

## 液体クロマトグラフィー／負イオンマススペクトロメトリーを用いたラット網膜および水晶体脂肪酸の分析

鈴木 隆司

最近、日下ら<sup>1)</sup>は液体クロマトグラフィー／負イオンマススペクトロメトリー(LC/NIMS)を用いて定性的、半定量的に遊離型脂肪酸を分析し得る迅速かつ単純な方法を見いだした。この方法によりラット網膜および水晶体の全脂肪酸を分析し検討した。

その結果、網膜においては多量の極長鎖多不飽和脂肪酸を含むが、水晶体にはそれが認められず(ただし、 $C_{16:1}$ 、 $C_{18:1}$ などモノ不飽和脂肪酸は相対的に多い)、また水晶体には奇数脂肪酸も有意な量で含むのに対して、網膜ではそのようなことはないということが明らかにされた。

これらの結果は、網膜と水晶体における脂肪酸起源の異質性をうかがわせるものであり、これらの組織における各種眼疾患の病因の究明に資するものと思われる。

(平成3年3月4日採用)

### Analysis of Fatty Acids in SD Rat Retina and Lens by Liquid Chromatography/Negative Ion Mass Spectrometry (LC/NIMS)

Takashi Suzuki

Recently, T. Kusaka et al. developed a simple and rapid method to analyze free fatty acids qualitatively and semiquantitatively by liquid chromatography/negative ion mass spectrometry (LC/NIMS).<sup>1)</sup> Using this method, I analyzed total fatty acids in SD rat retina and lens.

The results showed that SD rat retina characteristically contains predominantly polyunsaturated fatty acids. On the contrary lens contains significantly monounsaturated fatty acids ( $C_{16:1}$ ,  $C_{18:1}$ , etc.) and odd number fatty acids.

These findings strongly suggest that an heterogeneity in fatty acid origin exists between the retina and lens. (Accepted on March 4, 1991) *Kawasaki Igakkaishi* 17(1): 77-82, 1991

**Key Words** ① Liquid chromatography/negative ion mass spectrometry  
② Poly unsaturated fatty acids ③ SD rat retina and lens

#### 緒 言

近年、Aveldanoら<sup>2)~4)</sup>により、脊椎動物の網膜とくに杆体中に炭素数20~36個、二重結合数

1~6個の極長鎖多不飽和脂肪酸の含有率が高く、中でもドコサヘキサエン酸( $C_{22:6}$ ,  $\omega 3$ )は全脂肪酸含有率中5位以内に入ることが報告されており、また、ドコサヘキサエン酸の前駆物

質である  $\alpha$ -リノレン酸の欠乏状態を妊娠猿に作り、それによってその新生猿において視力や網膜反射能などの視機能の低下を来すことが、実験的に証明されている。<sup>5)</sup> このような高濃度の極長鎖多不飽和脂肪酸の存在は、網膜以外では、脳神経組織、精巣細胞、母乳 (特に初乳) 以外にはいまだ知られていない。しかしながら、従来ではこれらの極長鎖多不飽和脂肪酸の分析は、脂肪酸のメチル化、硝酸銀一薄層分画法、ガスクロマトグラフィーなど多段階の過程によって行わなければならない、またこれらの前処置を行ってもガスクロマトグラフィーによる相互分離は必ずしも十分ではなく、したがって正確な定量分析は困難であるために、網膜中の全構成脂肪酸の正確な組成についてはいまだ必ずしも十分に解明されていないのが現状である。今回、極長鎖多不飽和脂肪酸の誘導体化過程における化学変性を回避するため、遊離型脂肪酸を直接検出し得る陰イオン検出大気圧イオン化方式 LC/MS を用いて網膜、および水晶体中の構成脂肪酸の一斉分析を行いその結果について検討した。

## 方 法

第9週齢 (体重300~320 g) の雄 SD ラットの whole lens および whole retina を摘出し、Folch による脂質抽出法<sup>6)</sup> を行い、total lipid を得た (Fig. 1)。これら total lipid に対して Aveldano による酸性加水分解法<sup>7)</sup> を行うことにより得られた遊離型総脂肪酸を、そのまま LC/NIMS により分析した (Fig. 2)。

負イオン検出大気圧イオン化方式 LC/MS による遊離型脂肪酸の分析は、日下、中野の方法<sup>1)</sup> によった。すなわち、Aveldano 氏法<sup>7)</sup> を用い 0.5 M の塩酸存在下に 100°C、45 分間水解を行う。生じた遊離型脂肪酸をエーテル・ヘキサン混液 (1 : 1, v/v) で抽出し、これを濃縮後直ちに LC に注入する。使用した HPLC 装置は日立 L-6200 型で、ナカライ製逆相カラム (Cosmosil 5 C18, 4.6 mm × 250 mm) を日立製大気圧イオン化方式 LC/NI-MS インターフェイスに接続した。LC の溶出速度は 1 ml/分、85% メタノール、15% テ

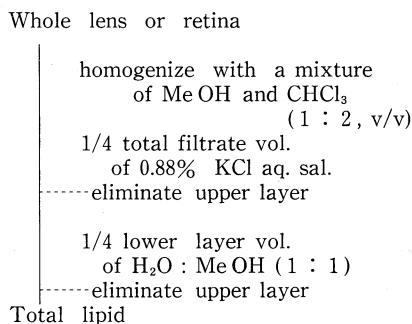


Fig. 1. Extraction of total lipid in SD rat lens and retina (Folch' method)

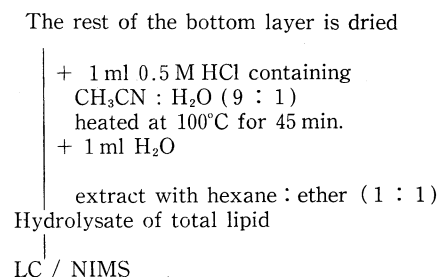


Fig. 2. Hydrolysis of total lipid

トラヒドロフラン (THF) 混液を出発時溶出液とし、その後 1%/分ずつ THF 濃度を上げて溶出した。MS-コンピューター装置は日立 M-2000 型を用いた。

## 結 果

日下ら<sup>1)</sup>によると各種系列の遊離型脂肪酸の負イオン-LC-マススペクトルはいずれもそれぞれの擬分子負イオン (M-1) のみを明瞭に示し、かつその強度もモル当たりほぼ同程度であることが知られている。したがって各脂肪酸の (M-1) に該当する m/z についてのマスクロマトグラムを描かせた場合、単一のピークでかつその溶出距離が各脂肪酸の極性を正しく反映するものであるとき、そのピークは当該脂肪酸に起因するものと確認することができる。Figures 3, 4 は、上述の方法を用いて得られた各種マスクロマトグラムのうち、とくに水晶体の飽和脂肪酸系列の、そして網膜のヘキサエン脂肪酸系列のマス

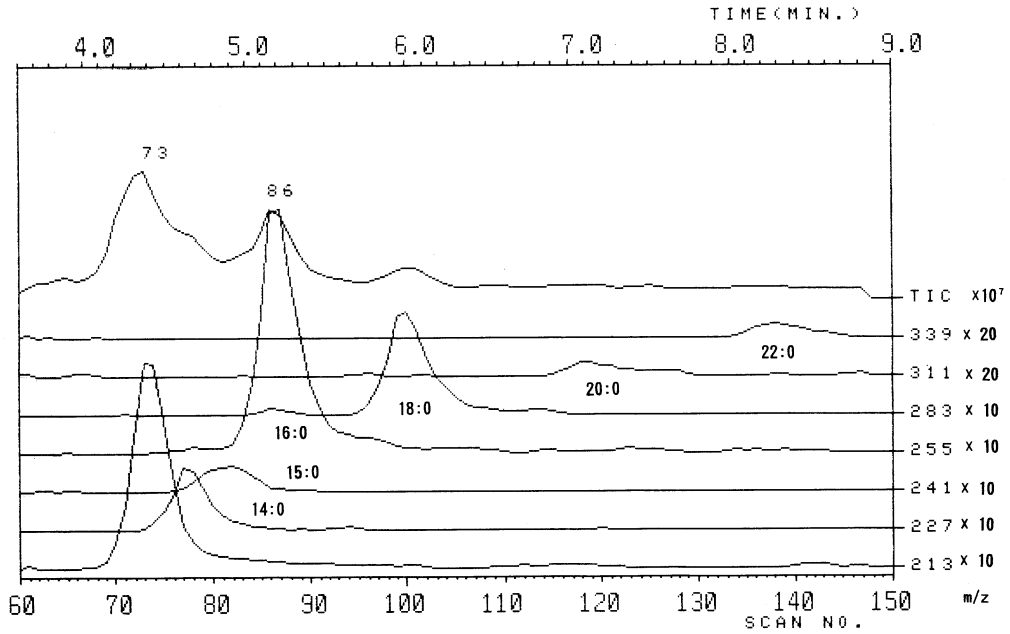


Fig. 3. LC/negative-ion-masschromatogram of SD rat lens's saturated fatty acids (TIC: total ion current)

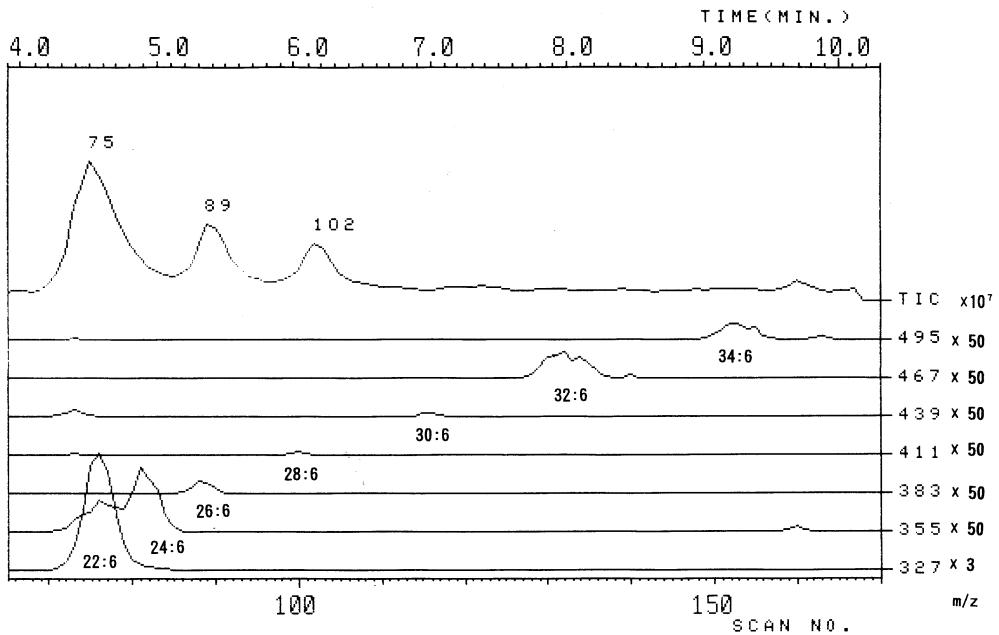


Fig. 4. LC/negative-ion-masschromatogram of SD rat retina's hexaenoic unsaturated fatty acids (TIC: total ion current)

Table 1. Mol % of SD rat retina and lens fatty acids

(mol %)					
	Retina	Lens		Retina	Lens
14:0	0.7	5.5	22:2	-----	0.1
15:0	0.9	2.7	:3	-----	0.6
16:0	17.4	22.9	:4	2.4	1.1
:1	1.6	9.8	:5	2.4	-----
:2	0.4	1.1	:6	23.7	7.3
17:0	1.5	1.4	23:0	-----	0.1
:1	0.4	1.7	24:0	-----	0.5
18:0	21.1	9.4	:1	-----	1.0
:1	10.1	20.6	:2	-----	0.1
:2	1.9	2.2	:4	0.6	0.5
:3	0.7	1.1	:6	1.1	-----
19:0	-----	0.3	25:0	-----	0.1
:1	0.3	-----	26:0	-----	0.1
20:0	-----	0.9	:4	0.3	-----
:1	0.4	1.1	:6	0.1	-----
:2	0.5	-----	28:6	0.1	-----
:4	10.1	6.0	32:5	0.3	-----
21:0	-----	0.1	:6	0.4	-----
22:0	-----	0.8	34:5	0.1	-----
:1	-----	0.3	:6	0.3	-----

Table 2. Comparison of saturated and unsaturated fatty acids, polyunsaturated and monounsaturated fatty acids contents in SD rat retina and lens

(mol %)		
	Retina	Lens
sat. : unsat.	41.6 : 58.4	44.8 : 55.2
polyunsat. : monounsat.	45.6 : 12.8	20.7 : 34.5
polyunsat. / monounsat.	3.56	0.6

クロマトグラムをそれぞれ例示したものである。

Table 1は上述のごときマスキロマトグラムを各種系列脂肪酸について描かせた後、同定されたそれぞれの脂肪酸のmol%をピーク面積の相対比より求めたものである (Table 1)。この表からわかるように最も長い長鎖脂肪酸は、網膜の場合は炭素数34、不飽和結合数6、水晶体では炭素数26、不飽和結合数6であった。量的には、網膜ではドコサヘキサエン酸 (C<sub>22:6</sub>, ω3) が最も多く、水晶体では炭素数16, 18の飽和、モノ不飽和脂肪酸の含有率が高い。また、水晶体には炭素数15~25までの奇数の脂肪酸が含まれていたが、網膜ではそのようなことはなかった。

また、この表から網膜、水晶体における飽和

脂肪酸と不飽和脂肪酸の比率を比較したが、その結果はTable 2のごとく大きな違いはなかった。しかし、モノ不飽和脂肪酸と多不飽和脂肪酸とを比較した場合、網膜では多不飽和脂肪酸が、水晶体では対照的にモノ不飽和脂肪酸の含有量が優位を占めていた (Table 2)。

## 考 察

網膜における脂肪酸組成は、炭素数30を超えるような極長鎖脂肪酸を多く含み、このうち量的に最も多いドコサヘキサエン酸 (C<sub>22:6</sub>, ω3) は脳組織、網膜にだけ豊富にあり、光受容体、神経伝達、虚血性疾患また神経変性疾患の修復などに重要な役割を果たしている。<sup>8)</sup> そして、これらのドコサヘキサエン酸は、肝臓で生成され、それが血液を通して、網膜、脳などに固有に取り込まれると推測されている。<sup>8)</sup>

このように、網膜は極長鎖多不飽和脂肪酸が他のどの組織よりも多いことから、種々の過酸化脂質

形成因子により過酸化反応を受けやすいのは明白で、特に網膜色素変性症において、ビタミンEを投与することにより視野の改善が認められたという報告<sup>9)</sup>や、後囊下白内障が合併する頻度が高いところから、視細胞の長鎖不飽和脂肪酸が過酸化脂質化することが共通の機序であるという興味ある研究もされている。また、上記の実験結果から、水晶体では奇数脂肪酸が多いが、これらは偶数脂肪酸α-酸化を介して生成されるものである。しかし、α-酸化は脳でしかおきないことから、おそらく、脳に近い脂肪酸合成系が水晶体にも存在する可能性が強い。そして、大脳皮質のモノ不飽和脂肪酸と多不飽和脂肪酸の比率が酷似している<sup>10)</sup>ことも、興味あるところ

であり、これらの知見を総合すると、網膜と水晶体における脂肪酸起源の異質性を十分に伺わせるものであり、さらに長鎖多不飽和脂肪酸は、網膜ひいては視細胞の機能上重要な構成成分であると考えられる。

なお、これら脂肪酸のリン脂質内での局在を知るため、ウシ全網膜に含まれるリン脂質 phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamines (PE) の  $\beta$  位脂肪酸 (phospholipase A<sub>2</sub> にて加水分解して得られたもの) のみについて前記と同様の LC/NIMS を試みた。ちなみに PC および PE は、脊椎動物の網膜リン脂質において80%前後を占めており、ともにリン脂質内の重要な component であるといわれている。<sup>11)</sup> 結果は Table 3 に示すごとく、炭素数は13~26、不飽和結合数は0~6であり、PCでは16:0、18:1または20:4が多いのに対して、PEでは炭素数22の不飽和脂肪酸が高い含有率を示した。そして、不飽和結合数2以上の、多不飽和脂肪酸の割合を求めたところ、PEが79.1%とPCの46.3%に対しはるかに高い含有率を示した。

これらの結果より、PEはrodpsin等を含む光受容体内、層状構造の流動性に密接に関与することが推測された。

以上のことから、本実験で用いられた負イオンLC/MSによる遊離型脂肪酸の分析は、特に長鎖不飽和脂肪酸の化学変性をできるだけ回避して検出が可能な方法と思われ、上述のような眼科領域における脂質生化学および疾患の病因

Table 3.  $\beta$ -fatty acid composition of bovine retina phospholipids

	(mol %)	
	PC	PE
13:0	1.7	0.4
14:0	2.2	1.2
15:0	3.2	2.0
16:0	12.7	2.5
:1	2.9	1.7
17:0	1.8	---
:1	0.5	0.2
18:1	20.8	8.4
:2	2.9	1.1
:3	3.1	1.5
19:1	1.1	1.7
20:1	1.8	0.6
:2	2.1	1.1
:3	4.1	3.3
:4	13.2	14.1
:6	1.2	3.4
22:4	3.1	11.0
:5	5.3	14.2
:6	10.2	22.6
24:4	1.4	1.2
:5	1.3	2.8
:6	2.1	2.9
26:6	1.3	2.1
% PUFA	46.3%	79.1%

の究明に有用であると考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただきました生化学教室 日下喬史教授、眼科学教室 藤原久子助教授、生化学センター 中野裕之氏および川崎病院医学教育研究部 中田敬一氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 日下喬史, 中野裕之: LC/負イオン-MSによる遊離型脂肪酸の分析. 日医用マススペクトル会講集 15: 119-122, 1990
- 2) Avelano, M. I.: A novel group of very long chain polyenoic fatty acids in dipolyunsaturated phosphatidylcholines from vertebrate retina. J. Biol. Chem. 262: 1172-1179, 1987
- 3) Avelano, M. I. and Sprecher, H.: Very long chain (C<sub>24</sub> to C<sub>36</sub>) polyenoic fatty acids of the n-3 and n-6 series in dipolyunsaturated phosphatidylcholines from bovine retina. J. Biol. Chem. 262: 1180-1186, 1987
- 4) Avelano, M. I. and Rotstein, N. P.: Synthesis of very long chain (up to 36 carbon) tetra, penta and hexaenoic fatty acids in retina. Biochem. J. 249: 191-200, 1988
- 5) Neuringer, M. and Conner, W. E.: Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal  $\omega$ 3

- fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83 : 4021—4025, 1986
- 6) Folch, J., Lees, M. and Stanley, G. H. S. : A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem. 226 : 497—509, 1957
  - 7) Aveldano, M. I. and Horrocks, L. A. : Quantitative release of fatty acids from lipids by a simple hydrolysis procedure. J. Lipid Res. 24 : 1101—1105, 1983
  - 8) Scott, B. L. and Bazan, N. G. : Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 : 2903—2907, 1989
  - 9) Campbell, D. A. and Harrison, R. : Retinitis pigmentosa. Vitamin A serum levels in relation to clinical findings. Exp. Eye. Res. 3 : 412—426, 1964
  - 10) 日下喬史 : 私見
  - 11) Rotstein, N. P. and Aveldano, M. I. : Labeling of lipids of retina subcellular fractions by [ $^{14}\text{C}$ ] eicosatetraenoate (20 : 4 (n-6)) docosapentaenoate (22 : 5 (n-3)) and docosahexaenoate (22 : 6 (n-3)). Biochim. Biophys. Acta 921 : 221—234, 1987
  - 12) N' Soukpoe-Kossi, C. N., Salesse, C., Leblanc, R. M. and Boucher, F. : Molar absorptivities of bovine retina rod outer segment phospholipids in n-Hexane. Anal. Biochem. 151 : 409—417, 1985