

平成 23 年度 修士論文

スサビノリ抽出ルテインの
網膜保護作用に関する研究

三重大学大学院 生物資源学研究科
資源循環学専攻 栄養機能工学研究室

510M107 神田 憲

目次

第1章	緒論	2
第2章	スサビノリからのルテインの精製法の検討	5
1節	実験目的	5
2節	実験材料および方法	5
3節	実験結果および考察	6
第3章	スサビノリからのルテイン結晶化による精製法の検討	7
1節	実験目的	7
2節	実験材料および方法	7
3節	実験結果および考察	8
第4章	細胞壁分解酵素におけるスサビノリからのルテインの精製法の検討	9
1節	実験目的	9
2節	実験材料および方法	9
3節	実験結果および考察	10
第5章	光障害ラットにおける抽出ルテイン硝子体投与の網膜保護効果の検討	11
1節	実験目的	11
2節	実験材料および方法	11
3節	実験結果および考察	12
第6章	光障害モデルラットにおける抽出ルテイン濃度変化による保護効果の検討	15
1節	実験目的	15
2節	実験材料および方法	15
3節	実験結果および考察	16
第7章	総合考察	18
第8章	図	21
参考文献		30
謝辞		32
要約		33

第1章 諸論

はじめに

人間は、情報の約9割を眼覚から取りこんでいる。テレビやパソコン作業のような眼に負担をかける機会が多く、眼の疾患や視覚機能の低下が問題となっている。網膜は光に曝されているため、活性酸素種が蓄積し酸化ストレスによる障害を受け易い。網膜に存在するニューロン（神経細胞）は障害を受けると、再生することができないため、視覚においては障害を予防することが重要となる。眼球構造は、外膜(角膜と強膜)、中膜(ぶどう膜、虹彩、毛様体、脈絡膜)、内膜(網膜)、房水、水晶体、硝子体から構成されている。角膜は無血管性の透明組織で光線を屈折させて眼内に光を導き、虹彩で瞳孔径を変えることで光量が調整され、水晶体を通り、網膜上の黄斑部に集約をする[1]。網膜は、系統発生的には間脳に属しており、外部から直接観察できる唯一の中樞神経系の機能を持つ。光は、一度網膜を通過して視細胞外側部(OS)で光受容細胞（桿体細胞・錐体細胞）を活性化し、電気信号に変換する。電気信号は、視細胞核が局在する外顆粒層(ONL)、双曲細胞、水平細胞、アマクリン細胞の核で構成されている内顆粒層(INL)のなどで制御され、神経節細胞層(GCL)に伝達される。そして、神経節細胞の軸索が視神経の役割を果し大脳に至る（網膜を貫通する視神経乳頭には視細胞は存在しない）[2]。

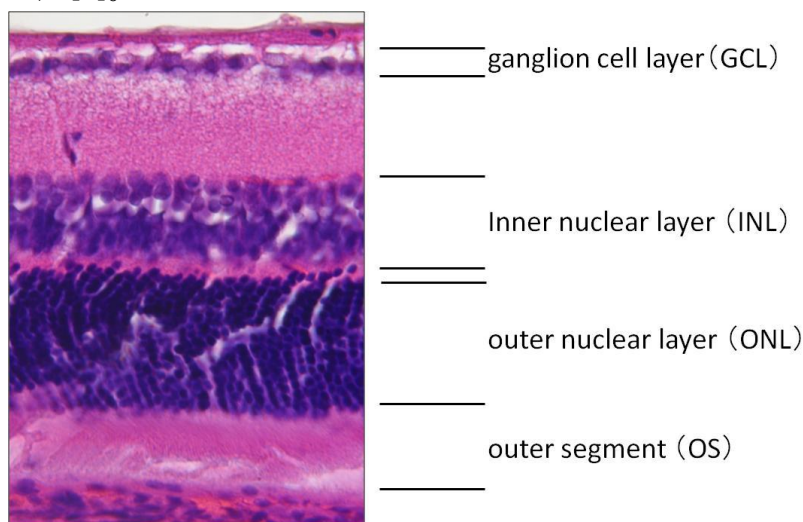


Fig.1 Structure of the retina

加齢黄斑変性は、日本の失明原因4位にあり、社会的失明原因の上位を占め、日本において50歳以上の加齢黄斑変性の有病率は0.9%である。総人口に換算すると、患者数は43万人にも登ることが推定される。患者の約90%に視力0.1以下になり、この疾患の治療法が早期に開発されることが望まれる[3]。加齢黄

斑変性は滲出型と萎縮型に分けられる。滲出型加齢黄斑変性は、脈絡膜から脈絡膜新生血管を生じ、網膜面に伸び、この新生血管は血管脆弱性であり、出血・滲出物の貯留から黄斑部の機能障害を引き起こし、偏視・視力低下などを示す。この視力の低下等を治療しないでいると、黄斑部に不可逆的な変性を起こし、視力欠損となる疾患である。萎縮型加齢黄斑変性は、加齢と共に黄斑部変性を起こし、この範囲により視力低下を引き起こすが滲出型のような脈絡膜新生血管は起こらない。

加齢黄斑変性の危険因子は、高血圧・紫外線・加齢・喫煙である。特に喫煙は、活性酸素を増加させ過酸化脂質の蓄積を進めると、脈絡膜の血液循環にも影響を及ぼし、黄斑変性を生じると考えられている。

現在、滲出型加齢黄斑変性の治療法は、脈絡膜新生血管の発生を抑えることがポイントであり、光線力学的療法と抗 VEGF(血管内皮増殖因子)剤が新規薬剤である。光線力学的療法は、ベルテポルフィン(光受容性物質)を静脈投与し、眼球病変部にレーザー照射することにより光化学反応を励起し、新生血管の閉塞をさせる。また、脈絡膜新生血管の発生は、VEGF が関与しており、抗 VEGF 剤などの薬剤の硝子体内注入により VEGF 作用を抑制し、脈絡膜新生血管を抑える治療が最も新しい治療法である[4]。

ラット光障害モデルは、加齢黄斑変性の原因として体内で産生される活性酸素による酸化ストレスが有力視され、活性酸素は病原体などを攻撃し細胞などを守る反面、発生すると酸化ストレスとなり、組織障害の原因となりうる。ラット光障害モデルは光曝露により、網膜視細胞等に活性酸素種を蓄積させ、視細胞層にアポトーシス性細胞死を誘発させた加齢黄斑変性のモデル動物である[5]。

網膜電位図 (electroretinogram: ERG)は、眼球の静止電位は、網膜に光刺激に変動する。この網膜の活動電位を記録したものが ERG である。実験では、暗順応 ERG を用い、弱短光で測定を行った。暗順応 ERG を Fig.2 に示す。この、 0.009 cds/m^2 は弱短光情報で主に桿体細胞が発する電位である[2]。

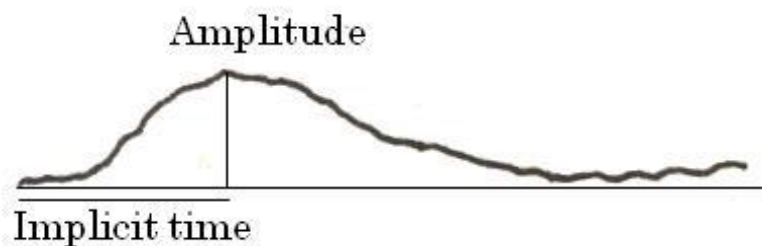


Fig.2 The waveform of ERG (0.009 cds/m^2).

第2章 スサビノリからのルテインの精製法の検討

1節 実験目的

スサビノリには、赤橙色素成分としてルテインを含有していることが知られている[9]。本章では、スサビノリからのルテインの精製法を検討した。

2節 実験材料および方法

1)実験材料

使用するスサビノリは、本研究科水圏生物利用学研究室の荒木教授から頂いたものを用いた。その他の実験に用いた試薬は、特級もしくは一級品の用いた。また、標準ルテイン(Extrasynthese)である。

2)スサビノリからのルテインの抽出

スサビノリ粉末 100 g に 99%エタノール 1 L を加えボールミルを用いて 24 時間攪拌した。濾紙(ADVANTEC, NO2, 150 mm)を用いて吸引濾過を行い、濾液をロータリーエバポレーター(N-1200A, 東京理科器械)を用いて乾固した。そこにアセトン 50 mL を加え、濾紙を用いて吸引濾過を行い、濾液をロータリーエバポレーターで乾固した。これに 10%KOH/メタノール 20 mL 加えてケン化(24 時間)した。酢酸エチル 100 mL と超純水 150 mL を加え分液ロートを用いて液液分配を行い、10%KOH/メタノールを含む超純水層を捨て、酢酸エチル層を回収し乾固した。

3)薄層クロマトグラフィー(TLC)による分析

試料を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ にアセトンで調整し TLC プレート(シリカゲル 60, メルク・ジャパン)に 5 μL アプライし、展開溶媒(アセトン/ヘキサン=2.5 : 7.5)を 4 分間展開した。スポットから Rf 値を求めた[10]。

Rf 値の求め方

$$[\text{Rf 値} = \text{スポットの移動距離} / \text{展開溶媒の移動距離}]$$

4) オープンカラムによる精製

TLCの結果を基にシリカゲル装填カラム(Wako-gel C-200, ϕ 17.6×270 mm, 和光純薬工業)にアプライし, アセトン/ヘキサン=2:8に混合した移動相を用いて分画しルテインが含有する赤橙色画分を得た。

5) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分取

ルテインを含む有色画分を逆相高速液体クロマトグラフィー(DG-2080, LG-1580-02, PU1580, UV-1570, 日本分光)を用いて精製をおこなった。超純水で平衡化した ODS カラム(Cosmosil 5C₁₈-AR, ϕ 4.6×150 mm)に標準ルテインをメタノールで溶解し 10 μ g アプライした。溶媒は, A 液が超純水, B 液がメタノールとし, サンプルをアプライし B 液を 0~100%まで 30 分間の直線濃度勾配をかけ, 続いて B 液を 100%で 30 分間流した。この時, 波長は 450 nm, 流速は 0.5 mL/min, レコーダー(HITACHI, D-2000 chromato-integrator)で記録を行った。

上記の分析で得られた溶出時間を基に, 有色画分からルテインの分取を行った。すなわち, 有色画分にメタノール 500 μ L を加えて溶解し, メンブレン(DISMIC-13HP, ADVANTEC)ろ過をしてサンプルとした。上記の分析と同様な方法を用いて精製を行った。得られた画分を抽出ルテインとした[11]。

3 節 実験結果および考察

抽出物質を TLC で分析した結果を Fig.4 に示した。サンプルに含まれた 2 つのスポットは, Rf 値が 0.99, 0.25 であったことから β -カロテンとルテインであることが分かった[10]。

標準ルテインの HPLC による分析の結果を Fig.5A に示し, ルテイン含有画分を HPLC で分取した時の結果を Fig.5B に示した。標準ルテインと同じの溶出時間のピークを分取することで, ルテインの精製を行った。分取の結果, スサビノリ粉末 100 g から 1.2 mg のルテインが得られた。

第3章 スサビノリからのルテイン結晶化による精製法の検討

1節 実験目的

今までの抽出法では、多くの工程を有し、抽出量も僅かであった。そこで本章では、ルテインの結晶化による精製法を用いることで、操作の簡易化とルテイン回収率の向上を目的とした。

2節 実験材料および方法

1)実験材料

実験に用いた試薬は、特級もしくは一級を用いた。

2)ルテインの結晶化

スサビノリ 61.1 g をミルミキサー(BM-RS08-GA, ZOJIRUSHI)を用いて粉末化した。そこに、ヘキサン 300 mL を加え 60°C で 1 時間、30 分おきに攪拌しながら加熱した。溶液をオムニポアフィルター(孔径 0.45 μm , ϕ 47 mm, MILLIPORE)を用いて吸引濾過を行い、濾液をロータリーエバポレーターで乾固した。この操作を 4 回行った。そこに、プロピレングリコールを 1 mL 加え 55°C, 30 分間加熱し溶解した。そして試料溶液に対して 18% になるように 45% KOH 水溶液を加え、ウォーターバスシェイカー(TAITEC)で 70°C, 6 時間攪拌しながら加熱し、ケン化した。70°C の超純水を溶液の 10 倍量加え、更に 70°C で 10 分加熱した後に、オムニポアフィルターで吸引濾過を行い濾液と結晶物質に分けた。不純物を取り除くために結晶を 70°C のヘキサンに溶かし、オムニポアフィルターを用いてろ液を回収した。これを、ロータリーエバポレーターを用いて乾固し、100 μL の 1% トリエチルアミン/ジクロロメタンと 100 μL のヘキサン加えて攪拌し、-20°C で 3 時間静置し再結晶化させた。その後、0°C の冷ヘキサンを数滴加え、遠心分離(3,500 rpm, 10 分)を行い沈殿と上清に分けた。上清を取り除き、沈殿に 0°C の冷ヘキサンを加えて再び遠心分離(3,500 rpm, 10 分)を行った。この操作を 3 回行うことで結晶の洗浄を行った[16, 17]。

3) 抽出ルテイン結晶の HPLC による分析

結晶化した抽出ルテインを逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて分析を行った。まず超純水/アセトン=14 : 86 で平衡化した ODS カラム(Wako Navi C₃₀-5, φ 4.6×250 mm)に超純水/アセトン=14 : 86 で標準ルテイン 200 µg/mL に調整したものを 10 µg をアプライした。溶媒は、A 液が超純水、B 液がアセトンとし、抽出試料をアプライから B 液を 86~97%まで 21 分間の直線濃度勾配をかけた。続いて B 液が 97~100%まで 4 分間の直線濃度勾配流し、B 液 100% を 1 分間流し続けた(波長: 445 nm, 流速: 1.0 mL/min)。

上記の分析で得られた溶出時間を基に、抽出ルテインの分析を行った。すなわち、サンプルに超純水/アセトン=14 : 86 を加えて 10 µg/mL に調整したものを 50 µl アプライした。溶媒は、A 液が超純水、B 液がアセトンとし、抽出試料をアプライした直後に B 液を 86~97%まで 21 分間の直線濃度勾配をかけた。その後続いて B 液が 97~100%まで 4 分間の直線濃度勾配流し、B 液 100%を 5 分間流し続けた。波長は、445 nm, 流速は 1.0 mL/min で行った[18]。

4) LC-MS による解析

試料をメタノールに溶かし、LC-MS(SHIMAZU)による質量分析を APCI 法で行った[18]。

3節 実験結果と考察

標準ルテインの HPLC による分析の結果を Fig.6A に示し、スサビノリ抽出ルテインを HPLC を用いて分析した結果を Fig.6B に示した。標準ルテインと同じの溶出時間のピークと比較し分析を行い、また LC-MS による質量分析を行った。結果は、HPLC では、標準ルテインと同時間にピークがみられたことから高い純度のルテインを抽出することができた。また、LC-MS による質量分析では、M/Z=551([M+H]⁺)が検出され、ルテインの分子量と一致した[18]。スサビノリ粉末 61.1 g からルテイン結晶 1.1 mg を精製したことから、第 2 章の方法で抽出したルテインよりも 1.5 倍精製率が多いことが明らかになった。今後は、結晶化による方法を用いて抽出を行なった。

第4章 細胞壁分解酵素におけるスサビノリからのルテインの精製法の検討

1節 実験目的

本章では、細胞壁分解酵素を用いてスサビノリからのルテインの抽出方法を検討することを目的としている。

2節 実験材料と方法

1)細胞壁分解酵素処理とルテインの結晶化

酵素処理は、50 g スサビノリをミルミキサーを用いて粉末化し、50 mM 酢酸バッファーを(pH 5.0)200 mL 加え、酵素粉末(500 U: β -1.4-mannase, 30 U: β -1.3-xylanase, 30 U: agarase)2.0 g を添加し回転攪拌機(D-79219, IKA)を用いて 37°Cで 2 時間攪拌した。その後、遠心分離(8,000 rpm, 10 分)し、上清を取り除いた。この操作を 3 回行うことで沈殿からルテインを回収し、凍結乾燥(FDU-2000, EYELA)を行った。沈殿を酵素処理画分とした。同様の操作を酵素をない状態で行い無酵素処理画分とした。酵素処理画分・無酵素処理画分をミルミキサーで粉末化し、300 mL のヘキサンを加え 60°Cで 1 時間、回転攪拌機で攪拌した。この溶液をオムニポアフィルターを用いて吸引濾過を行い、濾液をロータリーエバポレーターで乾固した(4回)。700 μ L のプロピレングリコールを加え 55°Cで 30 分間加熱溶解した。そして溶液体積に対して 18%の 45% KOH 水溶液を加え、70°Cを 6 時間攪拌しながらケン化した。この溶液量に対して 10 倍の 70°C超純水を加え、70°Cで 10 分加熱した後に、オムニポアフィルターを用いて吸引濾過を行うことで結晶物質を得た。結晶を 70°Cのヘキサンを加え溶かし、不純物を取り除くためにオムニポアフィルターを用いて吸引濾過を行い、ロータリーエバポレーターを用いて乾固し得た。再結晶化は 100 μ L の 1%トリエチルアミン/ジクロロメタン溶液と 100 μ L のヘキサンを加えて攪拌し、-20°Cで 3 時間し再結晶を得た。0°Cの冷ヘキサンを数滴加え、遠心分離(3,500 rpm, 10 分)を行い、沈殿 0°Cの冷ヘキサンを加えて再び遠心分離(3,500 rpm, 10 分)で結晶を得た(3回)[16, 17]。

2) 抽出ルテイン結晶の HPLC による分析

結晶化した抽出ルテインを HPLC(ODS カラム: Wako Navi C₃₀-5, ϕ 4.6 \times 250 mm)を用いて分析を行った。アセトニトリル/メタノール=50 : 50 で平衡化した ODS カラムに同溶液で溶解した標準ルテインを 5 μ g アプライした(波長: 220 nm, 流速: 1.0 mL/min)。

上記の分析で得られた溶出時間を基に、酵素処理、無酵素処理抽出ルテインの分析を行った。各サンプルにアセトニトリル/メタノール=50 : 50 を加えて(10

μg)アプライした。サンプルをアセトニトリル/メタノール=50:50で60分間流した(波長: 220 nm, 流速: 1.0 mL/min)[19]。

3節 実験結果と考察

HPLCによる標準ルテイン分析の結果を Fig.7A に示し、酵素処理及び無酵素処理したスサビノリ抽出ルテインを HPLC 分析した結果を Fig7B,C に示した。標準ルテインと同溶出時間のピークと比較し、分析を行った。50 g スサビノリ粉末から細胞壁分解酵素で処理ではルテイン結晶 2.2 mg を精製し、無酵素処理では、50 g からルテイン結晶 0.3 mg を精製した。以上のことから細胞壁分解酵素で処理することで、ルテインの収量を増加させることが明らかになった。

第5章 光障害ラットにおける抽出ルテイン硝子体投与の網膜保護効果の検討

1節 実験目的

光障害を受けると網膜視細胞が存在する外顆粒層でアポトーシスが引き起こされ、軸索が存在する外側部が委縮し、視機能が低下する。本章では、光障害モデルラットを用いてスサビノリ抽出ルテインの硝子体投与が網膜を保護するかを検討した。

2節 実験材料および方法

1)抽出ルテインの調整

第2章でスサビノリから抽出したルテインにジメチルスルホキシド(DMSO, Wako)を加え 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整した。

2)動物

雄性ラット (SD, 6 週齢, 日本 SLC)を 12 時間の明暗サイクル (8:00-20:00 点灯)のもと, 温度 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ で飼育した。実験餌(MF)および水は自由摂取させた。

3)PreERG の測定

ERG 測定 6 時間前に暗室において暗順応をさせた。この時, 温度 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ で飼育し, 実験試料 (MF)および水は自由摂取させた。ERG 測定 1 時間前に赤色灯下でラットの両眼に散瞳剤(アトロピン点眼液 1%, 日本点眼薬研究所)を点眼した。ERG 測定では, 赤色光下でラットをケタミン・キシラジン混合液 (8:2)を 0.5 mL 腹腔内注射し麻酔をかけ, 0.4% 塩酸オキシブプロカイン (ベノキシール点眼薬, 参天製薬)にて角膜表面麻酔後, 額電極, 皮膚電極, ラット用白色 LED コンタクト電極を眼に装着し, 白色 LED 電極装置 (トーマー)にて刺激した。ERG はアナログトランジェント解析装置 (日本光電)にて記録され, それをポラロイドカメラにて撮影した。

4)ラットのスサビノリ抽出ルテイン硝子体内注入と光障害モデルの作成

ラットにケタミン・キシラジン混合液 (8:2)を 0.4 mL 腹腔内注射し麻酔をかけた。0.4% 塩酸オキシブプロカイン(ベノキシール点眼薬)を点眼し眼表面麻酔を行った。硝子体内注入は 26G 針付ハミルトンマイクロシリンジを用い, 眼球上部結膜側から針先を水晶体に当たらないように刺入した。なお挿入は目視で確認しながら行った。右眼には抽出ルテイン/PBS(pH 7.4)=1 : 9 の溶液を 1 μL (10 μg : ルテイン)を硝子体に注入した。ルテインを注入したら 5 秒間静置し眼球内に循環させ, その後針先を抜いた。左眼には DMSO/PBS=1 : 9 の溶液 1 μL を同様に硝子体内注入した。

同日、硝子体投与したラットを一晩暗順応し、瞳孔散動によって、眼内光照射を増大させるため光照射 1 時間前に赤色灯下でラットの両眼に散瞳剤(アトロピン点眼液 1%)を点眼した。動物用光障害実験装置(メイヨー)を用いて、3,000 lux で 24 時間光障害を行った。実験餌 (MF)・水は自由摂取とした。ラットは 24 時間後に動物用光障害実験装置から出し、通常通り飼育した[12]。

5) post ERG の測定

第 2 章 3 節 2)と同じ方法を光障害処置 6 日後に行った。

6)眼球の摘出、網膜組織の固定

ラットはエーテルで麻酔後に屠殺した。眼球をピンセットで固定しながら結膜を切り、眼球を持ちあげ、視神経を残して眼球を摘出した。眼球は生理食塩水で洗浄後、ただちに固定液 [1% グルタルアルデヒド+4% ホルマリン含有リン酸緩衝液(PB), pH 7.4]に入れ眼球表面を軽く固定した。30 分後に眼球の角膜部に 23G 針で穴をあけ、房水に固定液を流し込んだ。この状態で一晩固定し、10% ホルマリン含有 PB (pH 7.4)を用いて 24 時間以上固定した。

7)網膜切片の作成

ラット眼を固定後、眼球の結膜部に沿って切り、角膜と水晶体を除去し eye cup を得た。eye cup を 70% エタノール液に 1 時間浸し、視神経から水平方向に墨入れをし、80%, 90%, 99% エタノール液に各々1 時間し、100% エタノール液で一晩完全に脱水を行った。その後、キシレンで 30 分間の透徹を行い、67°Cに加熱したパラフィンに浸し置換を 1 時間行った。その後ヒストセンター3 包埋モジュール (テルモ)にてパラフィンプロックを作成し、マイクロトーム (Yamato)にて視神経を通る厚さ 14 μm の垂直切片を得た。

8) 網膜切片のヘマトキシリン・エオシン染色 (HE 染色) と TUNEL 法

網膜切片をリモネンに 5 分×2 回浸し、100% エタノール液 10 秒間×2 回、95%, 70% エタノール液 10 秒間の順に水和を行った。流水にて 10 秒洗浄後、ヘマトキシリン液 (0.1% ヘマトキシリン, 5% 硫酸アルミニウムアンモニウムミョウバン, 0.21777% ヨウ素酸, 3% 酢酸)に 3 分間浸した。流水にて 15 分間洗浄後、95% エタノール液に 10 秒間浸し、エオシン液 (0.1% エオシン Y, 0.01% フロキシシン B, 74% エタノール, 0.5% 氷酢酸)に 2 分間浸した。100% エタノール液 10 秒間×3 回浸し余分なエオシン液を除去後、リモネンに 5 分間×3 回浸し、最後にマリノールにて封入した。

TUNEL 法は DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega)を使用した。

6)で作成した網膜切片をキシレン(5分×2回)静置し脱パラフィンを行った。次に100%エタノール溶液に5分静置し、95%、85%、70%、50%エタノール溶液に3分ずつ静置し水和させた。生理食塩水に5分静置後、ホワイトマーカでサンプルの周りを囲った。そしてPBS(pH 7.4)に5分静置した後、4%パラホルムアルデヒドを20 $\mu\text{l}/\text{sample}$ のせ15分間組織の固定を行った。PBS(5分×2回)静置洗浄し、Proteinase K (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を20 $\mu\text{l}/\text{sample}$ 添加し組織浸透化を10分間行った。PBSで5分間静置し、4%パラホルムアルデヒドを20 $\mu\text{l}/\text{sample}$ に入れ組織の再固定を5分間行った。次にPBSで5分間静置し、Equilibration Bufferを20 $\mu\text{l}/\text{sample}$ のせ組織の平衡化(10分間)を行った。rTdT溶液(Equilibration Buffer 22.5 μl , Nucleotide Mix 2.5 μl , rTdT Enzyme 0.5 μl)を25 $\mu\text{l}/\text{sample}$ のせ、遮光下の湿式チェンバーに入れ37°C、60分間インキュベートした。遮光下で2×SSCを20 $\mu\text{l}/\text{sample}$ で室温で15分間反応の停止を行い、PBS(5分×3回)洗浄した。Propidium iodide(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)溶液を20 $\mu\text{l}/\text{sample}$ を用いて染色を行い、超純水(15分×3回)で静置し洗浄した。Anti-Fade solution (Invitrogen)を1滴落とし、スライドガラスをマウントし蛍光顕微鏡で観察した。

3節 実験結果と考察

ラット光障害モデルにおけるルテインの硝子体投与の影響

ラット光障害(3,000 lux, 24時間)によるERGの変化をFig.8Aに示す。PreERGで網膜電位は正常時であるが、コントロール群において光障害6日後ではERG波形が減退し、電位の消失が確認できた。一方、ルテイン群(10 μg)ではコントロール群と比べERG波形の保護が確認できた。このERGのAmplitudeの変化をFig.8Bに示す。コントロール群のRod波においてPostERGはPreERGと比べ $32.3 \pm 7.1\%$ にまで低下していることから光障害による影響が確認できた。しかし、ルテイン群においては $47.4 \pm 9.8\%*$ と有意に減少を抑えた(* $p < 0.05$, t -test)。ERGのImplicit Timeの変化をFig.8Cに示す。障害を受けるとImplicit Timeは長くなるとされているが、Rod波においてコントロール群では $135 \pm 5.5\%$ 、ルテイン群では $132 \pm 7.7\%$ であり、コントロール群とルテイン群に差は有意にはみられなかったが、Implicit Timeの増加減少傾向があると確認できた[13]。以上のことより、光障害による網膜視細胞の幹体細胞への損傷がERGのAmplitudeとImplicit Timeの電位消失・潜時の遅延という形で確認できた。また、ルテイン硝子体投与には視細胞保護の効果あると考えられる。

光障害による網膜障害を評価するため、HE染色により網膜組織学的観察を行った結果をFig.9A,Bに示す。光障害は、酸化しやすい高級不飽和脂肪酸を多く含む視細胞の外側部から損傷を受け、委縮が起こると考えられている[14, 15]。

今回は視細胞内節・外節部の厚さをコントロール群とルテイン群で比較することにより光障害による影響を評価した。コントロール群が $11.7 \pm 1.9 \mu\text{m}$, ルテイン群では、 $16.0 \pm 1.1 \mu\text{m}^{**}$ と光障害に伴う外側部の委縮を有意に抑制していた($**p < 0.01$, t -test)。光障害による細胞内節・外節部の委縮を抑制したことから、ルテイン硝子体投与には視細胞保護の効果あると考えられる。また、光障害による酸化ストレスは、視細胞の核が存在する外顆粒層内へと損傷していきアポトーシスを引き起こす[14, 15]。そのため、光障害による網膜外顆粒層中のアポトーシス細胞を評価するため、TUNEL 法により網膜組織学的観察を行った結果を Fig.10A,B に示す。網膜外顆粒層のアポトーシス細胞を TUNEL 法を用いて検査した。コントロール群が $14.3 \pm 3.6\%$, ルテイン群では $9.2 \pm 3.3\%^{*}$ と光障害に伴う外顆粒層でのアポトーシスを有意に抑制していた($*p < 0.05$, t -test)。以上のことより,光障害による網膜外顆粒層でのアポトーシスを抑制したことから、ルテイン硝子体投与には桿体・錐体細胞保護の効果あると考えられる。

第 6 章 光障害モデルラット硝子体投与の抽出ルテイン濃度変化による保護効果の検討

1 節 実験目的

本実験で、スサビノリの抽出ルテイン 10 μg の硝子体投与で保護効果がみられた。その他濃度における検証は行っていない。本章では、光障害モデルラットを用いて硝子体投与におけるスサビノリ抽出ルテイン濃度変化による網膜保護の検討を行った。

2 節 実験材料および方法

1)抽出ルテインの調整

第 3 章でスサビノリから抽出したルテインに DMSO を加え 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整した。

2)動物

第 3 章 1 項と同様である。

3)スサビノリ抽出ルテイン硝子体内注入

右眼に 1 μL の抽出ルテイン溶液(100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) : PBS = 1 : 9 の溶液を硝子体注入した。注入後 5 秒ほど静置し、針先を抜いた。左眼には DMSO/PBS=1 : 9 の溶液 1 μL を同様の操作で硝子体内注入した。

4)ラット光障害モデルの作成

第 3 章 2 節 4)と同じ方法

5)眼球の摘出，網膜組織の固定

第 3 章 2 節 7)と同じ方法を光障害処置 7 日後に行った。

6)網膜切片の作成

第 3 章 2 節 8)と同じ方法

7) 網膜切片のヘマトキシリン・エオシン染色 (HE 染色)

第 3 章 2 節 9)と同じ方法

8)網膜切片の TUNEL 法

第 3 章 2 節 9)と同じ方法

3節 実験結果と考察

ラット光障害(3,000 lux, 24時間)による網膜障害を評価するため, HE 染色により網膜組織学的検討を行った結果を Fig.11A,B に示す。コントロール群 $9.4 \pm 0.6 \mu\text{m}$, 10 μg ルテイン群 $13.4 \pm 0.9 \mu\text{m}^{**}$, 1 μg ルテイン群 $9.6 \pm 1.2 \mu\text{m}$, 0.1 μg ルテイン群 $10.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$ でありコントロール群と 10 μg ルテイン群との間で有意な差がみられた($**p < 0.01$, Mann-Whitney *U*test)。

以上のことより, 10 μg ルテインの硝子体内投与で光障害による細胞内節・外節部の委縮を抑制したことから, 10 μg ルテイン硝子体投与には視細胞(桿体・錐体細胞)保護効果があると考えられる。

ラット光障害モデルによる外顆粒層中(桿体・錐体細胞)のアポトーシス数を評価するため, TUNEL 法により網膜組織学的観察を行った結果を Fig.12,13 に示す。網膜外顆粒層のアポトーシス陽性細胞を TUNEL 法でコントロール群 $2.6 \pm 0.3\%$, 10 μg ルテイン群 $0.8 \pm 0.4\%^*$, 1 μg ルテイン群 $1.2 \pm 0.4\%^*$, 0.1 μg ルテイン群 $1.8 \pm 0.4\%$ であった($*p < 0.05$, Mann-Whitney *U*test)。コントロール群と 10 μg , 1 μg ルテイン群間で有意な差がみられた。

以上のことより, 光障害による外顆粒層でのアポトーシスを 10 μg , 1 μg ルテインの硝子体内投与で抑制したことから, ルテイン硝子体投与には 10 μg , 1 μg ルテインで視細胞保護の効果あると考えられる。

第7章 総合考察

1. スサビノリからのルテインの精製

ルテインは、多くの緑黄色野菜および果実の主成分の一つである。しかし純粋なルテインの精製にこれら試料を用いた場合、大量存在する他のカロテノイドからの単離に多くの作業工程を必要とするため、時間がかかり経済的ではないため、ルテイン源の探索する必要がある。本研究では、近年問題となっているスサビノリ廃棄物に着目した。スサビノリには、ルテイン以外のカロテノイドをあまり含まないため、良質なルテイン源になりうることが期待される[9]。そこで、本実験ではスサビノリからのルテインの抽出法の検討を行った。

一般的にカロテノイド精製には、ケン化処理による抽出が行われている。そこで、第2章で行ったルテインの抽出には、ケン化による精製を行った。結果は、カロテンやその他物質含んでいたため、順相オープンカラムやHPLCによる精製が必要とされた。これは、ルテインの抽出効率向上を目的にスサビノリをボールミルにより微小化を行ったため、ルテイン以外のカロテノイドの抽出効率も同様に増加したからであると考えられる。また抽出には、生体に有害なアセトンを使用しているため、有機溶媒残留の危険性が考えられる。そのため抽出法と使用する有機溶媒の検討が必要であると考えられる。

第3章で行ったルテインの抽出には、アセトンなどの有機溶媒を使用せず比較的有害でないヘキサンを使用した。第2章同様にケン化による抽出方法であるが、適切な温度と溶媒でケン化することでルテインの結晶化を行った。この結晶は、HPLCやLC-MSで分析した結果高い純度のルテインであった。また、第2章で抽出したルテインと比較し約1.5倍の抽出量の増加が確認できた。

第4章で行ったルテインの抽出には、前処理として細胞壁分解酵素処理を行い第3章と同様に結晶化による方法でルテイン抽出を行った。酵素処理したスサビノリからのルテイン抽出量は、無酵素処理の抽出量を比較したとき約7倍抽出量が高かった。

以上のことから、スサビノリからのルテイン抽出には、結晶化による方法が抽出効率の高いことが証明された。また作業工程を減らし高い水準のルテインを精製できることが明らかになった。さらに細胞壁分解酵素の前処理を行うことで、抽出効率が上がることが示唆された。今後は実際に産業廃棄物スサビノリで同様の抽出法を行えるかを検討する。そして、商業的な大量精製を視野に入れた細胞壁分解酵素を用いたルテインの抽出方法を探索する必要がある。

2. 光障害におけるスサビノリ抽出ルテインの硝子体投与

ルテインは、黄斑の視細胞外側部に多く存在し、最大吸収波長が 450 nm であることから、450 nm 前後の青色光を吸収すると考えられている[20]。また *in vitro* において、過酸化脂質による視細胞への酸化ストレスを低減する報告されており高い抗酸化作用を持っていることが分かっている[8]。このことから、光障害から網膜の保護作用が期待され、近年では、*in vivo* でもルテイン摂取は、光障害の活性酸素増加による損傷から網膜を保護することが明らかになっている[21]。しかし、光障害においてルテインの硝子体内投与による投与の効果は、明らかにされていない。本実験では、スサビノリから抽出したルテインの硝子体投与において光障害モデルラットの網膜保護効果を検討した。

スサビノリから抽出したルテインをラット眼球(硝子体内)投与し、光照射(3,000 Lux, 24 時間)を行い光障害モデル作製し、ルテインの網膜保護効果を検討した。光障害を受けると網膜組織において活性酸素種が増加し、視細胞の核で構成されている外顆粒層中でアポトーシスが引き起こされることが知られている[21]。そして、アポトーシスによって、視細胞の軸索で構成される視細胞外側部が委縮し視機能が低下する。本実験でも RodERG での Amplitude の電位消失と Implicit Time の潜時遅延が光障害による視機能低下を示し、網膜切片でも桿体・錐体細胞のアポトーシスとそれに伴う外側部の委縮が確認できた。ルテインの硝子体投与は、RodERG の Amplitude がコントロール群で減少しているのに対して、ルテイン群(10 µg)ではコントロール群と比べ減少が抑制されていることが確認された。また、網膜切片で光障害による網膜外顆粒層中のアポトーシス増加は、コントロール群に対してルテイン群(10 µg)は、増加を減少させた。光障害に伴う桿体・錐体細胞外側部の委縮は、コントロール群に対してルテイン群(10 µg)で委縮を抑制した。以上のことから、ルテインの硝子体投与は、光障害による網膜視細胞の機能低下や損傷を抑制し、視細胞を保護したことが明らかになった。

硝子体内投与でルテインは、硝子体内で拡散による移動により網膜軸索付近に運ばれ、網膜組織で血液網膜関門を細胞膜の脂質層を介した受動輸送により網膜血管に吸収され網膜中で代謝されたと考えられる[7, 22]。光障害は、光照射時に発生する活性酸素が網膜の視細胞外側に含まれる不飽和脂肪酸をラジカル化し、脂肪が連鎖的に過酸化させて生体膜の破壊、DNA への損傷がおこることでアポトーシスを引き起こし視細胞が変性させると予想されている[15]。特に光感受に関与するタンパク質のロドプシンを多く含む桿体細胞体において損傷が高いことが報告されている[23]。ルテインには、光感受時に視細胞でロドプシンと結合するタンパク質オプシンの発現を促進する効果があることが分かっている[8]。本実験でも、桿体細胞由来の RodERG の Amplitude で保護効果が確

認できたことから、視細胞の特に桿体細胞の機能性保護にルテインが関与している可能性があると考えられる。また、光障害による視細胞核のアポトーシスは、光照射による活性酸素種(スーパーオキシド, 一酸化窒素)の産生やミトコンドリアの NO 合成酵素の活性化により細胞内カルシウムが増加した為に引き起こされるものと考えられている[24, 25]。本実験では、視細胞核でのアポトーシスの指標である DNA 断片化を減少させアポトーシスを抑制した。また他の研究チームでの、*In vivo*での実験でルテイン摂取が視細胞の DNA 二本鎖切断にもなって誘発される、ヒストン-H2 タンパクのリン酸化を抑制すると分かっており、*In vitro*の実験においても過酸化ストレスからアポトーシスを抑制し、視細胞軸索を保護したと報告されている[8, 21]。これは、ルテインにアポトーシス促進シグナルであるミトコンドリアのシトクロム C の遊離を引き起こす活性酸素のペルオキシナイトライトを減少させる作用が確認されていることから、このアポトーシス経路に作用しているのではないかと考えられる[25-29]。これらのことからルテインが光障害での視細胞層の活性酸素種増加によるアポトーシス増加を抑えることでアポトーシスを減少させ、視細胞である桿体・錐体細胞を保護したと考えられる。

ルテイン濃度は 10 μg , 1 μg において桿体・錐体細胞のアポトーシス抑制効果がみられ、視細胞外側部の委縮に対しては、ルテイン濃度 10 μg でしか保護効果が認められなかった。これは、光障害では、視細胞の中でも軸索である外側部は、過酸化脂質量が視細胞の中でも特異的に多く存在することが報告されている[21]。そのため、10 μg のルテイン投与でしか視細胞外側部の活性酸素種への効果が得られなかったと考えられる。このことから、ルテイン濃度 1 μg では、視細胞のアポトーシスを抑制することが出来るが、アポトーシスによる外側部の委縮を抑制するに至らなかったことが明らかになった。

以上のことから、スサビノリ抽出ルテインの硝子体内投与が、光障害モデルラットでの網膜を保護することが明らかとなった。今後は、本研究で用いたルテイン濃度よりも高い濃度で光障害による保護効果を検討し、*in vitro*において網膜細胞におけるルテインの作用機序を解明する必要があると考えられる。

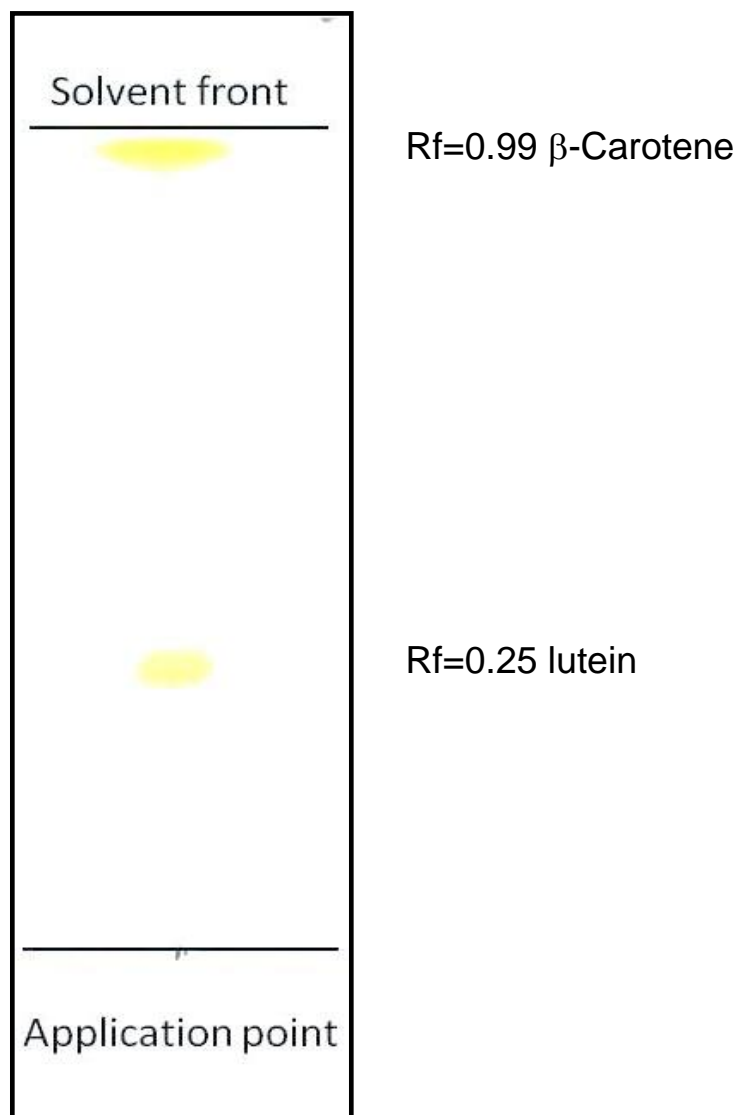


Fig.4 TLC of sample.

Conditions: TLC plate silica gel 60
Solvent : 25% Acetone/Hexane

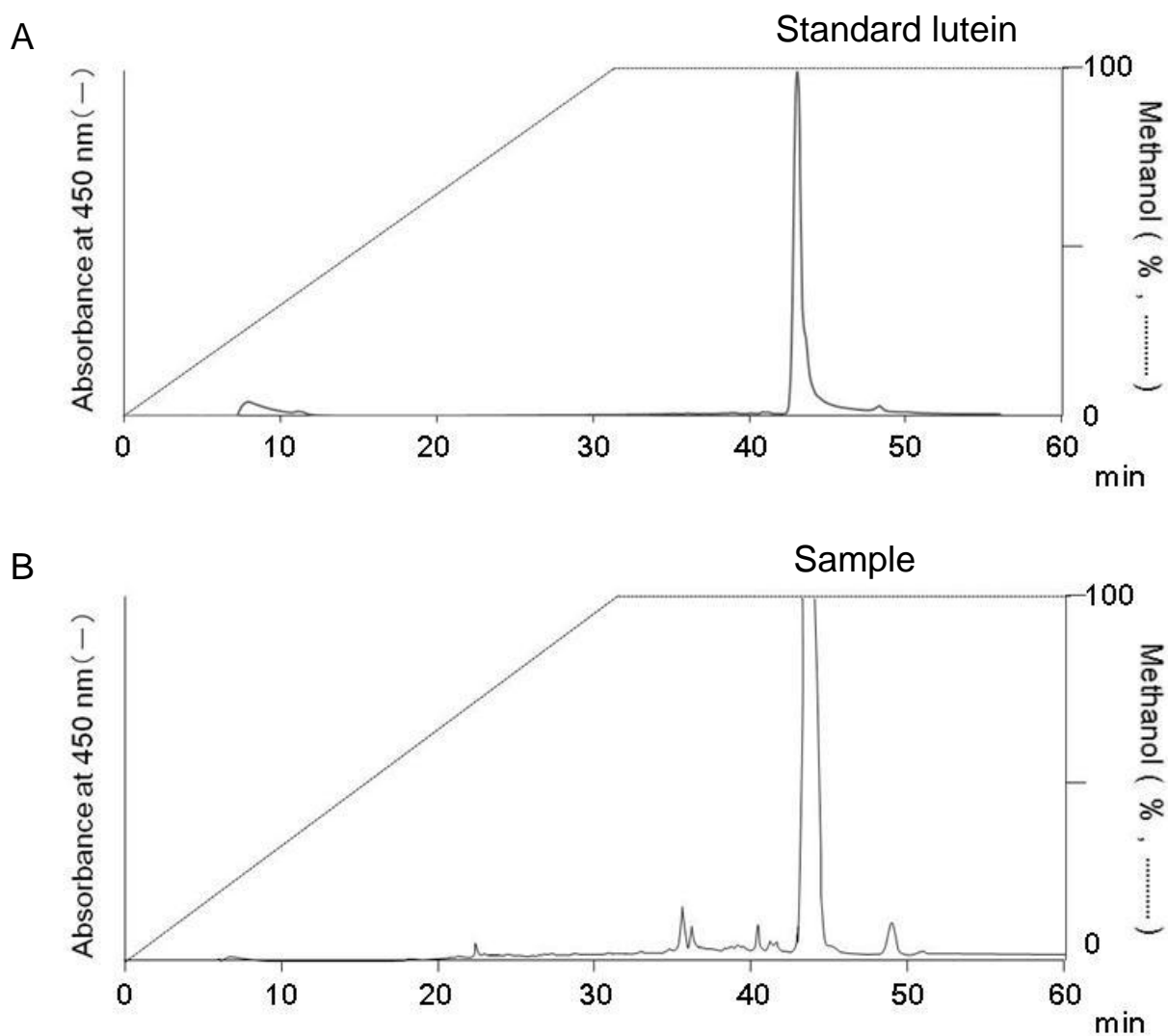


Fig.5 Refining of lutein by an C₁₈-column.

Column : Cosmosil 5C₁₈-AR, Φ 4.6 mm×150 mm
 Flow rate : 0.5 mL/min
 Wavelength : 450 nm
 Solvent : A-Water, B-Methanol
 Gradient : Methanol 0-100%; 0-30 min

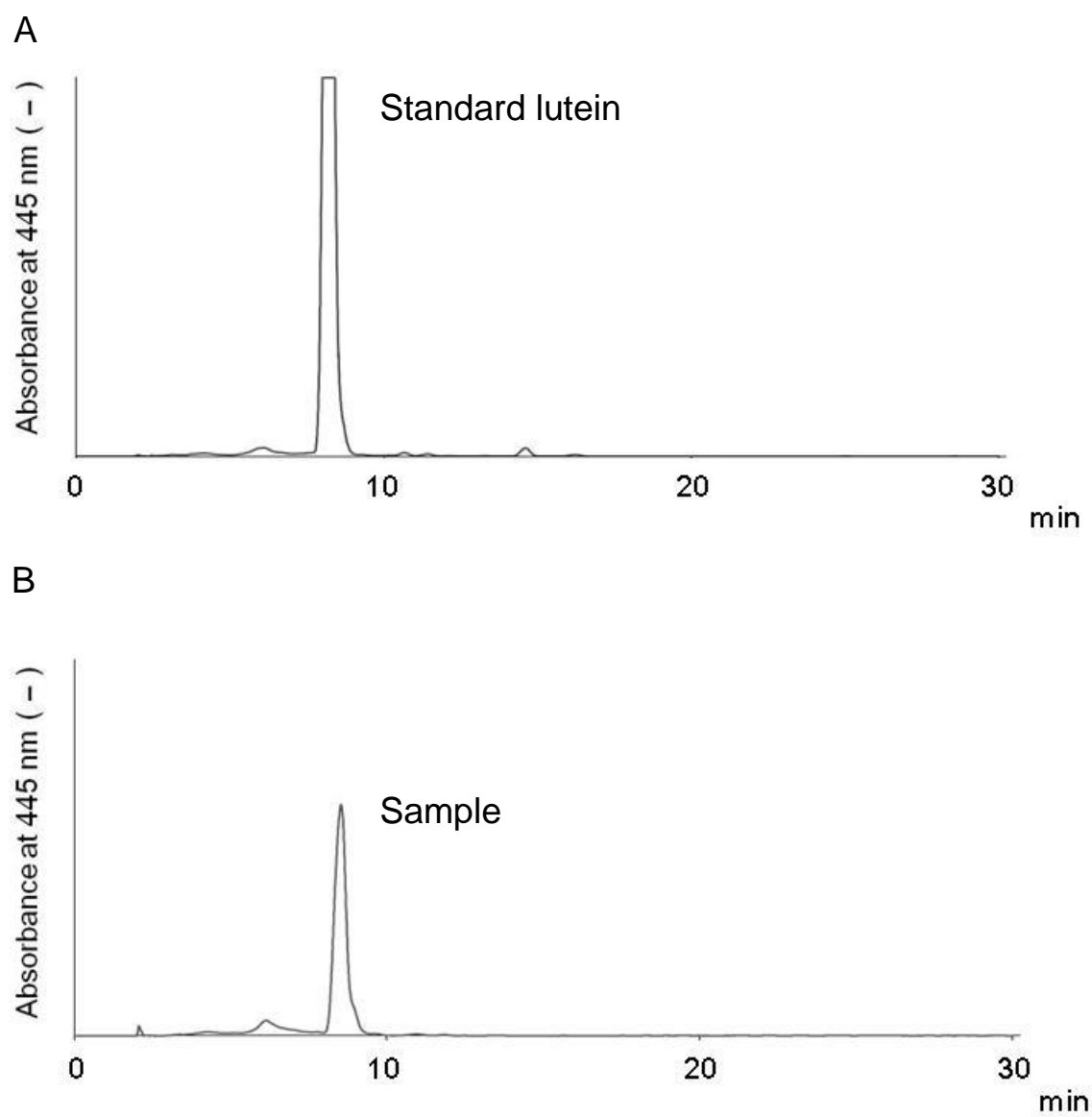


Fig.6 Analyzing of lutein by C₃₀-column.

HPLC chromatograms of Standard lutein (A) and sample (B).

Column : Wako-naveC₃₀-5, Φ 4.6 mm×250 mm

Flow rate : 1.0 mL/min

Wavelength : 445 nm

Solvent : A-Water, B-Acetone

Gradient : Acetone 86-97%; 0-21 min, 97-100%; 21-25 min

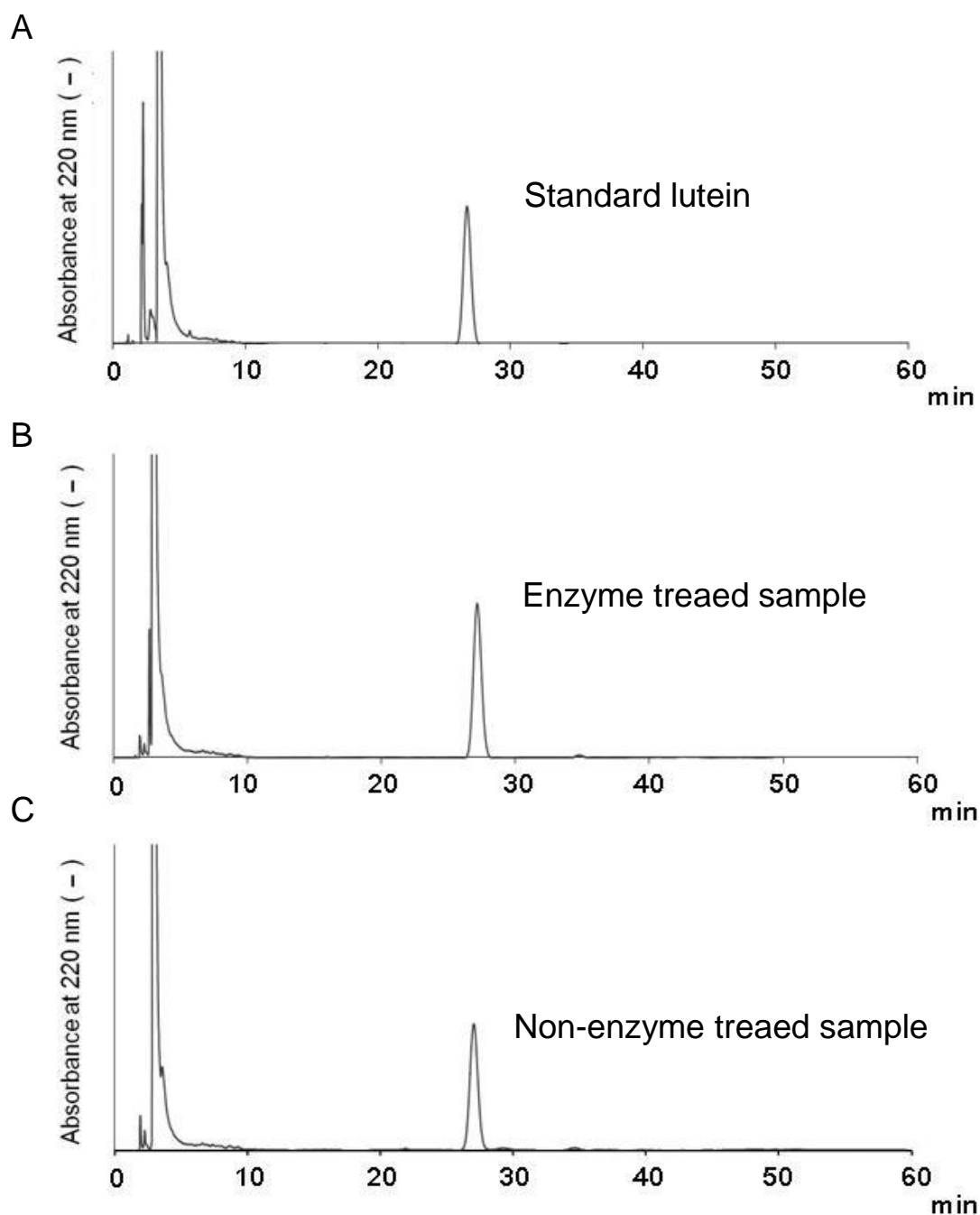


Fig.7 Analyzing of Lutein by C₃₀-column.

HPLC chromatograms of standard Lutein (A) and enzyme treated sample (B), non-enzyme treated sample (C).

Column : Wako-naveC₃₀-5, Φ 4.6 mm \times 250 mm

Flow rate : 1.0 mL/min

Wavelength : 220 nm

Solvent : A-Methanol, B-Acetonitrile

Isocratic : 50% Methanol/Acetonitrile: 60 min

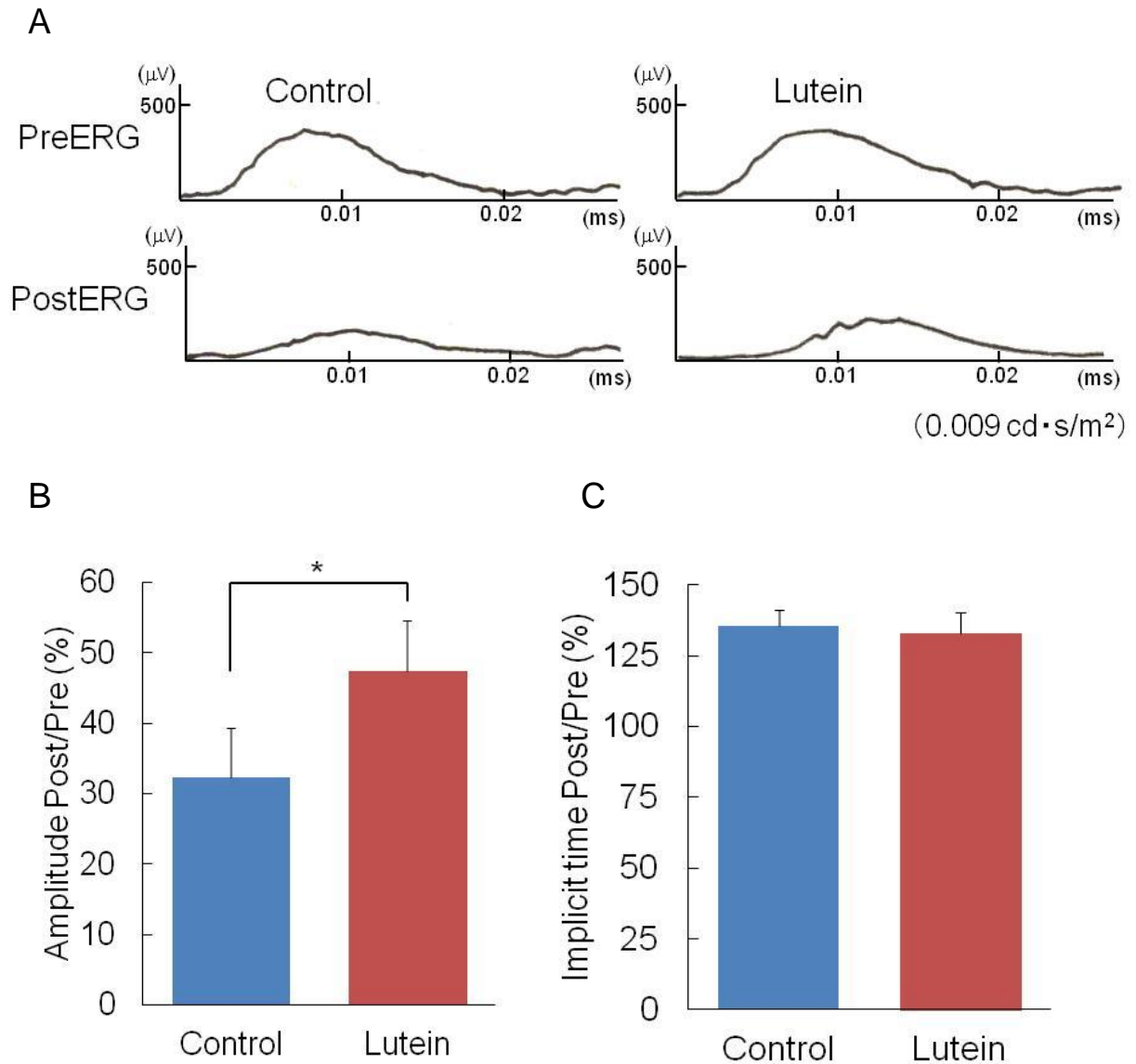


Fig.8 Protection effect of lutein on RodERG in light exposure.

RodERG of control and lutein measured before and after light exposure (A). PreERG: six days before light exposure. PostERG: six days after light exposure. The effect of lutein to amplitude or implicit time of RodERG was compared before and after light exposure (B-C). Control: DMSO-injected eyes (n=6), Lutein: 10 μg lutein/DMSO-injected eyes (n=6), Values are mean \pm S.E. * <0.05 , *t*-test.

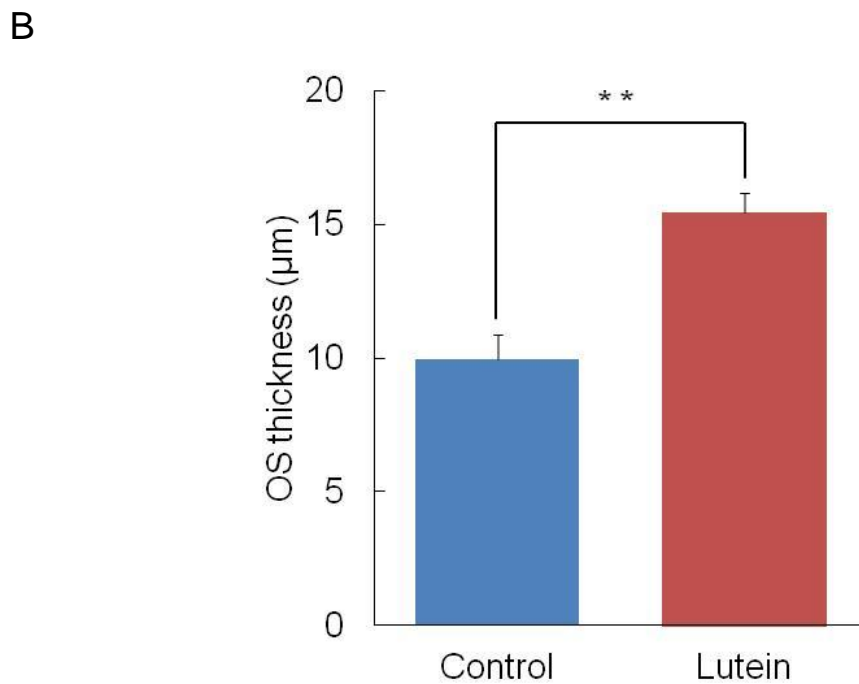
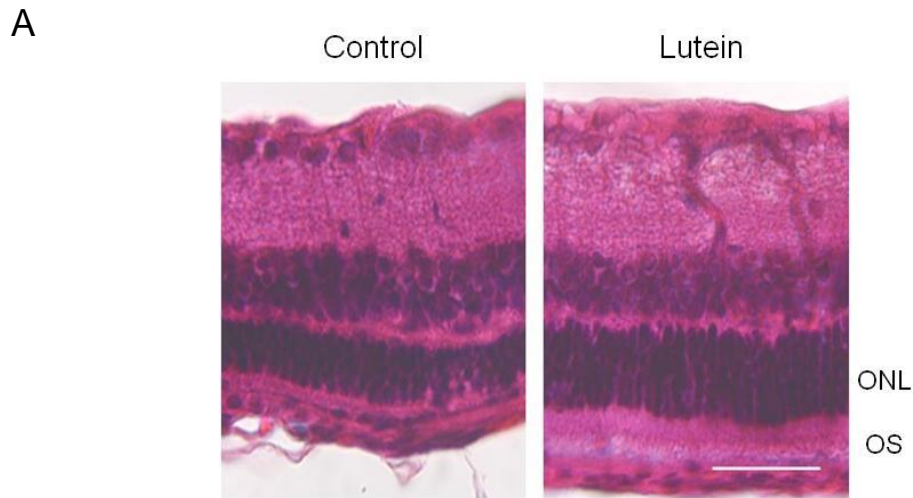


Fig.9 Protection effect of lutein on OS thickness in light exposure. OS thickness of control and lutein measured at seven days after light exposure (A). ONL: outer nuclear layer. OS: outer segment. The reduction in OS thickness measured control and lutein at seven days after light exposure (B). Control: DMSO-injected eyes (n=6), Lutein: 10 µg Lutein/DMSO-injected eyes (n=6), Values are mean ± S.E. ** $p < 0.01$, t -test. Scale bar 40 µm.

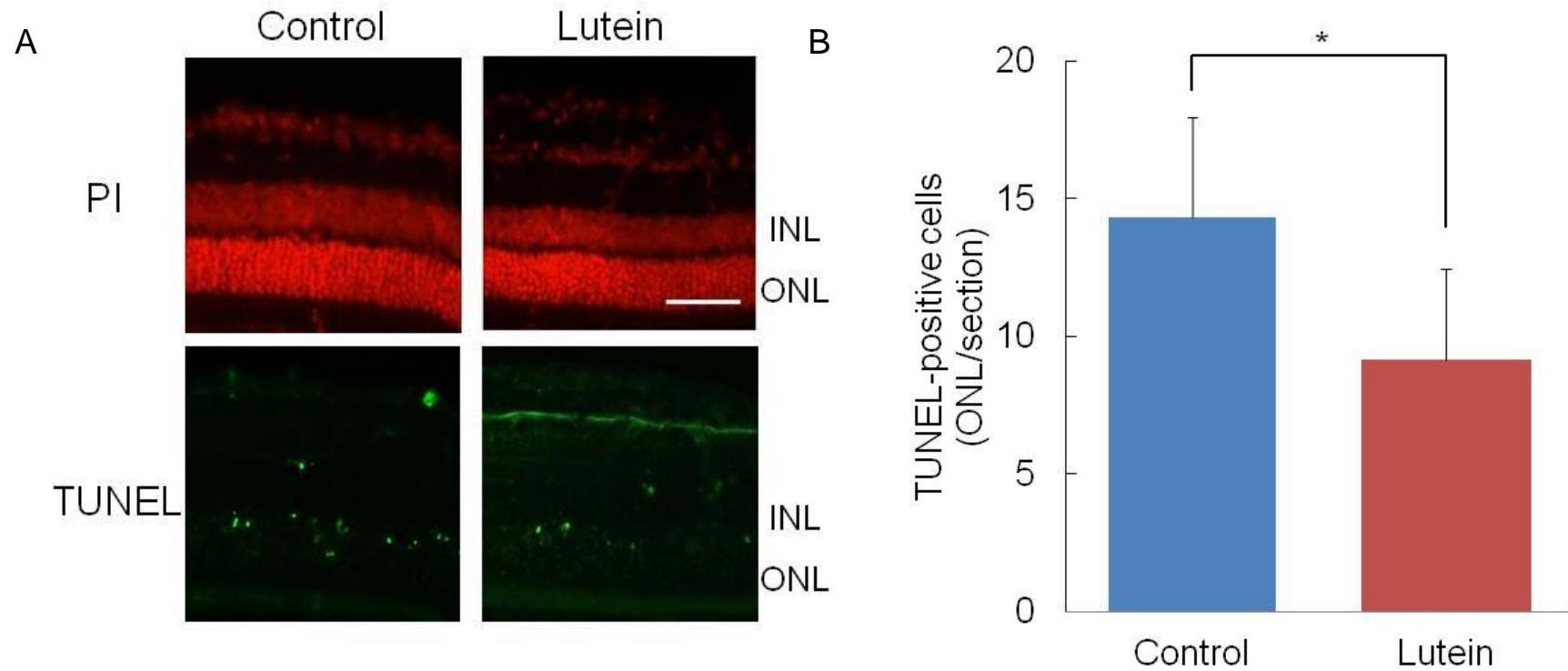
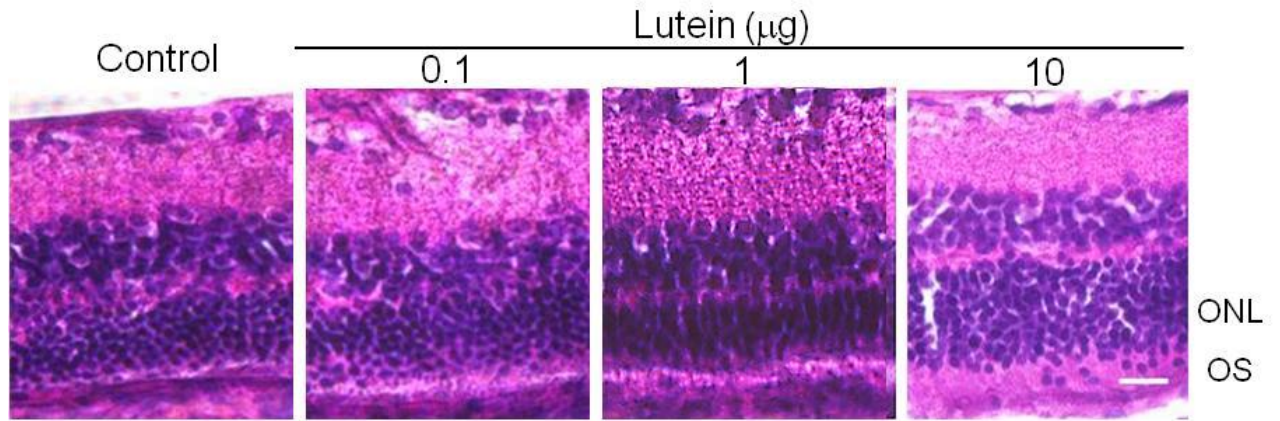


Fig.10 Protection effect of lutein on ONL cells death in light exposure.

ONL of control and lutein measured at seven days after light exposure by TUNEL assay (A). INL: inner nuclear layer. ONL: outer nuclear layer. Number of TUNEL-positive cells in ONL/section measured control and lutein at seven days after light exposure (B). Control: DMSO-injected eyes (n=6), Lutein: 10 μ g lutein/DMSO-injected eyes (n=6). Values are mean \pm S.E. * p <0.05, t -test. Scale bar 30 μ m.

A



B

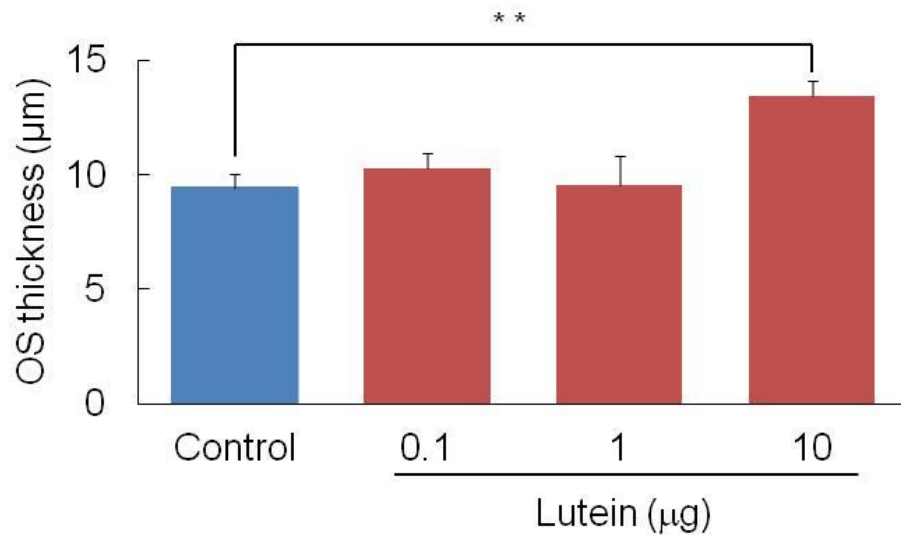


Fig.11 Protection effect of lutein on OS thickness in light exposure.

OS thickness of control and lutein measured at seven days after light exposure (A) . ONL: outer nuclear layer. OS: outer segment. The reduction in OS thickness measured control and lutein at seven days after light exposure (B). Control:DMSO-injected eyes (n=16), Lutein: 0.1 μg, 1 μg, 10 μg lutein/DMSO-injected eyes (n=5, 6, 5). Values are mean ±S.E. ** $p < 0.01$, Mann-Whitney *U*-test. Scale bar, 20 μm.

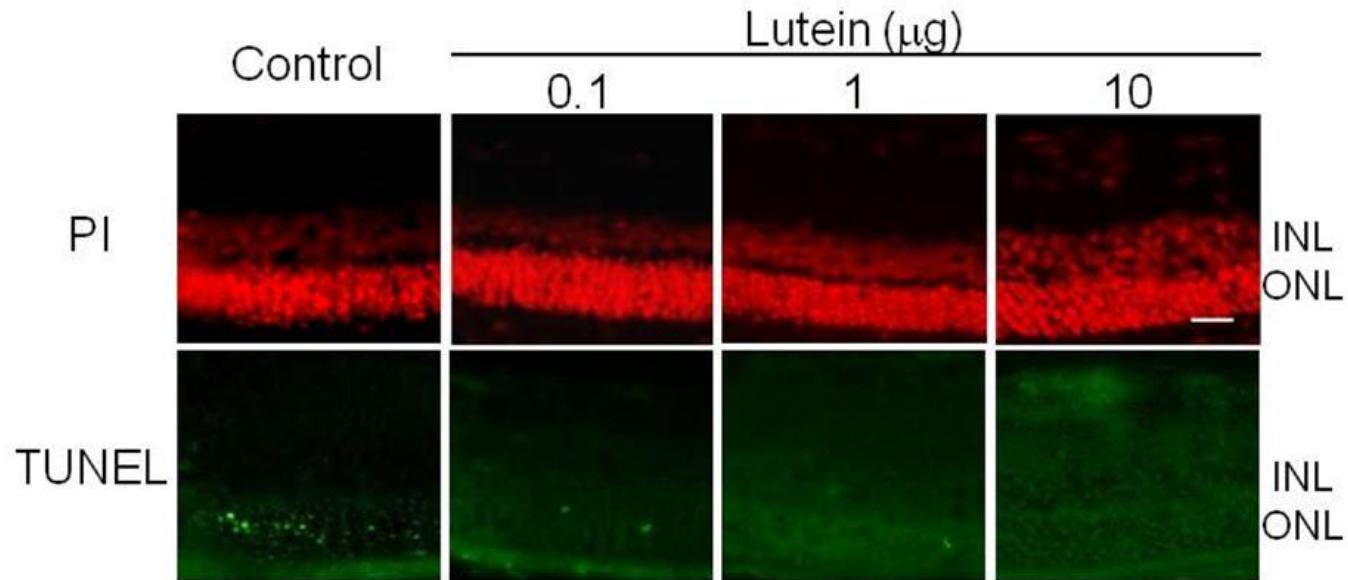


Fig.12 Protection effect of lutein on ONL cells death in light exposure.

ONL of control and lutein measured at seven days after light exposure by TUNEL assay.

INL: inner nuclear layer. ONL: outer nuclear layer. Control: DMSO-injected eye/group (n=16), Lutein: 0.1 μg, 10 μg, 10 μg lutein/DMSO-injected eyes (n=5,6,5). Scale bar, 20 μm.

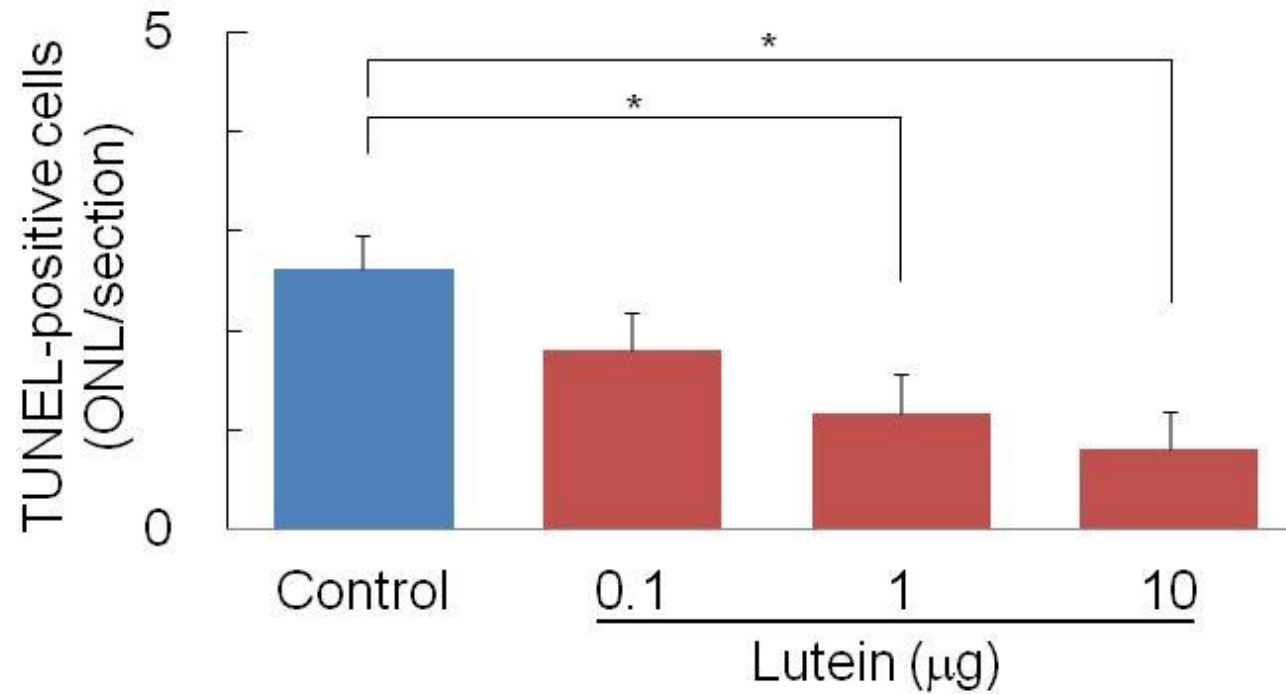


Fig.13. Protection effect of lutein on ONL cells death in light exposure.

Number of TUNEL-positive cells in ONL/section measured control and lutein at seven days after light exposure. ONL: outer nuclear layer. Control: DMSO-injected eyes (n=16), Lutein: 0.1 µg, 1 µg, 10 µg lutein/DMSO-injected eyes (n=5,6,5). Values are mean \pm S.E. * p <0.05, Mann-Whitney *U*-test.

1. 所敬, 吉., 谷原秀信, 現代の眼科学. 金原出版 2009: p. 7-9.
2. 大野重昭, 木., 水流忠彦, 澤口昭一, 標準眼科学. 医学書院, 2007 4p.8-59.
3. 中江公裕, わが国における視覚障害の現状. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 網膜脈絡膜・視神経 委縮症に関する研究:平成 17 年度研究報告, 2006: p. 263-267.
4. 白神史雄, 前., 打倒! 加齢黄斑変性 速報—眼科クリニック IT 化の現状. メジカルビュー社 2005: p. 34-37.
5. Sasaki, M., et al., Biological role of lutein in the light-induced retinal degeneration. *J Nutr Biochem*, 2011.
6. Kakinuma, M., et al., Molecular analysis of physiological responses to changes in nitrogen in a marine macroalga, *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *Cell Biol Toxicol*, 2008. 24(6): p. 629-39.
7. 吉川敏一, 辻智子, *The Doctor,s Compelete Guide To Alternative Medicines*. 講談社, 2004: p. 174-81.
8. Chucair, A.J., et al., Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007. 48(11): p. 5168-77.
9. 千原光雄 and 西澤一俊, 藻類研究法. 共立出版, 1985: p. 474—507.
10. Merete Grung , F.M.L.D.S., Michael Borowitzka , Synnove Liaaen-Jensen, *Algal Carotenoids* 51. Secondary Carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. *Applied Phycology*, 1992. 4: p. 165-171.
11. 強三, 江.幸.馬., 卵黄中の脂溶性ビタミン、カロテノイドの分析. 長崎県衛生公害研究所報, 2003. 49.
12. Ishikawa, F., et al., Prolonged Rhodopsin Phosphorylation in Light-Induced Retinal Degeneration in Rat Models. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006. 47(12): p. 5204-211.
13. V, C., V. K, and S. J, Cone–Rod Dependence in the Rat Retina: Variation with the Rate of Rod Damage. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2009. 50(6): p. 3017-23.
14. Huang, Y., et al., Differential roles of phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway in retinal ganglion cell survival in rats with or without acute ocular hypertension. *Neuroscience*, 2008. 153(1): p. 214-25.
15. 本田孔士, やさしい眼の細胞・分子生物学. 文光堂, 1996.p80-89, 174-81, 252-269
16. オーシックロドニーエル, サンダースディヴィッドジェイ, 植物から食用キサントフィル結晶を製造, 単離及び精製する方法. 公表特許公報, 1999(特許出願番号 11-508603).
17. フレデリック, カチック, ケン化したマリゴールドの含油樹脂からのルテインの単離、精製および再結晶法、およびその使用. 公表特許公報, 1995: p. 特許出願番号 7-2587.

18. Tomá ezanka, J.O.o., Miroslav Sobotka, Karel Sigler, The Use of APCI-MS with HPLC and Other Separation Techniques for Identification of Carotenoids and Related Compounds. *Current Analytical Chemistry*, 2009,. 5: p. 1-25.
19. Müller-Waldeck, F., et al., Determination of toxic perilla ketone, secondary plant metabolites and antioxidative capacity in five *Perilla frutescens* L. varieties. *Food and Chemical Toxicology* 2010. 48: p. 264–270.
20. Junghans, A., H. Sies, and W. Stahl, Macular Pigments Lutein and Zeaxanthin as Blue Light Filters Studied in Liposomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001. 391, No. 2, July 15 p. 160–164.
21. Sasakia, M., et al., Biological role of lutein in the light-induced retinal degeneration. *Nutritional Biochemistry*, 2011: p. 0955-2863.
22. Oguro Y, T.Y., Saito I, Kondo T., Estimation of the permeability of the blood-retinal barrier in normal individuals. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 1985 1985 Jul;26: p. 969-76.
23. Thomson, L.R., et al., Elevated Retinal Zeaxanthin and Prevention of Light-Induced Photoreceptor Cell Death in Quail. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2005. December Vol. 46: p. No. 124796 Copyright ©.
24. Donovan, M., R.J. Carmody, and T. G., Light-induced Photoreceptor Apoptosis in Vivo Requires Neuronal Nitric-oxide Synthase and Guanylate Cyclase Activity and Is Caspase-3-independent. Vol. 276, No. 25, Issue of June 22, pp. 23000–23008, 2001, 2001. Vol. 276, No. 25,(June 22): p. 23000–23008.
25. Ghafourifar, P., et al., Mitochondrial Nitric-oxide Synthase Stimulation Causes Cytochrome c Release from Isolated Mitochondria. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.*, 1999. Vol. 274, No. 44(October 29): p. 31185–31188.
26. Cassina, A.M., et al., Cytochrome c Nitration by Peroxynitrite*. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.*, 2000. 275, No. 28(July 14): p. 21409–21415, 200.
27. Fulda, S., et al., Activation of Mitochondria and Release of Mitochondrial Apoptogenic Factors by Betulinic Acid*. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 1998. 273, No. 51(December 18): p. 33942–33948.
28. Panasenko OM, et al., peroxynitrite with carotenoids in human low density lipoproteins. *Arch Biochem Biophys*, 2000: p. 302-5.
29. Scheidegger, R., et al., The Reaction of Peroxynitrite with Zeaxanthin. *NITRIC OXIDE*, 1998. 2(1): p. 8–16.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始適切なお指導を賜りました、三重大学生物資源学部栄養機能工学研究室の西尾昌洋講師に心よりお礼申し上げます。同時に、研究全般にわたり、ご助言をいただきました、同研究室の梅川逸人教授、及びに水圏生物利用学研究室の荒木利芳教授に深く感謝いたします。また、ERGの測定に協力いただきました、三重大学院医学研究科の宇治幸隆教授に深く感謝いたします。そして、蛍光顕微鏡観察に協力いただきました、三重大学生物資源学部海洋生物化学研究室の柿沼誠准教授に深く感謝いたします。

最後に本研究を温かく見守り、ご協力いただきました、栄養機能工学研究室の皆様にも深く感謝いたします。

要約

【目的】加齢黄斑変性は日本で失明原因の第4位であり、加齢や光障害による眼内の活性酸素種増加が原因である。加齢黄斑変性モデルラットはないが、ラットを光曝露処理することで網膜視細胞等への活性酸素種を増加させアポトーシスを誘発することにより、加齢黄斑変性と近い症状の光障害ラットを作成し、本実験に用いた。

ルテインは、カロテノイドの一種で、活性酸素種の減少効果があり、ラットを用いた経口投与実験では、加齢黄斑変性の治療に有効であることが知られている。一方、養殖スサビノリは生育環境の悪化による色落ち海苔や加工時の屑海苔などが大量に廃棄され問題となっている。

本研究では、光障害モデルラットにおいてスサビノリ抽出ルテイン硝子体内投与の網膜変性に対する抑制作用を検討した。

【方法・結果】スサビノリをエタノール抽出した後、さらにアセトン抽出を行ない、10% KOH/メタノールで24時間ケン化した。酢酸エチルと水を加え二層に分け、酢酸エチル層からオープンカラムとHPLCを用いてルテインを精製した。

SD系雄性ラットのプレ網膜電位図(PreERG)を測定した後、コントロール(DMSO)およびルテイン(10 µg/DMSO)をそれぞれ左右の眼に硝子体内投与をした。次にラットに光照射(3,000 lux)を24時間行い、処置後のポスト網膜電位図(PostERG)を測定した。なお、ERGは全て0.009 cd·s/m²で行った。その結果、Post/Pre ERGにおける振幅は、コントロール群：32.3±7.1%、ルテイン群：47.4±9.8% ($p<0.05$)で有意に減少を抑えた。網膜切片での視細胞外側部の委縮は、コントロール群：11.7±1.9 µm、ルテイン群：16.0±1.1 µm ($p<0.01$)で委縮を有意に抑制していた。またアポトーシス細胞数は、コントロール群：14.3±3.6%、ルテイン群：9.2±3.3% ($p<0.01$)でアポトーシスを有意に抑制していた。

以上のことから、スサビノリ抽出ルテインの硝子体内投与が、光障害モデルラットでの網膜を保護することが明らかとなった。今後、ルテインの硝子体内投与が加齢黄斑症の治療薬として患者や医師に寄与するよう更に研究を進めたい。