

## ヒト赤血球変形能に及ぼす高度不飽和脂肪酸含有リン脂質処理 (*in vitro*) の影響

野島正博, 細川雅史, 高橋是太郎, 羽田野六男, 菊池佑二

(1994年3月11日受付)

### Effect of *in vitro* Treatment with Glycerophospholipid Containing Highly Polyunsaturated Fatty Acids on Deformability of Human Erythrocytes

Masahiro Nojima,\*<sup>1</sup> Masashi Hosokawa,\*<sup>1</sup> Koretaro Takahashi,\*<sup>1</sup>  
Mutsuo Hatano,\*<sup>1</sup> and Yuji Kikuchi\*<sup>2</sup>

The flow rate of human erythrocytes on microchannels was measured to evaluate their deformability when treated with soy phospholipids, hydrogenated soy phospholipids, phospholipids containing icosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). EPA-containing phosphatidylserine and DHA-containing phosphatidylcholine or phosphatidylethanolamine were observed to be the most effective lipid molecular species to improve the deformability of human erythrocytes, while hydrogenated phospholipids tended to impair deformability.

キーワード: リン脂質, 高度不飽和脂肪酸, 赤血球, 変形能, マイクロチャンネル, イコサペンタエン酸, ドコサヘキサエン酸

リノール酸の過剰摂取が発癌, 胆石, 細胞膜の改質, 高密度リポタンパク質の低下といった危険性を持つことが指摘されはじめて以来, 他の不飽和脂肪酸の健康維持機能への関心が高まってきている。<sup>1)</sup> とりわけ魚油中に多く含まれているイコサペンタエン酸 (EPA), ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの高度不飽和脂肪酸 (HUFA) は, 現在では広く一般にもその成人病予防効果が知られるようになり, 医薬品への応用もすでに行われている。<sup>2,3)</sup>

HUFA を生体に投与した場合, これらは最終的に生体膜のリン脂質画分に取り込まれ, 生体膜の機能に関与していることが示唆されている。<sup>2,3)</sup>

本研究では, 膜機能の変化に関する研究において取り扱いが簡単であることからよく用いられている赤血球 (RBC) を HUFA 含有リン脂質 (HUFA-PL) で処理 (*in vitro*) し, RBC 変形能を毛細血管モデル<sup>4)</sup> により測定することにより, HUFA-PL の RBC への影響について比較検討した。

### 実験方法

試薬 リゾホスファチジルコリン (LPC) は協和発酵工業(株)より乳化剤として市販されているリゾ型リン脂質 (商品名 エルマイザー A) の供与を受け, クロロホルム-メタノール系ケイ酸カラムクロマトグラフィーに

Table 1. Fatty acid composition of substrate lipids

	LPC	EPA	DHA	Soy PC
Sat.				
16:0	24.5	1.0	—	13.3
18:0	6.5	—	0.2	4.1
Mono.				
18:1 n-9	11.1	—	—	10.7
Poly.				
18:2 n-6	52.3	1.7	0.3	65.7
18:3 n-3	5.1	1.4	—	6.2
20:5 n-3	—	90.9	1.5	—
22:5 n-3	—	—	3.5	—
22:6 n-3	—	0.4	88.2	—

Abbreviations: LPC, lysophosphatidylcholine; Soy PC, soy phosphatidylcholine.

\*<sup>1</sup> 北海道大学水産学部食品化学第一講座 (Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato, Hakodate 041, Japan).

\*<sup>2</sup> 農林水産省食品総合研究所計測工学研究室 (Instrumentation Engineering Laboratory, National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tsukuba 305, Japan).

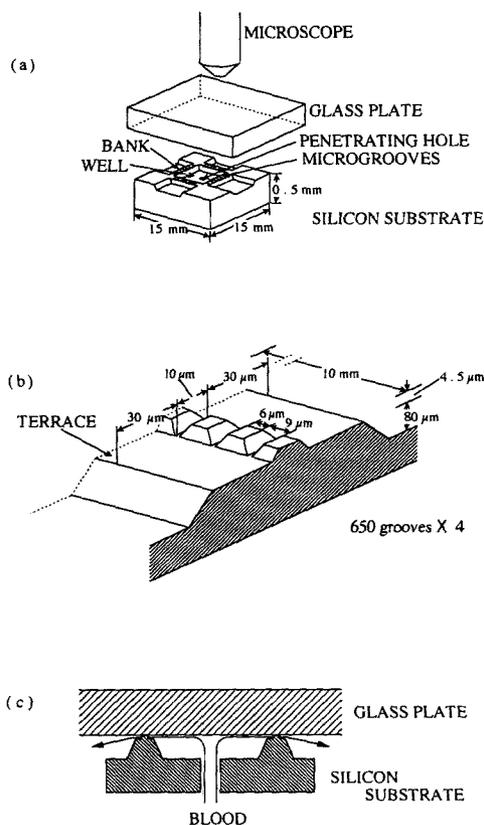


Fig. 1. Outline structure of the artificial capillary model.

(a) Outline structure. The silicon substrate surface has the compartments (wells) partitioned by the banks. (b) Magnified view of the bank. The level areas (terraces) are placed at the two sides of the bank at the same level as the groove depth. (c) Blood passage. The contact of the upper surface of the bank with the glass plate can be made watertight with mechanical pressing alone because of the optical flatness of both surfaces.

よって精製したものを用いた。EPA, DHA は日本化学飼料(株)より供与を受けた純度 90%, 88% のものを用いた。大豆 PC (Soy PC) には Avanti Polar-Lipids Inc. (Alabaster, AL) 製の 95% 純度のものを用いた。これらの反応基質の脂肪酸組成を Table 1 に示す。ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> は協和発酵工業(株)より供与を受けた工業的に利用されているブタ降臍由来のものを透析後, 真空凍結乾燥 (35.0 units/mg powder) してから用いた。Lipozyme IM 20 (27.5 BIU/g) は Novo Nordisk Bioindustrials Inc. より供与を受けた *Mucor miehei* 由来の固定化リ

パーゼを用いた。ホスホリパーゼ D (150 unit/mg powder) は旭化成工業(株)より供与を受けた *Streptomyces* sp. 由来のものを用いた。水素添加触媒には Kawaken Fine Chemical Co., Ltd. より入手した Rh-Carbon を用いた。その他のすべての試薬および溶媒は特級を用いた。

**リン脂質の調製** リン脂質の調製は, すべて前報<sup>7)</sup>に従って行った。すなわち, sn-2 EPA-PC, sn-2 DHA-PC のように, sn-2 位に EPA または DHA を含んだホスファチジルコリン (PC) の調製は LPC 1.1 g, EPA または DHA 1.8 g をグリセロール 55 g に分散後, 6 mM CaCl<sub>2</sub> 含有 200 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 5 ml にホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 19.1 unit/mg LPC を溶解した酵素液を加えて反応を開始し, 600 rpm で攪拌しながら 25°C で 48 h 反応を行った。反応終了後, クロロホルム-メタノール-水 (10:5:3, v/v/v) で脂質を抽出し, さらに抽出した脂質成分をクロロホルム-メタノール系ケイ酸カラムクロマトグラフィーにより精製した。回収したリン脂質を調製用 TLC プレート (DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck) に供し, クロロホルム-メタノール-水 (65:25:4, v/v/v) で展開後, 得られた PC 画分をメタノールで抽出した。sn-1 位に EPA を含んだ PC の調製には Soy PC 1.0 g, EPA 6.0 g をヘキサン 20 ml に溶解後, Lipozyme IM20 3.0 g を加え, 75 min<sup>-1</sup> で振盪しながら 40°C で 48 h 反応を行った。反応終了後, 回収, 精製する方法は前記と同様に行った。サケ卵 (Salmon roe) PC の調製は, まず Bligh-Dyer 法<sup>8)</sup>によりイクラ (市販品) から脂質を抽出し, これに 20 倍量のアセトンを加え, -20°C に一晩放置し, アセトンに溶解する単純脂質を除去した。このアセトン沈殿に 20 倍量のエタノールを加え, -20°C に一晩放置し, 沈殿したホスファチジルエタノールアミン (PE) ならびにホスファチジルセリン (PS) を除去した。このようにして得られた脂質をケイ酸カラムクロマトグラフィーに供し, エーテル-エタノール (1:1, v/v) で再び残存する単純脂質を除去し, エタノール-メタノール (9:1, v/v) で PC, LPC 以外の脂質を除去した後, メタノールによって PC, LPC 画分を回収した。以後の精製は前記と同様に行った。PC から PE へのホスファチジル基転移は PC 50 mg を酢酸エチル 2.2 ml に溶解後, 200 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.6) 1 ml にエタノールアミン塩酸塩 (Aldrich Chem. Comp., Inc.) 87.8 mg (終濃度 0.3 M), 牛血清アルブミン (和光純薬工業(株)) 11.9 mg, ホスホリパーゼ D 80 unit を溶解した酵素液を加えて反応を開始し, 1,200 rpm で攪拌しながら 30°C, 4 h 反応を行った。反応終了後, 回収および精製を前記と同様に行った。PC から PS へのホスファチジル基転移は PC 50 mg を酢酸エチル 1.7 ml に溶解後, 200 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.6) 0.8 ml に L-セリン (和光純薬工業(株)) 250 mg

(終濃度 1.0 M), ホスホリパーゼ D 80 unit, CaCl<sub>2</sub> 5 mg を溶解した酵素液を加えて反応を行った。以後の操作は PE と同様に行った。水素添加リン脂質 (HPL) は Soy リン脂質を無水エタノールに溶解後, 反応触媒として Rh-Carbon を加え, これに水素ガスを約 2 h 通気し, 水素添加反応を行った。反応終了後, ろ過を行い, さらに溶媒をクロロホルムに置換してから 0.45 μm のフィルター (エキクロディスク 13 CR, Gelman Sciences Japan, Ltd.) に通し, この触媒を完全に除去した。得られたリン脂質の脂肪酸組成を以下の条件で分析した。装置: 日立 163 型ガスクロマトグラフ, カラム: 40 m×1.2 mm, 膜厚 0.5 μm, G-300 (財団法人 化学品検査協会), キャリアガス: ヘリウム, 5 ml/min, カラム温度: 185°C, インジェクション温度: 250°C, ディテクター: FID。

**RBC の調製** 前報<sup>7)</sup> に準じた方法で RBC の調製を行った。すなわち, ヒトの静脈より採血を行い (ヘバリ

ン 1,000 IU/ml を血液に対して 5% 加え凝血防止), 3,000 rpm, 15 min, 4°C で遠心分離し, 血漿および RBC 以外の血球を除去した。この時得られる血漿を後ほど使用するために別の容器で保存 (4°C) しておき, 残った RBC を PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>, 125 mM NaCl, pH 7.4 at 4°C) で 3 回洗浄した。洗浄 RBC を反應用 PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>, 125 mM NaCl, 2 mM adenine, 10 mM inosine, 10 mM glucose, pH 7.4 at 37°C) に懸濁しヘマトクリット値 (Hct.) を 2% に調整した。

**RBC へのリン脂質処理** 洗浄 RBC (Hct. 2%) 6 ml に対してリン脂質懸濁液 (リン脂質が 4 mM となるように蒸留水に超音波懸濁したものと, ジメチルスルホキシドを 1:1 の割合で混合し, さらに超音波処理したもの) を 60 μl 加えた。これらの反応混液を 37°C, 3 h 振盪恒温槽 (80 min<sup>-1</sup>) 中でインキュベートし, 再び PBS で 3 回洗浄することによって余分なリン脂質を除去, PBS に再懸濁

Table 2. Fatty acid composition of PCs prepared

	<i>sn</i> -2 EPA-PC	<i>sn</i> -2 DHA-PC	<i>sn</i> -1 EPA-PC	Salmon roe PC	HPC
Sat.					
16:0	12.7	13.5	4.8	22.7	12.8
18:0	2.8	3.0	1.2	7.2	79.9
Mono.					
18:1 n-9	5.7	5.9	8.3	14.2	6.2
Poly.					
18:2 n-6	26.9	26.4	49.3	—	—
18:3 n-3	2.9	2.6	4.9	—	—
20:5 n-3	48.0	1.0	31.1	15.0	—
22:5 n-3	—	1.6	—	4.9	—
22:6 n-3	—	43.2	—	28.8	—

Abbreviations: *sn*-2 EPA-PC, PC containing icosapentaenoic acid (at *sn*-2); *sn*-2 DHA-PC, PC containing docosahexaenoic acid (at *sn*-2); *sn*-1 EPA-PC, PC containing icosapentaenoic acid (at *sn*-1); Salmon roe PC, natural occurring PC prepared from chum salmon roe; HPC, hydrogenated PC.

Table 3. Fatty acid composition of PEs prepared

	Soy PE	<i>sn</i> -2 EPA-PE	<i>sn</i> -2 DHA-PE	<i>sn</i> -1 EPA-PE	Salmon roe PE	HPE
Sat.						
16:0	12.9	12.2	12.8	3.5	17.1	21.0
18:0	3.5	3.5	3.6	—	7.9	50.1
Mono.						
18:1 n-9	10.9	5.8	5.8	7.6	12.2	25.9
Poly.						
18:2 n-6	66.3	26.6	25.3	47.1	—	2.1
18:3 n-3	6.3	3.2	2.5	4.5	—	—
20:5 n-3	—	45.4	1.4	35.5	14.9	—
22:5 n-3	—	—	2.1	—	6.6	—
22:6 n-3	—	—	42.2	—	27.8	—

Abbreviations: Soy PE, prepared by transphosphatidylation of Soy PC; *sn*-2 EPA-PE, PE containing icosapentaenoic acid (at *sn*-2); *sn*-2 DHA-PE, PE containing docosahexaenoic acid (at *sn*-2); *sn*-1 EPA-PE, PE containing icosapentaenoic acid (at *sn*-1); Salmon roe PE, prepared by transphosphatidylation of Salmon roe PC, HPE, hydrogenated PE.

Table 4. Fatty acid composition of PSs prepared

	Soy PS	<i>sn</i> -2 EPA-PS	<i>sn</i> -2 DHA-PS	<i>sn</i> -1 EPA-PS	Salmon roe PS	HPS
Sat.						
16:0	14.1	14.3	14.9	3.3	16.6	19.1
18:0	3.3	3.8	3.9	—	7.5	58.5
Mono.						
18:1 n-9	11.2	6.3	6.3	7.7	11.9	17.8
Poly.						
18:2 n-6	63.7	27.7	26.7	47.0	—	2.5
18:3 n-3	6.3	3.2	2.3	4.5	—	—
20:5 n-3	—	41.8	1.1	35.2	14.6	—
22:5 n-3	—	—	2.4	—	6.2	—
22:6 n-3	—	—	39.6	—	30.1	—

Abbreviations: Soy PS, prepared by transphosphatidylolation of Soy PC; *sn*-2 EPA-PS, PS containing icosapentaenoic acid (at *sn*-2); *sn*-2 DHA-PS, PS containing docosahexaenoic acid (at *sn*-2); *sn*-1 EPA-PS, PS containing icosapentaenoic acid (at *sn*-1); Salmon roe PS, prepared by transphosphatidylolation of Salmon roe PC, HPS, hydrogenated PS.

し, Hct. 10% に調整した。この RBC 懸濁液 0.5 ml に前記の血漿 0.2 ml を加えてよく混合した後, ニュークリポアフィルター (PC MEMB 13 mm 5 micropore, Costar Corporation) に通したものを毛細血管モデルによる RBC 変形能測定用の試料とした。

**リン脂質処理 RBC の変形能測定** Fig. 1a に示した毛細血管モデルの bank 上にはマイクロチャンネルが形成されており (Fig. 1b), この断面積は直径 6  $\mu\text{m}$  の円の面積に相当するので, ヒトの平均的な毛細血管径である 5  $\mu\text{m}$  とほぼ一致する。この毛細血管モデルを Fig. 1c のようにガラスと圧着させることによりマイクロチャンネル以外からの漏れを防止するとともに顕微鏡による観察を可能にした。外部から 7.4 mmHg (10 cm H<sub>2</sub>O) の引圧をかけてマイクロチャンネルに RBC を通過させ, 試料液 100  $\mu\text{l}$  が流れるのに要する時間を 10  $\mu\text{l}$  ごとに計測した。このマイクロチャンネル通過速度と顕微鏡を通して TV モニターに映しだされた画像から, 種々のリン脂質処理が RBC 変形能に及ぼす影響を比較検討した。すなわち, マイクロチャンネル通過速度が低下したものは変形能が悪化し, 向上したものは変形能が改善されたと判断した。

#### 結果および考察

**リン脂質の脂肪酸組成** Table 2~4 に調製したリン脂質 (PL) の脂肪酸組成を示す。*sn*-2 EPA-PL, *sn*-2 DHA-PL には, いずれの脂質クラスにも EPA または DHA が 45% 前後含まれており, *sn*-2 位に特異的に導入されたと考えられることから,<sup>9)</sup> *sn*-2 位の脂肪酸のうち 90% 前後が EPA, DHA で占められていることになる。*sn*-1 EPA-PL には, いずれの脂質クラスにも EPA が 35% 前後含まれており, *sn*-1 位の脂肪酸のうち EPA が

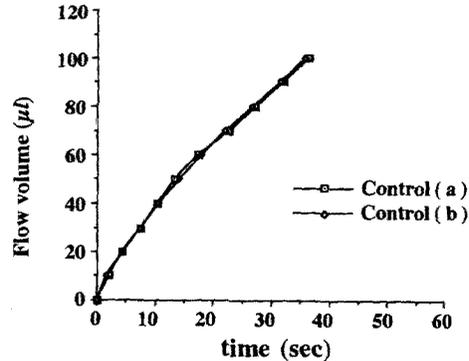


Fig. 2. Reproducibility of deformability obtained by measurements with artificial capillary model.

(Groove length of microchannel: 10  $\mu\text{m}$ ; Negative pressure applied to the reservoir 7.4 mmHg (10 cm H<sub>2</sub>O); Temp.: ambient (24°C)) Control (a) (b): red blood cell suspensions were prepared by incubation without phospholipid.

70% 前後を占めている。HPL には, ポリエン酸は全く含まれておらずほとんどが飽和脂肪酸であったが, 水素添加に用いた溶媒に対する溶解性の違いから HPE, HPS ではモノエン酸が 20% 程度残っていた。Salmon roe PL には, いずれの脂質クラスにも EPA が約 14%, DHA が約 28% 含まれており EPA : DHA = 1 : 2 の割合であった。

**毛細血管モデルを用いた赤血球変形能測定法の再現性の検討** 毛細血管モデルを用いた RBC 変形能測定法の再現性に関して検討した結果を Fig. 2 に示す。

Fig. 2 中の Control (a), (b) は, 異なる日に同じヒトで採血を行い, その日のうちに同じ条件で RBC の変形能を測定したものである。Control (a), (b) の flow curve は

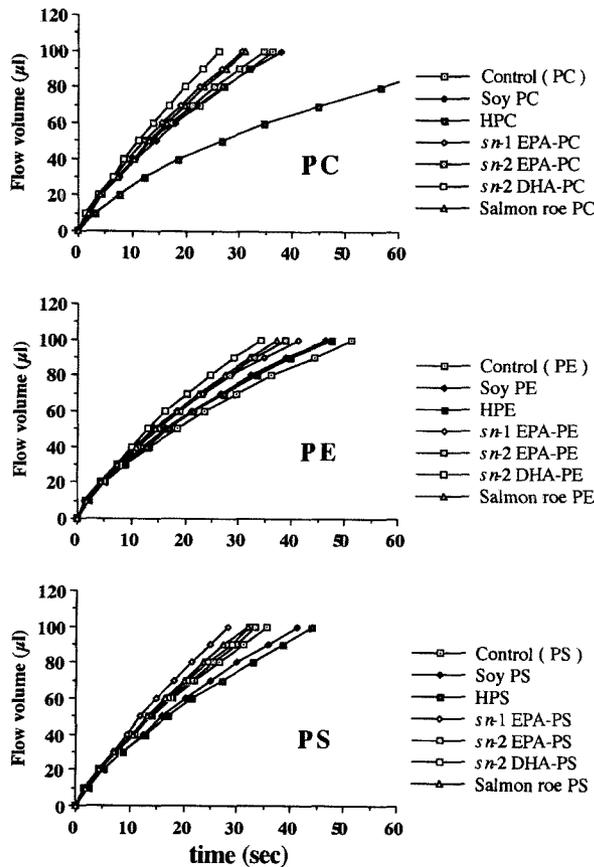


Fig. 3. Flow curves of RBC treated with various PC, PE and PS to evaluate deformability by artificial capillary model.

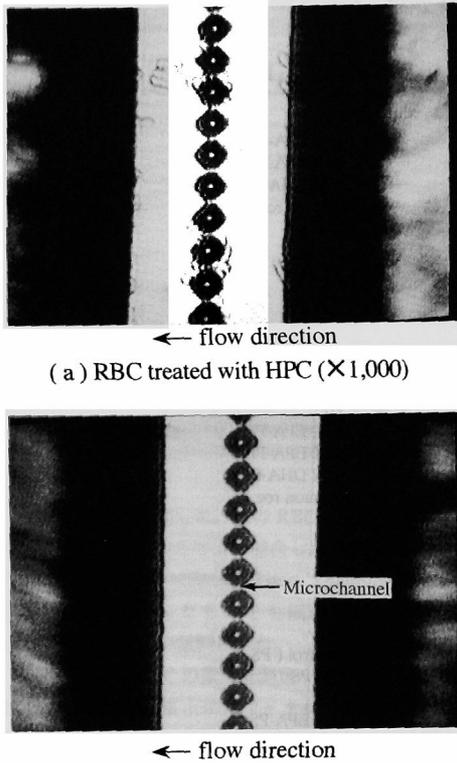
(Groove length of microchannel: 10  $\mu\text{m}$ ; Negative pressure applied to the reservoir 7.4 mmHg (10 cm  $\text{H}_2\text{O}$ ); Temp.: ambient (24°C)) Abbreviations: RBC, red blood cells. See Table 1-4 for other abbreviations.

ほぼ同一線上であり、流量が10  $\mu\text{l}$  ごとのマイクロチャンネル通過時間においても Control (a), (b) 間の差は1秒以内に納まっていた。このことから、本毛細血管モデルを用いた RBC 変形能測定法の再現性はかなり高いものであることが確認された。

毛細血管モデルを用いた赤血球変形能測定によるリン脂質処理赤血球の変形能の評価 RBC のマイクロチャンネル通過速度を測定することにより、PL 処理 RBC の変形能の評価を行った結果を Fig. 3 に、PL 処理 RBC がマイクロチャンネルを通過している様子を Fig. 4 に示す。

いずれの脂質クラスにおいても飽和脂肪酸を主な構成脂肪酸とする HPL で処理した RBC のマイクロチャンネル通過速度が遅くなっており、中でも特に、HPC 処理 RBC でマイクロチャンネル通過速度が著しく遅くな

ていることがわかる (Fig. 3)。マイクロチャンネルを通過している様子 (Fig. 4a) を見ても、HPC 処理 RBC ではマイクロチャンネルの出入口での引っ掛かりが見られ、RBC 変形能が低下していることが明白である。リノール酸を60%以上含む Soy PL で処理した RBC では、PL を加えず同様に処理した Control RBC に比べ RBC 変形能に大きな変化はみられなかったのに対し、HUFA-PL で処理した RBC ではすべてが Control RBC よりもマイクロチャンネル通過速度が速く (Fig. 3) なっており、RBC 変形能が向上していることが示された。またその結果は、マイクロチャンネルに引っ掛かることなくスムーズに通過している RBC の様子 (Fig. 4b) からも確認できる。sn-2 EPA-PC 処理による赤血球リン脂質画分の脂肪酸組成の変化を分析した結果 (Table 5), PL 未処理の RBC に比べパルミチン酸 (16:0) およびオレイ



(b) RBC treated with *sn*-2 DHA-PE (×1,000)

**Fig. 4.** Microscopic observation of RBC treated with HPC (a) and *sn*-2 DHA-PE (b) in microgrooves of artificial capillary model.

(Groove length of microchannel: 10 μm; Negative pressure applied to the reservoir 7.4 mmHg (10 cm H<sub>2</sub>O); Temp.: ambient (24°C) Abbreviations: HPC, hydrogenated PC; *sn*-2 DHA-PE, PE containing docosahexaenoic acid (at *sn*-2); RBC, red blood cells.

ン酸 (18:1) の減少と EPA (20:5) の増加が認められた。すなわち, RBC 変形能を低下させると考えられる飽和脂肪酸が減少し EPA が増加したことで膜流動性が向上し, RBC 変形能が向上したと考えられる。

田村らは EPA エチルエステルの投与により血液粘度が有意に低下し, RBC 変形能が有意に上昇することを報告しているが,<sup>10)</sup> 本実験においても HUF A-PL を用いた RBC 処理により同様の結果が得られた。さらに, PS では *sn*-1 EPA-PS, PC, PE の脂質クラスでは EPA より DHA (*sn*-2) を含有する PL において赤血球変形能の向上作用が顕著であることが示された。

赤血球変形能の向上は, 膜リン脂質脂肪酸のコレステロールとの結合性や細胞内タンパク質との相互作用など

**Table 5.** Changes in fatty acid composition in RBC before and after incubation with *sn*-2 EPA-PC

	Untreated RBC	<i>sn</i> -2 EPA-PC treated RBC
Sat.		
16:0	30.8	28.8
18:0	9.9	9.6
Mono.		
18:1 n-9	19.3	17.6
Poly.		
18:2 n-6	13.3	13.6
18:3 n-3	—	—
20:4 n-6	13.7	13.4
20:5 n-3	0.9	2.0
22:5 n-3	1.3	1.5
22:6 n-3	4.9	5.8

Abbreviations: RBC, red blood cells; *sn*-2 EPA-PC, PC containing icosapentaenoic acid (at *sn*-2).

様々な要因によって引き起こされると考えられているが,<sup>11)</sup> EPA や DHA 含有脂質の種類により効果が異なることが予想される。また, 膜リン脂質への取り込み速度の影響も考えられることから, 今後より詳細な検討が必要であると考えられる。

## 謝 辞

本研究を行うに当たりご協力を頂きました(株)日立製作所機械研究所 佐藤一雄氏, 日立北海セミコンダクター(株)平野次彦氏ならびに鶴沼ワカ氏に謝意を表す。

また, 本研究は文部省平成6年度科学研究費補助金(奨励研究(A), 06760183)によったものである。記して感謝する。

## 文 献

- 1) 鹿山 光監修: 高度不飽和脂肪酸, 第1版, 恒星社厚生閣, 東京, 1995.
- 2) 原 健次: 脂質誘導体の医薬品への応用 イコサペンタエン酸の医薬品への応用(1). 油脂, 46, No. 1, 91-99 (1993).
- 3) 原 健次: 脂質誘導体の医薬品への応用 イコサペンタエン酸の医薬品への応用(2). 油脂, 46, No. 2, 75-81 (1993).
- 4) 菊池佑二: 赤血球変形能の測定と環境因子による変化. 日本バイオレオロジー学会誌, 6, 2-16 (1992).
- 5) 菊池佑二, 佐藤一雄, 細胞計測・細胞加工への半導体技術の応用. 化学と生物, 30, 31-37 (1992).
- 6) Y. Kikuchi, K. Sato, H. Ohki, and T. Kaneko: Optically accessible microchannels formed in a single-crystal silicon substrate for studies of blood rheology. *Microvascular Res.* 44, 226-240 (1992).
- 7) M. Nojima, M. Hosokawa, K. Takahashi, and M. Hatano: Effect of EPA, DHA containing glycerophospholipid molecular species on the fluidity of erythrocytes cell membranes

- Fisheries Sci.*, **60**, 729-734 (1994).
- 8) E. G. Bligh and W. F. Dyer: A rapid method of total lipid extraction and purification *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917 (1959).
  - 9) 細川雅史, 高橋是太郎, 羽田野六男, 江木 衷: 工業用ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> による高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の合成. *日本食品工業学会誌*, **38**, 695-698 (1991).
  - 10) 田村 泰, 平井愛山, 寺野 隆, 吉田 尚, 熊谷 朗: 魚脂多価不飽和脂肪酸 (Eicosapentaenoic acid: EPA) の抗血栓, 抗動脈硬化および抗炎症作用の機序に関する研究. *感染・炎症・免疫*, **15**, 379-390 (1985).
  - 11) 大西俊一: 生体膜の動的構造, 第2版, 東京大学出版会, 東京, 1993.