

ドコサヘキサエン酸の赤血球変形能に及ぼす影響 —— 顕微フーリエ変換赤外分光法を用い赤血球膜より得られた スペクトルの検討 ——

川崎 泰久¹⁾ 金澤 眞雄¹⁾
能登谷 洋子¹⁾ 會沢 勝夫²⁾

¹⁾東京医科大学内科学第三講座, ²⁾生理学第二講座

【要旨】 n-3系多価不飽和脂肪酸の1つであるドコサヘキサエン酸 (DHA) は血小板凝集抑制作用や赤血球変形能を改善する作用をもつ。今回の研究では DHA の赤血球変形能に及ぼす影響を Swank らの方法で最大通過圧を測定して評価した。また、赤血球膜と DHA の結合を評価するために FT-IR スペクトルを測定した。動物は家兎を用い 24 週齢より 20 週間 0.5% コレステロール含有食にて飼育、次いで 44 週齢から 4 週間は DHA500 mg/kg 添加 0.5% コレステロール含有食にて飼育し実験に用いた。コレステロール食摂取前の赤血球最大通過圧は 166.5 mmHg であり、コレステロール食摂取後には 264.3 mmHg と上昇。DHA 添加食を給飼した 4 週間後には 170.9 mmHg とコレステロール食摂取前に復した。赤血球膜の組成の変化を FT-IR スペクトルにて評価すると、DHA 添加食を給飼した家兎より得た赤血球膜では、C-O-C の吸光量が DHA 添加前に比べ約 4 倍増加した。DHA の COOH 基が赤血球膜と結合し C-O-C の構造ができ、C-O-C の吸光量が増えたと推定された。赤血球膜に DHA が結合し赤血球膜リン脂質の二重構造に変化を来す事より、DHA は赤血球の変形能を改善する事が FT-IR 法にて示唆された。

はじめに

動脈硬化性疾患は生活習慣の変化、特に脂肪摂取量増加と共に日本人に多くみられるようになった。脂肪には飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸があるが、最近は動脈硬化を防ぐ上で不飽和脂肪酸の意義が注目されている。例えば、グリーンランド先住民は脂肪を多く食するが、心筋梗塞による死亡率は非常に低いことが知られている。彼らは魚肉やアザラシなどを多く食するため、魚油に含まれるエイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) を多く摂取し、これらの作用で心筋梗塞の発症率が低いことが報告されている¹⁾。

本邦においても EPA は抗血栓薬として使用されており、類似構造をもつ DHA もその有用性に注目が集

まっている。EPA は n-3 系多価不飽和脂肪酸であり、血小板凝集抑制作用以外に膜の流動性を高めることにより、赤血球変形能を改善することも示唆されている²⁻⁶⁾。

今回著者らは高脂肪食を摂取させた家兎に DHA を経口摂取させ、DHA の赤血球膜の変形能に及ぼす影響を検討した。膜の流動性についての評価法には蛍光プローブ法による検討も行われている⁷⁾。一方、顕微フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR 分光法) は動脈硬化部位の評価に用いられるようになってきた⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。今回は FT-IR 法を用いて赤血球膜への DHA の取り込みを検討し、赤血球膜の流動性との関連を評価した。

2001 年 8 月 20 日受付, 2001 年 11 月 29 日受理

キーワード: 顕微フーリエ変換赤外分光法, 赤血球変形能, 赤血球膜, ドコサヘキサエン酸
(別冊請求先: 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学内科学教室第三講座 川崎泰久)

対象及び方法

1. 使用動物

実験動物は日本白色家兎（雄性 24 週齢）を用いた（n=10）。家兎は日本クレア社製標準飼料で飼育した。24 週齢より 44 週齢まで 20 週間、0.5% コレステロール含有標準飼料に変更して飼育した。次いで 44 週齢より 48 週齢まで、DHA が 500 mg/kg/day となるように 0.5%コレステロール含有標準飼料を調整して飼育した (Fig. 1)。

2. 赤血球の変形能の評価

赤血球の変形能は Swank らの方法¹¹⁾¹²⁾に従い、最大通過圧 (maximum passage pressure:MPP) を指標として評価した。血液は早朝空腹時に耳静脈よりヘパリン添加スピッツに採取し、3000 回転 15 分間遠沈して、上清及び白血球層を除去した。赤血球層は PBS (phosphate-buffered saline: pH 7.4) にて再度浮遊させ、遠心・上清除去の操作を 2 回反復して、洗浄赤血球浮遊層を得た。最終的に洗浄赤血球は PBS にて 5×10^4 個/ml となるよう調整し、Swank の装置を用いて赤血球の変形能を評価した。赤血球変形能は screen filtration pressure 法 (SFP 法) を用い、フィルターは Nuclepore 社製 $8 \mu\text{m}$ として、25°C の条件で最大通過圧を測定して評価した。赤血球変形能の測定は 24 週齢 (通常飼料食摂取時)、44 週齢 (高脂肪食摂取時) および 45, 46, 47, 48 週齢 (DHA 添加食摂取時) に行った。

3. FT-IR 法を用いた赤血球膜の評価

赤血球変形能測定のために得た赤血球浮遊液の一部は DHA 投与前及び投与後 2 週、4 週について赤血球膜の赤外吸光スペクトルの観察に用いた。浮遊赤血球は蒸留水中にて膨化、破裂させ、蒸留水にて洗浄・遠心を 3 回繰り返して、赤血球膜ゴーストを得た。ゴーストはフッ化カルシウムのスライドガラス (応研 東京) に添付、付着、乾燥させた後、顕微 FT-IR による

吸光の測定に供した。顕微 FT-IR 分光器は Micro FT-IR-100 (日本電子社製) を用いた。FT-IR スペクトルの解析には GRAMS/32 (Galactic 社) を使用した。標本を顕微鏡下に直径 $100 \mu\text{m}$ のスポットに絞った赤外光を照射し、FT-IR スペクトルを測定した。測定波長領域は $800 \sim 3140 \text{ cm}^{-1}$ とした。

結 果

1. 赤血球最大通過圧

赤血球の最大通過圧は 24 週齢では $166.5 \pm 10.9 \text{ mmHg}$ であった。高脂肪食摂取後である 44 週齢の最大通過圧は $264.3 \pm 13.7 \text{ mmHg}$ と 24 週齢に比し、有意に増加した ($P < 0.0001$)。DHA 添加後投与 1 週 ($247.8 \pm 9.8 \text{ mmHg}$)、2 週 ($224.8 \pm 10.8 \text{ mmHg}$)、3 週 ($193.6 \pm 15.3 \text{ mmHg}$)、4 週 ($170.9 \pm 7.8 \text{ mmHg}$) と最大通過圧は DHA 添加前に比べて、1 週 ($P < 0.001$)、2 週 ($P < 0.001$)、3 週 ($P < 0.001$)、4 週 ($P < 0.001$) で、有意に低下を認めた。DHA 添加 4 週後では 24 週齢と有意差のない成績であった (Fig. 2)。

2. FT-IR 法を用いた赤血球膜の吸光スペクトルの変化

代表的家兎 1 羽について赤血球膜の吸光スペクトルの経時変化を Fig. 3a, 3b, 3c に示した。0.5% コレステロール食を 20 週摂取した時 (44 週齢) の FT-IR による赤血球膜ゴーストの吸光は Fig. 3a に示した。 $800 \sim 3,140 \text{ cm}^{-1}$ で得た吸光スペクトルの各ピークは、 $1,735 \text{ cm}^{-1}$ はエステル結合の C=O、 $1,650 \text{ cm}^{-1}$ は amid I、 $1,540 \text{ cm}^{-1}$ は amid II、 $1,070 \text{ cm}^{-1}$ は C-O-C の分子構造に依存している。赤血球膜の蛋白量を一定とするために、 $1,650 \text{ cm}^{-1}$ の amid I による吸光を内部標準物質と定め、その他の吸光を amid I に対する比で評価した。DHA 添加後 2 週の成績を Fig. 3b に示す。 $1,650 \text{ cm}^{-1}$ の amid I を標準として、各分子構造の吸光を評価すると、 $1,735 \text{ cm}^{-1}$ の C=O、 $1,540 \text{ cm}^{-1}$ の amid II

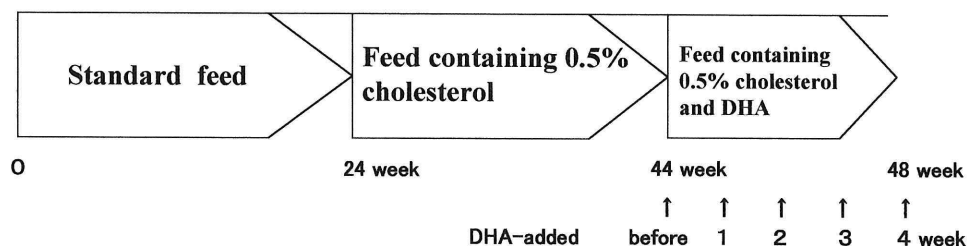


Fig. 1 Experiment method. Japanese white rabbits were given a standard feed for 24 weeks of age, followed by 0.5% cholesterol-containing feed for the next 20 weeks. DHA (500 mg/kg/day) was added to feed for 4 weeks starting at 44 weeks of age.

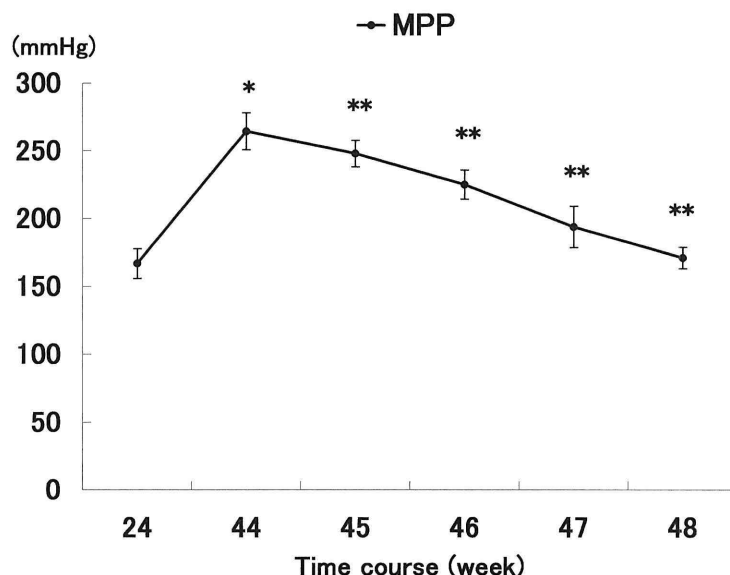


Fig. 2 Changes in the maximum passage pressure (MPP) of erythrocytes after addition of DHA. The MPP of erythrocyte increased significantly after giving high-cholesterol feed (264.3 ± 13.7 mmHg at 44 weeks of age) compared to the baseline determined at 24 weeks of age (166.5 ± 10.9 mmHg), but it decreased significantly after switching to DHA-added feed (247.8 ± 9.8 mmHg at 45 weeks of age; 224.8 ± 10.8 mmHg at 46 weeks of age; 193.6 ± 15.3 mmHg at 47 weeks of age; and 170.9 ± 7.8 mmHg at 48 weeks of age). In 4 weeks, the MPP of erythrocyte almost completely returned to the baseline determined at 24 weeks of age. Values are means \pm SD ($n=10$). *: Significant differences from 24 weeks of age. $*p < 0.0001$. **: Significant differences from 44 weeks of age. $**p < 0.001$.

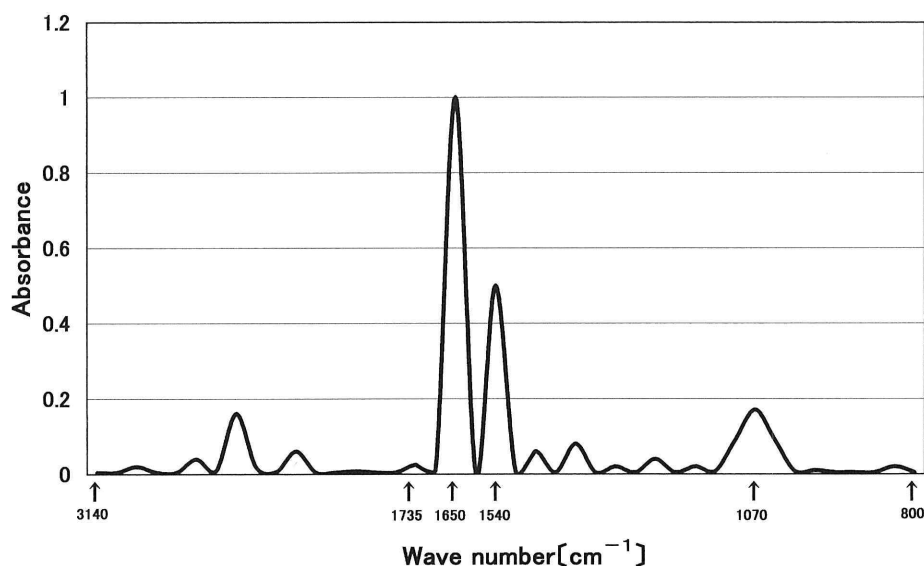


Fig. 3a FT-IR spectrum of the erythrocyte membrane before feeding with DHA-added feed (44 weeks of age). The spectrum, determined at $800-3,140$ cm^{-1} , showed peaks at $1,735$ cm^{-1} (C=O), $1,650$ cm^{-1} (amid I), $1,540$ cm^{-1} (amid II), and $1,070$ cm^{-1} (C-O-C). Each peak was shown as the ratio to amid I.

は不変であったが、 $1,070$ cm^{-1} のC-O-Cの吸光はDHA添加前(44週齢)に対して約2倍に増加した。DHA添加後4週の成績をFig. 3cに示す。1650 cm^{-1} のamid Iを標準として、各分子構造の吸光を評価すると、1735 cm^{-1} のC=O、1540 cm^{-1} のamid IIは不変であったが、1070 cm^{-1} のC-O-Cの吸光はDHA添加前(44週齢)に対して約4倍に増加した。スペクトル

を示した家兎のDHA添加前および添加後1から4週のFT-IRスペクトルの経時的变化をFig. 4に示した。1070 cm^{-1} のC-O-Cのスペクトルは、DHA添加前から添加後4週まで経時的に順次増加を認めた。1735 cm^{-1} のC=O、1650 cm^{-1} のamid I、1540 cm^{-1} のamid IIの吸光に経時的变化は認められなかった。

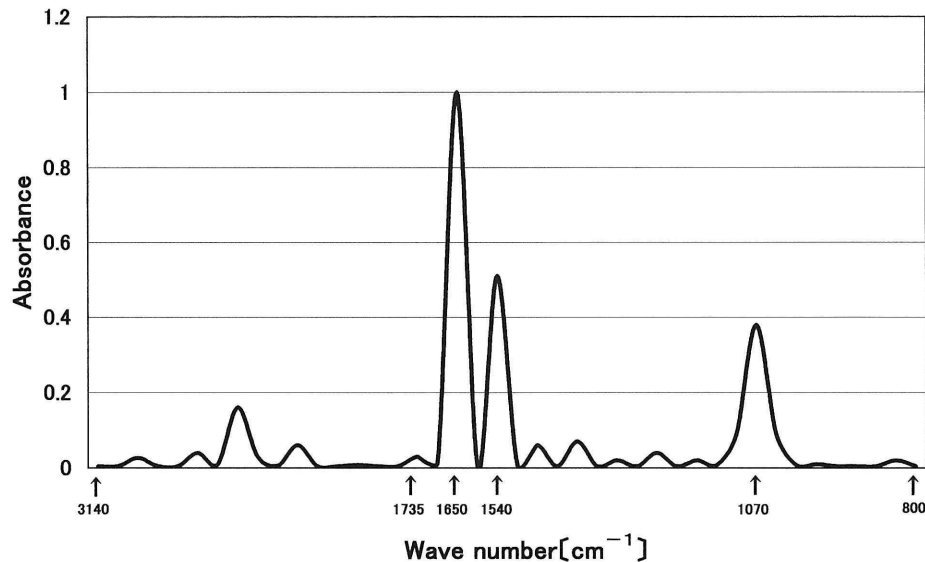


Fig. 3b FT-IR spectrum of the erythrocyte membrane 2 weeks after feeding with DHA-added feed (46 weeks of age). The peaks at $1,735\text{ cm}^{-1}$ (C=O) and $1,540\text{ cm}^{-1}$ (amid II) remained virtually unchanged compared to those before feeding with DHA-added feed (44 weeks of age), but the peak at $1,070\text{ cm}^{-1}$ (C-O-C) nearly doubled.

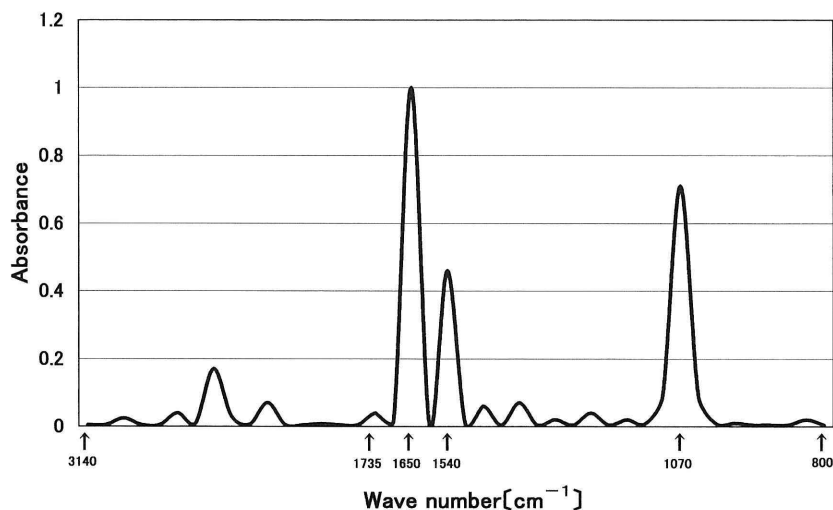


Fig. 3c FT-IR spectrum of the erythrocyte membrane 4 weeks after feeding with DHA-added feed (48 weeks of age). The peaks at $1,735\text{ cm}^{-1}$ (C=O) and $1,540\text{ cm}^{-1}$ (amid II) remained virtually unchanged compared to those before feeding with DHA-added feed (44 weeks of age), but the peak at $1,070\text{ cm}^{-1}$ (C-O-C) increased nearly 4 times.

考 案

DHAの赤血球の変形能に及ぼす影響を検討し、かつ赤血球膜に対するDHAの結合を評価した。赤血球膜のバネのような性質は主に脂質二重層を裏打ちしている蛋白質に依存している。一方、リン脂質の二重層も変形能に重要であることはLange Y.らにより示されている。リン脂質の二重構造は膜が折れ曲がるときに抵抗性を示すことが報告されており¹³⁾、DHAやEPAなどの結合による膜構成成分の変化はこの抵抗性に影響を与え、変形能に変化を与える可能性が考

られる。

EPAはn-3系多価不飽和脂肪酸で食物として摂取した時に、心筋梗塞をはじめとした動脈硬化性疾患の発症防止に有効なことが報告されている¹⁴⁾。その作用は血管内では血漿コレステロールを低下させ、血液粘着性を低下させることや、血小板を凝集させ、血管壁を収縮させるエイコサノイド(トロンボキサンA2)の合成を抑える為と考えられている¹⁵⁾。

一方、赤血球膜に対してはリン脂質にとりこまれ、その化学構造に由来する物理化学的性状から赤血球膜の流動性を増し、すなわち赤血球変形能を増加させ

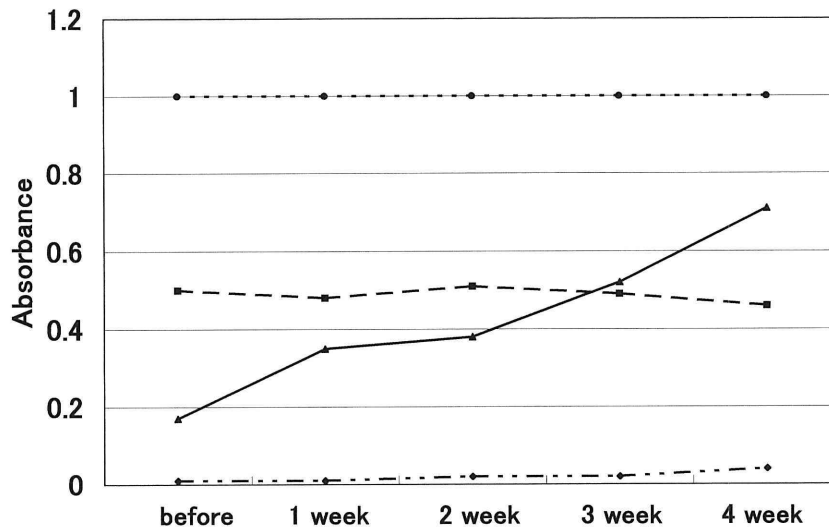


Fig. 4 Time-course changes in the FT-IR spectrum 1 to 4 weeks after feeding with DHA-added feed. The spectrum at 1070 cm^{-1} (C-O-C; ▲) increased over time after starting feeding with DHA-added feed. The spectrum at 1,735 cm^{-1} (C=O; ◆), 1,650 cm^{-1} (amid I; ●) and 1,540 cm^{-1} (amid II; ■) showed no significant change over time.

ることも推定されている¹⁶⁾。

DHAの構造 (Fig. 5) はEPAと同様にn-3系多価不飽和脂肪酸に含まれ、EPAと同じくアラキドン酸の代わりに脂質膜に取り込まれると推定されている¹⁷⁾。DHAの作用機序は不明な点が多いが、細胞膜リン脂質にとりこまれ、細胞の膜流動性を高める事も報告されている¹⁸⁾。

佐藤らはn-3系多価不飽和脂肪酸であるEPAを用いてヒトの赤血球膜に対する作用を、ヒト洗浄赤血球を用いて最大通過圧を指標として評価し、EPAは赤血球の変形能の改善することを示した²⁾。著者らはEPAと同じn-3系多価不飽和脂肪酸であるDHAを用い、佐藤らの方法に準じて家兎洗浄赤血球の最大通過圧を測定した。高脂肪食にて増大した最大通過圧はDHAを添加すると、高脂肪食摂取にもかかわらず4週にて、通常飼料食の値まで復することを示した。今回DHAを用いて最大通過圧が改善したことは、洗浄赤血球を用いて評価しているのでコレステロール等の血漿中の成分が影響している事は考えられない。著者らはDHAが赤血球膜に直接に影響を与え、赤血球の変形能を改善した事を推論した。



Docosahexaenoic acid (DHA) : (C_{22:6})

Fig. 5 Structure of DHA

DHAが赤血球膜のリン脂質に結合した事は顕微FT-IR法を用いて検討した。FT-IRの吸光はそれぞれの分子構造に応じて様々な吸光を示す。赤血球は生きた細胞であり、細胞質内には様々な蛋白や糖、無機質を含み、それぞれが持つ分子構造により、それぞれ特有の吸光を示す。よって赤血球の吸光を直接測定することは赤血球膜の性状を評価するには不適と考え、赤血球膜ゴーストを作製し、膜成分のみの吸光にて評価を行った。

著者らは1,735 cm^{-1} のC=Oの伸縮振動、1,650 cm^{-1} のamid I (蛋白質)、1,540 cm^{-1} のamid II (蛋白質)、1,070 cm^{-1} のC-O-Cの伸縮振動による吸光に着目した。赤血球膜ゴーストはフッ化ソーダ板に付着させて評価したが、フッ化ソーダ板に均一に赤血球膜が添付されているとはかぎらないため、amid Iの吸光を赤血球膜の内部標準物質として用い、以下の吸光の評価はamid Iの相対値として示した。1,070 cm^{-1} のC-O-Cの吸光はDHA添加食の期間に応じて、週数依存的に増加していた。EPA・DHAはそれぞれ末端にCOOHを持ち、COOH基は赤血球膜にC-O-Cの構造を形づくり結合していると推定される。これらのことはMPPで評価した赤血球変形能とFT-IR法で評価したC-O-Cの吸光とがほぼ時期を一致して変動していた事により、DHAの添加はDHAが赤血球膜に取り込まれ膜流動性を改善した事を示唆するものであった。よって、DHAが赤血球膜に結合することにより、赤血球変形能は改善したと推論された。

結 論

1) 家兎赤血球最大通過圧は高脂肪食負荷にて増加し、その後 DHA 含有食摂取にて有意に低下した。DHA 摂取は赤血球変形能を改善する事が示唆された。

2) 赤血球膜の FT-IR スペクトルを観測すると、 $1,070\text{ cm}^{-1}$ の C-O-C の吸光度は DHA 添加により経時的に増加していた。

3) DHA は赤血球膜にとりこまれ、膜の流動性を高めることにより赤血球変形能を改善すると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導ならびに御高閲を賜りました林徹教授に深甚なる謝意を捧げます。また、実験の御協力を賜りました生理学第二講座の諸先生方に深く感謝致します。加えて御理解と御協力下さいました内科学第三講座教室員各位に謝意を表します。

文 献

- 1) Kromann N, and Green A: Epidemiological Studies in the upernavik district, Greenland. *Acta Med Scand* **208**: 401~406, 1980
- 2) 佐藤秀昭, 林潤一: 閉塞性動脈硬化症患者の赤血球変形能に及ぼすエイコサペンタエン酸長期投与の効果. *脈管学* **34**: 369~374, 1994
- 3) Kamada T, Yamasita T, Baba Y, Kai M, Setoyama S, Chuman Y, and Otsuji S: Dietary sardine oil increases erythrocyte membrane fluidity in diabetes patients. *Diabetes* **35**: 604-611, 1986
- 4) Terano T, Hirai A, Hamazaki T, Kobayashi S, Fujita T, Tamura Y, and Kumagai A: Effect of oral administration of highly purified eicosapentaenoic acid on platelet function, blood viscosity and red cell deformability in healthy human subjects. *Atherosclerosis* **46**: 321-331, 1983
- 5) 浜崎智仁, 小林 悟, 浦風雅春, 矢野三郎, 熊谷朗: エイコサペンタエン酸 (EPA) が赤血球変形能を改善する機序について. *Blood&Vessel* **16**: 65~67, 1985

- 6) 小林 悟: 多価不飽和脂肪酸と血液レオロジー. *治療学* **25**: 45~47, 1991
- 7) Kitagawa S, Endo J, and Kametani F: Effects of long-chain cis-unsaturated fatty acids and their alcohol analogs on aggregation of bovine platelets and their relation with membrane fluidity change. *Biochim. Biophys. Acta* **818**: 391-397, 1985
- 8) 會沢勝夫: 顕微フーリエ変換赤外分光法による動脈硬化部位の光線力学的治療効果の解析. *レーザー学会研究会報告* **92**: 47~52, 1992
- 9) 會沢勝夫, 林 潤一, 佐藤秀昭, 斎藤喬士, 西村晴美, 佐藤潤一, 三輪 隆, 金澤眞雄, 能登谷洋子: 顕微フーリエ変換赤外分光法によるコレステロールエステルの in situ 検出. *診断と治療* **83**: 766~769, 1995
- 10) 西村晴美, 佐藤潤一, 會沢勝夫: 顕微フーリエ変換赤外分光法を用いた動脈壁コレステロールエステルの測定. *東医大誌* **53**: 390~398, 1995
- 11) Swank RL, Roth JG, and Jansen J: Screen filtration pressure method and adhesiveness and aggregation of blood cells. *J. Appl. Physiol* **19**: 340-346, 1964
- 12) Swank RL: Alteration of blood on storage: Measurement of adhesiveness of "aging" platelets and leucocytes and their removal by filtration. *N. Engl. J. Med.* **265**: 728-733, 1961
- 13) Lange Y, Gough A, and Steck TL: Role of the bilayer in the shape of the isolated erythrocyte membrane. *J Membr Biol* **69**: 113-123, 1982
- 14) GISSI-Prevenzione Investigators: Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* **354**: 447-55, 1999
- 15) 浜崎智仁: EPA と DHA—最近の研究. *健康と環境* **15**: 76~83, 1999
- 16) 矢澤一良: Lipids-Prevention and EPA・DHA. *Health Sciences* **15**: 123-128, 1999
- 17) Needleman P, Whitaker MO, Wyche A, Watters K, Sprecher H, and Raz A: Manipulation of platelet aggregation by prostaglandins and their fatty acid precursors: pharmacological basis for a therapeutic approach. *Prostaglandins* **1**: 165-181, 1980
- 18) 鈴木平光: n-3 高度不飽和脂肪酸における最近の話題. *バイオサイエンスとインダストリー* **49**: 486~491, 1991

Effects of docosahexaenoic acid on erythrocyte deformability
— Analysis of the spectrum of erythrocyte membranes
using FT-IR microspectrometry —

Yasuhisa KAWASAKI, Masao KANAZAWA, Yoko NOTOYA
and Katsuo AIZAWA*

Third Department of Internal Medicine, Tokyo Medical University
(Director: Prof. Tohru HAYASHI)

*Department of Physiology, Tokyo Medical University

Abstract

Docosahexaenoic acid (DHA), an n-3 polyunsaturated fatty acid, improves erythrocyte deformability and inhibits platelet aggregation. In this study we evaluated the effects of DHA on the erythrocyte deformability by measuring the maximum passage pressure using the Swank method. We also determined the FT-IR spectrum in order to investigate the binding between the erythrocyte membrane and DHA. Rabbits were given feed containing 0.5% cholesterol for 20 weeks from 24 weeks of age and feed containing 0.5% cholesterol and 500 mg/kg of DHA for 4 weeks from 44 weeks of age. Before ingestion of the cholesterol-containing feed, the maximum passage pressure of erythrocyte was 166.5 mmHg. After ingestion, the pressure increased to 264.3 mmHg, but it returned to 170.9 mmHg after four weeks of feeding with DHA-added feed. Changes in the components of the erythrocyte membranes were evaluated based on the FT-IR spectrum. The absorbance of C-O-C in the erythrocyte membranes from rabbits given the DHA-added feed increased nearly 4-fold compared to the baseline before DHA addition. This increase was thought to be attributable to the binding of the COOH group of DHA to the erythrocyte membranes and the resulting formation of a C-O-C structure. Findings obtained by the FT-IR method suggested that DHA improves the erythrocyte deformability by binding to the erythrocyte membranes and altering the two-layer structure of the phosphate lipids which compose the erythrocyte membranes.

<Key words> FT-IR microspectrometry, Erythrocyte deformability, Erythrocyte membrane, Docosahexaenoic acid
