

学 位 論 文 題 名

水産リン脂質の新規抽出法の開発と
生理機能に関する研究

学位論文内容の要旨

不飽和脂肪酸であるn-6系脂肪酸とn-3系脂肪酸は体内で合成できず、欠乏すると身体に悪影響を及ぼす。従ってこれらの脂肪酸は必須脂肪酸と言われ、経口摂取が必要不可欠である。魚を食する人々は心筋梗塞や動脈硬化など血管系の生活習慣病の発症率が低いことから、水産物に豊富なn-3系脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)が世界的に注目され、今日に至っている。本研究は、別名DHAのカプセルと呼ばれているイクラから効率良くDHA結合リン脂質を抽出する方法を検討し、得られたリン脂質の新規生理機能の一端を明らかにしたものである。イクラは商品価値のないものを対象とした。

第1章では、超臨界二酸化炭素流体(SC-CO₂)を用いてイクラからDHA結合型リン脂質の抽出を試みた。はじめに、凍結乾燥したイクラから諸条件下でSC-CO₂による脂質の抽出を行い、抽出脂質の組成を分析した。その結果、9.8から31.4 MPa、40から80℃で2時間SC-CO₂で抽出を行った範囲では9.8 MPaの場合、何れの温度条件下でも1%以下の抽出効率に止まることが判明した。このことから以後は17.7から31.4 MPaの条件で本研究を進めた。80℃では、17.7から31.4 MPまでの圧力の上昇とともに抽出量が増え、また60℃においても、17.7から24.5 MPaに圧力を上昇させると抽出量が増加することがわかった。しかし、40℃では、圧力を上昇させても抽出量は微増に止まった。一方、圧力を一定とし、温度を変化させた場合は17.7 MPaでは、温度の上昇とともに抽出量が減少したが、31.4 MPaでは温度が高いほど抽出量が増加した。これらの結果から、抽出量はCO₂濃度と密接な関係にあることが判明した。次いで第2節では、SC-CO₂とエントレイナーとしてのエタノールの併用によって、凍結乾燥させたイクラからDHA結合型リン脂質を効率良く抽出する方法について検討した。エントレイナーとしてエタノールを使用することで、トリグリセリド(TG)とリン脂質(PL)を分離することを検討した結果、先ず第一段階として、SC-CO₂に5%エタノールを混合して抽出を4時間行なうプロセスにより可能な限りTGを多く抽出除去し、続く第二段階で出来るだけ短時間にエタノール濃度を5%から20%に増加させて1時間抽出した後、第三段階でSC-CO₂に20%エタノールを混合してPL抽出を3時間行うことがPLの分離回収に適していることを明らかにした。この方法により、第三段階でPLをほぼ全量抽出することができた。すなわち、SC-CO₂とエントレイナーとしてエタノールを組み合わせることにより、効率良く海産物からリン脂質を抽出することに成功した。

第2章では、DHAの分子形態すなわち脂質クラスの違いがDHAの吸収、輸送、分布に対して如何なる

影響を及ぼすかについて検討した。脂質クラスには、第1章で得たDHA結合型リン脂質(DHA-PL)、DHA結合型TG(DHA-TG)、DHA結合型遊離脂肪酸(DHA-FA)及びDHA結合型エチルエステル(DHA-EE)を用いた。

マウスに各脂質を4週間自由摂食させた結果、血清では、DHA-PL群を除くDHA食の3群でアラキドン酸(AA)濃度の増加が見られたが、DHA-PL群では他のDHA群に比較してAA濃度が有意に低下した。肝臓では、DHA食の4群全てで摂食後からリノール酸(LA)とAAが30%減少した。その中でも、特にDHA-PL群は、他のDHA食群の3群よりもLAとAA濃度が低くなった。脳では、DHA食の4群全てでDHA濃度が10%程度増加した。しかし、脳における脂肪酸組成の変化は、血清や肝臓で起きる変化に比べて小さいものであった。DHA-PLは特に血清と肝臓中のAA濃度を減少させ、AAやDHA由来のサイトカインのバランスがDHAの分子形態によって大きく変化することを強く示唆した。以上のことから脂質クラスの選択が当該脂肪酸の吸収性、持続性、及び分布様式区に少なからず影響することが示された。

第3章では、DHA摂取とPS摂取が、若齢マウス(12週齢)及び老齢マウス(73週齢)における海馬の脂質含有量と脂肪酸組成にどのような影響を与えるかを調べた。ラットに大豆リン脂質(Soy-PL)、大豆由来ホスファチジルセリン(Soy-PS)、DHA-PL及びDHA結合型ホスファチジルセリン(DHA-PS)を4週間自由摂取させた。若齢マウスの海馬ではコントロール群に比べてDHA-PL群、Soy-PS群、Soy-PL群でPSの割合が増加傾向を示したが、有意な差は見られなかった。一方、老齢群では、DHA-PS群、Soy-PS群が他の老齢群に比べてPSの割合が有意に高かった。また海馬の脂肪酸組成は、老齢、若齢を問わず、コントロール食群に比べてDHA-PL群、DHA-PS群でDHA濃度が有意に高くなった。Soy-PS群とSoy-PL群では、AA、DHAの濃度は共にコントロール群と同程度であった。以上のことからPSとDHAが同一分子に存在する構造をとることで、経口摂取したDHA-PSが血液脳関門を何らかの機序で通過し、PS及びDHAを増強させ、海馬でのPS及びDHA含量の加齢に伴う減少を食い止め得ることが分かった。よって、DHA-PSの摂取は、加齢で低下した神経機能のある程度は改善できるものと確信するに至った。

第4章では、コリン作動性薬剤として作用することが期待されるPCと、中枢機能に影響を及ぼすことが示されているDHAを1分子(sn-2位)に有するDHA-PCのREM睡眠に与える影響について検討した。DHA-PCをラットに10 μ g/rat投与した結果、REM睡眠の時間及び総睡眠時間中のREM睡眠量が共に有意差を持って増加することが明らかになった。そこで、DHA-PCを多く含むイクラ抽出油をヒトに対して長期間摂取させた時にREM睡眠にどのような影響が起こるか調べたところ、試験期間中の総睡眠時間は450分前後で有意な変化は認められなかったが、REM睡眠の絶対量及び総睡眠時間中のREM睡眠の割合(SREM%)に増加傾向が認められた。しかし、Wash out後にはREM睡眠が増加していた状態が消失した。また、REM睡眠時間の割合量をNormalizationした結果、REM睡眠の3ヵ月目のデータと基準夜、1ヵ月目、2ヵ月目を比較すると何れも3ヵ月目は有意にREM睡眠量が増加した。Wash outした4名に関しても有意にREM睡眠量が減少し、元の状態へ戻った。更に、OSA睡眠調査票MA版により、試験期間2ヵ月後から被験者の熟眠感が有意に向上していることが明らかになった。以上のことから食習慣が睡眠の質に影響している可能性が非常に高いことが示された。DHA-PCは良質な睡眠の確保にも貢献できるものと考ええる。

以上、本研究により商品価値のないイクラを原料とし、エタノールを組み合わせた3段階SC-CO₂抽出を行うことにより、DHA-PLを効率よく得られることが明らかになった。また、種々のDHA結合

型脂質クラスの中でも、DHA-PL が最も血清及び肝臓の脂質改善効果に優れていることも明らかになった。さらに、DHA-PL の新規機能として、良質な睡眠を誘導できることを強く示唆した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 是太郎
副 査 教 授 宮 下 和 夫
副 査 准教授 栗 原 秀 幸
副 査 准教授 細 川 雅 史

学 位 論 文 題 名

水産リン脂質の新規抽出法の開発と 生理機能に関する研究

魚を食する人々は心筋梗塞や動脈硬化など血管系の生活習慣病の発症率が低いことから、水産物に豊富なn-3系脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)が世界的に注目され、今日に至っている。本研究は、別名DHAのカプセルと呼ばれているイクラから、効率良くDHA結合型リン脂質を抽出する方法を検討し、得られたリン脂質の新規生理機能の一端を明らかにしたものである。イクラは商品価値のないものを対象としており、他の未利用魚卵にも転用できる方法を開発した。

第1章では、超臨界二酸化炭素流体(SC-CO₂)を用いてイクラからDHA結合型リン脂質の抽出を試みた結果について報告している。はじめに、凍結乾燥したイクラから諸条件下でSC-CO₂による脂質の抽出を行い、抽出脂質の組成を分析した。その結果、9.8から31.4 MPa、40から80℃で2時間SC-CO₂で抽出を行った範囲では9.8 MPaの場合、何れの温度条件下でも1%以下の抽出効率に止まることが判明した。このことから以後は17.7から31.4 MPaの条件で本研究を進め、以下のことを明らかにしている。すなわち80℃では、17.7から31.4 MPaまでの圧力の上昇とともに抽出量が増え、また60℃においても、17.7から24.5 MPaに圧力を上昇させると抽出量が増加するが、40℃では、圧力を上昇させても抽出量は微増に止まることを示した。一方、圧力を一定とし、温度を変化させた場合は17.7 MPaでは、温度の上昇とともに抽出量が減少するが、31.4 MPaでは温度が高いほど抽出量が増加することが明らかになった。これらの結果から、抽出量はCO₂濃度と密接な関係にあることが判明した。次いで第2節では、SC-CO₂とエントレイナーとしてのエタノールの併用によって、凍結乾燥させたイクラからDHA結合型リン脂質を効率良く抽出する方法について検討した。エントレイナーとしてエタノールを使用することで、トリグリセリド(TG)とリン脂質(PL)を分離することを検討した結果、先ず第一段階として、SC-CO₂に5%エタノールを混合して抽出を4時間行なうプロセスにより可能な限りTGを多く抽出除去し、続く第二段階で出来るだけ短時間にエタノール濃度を5%から20%に増加させて1時間抽出した後、第三段階でSC-CO₂に20%エタノールを混合してPL抽出を3時間行うことがPLの分離回収に適していることを明らかにした。この方法により、第三段階でPLをほぼ

全量抽出することができた。すなわち、SC - CO₂ とエントレイナーとしてエタノールを組み合わせることにより、効率良く海産物からリン脂質を抽出することに成功した。

第2章では、DHAの分子形態すなわち脂質クラスの違いがDHAの吸収、輸送、分布に対して如何なる影響を及ぼすかについて検討した。脂質クラスには第1章で得たDHA結合型リン脂質(DHA-PL)、DHA結合型TG(DHA - TG)、DHA結合型遊離脂肪酸(DHA - FA)及びDHA結合型エチルエステル(DHA-EE)を用いた。

マウスに各脂質を4週間自由摂食させた結果、血清では、DHA - PL群を除くDHA食の3群でアラキドン酸(AA)濃度の増加が見られたが、DHA-PL群では他のDHA群に比較してAA濃度が有意に低下した。肝臓では、DHA食の4群全てで摂食後からリノール酸(LA)とAAが30%減少した。その中でも、特にDHA - PL群は、他のDHA食群の3群よりもLAとAA濃度が低くなった。脳では、DHA食の4群全てでDHA濃度が10%程度増加した。しかし、脳における脂肪酸組成の変化は、血清や肝臓で起きる変化に比べて小さいものであった。DHA - PLは特に血清と肝臓中のAA濃度を減少させ、AAやDHA由来のサイトカインのバランスがDHAの分子形態によって大きく変化することを強く示唆した。以上のことから脂質クラスの選択が当該脂肪酸の吸収性、持続性、及び分布様式区に少なからず影響することを示した。

第3章では、DHA 摂取とホスファチジルセリン(PS)摂取が、若齢マウス(12 週齢)及び老齢マウス(73 週齢)における海馬の脂質含有量と脂肪酸組成にどのような影響を与えるかを調べた。ラットに大豆リン脂質(Soy - PL)、大豆由来 PS(Soy - PS)、DHA - PL 及び DHA 結合型 PS (DHA - PS)を4 週間自由摂取させた結果、若齢マウスの海馬ではコントロール群に比べて DHA - PL 群、Soy - PS 群、Soy - PL 群で PS の割合が増加傾向を示したが、有意な差は見られなかった。一方、老齢群では、DHA - PS 群、Soy - PS 群が他の老齢群に比べて PS の割合が有意に高かった。また海馬の脂肪酸組成は、老齢、若齢を問わず、コントロール食群に比べて DHA - PL 群、DHA - PS 群で DHA 濃度が有意に高くなった。Soy - PS 群と Soy - PL 群では、AA, DHA の濃度は共にコントロール群と同程度であった。以上のことから PS と DHA が同一分子に存在する構造をとることで、経口摂取した DHA - PS が血液脳関門を何らかの機序で通過し、PS 及び DHA を増強させ、海馬での PS 及び DHA 含量の加齢に伴う減少を食い止めることが分かった。このことから、本申請者は DHA - PS の摂取は、加齢で低下した神経機能をある程度は改善できるものと確信するに至った。

第4章では、コリン作動性薬剤として作用することが期待される PC と、中枢機能に影響を及ぼすことが示されている DHA を1分子(*sn*-2 位)に有する DHA - PC の REM 睡眠に与える影響について検討した。DHA-PC をラットに 10 μ g/匹投与した結果、REM 睡眠の時間及び総睡眠時間中の REM 睡眠量が共に有意差を持って増加することが明らかになった。そこで、DHA - PC を多く含むイクラ抽出油をヒトに対して長期間摂取させた時に REM 睡眠にどのような影響が起こるか調べたところ、試験期間中の総睡眠時間は 450 分前後で有意な変化は認められなかったが、REM 睡眠の絶対量及び総睡眠時間中の REM 睡眠の割合(SREM%)に増加傾向が認められた。しかし、Wash out 後には REM 睡眠が増加していた状態が消失した。また、REM 睡眠時間の割合量を Normalization した結果、REM 睡眠の3ヵ月目のデータと基準夜、1ヵ月目、2ヵ月目を比較すると何れも3ヵ月目は有意に REM 睡眠量が増加した。Wash out した4名に関しても有意に REM 睡眠量が減少し、元の状態へ戻った。さらに、OSA 睡眠調査票 MA 版により、試験期間2ヵ月後から被験者の熟眠感が有意に向上していることが明らかになった。以上のことから、本申請者は食習慣が睡眠の質に影響している可能性が非常に高いことを示すとともに、DHA-PL の主要成分である DHA-PC が良質な睡眠の確保にも大きく貢献できるものと確信す

るに至った。

以上、同氏が見出したDHA結合型リン脂質の新規機能、特に良質な睡眠を誘導する機能は、現代社会において訴求性が高く、この分野における重要な機能発見と位置づけられる。よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。