HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	βー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

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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A_2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-1，6×20 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。

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.

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 60μlを添加し，37℃ 80strokes/minで1時間インキュベートした後，1,000 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（1/30Mリン酸緩衝液（pH7.2）にフェリシアン化カリウム1.5gとNaH3 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 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）。

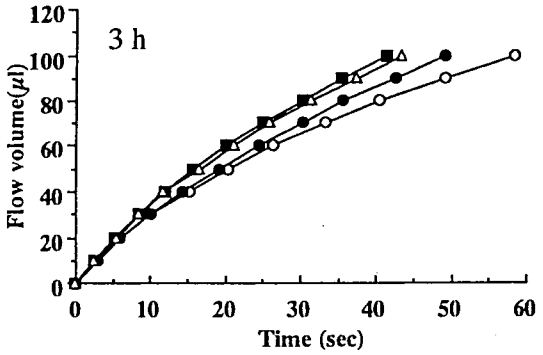

Fig. 1 Flow curves of human erythrocytes treated with some PCs and β-DHA-LPC for 3 h obtained through evaluation of deformability with artificial capillary model.
-○- control -●- Soy PC 10μM
-■- DHA-PC 10μM -△- β-DHA-LPC 5μM

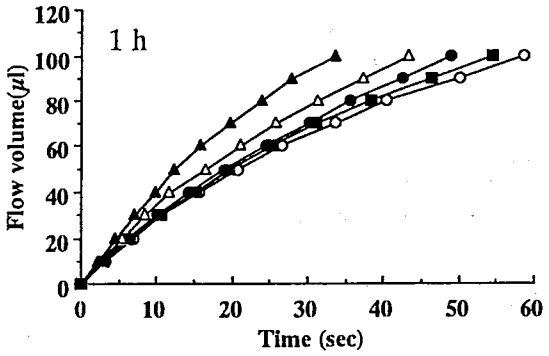

Fig. 2 Flow curves of human erythrocytes treated with some PCs and β-DHA-LPC for 1h obtained through evaluation of deformability with artificial capillary model.
-○- control -■- DHA-PC 10μM -●- Soy PC 10μM
-△- β-DHA-LPC 5μM -▲- β-DHA-LPC 10μM

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

Data represent mean±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 (10μM)	β-DHA-LPC (5μM)	β-DHA-LPC (10μM)
Sat.				
16:0	28.2±1.1	27.7±0.2	22.8±0.3*	21.2±0.1*
18:0	19.2±1.0	18.0±0.1	17.5±0.2	17.6±0.1
Mono.				
18:1	20.9±0.2	20.4±0.8	15.6±0.2*	15.5±0.1*
Poly.				
20:4 (AA)	9.7±0.6	11.4±0.4	10.7±0.1	11.6±0.1
20:5 (EPA)	1.3±0.1	1.8±0.1	3.0±0.1*	3.1±0.1*
22:6 (DHA)	5.5±0.4	5.3±0.2	11.2±0.2*	11.6±0.1*

Data represent mean±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。

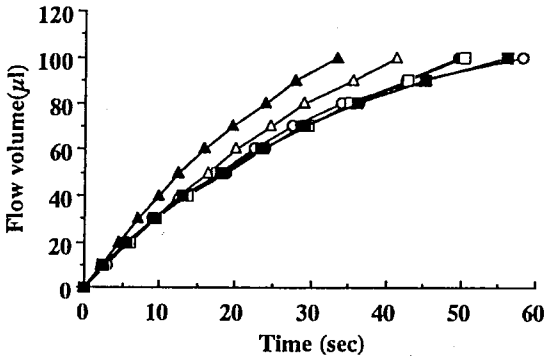

Fig.3 Flow curves of human erythrocytes treated with β-DHA-LPC and β-Soy LPC for 1h obtained through evaluation of deformability with artificial capillary model.
-○- control -●- Soy PC 10μM
-△- β-DHA-LPC 5μM -▲- β-DHA-LPC 10μM
-□- β-Soy LPC 5μM -■- β-Soy LPC 10μM

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，20μM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，50μMの添加ではα-EPA-LPCにおいて33%の溶血率が認めた。これに対しβ-EPA- LPCでは15%以下であった（Fig.5）。更に，100μM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）。

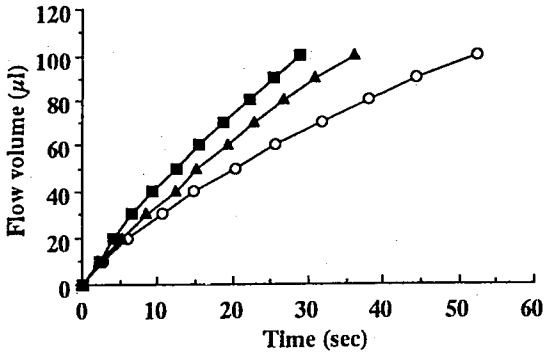

Fig.4 Flow curves of human erythrocytes treated with α-EPA-LPC and β-EPA LPC for 1h obtained through evaluation of deformability with artificial capillary model. -○- control -▲- α-EPA-LPC 10μM -■- β-EPA-LPC 10μM

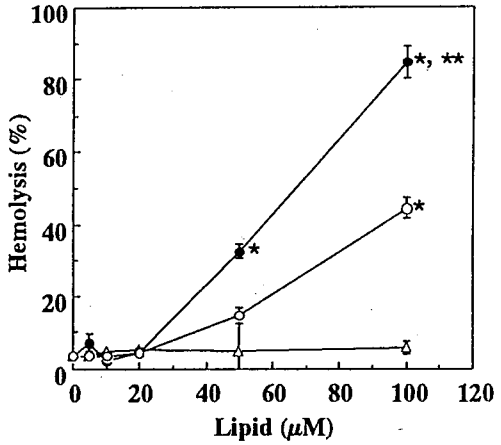

Fig. 5 Effect of α-EPA-LPC and β-EPA-LPC on hemolysis. -△- Soy PC -●- α-EPA-LPC -○- β-EPA-LPC Data represent mean ± S.D. (n=3). *P< 0.01 vs control, **P< 0.01 vs β-EPA-LPC.

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 Ono[1], Masashi Hosokawa[1], Koretaro Takahashi[1] and Yoshikazu Inoue[2]
[1]Faculty of Fisheries, Hokkaido University, [2]Bizen 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.