは既知の事実である。LDLの過酸化を行う前に、キトサンビーズを詰めたカラムを用いてNaClを含むLDL溶液を通過させ、Clイオンだけを除去した後、LDLの過酸化を行い、そのときの抗酸化効果を検討した結果をFig.3に示した。水溶性および脂溶性ラジカル発生剤を用いた場合、キトサンビーズカラムの通過回数を増やすとともに、抗酸化効果も高まった。いっぽう自動酸化の場合、キトサンビーズカラムを6回通過させても抗酸化効果は確認されなかった。このことから、キトサンビーズカラムを通過させることで、少なくともClイオンのみ除去されていることから、ClイオンよりむしろNaイオンがLDLの過酸化反応に関与している可能性が高いものと判断できた。次にNaイオンが抗酸化機構に関与しているものかをアルギン酸を用いて検討した。

### 3.4 アルギン酸を利用した追跡

アルギン酸は特異的にNaイオンのみと結合する性質があることから、試料の過酸化を行う前にアルギン酸カラムを追加させ、Naイオンのみを除去した後、LDLの過酸化を行ったときの結果をFig. 4に示した。水溶性、脂溶性ラジカル発生剤、あるいは自動酸化のいずれの場合も抗酸化効果は確認されなかった。この結果から、NaイオンがLDLの過酸化反応に関与している可能性が高いものと推察された。

### 3.5 リノール酸ヒドロペルオキシドの影響

いずれの脂質過酸化誘発の場合、ヒドロペルオキシドが生成される。したがって、生成されたヒドロペルオキシド自身がLDLの脂質過酸化反応に関与しているものとするれば、ヒドロペルオキシドの生成が増加すればするほどヒドロペルオキシドの分解も増加するものと考えられたので、このことを検討し、その結果をFig.5に示した。NaClを含む系の場合、ヒドロペルオキシド濃度上昇とともに、ヒドロペルオキシドの分解割合も増加し、その分解はほぼ直線的に分解した。いっぽうNaClを含まない系の場合、約40 μMまではヒドロペルオキシドの分解が確認されたが、それ以上の濃度では確認されなかった。この結果から、脂質過酸化によって生成したヒドロペルオキシドが脂質過酸化反応に関与していることが明らかとなった。

### 3.6 NaClのLDL脂質過酸化抑制機構

Scheme 1に示したように、LDL中の脂質(LH)は酸素存在下で水素が引き抜かれることで過酸化を受け、ペルオキシラジカル( $\text{LOO}\cdot$ )が生成される。その反応時にNaClはNaイオンとClイオンとに解離する。さらに、Clイオンは脂質の水素を受け取りHClとなる。ペルオキシラジカルは新たな脂質から水素を引き抜き、LDLヒドロペルオキシド(LOOH)が生成される。LDLヒドロペルオキシドとHClとの反応によって、ヒドロペルオキシド自身が分解する。また、NaイオンはLDL-LOOHと反応して、NaOHを生成される。生成されたNaOHはLDL-LOOHと反応してヒドロペルオキシド自身は分解する。

このような反応機構によって、LDLの脂質過酸化が抑制されたものと推察できた。このようなことから、Naイオンが脂質過酸化反応に関与し、結果として脂質過酸化を抑制したものと推察された。また、Fig. 5の結果については、生成されたヒドロペルオキシドが多ければ多いほどScheme 1の反応機構が進行する確立が高くなり、結果としてヒドロペルオキシドの分解割合が増加したものと推察できた。このことから、NaイオンあるいはClイオンが存在している系であれば、脂質過酸化反応によってヒドロペルオキシドを一端生成させることで、最終的には逆に脂質過酸化を抑制することになるものと考えられた。なお、Scheme 1の反応機構が実際進行しているものかはもう少し詳しく追跡する必要がある。また、反応機構の過程ではHClあるいはNaOHが生成されている。生体内においてHClあるいはNaOHの生成される可能性はほとんど考えられないことから、この点については今後の課題である。

## 4. 今後の課題

本研究によってNaイオンがLDLの脂質過酸化を抑制する、いわゆる抗酸化効果のあることを初めて明らかにした。また、その機構はNaイオンが関与することで脂質過酸化を抑制したことが本研究によって確固たるものとなった。著者はここで得られた結果が生体内の脂質過酸化をもNaClが何らかのかたちで関与することで脂質過酸化を抑制している可能性がきわめて高いであろうという成果を得た。生体内においてNaイオンあるいはClイオンはたえず血液中に存在することから、一定イオン濃度をたえず維持することで、少なくともLDLの脂質過酸化反応を抑制できるものと推察される。

## 5. 引用文献

- 1) Multiple risk factor intervention trial research group, *JAMA*, 248, 1465, (1982).

- 2) Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J., Witztum, J.L. Beyond cholesterol : Modifications low density lipoprotein that increases its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 320, 915-924 (1989).
- 3) Witztum, J.L., Steinberg, D. Role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.*, 88, 1785-1792 (1991).
- 4) Palinski, W., Yla-Herttula, S., Rosenfeldm, M.E., Butler, S.W., Socher, S.A., Parthasarathy, S., Curtiss, L.K., Witztum, J.L. Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of LDL. *Arteriosclerosis*, 10, 325-335 (1990).
- 5) Jialal, I., Norkus, E.P., Cristol, L., Grundy, S.M. Beta carotene inhibits the oxidative modification of LDL. *Biochim. Biophys. Acta*, 1086, 134-138 (1991).
- 6) Oleg, M.P., Svetlana, A.E., Elena, S.D., Victor, S.S., Valery, L.S., Yury, A.V. Hypochlorite induces lipid peroxidation in blood lipoproteins and phospholipid lipoproteins. *Free Radic. Biol. Med.*, 19, 133-140 (1995).
- 7) Foote, C.S., Goynes, T.E., Lehrer, R.I. Assessment of chlorination by human neutrophils. *Nature* (London), 301, 715-716 (1983).
- 8) Quinn, M.Y., Parthasarathy, S., Fong, L.G., Steinberg, D. Oxidatively modified low density lipoproteins: A potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 2995-2998 (1987).
- 9) Esterbauer, H., Gevicki, J., Puhl, H., Jurgens, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.*, 13, 341-390 (1992).
- 10) Mirella, N., Massimo D', A., Gianni, T., Vincenzo, G., Maurizio Di, F., Cristina S. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radic. Biol. Med.*, 19, 541-552 (1995).
- 11) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 263-275 (1951).
- 12) Matsuda, Y., Beppu, T., Arima, K. Crystallization and positional specificity of hydroperoxidation of fusarium lipooxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 530, 439-450 (1978).



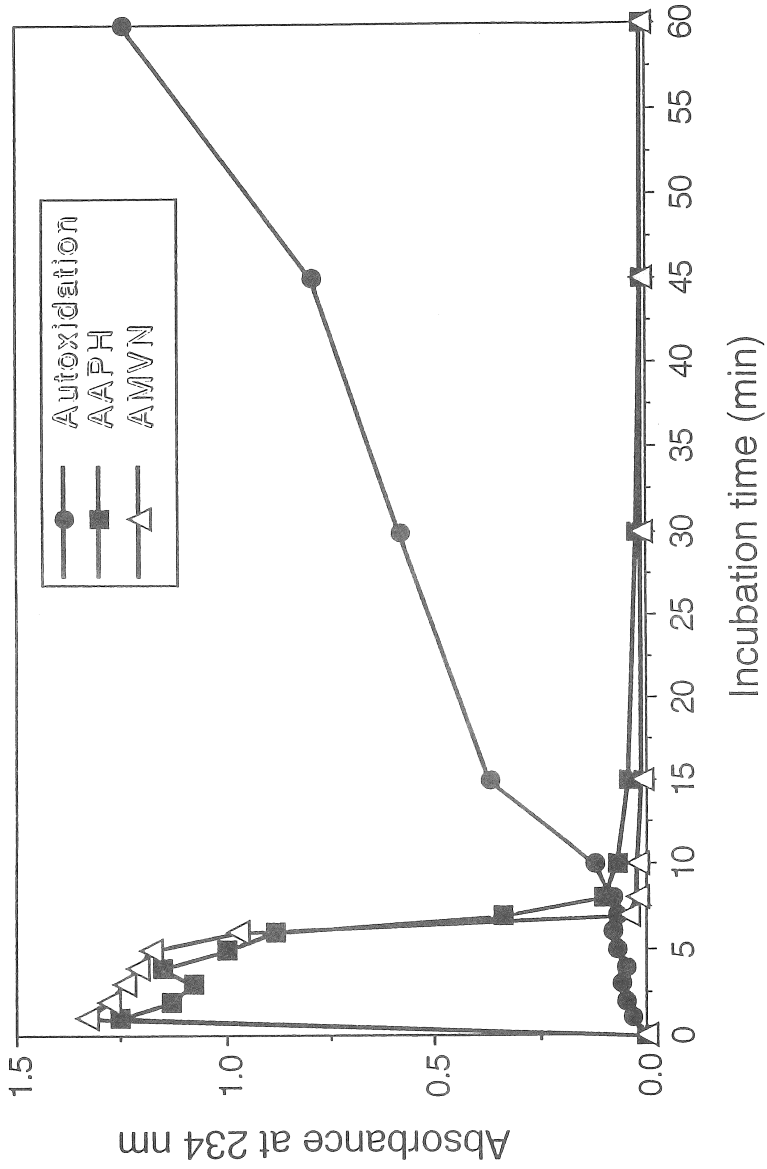


Fig. 1 Time course of the Autoxidation, AAPH-catalyzed and AMVN-catalyzed LDL oxidation.

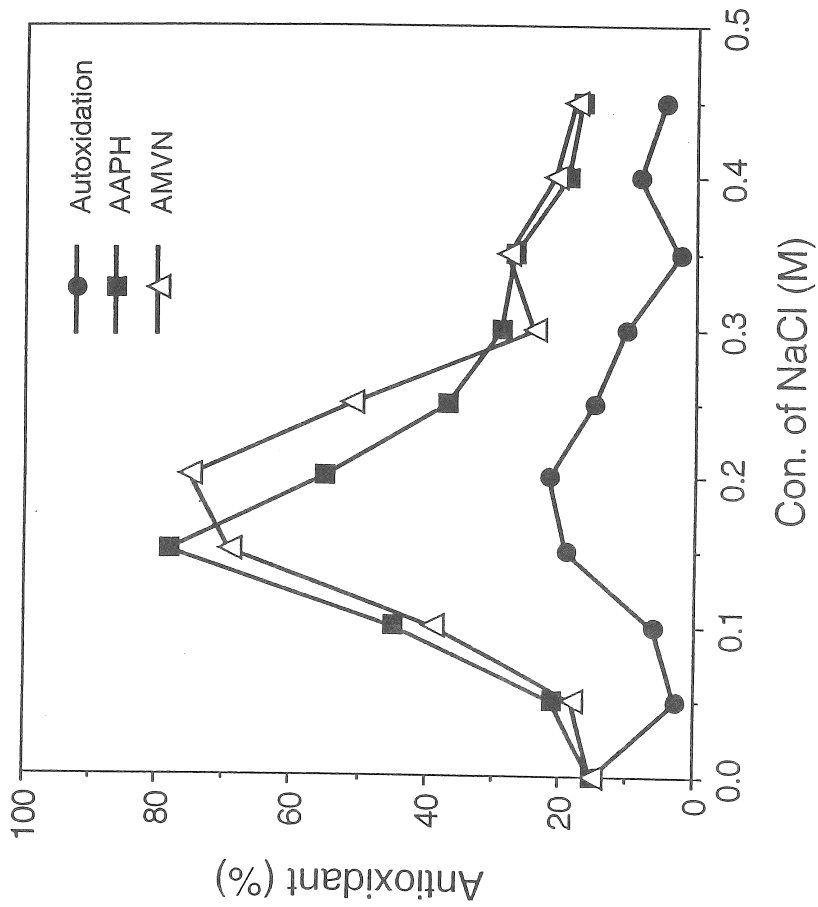


Fig. 2 Effects of the concentration of NaCl on the various catalyzed LDL oxidation.

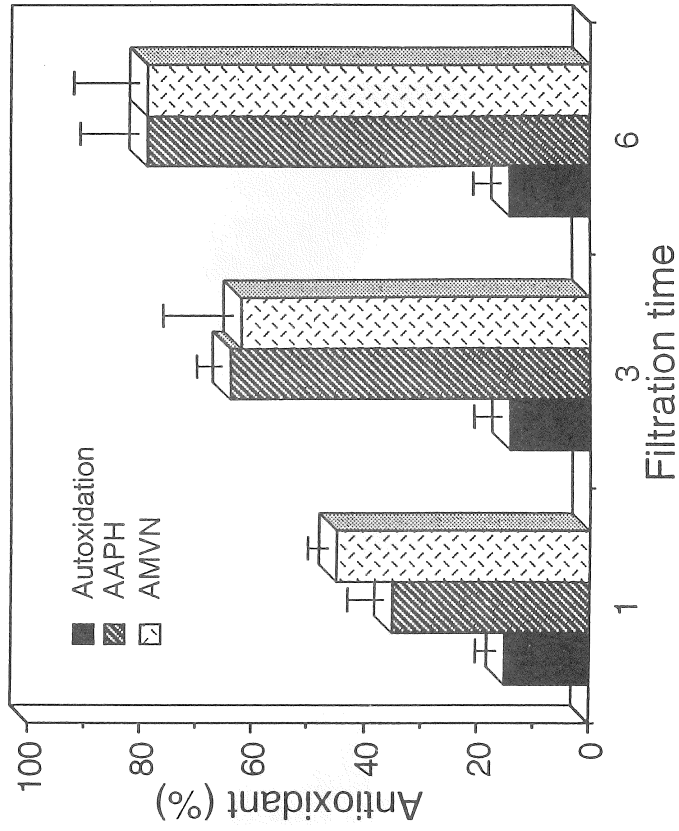


Fig. 3 Effect of chitosan on the oxidation of LDL with NaCl solution.

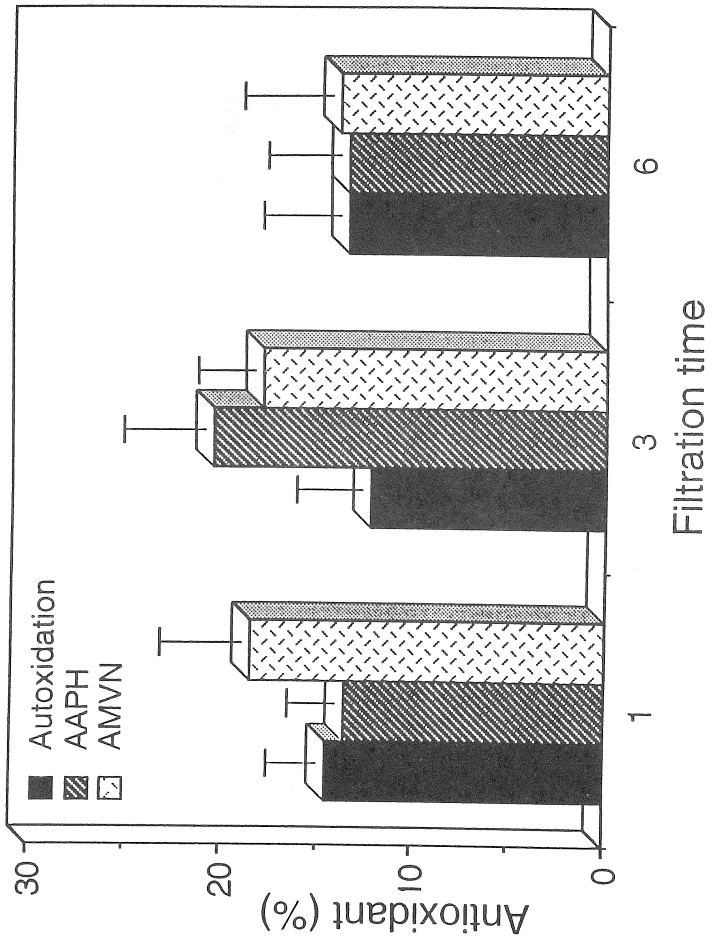


Fig. 4 Effect of alginic acid on the oxidation of LDL with NaCl solution.

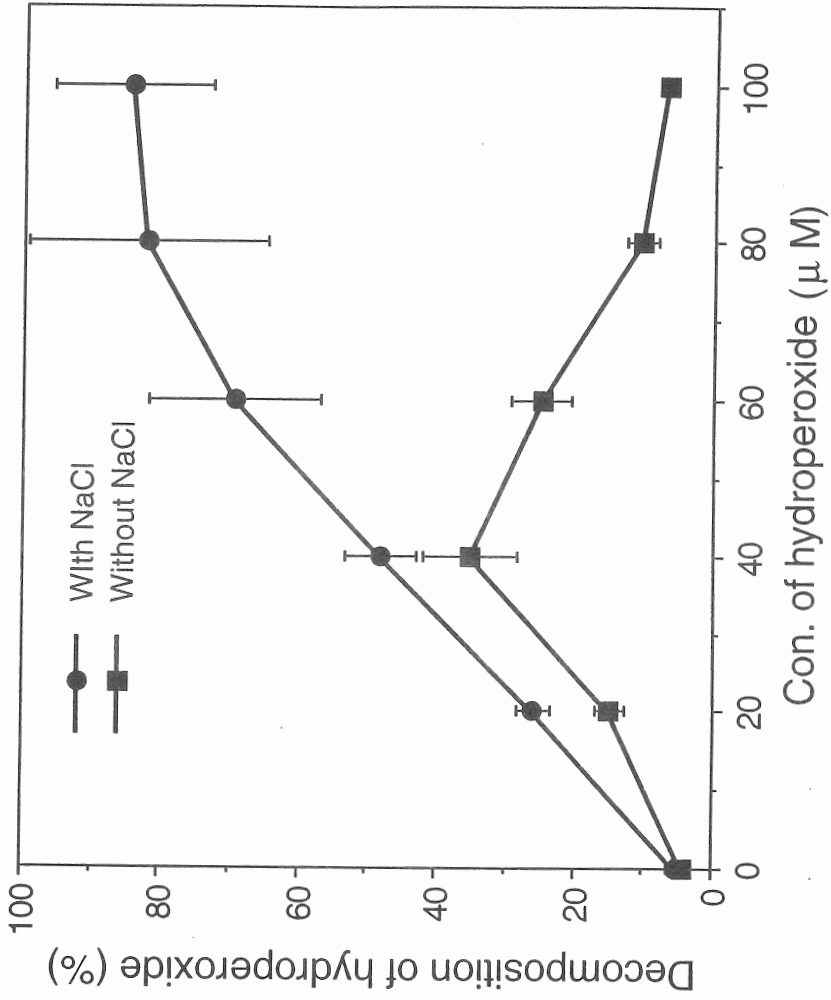
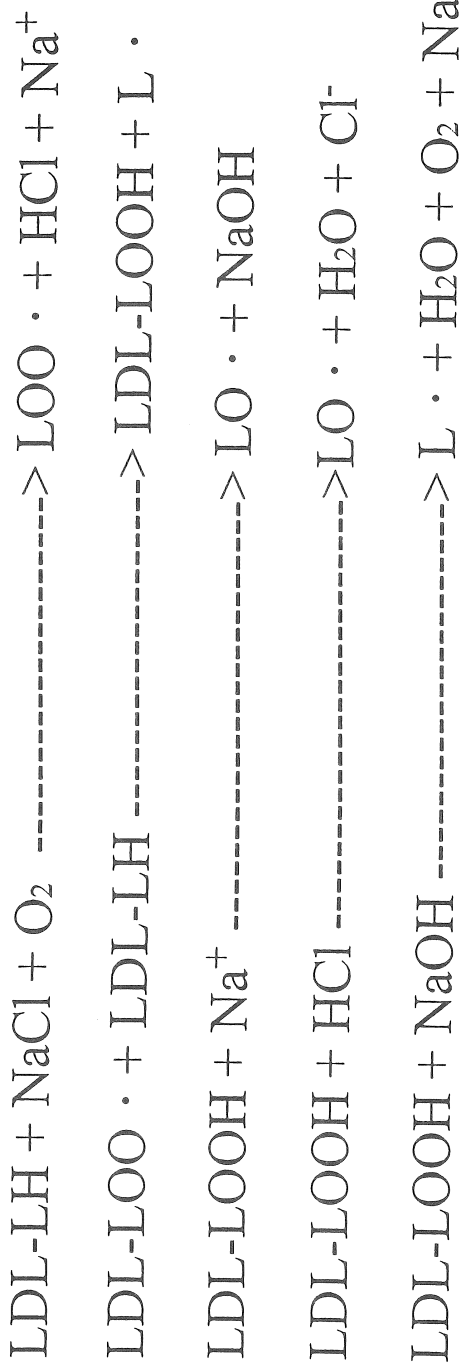


Fig. 5 Effect of the addition of linoleic acid hydroperoxide on the decomposition of LDL-hydroperoxide.



**Scheme 1 Mechanism of NaCl antioxidant effect on the LDL oxidation.**

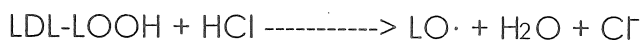
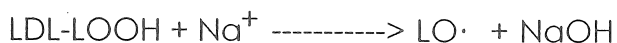
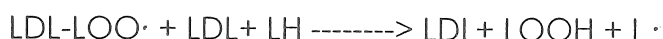
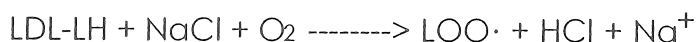
# Mechanism of the antioxidant effect of Na ion on the LDL oxidation

Toshiyuki Toyosaki

*Department of Home Economics, Koran Women's junior College*

## Summary

This paper reveals for the first time that the studies of the antioxidant effect of lipid peroxidation with NaCl. The purpose of this studies was to antioxidant effect of the Na ion in in vitro Low density lipoprotein (LDL) oxidation was screened, using 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH), 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile (AAVN) and autoxidation catalysis. The antioxidant activity was measured by the lag time preceding the onset of conjugated diene (234 nm) formation. The antioxidant effect of Na ion were confirmed to exists in the evolution of radical reagents. On the other hand, the antioxidant effect of Na ion was no confirmed. The mechanism of antioxidant action were as follows:



The results suggested that the antioxidant activity of Na ion was confirmed in exposure of LDL in vitro to the evolution of radical reagents. The study thus offers important finding for biochemistry or sciences.