⑤ HPLC-CL 法によるコレステロール エステルヒドロペルオキシドの測定

東京大学先端科学技術研究センター

永田 祐一郎, 山本 順寛

1. HPLC-化学発光法による各種脂質ヒドロペルオキシド分析法の開発

脂質の酸化第一次生成物は脂質ヒドロペルオキシドであるので、これを生体試料中に検出することに多くの関心が寄せられてきた。脂質の過酸化を防ぐために、生体中には酸素ラジカルを捕捉するビタミンC、ビタミンE等の抗酸化剤、また生成した脂質ヒドロペルオキシドを消去するためのグルタチオンペルオキシデースなどの消去システムが存在する。したがって生体中の脂質ヒドロペルオキシドレベルは非常に低いことが予想され、これを検出するためには超高感度の分析法が、また各種生体成分の妨害を受けない方法が必要となってくる。筆者らはこれらの要求を満たすと考えられる HPLC-化学発光法の開発にはじめて成功した¹⁾。

検出手段として、高感度（ピコモルレベル）の過酸化水素の検出法としてよく知られているイソルミノールの化学発光

法を用いた。推定される反応機構を図1に示したが、イソルミノールは鉄触媒（ここではミクロペルオキシデース）の存在下で脂質ヒドロペルオキシド (LOOH) により酸化され、エンドペルオキシドを与える。これが励起アミノフタル酸を経て、化学発光をもたらす。この一連の化学反応では、脂質アルコキシルラジカル (LO•) やスーパーオキシド ($O_2^{\bullet-}$) といった酸素ラジカルが重要な反応中間体となっている。生体試料中に必ず含まれる抗酸化剤は、酸素ラジカルを速やかに捕捉し、化

図1. イソルミノールの化学発光反応

学発光を消光してしまう。しかし HPLC と組み合わせ、抗酸化剤と脂質ヒドロペルオキシドを分離した後に化学発光反応を行えば問題はない。現在の検出感度は約100 フェムトモルあるいはそれ以下である。

2. 血漿脂質ヒドロペルオキシドへの応用

つぎにこの分析法を入手しやすい生体試料である血漿に応用することを試みた。健康人血漿中には抗酸化剤としてビタミンC、ユビキノール、ビタミンE、尿酸が、脂質としてはコレステロールエステル (CE)、ホスファチジルコリン (PC)、遊離コレステロール (FC)、トリグリセリド (TG)、遊離脂肪酸 (FFA) が含まれる。血清蛋白質であるアルブミンに結合している FFA を除いた他の脂質は、球状のリポ蛋白質を形成して存在している。脂質の中でも高度不飽和脂肪酸を側鎖にもつ CE、PC、TG は特に酸化を受けやすい脂質と考えられる。FFA は高度不飽和脂肪酸そのものであるが量は少ない。

問題はHPLCの分析条件である。上に挙げたすべての脂質のヒドロペルオキシド (CE-OOH, PC-OOH, FC-OOH, TG-OOH, FFA-OOH) と抗酸化剤を1つの分析条件で分離することは出来ない。そこで血漿を水/メタノール層とヘキサン層の2つのフラクションに分けた。血漿の分離と抽出は以下のように行なったが、ハロゲン化溶剤を含まない優れた抽出法である^{1,2)}。

- 1) ヘパリンを抗凝固剤として採血し、血漿を分離する。
- 2) 2 ml のメタノールに 0.5 ml の血漿を加え良く振とうした後、10 ml のヘキサンを加える。
- 3) 良く振とうした後、遠心分離機で2層に分け、水/メタノール層はそのまま、ヘキサン層は濃縮した後 HPLC で分析する。

ヘキサン層にはビタミンE、ユビキノール、CE-OOH、FC-OOH、TG-OOH、FC、CE、TG が、水/メタノール層にはビタミンC、尿酸、過酸化水素、FFA-OOH、PC-OOH が分配される²⁾。

図2にオクチルカラムを用いたヘキサン層の分析例を示したが、ユビキノール-10とCE-OOH が分離されている³⁾。CE-OOH のピークは合成した CE-OOH と保持時間が一致すること、またトリフェニルホスフィンで還元されることから確認した。健康人の血漿中 CE-OOH レベルは約 3 nM であった³⁾。

水/メタノール層をアミノプロピルカラムに導入すると、FFA-OOH と PC-OOH、そしてビタミンCと尿酸を分析することが出来るが、健康人では FFA-OOH も PC-OOH も検出されなかった²⁾。この理由として血漿グルタチオンペルオキシデースが FFA-OOH

と PC-OOH を還元するのに対し CE-OOH を還元しないことが挙げられる⁴⁾。

3. 人, ラット, 無アルブミンラットの比較⁵⁾

図3で健常人, ラット, そしてその高脂血症モデルである無アルブミンラットの血漿中の CE-OOH レベルを比較した。ラットは CE-OOH レベルそして CE-OOH/CE レベルとも明らかに人よりも高い。リポタンパク質の代謝回転もラットの方が人よりもかなり速いこと (例えば LDL ではそれぞれ10分と3日) を考えあわせると, 生成する CE-OOH の絶対量はラットの方が人よりもはるかに多いと見積られる。つぎにラットとその高脂血症モデルでもある無アルブミンラットを比較すると, 無アルブミンラットの CE-OOH レベルや CE-OOH/CE が有意に増加しており, 同ラットにおける酸化ストレスの亢進が示唆される。

4. CE-OOHの由来について

血漿中には多量の抗酸化剤が存在するために, 相当量の活性酸素・フリーラジカルの発生がなければ, CE-OOH の増加は認められない。従って, CE-OOH はリポ蛋白質の酸化により生成するのではなく, 酸化傷害を受けた組織に由来する可能性が大きい。最近我々は, 高密度リポ蛋白質中のレシチン: コレステロール アシルトランスフェラーゼ (LCAT) が, PC-OOH を CE-OOH に変換できることを見出した⁶⁾。肝細胞が高密度リ

図2. ヒト血漿のヘキサン抽出物の分析例

図3. ヒト, ラット, 無アルブミンラットの CE-OOH レベルの比較

ポ蛋白質中の CE-OOH を選択的に取り込むことから⁷⁾, LCATは酸化されたリン脂質の除去に重要な役割を果たしていると考えられる。

〈参考文献〉

1. Yamamoto Y, Brodsky MH Baker JC, Ames BN. Anal Biochem, 160 : 7-13, 1987.
2. Yamamoto Y, Ames BN. Free Rad Biol Med, 3 : 359-361, 1987.
3. Yamamoto Y, Niki E. Biochem Biophys Res Commun, 165 : 988-993, 1989.
4. Yamamoto Y, Nagata Y, Niki E, Watanabe K, Yoshimura S. Biochem Biophys Res Commun, 193 : 133-138, 1993.
5. Yamamoto Y, Wakabayashi K, Niki E, Nagao M. Biochem Biophys Res Commun, 189 : 518-523, 1992.
6. Nagata Y, Yamamoto Y, Niki E Arch Biochem Biophys, 329 : 24-30, 1996.
7. Sattler W, Stocker R. Biochem J, 294 : 771-778, 1993.