親鶏可食部のプラズマローゲン組成と食用利用のための調製方法

三明清隆¹・柚木恵太²・川村 純¹・府中英孝¹・杉山雅昭¹・大西正男³

¹ 丸大食品株式会社中央研究所, 高槻市 569-8577

² 株式会社ジェヌイン R&D, 福岡県新宮町 811-0104

³ 藤女子大学人間生活学部食物栄養学科, 石狩市 061-3204

(2013. 11. 21 受付, 2014. 2. 3 受理)

要 約 プラズマローゲン (Pls) は神経炎症抑制やアミロイド形成抑制効果を有し, アルツハイマー病の治療や予防に利用できる可能性がある. 親鶏の皮および筋肉部のリン脂質 (PL), 特に Pls の組成を調べた. 皮の PL 画分のスフィンゴミエリン (19%) は, 他の 3 つの筋肉組織 (6%) に比べて多く含まれていた. 皮 PL の 21% がエタノールアミンプラズマローゲン (PlsEtn), 6% がコリンプラズマローゲン (PlsCho) であった. ムネでは PlsCho は PlsEtn の 1.8 倍多く含まれていたが, モモでは PlsCho と PlsEtn は同量含まれていた. Pls の脂肪酸組成としては, 皮では n-6 系の 20:4 や 22:4 が多く, 筋肉組織では 18:1 が多く検出された. 皮エタノール抽出画分 (高 PlsEtn 型) とムネ肉エタノール抽出画分 (高 PlsCho 型) をホスホリパーゼ A₁ 処理し, ヘキサン, アセトンおよび溶解分画することにより高純度プラズマローゲン画分を容易に調製できた. 皮, ムネとも鶏種および飼育環境の違いによる PL 組成の変動は少ないため, 親鶏は安定した Pls の供給源として有望であることが確認できた.

日本畜産学会報 85 (2), 153-161, 2014

親鶏とは鶏卵生産能力が減少したため, 経済的な有効期間を終えた雌鶏であり, わが国では約 1 億羽いると推定される. 親鶏の肉は若鶏に比べて硬く, 精肉としての利用には適しておらず, その有効利用方法が求められている. これまでに Yunoki らは親鶏の皮にエーテル型リン脂質の一種であるプラズマローゲン (Pls) やスフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリン (SM) が豊富に含まれ, 動物性のリン脂質供給源として有用であることを示している (Yunoki ら 2008).

リン脂質は, リン酸のモノまたはジエステルを含む複合脂質をさし, 一般にはグリセリンを含むグリセロリン脂質と長鎖アミノアルコールであるスフィンゴイド塩基を含むスフィンゴリン脂質に大きく分類される. グリセロリン脂質はリン酸エステル基からなる親水性部分の官能基によって分類され, ホスファチジルコリン (PC), ホスファチジルエタノールアミン (PE), ホスファチジルセリン (PS) 等が存在する. 生体内においてこれらのリン脂質は生体膜を形成し細胞構造を維持する役割を担っている. さらに近年, リン脂質は様々な生理活性機能を有することが明らかになってきており, たとえば, 大豆レシチンや卵黄レシチンにおいては, 血中コレステロール低下作用 (Greten ら 1980 ; Kesaniemi と Grundy 1986 ; O'Brien と Andrews 1993), 記憶力向上作用 (Ueda ら 2011) が報告されている.

エーテル型リン脂質である Pls は生体内においては脳の髄鞘や心臓, 骨格筋に存在している (Brites ら 2004). Pls の生体内量はいくつかの疾病において変動が認められており, 動脈硬化症の高齢者の血清 (Maeba ら 2007) やアルツハイマー型認知症患者の脳 (Ginsberg ら 1995, 1998 ; Han ら 2001) で減少していることから, これら疾病の発症と関与していることが示唆されている. また, リポ多糖投与によって惹起されたアルツハイマー型認知症の原因物質であるアミロイド β の産生が Pls の同時投与によって抑制されることが報告されている (Ifuku ら 2012 ; Katafuchi ら 2012). 上記の知見は体外からの Pls やその他リン脂質の供給が認知症予防に寄与することを示唆している.

Pls の供給源候補としては動物由来の神経組織や臓器があげられるが, 牛海綿状脳症が発生して以来, ウシ由来の原料を用いることは困難になった. そこで, 我々は安価で安全性の高い動物性リン脂質源として親鶏の筋肉組織や皮が応用可能か評価するためにリン脂質組成について調査した. また, 親鶏から機能性食品素材として利用可能な高純度 Pls の調製を試みた.

材料および方法

1. 供試試料

親鶏は, 鹿児島県南九州市知覧町の養鶏場でコーン 62%, 植物油脂 20%, 動物基本飼料 6% から成る飼料で

連絡者: 川村 純 (fax : 072-661-2598, e-mail : kawamura_jun@marudai.co.jp)

704 日間飼育した白玉鶏種であるジュリア種 9,120 羽から 10 羽（平均体重 1.8 kg）を選別して供試検体とした。供試検体は皮、ムネ、モモ、ササミに分割して試験開始まで真空冷凍状態で保管し、総脂質、リン脂質および脂肪酸の分析と Pls の分離に使用した。なお、モモは目視にて赤色筋と白色筋に分割した。また、鶏種の違いによるリン脂質組成の変化を確認するために、赤玉鶏種であるボリスブラウン種の皮とムネ肉を供試検体とした。

2. 総脂質の抽出とリン脂質の分画

分割した供試検体 50 g を細切して、クロロホルム/メタノール（1 : 2, v/v）200 mL を加え、室温で 1 時間振とう抽出した後に No. 2 濾紙で濾過して抽出液を得た。その後、残渣にクロロホルム/メタノール（2 : 1, v/v）200 mL を加えて、同様の条件で再抽出を 2 回行った。すべての抽出液を合わせた後、抽出液に 0.9% KCl 水溶液を加えて、Folch 法による分配を行った（Folch ら 1957）。一晩静置後、下層をロータリーエバポレーターで濃縮したものを総脂質とし、これを市販のシリカゲルカートリッジ（Sep-Pak Plus Silica Cartridge ; Waters, Massachusetts, USA）を用いて分画した。少量のクロロホルムに溶解した総脂質 100 mg をアプライし、中性脂質画分、複合脂質画分はそれぞれクロロホルム、メタノールで溶出した（Rouser ら 1967）。複合脂質画分からのリン脂質画分の調製は、シリカゲルカラムを用いて行った。PE 画分はクロロホルム/メタノール（4 : 1, v/v）、PC 画分はクロロホルム/メタノール（2 : 1, v/v）、SM 画分はクロロホルム/メタノール（1 : 2, v/v）で溶出した（Hanahan ら 1957）。

Pls 組成分析のために、PE 画分と PC 画分中に含まれるジアシル型リン脂質をホスホリパーゼ A₁ 溶液（三菱化学フーズ、東京、終濃度 5 mg/mL, 0.1 mol/L クエン酸ナトリウム/塩酸緩衝液, pH 4.5）中で加水分解した。酵素による加水分解後、Folch 法（Folch ら 1957）によって反応液からプラズマローゲンを回収し、薄層クロマトグラフィーによって分離した。プレートは Silica gel 60 (0.25 mm 厚 ; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を使用し、展開液はクロロホルム/メタノール/28%アンモニア水（65 : 35 : 8, v/v/v）を用いた。展開後、プレートに 0.001% プリムリン試薬を噴霧して UV 照射によってスポットを可視化し、シリカゲルから回収した。Pls の純度は後述する順相 HPLC で確認した。この操作によってジアシル型リン脂質を除去した高エタノールアミンプラズマローゲン（PlsEtn）画分、高コリンプラズマローゲン（PlsCho）画分を得た。

3. HPLC 分析

順相 HPLC による PL 画分の分析は Mawatari らの方法（Mawatari ら 2007）に従って行った。

機器 : LC-10AD（島津製作所、京都）、移動相 : A 液 : ヘキサン/2-プロパノール : 酢酸（82 : 17 : 1, v/v/v）、

B 液 : 2-プロパノール/水/酢酸（85 : 14 : 1, v/v/v）+ 0.2% トリエチルアミン、グラジエント条件（B 液 %） : 0-1 分（0-5%）、1-25 分（5-40%）、25-28 分（40-0%）、カラム : LiChrospher 100-Diol（250 mm × 4 mm, 粒径 5 μm ; Merck Millipore）、流速 : 1 mL/分、サンプル量 : 10 μg、カラム温度 : 35℃、検出器 : ELSD-LT（50℃, 350 kPa ; 島津製作所）。

各成分量は各々の標準物質の検量線から算出した。標準試薬としてホスファチジルエタノールアミン（PE, 卵黄由来 : Sigma, St. Louis, USA）、ホスファチジルコリン（PC, 卵黄由来 : Sigma）、ホスファチジルセリン（PS, 大豆由来 : Sigma）、スフィンゴミエリン（SM, ウシ脳由来 : Sigma）を供した。なおホスファチジルセリン（PS）とホスファチジルイノシトール（PI）は PE 換算量として算出した。すべてのデータは 3 回の平均値で示した。

4. 脂肪酸分析

脂肪酸組成分析のために、PL 画分、PlsEtn 画分および PlsCho 画分は 5% HCl-メタノールを加えて 100℃, 3 時間反応させ、脂肪酸メチルエステルを調製した。調製した脂肪酸メチルエステルは島津 GC2010 を用いて脂肪酸組成を測定した。

検出器 : FID、カラム : CP-SIL 88（50 m × 0.25 mm 直径, 0.2 μm ; Agilent Technology, California, USA） : 温度プログラム : 80-160℃（10℃/分）、160-220℃（2℃/分） : キャリアガス : 窒素 ; キャリアガス流速 : 30 mL/分 ; 検出 : 240℃ ; インジェクションモード : スプリット（スプリット比 1 : 50）

脂肪酸メチルエステルのピークはクロマトグラフィーの保持時間と GC-MS によるマスペクトルによって同定した。脂肪酸組成はピーク面積/分子量で算出した。すべてのデータは 3 回の測定値の平均値で示した。

5. 皮およびムネエタノール抽出画分からのスフィンゴ脂質とプラズマローゲンの分離

皮およびムネはそれぞれ凍結乾燥し、乾燥重量 1 kg 対してエタノール 2 L で抽出した後、抽出残渣にさらにエタノール 4 L を加えて抽出した。エタノール抽出液をろ過後に濃縮した。エタノール抽出物にアセトン/水（2 : 1, v/v）、アセトン/水（1 : 1, v/v）、アセトンを順次加えて洗浄し、沈殿物（リン脂質画分）を得た。Pls の精製は図 1 に示した工程で実施した。リン脂質画分にヘキサン/アセトン（7 : 3, v/v）を加えて 4℃で遠心分離して沈殿物（スフィンゴ脂質画分）と上清（グリセリン脂質画分）を得た。上清は乾固した後、脂質重量に対して 10 倍容量のホスホリパーゼ A₁ 溶液（10 mg/mL, 0.1 mol/L クエン酸ナトリウム/塩酸緩衝液, pH 4.5）で 50℃, 2 時間処理した。反応液は冷却後、ヘキサン/アセトン/反応液の比率が 1 : 1 : 0.3（v/v）となるように溶媒を加えて攪拌振とうした。静置後、上層を乾固し、乾固物をアセトンで洗浄し、遊離脂肪酸を除去した。次いで、ヘキサン/アセトン（7 : 3,

v/v) を加えて、遠心分離し、残存したスフィンゴ脂質を沈殿させて除去した。得られた上清は濃縮乾固した後、ヘキサン/アセトン/水の比率が1:1:0.3 (v/v) となるように溶媒を加えて、攪拌振とうした。下層を廃棄し、上層に対してアセトン/水 (5:3, v/v) を加えて、再度攪拌振とうした。得られた上層をろ過し、濃縮乾固したものを Pls 画分として得た。

結果および考察

1. 皮、ムネ、ササミ、モモの総脂質および脂質含有量並びにリン脂質組成

皮、ムネ、ササミ、モモの総脂質はそれぞれ 46.0, 1.8,

1.5, 12.2 g/100 g であり、総脂質あたりの PL 含有率はそれぞれ 0.8, 38.6, 47.0, 7.4 wt% であった (表 1)。PL 含有量はムネとササミでは同等であり、モモが最も多かった。PL 画分 10 µg を HPLC-ELSD により分離したクロマトグラムを図 2 に示した。PlsEtn や PlsCho を含むエーテル型リン脂質はジアシル型リン脂質と良好な分離を示した。各部位におけるリン脂質組成は、モモを除く 3 部位では PE より PlsEtn が多く、皮では他の部位と比べて PlsEtn の占める割合が多かった。また、PlsEtn と PlsCho の組成比において、皮以外の 3 部位では PlsEtn より PlsCho が多かった (表 2)。

Figure 1 Procedure for separation of sphingomyelin and plasmalogens.

Table 1 Contents of total lipids and the phospholipid fraction in chicken tissues

Part	Total lipids	Phospholipid fraction	
	(g/100 g)	(TL%)	(g/100 g)
Skin	46.0 ± 6.2	0.8 ± 0.1	0.37 ± 0.02
Breast	1.8 ± 0.2	38.6 ± 3.9	0.70 ± 0.01
White breast	1.5 ± 0.2	47.0 ± 5.4	0.69 ± 0.01
Leg	12.2 ± 1.4	7.4 ± 1.0	0.89 ± 0.08

The values are expressed as the mean ± SEM ($n = 3$).

TL% is a percentage of phospholipid of the total lipids.

Figure 2 HPLC profiles of phospholipid fraction in chicken tissues.

A : skin ; B : breast ; C : white breast ; D : leg. 1 : ethanolamine plasmalogen (PlsEtn) ; 2 : phosphatidylethanolamine (PE) ; 3 : choline plasmalogen (PlsCho) ; 4 : phosphatidylcholine (PC) ; 5 : sphingomyelin 1 (SM1 : very long chain acyl) ; 6 : sphingomyelin 2 (SM2 : long chain acyl) ; 7 : phosphatidylserine (PS) ; 8 : phosphatidylinositol (PI).

Table 2 Composition (wt%) of phospholipids in chicken tissues determined by HPLC

Part	PlsEtn	PE	PlsCho	PC	SM	PS	PI
Skin	21 ± 1.0	8 ± 0.3	6 ± 1.0	37 ± 1.0	19 ± 1.0	5 ± 1.0	4 ± 0.3
Breast	12 ± 1.0	9 ± 1.0	21 ± 1.0	44 ± 3.0	6 ± 1.0	2 ± 0.4	7 ± 0.4
White breast	12 ± 1.0	10 ± 0.3	16 ± 1.0	45 ± 0.5	6 ± 1.0	3 ± 0.2	9 ± 0.0
Leg	12 ± 0.3	15 ± 1.0	12 ± 1.0	45 ± 1.0	6 ± 0.3	3 ± 0.1	8 ± 0.4

The values are expressed as the mean ± SEM ($n = 3$).

PlsEtn, ethanolamine plasmalogen ; PE, phosphatidylethanolamine ; PlsCho, choline plasmalogen ; PC, phosphatidylcholine ; SM, sphingomyelin ; PS, phosphatidylserine ; PI, phosphatidylinositol.

2. モモの赤色筋と白色筋の脂質組成

モモは赤色筋と白色筋が明確に分かれているため、各々の部位で脂質組成をHPLCで調べた。赤色筋と白色筋の総脂質はそれぞれ7.4, 2.7 g/100 gであり、PLはそれぞれ14.4, 33.0%であった（データ示さず）。両者を比較すると赤色筋のPLは白色筋に比べてPCが少なく、Plsがやや多かった（図3）。赤色筋はミトコンドリアを豊富に含み酸素を消費して連続的に収縮する遅筋線維であり、酸素結合タンパク質であるミオグロビンを多く含んでいる。酸素要求性の高い赤色筋にPlsが比較的多く含まれているのは、Plsが細胞膜の酸化安定性に寄与しているためと考えられる。

3. リン脂質画分とプラズマローゲンの脂肪酸組成

PL画分の脂肪酸組成を表3に示した。皮では他の部位に比べて16:0, 22:0, 24:0, 24:1, 24:2といった脂肪酸が多く含まれていた。Yunokiらは親鶏の皮より

調製したSMの脂肪酸分析を行った結果、鶏皮SMの構成脂肪酸は24:1や24:2といった超長鎖不飽和脂肪酸が多いことを報告している。本研究にてPL画分中で認められた超長鎖不飽和脂肪酸は皮のSMに由来する可能性が高い（Yunokiら2008）。ムネとササミの脂肪酸組成は類似しており、22:6が多く含まれていた。

Plsの脂肪酸組成を分析するため、カラムクロマトグラフィーによってPL画分をさらに分離し、得られた各画分をホスホリパーゼA₁で処理した。その後、ガスクロマトグラフィーで各部位のPlsEtnとPlsChoの脂肪酸組成を分析した結果、両者ともアルケニル基部分では全部位において、16:0が主要な脂肪酸だった（表4）。PlsEtnではアルケニル基部分の主要な脂肪酸は16:0および18:0だったが、皮では他の部位と比較して18:0が多く含まれていた。

全部位におけるPlsのアシル基部分の主要な脂肪酸は

PlsEtn, PlsCho 共に 18 : 1, 18 : 2 および 20 : 4 だったが、皮では他の部位と比較して 18 : 1 が少なく、20 : 4 が多かった。また、Pls の脂肪酸の不飽和度を調べた結果、皮では 3.1 と他の部位よりも高かった。これは他の部位と

比較して皮には 20 : 4 が多く含まれることに起因すると考えられた。

Pls が 100% 純品であれば、Pls のアシル基とアルケニル基のモル比は理論的には 1 : 1 となる。アルケニル基のモル比から、モモ以外の部位から調製した PlsEtn 画分は大部分がアルケニルアシル型であると考えられた。一方、PlsCho 画分におけるアルケニル基のモル比は 26.7 ~ 40.1 mol% と PlsEtn 画分と比べて低かった。天然に存在するエーテル型リン脂質にはアルケニルアシル型の Pls の他にアルキルアシル型リン脂質が知られており、この脂質は Pls と同様にホスホリパーゼ A₁ によって分解されない (Nakagawa ら 1982 ; El Tamer ら 1984)。また、天然に存在するアルキルアシル型リン脂質の多くがコリン型であること (Blank ら 1992) から、本試験においてホスホリパーゼ A₁ で処理後に得られた PlsCho 画分にはアルキルアシル型コリンリン脂質が含まれていると考えられる。

表 5 にジアシルリン脂質である PE の *sn*-2 位の脂肪酸組成を示す。一般的に飽和脂肪酸はグリセロリン脂質のグリセロール骨格の *sn*-1 位に、多価不飽和脂肪酸は *sn*-2 位に結合している。鶏由来 Pls においても *sn*-2 位に多価不飽和脂肪酸が結合しており、22 : 4 や 22 : 6 といった多価不飽和脂肪酸はジアシル型よりも多かった (表 4)。

Figure 3 HPLC profiles of red and white muscles separated from the leg.

The numbers shown in the figure indicate wt% of each phospholipid.

A : whole leg ; B : red muscle ; C : white muscle.

Table 3 Fatty acid composition (mol%) of phospholipid fraction in chicken tissues

Fatty acid	Skin	Breast	White breast	Leg
16 : 0	25.0 ± 1.4	22.6 ± 1.0	22.6 ± 0.4	22.4 ± 2.7
16 : 1	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.3	1.1 ± 0.5
18 : 0	21.2 ± 1.2	15.5 ± 1.2	15.7 ± 1.4	19.2 ± 2.4
18 : 1 (n-9)	15.1 ± 1.4	18.5 ± 3.1	16.5 ± 2.6	18.5 ± 4.4
18 : 1 (n-6)	2.0 ± 0.1	4.2 ± 0.5	5.9 ± 0.8	3.0 ± 0.3
18 : 2 (n-6)	8.2 ± 0.2	13.0 ± 2.5	13.4 ± 2.1	15.4 ± 1.5
20 : 0	0.7 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0
20 : 1	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0
20 : 2 (n-9)	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.2	0.3 ± 0.0
20 : 3 (n-9)	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.4	0.4 ± 0.1
20 : 3 (n-6)	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.8 ± 0.6	0.9 ± 0.2
20 : 4 (n-6)	16.1 ± 1.9	13.8 ± 0.9	12.9 ± 1.5	11.4 ± 2.4
22 : 0	1.0 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1
22 : 3 (n-9)	0.9 ± 0.0	1.6 ± 0.2	2.2 ± 0.4	1.1 ± 0.1
22 : 4 (n-6)	2.3 ± 0.3	2.9 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.1 ± 0.4
22 : 5 (n-6)	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1
22 : 6 (n-3)	0.8 ± 0.2	1.9 ± 0.3	2.0 ± 0.3	1.1 ± 0.4
24 : 0	0.7 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1
24 : 1	1.2 ± 0.2	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1
24 : 2	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
others	1.1 ± 0.3	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0
n-6/n-3	34.0 ± 5.0	16.7 ± 1.3	15.7 ± 1.5	28.1 ± 5.7

The values are expressed as the mean ± SEM (*n* = 3).

Table 4 Composition (mol%) of fatty chains of plasmalogens

	Skin		Breast		White breast		Leg	
	PlsEtn	PlsCho	PlsEtn	PlsCho	PlsEtn	PlsCho	PlsEtn	PlsCho
Acyl								
16 : 0	2.2 ± 0.6	7.5 ± 1.5	2.7 ± 1.6	8.0 ± 1.8	3.5 ± 0.2	8.6 ± 2.3	7.1 ± 2.4	15.3 ± 5.3
16 : 1	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1
18 : 0	0.8 ± 1.3	2.7 ± 1.1	1.3 ± 0.5	3.5 ± 1.4	2.1 ± 0.0	4.0 ± 0.5	5.1 ± 1.4	12.6 ± 0.5
18 : 1 (n-9)	23.9 ± 1.7	27.2 ± 2.3	39.5 ± 1.2	40.7 ± 4.3	35.4 ± 0.5	37.4 ± 2.0	34.5 ± 4.5	40.1 ± 3.0
18 : 1 (n-6)	0.7 ± 0.1	1.2 ± 0.3	0.7 ± 0.1	1.3 ± 0.4	0.9 ± 0.1	2.4 ± 0.4	0.9 ± 0.3	2.6 ± 0.5
18 : 2 (n-6)	8.9 ± 0.2	14.3 ± 2.2	6.2 ± 0.9	16.0 ± 2.5	7.1 ± 0.3	15.1 ± 1.4	11.1 ± 3.2	18.3 ± 1.6
20 : 1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.7 ± 0.5	0.2 ± 0.0
20 : 3 (n-9)	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1
20 : 3 (n-6)	0.8 ± 0.1	1.5 ± 0.4	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2
20 : 4 (n-6)	45.0 ± 1.3	33.0 ± 0.5	23.0 ± 1.8	21.9 ± 0.6	19.7 ± 0.5	23.2 ± 0.6	18.4 ± 0.9	7.2 ± 0.7
22 : 3 (n-9)	1.3 ± 0.1	1.8 ± 0.2	2.7 ± 1.3	0.9 ± 0.1	3.0 ± 0.3	0.9 ± 0.2	1.7 ± 0.3	0.2 ± 0.0
22 : 4 (n-6)	8.4 ± 0.3	4.4 ± 0.5	8.9 ± 0.5	2.9 ± 1.5	9.5 ± 0.3	3.4 ± 0.1	8.2 ± 1.1	1.4 ± 0.2
22 : 5 (n-6)	2.2 ± 0.5	1.0 ± 0.3	5.5 ± 0.8	1.3 ± 0.5	7.1 ± 0.5	1.7 ± 0.3	5.3 ± 1.7	0.9 ± 0.3
22 : 6 (n-3)	4.9 ± 0.9	3.9 ± 0.9	8.1 ± 2.6	2.5 ± 1.0	10.7 ± 0.8	2.1 ± 0.2	6.0 ± 0.4	0.5 ± 0.1
Alkenyl								
16 : 0	40.9 ± 4.2	77.7 ± 1.1	63.2 ± 0.9	89.5 ± 1.1	66.8 ± 2.0	91.6 ± 1.3	57.8 ± 3.8	88.1 ± 3.3
17 : 0	1.0 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.2 ± 0.1
17 : 1	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.2 ± 0.1
18 : 0	43.5 ± 4.0	11.8 ± 0.4	22.2 ± 1.8	3.3 ± 0.4	21.3 ± 2.1	2.7 ± 0.1	27.1 ± 1.6	4.4 ± 0.2
18 : 1 (n-9)	10.2 ± 0.5	6.9 ± 0.6	11.0 ± 0.6	5.4 ± 0.6	8.5 ± 0.1	4.1 ± 0.9	12.0 ± 2.0	6.4 ± 2.9
18 : 1 (n-6)	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.0	2.2 ± 0.2	1.1 ± 0.0	1.9 ± 0.0	0.9 ± 0.1	1.5 ± 0.3	0.7 ± 0.1
20 : 0	0.7 ± 0.4	—	0.1 ± 0.1	< 0.05	0.1 ± 0.0	—	0.3 ± 0.1	—
20 : 1	1.6 ± 0.5	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.1	< 0.05	0.1 ± 0.0	—	0.2 ± 0.1	—
n-6/n-3	13.3 ± 2.4	13.9 ± 4.6	5.4 ± 1.7	16.6 ± 6.6	4.1 ± 2.4	20.5 ± 3.7	7.2 ± 0.8	51.8 ± 12.9
UI	3.1 ± 0.06	2.5 ± 0.07	2.7 ± 0.21	2.0 ± 0.07	2.8 ± 0.02	2.0 ± 0.05	2.3 ± 0.15	1.2 ± 0.06
Alkenyl (mol%)	51.2 ± 1.7	35.6 ± 1.6	49.1 ± 1.5	40.1 ± 2.8	48.9 ± 1.5	39.8 ± 1.3	44.3 ± 1.6	26.7 ± 4.9

The values are expressed as the mean ± SEM (n = 3).

UI : unsaturation index.

PlsEtn, ethanolamine plasmalogen ; PlsCho, choline plasmalogen.

Table 5 *sn*-2 fatty acid composition (mol%) of phosphatidylethanolamine

Acyl	Skin	Breast	White breast	Leg
16 : 0	6.5	15.0	3.2	9.3
16 : 1	0.4	0.4	0.2	0.5
18 : 0	4.1	4.9	1.8	4.7
18 : 1 (n-9)	27.7	21.9	21.2	28.3
18 : 1 (n-6)	1.9	1.9	3.1	3.0
18 : 2 (n-6)	10.5	11.6	14.9	14.3
20 : 1	0.9	0.3	0.4	1.9
20 : 3 (n-9)	0.7	0.5	0.7	0.6
20 : 3 (n-6)	1.5	0.7	1.0	0.6
20 : 4 (n-6)	32.4	34.1	38.8	26.1
22 : 3 (n-9)	0.7	0.2	0.8	0.3
22 : 4 (n-6)	5.3	2.8	4.4	3.0
22 : 5 (n-6)	2.2	2.3	4.3	2.5
22 : 6 (n-3)	1.1	1.3	3.4	1.2
Others	4.1	2.1	1.8	3.7
n-6/n-3	47.2	39.6	18.6	38.8
UI	2.3	2.2	2.8	2.1

Others consist of 14 : 0, 17 : 0, 20 : 0, 22 : 0, 22 : 1, and 20 : 2 minor composition.

UI : unsaturation index.

Values are the means of more than triplicate analyses.

4. プラズマローゲンおよびスフィンゴミエリンの精製

図 1 での分画に従って食品素材の製造方法として利用可能な Pls を精製した。皮 PL 画分から調製したグリセロリン脂質およびスフィンゴ脂質の HPLC クロマトグラムを図 4 に示した。皮リン脂質画分 (I) は PC, PlsEtn, および SM を豊富に含む。リン脂質画分にヘキサン/アセトン (7 : 3, v/v) を加えて得られた沈殿物 (V) は SM を主体として少量の PC を含んでいた (粗 SM 画分)。ヘキサンのみでは溶媒相にスフィンゴ脂質の損耗を引き起こすが、本試験にて実施したヘキサン/アセトン分画によってスフィンゴ脂質とグリセロリン脂質の分離が可能となった。さらに、粗 SM 画分を弱アルカリ分解することで、純度 90% 以上の SM が得られた。クロマトグラムの SM の 3 個のピークはそれぞれ 4-sphingenine に 24 : 0, 20 : 0, 16 : 0 が結合したものが主体であると推測された (Yunoki ら 2008)。図 4 の II, III および IV にグリセロリン脂質のクロマトグラムを示した。皮由来グリセロリン脂質から PlsEtn を多く含む画分、ムネ由来グリセロリン脂質画分から PlsCho を多く含む画分が得られた (図 4 II)。その後、ホスホリパーゼ A₁ 処理によってグリセロリン脂質画分に含まれるジアシル型リン脂質が加水分解されて、分解産物であるリゾリン脂質と遊離脂肪酸の生成が認めら

親鶏のプラズマローゲン組成

Figure 4 Separation of glycerophospholipid and sphingolipid fractions.

I, II, III, IV, V and VI shown in the figure correspond to those of Figure 1.

The left or right chromatograms of II, III, and IV show the state of plasmalogens purified from chicken skin or breast, respectively.

1 : ethanolamine plasmalogen (PlsEtn) ; 2 : phosphatidylethanolamine (PE) ; 3 : choline plasmalogen (PlsCho) ; 4 : phosphatidylcholine (PC) ; 5 : sphingomyelin 1 (SM1 : very long chain acyl) ; 6 : sphingomyelin 2 (SM2 : long chain acyl) ; 7 : phosphatidylserine (PS) ; 8 : phosphatidylinositol (PI) ; 9 : free fatty acid ; 10 : lysophosphatidylethanolamine ; 11 : lysophosphatidylcholine.

れた (図 4 III). さらにアセトン沈殿と溶媒分配によって遊離脂肪酸とリゾリン脂質を除去することで、高純度 Pls 画分 (図 4 IV) が得られた。HPLC 分析から、皮およびムネ高純度 Pls 画分は Pls をそれぞれ 98% (PlsEtn 画分 : 81%, PlsCho 画分 : 19%), 96% (PlsEtn 画分 : 41%, PlsCho 画分 : 59%) 含まれていることがわかった。しかし、表 4 の結果から皮およびムネの PlsCho にはアルキルアシル型コリンリン脂質がそれぞれ 28%, 20%含まれていると考えられることから、Pls の純度は皮およびムネ由来でそれぞれ 93%, 84%となる。

鶏種の違うボリスブラウン種の皮およびムネ肉のリン脂質組成を分析した結果、鶏種の違いによるリン脂質組成の

変動は少なかった (表 6, 7)。

本研究の結果から、産卵効率が低下した親鶏が Pls の供給源として有用であることが明らかになった。さらに、本研究にて実施した食品用素材の製造に応用可能な Pls の大量調製方法は食品機能研究の発展の一因となりえると考えられる。緒言でも述べたように、現在 Pls の摂取によってアルツハイマー型認知症の発症を抑制する可能性を示唆する報告がなされている。現代社会において、認知症患者の増加は深刻な問題であり、発症の予防と治療は社会的課題であるといえる。今後、Pls の生理活性機能について、認知症予防効果に重点をおいて研究を行う必要がある。

Table 6 Composition (wt%) of phospholipids in chicken breasts determined by HPLC

	Season	PlsEtn	PE	PlsCho	PC	SM	PS	PI
Brown egg-laying hen	summer	16 ± 0.3	10 ± 0.5	19 ± 1.0	38 ± 2.0	8 ± 0.2	2 ± 1.6	9 ± 0.1
	winter	13 ± 0.7	10 ± 0.4	17 ± 0.8	40 ± 0.1	7 ± 0.6	4 ± 0.2	9 ± 0.2
White egg-laying hen	summer	11 ± 1.6	8 ± 0.5	19 ± 0.5	42 ± 2.2	7 ± 0.2	3 ± 0.5	9 ± 0.5
	winter	14 ± 0.5	10 ± 0.3	19 ± 1.6	36 ± 1.7	7 ± 0.2	4 ± 0.2	9 ± 0.3

The values are expressed as the mean ± SEM ($n = 3$).

PlsEtn, ethanolamine plasmalogen ; PE, phosphatidylethanolamine ; PlsCho, choline plasmalogen ; PC, phosphatidylcholine ; SM, sphingomyelin ; PS, phosphatidylserine ; PI, phosphatidylinositol.

Table 7 Composition (wt%) of phospholipids in chicken skins determined by HPLC

	Season	PlsEtn	PE	PlsCho	PC	SM	PS	PI
Brown egg-laying hen	summer	21 ± 0.5	7 ± 0.4	6 ± 0.1	27 ± 1.3	30 ± 1.0	5 ± 0.5	5 ± 0.5
	winter	20 ± 0.7	9 ± 0.6	6 ± 0.5	30 ± 1.0	21 ± 1.1	7 ± 0.4	7 ± 0.7
White egg-laying hen	summer	18 ± 2.3	8 ± 0.8	7 ± 0.4	35 ± 4.5	21 ± 2.0	5 ± 0.4	6 ± 0.5
	winter	21 ± 1.4	7 ± 0.8	8 ± 0.5	27 ± 3.2	25 ± 3.7	6 ± 0.6	7 ± 2.0

The values are expressed as the mean ± SEM ($n = 3$).

PlsEtn, ethanolamine plasmalogen ; PE, phosphatidylethanolamine ; PlsCho, choline plasmalogen ; PC, phosphatidylcholine ; SM, sphingomyelin ; PS, phosphatidylserine ; PI, phosphatidylinositol.

文 献

- Blank ML, Cress EA, Smith ZL, Snyder F. 1992. Meats and fish consumed in the American diet contain substantial amounts of ether-linked phospholipids. *Journal of Nutrition* **122**, 1656-1661.
- Brites P, Waterham H, Wanders RJA. 2004. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1636**, 219-231.
- El Tamer A, Record M, Fauvel J, Chap H, Douste-Blazy L. 1984. Studies on ether phospholipids. I. A new method of determination using phospholipase A1 from guinea pig pancreas : application to Krebs II ascites cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **793**, 213-220.
- Folch J, Lees M, Sloane SGH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **226**, 497-509.
- Ginsberg L, Rafique S, Xuereb JH, Rapoport SI, Gershfeld NL. 1995. Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. *Brain Research* **698**, 223-226.
- Ginsberg L, Xuereb JH, Gershfeld NL. 1998. Membrane instability, plasmalogen content, and Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* **70**, 2533-2538.
- Greten H, Raetz H, Stiehl A, Schettler G. 1980. The effect of polyunsaturated phosphatidylcholine on plasma lipids and fecal sterol excretion. *Atherosclerosis* **36**, 81-88.
- Han X, Holtzman DM, McKeel Jr. DW. 2001. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models : molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry* **77**, 1168-1180.
- Hanahan DJ, Dittmer JC, Warashima E. 1957. A column chromatographic separation of classes of phospholipids. *Journal of Biological Chemistry* **228**, 685-700.
- Ifuku M, Katafuchi T, Mawatari S, Noda M, Miake K, Sugiyama M, Fujino T. 2012. Anti-inflammatory/anti-amyloidogenic effects of plasmalogens in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in adult mice. *Journal of Neuroinflammation* **9**, 197-209.
- Katafuchi T, Ifuku M, Mawatari S, Noda M, Miake K, Sugiyama M, Fujino T. 2012. Effects of plasmalogens on systemic lipopolysaccharide-induced glial activation and β -amiloid accumulation in adult mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1262**, 85-92.
- Kesaniemi YA, Grundy SM. 1986. Effect of dietary polyenylphosphatidylcholine on metabolism of cholesterol and triglycerides in hypertriglyceridemic patients. *American Journal of Clinical Nutrition* **43**, 98-107.
- Maeba R, Maeda T, Kinoshita M, Takao K, Takenaka H, Kusano J, Yoshimura N, Takeoka T, Yasuda D, Okazaki T, Teramoto T. 2007. Plasmalogens in human serum positively correlate with high-density lipoprotein and decrease with aging. *Journal of Atherosclerosis Thrombosis* **14**, 12-18.
- Mawatari S, Okuma Y, Fujino T. 2007. Separation of intact plasmalogens and all other phospholipids by a single run of high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* **370**, 54-59.
- Nakagawa Y, Waku K, Ishima Y. 1982. Changes in the composition of fatty chains of diacyl, alkylacyl and

- alkenylacyl ethanolamine and choline phosphoglycerides during the development of chicken heart ventricular cells. High accumulation of 22 carbon fatty acid in ether phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta* **712**, 667-676.
- O'Brien BC, Andrews VG. 1993. Influence of dietary egg and soybean phospholipids and triacylglycerols on serum lipoproteins. *Lipids* **28**, 7-12.
- Rouser G, Kritchevsky G, Yamamoto A. 1967. Column chromatographic and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glycolipids. In : Maeientti GV (ed.), *Lipid Chromatographic Analysis*. pp. 99-161. Marcel Dekker, New York.
- Ueda Y, Wang MF, Irei AV, Sarukura N, Sakai T, Hsu TF. 2011. Effect of dietary lipids on longevity and memory in the SAMP8 mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **57**, 36-41.
- Yunoki K, Kukino O, Nadachi Y, Fujino T, Ohnishi M. 2008. Separation and determination of functional complex lipids from chicken skin. *Journal of American Oil Chemists' Society* **85**, 427-433.

The Plasmalogen composition of post laying-eggs hen and the production method for edible use

Kiyotaka MIAKE¹, Keita YUNOKI², Jun KAWAMURA¹, Hidetaka FUCHU¹,
Masaaki SUGIYAMA¹ and Masao OHNISHI³

¹ Central Research Institute, Marudai Food Co., Ltd, Takatsuki 569-8577, Japan

² Genuine R&D Co., Ltd, Shingu, Fukuoka 811-0104, Japan

³ Department of Food Science and Human Nutrition, Faculty of Human Life Science,
Fuji Women's University, Ishikari 061-3204, Japan

Corresponding : Jun KAWAMURA (fax : +81 (0) 72-661-2598, e-mail : kawamura_jun@marudai.co.jp)

Plasmalogens have anti-neuroinflammatory and anti-amyloidogenic effects, thereby those might be effective for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. The chemical compositions of phospholipids, particularly plasmalogens, in skin and muscle tissues from post laying-eggs hen were comparatively investigated. Ethanolamine plasmalogen (PlsEtn) accounted for 21% of the skin PL, and choline plasmalogen (PlsCho) made up 6%. PlsCho was 1.8-fold more abundant than PlsEtn in the breast muscle, despite the fact that the amounts of PlsCho and PlsEtn were equal in the leg muscle. As the fatty acids composition of plasmalogens, the skin plasmalogens were found to contain more n-6 series (20 : 4 and 22 : 4), while the muscle plasmalogens were rich in 18 : 1. When the ethanol extracts of skin (high PlsEtn type) and breast muscle (high PlsCho type) were treated with phospholipase A₁ followed by precipitation and partition with hexane, acetone, and water, showed a higher purity of plasmalogens. There were few changes of the phospholipid composition by the difference in chicken species and feeding environment. These findings suggest that the hens are stable and promising source of supply for plasmalogens.

Nihon Chikusan Gakkaiho 85 (2), 153-161, 2014

Key words : phospholipid, plasmalogen, post laying-eggs hen, sphingomyelin.