



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	小野, 雅代; 細川, 雅史; 高橋, 是太郎 他
Citation	ヘモレオロジー研究会誌, 1, 7-11
Issue Date	1998
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/48570
Type	journal article
File Information	takahashi_Hemorheology.pdf



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

小野雅代¹⁾、細川雅史¹⁾、高橋是太郎¹⁾、井上良計²⁾

¹⁾ 北大・水、²⁾ 備前化成

緒 言

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。我々はこのような点を解決するため、リパーゼによる鶏卵黄リン脂質の部分加水分解反応を試み、DHAを高濃度に含むリン脂質の調製法を確立した。

本研究では、このように調製した β -リゾ型高度不飽和リン脂質の生理機能を検討するため、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. リゾ型リン脂質の調製

DHA強化卵黄レシチン(DHA含有率 10.8%)を固定化酵素剤であるリポザイムIMを用いて部分加水分解し、生成した β -リゾホスファチジルコリン(LPC)画分を薄層クロマトグラフィーにより精製した。また、大豆ホスファチジルコリン(Soy PC)及び酵素的に合成した β -EPA-PCを、同様にリポザイムIMを用いて部分加水分解することにより、 β -リゾ型リン脂質を調製した。一方、 α -EPA-PCをホスホリパーゼA₂剤で加水分解することにより、 α -EPA-LPCを調製した。赤血球変形能の評価に用いた各種リン脂質の脂肪酸組成については、Table 1に示す。

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) 6m^l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℃ 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 0.5m^lにプラズマ 0.2m^l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, $6 \times 20 \mu\text{m}$ ）を用い、赤血球試料液 $100 \mu\text{l}$ 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。

3. リゾ型リン脂質の溶血性

洗浄赤血球（ヘマトクリット値 2% に調整） 6ml に対し、 α -EPA-LPC または β -EPA-LPC 懸濁液 $60 \mu\text{l}$ を添加し、 37°C 80 strokes/min で 1 時間インキュベートした後、 $1,000 \text{ rpm}$ で 10 分間遠心分離し上清を 4ml 分取した。これに松原の試薬（ $1/30\text{M}$ リン酸緩衝液（ $\text{pH} 7.2$ ）にフェリシアン化カリウム 1.5g と NaH_3 1.0g を溶かし、全容を 500ml として調製） 5ml を加え、1 時間室温で放置した後、 $1,000 \text{ rpm}$ で 10 分間遠心分離し、波長 540nm で上清の吸光値を測定した。蒸留水を用いて赤血球を溶血させた際の上清の吸光値を溶血率 100% として、リン脂質処理した赤血球の溶血率を算出した。

結 果 及 び 考 察

1. 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（インキュベート）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. 1）。その時の改善効果に 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. 2），1 時間の取り込み時間では後者の方が明らかに優れていた（Fig. 2）。

インキュベーション前後の赤血球の脂肪酸組成を調べたところ、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（Table 2），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（Table 3）。

Table 1 Fatty acid composition of PCs and LPCs used for the evaluation of erythrocytes deformability.

	DHA-PC	β -DHA-LPC	Soy PC	β -Soy LPC	α -EPA-LPC	β -EPA-LPC
Sat.						
16:0	39.1	8.3	14.9	2.6	2.6	3.9
18:0	9.6	3.7	3.3	0.2	0.7	0.9
Mono.						
18:1	28.9	38.7	14.1	16.4	2.6	1.6
Poly.						
18:2	11.3	14.9	61.8	74.7	11.5	7.8
18:3	0.1	—	5.4	5.4	1.4	1.5
20:4 (AA)	1.4	2.9	—	—	—	—
20:5 (EPA)	0.4	1.1	—	—	79.0	81.9
22:6 (DHA)	6.7	29.2	—	—	—	—

Abbreviations: DHA-PC; DHA-containing PC prepared from Egg yolk of fish oil fed hens, β -DHA-LPC; DHA-containing LPC prepared from DHA-Egg lecithin hydrolyzed with Lipozyme IM, β -Soy LPC; LPC prepared from Soy PC hydrolyzed with Lipozyme IM, α -EPA-LPC; LPC containing EPA at sn-1 position, β -EPA-LPC; LPC containing EPA at sn-2 position.

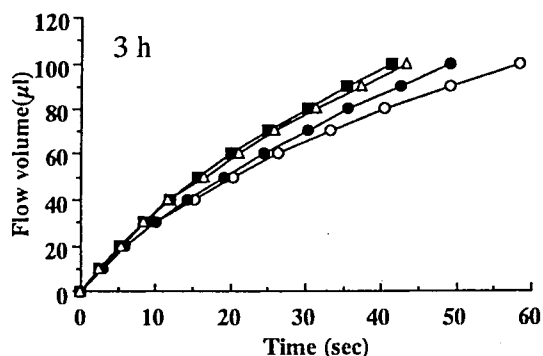


Fig. 1 Flow curves of human erythrocytes treated with some PCs and β -DHA-LPC for 3 h obtained through evaluation of deformability with artificial capillary model.

○- control ●- Soy PC 10 μ M
■- DHA-PC 10 μ M △- β -DHA-LPC 5 μ M

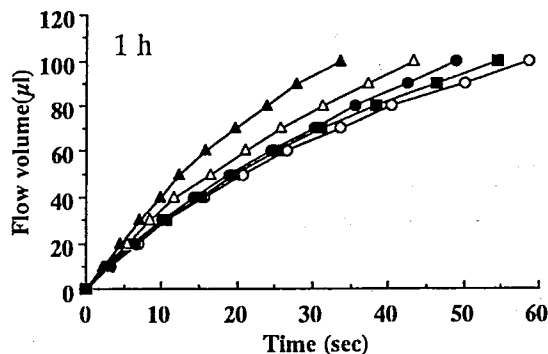


Fig. 2 Flow curves of human erythrocytes treated with some PCs and β -DHA-LPC for 1 h obtained through evaluation of deformability with artificial capillary model.

○- control ■- DHA-PC 10 μ M ●- Soy PC 10 μ M
△- β -DHA-LPC 5 μ M ▲- β -DHA-LPC 10 μ M

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

3 h	control	DHA-PC (10 μ M)	β -DHA-LPC (5 μ M)	β -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. 3 Fatty acid composition of phospholipid obtained from human erythrocytes treated with DHA-PC and β -DHA-LPC for 1h.

1 h	control	DHA-PC (10 μ M)	β -DHA-LPC (5 μ M)	β -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.

一方、大豆PCより大豆LPC (β -Soy-LPC) を調製し、 β -リゾ型高度不飽和リン脂質の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.3), 両者の間に著しい作用の差があることを認めた。

よって、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、特にリゾ型では短時間に低濃度でその効果を発揮できることが明らかとなった。

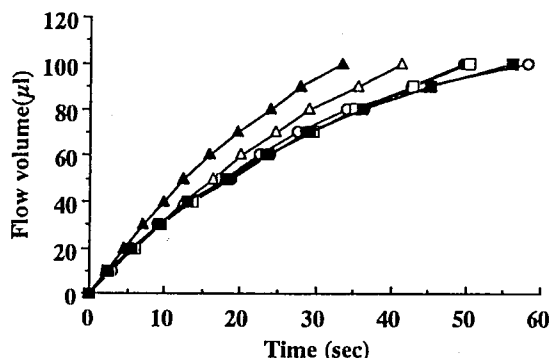


Fig. 3 Flow curves of human erythrocytes treated with β -DHA-LPC and β -Soy LPC for 1h obtained through evaluation of deformability with artificial capillary model.

○- control ●- Soy PC 10 μ M
△- β -DHA-LPC 5 μ M ▲- β -DHA-LPC 10 μ M
□- β -Soy LPC 5 μ M ■- β -Soy LPC 10 μ M

2. ヒト赤血球変形能に及ぼす脂肪酸の結合位置の影響

リゾ型リン脂質の α 位または β 位に、主にイコサペンタエン酸(EPA)が結合した α -EPA-LPC及び β -EPA-LPCを用いて、ヒト赤血球変形能に及ぼすリゾ型リン脂質の脂肪酸結合位置の影響を比較した。その結果、 α -EPA-LPCに比べ β -EPA-LPCにおいて赤血球変形能改善効果が顕著であった(Fig.4)。また、高度不飽和リゾ型リン脂質の赤血球に対する溶血性を比較したところ、20 μ Mの添加までは α -EPA-LPCと β -EPA-LPCの間に大きな差は見られないものの、50 μ Mの添加では α -EPA-LPCにおいて33%の溶血率が認められた。これに対し β -EPA-LPCでは15%以下であった(Fig.5)。更に、100 μ Mにおいては α -EPA-LPCで溶血率が80%以上に達したのに対し、 β -EPA-LPCでは約半分の40%に留まり、 β -リゾ型高度不飽和リン脂質の低い溶血性が明らかとなった(Fig.5)。

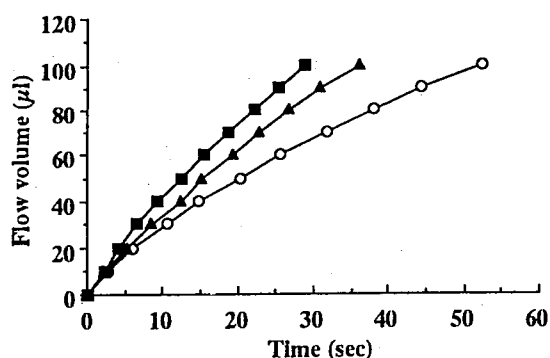


Fig. 4. Flow curves of human erythrocytes treated with α -EPA-LPC and β -EPA-LPC for 1h obtained through evaluation of deformability with artificial capillary model. $\circ$ -control $\triangle$ - α -EPA-LPC 10 μ M $\blacksquare$ - β -EPA-LPC 10 μ M

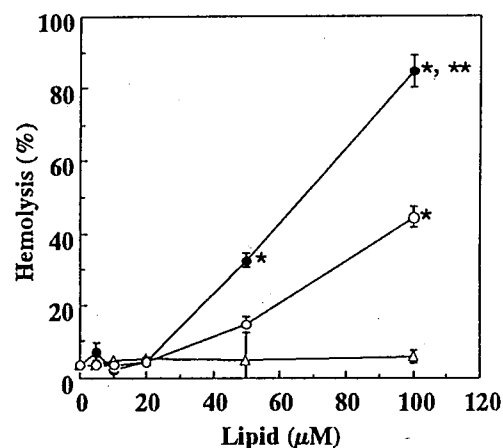


Fig. 5. Effect of α -EPA-LPC and β -EPA-LPC on hemolysis. $\triangle$ -Soy PC $\bullet$ - α -EPA-LPC $\circ$ - β -EPA-LPC. Data represent mean $\pm$ S.D. (n=3). * P <0.01 vs control, ** P <0.01 vs β -EPA-LPC.

以上の結果より、 β 位に高度不飽和脂肪酸の結合したリゾ型リン脂質は、溶血性の低い優れた血液性状改善物質であると結論した。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご助言並びにご協力を賜りました日立原町電子工業株式会社 田村 正孝氏に深く感謝いたします。

Beneficial Effect of β -lysophospholipid Rich in Highly Unsaturated Fatty Acids on Deformability of Human Erythrocytes

Masayo Ono¹, Masashi Hosokawa¹, Koretaro Takahashi¹ and Yoshikazu Inoue²

¹Faculty of Fisheries, Hokkaido University, ²Bizen Chemical Co., Ltd

Immobilized lipase (Lipozyme IM) mediated selective partial hydrolysis of docosahexaenoic acid (DHA) enriched egg yolk phospholipids (PL) were carried out. By keeping the water activity of lipase at an intermediate level, DHA was effectively enriched in acyl moieties of PL. This DHA-PL was dominant in β -lysophospholipids, and has rapidly improved the deformability of human erythrocytes when evaluated with artificial capillary model. β -lysophospholipids might be one of the most effective chemical forms to incorporate DHA into cells, accordingly.