

# 血清、肝臓中の過酸化脂質生成に及ぼす エイコサペンタエン酸濃縮油投与の影響

Effect of Dietary Eicosapentaenoic Fatty Acid  
on Lipid Peroxide in Serum and Liver of Rats

黒田 圭一 小島 義樹\*

Keiichi Kuroda Yoshiki Kobatake\*

The effects of polyunsaturated fatty acids dosed orally on the concentrations of serum lipids and lipid peroxide in rats was studied. Male Sprague Dawley rats were fed on diets for 10 days, which differ in fatty acid composition. The tested fats were 5% olive oil (OL), 4.7% OL+0.3% ethyl-eicosapentaenoate (EPAconc), 4.4% OL+0.6% EPAconc, 3.8% OL+1.2% EPAconc, 2.5% OL+2.5% EPAconc, 5% ethyl-linoleate (EL), 4.7% EL+0.3% EPAconc, 4.4% EL+0.6% EPAconc, and 3.8% EL+1.2% EPAconc. These test fats which were 5% of the basal diet previously received, were infused with stomach tube. The dose of the test fat containing EPAconc significantly depressed serum triglyceride,  $\beta$ -lipoprotein and phospholipid concentration, corresponding to increases of serum EPAconc levels.

The concentrations of serum lipid peroxide markedly increased according to the EPAconc level in the dosed test fat, whereas the concentrations of liver lipid peroxide were slightly reflected with the EPAconc level. When rats were administered EL+EPAconc, the concentrations of serum triglyceride were significantly decreased on all groups of the EL+EPAconc dose. The concentrations of serum lipid peroxide on the EL+EPAconc groups were lower than that of the OL+EPAconc groups

---

\* 千葉県立衛生短期大学

## 著 言

魚油は他の油脂と異なり、体内でLPOを生成する傾向が非常に強いことが知られている。<sup>1-4)</sup>これは魚油中に多く含まれるn-3系の多価不飽和脂肪酸に原因があると考えられる。それらの脂肪酸としては、量的にまずエイコサペンタエン酸(C20:5 n-3, EPA)とドコサヘキサエン酸(C22:6 n-3, DHA)の2種の脂肪酸が原因となっていると考えられる。そこで、この実験では比較的高純度に精製したEPAを摂取量を変えて投与し、リノール酸などと比較して実際にどの程度過酸化脂質が生成しやすいか検討した。

## 実験方法

### 1. 実験動物

実験には、4週齢のSprague-Dawley系の雄ラットを日本クレア(株)より購入した。数日間固型飼料(クレアCE-2)により飼育し、1週間20%カゼインの予備飼料で飼育後、成長に異常のないラットのみを用いた。実験群は各群5匹とし、1匹ずつアパルトメント式飼育ゲージに入れ飼育した。

### 2. 実験飼料及び飼料投与方法

一週間予備飼料で飼育したラットは5匹ずつ9群に分け、各実験飼料を10日間投与した。実験飼料は、Table 1に示した基礎飼料の試験油脂

Table 1 Composition of basal diet

Casein(vitamin free)	20.0%
Vitamin mixture	3.5
Mineral mixture	1.0
Cellulose powder	5.0
Choline bitartrate	0.2
Sucrose	50.0
$\alpha$ -Corn starch	10.3
Coconut oil	5.0
Test lipid (by stomach tube)	5.0

\* AIN-75<sup>TM</sup>

(Test lipid) 以外の成分をあらかじめ混合して、それを前日ラットに投与し、その摂取量の5%相当量を次の日に胃管カテーテルで注入するという方法を採用した。この方法によれば、EPAを飼料混合1日間空气中に開放して放置することによって産生する過酸化脂質生成を防ぐことが出来る。Table 2に投与試験油脂の組成を示した。試験油脂は、投与飼料の5%とした。

Table 2 Composition of test lipids.

- |                                       |
|---------------------------------------|
| (1) 5.0% olive oil                    |
| (2) 4.7% olive oil+0.3% EPAconc       |
| (3) 4.4% olive oil+0.6% EPAconc       |
| (4) 3.8% olive oil+1.2% EPAconc       |
| (5) 2.5% olive oil+2.5% EPAconc       |
| (6) 5.0% Ethyl-linoleate              |
| (7) 4.7% Ethyl-linoleate+0.3% EPAconc |
| (8) 4.4% Ethyl-linoleate+0.6% EPAconc |
| (9) 3.8% Ethyl-linoleate+1.2% EPAconc |

Table 3にこの実験に用いた油脂の脂肪酸組成を示した。基礎飼料中の脂肪のベースとなるヤシ

Table 3 Composition of main fatty acids in lipids used in the experiment

Fatty acid	Coconut oil	Olive oil	EPAconc	Ethyl-linoleate
8:0	8.6	-	-	-
10:0	7.0	-	-	-
12:0	50.5	-	-	-
14:0	17.1	-	-	-
16:0	8.1	11.5	-	-
18:0	2.1	2.8	-	-
18:1 n-9	5.7	80.3	-	0.6
18:2 n-6	1.1	4.1	-	86.9
18:3 n-3	-	-	-	1.3
20:1	-	-	1.8	-
20:4 n-6	-	-	2.6	-
20:4 n-3	-	-	5.4	-
20:5 n-3	-	-	73.9	-
22:5 n-3	-	-	2.4	-
22:6 n-3	-	-	7.2	-

油は大部分が低分子の飽和脂肪酸からなるので、過酸化脂質の生成は非常に少ないと考えられる。したがって試験油脂のからの過酸化脂質生成量に与える影響は少ないと考えられる。オリーブ油はオレイン酸を80%含むが対照群に投与した。EPA濃縮油 (EPAconc) はEthyl-esterとしてEPA73.9%、DHA7.2%を含有していた。Ethyl-linoleateは純度86.9%で、オレイン酸が0.6%混在していた。

### 3. 動物処理法

10日間の実験最終日、7:00a.m.から7時間絶食後、ネプタール麻酔下で心臓から採血することにより屠殺し、直ちに肝臓、睾丸周辺脂肪を摘出した。肝臓は0.9%食塩水を肝門脈から圧入することにより十分脱血した。血液は約1時間氷水中に静置後、3500rpm、15分間の条件で遠心分離を行な

い採取した。

### 4. 測定法

実験飼料投与期間の体重増加量、飼料摂取量を測定すると共に、血清及び肝臓中の中性脂肪 (TG)、血清中の $\beta$ -リポたん白質 ( $\beta$ -lipo)、リン脂質 (PL) の各濃度、血清及び肝臓中の過酸化脂質濃度、血清の脂肪酸組成を測定した。

血清TG、 $\beta$ -lipoはキットによる酵素法により測定した。血清、肝臓はクロロホルム(2):メタノール(1)混液 (C-M混液)により総脂質を抽出した。血清中のPLはC-M混液抽出液をFiske-Sub-brow法<sup>5)</sup>でリンを測定して算出した。血清及び肝臓のLPO濃度は、チオバルビツル酸反応による大川らの方法<sup>6)</sup>により測定した。血清中脂質の脂肪酸組成は脂質抽出液を硫酸メタノール法によりメチ

Table 4 Effect of EPA and linoleate on serum and liver triglyceride in rats fed the experimental diets for 10 days

Basal diet	Serum triglyceride (mg/100ml)	Liver triglyceride (mg/g)
(1) +5.0% Olive oil	213.1±81.5 <sup>*a</sup>	37.4±5.5 <sup>a</sup>
(2) +4.7% Olive oil +0.3% EPAconc	186.5±33.0 <sup>a</sup>	34.0±3.8 <sup>ab</sup>
(3) +4.4% Olive oil +0.6% EPAconc	117.4±24.8 <sup>ac</sup>	32.7±2.3 <sup>ab</sup>
(4) +3.8% Olive oil +1.2% EPAconc	56.3± 1.6 <sup>bc</sup>	31.6±2.2 <sup>ab</sup>
(5) +2.5% Olive oil +2.5% EPAconc	67.7± 7.3 <sup>c</sup>	24.6±0.7 <sup>b</sup>
(6) +5.0% Ethyl-linoleate	(59.6± 8.2)	24.6±1.6 <sup>ab</sup>
(7) +4.7% Ethyl-linoleate +0.3% EPAconc	74.0± 8.6 <sup>c</sup>	23.9±1.8 <sup>b</sup>
(8) +4.4% Ethyl-linoleate +0.6% EPAconc	76.3± 6.7 <sup>c</sup>	25.6±2.9 <sup>b</sup>
(9) +3.8% Ethyl-linoleate +1.2% EPAconc	68.2± 9.7 <sup>c</sup>	25.5±2.8 <sup>ab</sup>

\*Mean ± SEM (n=5). Means in the same column not sharing a common superscript letter are significantly different (p < 0.05).

ルエステル化し、ガスクロマトグラフィー (GLC) によって分析した。

### 5. 統計処理

データの統計処理はDuncan検定法によって行った。

## 実験結果

### 1. EPAの血清及び肝臓中の脂質濃度に対する影響

従来から、EPAを投与すると血清中の脂質、特にTG濃度低下の現象が知られている<sup>7,8)</sup>。Table 4に示すように、本実験でも対照のオリーブ油群に比べ、EPAconc 0.3~2.5% (群1~5) のいずれの群においても血清中のTGの低下が見られた。

一方肝臓中TG濃度もEPAconc投与量の増加にもなって低下の傾向を示したが、EPAconcを2.5%レベルで投与するとき、はじめて肝臓TGの明らかな低下を認めた。

オリーブ油の代わりにリノール酸エチルを投与した群6~9ではEPAconcを0.3%投与した時、すでに血清TGは最低のレベルまで低下していた。また肝臓TG濃度もEPAconcを0.3%以上に投与してもそれ以上のTG低下は起らなかった。

血清中のリポたん白質のうち、TG含量の多い区分はVLDLやLDLの $\beta$ -リポたん白質 ( $\beta$ -lipo) 区分であるので、 $\beta$ -lipoに与えるEPAconc投与の影響をみた。Table 5に血清中の $\beta$ -lipo濃度とPL濃度を示した。この両者はいずれもEPAconc投与量を増加するに従って低下傾向を強めていることを認めた。またリノール酸エチルとEPAconcの同

Table 5 Effect of EPA and linoleate on serum  $\beta$ -lipoprotein and phospholipid in rats fed the experimental diets for 10 days

	$\beta$ -Lipoprotein	Phospholipid
Basai diet	----- (mg/100ml) -----	
(1) +5.0% Olive oil	257.3±14.6 <sup>aa</sup>	196.3±15.3 <sup>a</sup>
(2) +4.7% Olive oil +0.3% EPAconc	267.2±37.9 <sup>ac</sup>	172.5±14.2 <sup>abc</sup>
(3) +4.4% Olive oil +0.6% EPAconc	243.5±13.6 <sup>b</sup>	159.2± 2.6 <sup>b</sup>
(4) +3.8% Olive oil +1.2% EPAconc	209.9±14.8 <sup>adc</sup>	144.3± 4.7 <sup>c</sup>
(5) +2.5% Olive oil +2.5% EPAconc	168.6±14.8 <sup>b</sup>	119.3± 6.1 <sup>d</sup>
-----		
(6) +5.0% Ethyl-linoleate	218.7±14.8 <sup>ac</sup>	157.2± 8.0 <sup>ac</sup>
(7) +4.7% Ethyl-linoleate +0.3% EPAconc	175.2±10.5 <sup>bde</sup>	134.0±12.2 <sup>bcd</sup>
(8) +4.4% Ethyl-linoleate +0.6% EPAconc	171.9± 7.8 <sup>bde</sup>	144.7± 7.2 <sup>bc</sup>
(9) +3.8% Ethyl-linoleate +1.2% EPAconc	195.1± 7.5 <sup>ce</sup>	149.2±10.4 <sup>bc</sup>

\* Mean ± SEM (n=5). Means in the same column not sharing a common superscript letter are significantly different (p < 0.05).

時投与はその低下効果を強めていることを見た。

## 2. EPAの血清LPO濃度及び脂肪酸組成におよぼす影響

上記と同じラットの血清、肝臓のLPOの測定結果をTable 6に示した。上記ではEPAconc投与量を増加するにつれて、血清や肝臓中のTGの低下を確認したが、このような条件でLPO濃度変化は興味を持たれる。特に本実験では魚油投与の場合と異なり、高純度のEPAを比較的低レベルで投与する条件なので、EPAそのものの投与量とLPO産生の関係が把握出来る可能性がある。Table 6に血清と肝臓中のLPO濃度を示した。血清のLPOに関しては、対照のオリーブ油群に比べ、EPAconc0.3~2.5% (群1~5)を投与した場合、いずれも対照より高くなり、投与レベルを上昇さ

せるに従ってLPO濃度も上昇している傾向がみられた。

一方、肝臓中のLPOは各群間にいずれも有意差はみられなかったが、EPAconcを2.5%投与した群(群5)において、やや上昇の傾向がみられた。このように、魚油を投与した場合<sup>1)</sup>のような肝臓中のLPO上昇はみられなかった。リノール酸エチルをEPAconcと同時に投与した場合は群6~9に示すように、EPAconc量を増加するに従って、ややLPO上昇傾向がみられるものの、明確なLPO上昇は認められなかった。

EPAconc投与レベルと血清中総脂質の脂肪酸組成の関係をTable 7に示した。血清LPOと血清多価不飽和脂肪酸、特にEPAやDHAと他の脂肪酸の存在割合がLPO濃度に関係するかどうかというのがこの測定の一つの目的である。この表か

Table 6 Concentration of lipid peroxide in the serum and liver of rats infused eicosapentaenoate by stomach tube for 10 days

Basal diet	Serum	Liver
	(n moles MDA*/ml)	( $\mu$ moles MDA/100g)
(1) +5.0% Olive oil	4.3 $\pm$ 0.4 <sup>**a</sup>	19.4 $\pm$ 2.8
(2) +4.7% Olive oil +0.3% EPAconc	5.8 $\pm$ 0.4 <sup>bde</sup>	20.5 $\pm$ 3.1
(3) +4.4% Olive oil +0.6% EPAconc	7.4 $\pm$ 0.9 <sup>bcd</sup>	18.6 $\pm$ 2.1
(4) +3.8% Olive oil +1.2% EPAconc	10.8 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	19.1 $\pm$ 1.3
(5) +2.5% Olive oil +2.5% EPAconc	11.0 $\pm$ 2.5 <sup>bcd</sup>	29.0 $\pm$ 11.0
(6) +5.0% Ethyl-linoleate	5.5 $\pm$ 0.8 <sup>abd</sup>	21.1 $\pm$ 3.9
(7) +4.7% Ethyl-linoleate +0.3% EPAconc	4.8 $\pm$ 0.4 <sup>ae</sup>	21.4 $\pm$ 2.9
(8) +4.4% Ethyl-linoleate +0.6% EPAconc	6.4 $\pm$ 0.9 <sup>abd</sup>	22.7 $\pm$ 5.8
(9) +3.8% Ethyl-linoleate +1.2% EPAconc	8.1 $\pm$ 1.0 <sup>cd</sup>	27.5 $\pm$ 4.1

\*MDA = malondialdehyde. \*\*Mean  $\pm$  SEM (n=5).

Means in the same column not sharing a common superscript letter are significantly different (p < 0.05).

Table 7 Fatty acid pattern in serum total lipid of rats

(%)

Fatty acid	(1) 5.0%OL	(2) 4.7%OL 0.3%EPA	(3) 4.4%OL 0.6%EPA	(4) 3.8%OL 1.2%EPA	(5) 2.5%OL 2.5%EPA	(6) 5.0%EL	(7) 4.7%EL 0.3%EPA	(8) 4.4%EL 0.6%EPA	(9) 3.8%EL 1.2%EPA
14:0	1.8*	2.0	2.0	2.0	1.9	1.4	1.5	1.8	1.4
16:0	21.9	23.5	23.6	23.0	21.6	19.3	22.1	22.2	20.2
16:1	5.5	6.0	5.5	4.2	3.4	2.4	3.5	3.4	2.6
18:0	8.6	6.8	6.9	8.2	8.1	9.4	9.2	8.2	9.5
18:1	36.8	36.4	32.0	23.3	19.8	15.3	16.9	15.7	13.5
18:2	6.6	6.2	5.6	4.6	4.1	20.4	21.3	21.7	19.8
20:3	3.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20:4 n-6	8.6	6.1	7.1	9.1	9.9	19.2	15.6	13.2	12.6
20:5 n-3	ND	4.4	8.5	15.1	18.3	ND	1.2	3.4	7.4
22:5 n-6	ND	ND	ND	ND	ND	3.0	ND	ND	ND
22:5 n-3	ND	0.7	1.3	2.0	4.2	ND	0.7	1.7	3.1
22:6 n-3	2.8	4.2	4.5	4.3	4.3	1.9	3.5	4.1	5.1

\*Mean from five rats.

らみられる特徴は、群1～5の間ではEPAconc投与レベルを上昇させると、血清脂質中のEPAの割合が次第に上昇し、それと逆に、オレイン酸(C18:1)及びリノール酸(C18:2)の割合が低下したことである。その他、ドコサペンタエン酸(C22:5)の割合が明らかに漸増していたが、DHAの割合は以外にもEPAconc投与量と関係していなかった。EPAconcとリノール酸エチルとの同時投与の群6～9においてはEPAconcの投与量の増加に従ってEPAとC22:5の他の脂肪酸に対する割合は、低いレベルを維持しながらも上昇したが、リノール酸とアラキドン酸(C20:4)は高いレベルを維持しながらむしろ低下の傾向を示した。

## 考 察

EPAconc投与レベル上昇による血清TGの低下作用は1.2%EPAconc投与でTGは最低に達していた。つまり、EPAconcは約74%のEPAを含むので(Table 3)、1.2%EPAconcではEPA0.9%に相当する。それ故、この実験条件のように高TGとなるような場合でも、摂取飼料に対して1%程度のEPA投与で強いTG低下作用のあることを確認し

た。肝臓中TGはEPAconcの2.5%投与で低下を認めしたが、いずれにしてもEPAは体内のTGプールを低下させる働きを持っており、脂肪の合成阻害と関係しているものと推定された<sup>9,10)</sup>。またリノール酸エチルとEPAconcの同時投与はEPAconcの低い投与レベルでも強いTGの低下効果を示したが、これはn-3系とn-6系の多価不飽和脂肪酸が同時に存在するとき体内のTGプールの低下がさらに助長されるものと推定された。

血清β-lipoのEPAconc投与による低下は、TGのそれと傾向がよく似ており、血清TGの低下は主にこの区別のTGの減少のためと推定される。

EPAconc投与レベル上昇による血清LPOの上昇は、1.2%EPAconc (EPAとして0.89%)のレベルでは対照(5%オリーブ油群)の約2倍(10.8 n mol/4.3n mol)の上昇が起こったことを意味しており、EPAのみに限って考えれば、投与EPAレベルは魚油(EPA約18%)を約5%添加した場合に相当する。勿論、魚油はEPA以外にDHAやその他の多価不飽和脂肪酸を含んでいるので、EPA以外の脂肪酸に由来するLPOが高濃度に産生するはずである。以前の実験<sup>1)</sup>において、5%魚油群は5%オリーブ油群の約5倍の血清LPO濃度を示していたが、その結果から推定すれば、EPAの

みから由来するLPOはDHAなどから産生するLPOより明らかに少ないと考えられる。

リノール酸エチルとEPAconcの同時投与において血清LPOレベルの上昇が少いのは明らかでないが、少なくともこの両脂肪酸は不飽和度が高いためLPO産生の原因になると考えられる。この2種の脂肪酸の間に何んらかLPO産生を抑制する相互作用が何らか働いたとも推定されるが、更に検討を要する。

血清LPO濃度と血清脂肪酸組成は関係すると推定される。本実験の場合も血清EPA濃度上昇にともないLPO濃度の上昇が確かめられているので、血清中でのLPOの直接の産生も考えられるが、肝臓、その他の臓器由来のLPOの可能性もある。

本実験結果では、血清TG、PLもEPAconc投与で低下しているので、総脂肪の血清中絶対量は明らかに低下しており、少なくともEPAの絶対量もEPAconc投与量にともなって大きな差はないと考えられる。この点から、やはりEPAと他の脂肪酸の存在比の方が血清LPO産生に強い影響を持つことを示唆している。

## 要 約

ラットにあらかじめ5%ヤシ油を含む基礎飼料を摂取させ、その摂取量の5%に相当する試験油脂を胃管で10日間毎日投与した。試験油脂はオリーブ油又はリノール酸エチルと高純度魚油EPA濃縮油(EPAconc)を割合を変えて混合したものである。実験期最終日に血清、肝臓のTG、PL、LPOの濃度を、血清 $\beta$ -lipo、血清脂肪酸組成を測定し、次の結果を得た。

オリーブ油とともにEPAconc投与を増加すると血清TGが低下し、1.2%EPAconcで最低に達した。血清 $\beta$ -lipoとPLもTGと同様の傾向を示した。血清LPOはEPAconc投与レベル上昇とともに上昇傾向を示した。肝臓LPOは、1.2%EPAconcまで

は影響を受けなかったが、2.5%EPAconcで上昇傾向をみた。

リノール酸エチルとEPAconcを同時に投与した時は、血清TGに対しては強い低下作用を示し、血清LPO濃度の上昇もオリーブ油の場合より抑えられた。しかし、EPAconc投与レベルの上昇にともなって血清TGは低下傾向、LPOは上昇傾向を示した。

## 引用文献

- 1) 鄭 承庸, 小島義樹, 黒田圭一, 西出英一, 印南 敏: 栄養学雑誌, 42, 31-41 (1984)
- 2) Bunyan, J., Green, J., Murrell, E.A., Diplock, A.T. and Cawthorne, M.A.: Brit. J. Nutr., 22, 97 (1968)
- 3) 小島義樹, 斎藤衛郎, 平原文子, 池上幸江, 印南 敏: 栄養学雑誌, 40, 311, (1982)
- 4) 小島義樹, 黒田圭一, 鄭 承庸, 印南 敏: 国立栄養研究所報告書, 第31号, 19, (1982)
- 5) Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: J. Biol. Chem., 66, 375 (1925)
- 6) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Anal. Biochem., 95, 351 (1977)
- 7) 平井愛山, 浜崎智仁, 寺野 隆, 高野 隆, 高中 篤, 原田哲志, 佐二木順子, 西川哲男, 小沢照夫, 近藤繁美, 依光晴男, 丹羽源之助, 田村 泰, 藤田隆夫, 熊谷 朗: 動脈硬化, 9, 281 (1981)
- 8) Kobatake, Y., Kuroda, K., Jinnouchi, H., Nishide, E. and Innami, S.: J. Nutr. Sci. Vitaminol., 30, 357 (1984)
- 9) Iritani, N., Inoguchi, K., Endo, M., Fukuda, E. and Morita, M.: Biochem. Acta., 618, 378 (1980)
- 10) Schrijver, R.D. and Privett, O.S.: J. Nutr., 112, 619 (1982)