【原 著】

脂肪酸組成の異なる油脂を摂取したラットの肝臓組織における脂肪滴の分布

Distribution of Fat Droplets in Liver Tissue of Rats Fed a Diet with Different Fatty Acid Compositions

細山田康恵*, 山田正子

Yasue HOSOYAMADA*, Masako YAMADA

千葉県立保健医療大学健康科学部栄養学科

【要 旨】

目的：脂肪酸組成の異なる油脂摂取が、ラットの脂肪蓄積量と肝臓組織の脂肪滴に与える影響について検討した。

方法：幼ラットに高コレステロール食としてラード、大豆油、エゴマ油、魚油を含む飼料を4週間摂取させた。コントロールにはラードを用いた。

結果：後腹壁脂肪及び睾丸周辺脂肪重量は、コントロール群、大豆油群それぞれより魚油群で有意に低値を示した。肝臓組織において、脂肪滴数は、エゴマ油群で他群より有意に高値を示し、直径の小さな脂肪滴が多数みられた。総面積に対する脂肪滴の割合は、コントロール群、大豆油群それぞれよりエゴマ油群で有意に低値を示し、コントロール群、大豆油群それぞれより魚油群で有意に低値を示した。

結論：脂肪酸組成の異なる油脂摂取において、脂肪蓄積量と肝臓組織の脂肪滴の面積は類似することが明らかとなった。魚油摂取が、脂肪蓄積低下に有用で肥満の予防や改善に役立つことが期待される。

【キーワード】

肝臓組織, 脂肪滴, 魚油, エゴマ油, ラット

はじめに

食習慣の欧米化による動物性脂肪摂取の増加や運動不足が、体内のエネルギー収支を消費よりも蓄積に傾け、エネルギーが余剰となる。このために、体内の脂肪組織が過剰に増加した状態となり、肥満につながるから問題となっている¹⁾。脂肪組織における、内臓脂肪と皮下脂肪に蓄積される脂肪の質は基本的には変わらないと考えられ、内臓脂肪は皮下脂肪と比較して脂肪が蓄積されやすいことが知られている²⁾。内臓脂肪組織や皮下脂肪組織を構成する脂肪細胞は白色脂肪細胞で、肥満が進むにつれて、細胞径が増大する。脂肪組織には、脂肪滴を蓄えた脂肪細胞のほか、間質にさまざまな種類の脂肪が存在する。特に、マクロファージやリンパ球などの免疫細胞は、脂肪細胞と密接に連携し、肥満状態の脂肪組織においては、マクロファージによる炎症性細胞浸潤を伴っていることが明らかにされている³⁾。肥満になると、脂質異常症、動脈硬化、高血圧、糖尿病などの生活習慣病を招きやすくなることが報告されている⁴⁻⁸⁾。脂質異常症は動脈硬化症の主たる危険因子と考えられ、コレステロールの多い食事では、リスクが高くなる。このような状況において、食生活を通じての、肥満の予防や改善に期待が集まっている。メタボリックシンドロームの病態と食事脂肪の役割が血中脂質、脂肪組織代謝などに密接に関連すると言われている⁹⁾。脂肪酸は、二重結合の数により、飽和脂肪酸、一価不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸に分類され、脂肪酸の種類により生理作用が異なることが報告されている¹⁰⁻¹⁶⁾。ラットにおいては、脂肪酸の比率が肝臓での代謝酵素活性に影響するというこ

受理日：2018年3月27日

* 〒261-0014 千葉県千葉市美浜区若葉2-10-1 Tel: 043-272-2964 Fax: 043-272-2964

E-mail: yasue.hosoyamada@cpuhs.ac.jp

報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。しかし、脂肪酸組成の異なる油脂を摂取した場合の肝臓の脂肪滴について、数や大きさの比較は行われていない。

今回は、栄養素を体が利用できるように代謝し、解毒作用や胆汁酸の生成など多くの役目を担っている肝臓に注目し、食事脂肪と脂肪滴について調べることにした。油脂は、日常使用している脂肪酸組成の異なる4種を選択した。パルミチン酸やオレイン酸を多く含有するラード、リノール酸を多く含有する大豆油、 α -リノレン酸を多く含有するエゴマ油、エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) を多く含有する魚油を用いた。また、ラットを用いた研究において、高コレステロール、コル酸含有食は、肝臓の脂肪蓄積、脂肪変性などを引き起こすことも知られている²⁰⁾ため、量が同じで質が異なる油脂を高コレステロール食としてラットに摂取させた。この際の、脂肪重量、肝臓組織の脂肪滴の分布について検討することを目的とした。

材料・方法

1. 実験動物

5週齢のSprague-Dawley系雄ラットを日本クレア(株)から24匹購入した。1匹ずつアパートメント式飼育ケージに入れた。2日間固形飼料(日本クレア(株)CE2)により飼育し、成長に異常のないラットのみを用いた。飼育条件は、室温21-25℃、湿度40-60%、12時間明暗サイクル(明7:00-19:00)とした。本研究における動物試験は、千葉県立保健医療大学実験指針に基づき、「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準を定める件」を遵守し、本大学の動物実験研究倫理審査部会の承認(2016-A001)を得て行った。

2. 試薬、飼料素材および試験脂質

DL-メチオニン、重酒石酸コリン、コレステロール、コル酸ナトリウム、大豆油、10%ホルマリン液、カラッチヘマトキシリン液、1%エオジンY溶液は和光純薬工業(株)製、カゼイン、 α -コーンスターチ、AIN-93ビタミン混合、AIN-93Mミネラル混合、セルロースパウダーはオリエンタル酵母工業(株)製、グラニュー糖は日新製糖(株)製、ラードは雪印(株)製、エゴマ油はマルタ(株)製を購入し用いた。魚油は日本水産(株)から提供頂いたものを用いた。実験に用いた油脂の脂肪酸組成をTable 1に示した。ラードはオレイン酸(C18:1)、大豆油はリノール酸(C18:2)、エゴマ油は α -リノレン酸(C18:3)、魚油はエイコサペンタエン酸(C20:5)、ドコサヘキサエン酸(C22:6)を多く含有していた。

3. 実験飼料

実験飼料は、カゼイン20%、DL-メチオニン0.3%、 α -コーンスターチ15%、スクロース44.25%、AIN-93Mミ

Table 1 Fatty acid composition of sample lipids used in the experiment (%).

Fatty acid	Lard	Soybean oil	Perilla oil	Fish oil
C10:0	0	0	1.0	0
C12:0	nd	0	0	1.2
C14:0	2.1	0	0	6.4
C16:0	23.9	10.6	7.1	6.4
C16:1	4.5	0	0	10.0
C18:0	9.7	3.6	1.2	3.6
C18:1 (n-9)	44.7	24.1	19.5	15.9
C18:2 (n-6)	11.7	53.5	13.7	1.2
C18:3 (n-3)	nd	8.1	57.0	0.9
C18:4 (n-3)	tr	0	0	5.0
C20:4 (n-6)	tr	0	0	0.7
C20:5 (n-3)	tr	0	0	27.2
C22:5 (n-3)	nd	0	0	1.9
C22:6 (n-3)	tr	0	0	10.5
Others	3.4	0.1	0.6	9.1

nd : not detected. tr : trace.

ネラル混合3.5%、AIN-93ビタミン混合1%、セルロースパウダー5%、重酒石酸コリン0.2%に油脂区分10%とし、0.5%コレステロールと0.25%コル酸ナトリウムを添加した高コレステロール食を使用した。実験油脂はラードを対照(Control)とし、大豆油(Soybean Oil)、エゴマ油(Perilla Oil)、魚油(Fish Oil)を用い、4群を設けた。すなわちコントロール群、大豆油群、エゴマ油群、魚油群で各群6匹ずつとした。それぞれの実験飼料摂取期間は4週間とした。実験飼料、飲料水は自由摂取とした。

4. 動物処理方法

ラットは実験期間最終日に16時間絶食後、ソムノペンチル麻酔下で、心臓の右心室から採血することにより屠殺し、直ちに肝臓、後腹壁脂肪、睪丸周辺脂肪を摘出し、秤量した。肝臓は、0.9%生理食塩水で門脈から圧入することにより脱血後測定に用いた。血液は、1時間放置し、3,500r.p.m., 15min. 遠心分離後の血清を測定に用いた。

5. 測定方法

肝臓の組織については、脱血後、左葉を直ちに10%ホルマリン固定液に浸漬し、脱水、透徹、包埋し、小型滑走式マイクロームESM-150S(エルマ(株)製)で薄切した。切片はヘマトキシ-エオジン(HE)で染色後、光学顕微鏡(オリンパスDP22)を用いて観察した。各肝臓組織をスケール入りで5カ所撮影した後、脂肪滴の直径と数を計測し、総面積の算出を行った。

6. 統計処理

データは、平均 $\pm$ 標準誤差(n=6)で表した。統計処理には、PASW Statistics 20(日本IBM(株))を用い、全群間の比較をTukeyの多重比較法により行った。検定の結果は、危険率5%および1%未満を有意と判定した。

結 果

終体重, 体重増加量, 総飼料摂取量, 肝臓重量を Table 2 に示した. 終体重は, 大豆油群より魚油群で有意に低値を示した ($p<0.05$). 体重増加量は, コントロール群より魚油群で有意に低値を示し ($p<0.05$), 大豆油群より魚油群で有意に低値を示した ($p<0.05$). 総飼料摂取量および肝臓重量は, 各群間における差はなかった. 後腹壁脂肪および睪丸周辺脂肪重量は, Fig.1 に示した. 後腹壁脂肪重量は, コントロール群より魚油群で有意に低値を示し ($p<0.05$), 大豆油群より魚油群で有意に低値を示した ($p<0.01$). 睪丸周辺脂肪重量は, コントロール群より魚油群で有意に低値を示し ($p<0.01$), 大豆油群より魚油群で有意に低値を示した ($p<0.01$).

肝臓組織の HE 染色像を Fig.2 に示し, 脂肪滴の数と直径を Fig.3 に示した. 肝臓組織像では, 群間における肝小葉の違いは見られなかった. コントロール群は, 直径 $0.5 \sim 1.0 \mu\text{m}$ の脂肪滴が多く, 大豆油群は, 直径 $0.3 \mu\text{m} \sim 0.7 \mu\text{m}$ の脂肪滴が多く見られた. エゴマ油群は, 直径 $0.1 \sim 0.5 \mu\text{m}$ の脂肪滴が多数見られた. 魚油群は, 大きな脂肪滴は見

られず, 直径 $0.2 \sim 0.6 \mu\text{m}$ 脂肪滴が少数見られた.

肝臓組織の脂肪滴数と総面積に対する脂肪滴の割合を Fig.4 に示した. 脂肪滴数は, エゴマ油群より大豆油群と魚油群で有意に低値 ($p<0.01$), コントロール群で有意に低値を示した ($p<0.05$). また, コントロール群より魚油群で低下傾向を示した. 総面積に対する脂肪滴の割合は, コントロール群, 大豆油群, エゴマ油群それぞれより魚油群で有意に低値を示した ($p<0.01$). また, コントロール群よりエゴマ油群で有意に低値を示し ($p<0.05$), 大豆油群よりエゴマ油群で有意に低値を示した ($p<0.05$). さらに, 魚油群はエゴマ油群と比較して有意に低値を示した ($p<0.01$).

Table 2 Physiological parameters in rats fed the experimental diets for 4 weeks.

	Final weight (g)	Body weight gain (g)	Total foods intake (g/4wk)	Liver weight (g)
Control	324.9 $\pm$ 4.71	219.4 $\pm$ 3.85 ^a	471.6 $\pm$ 10.46	16.8 $\pm$ 0.97
Soybean oil	338.6 $\pm$ 9.23 ^a	234.8 $\pm$ 8.62 ^a	476.2 $\pm$ 9.73	17.6 $\pm$ 0.98
Perilla oil	329.1 $\pm$ 9.59	224.6 $\pm$ 7.97	466.9 $\pm$ 16.1	16.7 $\pm$ 0.85
Fish oil	305.9 $\pm$ 7.64 ^b	200.4 $\pm$ 7.57 ^b	458.7 $\pm$ 10.61	15.6 $\pm$ 0.74

*Means $\pm$ SE (n=6). ^aa $p<0.05$ compared to b group.

Fig.1 Weights of posterior abdominal wall fat and testicle peripheral fat in rats fed the experimental diets over a period of 4 weeks.

Bars represent the mean $\pm$ SE (n=6). Asterisks indicate significant differences for comparisons between the groups at ** $p<0.01$ or * $p<0.05$ by Tukey's multiple test.

Fig.2 Rats were fed experimental diets for 4 weeks, and their liver tissue sections were treated with hematoxylin and eosin stain.

(a) Control (b) Soybean oil (c) Perilla oil (d) Fish oil

Fig.3 Scatter plot showing the amount and diameter of fat droplets in liver tissue sections of rats fed the experimental diets for 4 weeks.

Fig.4 Number of fat droplets and area of fat droplets in liver tissue sections of rats fed the experimental diets for 4 weeks. Means±S.E. (n=6) *p<0.05, **p<0.01.

考 察

体重増加量が、コントロール群より魚油群で有意に低値を示し、大豆油群より魚油群で有意に低値を示した。総飼料摂取量に差がなかったことから、魚油が体脂肪を低減したと考えられる。後腹壁脂肪および睾丸周辺脂肪重量が、コントロール群、大豆油群それぞれより魚油群で有意に低値を示したのは、終体重と相関したものと推定される。魚油による脂肪蓄積抑制効果²¹⁻²³⁾と同様の結果となった。マウスに魚油を摂取させた際の体脂肪の燃焼メカニズムが報告されている²⁴⁾が、ラットでも同様であることが示唆された。今回、幼ラットを用いたのは、近年、中年以上だけでなく小児肥満も増加しているため、成長期における脂肪蓄積抑制を検討するのに使用した。

肝臓組織の脂肪滴において、コントロール群と大豆油群は、直径の大きな不揃いの脂肪滴が多く見られた。肝臓組織の標本を用いたのは、栄養素の代謝を考える際、肝臓が大きな役割を担っており、糖質・脂質・たんぱく質の相互交換などと関連が深く、肝小葉に配置された肝細胞により、それぞれの機能を営んでいるため注目した。肝臓組織

像では、群間における肝小葉の違いは見られなかった。飼料は、肝小葉の門脈系から肝細胞へ流入経路となるが、組織には変化がなかったと考える。パルミチン酸やステアリン酸を多く含有するラードとリノール酸を多く含有する大豆油は、脂肪蓄積量が多いことがわかった。エゴマ油群で、直径の微小な脂肪滴が多数出現していた。脂肪滴の数が多ければ多いほど、ペリリピンなどの蛋白質の密度が減少し、リパーゼが作用する可能性が高くなることが報告²⁵⁾されている。このことより、脂肪滴の表面積増加を通して、脂質エステルの分解促進に繋がり、脂肪滴の総表面積を広げることにより、脂肪分解の効率を高めたのではないかと考えられる。また、エゴマ油は、n-3系の α -リノレン酸を多く含有し、体内で生合成される際にDHAやEPAに変換され、魚油と同様に総面積が減少したことも推定される。魚油群で、直径の小さな脂肪滴が少数あったのは、肝臓におけるトリグリセリドの合成量が低下し、脂肪酸酸化を促進させることから²⁶⁾、脂肪細胞の貯蔵が減少したと考えられる。総面積に対する脂肪滴の割合が、コントロール群よりエゴマ油群で有意に低値を示し、大豆油群よりエゴマ油群で有意に低値を示した。さらに、魚油群はエゴマ油群と比較して

有意に低値を示したことから、飽和脂肪酸や n-6 系脂肪酸のリノール酸より n-3 系脂肪酸を摂取した方が、脂肪滴の面積が減少することが示唆された。しかし、魚油群よりエゴマ油群で高値を示したことから、同じ n-3 系脂肪酸において、 α -リノレン酸含量の多いエゴマ油と EPA や DHA 含量の多い魚油では、脂肪滴の分布が異なることが明らかとなった。これらより、肝臓組織の脂肪滴の形成は、魚油摂取で抑制することが明らかとなり、内臓脂肪蓄積低下に有用で肥満の予防や改善に役立つことが期待される。また、脂肪合成の場である肝臓組織において、血清へ移行するトリグリセリドと肝臓組織に貯蔵するトリグリセリドが油脂の性質や構造で、分別されている可能性が考えられる。

今後、脂肪滴の構造と機能を解明するために、電子顕微鏡などを用いて、さらに詳細を明らかにする必要があると考える。

結 論

幼ラットに高コレステロール食としてラード、大豆油、エゴマ油、魚油を含む飼料を 4 週間摂取させた際、脂肪蓄積量は、ラードより魚油で有意に低値を示し、大豆油より魚油で有意に低値になることが明らかとなった。また、肝臓組織の脂肪滴の割合は、ラードよりエゴマ油で有意に低値を示し、大豆油よりエゴマ油で有意に低値を示し、魚油はエゴマ油より有意に低値となることが示唆された。

これらより、魚油摂取が内臓脂肪蓄積低下に有用で肥満の予防や改善に役立つことが期待される。

助成元

本研究は、「千葉県立保健医療大学学内共同研究費」(2016-E3) の助成を受けて実施した。

謝 辞

魚油を提供いただきました、日本水産（株）に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2005; 404: 635-643.
- 2) Klein S. The case of visceral fat: argument for the defense. *J Clin Invest*. 2004; 113: 1530-1532.
- 3) Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin Invest*. 2003; 112:1796-1808.
- 4) Maron DJ, Fair JM, Haskell WL. Saturated fat intake and insulin resistance in men with coronary artery disease. The Stanford Coronary Risk Intervention Project Investigators and Staff. *Circulation*. 1991; 84: 2020-2027.
- 5) Feskens EJ, Loeber JG, Kromhout D. Diet and physical activity as determinants of hyperinsulinemia: the Zutphen Elderly Study. *Am J Epidemiol*. 1994; 140: 350-360.
- 6) Marshall JA, Bessesen DH, Hamman RF. High saturated fat and low starch and fibre are associated with hyperinsulinaemia in a non-diabetic population: the San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetologia*. 1997; 40: 430-438.
- 7) Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005; 365: 1415-1428.
- 8) Nagao K, Yanagita T. Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Prog Lipid Res*. 2008; 47: 127-146.
- 9) Lottenberg AM, Afonso Mda S, Lavrador MS, et al. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *J Nutr Biochem*. 2012; 23: 1027-1040.
- 10) Gardner CD, Kraemer HC. Monounsaturated versus polyunsaturated dietary fat and serum lipids. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15: 1917-1927.
- 11) Clarke R, Frost C, Collins R, et al. Dietary lipids and blood cholesterol: quantitative metaanalysis of metabolic ward studies. *BMJ*. 1997; 314: 112-117.
- 12) Kris-Etherton PM. AHA Science Advisory. Mono-unsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. American Heart Association. Nutrition Committee. *Circulation*. 1999; 100: 1253-1258.
- 13) Paniagua JA, de la Sacristana AG, Sanchez E, et al. A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects. *J Am Coll Nutr*. 2007; 26: 434-444.
- 14) Mozaffarian D, Ascherio A, Hu FB, et al. Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*. 2005; 111: 157-164.
- 15) Iso H, Kobayashi M, Ishihara J, et al. Intake of fish and n-3 fatty acids and risk of coronary heart disease among Japanese: the Japan Public Health Center-Based (JPHC) Study Cohort I. *Circulation*. 2006; 113: 195-202.
- 16) Nestel PJ. Effects of N-3 fatty acids on lipid metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1990; 10: 149-167.
- 17) Garg ML, Sebokova E, Wierzbicki A, et al. Differential effects of dietary linoleic and alpha-linolenic acid on lipid metabolism in rat tissue. *Lipids*. 1988; 23: 847-852.
- 18) Lee JH, Sugano M, Ide T. Effects of various combinations of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fats with saturated fat on serum lipid levels and eicosanoid production in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*. 1988; 34: 117-129.
- 19) Lee JH, Fukumoto M, Nishida H, et al. The interrelated

- effects of n-6/n-3 and polyunsaturated/saturated ratios of dietary fats on the regulation of lipid metabolism in rats. *J. Nutr.* 1989; 119: 1893-1899.
- 20) Jeong WI, Jeong DH, Do SH, et al. Mild hepatic fibrosis in cholesterol and sodium cholate diet-fed rats. *J. Vet. Med. Sci.* 2005; 67: 235-242.
- 21) Okada T, Noguchi R, Hosokawa M, et al. Effects of trans and conjugated LC N-3 polyunsaturated fatty acids on lipid composition and abdominal fat weight in rats. *J. Food Sci.* 2008; 73: 201-206.
- 22) Arai T, Kim HJ, Chiba H, et al. Interaction of fenofibrate and fish oil in relation to lipid metabolism in mice. *J. Atheroscler Thromb.* 2009; 16: 283-291.
- 23) Haimeur A, Mimouni V, Ulmann L, et al. Fish oil and microalga omega-3 as dietary supplements: A comparative study on cardiovascular risk factors in high-fat fed rats. *Lipids.* 2016; 51: 1037-1049.
- 24) Kim M, Goto T, Yu R, et al. Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. *Sci Rep.* 2015; 5: 18013.
- 25) Brasaemle DL. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Research.* 2007; 48: 2547-2559.
- 26) Wong SH, Nestel PJ, Trimble RP, et al. The adaptive effects of dietary fish and safflower oil on lipid and lipoprotein metabolism in perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 1984; 792: 103-109.

ABSTRACT

Distribution of Fat Droplets in Liver Tissue of Rats Fed a Diet with Different Fatty Acid Compositions

Yasue HOSOYAMADA, Masako YAMADA

Department of Nutrition, Faculty of Health Care Sciences, Chiba Prefectural University of Health Sciences

Objectives: We examined the effect of oil intake differing in fatty acid composition on fat accumulation amount, concentration of serum and fat droplets adipocytes of liver tissue in rats.

Methods: Young male rats were fed a high cholesterol diet containing either lard, soybean oil, perilla oil or fish oil for 4wk. The control diet contained a lard component.

Results: Posterior abdominal wall fat and testicle peripheral fat weights were significantly lower in the fish oil group compared with the control and the soybean oil group. The number of fat droplets was significantly higher in the liver tissue of rats in the perilla oil group compared with the other groups, and many fat droplets with small diameters were observed. The proportion of fat droplets to the total area was significantly lower in the perilla oil group and the fish oil group compared with the control and the soybean oil group.

Conclusion: The results suggested that oil intake differing in fatty acid composition correlates with fat accumulation amount and lipid droplet area in the liver tissue. Fish oil intake correlated with reduced visceral fat accumulation and is expected to be useful in the prevention and improvement of obesity.

Key words: liver tissue, fat droplets, fish oil, perilla oil, rat