ODSラットにおけるビタミンCとEの相互作用

得　丸　定　子（上越教育大学生活・健康系講師）

1. 緒　　言

トコフェリルラジカルからビタミンC（VC）による水素供与で，ビタミンE（VE）が再生することについては，多くの *in vitro* の実験[1,2]で，その反応速度まで決定されている。しかし，*in vivo* における，これらのビタミンの相互作用は，まだ明らかにされていない[3]。これまでの様々な濃度の両ビタミンを含む餌を摂取させた，動物モデルにおける，両ビタミンの変化を測定することによって，相互作用が研究されてきた[4~10]。これらの研究におけるVCの測定方法は，半世紀前に開発された，汎用されている比色定量法[11]を用いている。最近，我々は，化学誘導とHPLCを組み合わせた新しい特異的な方法を開発した[12]。その方法を用いて測定したラット血漿中の真のVC量と比較すると　比色に基づく従来の方法では特異性が低く，3倍高い値を示すことを報告した[12]。また，VC研究のよいモデルである遺伝性壊血病ラット（ODSラット）[13]における，VC欠乏時のVCの減少速度は，臓器によって異なることを，この新しい方法を用いて報告した[14]。

本論文では，ODSラットをVC欠乏（－C），VE欠乏（－E），ビタミンC，E同時欠乏（－C，－E）にさせ，特異的，高感度測定法[12,15]を用いて，臓器中の両ビタミンの量の変化を測定することによって，VCとVEの *in vivo* での相互作用を検討した。

2. 材料と方法

2.1　試　薬

デヒドロ－L－アスコルビン酸ビス（(2, 4ジニトロフェニル）ヒドラゾン）は文献[12]に従って調整した。他の全ての試薬は特級を用い，和光純薬㈱から購入した。

2.2　動物と飼料

実験動物の取扱いは，日本政府動物実験の指針（1980年3月17条6号）に従って行った。5週齢オスODSラット（od/od）は日本クレア社㈱から購入した。ラットは，温度24±2℃，12時間明暗サイクルの条件下で飼育し，餌と水は自由摂取させた。最初の1週間，全てのラットに，AIN 76処方に従った船橋農場㈱製の合成飼料と正常な発育維持に十分な量であるVCを1g/L[13]を含むイオン交換水を与えた。予備飼育の後，ラットを4グループ［コントロール群，－C群，－E群，－C，－E群］に分け飼育した。各グループのラット数は4から5匹とした。－E群の餌は脂肪としてstripped コーンオイル（5g/100g）を含む，船橋農場製のものを用いた。コントロール群にはVCを1g/L含む水とstripped コーンオイル（5g/100g）にall-rac-α-トコフェロールを50mg/kg添加した合成飼料を与えた。－C群にはコントロール群と同じ飼料とVCを含まない水を与えた。－C，－E群にはVCを含まない水と，上に記したVEを含まない飼料を与えた。

2.3　分析方法

解剖予定日に，1日1匹づつ解剖し，解剖した

その日に全ての測定を行った。ラットをエーテル麻酔下にて開腹し，ヘパリンを含む注射筒で，下大静脈から血液を採集した。門脈から冷却した生理的食塩水を流し，潅流した後，臓器を取り出した。取り出した臓器は，冷却下，5倍量の10mMのリン酸緩衝液を含む生理的食塩水（pH7.2）でホモジネートにした。全ての測定は2連の実験で行った。VCの測定は，前回の報告[12,14]の方法で行った。VEの測定は文献[15]に従った。HPLCと蛍光検出器（島津RF-535）の条件は前回報告[17,18]した通りである。チオバルビツール酸反応生成物（TBARS）は文献[19]に従って測定し，臓器重量当たりのnmolマロンジアルデヒド（MDA）当量として表わした。

蛋白質量は牛血清アルブミンを標準物質として用い，Lowry等の方法[20]に従い測定した。

データは，平均±SDとして表わし，Stat View（Abacus Concepts, Berkeley, CA）を用い，ANOVAにて有意差検定を行った。各グループ間の相互作用を検討するために，全ての実験群のグループ平均は，two-way ANOVA[21]を用いて比較した。グループ平均間の有意差は，FisherのPLSDテストを用いて分析した。$p<0.05$を有意差とした。

3. 結果と考察

3.1 ODSラットの体重変化

コントロールの体重は文献[14,22]と同じく，順調に増加した。－E群の体重変化はコントロールと変わらず，前回の報告[18]と同じく，3週間のVE欠乏は体重変化に影響を及ぼさないことを示している。－C群と－C，－E群の体重は文献[14,22]の報告と同じく，最初，順調に増加したが，欠乏14日目から減少しはじめた。欠乏14日目の－C群と－C，－E群の体重はそれぞれ，168.2±10.5，166.5±10.4であり，コントロール群（178.3±11.9），－E群（185.0±3.9）よりも有意に減少した。欠乏21日目の－C群と－C，－E群の体重は，それぞれ158.36±12.85，162.54±13.46であり，これもまた，コントロール（216.08±5.59），－E群（209.74±13.28）よりも有意に低い数値を示した。

3.2 臓器中のVE量の変化

欠乏21日目の－C群の血漿中のα－トコフェロール類（α－Toc）量はコントロール群より有意に低い値であった（**Fig.1**）。他のトコフェロール（β，γ，δ）は本実験においては検出されなかった。同様の結果は，欠乏21日目の心臓，肺，肝臓，腎臓，欠乏14日目の血漿，脳，肺，肝臓においても見られた（**Fig.1**）。2－way ANOVAで解析すると，VE濃度における，両ビタミン欠乏間の有意な相互作用は，欠乏21日目の血漿，心臓，肺，肝臓，腎臓において見られた。これらの結果は，*in vivo*において，VCがVEをの消費を少なくしていることを示しており，*in vitro*[1,2]での研究で示されているように，VCによるトコフェリルラジカルへの直接的な反応の関与があることを支持している。このことは，モルモットにおける慢性的VC欠乏は，肝臓中のVE濃度を減少させるとの報告[9]と合致している。しかし，一方，最低VC量の餌を与えられたODSラットの臓器中のVE量は，最も高い値を示したという報告[10]とは異なっている。この相違は，用いられたVCの投与量の違いによるものと考えられる。

欠乏14日目，21日目における，－E群と－C，－E群の全臓器中のVE濃度は，コントロール群，－C群より有意に低かった（**Fig.1**）。－E群と－C，－E群間での有意な差は見られなかった。このことは，脳（下記参照）を除く他の臓器では，VE欠乏によってVE量が低下したため，VCの影響が見えなくなってしまったものと考えられる。

3.3 臓器中のVC量の変化

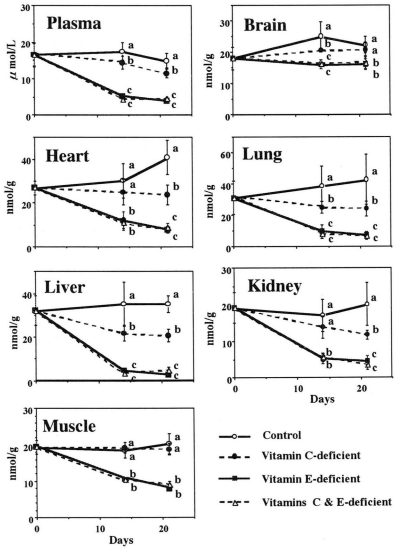

Fig.1 Concentrations of vitamin E in tissues of inherently scorbutic rats fed control, vitamin C-deficient, vitamin E-deficient and simultaneously vitamins C and E-deficient diets.

Values are means±SD, n=4 or 5. Different letters at each time point indicate significant differences among groups by Fisher's protected least significant difference test (P>0.05).

欠乏14日目におけるコントロール群の血漿中のＶＣ濃度は，－Ｅ群よりも有意に高い値を示した（**Fig.2**）。同様な結果は，欠乏14日目の心臓，腎臓，欠乏21日目の血漿，心臓，肝臓，腎臓，筋肉においても見られた。これらの結果は，それらの臓器において，ＶＥが欠乏したことにより，ＶＣの消費が促進されたものと考えられる。ＶＣにおけるＶＥの救済効果は，*in vivo* での本実験において，初めて見い出された。ＶＥによって，モノデヒドロアスコルビン酸やデヒドロアスコルビン酸が，アスコルビン酸に直接的に再生されるという反応は起こり得ないので，このことは，ＶＥ欠乏によって脂質層のラジカル反応が亢進し，その結果，細胞の水層における酸化的ストレスが上昇し，水層における強力な抗酸化剤であるＶＣ[23]の消耗を引き起こしたものと考えられる。

－Ｃ群において，全臓器中のＶＣ量は速やかに減少した（**Fig.2**）。この結果は我々の先の報告[14]と同じである。欠乏14日目と欠乏21日目の全臓器において，－Ｃ群と－Ｃ，－Ｅ群のＶＣ量は，コン

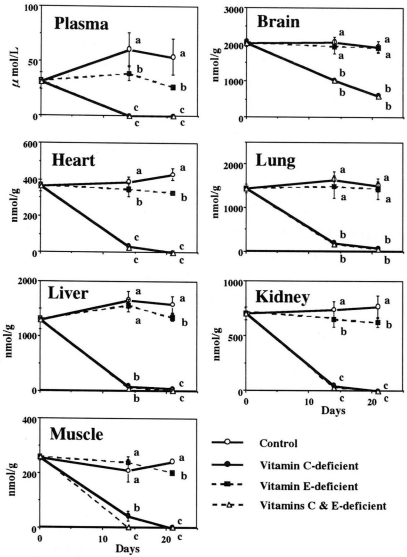

Fig.2 Concentrations of vitamin C in tissues of inherently scorbutic rats fed control,vitamin C-deficient, vitamin E-deficient and simultaneously vitamins C and E-deficient diets.
Values are means±SD, n=4 or 5. Different letters at each time point indicate significant differences among groups by Fisher's protected least significant difference test (P>0.05).

トロール群と－E群に比べ有意に減少した。欠乏14日目の血漿中の，これらの群（－C群と－C，－E群）におけるVC量は，検出限界以下であった。また，欠乏21日目の－C群と－C，－E群の両群における血漿，心臓，腎臓，筋肉中のVC量も検出限界以下となった。欠乏14日目の－C，－E群の筋肉中のVC量は，－C群よりも有意に減少した。このことは，VEによる筋肉中のVCの救済効果が，現われていると考えられる。2-way ANOVAで解析すると，VC濃度に関して，VC，VE欠乏の有意な相互作用は14日目の血漿，筋肉，21日目の血漿，心臓，肝臓，腎臓，筋肉において見られた。

脳は，VC，VE欠乏期間中，両ビタミンともに，最も遅い減少傾向を示し[14,18]，両ビタミンの相互作用は見られなかった（**Fig.1**，**Fig.2**）。また，肺におけるVCに対する，VEの救済効果は検出できなかった。これらの結果からすると，本研究において，両ビタミンの相互作用には臓器特異性があること，また，全ての臓器において，必

ずしも明瞭に観察されるとは限らないことが判った。

3.4　TBARSの変化

欠乏21日目の－C群と－C，－E群における，血漿，肝臓中のTBARSは，コントロール群，－E群と比べ有意に上昇した（**Table 1**）。このことは，VC欠乏による酸化的ストレスは，VE欠乏による場合よりも強いことを示している。VC欠乏時におけるVCの減少は，VE欠乏時でのVEの減少よりも，その程度が大きいことを示しているのかもしれない。しかし，TBARS測定結果による，両ビタミンの相互作用は本実験では明らかではない。

－C，－E群における肝臓のTBARSは，他の群よりも有意に上昇したということは，両ビタミン欠乏に相加性があることを示している。2-way ANOVAによる解析では，TBARSに関する，両ビタミン欠乏間の有意な相互作用は，肝臓にのみに現われている（**Table 1**）。脳，腎臓，心臓，肺，筋肉においては，4群間でのTBARSの有意な差は見られなかった。

Table 1　Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) of plasma and liver in inherently scorbutic rats fed control, vitamin C-deficient, vitamin E-deficient and simultaneously vitamins C and E-deficient diets for 21 d.

	Plasma	Liver
	nmol/g	
Control	9.14±0.35a	25.23±1.13a
-C	13.79±1.28b	33.72±4.53b
-E	8.96±1.55a	25.81±1.82a
-C,-E	12.98±1.34b	43.63±2.01c
Two-way ANOVA, P		
C	<0.001	<0.001
E	NS	<0.001
C*E	NS	<0.01

Inherently scorbutic rats were divided into four groups (control, vitamin C-deficient, vitamin E-deficient and simultaneously vitamins C and E-deficient groups). After 21 d, TBARS of plasma and liver were determined as described in the text. Values are means±SD of 4 or 5 rats. Values within each column not sharing a common superscript letter are significantly different ($P<0.05$) by Fisher's protected least significant difference test. NS=not significant, $P>0.05$.

4. まとめ

特異的，高感度測定法[12]を用いて，VCとVEの2つの抗酸化ビタミンの相互作用を明らかにした。VEの減少はVC欠乏によって加速され，そのことは，*in vitro*の研究[1,2]によって示されているように，VCによるVEの再生が*in vivo*でも起こり得ることを支持している。一方，VEによるVCの救済効果は，*in vivo*での本実験において観察された。VEによるVCの直接的な再生は起こり得ないので，この救済効果は，*in vitro*の研究では予測されなかったことである。この結果は，VE欠乏によって起こる，膜中での亢進した酸化的ストレスは，細胞の水層に移り，結果として，強力な水溶性抗酸化剤であるVC[23]の減少を引き起こすことを提示している。2-way ANOVAの解析によると，両ビタミンの欠乏における有意な相互作用は，血漿，心臓，肺，腎臓，肝臓，筋肉において見られた。両ビタミンの相互作用は本実験において，全ての臓器において，必ずしも明確に観察されなかった。TBARSによって評価される酸化的ストレスの場合も同様であった。

最後に，本研究を遂行するにあたり，研究助成を賜りました浦上食品・食文化振興財団および関係各位に心から感謝いたしますと共に貴財団の益々のご発展を祈念申し上げます。

文　献

1) Mukai, K., Nishimura, M. & Kikuchi, S. (1991) Stopped-flow investigation of the reaction of vitamin C with tocopheroxyl radical in aqueous Triton X-100 micellar solutions. The structure-activity relationship of the regeneration reaction of tocopherol by vitamin C. *J. Biol. Chem.* **266**: 274-278.

2) Packer, J.E., Slater, T.F. & Willson, R.L. (1979) Direct observation of a free radical interaction between

vitamin E and vitamin C. *Nature* (London) **278**:737-738.

3) Burton, G.W., Wronska, U., Stone, L., Foster, D.O. & Ingold, K.U. (1990) Biokinetics of Dietary RRR-a- tocopherol in the male guineapig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin C does not "spare" vitamin E in vivo. *Lipids* **25**: 199-211.

4) Chen, L.H., Lee, M.S., Hsing, W.F. & Chen, S.H. (1980) Effect of vitamin C on tissue antioxidant status of vitamin E deficient rats. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **50**: 156-162.

5) Chen, L.H. (1981) An increase in vitamin E requirement induced by high supplementation of vitamin C in rats. Am. *J. Clin. Nutr.* **34**: 1036-1041.

6) Chen, L.H. & Thacker, R.R. (1986) Vitamin C partially reversed some biochemical changes produced by vitamin E deficiency. *Biotech. Appl. Biochem.* **8**: 40-45.

7) Chen, L.H. & Thacker, R.R. (1987) Effect of ascorbic acid and vitamin E on biochemical changes associated with vitamin E deficiency in rats. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **57**: 385-390.

8) Ginter, E., Kosinova, A., Hudecova, A. & Mlynarcikova, U. (1984) Parabolic response of hepatic microsomal hydroxylating system and lipids to graded doses of ascorbic acid in guinea pigs on low and high a-tocopherol intake. *J. Nutr.* **114**: 485-492.

9) Hruba, F., Novakova, V. & Ginter, E. (1982) The effect of chronic marginal vitamin C defeiciency on the a-tocopherol content of the organs and plasma of guinea-pigs. *Experientia* **38**: 1454-1455.

10) Igarashi, O., Yonekawa, Y. & Fujiyama-Fujihara, Y. (1991) Synergistic action of vitamin E and vitamin C in vivo using a new mutant of Wistar-strain rats, ODS, unable to synthesize vitamin C. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **37**: 359-369.

11) Roe, J.H. & Kuether, C.A. (1943) Determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-DNPH derivative of dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.*, **147**: 399-407.

12) Kishida, E., Nishimoto, Y. & Kojo, S. (1992) Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* **64**: 1505-1507.

13) Mizushima, Y., Harauchi, T., Yoshizaki, T. & Makino, S. (1984) A rat mutant unable to synthesize vitamin C. *Experientia* **40**: 359-361.

14) Tokumaru, S., Takeshita, S., Nakata, R., Tsukamoto, I. & Kojo, S. (1996) Change in the level of vitamin C and lipid peroxidation in tissues of the inherently scorbutic rat during ascorbate deficiency. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 2748-2753.

15) Buttriss, J.L. & Diplock, A.T. (1984) High-performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues. *Methods Enzymol.* **105**: 131-138.

16) American Institute of Nutrition (1977) Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.* **107**: 1340-1348.

17) Kishida, E., Kamura, A., Tokumaru, S., Oribe, M., Iguchi, H. & Kojo. S. (1993) Re-evaluation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances as indices of autoxidation based on the oxygen consumption. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 1-4.

18) Tokumaru, S., Ogino, R., Shiromoto, A., Iguchi, H. & Kojo, S. (1997) Increase of lipid hydroperoxides in tissues of vitamin E-deficient rats. *Free Radic. Res.* **26**: 169-174.

19) Buege, J. A. & Aust, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**: 302-310

20) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-276.

21) Welkowitz, J., Ewen, R.B. & Cohen, J. (1982) In: *Introductory stastics for the behavioral sciences*. 3rd ed. Academin Press, Inc. New York, NY.

22) Kimura, H., Yamada, Y., Morita, Y., Ikeda, H. & Matsuo, T. (1992) Dietary ascorbic acid depresses plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation in genetically scorbutic rats. *J. Nutr.* **122**: 1904-1909.

23) Frei, B., England, L. & Ames, B.N. (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 6377-6381.

Inteactions between Vitamin C and Vitamin E are Observed in Tissues of Inherently Scorbutic Rats

Sadako Tokumaru (Department of Life and Health Sciences, Joetsu University of Education)

To investigate in vivo interactions between antioxidant vitamin C and E, sparing effects of vitamin C on vitamin E as well as those of vitamin E on vitamin C were evaluated using inherently scorbutic [Osteogenic Disorder Shionogi (ODS)] rats. Rats were divided into four groups (control, vitamin E-deficient, vitamin C-deficient and simultaneously vitamins C and E-deficient). The levels of vitamins C and E in tissues were determined at 0, 14 and 21 d of deficiency.

On d 14, the vitamin E concentration in plasma, liver, brain and lung of the vitamin C-deficient group was significantly lower than that of the control, in agreement with the literature concerning the sparing of vitamin E by ascorbate. The vitamin E concentration of the vitamin C-deficient group also was significantly lower in plasma, heart, liver, lung and kidney than that of the control group on d 21. On the basis of two-way ANOVA, significant interactions between vitamin C and E were observed on d 21 for vitamin E concentration in these tissues.

The ascorbate level in plasma, heart, liver, muscle and kidney of the vitamin E-deficient group was significantly lower than that of the corresponding control group on d 21. Significant interactions between vitamin C and vitamin E were observed on d 21 for vitamin C concentration in these tissues. These results suggest a sparing effect of vitamin E on vitaminC, an effect that was observed for the first time in this study. These results suggest that the interaction between vitamin C and E exists in vivo and that the extent of the interaction depends on the tissues.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in plasma and liver of the vitamin C-deficient rats were significantly higher than those of the control and the vitamin E-deficient groups on d 21, suggesting that the deficiency of vitamin C caused a larger increase in oxidative stress than the deficiency of vitamin E. TBARS of liver in rats deficient in both vitamins C and E were significantly higher than those in all other groups, suggesting an additive effect of the deficiencies of vitamin C and E on hepatic TBARS. These data suggest that in vivo, vitamins E and C interact, and each can exert sparing effects in the absence of the other.