



Title	-リゾ型高度不飽和リン脂質の調製及びヒト赤血球変形能改善効果
Author(s)	小野, 雅代; 細川, 雅史; 高橋, 是太郎; 井上, 良計
Citation	脂質生化学研究, 40, 204-206
Issue Date	1998
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/48574
Type	article
File Information	lipids40_204-206.pdf



[Instructions for use](#)

小野雅代, 細川雅史, 高橋是太郎 (北大・水)

井上良計 (備前化成)

Rhizomucor miehei 由来の固定化リパーゼ剤 (リポザイムIM) の水分活性を中間水分活性域に制御することによってDHA強化鶏卵黄リン脂質を部分加水分解し, DHA含量が極めて高い β -リゾ型リン脂質が得られた。この β -リゾ型リン脂質は低濃度で速やかに赤血球に取り込まれ, 赤血球の変形能を改善した。

高度不飽和リン脂質には多彩な生理活性のあることが示唆され始めている。高度不飽和リン脂質は水産物に比較的豊富に含まれてはいるが, 水産物より着臭や着色なしに抽出することは一般に難しい。一方, ドコサヘキサエン酸(DHA)を強化した鶏卵黄リン脂質は, 着臭や着色が殆どないという利点を有しているが, 水産物由来のリン脂質よりもDHA含量が低いという難点があった。

本研究ではこのような点を解決するため, リパーゼによる部分加水分解反応をリン脂質に応用し, リパーゼの脂肪酸選択性を発揮させてDHAを高濃度に含む鶏卵黄リン脂質を調製しようとした。また, これによって得られた β -リゾ型高度不飽和リン脂質のヒト赤血球変形能改善効果について, 人工毛細血管モデル(MC-FAN)を用いて評価した。

実験方法

1. レシチンの部分加水分解

DHA強化 (DHA含有率 10.8%) レシチン (DHA-PL) 及び大豆 PC (soy PC) 20mgを含むヘキサン溶液 2mlに, あらかじめ水分活性を調整したリポザイムIM 53mgを加え, 40°C 75strokes/minで部分加水分解反応を行った。反応後, Sep-pakシリカカートリッジを用いてリン脂質画分を回収し, TLCにより脂質組成, GLCによってDHA含有率を求めた。加水分解率(%)は, GLC分析の際に内部標準を加えることにより基質レシチン中の脂肪酸に対する加水分解された脂肪酸の重量%として算出した。また, Hydro Resistant Value(HRV%)¹⁾は, 反応前後のリン脂質画分中に存在するパルミチン酸, オレイン酸, DHAの量から算出した。

2. ヒト赤血球変形能改善効果の評価

ヒトより採血, 分離した洗浄赤血球 (ヘマトクリット値 2%に調整) 6mlに対し, 各種リン脂質懸濁液 (蒸留水 : DMSO=1:1 (v/v)) 60 μ lを添加し, 1時間または3時間, 37°C 80strokes/minでインキュベートした。次いでPBSで3回洗浄し, ヘマ

トクリット値を10%に調整した。この洗浄赤血球 0.5mlにプラズマ 0.2mlを加え、ニュークリポアフィルターに通したものを赤血球変形能測定用試料とした。赤血球変形能の測定には、MC-FAN KH-2S型細胞レオロジー測定装置（日立原町電子工業（株））及びシリコン単結晶基板毛細血管モデル（Bloody 5A-1, 6×20 μm）を用い、赤血球試料液100 μlがマイクロチャンネルを流れるのに要した時間を計測した。

結果及び考察

1. β-リゾ型高度不飽和リン脂質生成の至適条件

Fig.1に示したように、リポザイムIMの水分活性を中間水分活性域($a_w=0.44$)に調整することによりDHA-PLの部分加水分解反応を応用して最もDHA濃度の高いリン脂質を得ることができた。このとき、基質DHA-PLのDHA含有率が10.8%であったのに対し、反応8時間目で既にリン脂質画分のDHA含有率は35.6%にまで達していた。また、加水分解率は75.5%，DHAのHRVは77.3%になったが、このHRV値は共存下の他の如何なる脂肪酸残基のHRVよりも高い値になっていた（Fig.2）。

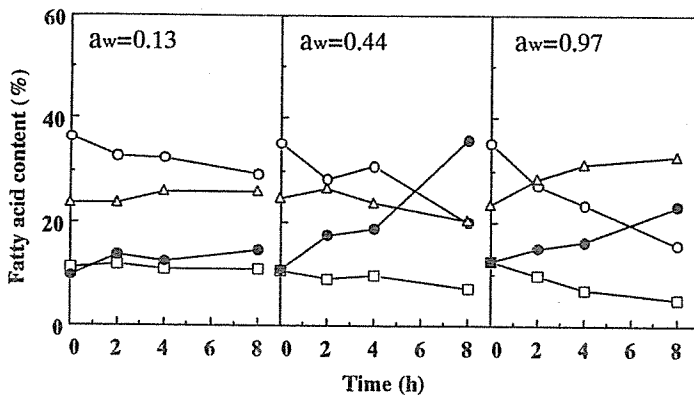


Fig.1 Effect of water activity of Lipozyme IM on concentration of DHA through partial hydrolysis of DHA-PL.

○— palmitic acid □— stearic acid
 △— oleic acid ●— DHA

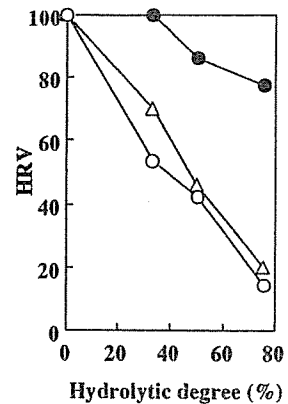


Fig.2 Hydrolysis resistant values(HRV) of fatty acid through partial hydrolysis of DHA-PL with Lipozyme IM adjusted to $a_w=0.44$.

○— palmitic acid △— oleic acid
 ●— DHA

2. β-リゾ型高度不飽和リン脂質のヒト赤血球変形能改善効果

大豆PCを比較対照リン脂質としてβ-リゾ型高度不飽和リン脂質のヒト赤血球に対する変形能改善効果を検討したところ、3時間の取り込み時間（インキュベーション）ではDHA-PC、β-リゾ型高度不飽和リン脂質とも大豆PCよりも優れた改善効果を示した（Fig.3）。その時の改善効果の大きさにDHA-PCとβ-リゾ型高度不飽和リン脂質の間で大きな差は見られなかったが（Fig.3）、1時間の取り込み時間では後者が明らかに優れていた（Fig.4）。インキュベーション前後の赤血球の脂肪酸組成を見たところ、3時間の取り込み時間ではDHA-PCとβ-リゾ型高度不飽和リン脂質の間に赤血球中のDHA組成比に殆ど差が見られなかった

のに対し (Table1), 1時間の取り込み時間では明らかに後者が高いDHA組成比を示していた (Table2)。一方, 大豆PCより大豆のリゾ型リン脂質 (大豆LPC) を調製し, β -リゾ型高度不飽和リン脂質と赤血球変形能改善効果を比較したところ, 大豆LPCはむしろ赤血球の変形能を低下させる作用を示し (Fig.5), 両者の間に著しい作用の差があることを認めた。

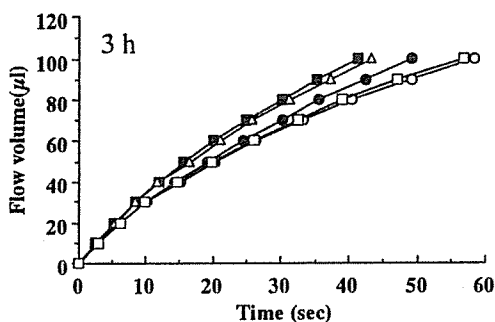


Fig. 3 Flow curves of human erythrocytes treated with some PCs and 2-acyl DHA-LPC for 3 h obtained through evaluation of deformability with artificial capillary model. -○- control -■- DHA-PC 10 μ M -□- Egg PC 10 μ M -●- soy PC 10 μ M -△- 2-acyl DHA-LPC 5 μ M

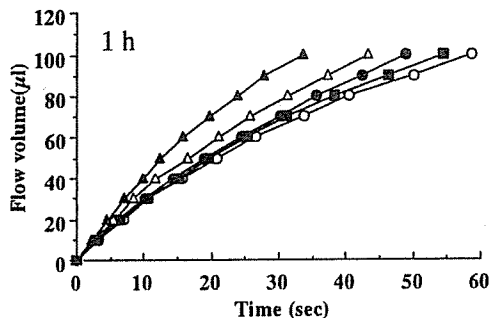


Fig. 4 Flow curves of human erythrocytes treated with some PCs and 2-acyl DHA-LPC for 1 h obtained through evaluation of deformability with artificial capillary model. -○- control -■- DHA-PC 10 μ M -●- soy PC 10 μ M -△- 2-acyl DHA-LPC 5 μ M -▲- 2-acyl DHA-LPC 10 μ M

Table 1 Fatty acid composition of phospholipid obtained from human erythrocytes treated with DHA-PC and 2-acyl DHA-LPC for 3h.

3 h	control	DHA-PC (10 μ M)	2-acyl DHA-LPC (5 μ M)	2-acyl DHA-LPC (10 μ M)
Sat.				
16:0	26.8 \pm 0.1	23.1 \pm 0.2*	22.3 \pm 0.1*	25.2 \pm 0.3*
18:0	19.0 \pm 0.1	16.1 \pm 0.1*	16.3 \pm 0.5*	17.5 \pm 0.2*
Mono.				
18:1	18.4 \pm 0.4	16.5 \pm 0.8*	17.1 \pm 0.5*	16.4 \pm 0.6*
Poly.				
20:4 (AA)	10.1 \pm 0.1	11.0 \pm 0.4*	11.1 \pm 0.4*	10.8 \pm 0.2
20:5 (EPA)	1.3 \pm 0.1	3.4 \pm 0.1*	3.1 \pm 0.1*	2.1 \pm 0.1*
22:6 (DHA)	4.8 \pm 0.1	10.8 \pm 0.2*	10.9 \pm 0.3*	9.6 \pm 0.1*

Data represent mean \pm S.D. (n=3). *P < 0.01 vs control.

Table 2 Fatty acid composition of phospholipid obtained from human erythrocytes treated with DHA-PC and 2-acyl DHA-LPC for 1h.

1 h	control	DHA-PC (10 μ M)	2-acyl DHA-LPC (5 μ M)	2-acyl DHA-LPC (10 μ M)
Sat.				
16:0	28.2 \pm 1.1	27.7 \pm 0.2	22.8 \pm 0.3*	21.2 \pm 0.1*
18:0	19.2 \pm 1.0	18.0 \pm 0.1	17.5 \pm 0.2	17.6 \pm 0.1
Mono.				
18:1	20.9 \pm 0.2	20.4 \pm 0.8	15.6 \pm 0.2*	15.5 \pm 0.1*
Poly.				
20:4 (AA)	9.7 \pm 0.6	11.4 \pm 0.4	10.7 \pm 0.1	11.6 \pm 0.1
20:5 (EPA)	1.3 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1	3.0 \pm 0.1*	3.1 \pm 0.1*
22:6 (DHA)	5.5 \pm 0.4	5.3 \pm 0.2	11.2 \pm 0.2*	11.6 \pm 0.1*

Data represent mean \pm S.D. (n=3). *P < 0.01 vs control.

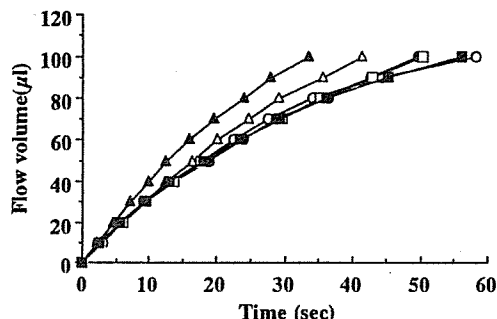


Fig.5 Flow curves of human erythrocytes treated with 2-acyl DHA-LPC and 2-acyl soy LPC for 1h obtained through evaluation of deformability with artificial capillary model.

-○- control -●- soy PC 10 μ M
-△- 2-acyl DHA-LPC 5 μ M -▲- 2-acyl DHA-LPC 10 μ M
-□- 2-acyl soy LPC 5 μ M -■- 2-acyl soy LPC 10 μ M

以上の結果より, DHAの結合したリン脂質はジアシル型, リゾ型ともに赤血球変形能改善効果に優れ, 特に後者では短時間に低濃度で生体膜を殆ど脆弱化することなくその効果を発揮できることが明らかとなった。

1) Y. Tanaka *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 1210 (1992)