

魚油 ω -3系多価不飽和脂肪酸のラット血清中性脂肪、 過酸化脂質濃度、及び血小板凝集能におよぼす影響

土屋卓児 黒田圭一 小島義樹*

Effects of ω -3 Polyunsaturated Derived from Fish Oil
on Concentration of Serum Triglyceride and Lipid Peroxide,
and on Platelet Aggregation on Rats.

Takuji Tuchiya Keiichi Kuroda Yoshiki Kobatake*

The effect of feeding fish oil rich in ethyl-eicosapentaenoate (EPAconc) or ethyl-docosa-hexaenoate (DHAconc) on platelet aggregation, concentrations of serum triglycerides and lipid peroxide was studied in rat. Each of these omega-3 fatty acids was supplemented to the basal diet, and rats were fed these experimental diets for 7 or 14 days. The platelet aggregation in groups fed EPAconc or DHAconc did not differ significantly from those of the control group fed a olive oil diet, although it tended to decrease in the DHAconc group, compared to the control group. The concentrations of serum triglycerides in both the EPAconc and DHAconc groups were lower on day 7 and 14, compared to that of the control group. The concentration of lipid peroxide in the serum was higher level in the EPAconc and DHAconc groups than in the control group. These findings indicated that in the rat the omega-3 polyunsaturated fatty acids induced to decrease serum triglyceride, and to elevate lipid peroxide levels on short-term feeding, however, platelet function did not changed sensitively.

緒言

魚油中には、非常に高度な不飽和脂肪酸である Eicosapentaenoic acid ($C_{20:5}$;EPA), Docosa-hexaenoic acid ($C_{22:6}$;DHA) を多く含んでおり、またこれらの脂肪酸はいずれも ω -3系に属することも他の油脂に見られない特徴である。これら

の EPA, DHA は血中脂質の改善効果を持つことが知られている¹⁾。また、EPAからの代謝生成物のプロスタグランディンが、血小板凝集を抑制することが報告されており、DHAも同様な作用を持つのではないかと推定される。本研究では、ラットを使ってEPAとDHAの血小板凝集に与える影響とあわせて血清中の中性脂肪と過酸化脂質の濃

* 国立栄養研究所食品科学部

度について調べた。

実験方法

1. 実験動物

実験動物は、4週齢のSprague-dawley系の雄ラットを東京実験動物㈱より購入し、7日間20%カゼイン飼料で予備飼育し、成長に異常のないラットのみ実験に用いた。飼育室の温度は21~25℃、湿度は50%前後に調節し、明暗は12時間周期(明、7:00~19:00)とした。実験群は各群5匹とし、1匹ずつアパートメント式飼育ケージに入れ飼育した。

2. 実験飼料

予備飼育飼料は20%カゼインを含むAIN組成に準じて調製した。実験飼料は基礎飼料(Table 1)の試験油脂(Test lipid)として、オリーブ油(OL), ethyl-linoleate (LE), ethyl-eicosapentaenoate 濃縮物(EPAconc), ethyl-docosahexaenoate 濃縮物(DHAconc)を基礎飼料に混合し5種類調製した。すなわち、Table 2に示すように5%OL(飼料1), 3%LE+2%OL(飼料2), 3%EPAconc+2%OL(飼料3), 3%DHAconc+2%OL(飼料4)を基礎飼料に混合し調製した。これらの実験飼料をラットに7日間、および14日間それぞれ投与した8つの実験群を設けた。

Table 1 Composition of basal diet

Casein	20.0%
Mineral mixture *	3.5
Vitamin mixture *	1.0
Choline bitartrate	0.2
Cellulose powder	2.0
Sucrose	63.3
Lard	5.0
Test lipid	5.0

* AIN-76™ (J.Nutr., 107, 1340(1977))

3. 動物処理法

実験飼料投与中毎日、体重と飼料摂取量の測定を行なった。実験期(7日間, 14日間)の最終日、7:00 a.m. から7時間絶食後、ネブタール麻酔下で心臓から採血することにより屠殺した。採血に際し血液は、2本のチューブに分取した。すなわち一本はクエン酸ナトリウム処理を行ない、血小板凝集能測定用に処理し、他の一本のポリスピッツに分取した血液は約1時間氷水中に静置後、3,000rpmで15分間遠心分離を行ない、上清の血清区分を採取した。

4. 測定方法

1) 血小板凝集能測定法²⁾

血小板凝集能の測定は、凝集惹起物質としてADPを用いて行なった。測定に使用した血小板凝集計は、二光バイオサイエンス㈱のNKK HEM-ATRACER.1 MODEL PAT-4Aであった。

2) 血清中の中性脂肪濃度の測定法

中性脂肪濃度は、酵素法(Cleantech TG-S; ヤトロン㈱)により測定した。

3) 血清中の過酸化脂質濃度の測定法

過酸化脂質濃度は、チオバルビツル酸反応による大川らの方法³⁾で測定した。

5. 試薬および飼料添加油脂

実験に使用した試薬はすべて特級品を用いた。実験飼料へ添加した油脂類の脂肪酸組成はTable 2, Table 3に示した。EPAconcとDHAconcはいずれも日本油脂㈱において調製し、提供されたものであった。

結果および考察

本実験ではラットに異なった試験油脂を与えたとき、血小板凝集能にどのような影響があらわれるか、またそのときの血清中性脂肪、過酸化脂質

Table 2 Composition of experimental diet

Diet 1	Basal diet + 5% olive oil ^a
Diet 2	Basal diet + 3% ethyl-linoleate ^b + 2% olive oil
Diet 3	Basal diet + 3% ethyl-eicosapentaenoate (EPAconc) ^c + 2% olive oil
Diet 4	Basal diet + 3% ethyl-docosahexaenoate (DHAconc) ^d + 2% olive oil

^a Olive oil fatty acid pattern (%) : C_{16:0} (9.5), C_{16:1} (4.5), C_{18:0} (3.6), C_{18:1} (80.2), C_{18:2} (5.2), C_{18:3} (0.6).

^b Ethyl-linoleate fatty acid pattern (%) : C_{18:1} (0.6), C_{18:2} (86.9), C_{18:3} (1.3).

^{c, d} See table 3.

Table 3 Composition of main fatty acid in EPAconc and DHAconc used in the experiment.

	EPAconc *	DHAconc *
C _{20:5} n-3 (eicosapentaenoate)	66.2	11.1
C _{22:6} n-3 (docosahexaenoate)	10.5	76.7
>∑ C ₂₀	81.2	92.0
Saturated fatty acids	1.6	1.0
Monoene	1.0	0.5
C _{20:4} n-6 (arachidonate)	3.2	2.8

* Ethyl-ester.

の濃度について検討することを目的とした。

体重増加量と飼料摂取量を Table 4 に示した。体重増加量は、7日間飼育で3% EPAconc 添加群 (EPAconc 群), 14日間飼育で3% DHAconc 添加群 (DHAconc 群) がそれぞれ若干高かったが、両飼育期間とも各群間に有意差はみられなかった。飼料摂取量は、7日間飼育で DHAconc 群で対照の5% オリーブ油添加群 (オリーブ油群) より高くその他の群間には有意の差がなかった。また、14日間飼育での飼料摂取量は、各群間とも差異が認められなかった。したがって多価不飽和脂肪酸のエステルであっても、体重増加に影響を与えなかったと考えられる。飼料摂取量は、7日間飼育でコントロールのオリーブ油群より DHAconc 群が

有意に高かったが、他の群間には明らかな差は認められなかった。14日間飼育では、オリーブ油群と DHAconc 群で高い傾向がみられたが4群間に有意差は見られなかった。この結果は魚油又はω-3脂肪酸濃縮油投与で見られた結果と似ていた^{4) 5)}。

凝集惹起物質として ADP を用いて測定した血小板凝集能の結果を Table 5 に示した。7日間飼育ではオリーブ油群, 3% ethyl-linoleate 添加群 (リノール酸群), EPAconc 群の群間にはほとんど差はみられなかったが、DHAconc 群は低い傾向がみられた。また14日間飼育での血小板凝集能は、リノール酸群が他の3つの群より低値の傾向がみられた。7日間飼育, 14日間飼育とも群間に有意

の差は認められなかった。従来、高度不飽和脂肪酸の血小板凝集能への影響についての報告がされており、eicosapentaenoate の凝集能の低下が知られている⁶⁾。しかし、それらのデータは人間に関して行なわれた試験であり、本実験条件のようなラットを用いた試験では、高度不飽和脂肪酸の血小板凝集能への影響はあられ難いとも考えられる。ラットなどで血小板凝集抑制するためには3%レベルの高度不飽和脂肪酸の摂取量では少なく、影響がおよぼされなかったのではないかと推定される⁷⁾。本実験では実験期間を7日間と14日間を設けたが、もっと長期間の影響を見ることも必要であると考えられる。ラットの血小板凝集能に及ぼす ω -3系脂肪酸の影響に関する報告は少ないが、EPAから生成されるPGI₃に対するリセプターがラットでは認められないため、人間に比べてその作用も発現しにくいと考えられる⁶⁾。

血清中の中性脂肪濃度をTable 6に示した。対照のオリーブ油群に比べリノール酸群で高い傾向がみられ、EPAconc群とDHAconc群は有意に低値が認められた。EPAconc群とDHAconc群は、ほぼ等しい値であった。14日間飼育では、オリ

ブ油群が最も高く、次いでリノール酸群、EPAconc群、DHAconc群の順に低くなる傾向がみられた。また、同じ試験油脂を添加した群について7日間飼育と14日間飼育を比較してみると、リノール酸群ではほとんど差はみられなかったが、他の3つの群ではいずれも7日間飼育よりも14日間飼育の方が上昇していた。血清の中性脂肪濃度は、多価不飽和脂肪酸の摂取により明らかに低下の作用を持つことは報告⁸⁾されており、本実験でも一致した結果が得られている。しかし、14日間飼育でEPAconc群よりDHAconc群の方が低下の傾向がみられたのは、Kobatakeら⁹⁾の高コレステロールの飼料条件の報告と異なっていた。これは本実験の条件と異なっていたためであると推定される。

Table 7には血清と肝臓中の過酸化脂質濃度を示した。血清中の過酸化脂質濃度は7日間飼育ではオリーブ油群<リノール酸<EPAconc群<DHAconc群の順に高値を示す傾向が見られた。14日間飼育ではオリーブ油群とDHAconc群で高くなる傾向が見られた。肝臓中の過酸化脂質濃度は、7日間飼育でリノール酸群が最も低くオリーブ油

Table 4 Weight gain and food intake of rats fed on the experimental diets for 7 and 14 days.

	Weight gain		Food intake	
	on day 7 (g/7days)	on day 14 (g/14days)	on day 7 (g/7days)	on day 14 (g/14days)
Basal diet + 5% olive oil	35.2 ± 5.3	93.2 ± 9.9	93.1 ± 3.7 ^a	223.8 ± 11.2
Basal diet + 3% Ethyl-linoleate + 2% olive oil	35.2 ± 6.2	75.5 ± 12.6	94.3 ± 8.9 ^{ab}	186.5 ± 17.3
Basal diet + 3% EPAconc + 2% olive oil	48.8 ± 5.7	73.2 ± 11.7	119.9 ± 9.9 ^{ab}	194.2 ± 14.6
Basal diet + 3% DHAconc + 2% olive oil	37.8 ± 3.2	100.8 ± 6.1	116.1 ± 6.7 ^b	221.1 ± 8.0

* Mean ± standard error of mean (n=5).
Mean in the same column not sharing a common superscript letter are significantly different (p<0.05).

群<EPAconc群<DHAconc群の順に高くなって
いたが、EPAconc群とDHAconc群は近い値を示
した。14日間飼育では、リノール酸群が最も低く、
EPAconc群とDHAconc群が高かった。7日間飼
育と14日間飼育の過酸化脂質濃度を比較して飼育
による経時的影響を見るとオリーブ油群では7日
より14日に上昇していたが、EPAconc群とDHA
conc群では若干低くなっていた。鄭ら¹⁰⁾の報告に
よると、摂取脂肪酸の不飽和度が高い場合に過酸

化脂質の生成が高まっていたが、本実験では肝臓
中の過酸化脂質がオリーブ油群よりむしろリノ
ール酸群の方が低く、これらの結果は予想とは異な
り解釈が困難であった。

これらの結果から、血小板凝集能および血清中
過酸化脂質生成におよぼす高度不飽和脂肪酸の影
響は、摂取量と摂取期間を考慮して今後検討する
必要があると考えられた。

Table 5 Effect of the experimental diets on platelet aggregation induced by ADP in the rats.

	Platelet aggregation by ADP (%, light transmission)	
	on day 7	on day 14
Basal diet + 5% olive oil	74.8 ± 6.4 *	72.6 ± 1.3
Basal diet + 3% Ethyl-linoleate + 2% olive oil	72.0 ± 0.5	66.6 ± 1.8
Basal diet + 3% EPAconc + 2% olive oil	72.0 ± 2.3	71.3 ± 1.8
Basal diet + 3% DHAconc + 2% olive oil	66.5 ± 3.8	71.4 ± 0.9

* Mean ± standard error of mean (n=5).

Table 6 Concentration of triglyceride in the serum of rats fed the experimental diets for 7 and 14 days.

	Triglyceride (mg/100 ml)	
	on day 7	on day 14
Basal diet + 5% olive oil	134.7 ± 25.1 ^a *	259.6 ± 82.6
Basal diet + 3% Ethyl-linoleate + 2% olive oil	151.3 ± 26.0 ^a	156.6 ± 33.6
Basal diet + 3% EPAconc + 2% olive oil	64.0 ± 6.4 ^b	134.0 ± 36.7
Basal diet + 3% DHAconc + 2% olive oil	63.4 ± 11.3 ^b	98.4 ± 32.8

Mean ± standard error of mean (n=5).

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

Table 7 Concentration of lipid peroxide in the serum and liver of rats fed on the experimental diets for 7 and 14 days.

	lipid peroxide			
	serum		liver	
	on day 7 (nmol MDA*/ml)	on day 14	on day 7 (μ mol MDA/100g liver)	on day 14
Basal diet + 5% olive oil	2.8 \pm 0.9 **	6.2 \pm 0.8	14.1 \pm 1.7	18.1 \pm 2.6 ^a
Basal diet + 3% Ethyl-linoleate + 2% olive oil	3.5 \pm 0.4	4.9 \pm 0.7	12.1 \pm 0.9	13.9 \pm 1.8 ^a
Basal diet + 3% EPAconc + 2% olive oil	4.1 \pm 0.5	4.7 \pm 0.7	24.4 \pm 3.5	20.1 \pm 5.4 ^b
Basal diet + 3% DHAconc + 2% olive oil	4.9 \pm 0.9	6.1 \pm 1.2	23.3 \pm 1.1	21.5 \pm 3.4 ^b

* MDA=malondialdehyde.

** Mean \pm standard error of mean (n=5).

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

要 約

多価不飽和脂肪酸が、血小板凝集能、血清中の中性脂肪、過酸化脂質にどのような影響を与えるか検討するため、対照をオリーブ油として、ethyl-linoleate, ethyl-eicosapentaenoate (EPA), ethyl-docosahexaenoate (DHA) をそれぞれ添加した飼料をラットに投与した。飼育期間は7日間と14日間として次のような結果を得た。

1. 血小板凝集能はDHA投与により低下傾向を見たが、試験油脂の違いによる影響は少なかった。

2. 血清中の中性脂肪濃度は、7日間飼育、14日間飼育ともethyl-eicosapentaenoate, ethyl-docosahexaenoate をそれぞれ投与した群で同時に低下していた。

3. 血清中の過酸化脂質濃度は、ethyl-eicosapentaenoate, ethyl-docosahexaenoate をそれぞれ投与した群で高まった。

この研究を行なうにあたり、飼料添加用トコフェロールを提供下さった河合製薬株式会社に、ethyl-eicosapentaenoate, ethyl-docosahexaenoate を提供下さった日本油脂株式会社に対して厚く御礼申し上げます。

引 用 文 献

- 1) P.M. Herold and J.E. Kiusella: Am. J. Clin. Nutr., **43**, 566 - 598 (1986)
- 2) 寺田秀夫: 血液検査の基礎知識 (1982) 医歯薬出版
- 3) H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi: Anal. Biochem., **95**, 351 - 358 (1979)
- 4) De Schrijver and R. Privett OS: J. Nutr., **112**, 619 - 626 (1982)
- 5) S.H. Wong, P.J. Nestel, R.P. Trimble, G.B. Storere, R.J. Topping, and D.L. Topping: Biochem. Biophys. Acta, **792**, 103 - 109 (1984)
- 6) T. Terano, A. Hirai, T. Hamazaki, S. Koba-

- yasi, T.Fjita, Y.Tamura, and A.Kumagai
: *Atherosclerosis.*, **46**, 321 - 331 (1983)
- 7) 森田育男, 室田誠逸 : *化学と生物*, **21**,
168 - 173 (1983)
- 8) A.Ruiter, W.Jougboed, van Gent CM,
L.H.J.C.Danse, and S.H.M.Metz : *Am. J.*
Clin. Nutr., **31**, 2159 - 2166 (1978)
- 9) Y.Kobatake, K.Kuroda, H.Jinnouchi,
E.Nishide, and S.Innami : *J. Nutr. Sic.*
Vitaminol., **30**, 357 - 372 (1984)
- 10) 鄭承鏞, 小島義樹, 黒田圭一, 西出英一,
印南敏 : *栄養学雑誌*, **42**, 31 - 41 (1984)