

オゾン曝露によるニジマス赤血球の障害発現における鉄の関与

福永健治・鈴木鐵也・高間浩蔵
(北海道大学水産学部海洋生物資源化学科食品機能化学講座*)

Effect of Hemoglobin and Iron on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) RBC Damage Induced by Ozone Exposure.

Kenji FUKUNAGA, Tetsuya SUZUKI and Kozo TAKAMA

Department of Marine Bioresources Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University

During the course of the study on the oxidative damage in fishes, we previously revealed that the primary target organ of ozone toxicity to fish was not gill to cause gill injury but rather red blood cells (RBC). However, the mechanism of ozone toxicity to RBC at the molecular level has remained unrevealed. In the present study, we examined whether hemoglobin (Hb) or hemoglobin-derived iron (HbFe) could participate in oxidative damage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) RBC induced by ozone exposure. Carbon monoxide (CO) was used to convert the Hb to a stable derivative prior to ozone exposure and the effect of free ferrous irons from Hb as a result of ozone exposure was examined by the addition of diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) in the medium. Ozone exposure induced hemolysis, membrane lipid peroxidation, decrease of antioxidative substances and activity of acetylcholinesterase (AChE). Those damages were not suppressed by the addition of DTPA but were effectively suppressed by incubating RBC with CO. Ozone or ozone derived species should penetrate through the membrane without direct membrane damage and react with the iron of Hb to generate hydroxyl radical or other reactive species inside RBC. No inhibition of DTPA addition suggests that ozone exposure did not release iron from Hb. These results indicate that Hb itself performs an important role in the oxidative damage of RBC membrane; i.e., oxidative damage was caused by the reactive oxygen species generated inside RBC rather than by direct attack of extracellular direct ozone attack to RBC outer membrane.

我々は¹⁻⁴⁾魚類におよぼすオゾン曝露の影響について検討を行い、高濃度オゾンによる障害の一次標的器官(細胞)は、鰓ではなく赤血球であることを明らかにした。また、前報⁵⁾では赤血球のオゾン曝露障害がビタミンC (V. C) およびビタミンE (V. E) の投与によって効果的に軽減されることを

*所在地：北海道函館市港町3-1-1 (〒041)

報告した。これらオゾン曝露によって惹起される障害は、著しい溶血を伴うことから障害の発現にヘモグロビン (Hb) が関与していることが示唆された。そこで今回は、赤血球の障害に対する Hb および Hb 由来鉄の影響を明らかにすることを目的にニジマス分離赤血球を用い In vitro 系で障害発現機構を解明しようとした。また、赤血球の障害におよぼす血漿の影響についても検討を行なった。

材 料 と 方 法

供試魚は、屋外養殖池で飼育しているニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) 1 年魚 (平均体重65g, 尾叉長16cm) を用いた。実験室に搬入後、木村式高密度多目的水槽 (20L 容) に移し、市販餌料 (オリエンタル酵母株, マス用配合餌料—マス赤 8 号) 給餌による 2 週間の予備飼育を行なった。飼育水は活性炭カラムを通した水道水を流速3.0L/min で給水し、水温は15℃に保った。

試料の調製とオゾン曝露

ヘパリンナトリウムを抗凝血剤に用い尾柄部から採血し、常法に従って赤血球と血漿に分離した。赤血球は PBS にて 3 回洗浄後、5 尾分を合一し試料とした。また、以下に示す全ての測定は 4 回行った。分画した赤血球は、Ht 値が 5 % となるように PBS に懸濁し、その 20ml を Fig. 1 に示す装置の曝露管に移した。また、赤血球の障害に対する血漿の影響を検討するため Ht 値 5 % 相当になるように血漿を添加した。オゾンは純酸素から無声放電型オゾン発生装置 (日本オゾン株) を用い発生させ、曝露管の底部に設置したガラス製の細泡作成フィルターにテフロン製チューブで導入した。オゾン曝露は流速 10ml/min, 50ppm で 2 時間行った。オゾン濃度は中性ヨード滴定法⁶⁾によって測定した。また、対照群は空気を通気曝露した。

溶血率の測定

オゾン曝露後の赤血球懸濁液を 5 倍容の生理食塩水と混和後、1500×g, 10分間の遠心分離によって

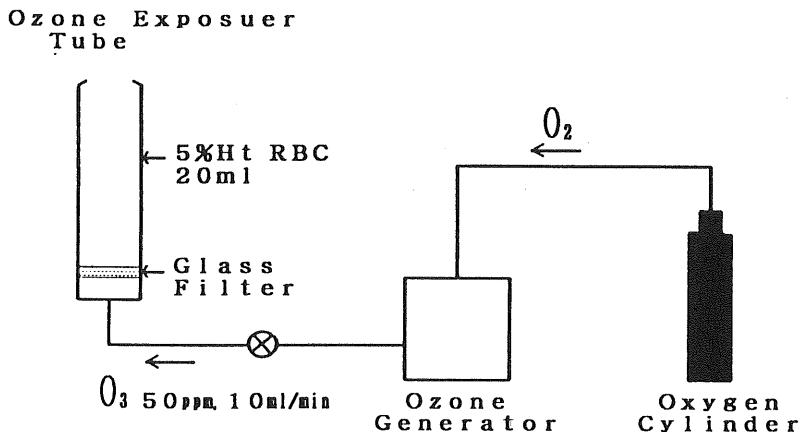


Fig. 1 Apparatus used for in vitro ozone exposure to rainbow trout RBC.

上清を得た。上清のヘモグロビン量を a, 全ヘモグロビン量を b とし, 次式から算出した。ヘモグロビン量はシアンメトヘモグロビン法⁷⁾によって測定した。

$$\text{溶血率 (\%)} = 100 \times a / b$$

赤血球膜障害指標酵素の測定

アセチルコリンエステラーゼ活性の測定は, Ellman ら⁸⁾の方法によって測定した。

抗酸化性成分および脂質過酸化度の測定

V. C は, 分子サイズ排除紫外検出 HPLC 法⁹⁾, V. E は, 順相蛍光検出 HPLC 法¹⁰⁾, 還元型グルタチオン (GSH) は, 逆相ポストラベル蛍光検出 HPLC 法¹¹⁾, リン脂質ヒドロペルオキシド (PLOOH) は, 順相ポストラベル化学発光検出 HPLC 法¹²⁾, マロンジアルデヒド (MDA) は, 逆相蛍光検出 TBA-HPLC 法¹³⁾によって定量した。

CO 処理および DTPA の添加

赤血球の障害に対する Hb の影響を検討する目的でオゾン曝露前に CO ガスを赤血球懸濁液に通気し, Hb を安定な COHb に変換した。また, 遊離鉄の影響を検討するためにジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) 5 mM を赤血球懸濁液に添加した。

結果および考察

溶血におよぼすオゾン曝露の影響

溶血率を経時的に測定し, 赤血球の障害の進行を検討した。その結果を Fig. 2 に示す。血漿非添加群での溶血はオゾン曝露15分後に確認され, その後徐々に溶血率は上昇し, 90分後あたりから急激な上昇が見られ120分後では90%以上の溶血率となった。一方, 血漿添加群では, 15分後では溶血はわずかで,

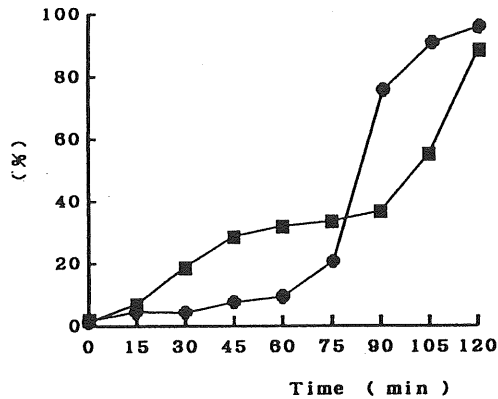


Fig. 2 Effect of ozone exposure on hemolysis with or without plasma.
 —●— with plasma —■— without plasma

60分までは溶血率は低かった。その後溶血率の急激な上昇が見られ、75分を過ぎると血漿非添加群に比べ反対に高くなった。血漿添加群における溶血誘導期の延長は、オゾンあるいはオゾン由来活性種が血漿中の抗酸化性成分によって消去された結果であると推察された。また、誘導期後に急激な溶血率の上昇が認められた。すなわち、曝露初期では、血漿中の抗酸化性成分が赤血球障害を抑制し、さらに曝露を続けると抗酸化性成分の急激な減少にともない生成した血漿脂質成分の酸化生成物によって酸化促進的に作用したものと考えられる。

アセチルコリンエステラーゼ活性におよぼすオゾン曝露の影響

赤血球膜の鋭敏な酸化障害指標として AChE 活性を経時的に測定した。その結果をオゾン曝露前の活性を100%として Fig. 3 に示す。血漿非添加群では、曝露後10分で活性の低下が認められ、70分後には完全に失活した。血漿添加群では、曝露30分後までは活性の低下はわずかであったがその後急激に低下し、60分後では完全に失活した。溶血におよぼす影響と同様にオゾン曝露による血漿成分、とくに血漿脂質成分の過酸化が赤血球の酸化的障害に関与していることが考えられる。

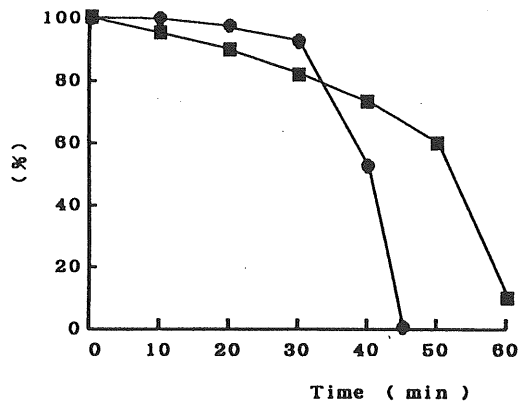


Fig. 3 Effect of ozone exposure on RBC AChE activity with or without plasma. Initial activity is defined as 100%

—●— with plasma —■— without plasma

赤血球の障害に対する Hb の影響

オゾン曝露によって著しい溶血をとまなうことから Hb あるいは Hb 由来鉄の酸化的障害への関与が考えられた。そこで、これらを確認するために Hb を安定な COHb に変換し、Hb からの O₂ の放出の有無を検討するとともに、鉄キレート DTPA の添加実験によって Hb からの遊離鉄の生成について検討し、これらの過酸化反応の関与を明らかにした。まず、赤血球膜の酸化的障害の指標として AChE 活性、溶血率の変化を測定した結果を Table 1 に示す。対照群では、オゾン曝露によって AChE の失活、著しい溶血が見られたが、CO 処理によって、AChE 活性の残存 (6.3%, 60分後)、溶血の抑制が認められた。一方、DTPA 添加によっては AChE 活性低下、溶血の抑制効果は認められなかった。

次いで、赤血球の主たる抗酸化性成分である GSH, V. C および V. E 量におよぼす CO および DTPA

の影響を検討し、結果を Table 2 に示した。オゾン曝露によってほぼ完全に枯渇し、GSH および V. E はそれぞれ約10%、25%に減少した。しかし、これらの減少はCO処理によって明らかに抑制された。一方、DTPA 添加によるこれら抗酸化性成分の減少抑制効果は認められなかった。

赤血球膜脂質過酸化度の指標として一次生成物である PLOOH および二次分解産物である MDA を定量した。その結果を Table 3 に示す。オゾン曝露によって PLOOH は約14倍にも増加し、また、クラス別に PLOOH の生成を検討した結果、曝露前はホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH)

Table 1. Effect of ozone exposure on hemolysis and acetylcholinesterase (AChE) activity.

		Control	Ozone exposed (120 min)		
			Non-treatment	CO treatment (60 min)	DTPA addition
AChE ^a	(%)	100	0 ^b	6.3±1.7 ^b	0 ^b
Hemolysis	(%)	0	95.2±4.3	4.2±0.9 ^b	96.7±5.4

a : Control value is defined as 100%.

b : Significantly different from control. $p < 0.01$.

Values are expressed as mean ± S.D. $n = 4$.

Table 2. Effect of CO and DTPA on change of rainbow trout RBC antioxidative substances.

		Control	Ozone exposed (120 min)		
			Non-treatment	CO treatment	DTPA addition
GSH ^a	(%)	100	10.6±1.4 ^b	83.2±3.1 ^{bc}	8.7±2.7 ^b
Vitamin C ^a	(%)	100	trace ^b	74.6±3.6 ^{bc}	trace ^b
Vitamin E ^a	(%)	100	25.3±3.9 ^b	93.1±6.4 ^c	27.8±4.3 ^b

a : Control activity is defined as 100%.

b : Significantly different from control. $p < 0.01$.

c : Significantly different from CO non-treatment group. $p < 0.01$.

Values are expressed as mean ± S.D. $n = 4$.

Table 3. Effect of CO and DTPA on rainbow trout RBC lipid peroxidation.

		Control	Ozone exposed (120 min)		
			Non-treatment	CO treatment	DTPA addition
PLOOH (nmol/ml)		0.32±0.04	4.37±0.53 ^a	1.07±0.12 ^{ab}	4.19±1.34 ^a
PCOOH (nmol/ml)		0.17±0.02	1.36±0.65 ^a	0.32±0.14 ^{ab}	1.29±0.91 ^a
PEOOH (nmol/ml)		0.11±0.05	2.82±0.29 ^a	0.63±0.09 ^{ab}	2.67±0.52 ^a
MDA (nmol/ml)		1.51±0.45	9.81±1.74 ^a	3.96±0.64 ^{ab}	8.93±1.26 ^a

a : Significantly different from control. $p < 0.01$.

b : Significantly different from CO non-treatment group. $p < 0.01$.

Values are expressed as mean ± S.D. $n = 4$.

がホスファチジルエタノールアミンヒドロペルオキシド (PEOOH) よりも多かったが、曝露後は赤血球内膜に多く存在する PEOOH の増大が顕著であった。これらヒドロペルオキシドの生成は、赤血球の CO 処理によって明らかに抑制されたが、DTPA の添加による抑制作用は認められなかった。また、MDA を指標にした場合についても同様の傾向であった。

以上の結果から、赤血球膜の酸化的障害は内膜で顕著であること、Hb を安定な COHb に変換し、Hb からの O_2^- の生成 (Hb の酸化) を抑止すると障害が抑制されること、また、遊離鉄の酸化的障害への関与がないことが判明した。

要 約

オゾン曝露によって赤血球抗酸化性成分の減少、赤血球膜構成脂質成分の過酸化が惹起されるが、予め赤血球を CO 処理し Hb を安定な COHb に変換して、Hb の酸化による O_2^- などの活性種の派生を抑制することで障害も抑制されることが明らかになった。一方、遊離鉄キレート、DTPA 添加による障害抑制効果は認められなかった。

すなわち、赤血球の障害は膜外側からのオゾンによる直接的攻撃ではなく、細胞内の Hb に作用して派生した活性種によって惹起されること、また、Hb 由来遊離鉄の障害への関与はなく、酸化変性した Hb 鉄が酸化触媒的にはたらいっていることが示された。また、血漿が存在する場合、曝露初期では抗酸化性成分の作用で Hb に影響がおよぶ以前にオゾンが不活性化されて障害の発現が遅延され、後期では抗酸化性成分の枯渇にともない血漿脂質成分の過酸化によって派生した活性種によって酸化的障害が促進されたと考えられる。

文 献

- 1) Fukunaga, K., Suzuki, T. and Takama, K. (1993) J. Chromatogr. **621** : 77
- 2) Fukunaga, K., Suzuki, T. and Takama, K. (1991) Comp. Biochem. Physiol. **100B** : 481
- 3) Fukunaga, K., Suzuki, T., Arita, M., Hara, A., Yamauchi, K., Shinriki, N., Ishizaki, K. and Takama, K. (1992) Comp. Biochem. Physiol. **101C** : 331
- 4) Fukunaga, K., Suzuki, T., Hara, A. and Takama K. (1992) Free Rad. Res. Commun. **17** : 327
- 5) 福永健治, 鈴木鐵也, 高間浩蔵 (1994) 微量栄養素研究 **10** : 151
- 6) Saltzman, B.E. and Gilbert, N. (1959) Anal. Chem. **31** : 1949
- 7) Horecker, B.L. and Brackett, F.S. (1944) J. Biol. Chem. **152** : 669
- 8) Ellman, G.L., Courney, K.D., Andres, V. and Featherston, R.M. (1961) Biochem. Pharmacol. **7** : 88
- 9) Yoshiura, M. and Iriyama, K. (1986) J. Liquid Chromatogr. **9** : 177
- 10) Abe, K., Ohmae, M. and Katsui, G. (1976) Vitamin **50** : 453
- 11) 福永健治, 鈴木鐵也, 高間浩蔵 (1993) 微量栄養素研究 **10** : 151
- 12) Miyazawa, T., Yasuda, K., Fujimoto, K. and Kaneda T. (1988) Anal. Lett., **21** : 1033
- 13) Fukunaga, K., Suzuki, T. and Takama, K. (1993) J. Chromatogr. **621** : 77