



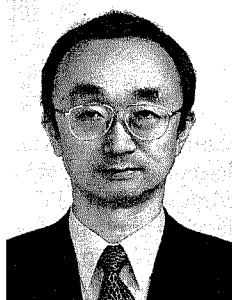
Title	高度不飽和グリセロ脂質の分子種の分析と機能に関する研究
Author(s)	高橋, 是太郎; Takahashi, Koretaro
Description	表彰記事の出典: 『オレオサイエンス』 第8巻第5号、p.200、2008年 総説 第42回日本油化学会学会賞
Citation	オレオサイエンス, 8(12), 525-538
Issue Date	2008-12-01
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/42798">https://hdl.handle.net/2115/42798</a>
Type	journal article
File Information	takahashi_JOCS8-525.pdf



<第42回日本油化学会学会賞>

高度不飽和グリセロ脂質の分子種の分析と機能に関する研究

A Novel Approach for the Identification of Highly Polyunsaturated Glycerolipid Molecular Species, and Their Functional Benefits



高橋是太郎

北海道大学大学院水産科学研究院  
〒041-8611  
函館市港町 3-1-1

Koretaro TAKAHASHI

Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University  
3-1-1 Minato-cho, Hakodate 041-8611, JAPAN

論文要旨：逆相分配クロマトグラフィーにおける高度不飽和グリセロ脂質分子種の保持容量（保持時間）を支配する因子、および隣り合うグリセロ脂質分子種の分離度を支配する因子を明らかにし、それらを応用することによって水産グリセロ脂質の内、とくにリン脂質の分子種を同定し、その特徴を明らかにした。次いで、水産グリセロリン脂質の主要分子種である DHA 結合型リン脂質分子種を合成し、その有用機能の一端として抗腫瘍性物質に対する機能促進性を明らかにするとともに、それを応用したりボソームも作成し、その抗腫瘍性からみた有用性についても評価した。

**Abstract:** Chromatographic behavior of individual glycerolipid molecular species including highly polyunsaturated fatty acid bounded form was analyzed in detail. And a novel approach for the identification of glycerolipid molecular species on reverse phase chromatography rest on the additional theorem of chemical potential of individual functional groups in glycerolipid molecule was suggested. As an example of health benefit of phospholipid molecular species containing high amount of DHA, antitumor promotional effect of them were demonstrated, and they were successfully synthesized, then the synthesized and natural occurring ones were applied as antitumor boosting liposomes.

**Key words:** phospholipid, triacylglycerol, molecular species, DHA, chemical potential

1 はじめに

高度不飽和グリセロ脂質の有用機能について論じるとき、それらを構成する脂肪酸の総合組成比のみに着目するだけでは不十分になってきている。たとえば、魚油をランダム化すると、酸化安定性が低下することが指摘されており、また同じ脂肪酸組成をもった油脂であっても、単酸型のグリセロ脂質の混合物と、混酸型のグリセロ脂質とでは、酸化安定性のみならず、腸管における吸

収性や生体利用率が異なることも示唆されている。このように、脂肪酸残基の結合位置やさらには脂肪酸残基の組み合わせすなわち分子種レベルの解析が必要なことは明らかであり、分子種組成の分析が試みられてきた。高度不飽和グリセロ脂質の分子種分析には逆相分配クロマトグラフィーが繁用される。本研究では逆相分配クロマトグラフィーにおけるグリセロ脂質分子種の保持容量（保持時間）を支配する因子、および隣り合うグリセロ脂質分子種の分離度を支配する因子を先ず明らかにし、それらを応用することによって水産グリセロ脂質の内、とくに水産グリセロリン脂質の分子種の特徴を明らかに

連絡者：高橋是太郎  
E-mail: kore@fish.hokudai.ac.jp

した。次いで、水産グリセロリン脂質の主要分子種である高度不飽和リン脂質分子種の有用機能を明らかにするとともに、それをを用いたりボソームを作成し、その有用性を評価した。

2 グリセロ脂質の分子構造とクロマト溶出順位の関係

魚肉のグリセロリン脂質の分子種を明らかにするため、リン脂質の極性基をホスホリパーゼCで除去した後、無水酢酸でアセチルジアシルグリセロールに誘導し、それを逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供した<sup>1)</sup>。極性基を除去しないと、極性基と固定相の残存シラノール基が引き合せて分子種間の分離が悪くなるからである。魚肉のホスファチジルコリン (PC) 由来のアセチルジアシルグリセロールの逆相 HPLC (マグロ筋肉 PC の例) では Fig. 1 のクロマトグラムを得るが、主要ピークの場合は Fig. 1 右の挿入表のようにそれぞれのピークの脂肪酸組成の結果から比較的容易に分子種を同定できた。また、Fig. 2 (シロサケ筋肉 PC の例) のIIのピーク群のように、主要な分子種ピークでなくても、各ピークの脂肪酸組成の分析結果とアシル基の総炭素数の分析結果を同時に満足させるアシル基の組み合わせを割り出すことにより (Fig. 2 上の挿入表)、分離度が不十分であっても事実上分子種を同定できることを認めた。このようにして、マグロ、イワシ、サバ、ソイ、スナガレイ、コイ、ニジマス、ヨシキリサメの筋肉、および大豆、卵黄の各 PC 分子種ピークを同定していき、

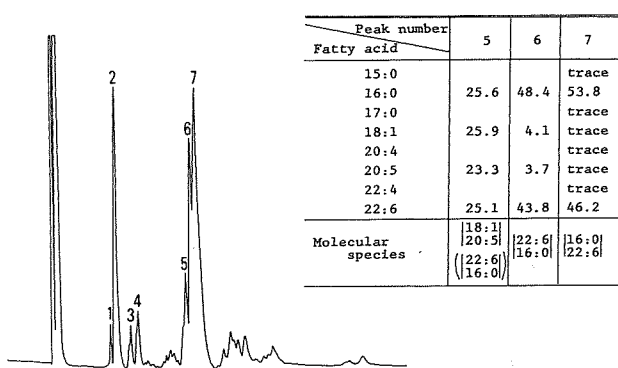


Fig. 1 Determination Example of Major Phospholipid Molecular Species of Fish Muscle.

Tuna meat phosphatidylcholine (PC) was derived into acetyl diacylglycerol and then injected into Hitachi Liquid Chromatograph (HPLC) Model 638-50 equipped with twin 8 × 250 mm LiChrosorb RP-18 columns using Shodex RI Model SE-11 as a detector. The eluting solvent used was isopropanol/acetone/methanol/acetonitrile (1:1:3:4, v/v) at a flow rate of 1.5 mL/min. Peaks numbered as 5, 6, 7 were recovered, then methylesterified and subjected to fatty acid composition analysis. The results are depicted as an inserted table<sup>1)</sup>.

Peak number	1	2	3	4	5	6
Fatty acid						
14:0			21.3	30.6	34.6	44.6
16:1	53.0	47.7	28.3	19.0	19.6	9.2
20:5	47.0	52.3	50.4	36.2	15.6	8.3
22:6				14.2	30.2	37.9
Carbon number						
34			42.6	63.3	32.2	10.8
36	95. <	90.0	57.4	5.7	41.7	89.2
38				31.0	26.1	
Carbon number						
34			$\begin{matrix} 20:5 \\ 14:0 \end{matrix}$ 42.6	$\begin{matrix} 14:0 \\ 20:5 \end{matrix}$ 63.3	$\begin{matrix} 14:0 \\ 20:5 \end{matrix}$ 32.2	$\begin{matrix} 14:0 \\ 20:5 \end{matrix}$ 10.8
36	$\begin{matrix} 20:5 \\ 16:1 \end{matrix}$ 95. <	$\begin{matrix} 16:1 \\ 20:5 \end{matrix}$ 90.0	$\begin{matrix} 16:1 \\ 20:5 \end{matrix}$ 57.4	$\begin{matrix} 16:1 \\ 20:5 \end{matrix}$ 5.7	$\begin{matrix} 14:0 \\ 16:1 \end{matrix}$ 41.7	$\begin{matrix} 14:0 \\ 22:6 \end{matrix}$ 89.2
38				$\begin{matrix} 22:6 \\ 16:1 \end{matrix}$ 31.0	$\begin{matrix} 16:1 \\ 22:6 \end{matrix}$ 26.1	

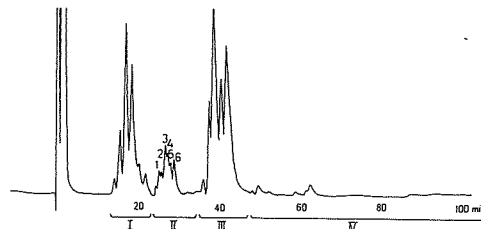


Fig. 2 Determination Example of Minor Phospholipid Molecular Species of Fish Muscle<sup>1)</sup>.

Salmon meat PC was derived into acetyl diacylglycerol and then injected into the same HPLC system as in Fig. 1. Peaks numbered from 1 to 6 were individually recovered, then methylesterified and subjected to fatty acid composition analysis. The results are depicted as an inserted table.

I: Molecular species composed of highly unsaturated fatty acids such as (20 : 5n-3, 20 : 5n-3), (20 : 5n-3, 22 : 6n-3) and (22 : 6n-3, 22 : 6n-3).

III: Molecular species composed of generally found fatty acids such as 16 : 0 or 18 : 1 in combination with 20 : 5n-3 or 22 : 6n-3 such as (16 : 0, 20 : 5n-3), (16 : 0, 22 : 6n-3), (18 : 1, 20 : 5n-3) and (18 : 1, 22 : 6n-3).

II & IV: Others.

個々の分子種ピークの RRT とアシル基の総炭素数の関係、および RRT とアシル基の総二重結合数との関係をみると、両アシル基それぞれの炭素数およびそれぞれの二重結合数のうち 3 つを定数、残りの 1 つを変数とする平行線群の関係 (Fig. 3<sup>1)</sup>) になることが判明した。この関係は次のように表すことができる。

$$CN = p_1 \cdot \log(RRT) + q_1 \quad CN = \begin{vmatrix} x & d_1 \\ c_2 & d_2 \end{vmatrix} \dots (1)$$

$$DB = p_2 \cdot \log(RRT) + q_2 \quad DB = \begin{vmatrix} c_1 & y \\ c_2 & d_2 \end{vmatrix} \dots (2)$$

ここで CN はアシル基の総炭素数、DB はアシル基の総二重結合数、 $c_1$ 、 $c_2$  および  $d_1$ 、 $d_2$  はそれぞれのアシル基における炭素数および二重結合数の定数を表し、 $x$  と  $y$  はアシル基の炭素数および二重結合数の変数を表している。(ただし、行列表示は便宜上のものであり、数学の行列計算に従うものではない。) しかし、この関係は前述のように、実際にはリン脂質のままではなく、アセチルジアシルグリセロールに誘導したものを HPLC に供していることから、本来あるべき (1) および (2) の表

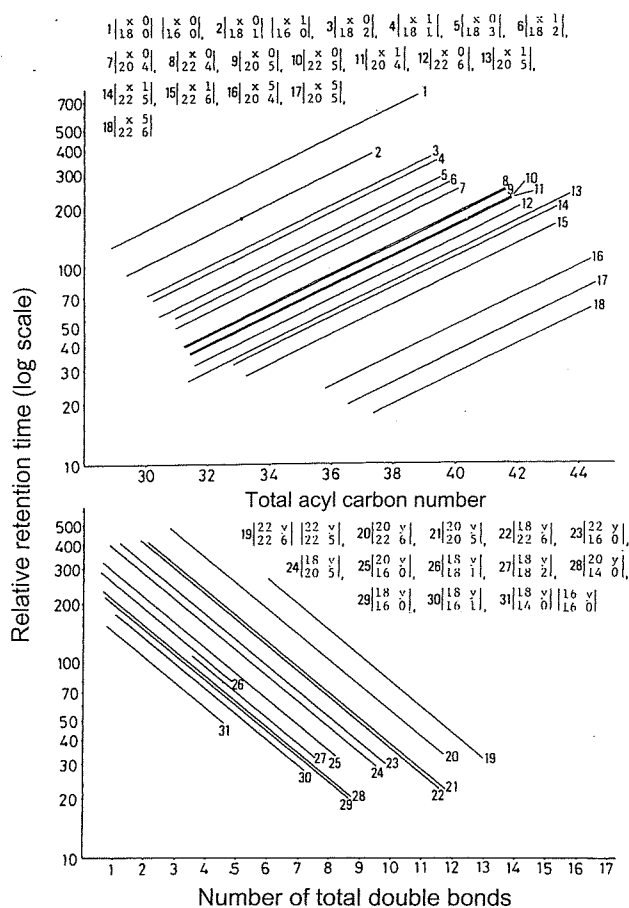


Fig. 3 Relationship between Relative Retention Time and Total Acyl Carbon Number and Relationship between Relative Retention Time and Total Double Bonds of Phospholipid Molecular Species on Reverse Phase HPLC<sup>1)</sup>. Natural occurring PCs were derived into acetyl diacylglycerols and then injected into the same HPLC system as in Fig. 1. (x and y are variables of acyl carbon number and number of double bonds, respectively. For example, x can take 14, 16, 18, 20, 22 ... and y can take 1, 2, 3, 4, 5 ...)

記は：

$$CN = p_1 \cdot \log(RRT) + q_1 \quad CN = \begin{vmatrix} x & d_1 \\ c_2 & d_2 \\ 2 & 0 \end{vmatrix} \dots (3)$$

$$DB = p_2 \cdot \log(RRT) + q_2 \quad DB = \begin{vmatrix} c_1 & y \\ c_2 & d_2 \\ 2 & 0 \end{vmatrix} \dots (4)$$

$$CN = p_1 \cdot \log(RRT) + q_1 \quad CN = \begin{vmatrix} x & d_1 \\ c_2 & d_2 \\ c_3 & d_3 \end{vmatrix} \dots (5)$$

$$DB = p_2 \cdot \log(RRT) + q_2 \quad DB = \begin{vmatrix} c_1 & y \\ c_2 & d_2 \\ c_3 & d_3 \end{vmatrix} \dots (6)$$

の一例に過ぎないと考えることができる。

これを確かめるため RRT 既知の各種 TG の分子種を Fig. 3<sup>1)</sup> と同様にプロットしたところ、実際にも Fig. 4<sup>3)</sup> に示した平行線群が得られ、(5) および (6) の関係が成り立つことが証明された。

一般に、溶質 A と B が同族体の関係にあり、A と B の分子構造上の差異が X であったとき、分配クロマトグラフィーにおいては：

$$(\Delta\mu_B / RT) = (\Delta\mu_A / RT) + (\Delta\mu_X / RT) \dots (7)$$

なる関係があることが知られている<sup>4)</sup>。ここで  $\mu$  はケミ

になる<sup>2)</sup>。

このアセチルジアシルグリセロールは *sn*-3 位のアシル基が最も短いトリアシルグリセロール (TG) の一形態であるといえることから、(3) および (4) は TG における一般則：

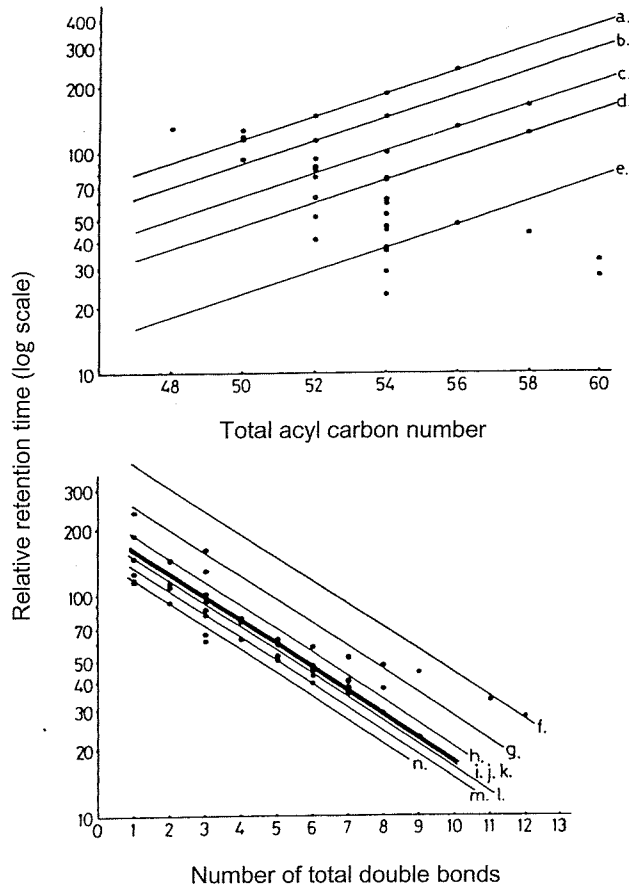


Fig. 4 Relationship between Relative Retention Time and Total Acyl Carbon Number and Relationship between Relative Retention Time and Total Double Bonds of Triacylglycerol Molecular Species on Reverse Phase HPLC<sup>3)</sup>.

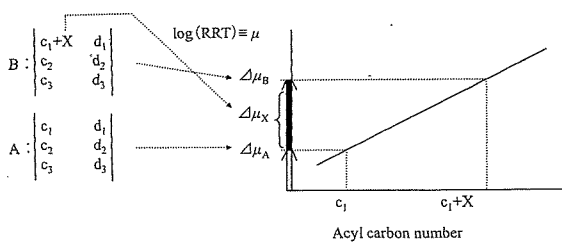
Natural occurring triacylglycerols were injected into the same HPLC system as in Fig. 1 except that acetone/acetonitrile (3 : 1, v/v) was used as eluting solvent.

a.	$\begin{vmatrix} 18 & 0 \\ 18 & 1 \\ x & 0 \end{vmatrix}$	$\begin{vmatrix} 18 & 1 \\ 18 & 1 \\ x & 0 \end{vmatrix}$	$\begin{vmatrix} 18 & 1 \\ 18 & 1 \\ x & 1 \end{vmatrix}$	$\begin{vmatrix} 18 & 1 \\ 18 & 2 \\ x & 1 \end{vmatrix}$	$\begin{vmatrix} x & 0 \\ 20 & 4 \\ 20 & 4 \end{vmatrix}$	$\begin{vmatrix} 20 & y \\ 20 & 4 \\ 20 & 4 \end{vmatrix}$	$\begin{vmatrix} 18 & y \\ 18 & 1 \\ 22 & 1 \end{vmatrix}$
h.	$\begin{vmatrix} 18 & 0 \\ 18 & 0 \\ 18 & y \end{vmatrix}$	$\begin{vmatrix} 18 & 1 \\ 18 & 1 \\ 18 & y \end{vmatrix}$	$\begin{vmatrix} 18 & 2 \\ 18 & 2 \\ 18 & y \end{vmatrix}$	$\begin{vmatrix} 18 & 3 \\ 18 & 3 \\ 18 & y \end{vmatrix}$	$\begin{vmatrix} 16 & 0 \\ 16 & 0 \\ 18 & y \end{vmatrix}$	$\begin{vmatrix} 16 & 0 \\ 16 & 0 \\ 18 & y \end{vmatrix}$	$\begin{vmatrix} 16 & 0 \\ 16 & 0 \\ 18 & y \end{vmatrix}$

(x and y are variables of acyl carbon number and number of double bonds, respectively. For example, x can take 14, 16, 18, 20, 22 ... and y can take 1, 2, 3, 4, 5 ...)

カルポテンシャルすなわち、固定相および移動相分子と溶質分子間に作用する van der Waals 力 (双極子効果, 誘起効果, 分散効果のポテンシャルエネルギー) の総和, R は気体定数, T は絶対温度を表している。温度が一定の場合, ある同族体分子のケミカルポテンシャルはその分子の相対保持時間 (RRT) の対数に比例することから, 溶質分子中の X 部分のケミカルポテンシャルの

大きさをわち log RRT への寄与率がわかれば, 任意の分子構造 (ただし同族体に限る) のケミカルポテンシャルがわかり, その RRT を算出できることになる。X が  $-CH_2-$  に相当するときはグリセロ脂質の 1 つのアシル基の炭素が 1 個ずつ増える度に  $-CH_2-$  分のケミカルポテンシャルが増大し (Fig. 5),  $-CH_2-$  の数のみが異なる他の分子種の log RRT とは単純な加法定理の関係にあるこ



$$\log \alpha_A = \frac{\Delta\mu_A}{R \cdot T}, \quad \log \alpha_B = \frac{\Delta\mu_B}{R \cdot T} = \frac{\Delta\mu_A}{R \cdot T} + \frac{\Delta\mu_X}{R \cdot T}$$

$$\log \left( \frac{\alpha_B}{\alpha_A} \right) = \log \alpha_B - \log \alpha_A = \frac{\Delta\mu_X}{R \cdot T}$$

R : Gas constant.  
 T : Abs. temp.  
 A,B : Substances which differ by the group X  
 μ : Chemical potential

Fig. 5 Relationship between the Increased Chemical Potential of a Certain Glycerolipid Molecular Species ( $\Delta\mu_B$ ) and that of the Original Glycerolipid Molecular Species ( $\Delta\mu_A$ ) in Accordance with the Increase in Chemical Potential ( $\Delta\mu_X$ ) due to Increase in Acyl Carbon Number.

とになる。また、Xが-CH=CH-に相当するときはグリセロ脂質の1つのアシル基の二重結合が1個ずつ増える度に-CH=CH-分のケミカルポテンシャルが減少し、-CH=CH-の数のみが異なる他の分子種のlog RRTとは負の加法定理が成り立つ関係 (Fig. 6) にある。すなわち：

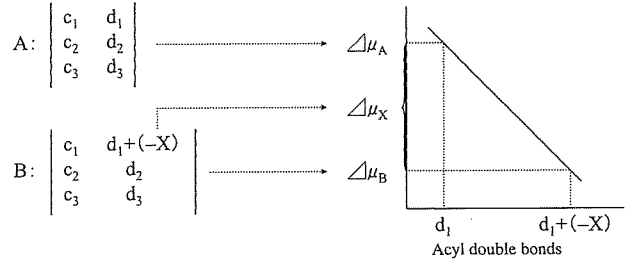
$$\text{CN} = p_1 \cdot \log(\text{RRT}) + q_1 \quad \text{CN} = \begin{vmatrix} c_1+x & d_1 \\ c_2 & d_2 \\ c_3 & d_3 \end{vmatrix} \dots\dots(8)$$

$$\text{DB} = p_2 \cdot \log(\text{RRT}) + q_2 \quad \text{DB} = \begin{vmatrix} c_1 & d_1+y \\ c_2 & d_2 \\ c_3 & d_3 \end{vmatrix} \dots\dots(9)$$

なる関係があることが明らかとなった。

よって、-CH<sub>2</sub>-分 ((8)式の中のx) もしくは-CH=CH-分 ((9)式の中のy) に相当するlog RRTの変化量がわかれば、所望分子種のRRTを予測することが可能である。

ケミカルポテンシャルの加法定理の考え方は、log RRTの変化量が一定でありさえすれば常に成り立つことを意味し、次のような発展的解釈を可能とする。たとえばトリパルミチンというTGの3つのパルミテートアシル基のうち、1つがオレエートアシル基に置き換わった際のトリパルミチンから、オレオイルジパルミチンへのlog RRTの変化量=オレオイルジパルミチンからパルミトイルジオレインへのlog RRTの変化量=パルミトイルジオレインからトリオレインへのlog RRTの変化量になることも意味する筈である。事実、これら4つのTG分子種はFig. 7<sup>5)</sup>のプロットにおいて、直線上に載ることが証明された。同様に、トリパルミチンからトリリノ



$$\log \alpha_A = \frac{\Delta\mu_A}{R \cdot T}, \quad \log \alpha_B = \frac{\Delta\mu_B}{R \cdot T} = \frac{\Delta\mu_A}{R \cdot T} + \left( -\frac{\Delta\mu_X}{R \cdot T} \right)$$

$$\log \left( \frac{\alpha_B}{\alpha_A} \right) = \log \alpha_B - \log \alpha_A = -\frac{\Delta\mu_X}{R \cdot T}$$

Fig. 6 Relationship between the Decreased Chemical Potential of a Certain Glycerolipid Molecular Species ( $\Delta\mu_B$ ) and that of the Original Glycerolipid Molecular Species ( $\Delta\mu_A$ ) in Accordance with the Decrease in Chemical Potential ( $-\Delta\mu_X$ ) due to Increase in Acyl Double Bonds.

レインへのlog RRTの変化量やトリパルミチンからトリリノレニンへのlog RRTの変化量においても、Fig. 7<sup>5)</sup>のプロットにおいて予想通り直線上に載る関係を示した。

この知見から下記の式(10)が成り立つことが導かれ、同様の考え方によって、以下<sup>6)</sup>の加法定理(11)~(14)も成り立ち、それぞれの脂質クラスの分子種のRRTを定められることが予測された。

$$(\Delta\mu_{\text{TG}} / RT) = (\Delta\mu_{\text{acyl}_1} / RT) + (\Delta\mu_{\text{acyl}_2} / RT) + (\Delta\mu_{\text{acyl}_3} / RT) \dots\dots(10)$$

$$(\Delta\mu_{\text{DG}} / RT) = (\Delta\mu_{\text{acyl}_1} / RT) + (\Delta\mu_{\text{acyl}_2} / RT) \dots\dots(11)$$

$$(\Delta\mu_{\text{PL}} / RT) = (\Delta\mu_{\text{acyl}_1} / RT) + (\Delta\mu_{\text{acyl}_2} / RT) \dots\dots(12)$$

$$(\Delta\mu_{\text{alkenylacyl}} / RT) = (\Delta\mu_{\text{alkenyl}} / RT) + (\Delta\mu_{\text{acyl}} / RT) \dots\dots(13)$$

$$(\Delta\mu_{\text{alkylacyl}} / RT) = (\Delta\mu_{\text{alkyl}} / RT) + (\Delta\mu_{\text{acyl}} / RT) \dots\dots(14)$$

(ここで、DGはジアシルグリセロール、PLはジアシルグリセロリン脂質、TGはトリアシルグリセロール、Rは気体定数、Tは絶対温度を指す)

事実、いくつかの実測<sup>7,8)</sup>において予想通りとなり、上記の加法定理が成り立つことが証明された。

これを応用すると、先ず単酸型の標品を用いて1残基分に相当するケミカルポテンシャルの大きさ(これをRelative Retention Potential Index: RPIと定義する)を求め、その値を活用して他の分子種分子の既知log RRTから引けば、残りの残基分に相当する未知のRPIを求めることができ、次々と未知の分子種のRRTを予測できることになる。具体的には、たとえばTGでは次のようにケミカルポテンシャルの加法定理を活用できた。今仮にトリイコサペンタエノインのlog RRTを100と置くと、イコサペンタエン酸(20:5n-3)1残基

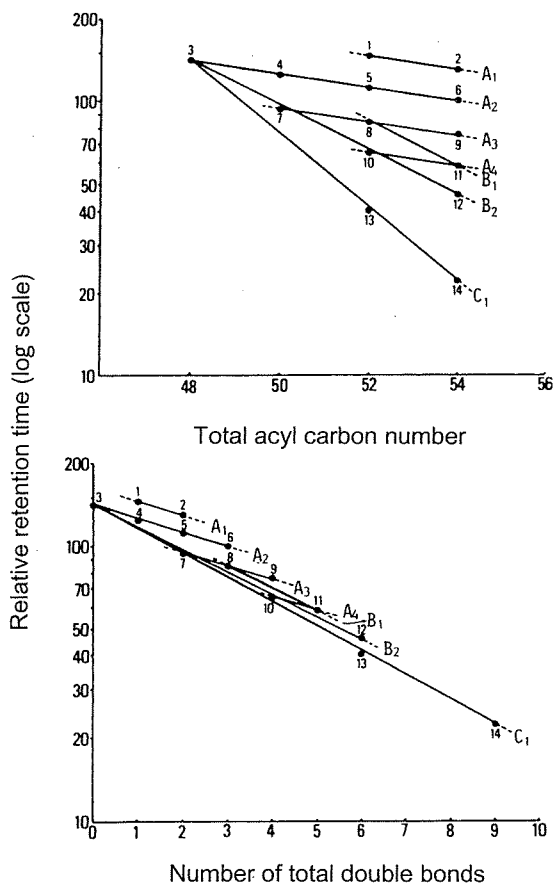


Fig. 7 Relationship between Relative Retention Time of a Molecular Species of a Triacylglycerol versus Total Acyl Carbon Number or Number of Total Double Bonds when the Fatty Acid Residue is Substituted<sup>5)</sup>.

Lines from A<sub>1</sub> to A<sub>4</sub> demonstrate the lines of 16:0 → 18:1 substitution.

Lines B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> demonstrate the lines of 16:0 → 18:2 substitution.

Line C<sub>1</sub> demonstrates the line of 16:0 → 18:3 substitution.

Lines are:

A<sub>1</sub>: (18:0, 16:0, 18:1n-9) → (18:0, 18:1n-9, 18:1n-9)

A<sub>2</sub>: (16:0, 16:0, 16:0) → (16:0, 16:0, 18:1n-9) → (16:0, 18:1n-9, 18:1n-9) → (18:1n-9, 18:1n-9, 18:1n-9)

A<sub>3</sub>: (16:0, 16:0, 18:2n-6) → (18:2n-6, 16:0, 18:1n-9) → (18:2n-6, 18:1n-9, 18:1n-9)

A<sub>4</sub>: (16:0, 18:2n-6, 18:2n-6) → (18:1n-9, 18:2n-6, 18:2n-6)

B<sub>1</sub>: (18:2n-6, 16:0, 18:1n-9) → (18:1n-9, 18:2n-6, 18:2n-6)

B<sub>2</sub>: (16:0, 16:0, 16:0) → (16:0, 16:0, 18:2n-6) → (16:0, 18:2n-6, 18:2n-6) → (18:2n-6, 18:2n-6, 18:2n-6)

C<sub>1</sub>: (16:0, 16:0, 16:0) → (16:0, 16:0, 18:3n-3) → (16:0, 18:3n-3, 18:3n-3) → (18:3n-3, 18:3n-3, 18:3n-3)

Points are:

1.(18:0, 16:0, 18:1n-9), 2.(18:0, 18:1n-9, 18:1n-9), 3.(16:0, 16:0, 16:0), 4.(16:0, 16:0, 18:1n-9), 5.(16:0, 18:1n-9, 18:1n-9), 6.(18:1n-9, 18:1n-9, 18:1n-9), 7.(16:0, 16:0, 18:2n-6), 8.(18:2n-6, 16:0, 18:1n-9), 9.(18:2n-6, 18:1n-9, 18:1n-9), 10.(16:0, 18:2n-6, 18:2n-6), 11.(18:1n-9, 18:2n-6, 18:2n-6), 12.(18:2n-6, 18:2n-6, 18:2n-6), 13.(16:0, 18:3n-3, 18:3n-3), 14.(18:3n-3, 18:3n-3, 18:3n-3)

当たりの RPI は  $(\log 100.0)/3=0.667$  と求められる。同じクロマトグラム上で、トリオレインよりオレイン酸 (18:1n-9) 1 残基当たりの RPI は  $(\log 952.8)/3=0.993$  となる。このようにして、単酸型の既知分子種の  $\log RRT$  から相当数の構成脂肪酸残基の RPI ( $\omega$  異性体は僅かながら異なった RPI を持つ) を算出できるが、たとえばトリドコサヘキサエノインのように標品の入手が比較困難な場合には 22:6n-3 と 20:5n-3 の双方を含む  $\log RRT$  が既知の混酸型分子種ピークの  $\log RRT$  を頼り

に、(22:6n-3) 1 残基当たりの RPI を求めることができる。すなわち、ジイコサペンタエノイルドコサヘキサエノイン (22:6n-3, 20:5n-3, 20:5n-3) の RRT が 106.1 であることから  $\log RRT=2.026$  が求められ、 $2.026=(22:6n-3)$  1 残基当たりの RPI+0.667+0.667 の関係があることから、(22:6n-3) 1 残基当たりの RPI= $2.026-0.667-0.667=0.692$  と算出される。

これら 3 種だけの脂肪酸残基の RPI 情報を用いただけでも、(22:6n-3, 22:6n-3, 22:6n-3), (22:6n-3,

22:6n-3, 20:5n-3), (22:6n-3, 22:6n-3, 18:1n-9), (20:5n-3, 20:5n-3, 18:1n-9), (22:6n-3, 20:5n-3, 18:1n-9), (22:6n-3, 18:1n-9, 18:1n-9), (20:5n-3, 18:1n-9, 18:1n-9), (18:1n-9, 18:1n-9, 18:1n-9) の RRT をすべて求めることが可能である。たとえば (22:6n-3, 20:5n-3, 18:1n-9) の場合は,  $\log RRT=0.692+0.667+0.993$  となり, RRT を求めると, 224.9 になる。基準にしたトリコサペンタエノインの RRT は 100 であるが, Fig. 8<sup>7)</sup> のスナガレイ TG における実際の溶出時間は 7.06 分であることから, (22:6n-3, 20:5n-3, 18:1n-9) の溶出時間は  $7.06 \times 224.9 / 100 = 15.88$  分と計算される。Table 1<sup>7)</sup> にケミカルポテンシャルの加法定理を活用して求めた 1 残基当たりの RPI, Table 2<sup>7)</sup> には Fig. 8<sup>7)</sup> の各主要分子種ピークの実測溶出時間と, 上記計算による予想溶出時間を示した。この結果では実測溶出時間と予想溶出時間との相対的な差は,  $\approx 0 \sim 2.7\%$  であった。

一般に TG では sn-1 位と 2 位, もしくは 2 位と 3 位のアシル基が置き換わった分子種間の分離は困難であるが, DG や PL ではリバースアイソマーの分離が可能である。このことは次のように説明できた。

各アシル基のケミカルポテンシャルの加法定理は

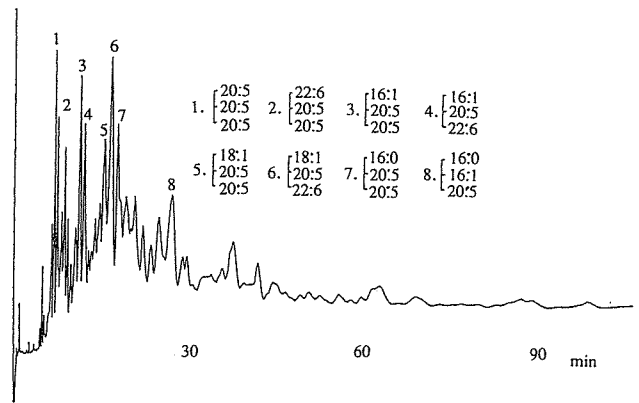


Fig. 8 Prominent Molecular Species of Sand Flounder Muscle PC on Reverse Phase HPLC<sup>7)</sup>. Same HPLC system was used as in Fig. 4 except that single 4 × 250 mm Supersphere RP-18 non end cap column was used.

$\Delta\mu_{TG}$  では誤差がほとんどなく成り立つが, sn-3 位が極度に短いリン脂質の誘導体ではグリセロール骨格に結合している 3 炭素鎖原子団間の 3 次元的均衡性が悪く, そのため各元素の電子による反発力 (クーロン力) が最小になるようにコンフォメーションが変化する。この変化

Table 1 Contribution Potential toward log RRT\* of the Individual Triacylglycerol Molecular Species on Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography<sup>7)</sup>.

Fatty acid residue	Contribution potential toward log RRT*	Fatty acid residue	Contribution potential toward log RRT*
14:0	0.847	18:2n-6	0.861
16:0	1.033	18:3n-3	0.740
18:0	1.178	20:3n-3	0.834
16:1n-9	0.861	20:4n-6	0.781
18:1n-9	0.993	20:5n-3	0.667
		22:6n-3	0.692

\*We defined this as relative retention potential index (RPI) in the text.

Table 2 Comparison of the Predicted and the Empirically Determined log RRT of the Individual Triacylglycerol Molecular Species on Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography<sup>\*1)</sup>.

Peak No.	Molecular species	Predicted retention time (min)	Empirically determined retention time (min)	Relative deviation
1	(20:5n-3, 20:5n-3, 20:5n-3) <sup>*2)</sup>	—	7.06	—
2	(22:6n-3, 20:5n-3, 20:5n-3) <sup>*2)</sup>	—	7.46	—
3	(16:1n-9, 20:5n-3, 20:5n-3)	11.06	11.05	0.1%
4	(16:1n-9, 20:5n-3, 22:6n-3)	11.72	11.77	0.4%
5	(18:1n-9, 20:5n-3, 20:5n-3)	14.99	14.89	0.7%
6	(18:1n-9, 20:5n-3, 22:6n-3)	15.88	15.94	0.4%
7	(16:0, 20:5n-3, 20:5n-3)	16.44	16.89	2.7%
8	(16:0, 16:1n-9, 20:5n-3)	25.69	25.70	$\approx 0\%$

\*1 See Fig. 8<sup>7)</sup>.

\*2 Standard (reference) peaks.

は当然 van der Waals 力に影響を与えることになる。一方、アシルグリセロールを構成する原子団として、メチルユニット(飽和炭素部)、エチレンユニット(不飽和部)、カルボニルエステルユニット(-CO-O-)が存在する。これらのうちメチルユニットは極性がほとんどないが、エチレンユニットおよびカルボニルエステルユニットは極性を有する。したがって、逆相クロマト系におけるアシルグリセロールの分離は、固定相および移動相と上記原子団との双極子引力の差に依存する。分子内に双極子モーメントを有する極性基が複数存在する場合、分子全体としての双極子モーメントは、近似的にこれらの基能率の和(空間ベクトルの加算則)で与えられる。すなわち、各極性基の双極子モーメントを  $\mu'_1$ ,  $\mu'_2$  とし、これらのなす方向角を  $\theta$  とすると、分子全体としての双極子モーメント  $\mu'$  は次式で近似される。

$$\mu' = \sqrt{\mu'_1 + \mu'_2 + 2\mu'_1\mu'_2 \cos\theta}$$

この式より、 $\mu'_1$  と  $\mu'_2$  の方向が同一( $\theta=0$ )のときのみ  $\mu' = \mu'_1 + \mu'_2$  が成立するが、 $\mu'_1$  と  $\mu'_2$  の方向が異なる場合には一般に  $\mu' < \mu'_1 + \mu'_2$  となることが導かれる。不飽和脂肪酸の場合、二重結合の数が多くなるにしたがってアシル基の折れ曲がりの度合いが大きくなり、二重結合数が4以上にもなると、馬蹄形に近い形状になるので、二重結合数が多い時は  $\mu' \ll \mu'_1 + \mu'_2$  となり、予測直線の傾きよりも幾分小さくなると考察される。事実、PLをジニトロベンゾイル誘導体にして非極性化した各分子種ピークのRRTとアシル基の総炭素数およびRRTとアシル基の総二重結合数との関係について  $sn-1$  位と2位を区別してプロットしたところ、Fig. 9<sup>9)</sup> のように  $sn-2$  位の高度不飽和領域で、ケミカルポテンシャルの加法定理による予測直線の傾きよりも実際には幾分小さくなることが判明した。たとえば Fig. 9<sup>9)</sup> の点48と49を結ぶ線や点51と52を結ぶ線の傾きが幾分小さくなることを認めた。

### 3 グリセロ脂質分子種のクロマトグラフィーにおける低温化の影響

本研究では融点の低い水産グリセロ脂質の分子種分析において、クロマトカラムの低温化が分離度の改善に大きく寄与し、低温化に伴う理論段数の低下を上回る分離改善効果があることを見出した。すなわち、20:5n-3および22:6n-3より成る合成TG分子種においては、アセトン/アセトニトリル(3:1, v/v)を移動相とした時、Fig. 10<sup>10)</sup> に示すように-15°C付近に分離度(Rs)が最良になる極大点が見られた。この極大点の存在は、Rsを示す下記式からも証明された。

$$Rs = (1/4)(\alpha-1)\sqrt{N_1} \delta$$

すなわち、この式で  $\delta = k_1/(k'+1)$  と定義し、 $k'$  が容

量比、 $k_1$  がバンド1の容量比、 $\alpha = k_2/k_1$  が分離係数、 $N$  が理論段数を表すとき、 $\alpha-1$ の項において、 $\alpha$  をカラム温度  $T$  で微分すると  $\partial\alpha/\partial T < 0$  になることより、カラム温度を下げると  $\alpha$  の値が大きくなり、Rsも向上することが導かれた。一方、カラム温度が臨界温度( $\partial N/\partial T=0$ )以上の領域では  $N_1$  の項において  $\partial N/\partial T < 0$  になり、臨界温度以下では  $\partial N/\partial T > 0$  になった。このことから、カラム温度が臨界温度までは低いほど理論段数が上がり、Rsも向上するが、臨界温度以下になると、カラム温度を下げることにより、理論段数が悪化することが示された。 $\delta$ の項においては  $\delta$  をカラム温度  $T$  で微分すると  $\partial\delta/\partial T < 0$  になることから、カラム温度を下げることにより、 $\delta$  の値が大きくなり、Rsも向上することが導かれた。以上のことから、カラム温度が臨界温度( $\partial N/\partial T=0$ )に到達するまでは、カラム温度が低い程  $\alpha-1$  の項、 $N_1$  の項、 $\delta$  の項すべてがより大きな値をとることになり、臨界温度直前でRsが最大になる<sup>11)</sup>。アセトン/アセトニトリル(3:1, v/v)を移動相とした時には-15°C付近に臨界カラム温度があったが、実際のHPLC分析においては、試料脂質の溶解度と融点を考慮した最低温度が至適クロマト温度ということになる。

### 4 水産リン脂質分子種の特徴および改質

先の魚類筋肉PCの分子種を明らかにしていく中で、共通の特色として、次のことを見出した<sup>12)</sup>。

- ① ( $sn-1$  位 16:0,  $sn-2$  位 22:6n-3) の分子種が最も多い魚種が大半を占める。
- ② ( $sn-1$  位 16:0,  $sn-2$  位 20:5n-3) は平魚に多い。
- ③ 高度不飽和脂肪酸同士の分子種である (20:5n-3, 22:6n-3), (22:6n-3, 22:6n-3) および (20:5n-3, 20:5n-3) も海産魚では確実に含まれているが、(20:5n-3, 20:5n-3) は非常に少ない。
- ④ シロサケは河川に遡上すると、著しく ( $sn-1$  位 16:0,  $sn-2$  位 22:6n-3) および ( $sn-1$  位 16:0,  $sn-2$  位 20:5n-3) の組成比が減少する。

一方、無脊椎動物のイカでは顕著に ( $sn-1$  位 16:0,  $sn-2$  位 22:6n-3) が多く、これを基質として  $sn-1,3$  位選択性リパーゼまたはホスホリパーゼ  $A_1$  を作用させると、 $sn-1$  位の 16:0 を選択的に遊離させることができ、 $sn-2$  位 22:6n-3 (DHA) 結合型リゾPCを得ることができる。このリン脂質は著しくDHAの含量が高くなる (Table 3<sup>3)</sup>) ことから、今後多方面での応用が期待される。

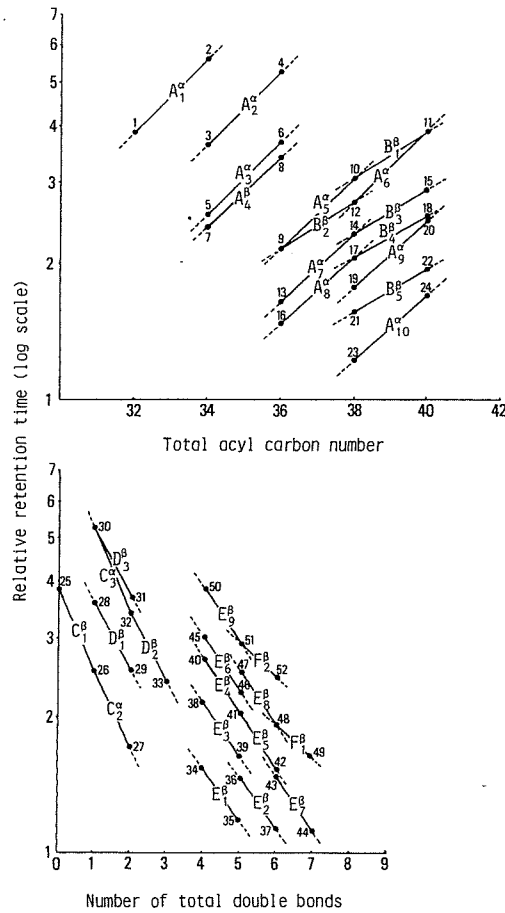


Fig. 9 Relationship between Relative Retention Time of Molecular Species of Diacylglycerolipid in the Form of Dinitrobenzoyl Derivative versus Total Acyl Carbon Number or Number of Total Double Bonds on Reverse Phase HPLC<sup>9)</sup>.

Retention time of (12 : 0, 12 : 0) is regarded as 1.00.

The superscript on the alphabet shows the acyl carbon number or number of double bonds substituted position ( $\alpha$  for *sn*-1 and  $\beta$  for *sn*-2).

Lines A and B are for the acyl carbon number substitutions, and lines from C to F are for the acyl double bonds substitutions.

Lines with the same alphabet are parallel to each other though there is a slight difference between that for *sn*-1 and that for *sn*-2 positions; The *sn*-1, 2- and the *sn*-1, 3- positional isomers are all discriminated here.

Points are:

- 1.(16 : 0, 16 : 0), 2.(18 : 0, 16 : 0), 3.(16 : 0, 18 : 1n-9), 4.(18 : 0, 18 : 1n-9), 5. (16 : 0, 18 : 2n-6), 6.(18 : 0, 18 : 2n-6), 7.(18 : 1n-9, 16 : 1n-9), 8.(18 : 1n-9, 18 : 1n-9), 9.(16 : 0, 20 : 4n-6), 10.(18 : 0, 20 : 4n-6), 11.(18 : 0, 22 : 4n-6), 12.(16 : 0, 22 : 4n-6), 13.(16 : 0, 20 : 5n-3), 14.(18 : 0, 20 : 5n-3), 15.(18 : 0, 22 : 5n-3), 16.(16 : 1n-9, 20 : 4n-6), 17.(18 : 1n-9, 20 : 4n-6), 18.(18 : 1n-9, 22 : 4n-6), 19.(16 : 0, 22 : 6n-3), 20.(18 : 0, 22 : 6n-3), 21.(18 : 1n-9, 20 : 5n-3), 22.(18 : 1n-9, 22 : 5n-3), 23.(16 : 1n-9, 22 : 6n-3), 24.(18 : 1n-9, 22 : 6n-3), 25.(16 : 0, 16 : 0), 26.(16 : 0, 16 : 1n-9), 27.(16 : 1n-9, 16 : 1n-9), 28.(16 : 0, 18 : 1n-9), 29.(16 : 0, 18 : 2n-6), 30.(18 : 0, 18 : 1n-9), 31.(18 : 0, 18 : 2n-6), 32.(18 : 1n-9, 18 : 1n-9), 33.(18 : 1n-9, 18 : 2n-6), 34.(14 : 0, 20 : 4n-6), 35.(14 : 0, 20 : 5n-3), 36.(16 : 1n-9, 20 : 4n-6), 37.(16 : 1n-9, 20 : 5n-3), 38.(16 : 0, 20 : 4n-6), 39.(16 : 0, 20 : 5n-3), 40.(16 : 0, 22 : 4n-6), 41.(16 : 0, 22 : 5n-3) and (18 : 1n-9, 20 : 4n-6), 42.(18 : 1n-9, 20 : 5n-3), 43.(18 : 2n-6, 20 : 4n-6), 44.(18 : 2n-6, 20 : 5n-3), 45.(18 : 0, 20 : 4n-6), 46.(18 : 0, 20 : 5n-3), 47.(18 : 1n-9, 22 : 4n-6), 48.(18 : 1n-9, 22 : 5n-3), 49.( 18 : 1n-9, 22 : 6n-3), 50.(18 : 0, 22 : 4n-6), 51.(18 : 0, 22 : 6n-3), 52.(18 : 0, 22 : 6n-3)

## 5 主要水産リン脂質分子種-DHA 結合型リン脂質の合成と応用

### 5.1 DHA 結合型リン脂質の合成

水産リン脂質で最も多い分子種は *sn*-2 位 DHA 結合型の分子種である。この分子種は魚油の加水分解物から

高度に DHA の純度を上げた混合脂肪酸を大豆レシチン由来のリゾレシチンにエステル結合させることによって合成できる。このエステル合成反応は、用いるホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 剤の活性化と、エステル合成反応の進行に伴って生成する水分の除去を確実に行うことが鍵となる。ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 剤は水分の添加によって活性化

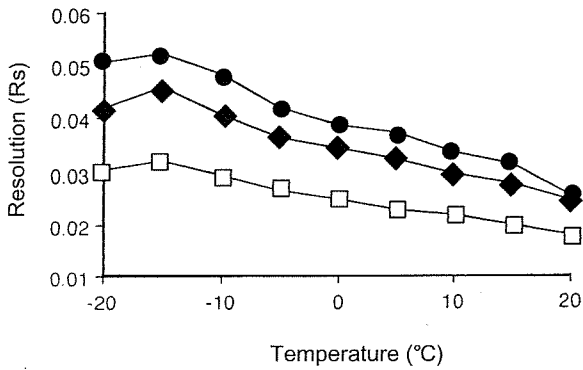


Fig. 10 Relationship between Resolution Value ( $R_s$ ) and Temperature of the Column on Reverse Phase HPLC.<sup>10)</sup> Each symbol represents means of ten chromatographic runs. Same HPLC system was used as in Fig. 8.  
 □:  $R_s$  between (20:5n-3, 20:5n-3, 20:5n-3) and (20:5n-3, 20:5n-3, 22:6n-3).  
 ◆:  $R_s$  between (20:5n-3, 20:5n-3, 22:6n-3) and (20:5n-3, 22:6n-3, 22:6n-3).  
 ●:  $R_s$  between (20:5n-3, 22:6n-3, 22:6n-3) and (22:6n-3, 22:6n-3, 22:6n-3).

Table 3 Fatty Acid Composition of the Substrate Squid PC and the Produced LPC after Partial Hydrolysis in Super Critical Carbon Dioxide Medium.<sup>13)</sup>

Fatty acids	Substrate squid PC	Produced LPC
14:0	1.62	0.13
16:0	34.03	0.83
16:1n-9	0.58	0.06
18:0	1.35	1.01
18:1n-9	2.94	0.13
20:0	0.03	0.13
20:4n-6	0.92	0.91
20:5n-3	8.40	10.82
22:6n-3	39.90	83.93

するが、添加した水分自体がエステル結合を切る求核的な働きをしてしまうため、結局反応平衡が合成側に進まない。そこで、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 剤を活性化しても、エステル結合を切る求核的な作用をしない物質の利用を考えた。この条件を満足する種々の高誘電率物質について試したところ、ホルムアミドが反応初速度を効果的に高め、反応をエステル合成側にシフトすることがわかった。しかし、その場合でも収率は45%前後に留まった<sup>14)</sup>ことから、エステル合成反応の後期ではホルムアミドが過剰になっていることが推察された。そこで、減圧下においてエステル合成反応を行うことにより、反応初期においては十分量のホルムアミドによって反応初速度を高めつつ、中後期ではホルムアミドの含量を下げることで反応平衡をエステル合成側にシフトさせることを試みたところ、Fig. 11<sup>15)</sup> のように90モル%の収率を得るに至った。

### 5.2 DHA 結合型リン脂質の機能の応用

DHA 結合型リン脂質の有用機能として先ず明らかになったことは、細胞分化誘導剤とともに浮遊性のガン細胞に作用させた際にみられる細胞分化誘導促進機能<sup>16-18)</sup>である。ガン細胞が分化すると、暴走的な増殖が止まり、やがてガン細胞は死滅する。その後 Caco-2 細胞のごとき接着性のガン細胞に対しても、同様の細胞分化誘導促進機能が認められ、Caco-2 細胞に対してはとくにホスファチジルセリン (PS) 形態の DHA 結合型リン脂質が細胞分化誘導促進機能に優れることが判明した<sup>19, 20)</sup>。すなわち、20:5n-3 (IPA) 8.4%, DHA 40.7% を含むイカ PC からホスファチジル基転移反応により PS を調製して、酪酸ナトリウムの細胞分化誘導作用に対する促進効果を調べたところ、酪酸ナトリウムの単独添加に比して DHA 結合型 PS を併用することにより、分化の1指標であるアルカリホスファターゼ活性が約2倍に上がることが認められた。このような細胞分化誘導促進機能による制ガン作用に加え、その後 DHA 結合型リン脂質のうち、とくに DHA 結合型 PE は浮遊性のガン細胞に対して *c-myc* ガン遺伝子の過剰発現を抑制することが示唆された<sup>21-23)</sup>。In vivo の実験では、DHA 結合型リン脂質をリポソーム化することにより、それを皮下注射した繊維肉肉腫 (Meth A) のマウス (Fig. 12<sup>24-28)</sup>) や経口投与した骨髄腫 (sp2) のマウスに対しての抗腫瘍性<sup>29-31)</sup>が認められた。興味深いことに、アガリクスの水抽出物のごとき免疫賦活性物質を DHA 結合型リン脂質リポソームに内包化すると、加算効果的にマウスに対する抗

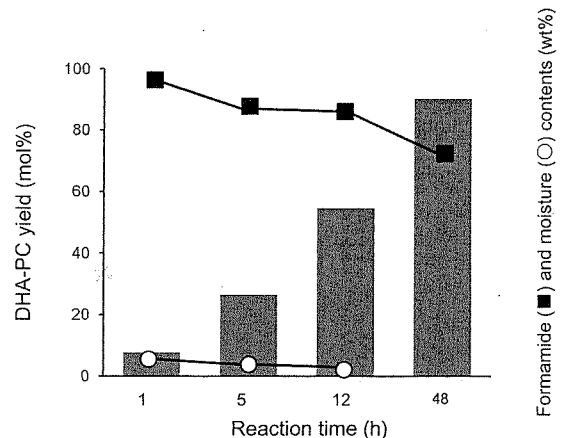


Fig. 11 Relationships between the Desired DHA Bounded PC Yield versus Moisture Content, and Formamide Content on Phospholipase A<sub>2</sub> Mediated Esterification System<sup>15)</sup>. Reaction mixture: lyso PC 110 mg, DHA 180 mg, glycerol 5,500 mg, phospholipase A<sub>2</sub> 60 mg, CaCl<sub>2</sub> 3 μmol, formamide 0.5 mL. Reaction condition: 40°C, 48 h, decompression (132-165 Torr).

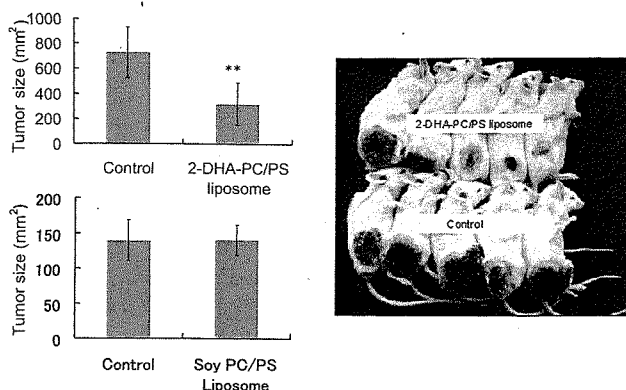


Fig. 12 Antitumor Effect of DHA Bounded Phospholipid and Soy Phospholipid Liposomes on Meth-A Fibrosarcoma-bearing BALB/c Mice<sup>24-28</sup>. PS: phosphatidylserine prepared by transphosphatidylation of PC. Data are shown as means  $\pm$ S.D. (n=6) \*\**P* < 0.01 versus Control.

腫瘍性が向上することが認められ (Fig. 13<sup>29</sup>), また DHA 結合型リン脂質リポソームを単にキトサンと混合しただけでも, 加算効果的に抗腫瘍性が向上することも確認された (Fig. 14)。通常, リン脂質リポソーム液にキトサン溶液を滴下させることによって, キトサンコートリポソームを調製するが, 単に両者を混合しただけでも, 時間がたてばキトサンがコーティングされてしまう。このことから, Fig. 14においてキトサンコートリン脂質リポソームと, キトサン溶液とリポソーム液の単純混合系との間で, 抗腫瘍性に差がなかったのは, 単純混合系においてもキトサンコートリン脂質リポソームが結果的にできてしまったためと推察された。両者の併用による加算的效果はキトサンコートにより, 小腸上皮に付着し易くなることで効率的にリポソームが取り込まれるようになったため<sup>32</sup>) と思われる。Fig. 12<sup>24-28</sup>) において抗腫瘍性が発現した理由には少なくとも2つのことが考えられた。すなわち, 当該リポソームには DHA 結合型 PS を添加していたためにマクロファージがこれを貪食し活性化したこと, および当該リポソームがガン細胞に取り込まれることによって, ガン細胞の生体膜に何らかの変化をきたし, 結果的に生細胞数の減少 (Fig. 15<sup>26</sup>) を招いたことである。事実, 大豆リン脂質 (リノール酸結合型 PC + リノール酸結合型 PS) リポソームを比較対照として両リポソームをマクロファージ様 J774-1 細胞に添加して培養し, ラテックスビーズを対象とした貪食能および貪食を開始した J774-1 細胞の割合を求めた結果, DHA 結合型リン脂質 (DHA 結合型 PC + DHA 結合型 PS) リポソームを添加した J774-1 マクロファージ様細胞は未添加の細胞よりもより多くのラテックスビーズを取り込み (Fig. 16<sup>26</sup>), また Table 4<sup>26</sup>) に示した

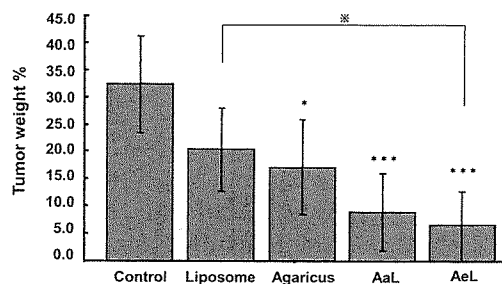


Fig. 13 Changes in Tumor Weight % against Body Weight of Myeloma sp2 Bearing BALB/c Mice on Agaricus Encapsulated Squid PC/PS Liposomes Therapy<sup>29</sup>. Squid phospholipid is exclusively rich in DHA bounded PC.

The following samples were administrated 20 days after myeloma sp2 tumor ( $1.5 \times 10^5$  cells) implantation. Liposome: Squid PC/PS liposomes (1.0 mg/mL), Agaricus: Agaricus water extract (0.5 mg/mL), AaL: Agaricus (0.5 mg/mL) and squid PC/PS liposome (1.0 mg/mL) mixture, and AeL: Agaricus (0.5 mg/mL) encapsulated squid PC/PS liposomes (1.0 mg/mL as phospholipids) were all administrated in the same term from days 0 to 21. Significance relative to control is indicated by asterisks (\**p* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001) and squid PC/PS liposome versus Agaricus encapsulated liposomes by (\**P* < 0.05), ANOVA (n=7).

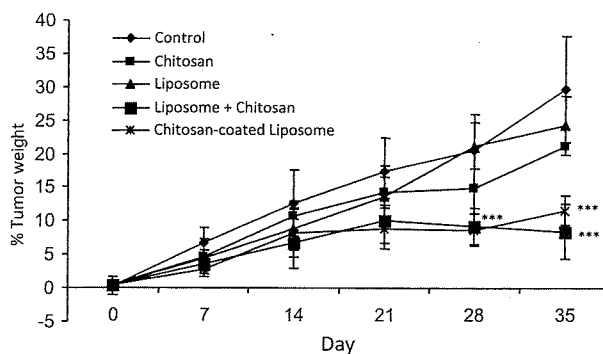


Fig. 14 Tumor Weight % against Body Weight of Myeloma sp2 Bearing BALB/c Mice on Chitosan Coated Squid PC/PS Liposomes Therapy.

Control: distilled water served, Liposome: 1.0 mg/mL squid phospholipids liposome (PC/PS/Cholesterol=9/1/10 molar ratio) served, Chitosan: 5.0 mg/mL chitosan served, Liposome+Chitosan: chitosan (5 mg/mL)+squid phospholipid (1 mg/mL) liposome mixture served, and Chitosan coated Liposome: chitosan-coated (5 mg/mL) squid phospholipid liposome (1 mg/mL) served.

ように, 貪食を開始した J774-1 細胞の割合も大豆リン脂質リポソームを添加した J774-1 マクロファージ様細胞よりも多いことを認めた。リポソームの酸化度が変わっても, DHA 結合型リン脂質リポソームを取り込んだ J774-1 細胞の方が常に大豆リン脂質リポソームを取り込んだ細胞よりもより多くのラテックスビーズを貪食

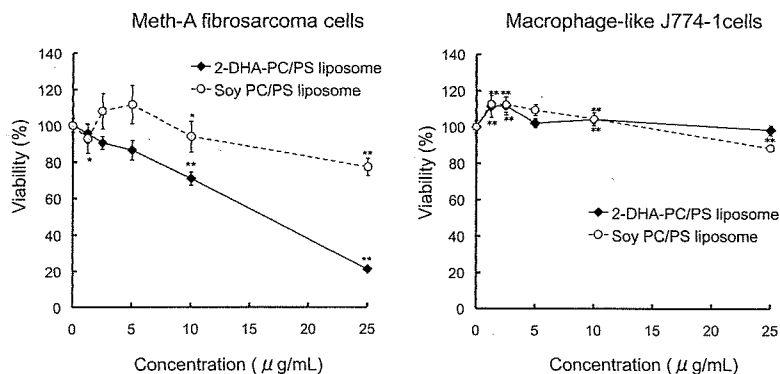


Fig. 15 Effect of DHA Bounded Phospholipid and Soy Phospholipid Liposomes on Viability of Meth-A Fibrosarcoma Cells and Macrophage-like J774-1 Cells<sup>26)</sup>. Data are shown as means  $\pm$  S.D. (n=6) \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  versus 0  $\mu\text{g/mL}$

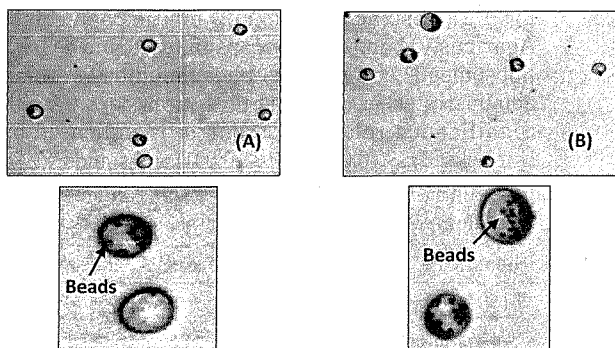


Fig. 16 Enhancement of Phagocytic Effect of DHA Bounded Phospholipid Liposomes on Macrophage-like J774-1 Cells<sup>26)</sup>. (A): Control, (B): DHA bounded PC/PS liposome added (10 mg/mL).

し、かつ貪食を開始した J 774-1 細胞の割合も多かったことには変わりはなく、単なる脂質酸化物量の違いに基づく刺激効果の差異によるものではないことが推察された。一方、Fig. 13 の経口投与においては DHA 結合型リン脂質リポソームに含まれる DHA 結合型 PS が小腸上皮の M 細胞に認識されて取り込まれている可能性が考えられた。そこで、M 細胞を発現した小腸上皮細胞モデル

を構築し、DHA 結合型 PC のみより成るリポソームと DHA 結合型 PC + DHA 結合型 PS リポソームそれぞれの M 細胞を介した透過について蛍光物質 (カルセイン) を内包させて調べたところ、予想通り DHA 結合型 PC + DHA 結合型 PS リポソームの M 細胞を介した透過の方が、DHA 結合型 PC のみより成るリポソームよりも内包物が多く透過することが認められた。しかし、さらにジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG) を二重膜に組み込んだリポソームでは、DHA 結合型 PS の透過促進効果がみられなくなってしまった。DGDG はヘパリンのごとき水溶性難吸収物質の腸管吸収性を向上させることで知られるが、DHA 結合型リン脂質との共存では PS の M 細胞を介した透過促進性を損なっている可能性が示唆された。これらの結果は腸管を介した物質吸収・透過が非常に複雑であることを示す一端となった。複合脂質の吸収、透過に関しては「リゾ型リン脂質と遊離脂肪酸に分かれて吸収される」と教科書的にはいわれているが、その実ほとんど何もわかっていない。脂質クラスの違いのみならず、分子種の違いによっても取り込まれ方が異なることが考えられる。複合脂質の腸管吸収は最も未解明な領域の一つであり、今後の研究進展

Table 4 Phagocytic Enhancement of Macrophage-like J774-1 Cells Induced by Liposomes<sup>26)</sup>.

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Soy PC/PS liposome				2-DHA-PC/PS liposome			
	(A)	(%)	(B)	(%)	(A)	(%)	(B)	(%)
0	55.0	100.0	12.1	100.0	55.0	100.0	12.1	100.0
5	56.3	102.3	12.0	99.6	60.0	109.1	13.4	110.7
10	74.3	135.1	11.8	98.2	84.6	153.8	14.0	115.6
25	78.3	142.3	11.9	98.5	96.6	175.7	15.2	126.1

(A) Number of phagocytic cells/300 cells  $\times$  100 (%)  
 (B) Number of beads/Individual phagocytic cells

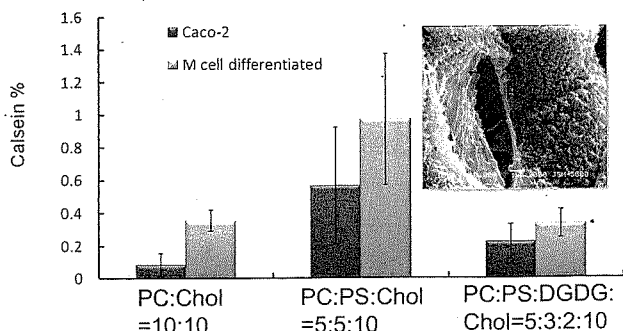


Fig. 17 Transport of Calsein Encapsulated in PS or Digalactosyl Diacylglycerol (DGDG) Implanted Squid Phospholipid Liposomes through M Cells which had Differentiated from Small Intestinal Epithelial Caco 2 Cell Model. Left hand magnified cell with a cave in the inserted picture must be M cell.

が強く望まれる。

### 6 おわりに

本研究における分子種同定の理論的基盤になったのは、60年近くも以前に発表された A.J.P. Martin の法則 (ノーベル賞授賞) である。ペーパークロマトグラフィーで築かれたこの理論は、機器分析が著しく発展した今日においてもまったく色褪せておらず、むしろ分解能が向上したことによってもたらされる分子種の分析結果を保証する理論的ツールにさえ成り得るようになった。今後、グリセロ脂質の分子種分析において、実測データを裏付ける根拠として、A.J.P. Martin の法則を基盤とした本研究の予測法が導入されることを期待したい。そしてこれによって将来は分子種の容易なルーチン分析が可能となり、新次元の動的研究に発展していくことが期待される。

#### 謝辞

水産グリセロ脂質の分子種分析を研究テーマとして与えて下さったのは、生涯の恩人である故座間宏一北大名誉教授である。ここに改めて深甚なる謝意を表す。本研究は細川雅史博士、栗原秀幸博士、福永健治博士、佐々木甚一博士の力無くしては成し得ず、また平野次彦氏、蛭名秀昭氏、江木衷氏、藤本章人氏、村川健太郎氏、岩倉和彦氏、内藤裕久氏他大勢の院生・学生諸氏からは計り知れないほどのお骨折りを賜った。ここに記して深謝する。

#### 文 献

- 1) K. Takahashi, T. Hirano, K. Takama & K. Zama, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 48, 1803-14 (1982).
- 2) K. Takahashi, T. Hirano & K. Zama, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 49, 1301 (1983).

- 3) K. Takahashi, T. Hirano & K. Zama, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 1226-9 (1984).
- 4) A.J.P. Martin, *Biochem. Soc. Symposia* (Cambridge, England), 3, 4-20 (1950).
- 5) K. Takahashi, T. Hirano, M. Egi, M. Hatano & K. Zama, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 63, 1543-6 (1986).
- 6) 高橋是太郎, *油化学*, 37, 307-9 (1988).
- 7) K. Takahashi, T. Hirano & M. Saito, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 523-8 (1988).
- 8) K. Takahashi & T. Hirano, *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 38, 398-404 (1987).
- 9) 高橋是太郎, 平野次彦, *油化学*, 40, 300-5 (1991).
- 10) 澤田哲志, 高橋是太郎, 羽田野六男, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 1313-7 (1992).
- 11) T. Hirano & K. Takahashi, *J. Chromatogr. Sci.*, 34, 341-8 (1996).
- 12) K. Takahashi, *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 32, 245-330 (1985).
- 13) 内藤裕久, 平成 19 年度修士論文, 北海道大学水産科学院, p.22 (2008).
- 14) M. Hosokawa, K. Takahashi, Y. Kikuchi & M. Hatano, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 1287-91 (1995).
- 15) S. Awano, K. Miyamoto, M. Hosokawa, M. Mankura & K. Takahashi, *Fish. Sci.*, 72, 909-12 (2006).
- 16) M. Suzuki, K. Asahi, K. Isono, A. Sakurai & N. Takahashi, *Develop. Growth Differ.*, 34, 301-7 (1992).
- 17) 細川雅史, 大島宏哲, 甲野裕之, 高橋是太郎, 羽田野六男, 小田島肅夫, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 309-14 (1993).
- 18) K. Tochizawa, M. Hosokawa, H. Kurihara, H. Kohno, S. Odashima & K. Takahashi, *Jpn. Oil Chem. Soc.*, 46, 382-90 (1997).
- 19) 小西めぐみ, 平成 14 年度修士論文, 北海道大学大学院水産科学研究科, p.51 (2003).
- 20) Z. Hossain, M. Konishi, M. Hosokawa & K. Takahashi, *Cell Biochem. Func.*, 24, 159-65 (2006).
- 21) H. Ishigamori, M. Hosokawa, H. Kohno, T. Tanaka, K. Miyashita & K. Takahashi, *Mol. Cellular Biochem.*, 275, 127-33 (2005).
- 22) M. Hosokawa & K. Takahashi, *Handbook of Industrial Biocatalysis*, (C.T. Hou ed.), CRC press, Boca Raton, Chapter 13, 1-13 (2005).
- 23) 高橋是太郎, 佐藤清隆, 柳田晃良, 和田 俊 編, 機能性脂質のフロンティア, (株)シーエムシー, pp.120-7 (2004).
- 24) 藤本章人, 佐々木甚一, 細川雅史, 高橋是太郎, *脂質生化学研究*, 43, 318-21 (2001).
- 25) A. Fujimoto, J. Sasaki, M. Hosokawa & K. Takahashi, *Fisheries Sci.*, 68 Supplement II, 1639-40 (2002).
- 26) A. Fujimoto, J. Sasaki, M. Hosokawa & K. Takahashi, *Essential Fatty Acids and Eicosanoids* (Y.-S.Huang, S.-J. Lin & P.-C. Huang ed.), AOCs Press, Champaign, pp.290-5 (2003).
- 27) 高橋是太郎, 水産機能性脂質—給源・機能・利用—, 高橋是太郎 編, 恒星社厚生閣, pp.169-79 (2004).
- 28) 細川雅史, 高橋是太郎, *オレオサイエンス*, 2, 19-25

- (2002).
- 29) K. Murakawa, K. Fukunaga, M. Tanouchi, M. Hosokawa, Z. Hossain & K. Takahashi, *J. Oleo Sci.*, 56, 179-88 (2007).
- 30) K. Takahashi & K. Fukunaga, *Biocatalysis and Biotechnology for Functional Foods*, (C.T. Hou & J.-F. Shaw ed.), CRC press, Boca Raton, pp. 79-90 (2007).
- 31) 高橋是太郎, 食品機能性の科学, 西川研次郎監修, (株)産業技術サービスセンター, pp.797-801 (2008).
- 32) H. Yamamoto, T. Niwa, T. Hino & Y. Kawashima, *Pharm. Res.*, 13, 896-901 (1996).
-