

紫外線照射時のウシ網膜内脂肪酸量の変動

— 化学発光法による過酸化脂肪酸の定量 —

小林 由佳

川崎医科大学眼科学教室

要 約

網膜の光障害などに関与すると考えられる生成過酸化脂肪酸の測定が行われている。しかし、従来の測定法は間接的であり、個々の過酸化脂肪酸の測定は行われていなかった。今回、化学発光—高速液体クロマトグラフィー (CL-HPLC) 法により、その直接的定量を試みたので報告する。ウシ網膜 30 眼を対象に、自動酸化による脂肪酸量の有意な減少がないことを確認した後、紫外線照射を 12 時間と 24 時間とで行い、各不飽和脂肪酸量の減少と過酸化脂肪酸量の増加を紫外線照射しないものを対照にして比較した。ウシ網膜 1 眼当たりの不飽和脂肪酸量は、照射 24 時間群では対照群と比較して有意な減少を認めた。過

酸化脂肪酸量については、炭素数 18 個の脂肪酸群の過酸化物においては照射時間にほぼ比例した増加量が認められたが、炭素数 22 や 20 個の脂肪酸群から生成された過酸化物量については照射 12 時間と 24 時間との間に変化は認められなかった。なお、照射による脂肪酸の減少量が過酸化脂肪酸の増加量より多い結果が得られたが、その理由として、一度生成された過酸化脂肪酸が紫外線照射により分解されたためと考えられた。(日眼会誌 102: 15—21, 1998)

キーワード：不飽和脂肪酸、過酸化脂肪酸、紫外線照射

Change of Hydroperoxy Fatty Acids Formed by Ultraviolet Irradiation of Bovine Retinas

— Determination of Chemiluminescence Assay —

Yuka Kobayashi

Department of Ophthalmology, Kawasaki Medical School

Abstract

Hydroperoxy fatty acids possibly formed by light-induced retinal damage have been measured with conventional methods which could not detect directly individual hydroperoxy fatty acids. We tried to measure directly the retinal hydroperoxy fatty acids using chemiluminescence/high-performance liquid chromatography. A total of 30 bovine retinas were used for the following experiment. First, the effects of autoxidation on the content of fatty acids in the retinas were confirmed to be significantly negligible, and then the retinas were divided into 3 groups. The first and second groups were exposed to ultraviolet (UV) irradiation for 12 and 24 hrs respectively, and the third was not irradiated as a control to see if increases in hydroperoxy fatty acids and decreases in fatty acids can

be caused by the irradiation. The amount of unsaturated fatty acids per one retina was clearly decreased after 24 hrs of irradiation. The amount of hydroperoxy fatty acid of 18 carbon atoms increased in proportion to the irradiation time, but that of 20~22 carbon atoms was not different between 12 hrs and 24 hrs of irradiation. The detected amount of hydroperoxy fatty acids did not correspond to that of normal acids, which decreased. This suggests that hydroperoxy fatty acids could be split after their formation during the UV irradiation. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 15—21, 1998)

Key words: Unsaturated fatty acids, Hydroperoxyde, Ultraviolet irradiation

I 緒 言

生体膜中における高度不飽和脂肪酸は、前立腺、脳、網

膜などに多く含まれ、網膜中では特に視細胞外節に多いことが知られている¹⁾²⁾。また、有水晶体眼では 400 nm 以下の波長は吸収されるが、硝子体手術後の無水晶体眼や

別刷請求先：701-01 岡山県倉敷市松島 577 川崎医科大学眼科学教室 小林 由佳
(平成 8 年 4 月 5 日受付、平成 9 年 8 月 11 日改訂受理)

Reprint requests to: Yuka Kobayashi, M.D. Department of Ophthalmology, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki-shi Okayama-ken 701-01, Japan

(Received April 5, 1996 and accepted in revised form August 11, 1997)

人工水晶体移植術後では 300~400 nm の近紫外線が通過するため、網膜に対する光障害が問題となる。そして、これら不飽和脂肪酸から生成される過酸化脂肪酸が網膜の光障害にも関与していることが明らかにされており^{3,4)}、その障害過程を明らかにするために生成過酸化脂肪酸の測定が行われている^{5,6)}。しかし、従来の測定法は、例えばチオバルビツール酸試験(TBA)法のごとく過酸化脂肪酸の分解産物(マロンジアルデヒド)を測定する方法や、共役ジエン含有測定法によって相対的な過酸化物を測定する方法であった。また、感度が良く検出に優れているとされている化学発光法でも過酸化脂肪酸を含むリン脂質が対象であった。これらの間接的測定法では個々の過酸化脂肪酸の測定は行われていないため、どのような脂肪酸が光暴露の作用を受けやすく、より障害に関与しているか不明瞭である。今回は、西岡ら⁷⁾の方法を用いて、個々の過酸化脂肪酸の分離を行い、化学発光-高速液体クロマトグラフィー(CL-HPLC)法により、その直接的定量を試みたので報告する。

II 実験方法

1. 実験材料

屠殺場から得た新鮮ウシ眼 30 眼の網膜を使用した。加齢変化による脂肪酸組成のばらつきを除外するために、1 眼ずつの網膜湿重量および水晶体重量を測定し、水晶体重量が同程度の網膜を使用した。すぐに使用できなかった網膜は -70℃ で保存し、随時自然解凍後に実験に使用した。使用した 1 眼当たりの網膜の平均重量は 774 mg であり、水晶体の平均重量は 2.201g であった。

2. 紫外線照射

室温 5℃ の低温室内で行った。生食 1 ml を浸した直径 3.5 cm のペトリ皿に剥離したウシ網膜 1 眼分を伸展し、乾燥を防ぐために蓋をして、上方 15 cm から波長 365 nm の紫外線ランプ(B-100A 型、ウルトラ・バイオレット社)を用いて照射を行った。蓋をしない場合の紫外線強度は 15.03 mW/cm² であり、蓋をした場合は 13.89 mW/cm² と約 8.6% の紫外線カット率しかなかったため、このような方法を用いた。また、自動酸化の影響を除外するために、照射せずに同条件下で同時間放置したものを用いて比較を行った。30 眼を以下の 5 群の条件に分けたが、内訳は放置も照射もしない 6 眼(対照眼)、12 時間放置した 6 眼、24 時間放置した 6 眼、12 時間照射した 6 眼、24 時間照射した 6 眼である。その後、以下に述べる方法で 1 眼ずつ脂肪酸の抽出および分析を行った。

3. 脂肪酸の抽出

脂肪酸の抽出は、以下に述べるように西岡ら⁷⁾の方法に沿って行った。

1) Folch 法による総脂質の抽出

網膜を 50 ml のメタノール/クロロホルム混合液(2:1, v/v)とともにホモジネートにした後、攪拌し、

濾過した。1/5 量の 0.88% KCl 水溶液を加え振盪、混和し、二層に分離後上層を除去した。次いで、1/5 量のメタノール/蒸留水混合液(1:1, v/v)を加え同様に上層を除去し、ロータリーエバポレーターで 1~2 ml に濃縮した。

2) カラムクロマトグラフィーによる複合脂質の抽出

内径 10 mm のガラス管を用い、クロロホルムに懸濁させたシリカゲルパウダー/ハイフロスーパーセル(1:1.5, w/w)で約 4 cm 長のカラムを作製し、先の総脂質抽出液をこれに重層する。クロロホルムで溶出される単純脂質を棄却し、メタノールで複合脂質を溶出した。溶出液はロータリーエバポレーターで 1~2 ml に濃縮した。

3) 複合脂質からの脂肪酸の分離

先の濃縮溶液に 0.2 ml ジエチルエーテル、20 μmole ナトリウム塩化物(NaCl)、2 μmole カルシウム塩化物(CaCl₂)、0.1 μmole エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、0.1 mmole トリス塩酸緩衝液(pH 8.9)を加え、さらに、0.02 mg ホスホリパーゼ A₂(蜂毒性)を加えて室温下で 20 分間反応させ、脂肪酸および過酸化脂肪酸をリン脂質から遊離させた。2 倍量のジクロロメタンを加え、遊離した脂肪酸を 2 回にわたり抽出し、遠沈エバポレーターで濃縮した。

4) 脂肪酸のベンゾキサジン誘導体化

濃縮した液に 0.2 ml、5 mM の 3-ブロモメチル-7-メトキシ-1, 4-ベンゾキサジン-2-(Br-MB)のアセトニトリル溶液と 5 μl イソプロピルエチルアミンを加え、脂肪酸の定量のための内部標準物質のヘプタデカン酸を 800 nmol 量加え、攪拌した後 30 分間室温下で反応させた。こうして分光光度計の吸収域 355 nm で検出可能なベンゾキサジン誘導体を作製した。図 1 にベンゾキサジン誘導体化の反応を示した。図示したように、ベンゾキサジン環の 3 位に脂肪酸が結合する。

4. 分 析

分析における各脂肪酸検出の流れのシェーマを図 2 に示した。

1) 脂肪酸の検出

ナカライテスク社製 5 C18 逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(LC-10AD 型、島津社)を用いた。移動層の組成は、アセトニトリル 70% : 蒸留水 30% からアセトニトリル 100% に 30 分間で均一変化させ、以後はアセトニトリル 100% のままで 40 分間まで検出を行った。吸光度検出器(SPD-10A 型、島津社)を用い、355 nm における吸収スペクトルを測定した。

2) 過酸化脂肪酸の検出

Yamamoto ら⁸⁾の方法に沿って化学発光法を用いて行った。反応液の組成は、0.1 M ホウ酸ソーダ緩衝液(pH 10) 500 ml、メタノール 500 ml、混合液中にイソルミノール 177.2 mg、ミクロペルオキシダーゼ 5 mg を溶解させた。前記の吸光度検出器からの流出液を連続的に化学発

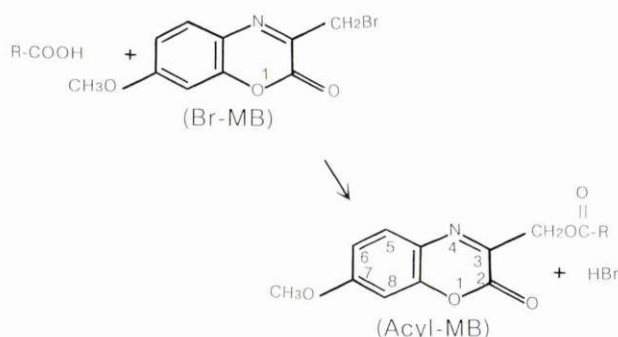


図1 ベンゾキサジン誘導体.

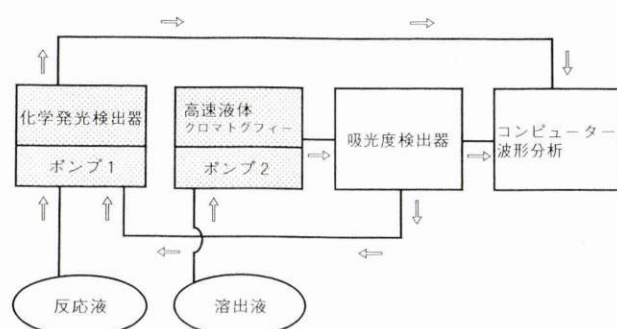


図2 検出器の構成.

高速液体クロマトグラフィーにかけた試料から脂肪酸を吸光度検出した後、化学発光検出器に流し過酸化脂肪酸を検出した。

光検出器 (CL-2 型, 昭和電工社) によって検出した。この際、定量のための外部標準物質として 300 pmol 量の *t*-ブチルヒドロペルオキシド (*t*-BOOH) を分析開始後 10 分に注入した。

3) 脂肪酸および過酸化脂肪酸の定量

上記 2 種の検出器によるクロマトグラムの波形をほぼ同時にコンピュータ (COMPAQ 社) にオンライン導入し、分析ソフトを用いて波形処理した。それぞれの標準物質とのピーク面積比を求め、定量を行った。

4) 過酸化脂肪酸の同定

各々の過酸化脂肪酸の *m/z* 値が明らかにされているため⁹⁾、選択イオン検出 (SIM-LC) / マススペクトロメトリ (CIMS) を用いて同定した。5 C18 逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (L-6200 型, 日立社) で試料を分離した後、日立大気圧化学イオン方式 LC/MS インターフェイスを経て質量分析計 (M-2000 型, 日立社) にオンライン導入し、分析した。

III 結 果

1. 脂肪酸量の経時的変化

1) 非照射対照群

対照眼から得られた脂肪酸の高速液体クロマトグラムを図 3 に示した。最後に溶出される標準物質を除いて計 7 つのピークを認めた。これら各脂肪酸量の網膜 1 眼当

りの平均値 ± 標準偏差を図 4 に示した。対照眼では、22:6 (n-3) : 4.69 ± 1.07 μmol, 20:4 (n-6) : 3.63 ± 1.00 μmol, 22:5 (n-3) : 0.31 ± 0.07 μmol, 22:5 (n-6) + 18:2 (n-6) : 3.50 ± 1.67 μmol, 20:3 (n-6) : 0.26 ± 0.07 μmol, 22:4 (n-3) : 1.54 ± 0.45 μmol, 18:1 (n-9) + 16:0 : 4.26 ± 1.26 μmol であった。12 時間放置眼では、22:6 (n-3) : 4.30 ± 0.72 μmol, 20:4 (n-6) : 3.13 ± 0.27 μmol, 22:5 (n-3) : 0.31 ± 0.22 μmol, 22:5 (n-6) + 18:2 (n-6) : 2.84 ± 0.69 μmol, 20:3 (n-6) : 0.14 ± 0.03 μmol, 22:4 (n-3) : 1.18 ± 0.26 μmol, 18:1 (n-9) + 16:0 : 3.75 ± 0.50 μmol であった。また、24 時間放置眼では、22:6 (n-3) : 4.58 ± 0.66 μmol, 20:4 (n-6) : 3.20 ± 0.35 μmol, 22:5 (n-3) : 3.64 ± 0.08 μmol, 22:5 (n-6) + 18:2 (n-6) : 2.52 ± 0.28 μmol, 20:3 (n-6) : 0.21 ± 0.04 μmol, 22:4 (n-3) : 1.17 ± 0.18 μmol, 18:1 (n-9) + 16:0 : 3.81 ± 0.74 μmol であった。対照眼に比べ、22:5 (n-6) + 18:2 (n-6) においては 24 時間放置眼で有意な増加を認めたが、その他の脂肪酸については有意な減少は認めなかった。

2) 照射群

照射群についての脂肪酸の高速液体クロマトグラムの結果を図 5 に示した。12 時間照射眼では、22:6 (n-3) : 3.24 ± 0.91 μmol, 20:4 (n-6) : 2.42 ± 0.93 μmol, 22:5 (n-3) : 0.38 ± 0.50 μmol, 22:5 (n-6) + 18:2 (n-6) : 2.37 ± 0.73 μmol, 20:3 (n-6) : 0.17 ± 0.10 μmol, 22:4 (n-3) : 0.97 ± 0.36 μmol, 18:1 (n-9) + 16:0 : 3.77 ± 1.49 μmol であった。また、24 時間照射眼では、22:6 (n-3) : 1.01 ± 0.34 μmol, 20:4 (n-6) : 0.96 ± 0.36 μmol, 22:5 (n-3) : 0.11 ± 0.02 μmol, 22:5 (n-6) + 18:2 (n-6) : 0.85 ± 0.46 μmol, 20:3 (n-6) : 0.09 ± 0.03 μmol, 22:4 (n-3) : 0.43 ± 0.24 μmol, 18:1 (n-9) + 16:0 : 3.33 ± 1.72 μmol であった。対照眼に比べ、18:1 (n-9) + 16:0 においては有意な減少は認められなかったが、その他の脂肪酸については照射 24 時間で有意な減少を認めた。

2. 過酸化脂肪酸の経時的変化

化学発光検出器によって 12 時間放置群と 24 時間放置群 (図 6) とともに過酸化脂肪酸は検出されなかったため、今回生成された過酸化脂肪酸は紫外線照射による光障害のみにより生成されたもので、自動酸化の影響はないものと考えられた。照射 24 時間の過酸化脂肪酸のピーク波形を図 7 に示した。SIM-LC/CIMS を用いて個々のピークを定性したところ、対照眼では過酸化脂肪酸のピークがないため検出されなかった (図 8) が、過酸化脂肪酸群 (溶出時間 16~25 分) は図 7 に示すように 9 つのピークから構成されていたため、これらのピークは 2~3 種類の過酸化脂肪酸の混合したものであることが明らかになった (図 9) (図 7 と図 9 において若干のリテンションタイムの違いがあるが、用いた液体クロマトグラフィーの機種が HPLC-CL と LC/CIMS で異なるためである)。図 9 の SIM スペクトルから各過酸化脂肪酸の量比を算出

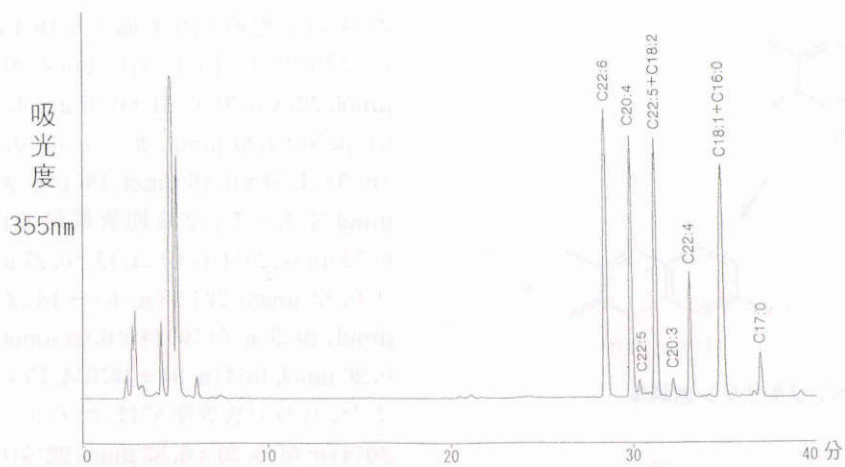


図3 紫外線照射前のウシ網膜内脂肪酸のクロマトグラム(吸光度355nm).

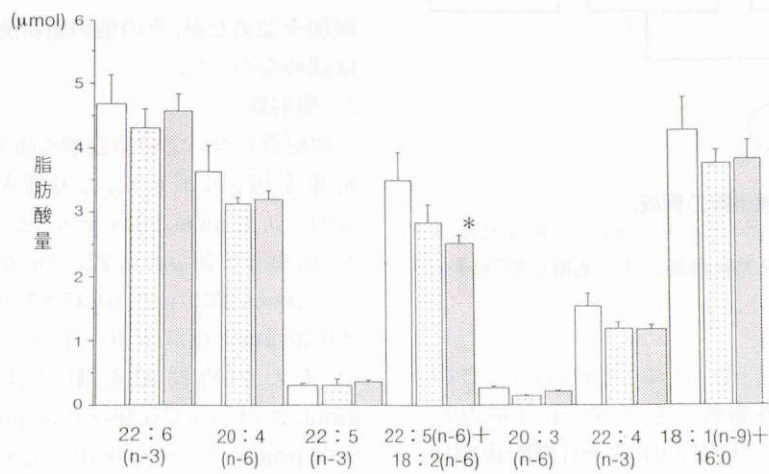


図4 照射前および放置後の脂肪酸量の変化。

□: 対照 (n = 6) ▨: 放置12時間 (n = 6) ▩: 放置24時間 (n = 6)
*: $p < 0.005$.

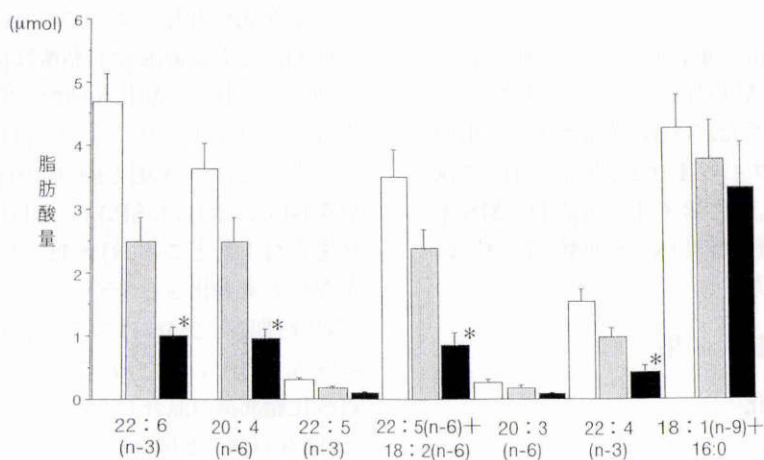


図5 照射前および紫外線照射後の脂肪酸量の変化。

□: 対照 (n = 6) ▨: 放置12時間 (n = 6) ■: 放置24時間 (n = 6)
*: $p < 0.005$.

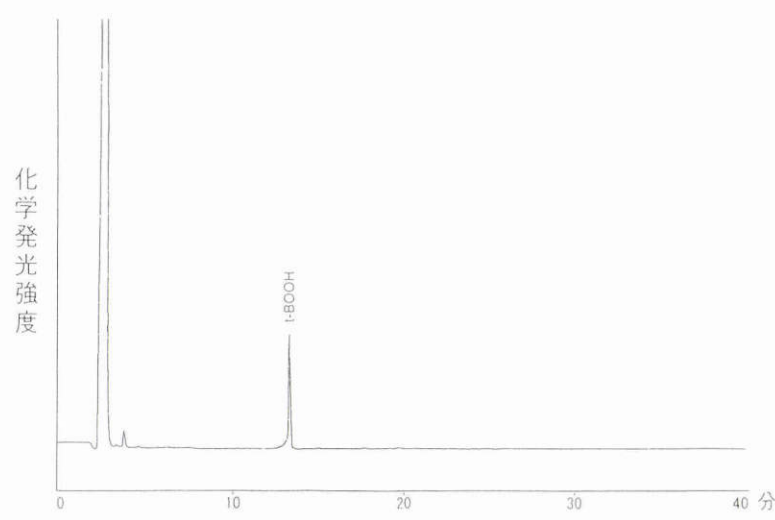


図 6 照射前の化学発光検出分析.

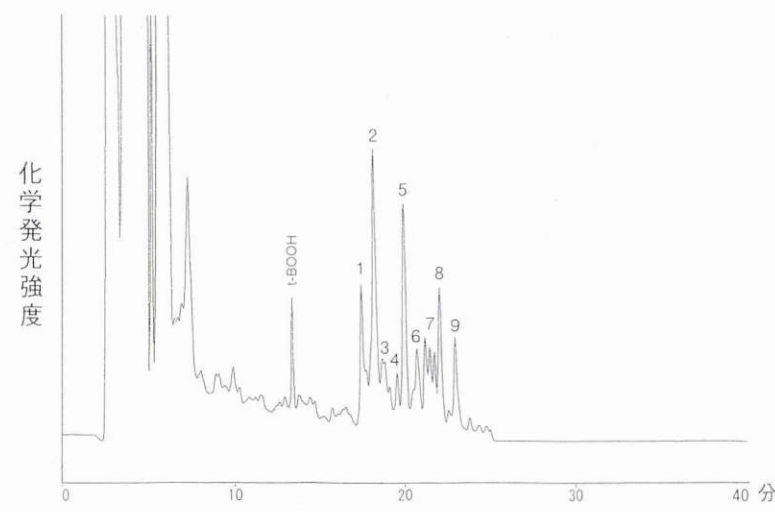


図 7 24 時間照射後の化学発光検出分析.

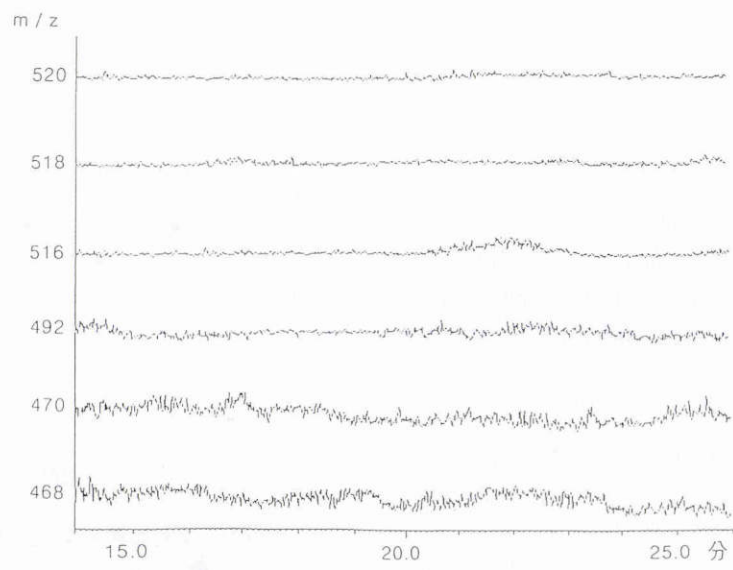


図 8 照射前の選択イオン検出—マススペクトロメトリー (SIM-MS).

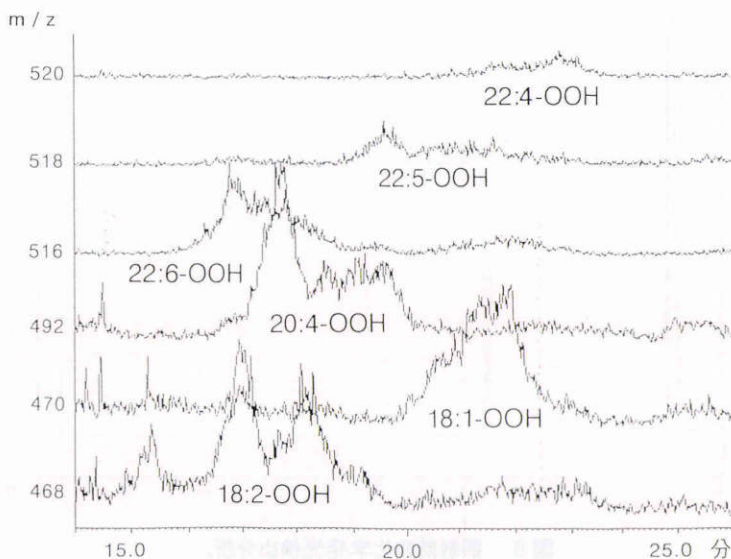


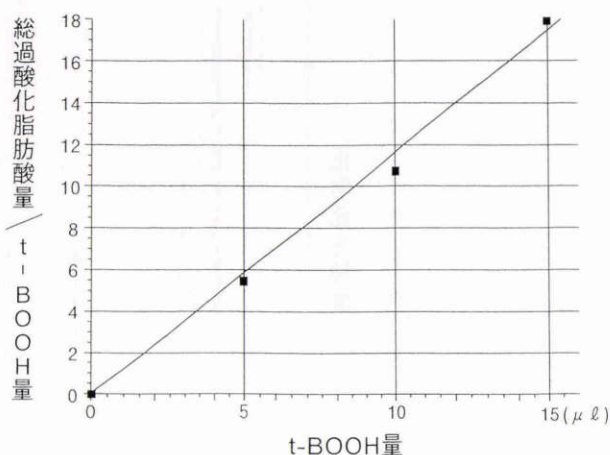
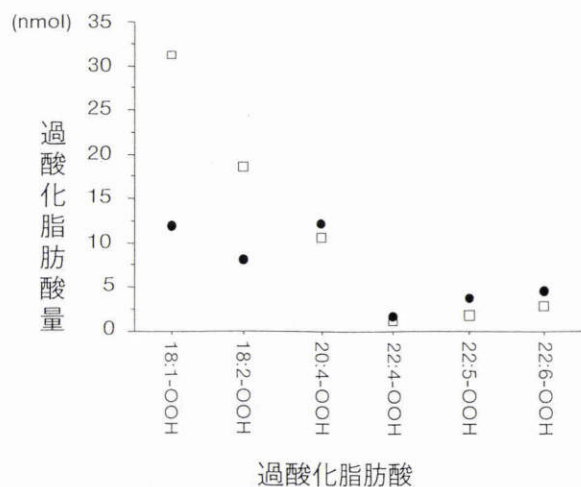
図9 紫外線照射12時間後のSIM-MS.

した.次に, t -BOOH を外部標準として用い, 検量線を作成し, 化学発光検出量試料注入量の間に直線関係が得られたため, 得られた検量線から各々の試料の総過酸化脂肪酸量を求めた(図10). さらに, 得られた総過酸化脂肪酸量と前述の各過酸化脂肪酸量比から, 12時間および24時間照射群(各2例)における1眼当たりの過酸化脂肪酸量を求めた. 炭素数が18個の脂肪酸群の過酸化物においては, 12時間では10 nmol 前後であり, 24時間では20~30 nmol と増加が認められるが, 炭素数が20や22個の脂肪酸群から生成された過酸化物量については両照射間での差はほとんど認められなかった(図11).

IV 考 按

1. 脂肪酸量の経時的変化

今回の紫外線照射を行った場合では, ドコサヘキサエン酸やアラキドン酸の脂肪酸の減少量の方が, オレイン酸の脂肪酸の減少量よりも多い結果を得た. 遊離型の脂肪酸を用いた研究では, 浮遊液中の不飽和脂肪酸に紫外線照射を行い, HPLC およびガスクロマトグラフィーによる分析を用いて, ドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸に比べアラキドン酸の方により著明な脂肪酸の減少とマロンジアルデヒドの増加を認めたという報告¹¹⁾がある. また, 二重結合の数が多い脂肪酸の方が過酸化の影響を受けにくいとの報告¹²⁾もある. しかし, 今回の結果は, 西岡ら⁷⁾が行った研究と同様に, 網膜内の組成量の多い順に減少率が多い傾向を示し, また, 不飽和度の高い脂肪酸の方が過酸化の影響を受けやすい傾向を示したものであるが, 炭素原子の数や不飽和の程度と過酸化との間に判然とした相関関係を得ることができなかった. 減少量としては, Wiegand ら¹³⁾の24時間白色光暴露ラットの網膜内ドコサヘキサエン酸(C22:6)に比べ, 24時間紫外線照射でのC22:6の減少率は約78%と高率であった.

図10 t -ブチルヒドロペルオキシドと過酸化脂肪酸の検量線.図11 紫外線照射後の過酸化脂肪酸量の変化.
●: 照射12時間 □: 照射24時間.

これは、近紫外線を用いたことや、長時間の *in vitro* の暴露のため、抑制される因子に乏しいためであろうと思われる。

2. 過酸化脂肪酸の経時的变化

今回、CL-HPLC 法を用い、紫外線照射後の網膜内において生成された個々の過酸化脂肪酸の直接的定量を試みた。化学発光法では、紫外線照射によって生成されたと思われるドコサヘキサエン酸(C22:6)、ドコサペンタエン酸(C22:5)、ドコサテトラエン酸(C22:4)、アラキドン酸(C20:4)、リノール酸(C18:2)、オレイン酸(C18:1)の過酸化脂肪酸群を認めた。これまで網膜の光障害における過酸化脂肪酸の測定としては、TBA 法を用いた紫外線照射による家兎網膜内の過酸化脂質の増加⁵⁾や、ブタ眼の紫外線照射網膜内における増加⁶⁾などの報告がある。また、同様に CL-HPLC 法を用いた方法でも過酸化脂肪酸を含んだリン脂質の測定の報告¹⁰⁾を認めるが、個々の過酸化脂肪酸の測定の報告はされていない。本研究では、過酸化脂肪酸の生成量では、ドコサヘキサエン酸に比べて、オレイン酸やリノール酸のような炭素数が18個と少ない生成過酸化脂肪酸の方が多く認められた。また、この結果は、先に述べた脂肪酸の減少とは一致せず、過酸化を受けたにも拘わらず、生成された過酸化脂肪酸が何らかの影響により検出できなかったことが示唆される。これを支持するものとしては、紫外線照射による生成過酸化脂肪酸の分解によりドコサヘキサエン酸からドロキシカルボン酸を生ずるという報告¹⁴⁾がある。リノール酸の過酸化脂肪酸が二重結合の少ない点でドコサヘキサエン酸に比べ分解されにくい点で、過酸化脂肪酸としての検出量が多かったのではないかと考えられる。また、今後このような分解産物に関しても追求していく予定である。

今回用いた CL-HPLC 法では、化学発光法においてそのピークが重なるため、個々の過酸化脂肪酸の定量は困難であったが、この問題に対しては、西岡ら⁷⁾が用いた選択イオン検出—SIM-MS 法を併用することにより定量化が可能であると考えている。今後、これらの方法を用いることにより光曝露の状態のみならず、網膜の虚血状態などによって生成される過酸化脂質の測定にも応用が可能と思われる。

稿を終えるに当たり、本研究に際しご指導と論文のご校閲を賜りました日下教授ならびに田淵教授に深謝いたします。

なお、本研究は川崎医科大学プロジェクト研究 6-608 および 7-713 の援助を受けたものです。

文 献

- 1) **Aveldano MI**: A novel group of long chain polyenoic fatty acids in dipolyunsaturated phosphatyl-

dylcholines from vertebrate retina. *J Biol Chem* 262: 1172—1179, 1987.

- 2) **Aveldano MI, Sprecher H**: Very long chain (C24 to C36) polyenoic fatty acids of the n-3 and n-6 series in dipolyunsaturated phosphatidylcholines from bovine retina. *J Biol Chem* 262: 1180—1186, 1987.
- 3) **Kogan V E, Shvedava A A, Novikov K N, Kozlov Yu P**: Light-induced free radical oxidation of membrane lipids in photoreceptors of frog retina. *Biochem Biophys Acta* 330: 76—79, 1973.
- 4) **Anderson R E, Sperling L**: Lipids of ocular tissues VII. Positional distribution of the fatty acids in the phospholipids of bovine retina rod outer segments. *Arch Biochem Biophys* 144: 673—677, 1971.
- 5) **山川直之, 高村健太郎, 臼井正彦, 原敏**: 紫外線を照射した網膜における過酸化脂質の変化. *眼紀* 42: 629—634, 1991.
- 6) **平光忠久, 大城三和子**: 紫外線照射による過酸化脂質形成と活性酸素消去酵素. *あたらしい眼科* 5: 1024—1026, 1988.
- 7) **西岡ゆかり, 日下喬史, 田淵昭雄**: 紫外線照射による網膜内生成過酸化脂肪酸の LC/SIM-MS による測定. *眼紀* 45: 263—267, 1994.
- 8) **Yamamoto Y, Niki E**: Presence of Cholesteryl ester Hydroperoxide in human blood plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 988—993, 1989.
- 9) **Kusaka T, Ikeda M**: Liquid chromatography-mass spectrometry of fatty acid including hydroperoxy and hydroxy acids as their 3-methyl-7-methoxy-1, 4-benzo-xazin-2-one derivatives. *J Chromatogr* 639: 165—173, 1993.
- 10) **Terao J, Shibata S S**: Selective quantification of arachidonic hydroperoxides and their hydroxy derivation in reverse-phase high performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 169: 415—423, 1988.
- 11) **Bruna E, Petit E, Beljean-Laymarie M, Huynh S, Nouvelot A**: Specific susceptibility of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acids to peroxidation in aqueous solution. *Lipids* 24: 970—975, 1989.
- 12) **宮下和夫, 奈良英一, 太田亮**: 水溶液中での n-3 系および n-6 系高度不飽和脂肪酸の酸化安定性について. *脂質生化学研究* 35: 359—362, 1993.
- 13) **Wiegand RD, Giusto NM, Rapp LM, Anderson RE**: Evidence for rod outer segment lipid peroxidation following constant illumination of the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1433—1435, 1983.
- 14) **三尾隆彌, 劉 偉, 住野公昭**: 紫外線による DHA の過酸化とその生成物の細胞毒性. *日本医用マススペクトル学会講演集* 20: 157—160, 1995.