

生体関連物質の放射線化学

小川 真理子

序：

放射線によって生物体のうける損傷のうちで大きなものは、DNA の 2 本鎖の切断であると長い間考えられてきた。近年、DNA に加えて生体膜もまた放射線作用の重要なターゲットであることが指摘されてきて、その方面の研究も多くなってきている。

1972 年に Petkau¹⁾ がリン脂質の人工膜を用いて放射線によって脂質膜の安定性と化学構造が変化することを示唆し、また Alper²⁾ は生体膜が酸素効果の部位であると推定している。

ここでは主に生体膜構成要素である脂質の過酸化を取り上げ、その過酸化機構について研究した。

生体膜と脂質の過酸化：

生体膜の化学成分はタンパク質と一連の複雑な極性を持つ脂質であり、細菌ではリン脂質の 95% が膜に結合している。1973 年に Singer と Nicholson³⁾ が提唱した流動モザイクモデルによると、生体膜においては図 1 に示すよう

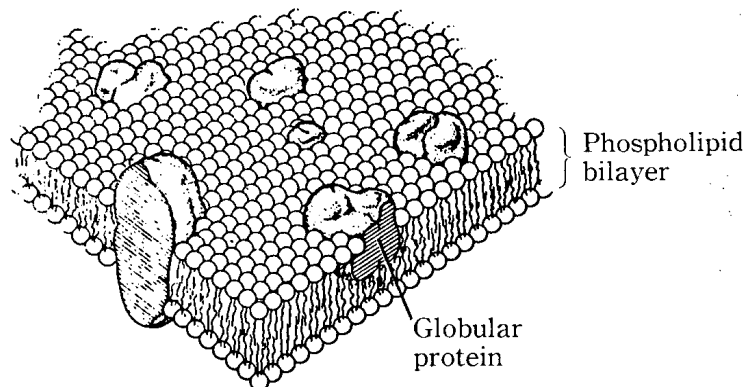


図 1 生体膜の流動モザイクモデル (Singer と Nicholson による)

に、リン脂質が極性部を外側、非極性部を内側にして二重層をなしており、その中にタンパク質が埋め込まれている。タンパク質には2種類あり、不溶性タンパク質と表層（可溶性）タンパク質と呼ばれる。前者は膜に深く入り込んでしまっはずれにくく、後者は疎水部分のみを膜内に埋め込んではずれやすい構造となっているため、膜内を自由に移動することができる。

生体膜を構成する脂質は一般に長鎖脂肪酸エステルであり、多価不飽和脂肪酸の場合も多い。これらは放射線照射や金属イオンの触媒作用などによって水素原子の引き抜きによりフリーラジカルを生じる。この過程を図2に示した。ラジカルになると直ちに二重結合の再配列が起こって、共役二重結合ができる。またラジカル部位には酸素が結びついて、過酸化ラジカルとなる。これがまた他の不飽和脂肪酸から水素原子を引き抜くため、連鎖反応となるのであるが、自身はヒドロパーオキシドとなり、不安定なため分解してさらに2つのフリーラジカルを生じたり、あるいは重合をくり返すなどして

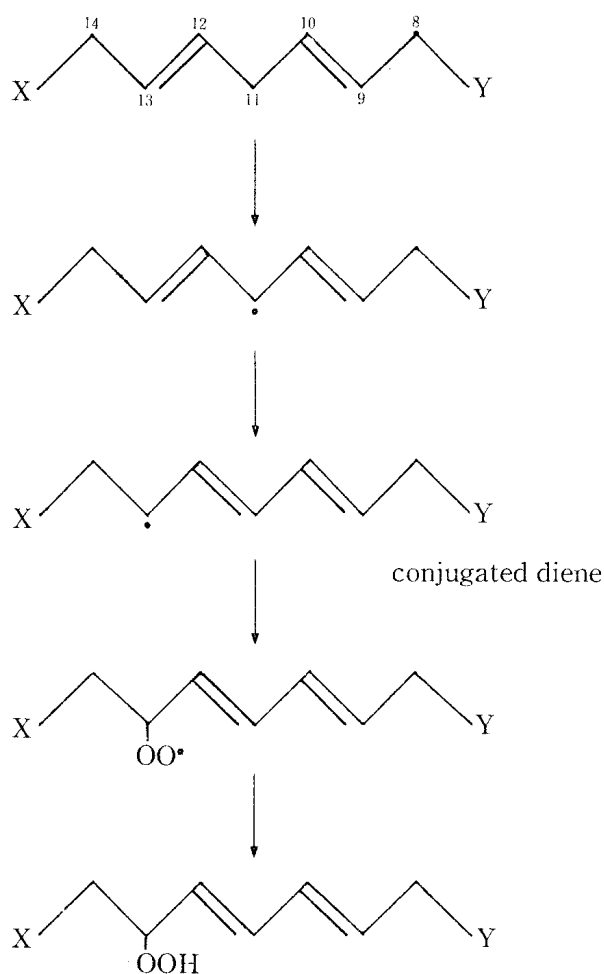


図2 多価不飽和脂肪酸におけるフリーラジカルおよびヒドロパーオキシドの生成

多種の二次生成物を生じる。最終的にはマロンアルデヒドが形成される。

ここで生成する過酸化脂質およびその分解生成物であるマロンアルデヒドは生体に対して著しい毒性を示し、老化現象や退行性変化を伴う疾患、たとえば動脈硬化症、糖尿病、肝疾患などとの関連性が問題となってきた⁴⁾。

実験：

脂肪酸のなかで特に多価不飽和脂肪酸の過酸化物が、生体に対する毒性と関連して問題となっている。そこで、多価不飽和脂肪酸含量の非常に多いゴマを用いて、これより脂質の抽出を行い、また標品としてはリノール酸（和光純薬、生化学用）を用いて、これらをそれぞれ水にけん濁しホモジナイザーおよび超音波処理によりミセル液として、これを生体膜モデルとした。試料の照射は⁶⁰Co γ 線源を用いて、線量率 $6.4 \times 10^4 \text{ rad/h}$ で30分間 γ 線照射を行った。照射試料は、脂肪酸組成の経時変化および過酸化物生成の様子をみた。過酸化物の測定は、共役二重結合の測定、フリーラジカルの測定、チオバルビツール酸によるマロンアルデヒドの測定など、いくつか考案されている。ここでは共役二重結合の吸収を232 nmでみてその生成を定量するという、吸光測定を行った。また脂肪酸組成の変動に関しては、リノール酸標品の場合はこれを0-4-Nitrobenzyl-NN'-diisopropylisourea (NBDI)を用いてラベル化した後、高速液体クロマトグラフィーによってリノール酸量の変化をみた。ゴマ抽出脂質の場合は、照射後ミセル液をケン化して遊離脂肪酸とした後、NBDIでラベル化し、同じく高速液体クロマトグラフィーにより分離定量した。操作の概略を図3に示した。高速液体クロマトグラフィーのカラム担体はRp 18-5 (Merck社製) 内径4 mm×長さ150 mmを用い、溶媒はアセトニトリルを1 ml/minの流量で溶出した。検出は脂肪酸の吸収をみるため、254 nmで行った。

結果および考察：

ゴマより抽出した脂肪酸をNBDIでラベル化し、高速液体クロマトグラフィーにかけて得たスペクトルを図4に示す。スペクトルのはじめのピークはNBDIによるものであり、脂肪酸としては、主にリノール酸($C_{18:2}$)、オレイン酸($C_{18:1}$)、ステアリン酸($C_{18:0}$)、パルミチン酸($C_{16:0}$)からなり、その構成比は48:34:4:14であった。ここで、リノール酸、オレイン酸、ステアリン酸は共に炭素数18、パルミチン酸は炭素数16の脂肪酸であるが、リノール酸は二重結合を2つ持つ多価不飽和脂肪酸であり、オレイン酸は二重結

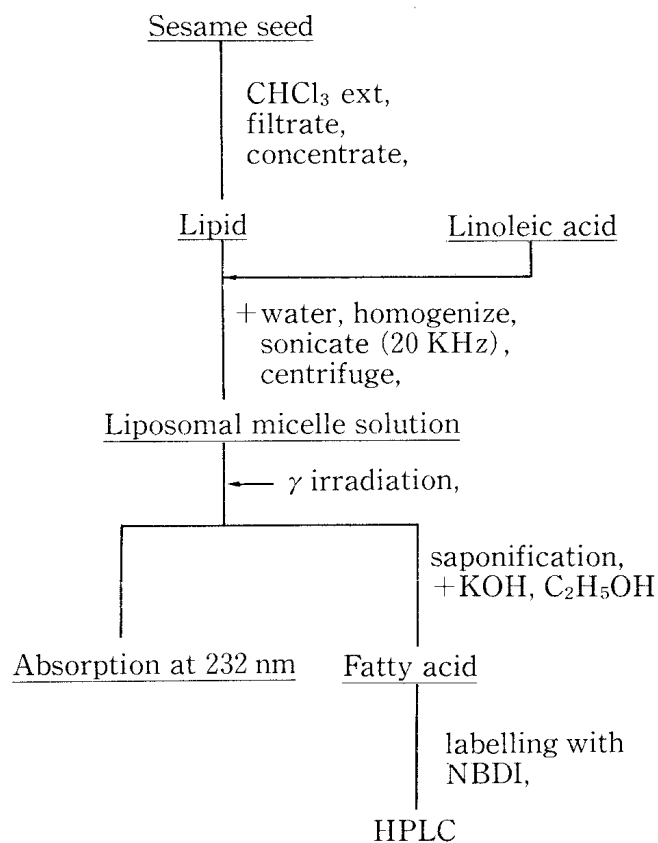


図 3 実験操作の概略

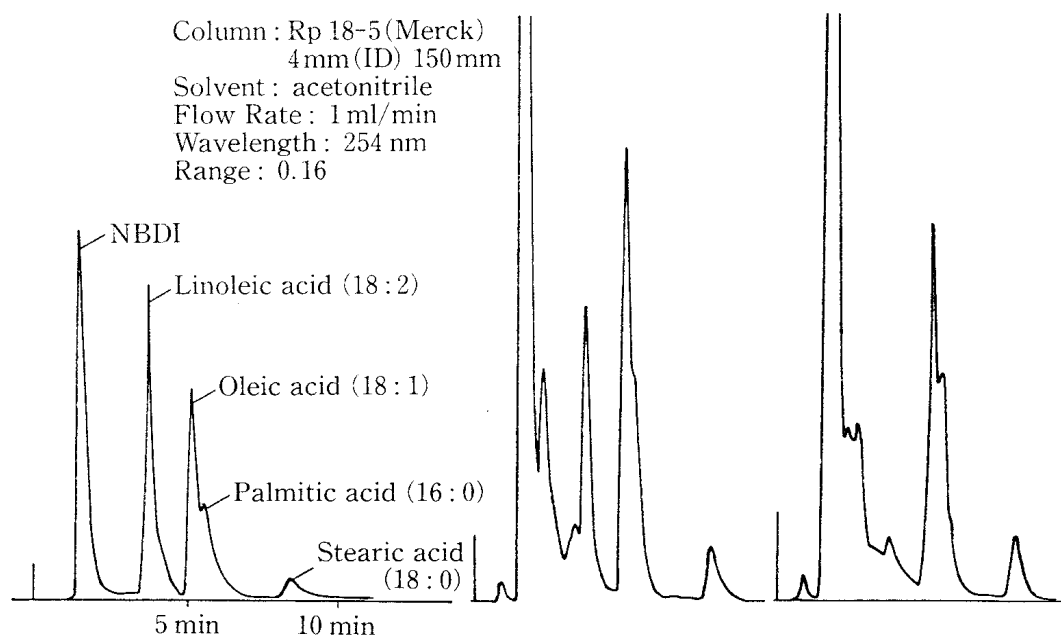


図 4 ゴマ抽出油の高速液体クロマトグラフィースペクトル。左から非照射，照射 5 時間後，照射 4 日後のスペクトル

表 1 Time dependent change of fatty acid composition of model lipid membrane from Sesami Semen after γ irradiation with 50000 rad and stored for different length of time.

Fatty acids	Control	5H	Irradiated		
			2 days	4 days	6 days
C 16 : 0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
C 18 : 0	0.27	0.20	0.24	0.31	0.27
C 18 : 1	2.41	1.80	1.76	1.97	1.67
C 18 : 2	3.32	1.74	0.72	0.63	0.36

合を 1 つ，ステアリン酸とパルミチン酸は二重結合を持っていない。

試料を γ 線照射した後，5 時間後，2 日，4 日，6 日後に同様の液体クロマトグラフィーにかけ，脂肪酸組成の変化をみた。スペクトルから，リノール酸のピークが大きく減少していることがわかる。また NBDI のピークの前後に新たなピークが現われており，これは過酸化物によるピークであるかもしれない。今後分離して，分析してみる必要があるだろう。

脂肪酸組成の経時変化について，表 1 にまとめてみた。ここでは，もっとも変動が少ないと思われるパルミチン酸を基準にとり，他の脂肪酸量の相対変化をみた。二重結合を持たないステアリン酸は，照射後も非照射ブランクとほとんど組成変化がないことがわかる。オレイン酸は，照射により少し減少がみられたが，その後の経時変化はあまりない。これに対してリノール酸は，照射により大きく減少し，その後も経時的に減少していつていることがわかる。これはリノール酸の場合，連鎖反応が進行していつて，照射後も続いていることをあらわしていると思われる。

図 5 は，照射したリノール酸ミセル液における共役二重結合の生成を 232 nm の吸光によって測定したものである。照射量は，840 ラド，4200 ラド，17000 ラドとし，照射後の共役二重結合の時間的な変化をみた。これによると，17000 ラド照射の試料はもっとも早く（照射後約 30 時間）共役二重結合の生成ピークがあらわれ，その後減少している。これは共役二重結合ができた後，過酸化物となり分解していく過程をあらわしているのであろう。照射量が少なくなるにつれて，共役二重結合の生成は遅くなり，非照射試料では 72 時間後にやっとピークにさしかかろうとしている。非照射試料でも，時間的な差はあるものの，やはり共役二重結合はできてくる。共役二重結合の生成は，試料のおかれた雰囲気でも異なってくる。試料を酸素雰囲気においた場合と，窒素充填して酸素を窒素に置き換えた場合の共役二重結合の生成を

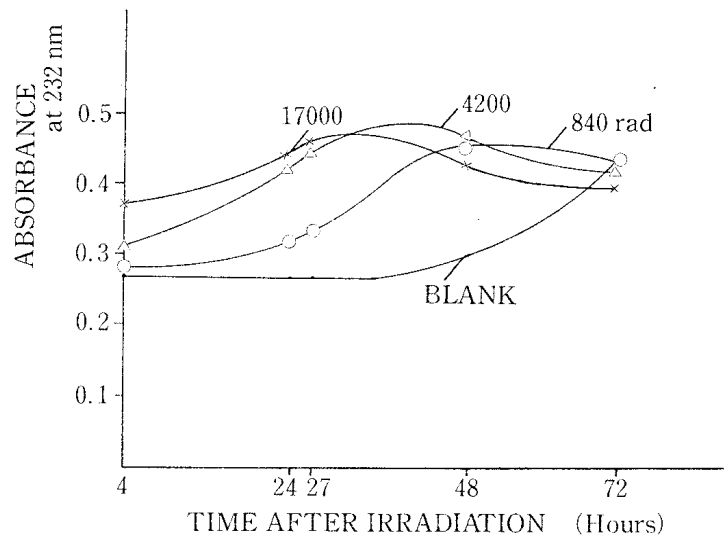


図 5 リノール酸ミセル液中の共役二重結合の生成の経時変化

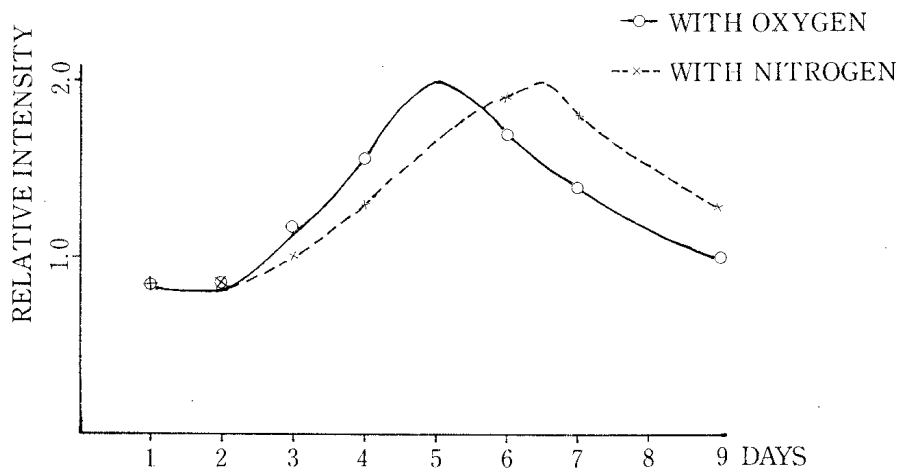


図 6 リノール酸のミセル液中の共役二重結合の、試料雰囲気による生成時間変化

図 6 に示した。これより明らかなように、窒素置換雰囲気では、共役二重結合の生成は遅れるようであり、酸素が共役二重結合の生成とその後に関わりを持っていることがわかる。

これは二重結合を二つ持つリノール酸においては、ラジカル生成—共役二重結合—パーオキサイド生成の連鎖反応が進行しているためであると思われる。ここで抗酸化剤としてトコフェロールを添加して、リノール酸ピークの減少の経時変化をみたものを図 7 に示した。リノール酸ピークは照射直後から大きな差があり、トコフェロール添加したものではリノール酸の減少が少ない。その後の経過も、トコフェロール無添加試料ではリノール酸ピークがどんどん小さくなっていくのに比べて、トコフェロール添加試料では、その

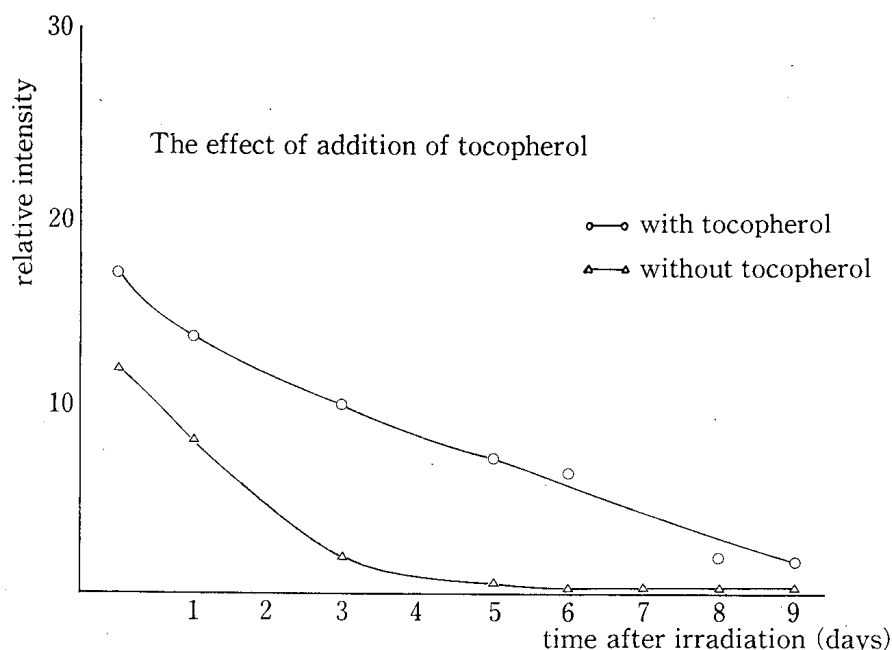


図 7 トコフェロール添加効果

減少速度がゆるやかである。これは、トコフェロールの添加によって、脂質の過酸化が妨げられたことを示している。

以上ゴマおよびリノール酸標品を用いて、脂質の過酸化の様子をみてきた。脂質の過酸化は放射線照射などにより、ラジカルの生成がひきがねとなって起こること、多価不飽和脂肪酸において、共役二重結合を経由して生じること、酸素の影響などが証明された。

本実験においては、生体膜のモデルとしてゴマ抽出油やリノール酸ミセル液など、ごく簡単なモデルを用いて行ったが、実際の細胞膜はリン脂質としてリン酸基や極性基を含んでいたり、コレステロール、タンパク質、糖質などの複雑な混合物である。実際の生体膜上での放射線影響を解明するためには、より複雑な系での脂質の挙動を調べていくことが必要である。

参考文献

- 1) A. Petkau, Health Phys, **22** (1972) pp. 239-244
- 2) T. Alper The roles of primary lesions in membranes and DNA in Bio-physical Aspects of Radiation Quality, 1971, IAEA, Vienna, pp. 171-183
- 3) S. J. Singer, G. L. Nicholson, Science **175** (1972) pp. 720-731
- 4) 五島雄一郎, 日本薬剤師会雑誌, **33** (1981) pp. 773-777