

ラット血清および肝臓脂質に及ぼすオキアミと卵黄 由来の精製リン脂質投与の影響の差異について

黒田圭一, 小島義樹*

Different Effect of Dietary Krill- and Egg-Phospholipids on Serum and Liver Lipids of Rats

Keiichi Kuroda, Yoshiki Kobatake *

Present experiments were carried out to clarify the different effects of two types of purified phospholipids i. e. a krill-phospholipid and egg-phospholipid on the lipid concentration of serum and liver of rats. Each experimental diet contained 5% krill-phospholipid or 5% egg-phospholipid, while the control diet contained 5% olive oil.

- 1) Total serum and liver cholesterol concentrations which had been elevated by the feeding of the hypercholesterolemic diet were decreased significantly both krill- and egg-phospholipid groups compared to the control group. And serum high density lipoprotein cholesterol concentration in both phospholipid groups were higher than that in the control group. While concentrations of serum and liver triglyceride were significantly less in the krill-phospholipid group than in the egg-phospholipid group.
- 2) Apparent excretion ratio of cholesterol into feces in the krill- and egg-phospholipid groups were higher than in the control group. And fecal phosphorus extracted with chloroform-methanol (2:1) in two phospholipid groups were also higher than in the control group.
- 3) In the krill-phospholipid group the epididymal fat pad weight was significantly decreased but not in the egg phospholipid group compared to that in the control group.

These results suggested that these 2 type phospholipids showed similar effect on the suppression of serum and liver cholesterol, on the other hand, the difference of fatty acid pattern of these two phospholipids showed the different effect on serum and liver triglyceride concentration.

* 国立栄養研究所食品科学部

著 言

食品中のリン脂質の生理作用の一つとして、血中脂質を低下させる効果、特に血清コレステロールの低下効果があり、LDL-コレステロール低下作用が知られている¹⁻⁴⁾。これは、リン脂質そのものの分子構造による作用と共にリン脂質に結合している不飽和脂肪酸の効果も考えられる⁵⁾。そのため血中脂質濃度に対する作用が脂肪酸とどの様に関係しているか明かにする必要があるのではないかと考えられる。リン脂質はその生物試料の起源の差異により、結合している脂肪酸の組成、塩基組成もかなり異なってくる。本実験では、異なった生物起源の食品から抽出、精製されたリン脂質の血清脂質に及ぼす作用の違いを検討することにより、脂肪酸とリン脂質の組成の差異が血清脂質濃度におよぼす関係を調べることを目的とした。

実験方法

1. 実験動物

実験には、3週齢のSprague-Dawley系の雄ラットを東京実験動物(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匹ずつアパー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法

1週間予備飼料で飼育したラットは5匹ずつ3群に分け、各実験飼料を2週間投与した。実験飼料は、基礎飼料(Table 1)の試験油脂の区分(Test lipid)を①5%オリーブ油(OL)、②5%オキアミリン脂質(KrPL)、③5%卵黄リン脂質(EgPL)

に入れ換えることにより、3種類を調製した。これらの実験飼料はそれぞれ群1~3のラットに投与した。

Table 1 Composition of basal diet

Casein(vitamin free)	20.0 %
L-Methionine	0.3
Mineral mixture*	3.5
Vitamin mixture*	1.0
Cellulose powder	5.0
Choline bitartrate	0.2
α -Starch	15.0
Sucrose	44.25
Cholesterol	0.5
Sodium cholate	0.25
Lard (low vitamin E)	5.0
Test lipid	5.0

*AIN-75TM

3. 動物処理法

2週間の実験最終日、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、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、3500 rpm、15分間の条件で遠心分離を行ない採取した。これらの試料は分析するまで-20°Cのフリーザーに保管した。

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、血清については総コレステロール(T-chol)、高比重リポたん白コレステロール(HDL-chol)、中性脂肪(TG)、 β -リポたん白質(β -lipo)、リン脂質(PL)の各濃度を測定した。ま

た肝臓については、T-chol, TG, PLの各濃度を測定した。また実験期間中に排泄された糞を2日間ずつ採取し、糞中のコレステロールとクロロホルム-メタノール混液可溶性有機リンを測定した。

血清T-chol, HDL-chol, TG, β -lipoはキットによる酵素法により測定した。血清、肝臓、糞は2:1のクロロホルム:メタノール混液(C-M混液)により総脂質を抽出した。血清及び肝臓中のPL、糞中の有機リンはC-M混液抽出液を(Fiske-Subbrow法⁶⁾。でリンを測定して算出した。肝臓T-chol及び糞中のコレステロールはC-M混液抽出物をけん化後、ジキトナイドを生成⁷⁾させ硫酸発色法⁸⁾により測定した。リン脂質組成は、イヤトロンスキャン法(Iatronscan TH-10)により分析した。リン脂質の分離にはシュウ酸をコーティングしたロッドをCH₃Cl:MeOH:H₂O(65:35:4)の組成の溶媒で展開する方法を用いた⁹⁾。

5. 試薬及び試験油脂

実験に用いた試薬はすべて特級品を用い、実験飼料へ添加した試験油脂の成分組成はTable 2に示した。卵黄リン脂質は旭化成工業㈱、またオキアミリン脂質は日本水産㈱においてそれぞれ製造されたものであった。

実験結果

実験期間中の体重増加量、飼料摂取量、肝臓重量と睾丸周辺脂肪重量をTable 3に示した。14日間の体重増加量及び飼料摂取量は、両リン脂質群に比べやや低い傾向が見られた。また肝臓重量、睾丸周辺脂肪重量もそれぞれのリン脂質投与により対照に比べやや低い傾向が見られた。

血清中の総コレステロール(T-chol)濃度、高比重リポたんぱくコレステロール(HDL-chol)濃度、T-cholに対するHDL-cholの比率をTable 4に示した。血清T-chol濃度は、KrPL群、EgPL群で対照群の $\frac{1}{2}$ 以下の値を示し、上昇が抑制されていた。

Table 2 Composition of test phospholipids used in the experiments

Name	Krill phospholipid	Egg york phospholipid
Maker	Nihon-suisan Co. Ltd.	Asahi-kasei Co. Ltd.
Phospholipid (P×25)	87.5%	96.7%
Phosphatidyl-choline	83.6	66.3
Phosphatidyl-ethanolamine	7.8	14.0
Lyso-phosphatidyl-choline	4.3	0.7
(Fatty acid composition)		
14:0	2.7	0.2
15:0	0.1	0.2
16:0	23.4	28.9
16:1	2.5	1.3
15:2	—	0.3
17:1	0.2	—
18:0	1.0	15.4
18:1	12.5	26.0
18:2 n-6	2.0	13.3
18:3 n-3	1.4	0.3
20:1	0.6	—
18:4	3.2	—
20:3	0.1	0.4
22:1	0.8	—
20:4 n-6	0.5	5.7
20:5 n-3	26.8	0.2
24:1	0.9	—
22:5 n-3	0.6	0.7
22:6 n-3	19.3	6.5

KrPL群とEgPL群間には差が認められなかった。HDL-chol濃度は、対照群に比べ明らかにKrPL群、EgPL群で高い値を示した。そのためHDL-

chol/T-chol比は、2つのリン脂質群で著しく上昇していた。

血清中の中性脂肪(TG), β -リポたんぱく(β -lipo), リン脂質(PL)濃度をTable 5 に示した。血清TG濃度は、対照と比較してKrPL群では低下の傾向が、EgPL群では有意に上昇していた。また、 β -lipo濃度はKrPL群, EgPL群で対照に比較して $\frac{1}{2}$ 以下と著しく低下が認められた。血清PL濃度も対照に比べ、KrPL群, EgPL群で明らかに低下していたが、2つのリン脂質投与の間には差は認められなかった。

肝臓中のT-chol, TG, PL濃度をTable 6 に示した。肝臓中のT-chol濃度は、対照群に比べKrPL群, EgPL群で有意に低下していた。肝臓TG濃度は、対照と比較してEgPL群で低下の傾向が見られ、KrPL群で明らかに低下していた。肝臓PL濃度は、3群間に有意の差は認められなかった。各群のラットの糞を実験初日から2日毎に分けて採糞し、糞中への見かけのコレステロール(Cchol)排泄率とクロロホルム-メタノール混液可溶性リンの排泄量を測定し、Table 7 に示した。摂取飼料量は3群ともほぼ等しいため、摂取Ch

Table 3 Weight gain, food intake, and weight of liver and epididymal fat pad

	Weight gain (g/2 weeks)	Food intake (g/2 weeks)	Liver weight (g)	Epididymal fat pad weight (g)
1) Basal diet + 5% olive oil	98.0 \pm 5.8 ^{*a}	196.5 \pm 8.6 ^a	9.7 \pm 0.6 ^a	1.26 \pm 0.14 ^a
2) Basal diet + 5% krill phospholipid	90.2 \pm 5.9 ^a	185.4 \pm 7.0 ^a	9.0 \pm 0.4 ^a	0.92 \pm 0.04 ^b
3) Basal diet + 5% egg phospholipid	95.6 \pm 8.0 ^a	189.7 \pm 7.0 ^a	9.5 \pm 0.9 ^a	0.96 \pm 0.02 ^{ab}

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

Table 4 Concentration of total cholesterol and HDL-cholesterol in the serum of rats fed the experimental diets

	Total cholesterol (mg/100ml)	HDL-cholesterol (mg/100ml)	HDL-chol./T-chol \times 100 (%)
1) Basal diet + 5% olive oil	445.4 \pm 63.9 ^{*a}	22.1 \pm 2.0 ^a	5.3 \pm 1.6 ^a
2) Basal diet + 5% krill phospholipid	209.1 \pm 13.3 ^b	39.5 \pm 3.4 ^b	19.2 \pm 2.1 ^b
3) Basal diet + 5% egg phospholipid	204.3 \pm 20.6 ^b	37.9 \pm 3.2 ^b	19.7 \pm 3.4 ^b

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

Table 5 Concentration of triglyceride, β -lipoprotein and phospholipid in the serum of rats fed the experimental diets

	Triglyceride (mg/100ml)	β -lipoprotein	phospholipid (mg/100ml)
1) Basal diet + 5% olive oil	72.1 \pm 8.8 ^{*ab}	1274.4 \pm 165.3 ^a	159.6 \pm 15.9 ^{*a}
2) Basal diet + 5% krill phospholipid	63.1 \pm 5.5 ^a	636.3 \pm 41.3 ^b	113.7 \pm 5.9 ^b
3) Basal diet + 5% egg phospholipid	97.6 \pm 11.5 ^b	566.2 \pm 54.4 ^b	119.7 \pm 4.6 ^b

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

Table 6 Concentration of total cholesterol, triglyceride and phospholipid in the liver of rats fed the experimental diets for 2 weeks

	Total cholesterol (mg/g)	Triglyceride (mg/g)	phospholipid (mg/g)
1) Basal diet + 5% olive oil	61.1 \pm 2.3 ^{*a}	41.2 \pm 6.7 ^a	11.8 \pm 0.4 ^a
2) Basal diet + 5% krill phospholipid	39.1 \pm 3.5 ^b	19.1 \pm 2.2 ^b	12.5 \pm 0.3 ^a
3) Basal diet + 5% egg phospholipid	34.6 \pm 2.2 ^b	27.6 \pm 1.9 ^a	14.0 \pm 1.2 ^a

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

ol量もほぼ等しかった。糞中のChol, 即ち見かけのChol排泄率は対照群に比べKrPL群, EgPL群で高かった。特にEgPL群は対照群の3倍量のCholを糞中に排泄した。また, いずれの群も4日目までCholの排泄が次第に増加し, その後は大体一定となった。糞中へのクロロホルム-メタノール混液可溶性リンの量もChol量と比較的良好に関連しており, 対照群と比較して両リン脂質投与群で高値であった。2つのリン脂質投与群を比べるとKrPL群に対してEgPL群で明らかに高い値を認めた。

考 察

体重増加量が両リン脂質群で低下の傾向が見られたのは, 各リン脂質を5%レベル程度添加すると, 何らかの生体に影響が出る可能性のあることを示唆している。著者らは, 大豆リン脂質9%レベルで添加した飼料をラットに投与した時, 体重増加が対照の大豆油群より低くなることを認めている^{10,11)}。また, 肝臓重量, 睪丸周辺脂肪重量も両リン脂質群で対照に比べやや低い傾向が見られ, 特にKrPL群で睪丸周辺脂肪重量低下が著しかっ

Table 7 Apparent excretion ratio of cholesterol into feces and fecal phosphorus in rats fed the experimental diets for 2 weeks

	Sampling period (day from start)	Ingested cholesterol (mg/rat)	Cholesterol in feces (mg/rat)	Apparet excretion ratio of cholesterol into feces (%)	Fecal organic phosphorus (ug/rat)
1) Basal diet + 5% olive oil	0 - 2	93.96 ± 3.64*	9.16 ± 1.00	9.74 ± 0.97	208.36 ± 18.90
	2 - 4	102.16 ± 4.78	12.32 ± 0.45	12.14 ± 0.58	76.61 ± 2.90
	4 - 6	112.82 ± 4.73	12.62 ± 0.79	11.26 ± 0.98	83.30 ± 6.12
	6 - 8	124.30 ± 5.43	14.46 ± 0.89	11.64 ± 0.48	86.24 ± 6.65
	8 - 10	123.46 ± 6.26	15.38 ± 4.96	11.90 ± 3.09	104.48 ± 16.73
	10 - 12	130.54 ± 6.71	15.12 ± 1.62	11.52 ± 3.08	120.58 ± 14.79
	12 - 14	119.70 ± 5.40	12.74 ± 1.74	10.80 ± 1.78	140.80 ± 21.52
2) Basal diet + 5% krill phospholipid	0 - 2	101.30 ± 4.43	8.34 ± 1.70	8.32 ± 1.77	324.37 ± 35.51
	2 - 4	101.98 ± 2.32	14.32 ± 2.75	13.98 ± 2.59	392.58 ± 17.25
	4 - 6	110.10 ± 3.33	27.60 ± 2.00	25.40 ± 2.61	510.27 ± 36.16
	6 - 8	114.38 ± 4.28	27.34 ± 3.08	24.20 ± 3.22	328.44 ± 12.81
	8 - 10	126.76 ± 6.95	27.52 ± 2.65	21.86 ± 2.05	356.02 ± 47.86
	10 - 12	128.14 ± 7.68	32.90 ± 3.55	25.76 ± 2.37	439.71 ± 23.05
	12 - 14	119.88 ± 5.70	36.38 ± 3.90	30.50 ± 3.24	490.48 ± 47.75
3) Basal diet + 5% egg phospholipid	0 - 2	100.58 ± 1.65	17.56 ± 3.45	17.50 ± 3.43	183.93 ± 21.36
	2 - 4	112.96 ± 2.29	31.00 ± 6.52	27.46 ± 5.62	391.49 ± 79.65
	4 - 6	125.38 ± 1.92	46.06 ± 4.13	39.02 ± 4.30	686.64 ± 112.70
	6 - 8	133.12 ± 3.40	46.06 ± 8.92	35.06 ± 7.14	759.84 ± 115.16
	8 - 10	133.84 ± 6.01	50.46 ± 4.70	38.48 ± 4.87	735.62 ± 124.79
	10 - 12	143.26 ± 8.00	58.82 ± 7.04	42.62 ± 7.18	908.65 ± 141.09
	12 - 14	133.38 ± 14.34	47.66 ± 5.64	37.80 ± 6.85	880.06 ± 176.50

* Mean ± SEM

た。この脂肪組織の重量低下はエイコサペンタエン酸 (EPA) のような n-3 系多価不飽和脂肪酸の割合の高い脂質を摂取した時、脂肪の合成の抑制あるいは分解の促進を促すのではないかと推定される。その結果、脂肪組織重量にも影響するのではないかとおもわれる¹²⁾。これは少なくとも KrPL に結合している EPA, ドコサヘキサエン酸 (DHA) の存在が影響したものと考えられる。また EgPL 群でも睾丸周辺脂肪重量は対照群と比較して有意の差はなかったが、低い傾向が見られたのは n-6 系多価不飽和脂肪酸のアラキドン酸による影響と推定される。

血清中 Chol 濃度は、両リン脂質の投与で上昇抑制の効果が強いことを示しているが、コレステロールの腸管からの吸収阻害、異化促進あるいは排泄促進のためと考えられる。しかし、Chol 飼料の条件で n-3 系脂肪酸が多く結合している KrPL

脂質が EgPL 脂質よりも血清 Chol 上昇抑制が強いと推定されたが、KrPL 脂質と EgPL 脂質には差がなく、この作用はリン脂質に結合している脂肪酸よりもリン脂質によるものと考えられる。

肝臓中の Chol も血清と同様の傾向が見られ、高 Chol 飼料投与における体内 Chol のプールは一般に肝臓に集中しているが、このように肝臓中の Chol の低下は体内全 Chol プールの低下を意味しており、この点からもおそらく高 Chol 飼料からの Chol のリン脂質による吸収阻害の結果であるとされる。また、肝臓中 TG も両リン脂質群で低値を示したが、血清 TG と対比して興味を持たれる。しかし、この原因については明らかでない。

糞中の Chol 排泄率の結果から、リン脂質を摂取した時飼料中 Chol の吸収が明らかに阻害されていることがわかる。またリンの量がこれと関係するのは何らかリン脂質がミセルを形成し Chol

と混合され、消化管中で相互に消化、吸収を阻害する状態になっていることを示唆している⁴⁾。いずれにしても、リン脂質投与における体内Cholプールの現象は消化管におけるCholの吸収阻害に原因があることは明らかである。また、KrPLはEgPLよりCholの糞中への排泄が少なく吸収阻害が弱い結果が見られたのは、そのリン脂質に結合している脂肪酸の種類によるものと考えられるが、特にEPA, DHAのようなn-3系の多価不飽和脂肪酸がリン脂質と混在するとき、リン脂質が腸管からのCholの吸収を抑制する効果をなんらか阻害する作用をもっているのではないかと推定される。

要 約

脂肪酸組成の著しく異なった2種の精製リン脂質(オキアミリン脂質, 卵黄リン脂質)およびオリーブ油(対照)をそれぞれ5%添加した高コレステロール飼料をラットに投与し、リン脂質そのものの種類の差異とリン脂質に含有される脂肪酸の種類の差異が血清、肝臓の脂質濃度などにどの様に影響を与えるか検討した。

1) 血清、肝臓の総コレステロール濃度は5%オキアミリン脂質、5%卵黄リン脂質のそれぞれの投与で対照群と比較して、上昇が抑制された。また、血清HDL-コレステロール濃度はそれらの群でいずれも上昇した。一方血清および肝臓中トリグリセリド濃度で、オキアミリン脂質投与群は卵黄リン脂質群に比べ明らかに低値を示していた。

2) コレステロールの糞中への見かけの排泄率はいずれのリン脂質投与でも対照群に比べ高値を示したが、同時に糞中へのクロロホルム-メタノール混液への可溶性区分のリン脂質量もこれらの群で増加していた。

3) 5%オキアミリン脂質投与群では、辜丸周辺脂肪組織の重量は対照群より低下していた。

これらの結果から、これら2種のリン脂質は、飼料コレステロールの吸収阻害作用の結果として血清、肝臓コレステロール上昇抑制において似たような作用を示すが、これらリン脂質の脂肪酸組成の差異は血清、肝臓のトリグリセリドに対してそれぞれ異なった効果を示すことを認めた。

終りに、オキアミリン脂質を提供して頂きました日本水産株式会社、卵黄リン脂質を提供して頂きました旭化成株式会社に深謝いたします。

本研究の一部は昭和63年度文部省科学研究費助成金(奨励研究(A))、課題番号:63780117)によって行ったことを記して謝意を表します。

引 用 文 献

- 1) Oversen, L., Ebbesen, K. and Olesen, E.S. : J. Parenteral Enteral Nutr., 9, 716 (1985)
- 2) Imaizumi, K., Mawatari, K., Murata, M., Ikeda, I. and Sugano, M. : J. Nutr., 113, 2403 (1983)
- 3) Galli, C., Tremoli, E., Giani, E., Maderana, P., Gianfranceschi, G. and Sirtori, C.R. : Lipids, 20, 561 (1985)
- 4) Rampone, A. J. and Machida, C.M. : J. Lipids Res., 22, 744 (1981)
- 5) Rosseneu, M., Declercq, B., Vandamme, D., Vercaenst, R., Soetewey, F., Peeters, H., and Blaton, V. : Atherosclerosis, 32, 141 (1979)
- 6) Fiske, C.H. and Subbarow, Y. : J. Biol. Chem., 66, 375 (1925)
- 7) Sperry, W. M. and Webb, M. : J. Biol. Chem., 187, 97 (1950)
- 8) Sobel, C. and Fernandez, A. : Clin. Chem., 12, 739 (1966)
- 9) Banerjic, A. K., Ratnayake, W.M.N. and Ackman, R.G. : Lipids, 20, 121 (1985)

- 10) 小島義樹, 黒田圭一, 山口迪夫: 日本栄養・食糧学会誌, 41,23 (1988)
- 11) 小島義樹, 黒田圭一, 斎藤衛郎, 西出英一, 山口迪夫: 日本栄養・食糧学会誌, 41,457 (1988)
- 12) Clarke, S. D., Romsos, D. R., and Leveille, G. A. : J. Nutr., 107,1170 (1977)