【原 著】

亜麻仁油, エゴマ油を摂取したラットの肝臓脂質濃度と
生体内酸化ストレスに及ぼす影響Effects of Dietary Linseed Oil and/or Perilla Oil on Liver Lipid
Concentrations and Oxidative Stress in Rats細山田康恵^{1,*}, 山田正子²Yasue HOSOYAMADA^{1,*}, Masako YAMADA²¹ 千葉県立保健医療大学健康科学部栄養学科² 東京家政学院大学現代生活学部食物学科

【要 旨】

目的: α -リノレン酸を多く含有する亜麻仁油 (Linseed Oil: LO), エゴマ油 (Perilla Oil: PO) をラットに摂取させた際の肝臓脂質濃度や酸化ストレスに及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

方法: 5週齢 Sprague-Dawley 系雄ラットに20日間, それぞれ3種類の油脂を普通食に添加し, 肝臓脂質濃度, 酸化ストレスなどの測定を行った。群分けは, 普通食にラードを加えた群 (コントロール群: n=6), LO群 (n=6) および PO群 (n=6) とした。

結果: 終体重は, Control 群より PO 群で低値を示す傾向がみられた (P=0.0509)。なお, 総飼料摂取量に差は見られなかった。肝臓コレステロール濃度および酸化ストレス度は, Control 群より LO 群と PO 群で有意に低値を示した (p<0.01, p<0.05)。

結論: 亜麻仁油またはエゴマ油を摂取したラットにおいて, 肝臓コレステロール濃度および酸化ストレスはそれぞれ低下した。亜麻仁油やエゴマ油摂取は脂質代謝異常の改善やストレス緩和に役立つことが示された。

【キーワード】

ラット, 亜麻仁油, エゴマ油, 肝臓脂質濃度, 酸化ストレス

はじめに

我が国の平成30年の死因別死亡数の割合では, 心疾患が15.3%, 脳血管疾患が7.9%を占め¹⁾, 生活習慣病が問題となっている。脂質異常症などの生活習慣病の共通の危険因子として肥満があり, 過食や運動不足, 動物性脂肪への依存などがあると考えられている^{2,3)}。しかし, 食餌中に含まれる脂肪酸組成によって肥満に対する効果が異なることが明らかにされており⁴⁾, 飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸など, 様々な脂肪酸についての検討が行われている。n-3系脂肪酸には, 魚由来のエイコサペンタエン酸 (Eicosapentaenoic acid: EPA) とドコサヘキサエン酸 (Docosahexaenoic acid: DHA), 植物由来の α -リノレン酸などがある。1970年代にDyerbergらは, EPAやDHAは, 心疾患に対する予防効果を有することを報告した⁵⁾。それ以降, 心血管疾患の発症予防に効果があることが報告されている⁶⁻⁸⁾。著者らも, 魚油を用いた動物実験で, 血清脂質濃度や肝臓脂質濃度に及ぼす影響については報告している^{9,10)}。しかし, EPAやDHAは, 非常に酸化されやすく, 過酸化脂質やフリーラジカルを産生しやすい性質があり, 血中や肝臓中で過酸化脂質が増加する^{11,12)}。また, EPAやDHAの摂取量が少ない場合は, 過酸化脂質が増加しないとも言われている¹³⁾。一方, α -リノレン酸はヒトが合成できない必須の多価不飽和脂肪酸であり, EPAやDHAなどの長鎖n-3系多価不飽和脂肪酸の前駆体として機能している¹⁴⁾。 α -リノレン酸から, 生体内でEPAやDHAに変換されるが, その量は非常に少ないとされている^{15,16)}。さらに, 生活習慣病の原因となる酸化ストレスは, 脂肪細胞の肥大化につながり¹⁷⁾, アディポサイ

受理日: 2021年4月9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

トカインやリポカインの分泌異常がインスリン抵抗性へとつながっていると考えられている¹⁸⁾。しかし、 α -リノレン酸と酸化ストレスの関係は、明らかとなっていない。生活習慣病と食生活は密接に関連しており、生活習慣病予防のためには健康的な望ましい食生活が重要であると考え、 α -リノレン酸は血中脂質改善に有益な効果があることが示唆されているが、魚油と同様に酸化の影響も受けやすいため、過酸化脂質が高くなることもあり、生理効果が明らかではない。植物油等で手軽に摂取することができ、DHAやEPAの食事代替源となりうるとも言われている¹⁹⁾。健康志向ブームの中で、健康に良いとされるn-3系油脂として、亜麻仁油やエゴマ油などが市販されており、入手しやすい利点もある。

本研究では、ラットを用いて、 α -リノレン酸を約60%含有している亜麻仁油、エゴマ油を摂取した際に、肝臓脂質濃度や酸化ストレス度などにどのように影響するのか検討することを目的とした。酸化ストレスについては、血清中の脂質ヒドロペルオキシドを評価するd-ROMs(diacron-reactive oxygen metabolites)値を用いて検討した。

材料・方法

1. 実験動物

5週齢の雄ラット Sprague-Dawley を日本クレア(株)から18匹購入した。実験群は各群6匹とし、1匹ずつアパートメント式飼育ケージに入れた。実験飼料摂取期間は20日間とし、飼料と水は自由摂取とした。飼育条件は、室温21~25°C、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実験は、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(2020-A01)を得て行った。

2. 試薬、飼料素材および試験脂質

L-メチオニン、重酒石酸コリンは和光純薬工業(株)製、ミルクカゼイン、 α -コーンスターチ、セルロースパウダー、AIN-93 ビタミン混合、AIN-93 ミネラル混合はオリエンタル酵母工業(株)より購入した。スクロースは日新製糖(株)製、ラードは雪印メグミルク(株)製、亜麻仁油、エゴマ油は太田油脂(株)製を購入し用いた。

実験に用いた油脂の主な脂肪酸組成は、島津製作所ガスクロマトグラフ GC-14B を用いて分析した結果、ラードがパルミチン酸(C16:0) 23.9%、パルミトレイン酸(C16:1) 4.5%、ステアリン酸(C18:0) 9.7%、オレイン酸(C18:1) 44.7%、リノール酸(C18:2) 11.7%、亜麻仁油がC16:0 5.4%、C18:0 2.9%、C18:1 17.9%、C18:2 15.9%、 α -リノレン酸(C18:3) 57.7%、エゴマ油がミリスチン酸(C14:0) 0.3%、C16:0 6.2%、C16:1 0.1%、C18:0 1.8%、C18:1 15.9%、C18:2 14.0%、C18:3 60.0%、アラキドン酸(C20:4) 0.3%であった。

3. 実験飼料

普通食に添加した油脂として、対照群(Control 群; n=6)の油脂にはラードを用い、実験群の油脂にはそれぞれ亜麻仁油(Linseed Oil)(LO 群; n=6)、エゴマ油(Perilla Oil)(PO 群; n=6)を用いた。なお、飼料と水は自由摂取とし、摂取期間は20日間とした。

基本となる飼料組成は、ミルクカゼイン20%、L-メチオニン0.3%、 α -コーンスターチ49.95%、スクロース10%、セルロースパウダー5%、AIN-93 ミネラル混合3.5%、AIN-93 ビタミン混合1%、重酒石酸コリン0.25%であり、混合した油脂はそれぞれ10%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た。内臓脂肪量の指標として後腹壁脂肪、睪丸周辺脂肪を直ちに摘出し、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、測定した。血液は、1時間放置し、3,500r.p.m., 15min. 遠心分離後に血清を測定した。

5. 測定方法

血清総コレステロール濃度は、コレステロールオキシダーゼ・DAOS法(和光純薬工業(株)製、コレステロールE-テストワコー)、血清トリグリセリド濃度はGPO・DAOS法(和光純薬工業(株)製、トリグリセリドE-テストワコー)、アディポネクチン濃度はELISA法(大塚製薬(株)製、マウス/ラットアディポネクチンELISAキット)で分析を行った。肝臓脂質に関しては、クロロホルム-メタノール(CM)混液(2:1, v/v)で脂質を抽出後、減圧乾固して酵素法キットにより測定を行った。肝臓総コレステロールはコレステロールオキシダーゼ・DAOS法(和光純薬工業(株)製、コレステロールE-テストワコー)、肝臓トリグリセリドはGPO・DAOS法(和光純薬工業(株)製、トリグリセリドE-テストワコー)を用いた。

d-ROMs(diacron-reactive oxygen metabolites)値については、ウィスマー社のフリーラジカル解析装置Freeを用いて測定を行った。

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、一元配置分散分析およびTurkey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、総飼料摂取量、後腹壁脂肪重量と睪丸周辺脂肪重量をFig.1に示した。終体重は、Control群よりPO群で低値を示す傾向にあった(p=0.0509)。総飼料摂取量は、群間における差はなかった。後腹壁脂肪重量は、Control

Fig.1 Final body weight, Total food intake, Posterior abdominal wall fat weight and Testicle peripheral fat weight in rats fed the experimental diets for 20 days
LO: Linseed Oil, PO: Perilla Oil. Means±S.E.(n=6), *p<0.05.

Fig.2 Concentration of serum and liver lipids of rats fed the experimental diets for 20 days
LO: Linseed Oil, PO: Perilla Oil. Means±S.E.(n=6), *p<0.05, **p<0.01.

群より PO 群で有意に低値を示し (p<0.05), LO 群より PO 群で有意に低値を示した (p<0.05). 睾丸周辺脂肪重量は, Control 群より PO 群で低値を示す傾向にあった (p=0.0825).

血清および肝臓脂質濃度を Fig.2 に示した. 血清総コレステロール濃度は, Control 群より LO 群で低値を示す傾

向にあった (p=0.0547). また, Control 群より PO 群で低値を示す傾向にあった (p=0.0601). 血清トリグリセリド濃度は, 群間における差はなかった. 肝臓総コレステロール濃度は, Control 群より LO 群で有意に低値を示した (p<0.01). また, Control 群より PO 群で有意に低値を示した (p<0.05). 肝臓トリグリセリド濃度は, 群間における差

Fig.3 Concentration of adiponectin of rats fed the experimental diets for 20 days
LO: Linseed Oil, PO: Perilla Oil.
Means $\pm$ S.E.(n=6), * p <0.05.

Fig.4 Concentration of d-ROMs of rats fed the experimental diets for 20 days
LO: Linseed Oil, PO: Perilla Oil.
Means $\pm$ S.E.(n=6), * p <0.05, ** p <0.01.

はなかった。

血清アディポネクチン濃度を Fig.3 に示した。血清アディポネクチン濃度は、Control 群より LO 群で有意に高値を示した (p <0.05)。また、Control 群より PO 群で高値を示す傾向にあった (p =0.0828)。

血清中 d-ROMs 値を Fig.4 に示した。d-ROMs 値は、Control 群より LO 群で有意に低値を示した (p <0.01)。また、Control 群より PO 群で有意に低値を示した (p <0.05)。

考 察

総飼料摂取量は、群間における差はなく、エネルギー摂取量は同様であったと考えられた。終体重が、Control 群より PO 群で低値を示す傾向にあったのは、エゴマ油摂取後、総飼料摂取量の低下傾向が体重増加の抑制に起因したと考えられる。後腹壁脂肪重量は、Control 群より PO 群で有意に減少し、LO 群より PO 群で有意に減少した。また、睾丸周辺脂肪重量は、Control 群より PO 群で減少傾向にあったことから、エゴマ油摂取で脂肪蓄積が抑制されたと考えられる。終体重がコントロール群より PO 群で低値を

示す傾向にあったことと相関していると考えられる。魚油摂取と同様に α -リノレン酸を約 60 % 含有するエゴマ油でも脂肪蓄積抑制作用が明らかとなった。エゴマ油は、高脂肪食摂取で体重増加量および脂肪沈着の抑制効果が示されている^{20,21)}が、今回我々の実験では、普通食摂取でも同様の結果となることが示され、肥満予防効果が再確認された。

血清総コレステロール濃度は、Control 群より LO 群と PO 群で低値を示す傾向にあったことから、n-3 系脂肪酸の脂質低下効果と考えられる。また、血清トリグリセリド濃度は、群間における差がなかったのは、個体差が大きく影響したと考えられる。

肝臓総コレステロール濃度において、Control 群より LO 群と PO 群で有意に低値を示したのは、腸管で吸収されたコレステロールがミセルを形成し、糞便中に排泄したことが示唆される。エゴマ油を摂取したラットで、糞便中の胆汁酸とコレステロール排泄が増加した報告があり²²⁾、今回の結果にも糞便中への排泄が関わっていた可能性が示唆された。肝臓トリグリセリド濃度は、群間における差はなかったが、血清と同様に個体差によるものや飼育期間などの影響もあると考える。

血清アディポネクチン濃度は、Control 群より LO 群で有意に高値を示し、Control 群より PO 群で高値を示す傾向にあった。アディポネクチンは、脂肪細胞から分泌される善玉生理活性物質のひとつで、動脈硬化や糖尿病を防ぐことが知られている¹⁸⁾。亜麻仁油はアディポネクチン濃度を増加させる働きがあることが報告されている²³⁾が、エゴマ油でも、同様に増加することが明らかとなった。また、エゴマ油を添加した高脂肪食において、アディポネクチン濃度を増加させる働きがあることが報告されている²¹⁾。今回、普通食においても、エゴマ油摂取で、アディポネクチン濃度を増加させることが明らかとなり、脂肪細胞の分泌に役立つことが示唆された。

d-ROMs 値は、Control 群より LO 群と PO 群で有意に低値を示したことから、亜麻仁油とエゴマ油は酸化ストレスを軽減させる働きがあることが示唆された。また、エゴマ油によって誘導される酸化ストレスを α -リポ酸が改善するという報告もある²⁴⁾。

今回、後腹壁脂肪重量が、Control 群より PO 群で有意に低値、LO 群より PO 群で有意に低値を示したことから、酸化ストレスの軽減が脂肪蓄積抑制につながったとも考えられる。著者らは、肥満ラットに魚油とコレステロールを摂取させた際に、酸化ストレス度がラードと比較して魚油で低下することを報告している²⁵⁾。魚油は、スーパーオキシドディスムターゼやカタラーゼの活性化を亢進させるとも言われている^{26,27)}。フリーラジカルによる損傷から細胞を保護することで、過酸化脂質の生成を減少させたことが推定される。 α -リノレン酸から EPA や DHA の合成量は少なくとも、魚油と同様に、生体内の酸化ストレスを低下することが明らかとなった。

結 論

亜麻仁油やエゴマ油を摂取したラットにおいて、肝臓コレステロール濃度および酸化ストレスの低下が明らかとなった。また、亜麻仁油によるアディポネクチン増加が示された。

以上のことから、亜麻仁油やエゴマ油摂取が脂質代謝異常の改善やストレス緩和に役立つことが期待される。

助成元

なし

利益相反

開示すべき COI はない

謝 辞

本研究を遂行する上で、ラットの飼育・測定にご協力いただいた、本学第9期生有江日奈乃氏、川崎美穂氏に感謝致します。

参考文献

- 1) 厚生労働省政策統括官(統計・情報政策, 政策評価担当) 編. 平成30年人口動態統計. 一般財団法人 厚生労働統計協会. 2020;24:25.
- 2) 春日雅人. 肥満症とその成因. 日本内科学会雑誌. 2015;104(4):687-689.
- 3) Li Y, Hruby A, Bernstein AM, et al. Saturated fat as compared with unsaturated fats and sources of carbohydrates in relation to risk of coronary heart disease: A prospective cohort study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015;66(14):1538-1548.
- 4) 松尾達博. 高飽和脂肪食の体脂肪蓄積機構に関する栄養生理学的研究. 日本栄養・食糧学会誌. 2003;56:379-387.
- 5) Dyerberg J, Bang HO, Hjorne N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am. J. Clinical Nutrition.* 1975;28:958-966.
- 6) Nestel PJ. Effects of n-3 fatty acids on lipid metabolism. *Annual Review Nutrition.* 1990;10:149-167.
- 7) Iso H, Kobayashi M, Ishihara I, et al. Intake of fish and n3 fatty acids and risk of coronary heart disease among Japanese: the Japan Public Health Center-Based (JPHC) Study Cohort 1. *Circulation.* 2006;113:195-202.
- 8) Jain AP, Aggarwal KK, Zhang P-Y. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(3):441-445.
- 9) Hosoyamada Y, Yamada M. Effects of dietary fish oil and apple polyphenol on the concentration serum lipids and excretion of fecal bile acids in rats. *J. Nutr Sci Vitaminol.* 2017;63:21-27.
- 10) 細山田康恵, 山田正子. 魚油, 酒粕を摂取したラットの血清脂質濃度と不安行動に及ぼす影響. 日本補完代替医療学会誌. 2020;17(1):43-49.
- 11) Fritsche KL, Johnston PV. Rapid autoxidation of fish oil in diets without added antioxidants. *J. Nutr.* 1998;118:425-426.
- 12) Gonzalez MJ, Gray JI, Schemmel RA, et al. Lipid peroxidation products are elevated in fish oil diets even in the presence of added antioxidants. *J. Nutr.* 1992;122:2190-2195.
- 13) Calviello G, Palozza P, Franceschelli P, et al. Low-dose eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid administration modifies fatty acid composition and does not affect susceptibility to oxidative stress in rat erythrocytes and tissues. *Lipids.* 1997;32:1075-1083.
- 14) Xu J, Gao h, Zhang Li. A combination of flaxseed oil and astaxanthin alleviates atherosclerosis risk factors in high fat diet fed rats. *Lipids in Health and Disease.* 2014;13:63.
- 15) Bernna JT, Salem N, Sinclair AJ, et al. α -Linoleic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 2009;80:85-91.
- 16) Graham C, Burdge, Philip CC. Conversion of α -Linoleic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reduction Nutrition Development.* 2005;45(5):581-597.
- 17) Frukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clinical Unvestiate.* 2004;114:1752-1761.
- 18) Murdolo G, Bartolini D, Tortoioli C, et al. Lipokines and oxysterols: novel adipose-derived lipid hormones linking adipose dysfunction and insulin resistance. *Free Radical Biology and Medicine.* 2013;65:811-820.
- 19) Kawakami Y, Yamanaka-Okumura H, Naniwa-Kuroki Y, et al. Flaxseed oil intake reduces serum small dense low-density lipoprotein concentrations in Japanese men: a randomized, double blind, crossover study. *Nutrition J.* 2015;14:39. DOI 10:1186/s12937-015-0023-2.
- 20) Guo H, Ban YH, Cha Y, et al. Comparative effects of plant oils and trans-fat on blood lipid profiles and ischemic stroke in rats. *J. Biomedical Res.* 2017;31(2):122-129.
- 21) Thomas SS, Cha YS, Kim KA. Effect of vegetable oils with different fatty acid composition on high-fat diet-induced obesity and colon inflammation. *Nutr Res. Pract.* 2020;14(5):425-437.
- 22) Tian Y, Wang H, Yuan F, et al. Perilla oil has similar protective effect of fish oil on high-fat diet-induced

- nonalcoholic fatty liver disease and gut dysbiosis. Biomed Research International. 2016;http://dx.doi.org/10.1155/2016/9462571.
- 23) Sekine S, Sasanuki S, Murano Y, et al. α -Linolenic acid-rich flaxseed oil ingestion increases plasma adiponectin level in rats. International Journal for Vitamin and Nutrition Research. 2008;78:223-229.
- 24) Ide T, Tanaka I. α -Lipoic acid ameliorated oxidative stress induced by perilla oil, but the combination of these dietary factors was ineffective to cause marked decreases in serum lipid levels in rats. Nutrition Research. 2017;48:49-64.
- 25) 細山田康恵, 山田正子. 肥満ラットの生体内酸化ストレスに及ぼす魚油の影響. 日本補完代替医療学会誌. 2016;13(1): 13-19.
- 26) Tsuduki T, Honma T, Nakagawa K, et al. Long-term intake of fish oil increases oxidative stress and decreases lifespan in senescence-accelerated mice. Nutrition. 2011;27:334-337.
- 27) Jahangiri A, Leifert WR, Kind KL, et al. Dietary fish oil alters cardiomyocyte Ca^{2+} dynamics and antioxidant status. Free Radic Biol Med. 2006;40:1592-1602.

ABSTRACT

Effects of Dietary Linseed Oil and/or Perilla Oil on Liver Lipid Concentrations and Oxidative Stress in Rats

Yasue HOSOYAMADA¹, Masako YAMADA²

¹*Department of Nutrition, Faculty of Health Care Sciences, Chiba Prefectural University of Health Sciences*

²*Department of Food and Nutrition, Faculty of Contemporary Human Life and Science, Tokyo Kasei Gakuin University*

Objective: We studied the effect of linseed oil (LO) and perilla oil (PO) diets (rich in α -linoleic acid) compared to a normal diet in rats, and assessed liver lipid concentrations and oxidative stress.

Methods: Male Sprague-Dawley rats aged 5 weeks in three groups were fed a normal diet for 20 days, and liver lipid concentrations and oxidative stress were then measured in each rat. The groups were divided into a normal diet containing either lard (the control group: n=6), the LO group (n=6) and the PO group (n=6).

Results: Final body weight tended to be lower in the PO group than in the Control group. There was no difference in total food intake between each group. Liver lipid concentrations and oxidative stress were significantly lower in the LO and the PO groups than in the Control group.

Conclusion: These results suggested that diets containing LO and PO caused decreased concentrations of liver cholesterol and oxidative stress in rats compared to the control diet. Linseed oil and perilla oil diets are shown to prevent dyslipidemia and to relieve oxidative stress in vivo.

Key words: rat, linseed oil, perilla oil, liver lipids, oxidative stress