

## 魚介類に存在する生理活性リン脂質

### —多価不飽和脂肪酸含有コリングリセロリン脂質の過酸化との関連—

中山 玲子, 吉田 広佳, 田中じゅん, 野口 千佳, 野村 妙子

Presence of Bioactive Phospholipids in Fishes and Shellfishes: Peroxidation of PUFA containing cholineglycerophospholipids and PAF-like phospholipids

Reiko Nakayama, Hiroka Yoshida, Jun Tanaka,  
Chika Noguchi and Taeko Nomura

Platelet-activating factor (PAF, 1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) is a potent bioactive lipid that is formed enzymatically in various mammalian cells and tissues. We found that high PAF activities in lipid extracts from fishes. Recently, Tanaka *et al.* reported that novel phospholipids with an *sn*-2-short-chain acyl groups, having PAF-like bioactivities, were produced by lipid peroxidation of CGP (cholineglycerophospholipid) with an *sn*-2-polyunsaturated fatty acyl (PUFA) group.

Therefore, we wondered whether the bioactive phospholipids in lipid extract from fishes were formed by lipid peroxidation. We extracted and prepared lipids with and without an anti-oxidant BHT from the tissues of various kinds of fishes and shellfishes. The lipid extract containing PAF-like compound that was purified by thin-layer chromatography induced the aggregation of washed rabbit platelets, and the activities were inhibited by PAF receptor antagonist, WEB-2086. Fishes which had high PAF-like activities were abundant in CGP with PUFA. In the case of lipid preparations without BHT, increase in PAF-like activities and TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) values, and decrease in PUFA content in CGP were observed. Furthermore, we peroxidized CGPs derived from various fishes and shellfishes, and PAF-like biological activities were measured by platelet aggregation. Investigations of the correlation between the PAF-like activities produced by peroxidation of PUFA containing CGP and the contents of PUFA and alkyl ether-linked subclass in parent CGPs, revealed that higher activities were produced by peroxidation of alkyl-PUFA CGP species, that were rich in alkyl ether-linked subclass and/or rich in docosahexaenoate (DHA). These results suggest that the lipids having PAF-like biological activities in fishes and shellfishes were produced by peroxidation of PUFA containing CGP.

### I. はじめに

PAF (platelet-activating factor, 血小板活性化因子) は、ウサギのアナフィラキシー反応解析の際に発見された多彩な生理作用を有するリン脂質性メディエーターである<sup>1)</sup>。PAF は、1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (サブクラスとして 1-

acyl 型もある) の構造<sup>2)</sup> を持ち、代表的な生理作用として、血小板活性化の他に、好中球・マクロファージなどの活性化、血管透過性亢進、血圧降下、平滑筋収縮作用などがある<sup>3-5)</sup>。本因子はアレルギーや炎症に関与する細胞から産生されるだけでなく、高等動物の正常組織<sup>6,7)</sup>、テトラヒメナ<sup>8)</sup>、細胞性粘菌<sup>9)</sup>、多細胞無脊椎動物<sup>10,11)</sup>、酵母<sup>12)</sup> 等、広く生物界に存在していることも判明してきた。

我々は、種々の食品の PAF 活性を検索した結果、

魚介類に高い活性があることを見出した。近年、PUFA (多価不飽和脂肪酸) 含有コリングリセロリン脂質 (CGP) の過酸化二次成績体として PAF 様構造の物質が同定され、その存在意義が注目されている<sup>13,14)</sup>。魚介類には、EPA (イコサペンタエン酸) や DHA (ドコサヘキサエン酸) などの PUFA が多く含まれ、過酸化され易いことも良く知られている。従って、本研究では、魚介類中に存在する PAF 活性が生合成由来の PAF か脂質過酸化により派生した PAF 様物質によるものか明らかにすることを目的とし、PAF 及び関連リン脂質について検討を行った。

## II. 実験方法

### 1. 総脂質の抽出と PAF 及び関連脂質の精製

#### 1) 魚介類筋肉組織の総脂質の抽出

魚介類は京都市錦市場の鮮魚店より購入した。旬(出盛り期)のもの、日常良く食されるもの、比較的 PUFA (多価不飽和脂肪酸) が多くとされるものを基準に選定した。購入直後に可食部(普通肉)を10~20 g 量りとり、四訂日本食品標準成分表<sup>15)</sup>を参考に各食品中の水分含量を算出し、一相系溶媒(クロロホルム:メタノール:水=1:2:0.8, by vol.)となるように、メタノール、クロロホルムを加え、氷冷下にてブレンダー式ホモゲナイザーで15,000 rpm, 10分間ホモゲナイズを行った後、Bligh-Dyer 法<sup>16)</sup>を用いて総脂質(TL)の抽出を行った。操作中の脂質の自動酸化の影響を検討するために、同一種類の魚介類で、抗酸化剤 BHT (ブチルヒドロキソトルエン, 2,6-ジ-*tert*-ブチル-*p*-クレゾール)を添加したもの(終濃度0.01%)と無添加のものを用意し、並行して脂質の抽出、精製及び保存を行った。以下の操作において、特に断らない限り、脂質はクロロホルム:メタノール混液(1:1, by vol., 以下 CM と略す, ±BHT)に溶解し、-40℃で保存した。溶媒の乾固は窒素ガスにて行った。リン脂質(PL)は、Bartlett 法<sup>17)</sup>に従い、加水分解後、脂質リンの定量を行った。

#### 2) PAF 及び関連脂質の精製

クロロホルムに溶解した1 mg Pi (脂質リン)相当の TL をアルミナ(ICN Alumina N-Super I, 1 g)に吸着させ、クロロホルムで単純脂質(SL)を溶出させた後、CMにてコリン含有リン脂質(Cho. PL)を溶出させた。SL含量の多い魚類(マイワシ、ブリ等)の場合、ヘキサンをを用いた溶媒分画法により SL を除去した後、アルミナカラムクロマトグラフ

ィーを行った。

次に、薄層プレート(Merck 社 silica gel 60)に Cho. PL (200 µgPi/プレート)を塗布し、展開溶媒系、クロロホルム:メタノール:水=65:35:6 (by vol.)を用いて、1時間展開させた。標準として卵黄 TL (20 µgPi 相当)を使用し、TNS (6-(*p*-トルイジノ)-2-ナフタレンスルホン酸)により、脂質の検出を行った。PAF 様物質画分<sup>18)</sup>として、画分①(原点からリゾフォスファチジルコリン(LPC)の下端)、画分②(LPCの上端からスフィンゴミエリン(SPH)の下端まで、本来の PAF 画分)と画分③(SPHの上端からコリングリセロリン脂質(CG)の下端まで)の3画分、及び CGP 画分をそれぞれスクレイパーでかき取り、各脂質を抽出した。

### 2. エーテル型 CGP の測定 (PAF の半合成)

CGP をアルカリ処理後、アセチル化して PAF の半合成を行い、エーテル型 CGP 含量を求めた<sup>19)</sup>。精製した CGP (5 µgPi 相当)に 0.25 N KOH/95%メタノール溶液 1 ml を加え、ヒーティングブロックで37℃, 15分間加熱した。その後、得られたエーテル型リゾ CGP をクロロホルム 1 ml に溶解し、無水酢酸 200 µl, 60%過塩素酸 30 µl を加えてアセチル基の導入を行い、半合成 PAF を得た。

### 3. CGP の過酸化反応による PAF 様活性の生成

10 µgPi 相当の CGP (BHT 添加で保存したもの)をアルミナカラムクロマトグラフィーにより BHT を除き、溶媒を乾固後、ヒーティングブロックで40℃24時間自動酸化を行った。その後、500 µl の CM (BHT 添加)に溶解し、半量は TLC にて PAF 様物質画分を精製後、PAF 様活性の定量を行い、残りの半量は FAME 化後、脂肪酸分析を行った。抗酸化ビタミンの影響を検討する実験では、CGP に対して 0.1~2.0 mol% のビタミンを添加して、同様に操作した。また、FeSO<sub>4</sub>/アスコルビン酸/EDTA の系を用いた過酸化反応<sup>18)</sup>も行った。

### 4. 脂肪酸組成の分析

10 µgPi 相当の TL 及び CGP に10%塩酸-メタノール 1 ml を加え、80℃1時間加熱し、メタノリシスを行った。その後、石油エーテルを用いて、脂肪酸メチルエステル(FAME)を抽出し、ガスクロマトグラフィー(GC)による脂肪酸分析を行った。Shinchrom A (DMCS) ADVANCE DS カラム (3 mm×2 m)を装着した HITACHI G-5000 形ガスクロマトグラフを用いて、分析カラム温度は開始時 150℃で1分保持後、4℃/分で220℃まで昇温し、

その後5分間この温度を保持した。キャリアガスは窒素ガス (40 ml/min) を用いて注入部及び検出部温度は共に230℃とし、FID (水素炎イオン化検出器) で検出を行った。標準 FAME を用いて、各ピークの保持時間により試料中の脂肪酸を同定し、各成分のピーク面積により総脂肪酸における各々の脂肪酸組成を百分率 (%) で表示した。

### 5. TBARS 値の測定

Buege と Aust の方法<sup>20)</sup> を用いて、TBARS (チオバルビツール酸反応性物質) 値の測定を行った。10~20 $\mu$ gPi 相当の TL 及び CGP をエタノール 0.2 ml に溶解し、蒸留水 0.8 ml と TBA 試薬 (0.375% TBA, 40% トリクロロ酢酸, 0.02% BHT) 2 ml を加え、沸騰水浴中で15分間加熱した。冷却後、ブタノール 4 ml を加え、3,000 rpm, 10分間遠心分離後、ブタノール層の 535 nm での吸光度を測定した。標準物質として 1,1,3,3-テトラエトキシプロパンを用いた。

### 6. 血小板凝集による PAF 及び PAF 様活性の定量

#### 1) ウサギ洗浄血小板の調製

Pinckard らの方法<sup>21)</sup> に従い、まず、抗凝固剤として ACD (acid-citrate-dextrose) 溶液を加えて採血したウサギ血液を 1,600 rpm で15分間遠心し、多血小板血漿 (PRP) を得た。これを Ficol-paque に重層し、2,100 rpm で15分間遠心して血小板画分を得、これを 0.1 mM EGTA (エチレンジグリコールビス-( $\beta$ -アミノエーテル)-N,N'-四酢酸) 含有タイロードゼラチン緩衝液 (pH6.5) に懸濁し、遠心後、沈殿した血小板を同緩衝液にて再懸濁し、洗浄血小板 (1.25 $\times$ 10<sup>9</sup> cells/ml) を調製した。

#### 2) 血小板凝集活性の測定<sup>22)</sup>

検定試料は溶媒を乾固させた後、ウシ血清アルブミン (脂肪酸フリー) 含有生理食塩水 (2.5 mg/ml) を 100  $\mu$ l 加え、超音波にて懸濁させて調製した。血小板凝集計用キュベットに回転子、1 mM CaCl<sub>2</sub> 含有タイロードゼラチン緩衝液 (pH7.4) 160  $\mu$ l、洗浄血小板懸濁液 40  $\mu$ l を入れ、37℃1,000 rpm で1分間インキュベート後、試料 10  $\mu$ l を加え、透過率の上昇による凝集の割合を自動血小板凝集測定装置 (NBS ヘマトレーサー-601型) にて測定した。標準として 16:0 PAF (1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) を用いて検量線を作成し、PAF 様活性の定量を行い、16:0 PAF 相当量で示した。また、凝集活性の認められたものは、PAF 受容体アンタゴニストである WEB-2086 (5

$\times 10^{-7}$  M) による凝集の抑制を確認した。

## III. 結果と考察

### 1. 魚介類に存在する PAF 様活性と関連リン脂質の分析

血小板活性化因子 (PAF) は、高等動物では主に修復系合成経路により合成される<sup>23)</sup>。即ち、刺激に応じて細胞内の Ca<sup>2+</sup> 濃度が上昇してアラキドン酸 (AA) 特異的 phospholipase A<sub>2</sub> が活性化され、生体膜のコリングリセロリン脂質 (CGP) よりリン PAF が生成し、次いで acetyltransferase によりアセチル基が導入される。

我々は、動物性及び植物性の食品中の PAF 活性を測定し、魚介類が牛肉、豚肉以上に高い PAF 活性を有することを見出した。PAF の生合成経路の前駆体であるエーテル型 CGP は、一般に、高等動物の炎症性細胞・組織に多いが、魚介類の CGP については不明である。

日本食品脂溶性成分表<sup>24)</sup> に魚介類の脂質含量及び脂肪酸組成が記載されているが、これは総脂質 (TL) の値である。多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は一般に貯蔵脂質である中性脂肪に結合していることが多く、水産脂質の有効利用の観点から精力的な研究が行われてきた<sup>25)</sup>。しかし、組織脂質であるリン脂質 (PL) 含量や PL 結合型の脂肪酸については、特定の魚介類以外、あまり検討されていない。本研究では、特に CGP に結合している脂肪酸組成とその過酸化反応により PAF 様活性が出現するかについて焦点を絞り、検討を行った。

魚介類の脂質含量及び脂肪酸組成は、同一種類であっても、環境条件 (水温、棲息深度、回遊場所) や生理的条件 (性的成熟度、年齢)、食餌状態の影響で、個体や系統群で大きく変動する。魚介類の選定に際して、今回は、広く多種類の魚介類について検討することを第一目的とし、旬に出回っている魚介類を購入し、部位は普通肉組織 (生) を用いた。貝類はカキ、ハマグリの場合、内蔵も一緒にホモゲナイズした。

まず、TLC により3画分の PAF 様物質画分を精製し、血小板凝集により PAF 活性を測定した。例として、図1にサンマの PAF 様物質画分 (BHT 無添加) の血小板凝集曲線を示した。本来の PAF が存在する画分②が最も凝集活性が高いが、画分①及び画分③にも凝集活性があること、また、これらの凝集活性は、PAF 受容体アンタゴニスト WEB-2086 で完全に抑制されたことより、これらの画分

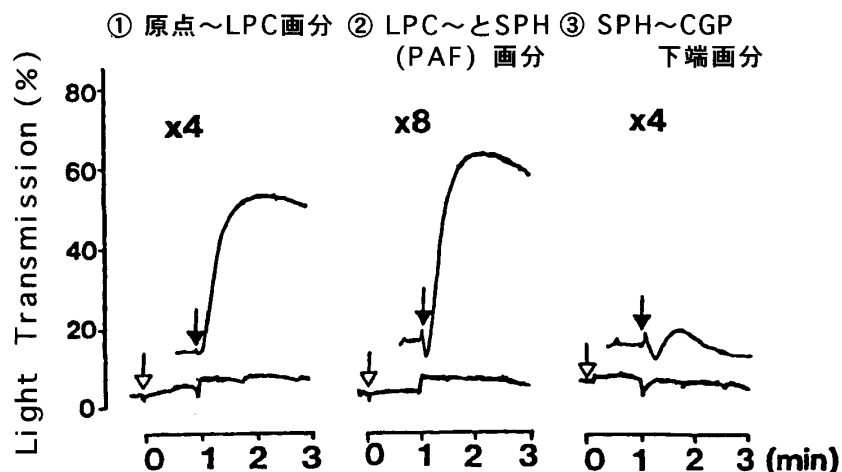


図1 サンマの PAF 様物質画分の血小板凝集活性および PAF アンタゴニストによる阻害  
TLC により精製した PAF 様物質画分 (①原点～LPC 下端, ②LPC 上端～SPH 下端 (本来の PAF 画分), ③SPH 上端～CGP 下端) を▼に示す時点で添加し, 血小板凝集活性を透過率 (%) の上昇により測定した。PAF アンタゴニスト WEB-2086は, ▽に示す時点で添加し, 1分後に PAF 様物質画分を添加し, 凝集抑制を確認した。

に PAF 様物質が存在することが明らかとなった。

約30種類の魚介類について検討し, 表1に, 総 PAF 様活性 (3画分の合計値, 16:0 PAF 相当量) 及び関連 PL および, TBARS 値の分析値をまとめた。

魚介類組織 100 g 中の PL 含量は大部分が約 20～30 mg Pi (脂質リン相当) であった。PL 中の CGP の割合は, 大部分の魚類, その他の魚介類では約30～50%であったが, 貝類は25%前後と比較的低かった。

PAF 様活性を抗酸化剤 BHT の添加の有無で比較した結果, 大部分の魚介類で無添加の方が総 PAF 様活性が高い値を示した。また, BHT 無添加のものは, 添加したものに比べて TBARS 値が高くなっており, また, CGP 中の PUFA (DHA, EPA) 含量の減少が見られたことより, 操作中に過酸化が進行したことが示唆された。特に, カツオ, サンマ, サバ, マイワシなど, PAF 様活性が BHT 添加したものに比べて顕著に高くなっていたものは, PUFA 含量も約40～60%と高いものであり, TBARS 値も高くなっていた。一方, ハゼ, フグ, タイなどは PAF 様活性が低く, TBARS 値や PUFA 含量も, 他の魚介類よりも比較的低かった。

TBARS 値は脂質過酸化反応の主に第2段階生成物の指標であり, PAF 様活性は更に分解が進行した第3段階の生成物である。かつ, PAF 様物質は後述するような種々の分子種の混合物であるので 16:0 PAF 相当量で表わしている。従って, 必ず

しも両者の値に相関があるとは限らない。しかしながら, 今回の結果から, PUFA 含有 CGP が過酸化されて PAF 様物質が派生してくる可能性が示唆された。また, BHT を添加して調製したものにも PAF 様活性があったことから, 魚介類筋肉組織中には生合成由来の PAF が存在するものと思われる。特に, タイラガイのような貝類では, TBARS 値が低いにもかかわらず PAF 様活性が高いものもあり, エーテル型 CGP の割合が高い (表2) ことから, 生合成由来の PAF による可能性は充分考えられる。

今回, 我々は日常利用している鮮魚店の店頭にあるものを購入して, 魚介類に存在する PAF 様活性について検討したが, 中には CGP の PUFA 含量が低いにもかかわらず, PAF 様活性が高く, また, TBARS 値も高いものがあった (表1 アナゴ, サワラ)。流通を含めた保存の期間やその条件により過度に過酸化が起こり, PAF 様物質が生成されたことが予想される。また, 魚介類はリポキシゲナーゼ活性が高い<sup>26)</sup> ことが知られているため, この酵素による生体内過酸化により生成される可能性も考えられる。PAF 様物質の生成機構として, 化学的な過酸化, 生体内過酸化の両面からの解明が今後必要と思われる。現在, 魚肉の保存や加熱調理の影響について検討中である。

## 2. CGP の過酸化反応による PAF 様活性の生成及び CGP の分析

Tanaka らは, DHA, AA, LA (リノール酸) を

表1 魚介類の PAF 様活性及び関連リン脂質の分析

食品名	PL (mgPi/100 g)	CGP/PL (%)	総 PAF 様活性*1 ( $\mu\text{mol/mol}$ CGP)		CGP の PUFA*2 (20:5 + 22:6) (%)		TBARS (mmol MDA/mol TL)	
			BHT-	+	BHT-	+	BHT-	+
〈魚類〉								
アジ	31.0	34.5	0.89	0.33	25.7	36.9	0.62	0.31
マイワシ	28.5	39.1	1.74	0.52	31.7	44.1	3.41	1.33
サバ	23.8	41.8	1.96	1.63	37.9	45.1	2.01	1.36
サンマ	32.7	30.0	2.49	0.83	33.3	40.2	5.30	2.60
カツオ	27.2	36.5	6.89	2.82	46.3	59.6	1.15	0.59
カレイ	21.3	42.0	1.02	0.61	13.7	19.0	0.97	0.71
アナゴ	20.7	45.5	1.70	1.19	15.4	18.6	1.36	0.99
サワラ	19.4	35.5	1.65	0.71	16.2	19.0	3.75	2.53
ハタハタ	28.5	28.0	0.88	0.32	39.1	40.9	1.09	0.50
キス	15.0	46.5	0.72	0.32	20.4	31.6	0.96	0.47
サヨリ	26.9	49.5	0.64	0.44	30.4	36.1	0.76	0.73
タイ	25.9	49.0	0.29	0.06	20.7	29.3	0.71	0.63
ハモ	20.5	43.0	0.45	0.38	11.1	34.5	0.66	0.24
ブリ	18.6	39.4	0.21	0.07	35.9	39.9	10.09	5.82
マグロ	15.4	48.9	0.43	0.36	34.5	43.1	1.76	0.90
ハゼ	20.5	35.9	0.04	0.03	29.8	24.8	0.55	0.32
フグ	25.1	44.4	0	0	37.2	39.6	0.63	0.45
メバル	19.8	39.0	0.14	0.10	25.4	31.3	1.75	0.80
〈貝類〉								
カキ	30.8	22.7	1.50	1.07	20.5	25.1	0.91	0.27
タイラガイ	17.2	24.0	2.21	2.00	39.0	42.4	0.63	0.40
ホタテガイ	25.8	25.5	0.95	0.32	42.2	51.4	0.18	0.14
ハマグリ	28.2	22.6	0.13	0.13	40.2	41.7	0.40	0.38
〈その他の魚介類〉								
スルメイカ	52.8	32.0	5.24	3.31	32.2	45.6	0.20	0.12
マダコ	23.5	26.4	1.74	1.44	22.9	34.6	0.15	0.02

各魚介類について、2～4回実験を行った平均値を示した。

\*1 16:0 PAF 相当量, \*2 EPA (20:5) と DHA (22:6) の合計値

含有した化学合成の CGP をそれぞれ過酸化反応させ、PUFA 鎖のカルボニル側に最も近い位置の二重結合 (DHA では 4～5 位, AA では 5～6 位, LA では 9～10 位) にヒドロペルオキシドが生成し分解されると、グリセロール骨格の C-2 位にモノカルボン酸、 $\omega$ -ヒドロキシモノカルボン酸、ジカルボン酸、ジカルボン酸セミアルデヒドの、4 種類のカルボン酸残基をもつ PAF 様 PL が派生することを質量分析 (GC-MS) により証明している<sup>18)</sup>。これらはいずれも C-2 位が短鎖で構造的に PAF と類似しており、PAF 受容体を介して血小板や標的細胞を活性化する。PAF 様物質は、PAF 分子種同様 C-1 位がエーテル型の方がエステル型の約 100 倍活性

が高い。また、C-2 位が短鎖なほど高い活性を示すが、DHA 含有 CGP を過酸化した場合、最も短鎖な PAF 様物質が生成することも判明している<sup>13)</sup>。

表 1 に示したように、魚介類の CGP には DHA や EPA を含有するものが多いことが明らかとなった。そこで、魚介類由来 PUFA 含有 CGP の過酸化により PAF 様物質が生成するか、精製した CGP を用いて過酸化反応を行った結果、ほとんどの CGP が自動酸化反応 (40℃, 24 時間) により、PAF 様活性を示した。また、FeSO<sub>4</sub>/アスコルビン酸/EDTA の系を用いた過酸化反応<sup>18)</sup> によっても同様の結果を示した。例として、図 2 にサンマの過酸化 CGP の血小板凝集曲線を示すが、その凝集活

表2 魚介類由来の PUFA 含有 CGP の過酸化による PAF 様活性の生成と CGP の PUFA 含量及びエーテル型 CGP の割合

食品名	自動酸化	PAF 様活性*2 ( $\mu\text{mol}/\text{mol}$ CGP)	CGP の PUFA (%)		エーテル型 CGP*3/CGP (%)
			20:5	22:6	
〈魚類〉					
アジ	—*1	0	8.7	43.7	0.67
	+	7.41	7.4	33.5	
カツオ	—	0	8.5	51.1	0.38
	+	21.91	2.9	8.6	
マイワシ	—	0	12.5	37.8	0.42
	+	6.29	6.9	17.0	
サンマ	—	0	8.4	44.5	0.26
	+	3.84	4.3	22.2	
サバ	—	0.99	12.5	36.7	0.83
	+	49.01	3.4	7.7	
マグロ	—	0	6.3	36.8	0.67
	+	5.47	3.1	18.5	
ハゼ	—	0.76	24.3	5.5	0.16
	+	8.80	11.1	3.0	
ハタハタ	—	0.35	18.8	22.1	0.08
	+	3.80	10.6	10.9	
フグ	—	0.16	12.7	26.9	0.08
	+	1.80	11.6	15.5	
ブリ	—	0	11.1	28.8	0.08
	+	1.08	9.9	22.8	
〈貝類〉					
ホタテガイ	—	0.46	25.2	26.2	3.43
	+	39.72	14.2	9.9	
タイラガイ	—	1.56	20.0	22.4	4.10
	+	42.81	10.0	9.8	
ハマグリ	—	0.66	10.5	29.7	2.67
	+	14.80	8.5	21.8	
カキ	—	0	26.9	13.5	0.77
	+	1.76	25.3	12.2	
〈その他の魚介類〉					
スルメイカ	—	0.34	8.1	35.3	7.65
	+	3.13	7.9	34.2	
マダコ	—	0	8.5	26.1	1.49
	+	11.71	7.0	17.2	

各魚介類の CGP について、2 回過酸化反応を行った平均値を示した。

\*1 —：未処理 CGP，+：自動酸化反応を行った CGP

\*2 16:0 PAF 相当量

\*3 C-1 位が16:0 のエーテル型 CGP 相当量

性は PAF アンタゴニストにより阻害されたことより、PAF 受容体を介していることが証明され、PAF 様物質の生成が明らかとなった。

次に、PAF 様活性と CGP の分子種との関連に

ついて、CGP の PUFA (EPA, DHA) 含量、並びにエーテル型 CGP の割合について検討し、結果を表2にまとめた。本来エーテル型 CGP は化学的に分析するべきであるが、今回は派生する PAF 様活

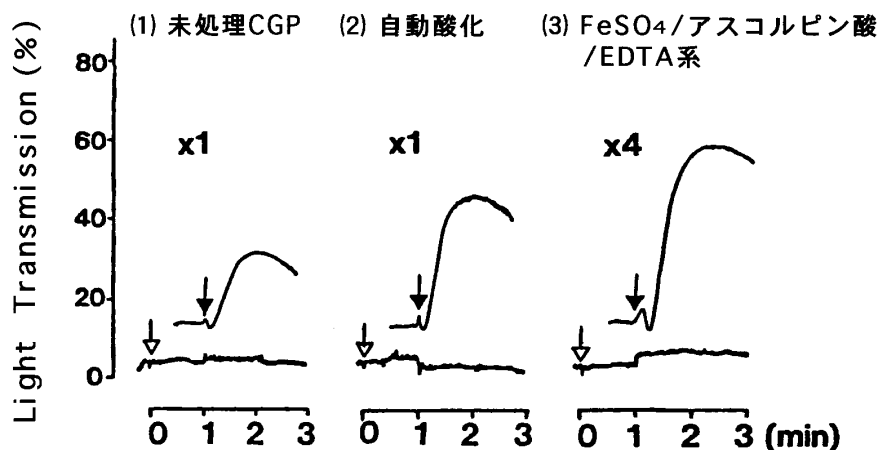


図2 サンマ由来 CGP の過酸化反応による PAF 様活性の出現  
 (1)未処理 CGP, (2)自動酸化した CGP, (3)FeSO<sub>4</sub>/アスコルビン酸/EDTA の系により過酸化した CGP を、TLC にて PAF 様物質 (3 画分混合) を精製し、血小板凝集測定を行った (図 1 の説明文参照)。

性との関連を重視し、PAF を半合成した後に血小板凝集活性を測定し、16:0 PAF 相当量で示した。従って、C-1 位が16:0 のエーテル型 CGP 相当量ということになり、物質的にはさらに多い可能性もある。魚類は1%以下であったが、貝類は高い傾向にあった。今後、C-1 位のアルキル側鎖の化学的分析が必要であろう。

魚類では、サバ、カツオ、アジ、マイワシの CGP が過酸化により高い PAF 様活性を示し、これらの CGP の PUFA 含量は特に DHA が35~50%と高く、過酸化反応により激減していたことから、PUFA 含有 CGP の過酸化により PAF 様活性が生成することが明らかとなった。また、貝類では、タイラガイ、ホタテガイの PAF 様活性が高く、エーテル型 CGP、かつ、PUFA 含量も高かった。前駆体である CGP 1 mol 当たりで見ると、約1~50 μmol の PAF 様物質が生成していた。CGP の過酸化により高い PAF 様活性を示した魚介類は、表1に示した魚介類の組織中に存在する PAF 様活性も高い傾向が見られた。一方、過酸化により PAF 様活性があまり出現しなかったものは、PUFA 含量やエーテル型の割合が比較的低い CGP であった。以上の結果から、天然型の CGP においても、C-1 位がエーテル型で C-2 位が DHA のような PUFA 含有 CGP が過酸化されると、高い生理活性を有する分子種の PAF 様物質が生成することが明らかとなった。

### 3. PUFA 含有 CGP の過酸化反応による PAF 様物質生成への抗酸化ビタミンの影響

サンマの CGP に β-カロテン、α-トコフェロールを添加 (CGP の0.1~2.0 mol%) し、自動酸化反応を行った後、PAF 様活性および CGP の PUFA 含量を測定した。図3に抗酸化ビタミン無添加の場合に生じた血小板凝集活性、および CGP の PUFA 含量の減少量を100%とし、各濃度の抗酸化ビタミンを添加した場合のそれぞれの抑制率 (%) を示した。濃度依存的に血小板凝集活性の抑制、並びに、CGP の PUFA 含量の減少も抑制していた。IC<sub>50</sub> は0.2 mol%と両ビタミンとも同じような値であった。ラジカル捕捉作用は α-トコフェロールの方が強いといわれるが、β-カロテンは一重項酸素の消去作用もあるため、この自動過酸化の反応系では同程度の効果がみられたと思われる。この結果より、抗酸化ビタミンは、PUFA 含有 CGP の過酸化 (ヒドロペルオキシドの生成) を抑制し、その分解によって生じる PAF 様物質の生成も抑制することが明らかとなった。

最近、PAF 受容体遺伝子のノックアウトマウスなどの発生工学的研究により、PAF のアレルギーへの関与は確実となった<sup>27)</sup>。以前より、アレルギーなどの治療を目的として、PAF 受容体アンタゴニストの医薬品開発が試みられてきたが、食習慣により PAF の産生を制御できる方が望ましいのは言うまでもない。近年、PAF の脂質栄養学的な研究も進められており、PAF の生合成と密接に関連している n-6 系脂肪酸である AA と代謝的に拮抗する n-

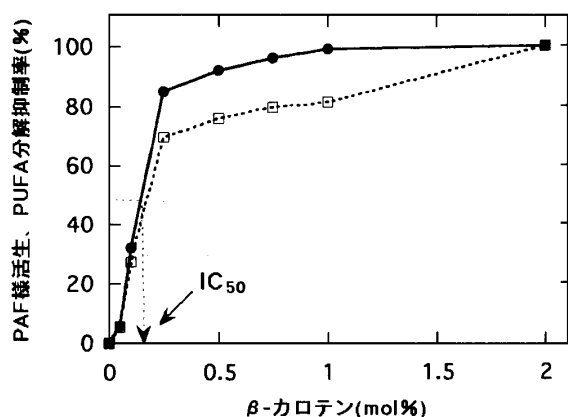
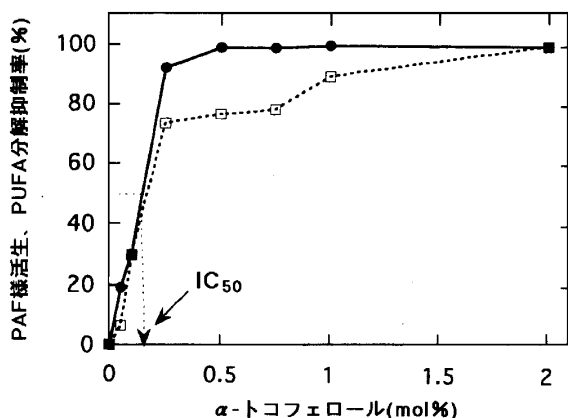


図3 CGPの過酸化によるPAF様活性の生成への抗酸化ビタミンの抑制効果  
サンマ由来CGPに抗酸化ビタミン( $\alpha$ -トコフェロール,  $\beta$ -カロテン)をCGPに対して0~2.0 mol%添加し, PAF様活性及びPUFA含量を測定し, 無添加時の値を100%とした場合の抑制率を示した。  
—●— PAF様活性生成抑制率, ---□--- PUFA分解抑制率

3系脂肪酸を用いて膜リン脂質の分子種を改変することにより, PAF産生が抑制されることが報告されている<sup>28,29</sup>。本研究で示されたように, 特にDHAなどのPUFA含有CGPの過酸化により高い活性を有するPAF様物質を派生することになれば, n-3系列のPUFAを多く含む魚介類(特にサンマなど“背の青い魚”)の摂取を再検討する必要がでてくる。しかしながら生体内には活性酸素種消去酵素(スーパーオキシドジスムターゼ(SOD))などの生体内抗酸化システムがあり, さらに, 食品中にはビタミンE, ビタミンC, カロテノイド及びフラボノイドなどの多種類の抗酸化作用を有する物質が含まれているため, 生理的条件下での生体内過酸化はそれほど問題がないと思われる。今回のCGPの過酸化によるPAF様物質生成に対する抗

酸化ビタミンの効果は, それを示唆するものである。また, PAFの分解酵素PAFアセチルヒドロラーゼは, PAF様物質の排除の役目も担っていることが報告されている<sup>30</sup>。一方, PAF様物質が生成されてもその量はごく微量であり, 過度に過酸化されたものを食さない限り問題が無いと思われる。しかしながら, 魚介類組織に含まれるPAF様物質の消化吸收や生体内での生理機能については不明であり, このような観点からの研究, 解明も今後重要になると思われる。

#### IV. 要 約

魚介類組織中のPAF様活性及びPAF関連脂質の分析を行った。まず, TLCにより3画分のPAF様物質画分を精製し, 血小板凝集によりPAF活性を測定した。その結果, 本来のPAFが存在する画分②が最も凝集活性が高いが, 画分①及び画分③にも凝集活性があること, また, これらの凝集活性は, PAF受容体アンタゴニストWEB-2086で抑制されたことより, 魚介類組織にPAF及びPAF様物質が存在することが明らかとなった。

約30種類の魚介類について検討した結果, 大部分の魚介類で抗酸化剤BHT無添加の方が総PAF様活性が高い値を示した。また, BHT無添加のものは, 添加したものに比べてTBARS値が高くなっており, また, CGP中のPUFA(DHA, EPA)含量の減少が見られたことより, 操作中に過酸化が進行したことが示唆された。特に, PAF様活性がBHT添加したものに比べて顕著に高くなっていたものは, PUFA含量も高いものであり, TBARS値も高かった。以上の結果から, PUFA含有CGPが過酸化してPAF様物質が派生してくる可能性が示唆された。

次に, 魚介類由来PUFA含有CGPを用いて過酸化反応を行った結果, ほとんどのCGPが自動酸化反応により血小板凝集活性を示し, その活性はPAFアンタゴニストにより阻害された。CGPの過酸化により高いPAF様活性を示した魚介類は, 組織中に存在するPAF様活性も高い傾向が見られた。PAF様活性とCGPの分子種との関連について検討した結果, C-1位がエーテル型で, C-2位がDHAのようなPUFA含有CGPが過酸化されると, 高い生理活性を有する分子種のPAF様物質が生成することが示唆された。

さらに, 抗酸化ビタミン( $\beta$ -カロテン,  $\alpha$ -トコフェロール)は, PUFA含有CGPの過酸化を抑制し,



その分解によって生じる PAF 様物質の生成も抑制することが明らかとなった。

## 謝 辞

PAF 受容体アンタゴニストである WEB-2086 をご恵与いただいたベーリンガーインゲルハイム㈱に感謝致します。

## 引用文献

- 1) J. Benveniste, P. M. Henson and C. G. Cochrane: *J. Exp. Med.*, **136**, 1356-1377 (1972)
- 2) D. J. Hanahan, C. A. Demopoulos, J. Liehr and R. N. Pinckard: *J. Biol. Chem.*, **255**, 5514-5516 (1980)
- 3) F. Snyder: *Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators*, Plenum Press, New York (1987)
- 4) 和久敬蔵, 井上圭三編: 血小板活性化因子—生化学・生理・病理, 東京化学同人 (1989)
- 5) 中山玲子: 本誌, **45**, 1-10 (1990)
- 6) R. Nakayama, K. Yasuda and K. Saito: *J. Biol. Chem.*, **262**, 13174-13179 (1987)
- 7) R. Nakayama and K. Saito: *J. Biochem.*, **105**, 494-496 (1989)
- 8) M. Lekka, A. D. Tselepis and D. Tsoukatos.: *FEBS Lett.*, **208**, 52-55 (1986)
- 9) F. Bussolino, C. Sordano, E. Benfenati and S. Bozzaro.: *Eur. J. Biochem.*, **196**, 609-615 (1991)
- 10) T. Sugiura, T. Ojima, T. Fukuda, K. Satouchi, K. Saito and K. Waku: *J. Lipid Res.*, **32**, 1795-1803 (1991)
- 11) 杉浦隆之, 福田輝夫, 程能能, 宮本達也, 山下純, 和久敬蔵: 脂質生化学研究, **33**, 185-188 (1991)
- 12) R. Nakayama, H. Kumagai and K. Saito: *Biochim. Biophys. Acta*, **1199**, 137-142 (1994)
- 13) T. Tanaka, M. Iimori, H. Tukatani and A. Tokumura: *Biochim. Biophys. Acta*, **1210**, 202-208 (1994)
- 14) 中山玲子: ビタミン, **70**, 343-345 (1996)
- 15) 科学技術庁資源調査会編: 日本食品標準成分表, 大蔵省印刷局 (1982)
- 16) E. G. Bligh and W. J. Dyer: *Can. J. Biochem. Phys.*, **37**, 911-917 (1959)
- 17) G. R. Bartlett: *J. Biol. Chem.*, **234**, 466-468 (1959)
- 18) T. Tanaka, H. Minamino, S. Unezaki, H. Tukatani and A. Tokumura: *Biochim. Biophys. Acta*, **1166**, 264-274 (1993)
- 19) R. Nakayama, K. Yasuda, K. Satouchi and K. Saito: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **151**, 1256-1261 (1988)
- 20) J. A. Buege and S. D. Aust: *Methods Enzymol.*, **52**, 302-310 (1978)
- 21) R. N. Pinckard, R. S. Farr and D. J. Hanahan: *J. Immunol.*, **123**, 1847-1857 (1979)
- 22) R. Nakayama, M. Oda, K. Satouchi and K. Saito: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 629-634 (1985)
- 23) R. K. Wykle, B. Malone and F. Snyder,: *J. Biol. Chem.*, **255**, 10256-10260 (1980)
- 24) 科学技術庁資源調査会編: 日本食品脂溶性成分表 (脂肪酸・コレステロール・ビタミン E) 大蔵省印刷局 (1989)
- 25) 藤本健四郎編: 日本水産学会監修「水産脂質—その特性と生理活性」恒星社厚生閣 (1993)
- 26) 飯島憲章, 鹿山光: 鹿山光編「AA, EPA, DHA—高度不飽和脂肪酸」恒星社厚生閣, pp. 82-95 (1995)
- 27) S. Ishii, T. Nagase, F. Tashiro, K. Ikuta, S. Sato, I. Waga, K. Kume, J. Miyazaki and T. Shimizu: *EMBO J.*, **16**, 133-142 (1997)
- 28) T. Horii, K. Satouchi, Y. Kobayashi, K. Saito, S. Watanabe, Y. Yoshida and H. Okuyama: *J. Immunol.*, **147**, 1607-1611 (1991)
- 29) 奥山治美: 脂質栄養学, **6**, 6-10 (1997)
- 30) K. E. Stremmler, D. M. Stafforini, S. M. Prescott and T. M. McIntyre: *J. Biol. Chem.*, **266**, 11095-11103 (1991)