Jpn. J. Toxicol. Environ. Health
衛生 生 化 学
38 (1) 57-62 (1992)

エイコサペンタエン酸 (EPA) 並びにその自動酸化生成物のマウス致死 並びにヘモグロビン酸化作用について

佐二木順子,^a 高橋勝弘,^a 浜崎智仁^b

千葉県衛生研究所,^a 富山医科薬科大学^b

Effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Its Autoxidation Products on Mouse Lethal Toxicity and Hemoglobin Oxidation

JUNKO SAJIKI,^a KATSUHIRO TAKAHASHI^a and TOMOHITO HAMAZAKI^b

Chiba Prefectural Institute of Public Health,^a 666-2 Nitona-cho, Chiba 280, Japan and

1st Department of Internal Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical

University, 2630 Sugitani, Toyama 930-01, Japan^b

(Received July, 12, 1991)

Hemoglobin (Hb) oxidation and mouse lethal toxicity of eicosapentaenoic acid (EPA) and its oxidized products by continuous aeration of EPA at 37°C for a week were investigated. To clarify the effects of oxidized EPA (EPA-Ox), they were separated into two fractions (Fr. 1: oxidized EPA; Fr. 2: unoxidized EPA) by thin-layer chromatography, and their effects were studied. By monitoring the substances in Fr. 1 by spectrophotometry at 230 nm and 280 nm they were separated by high performance liquid chromatography, and many hydrophobic substances were detected. The activity of Hb oxidation was 7.4 times higher in oxidized EPA (Fr. 1) than original EPA (Fr. 2). And the activity of EPA without 0.2% α -tocopherol was also 6.6 times that with the antioxidant. By intraperitoneal injection, mice were killed much earlier by oxidized EPA (EPA-Ox and Fr. 1) than by EPA. LD₅₀ observed 24 h after injection of the above samples using 4 mice in each group, were 9.0 mg for EPA-Ox, 7.4 mg for Fr. 2, 7.3 mg for EPA and 4.2 mg for Fr. 1, and Fr. 1 was more toxic than others. The mouse lethal activity was not inhibited by the further addition of α -tocopherol up to 8.2%.

In conclusion, it is suggested that radical oxygens occurred by heme iron-catalyzed autoxidation of EPA are concerned to this Hb oxidation. For the effect of mouse lethal toxicity by EPA, however, it is considered that the mechanism inducing the mouse death is different from that inducing the Hb oxidation, because the toxicity was not inhibited by the addition of α -tocopherol at higher doses.

Keywords — eicosapentaenoic acid (EPA); EPA autoxidation product; hemoglobin oxidation; mouse lethal toxicity; α -tocopherol

はじめに

魚介類に多く含まれているエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) をはじめとする ω -3 系列の高級不飽和脂肪酸は血栓症や動脈硬化症などの予防に有効である¹⁻³⁾といわれている。これらはまた生体内、外で酸化を受けると各種の脂肪酸酸化物を生じることが知られている。^{4,5)}

これまで、著者らは二枚貝並びに魚類の脂溶性分画がマウス致死作用をもち、*in vitro* で血球のオキシヘモグロビン (O₂Hb) をメトヘモグロビン (MetHb) に酸化することを見いだした。^{6,7)} このうち血球のヘモグロビン (Hb) 酸化については不飽和脂肪酸にその作用があり、不飽和度が増すにつれてその作用が強まることを明らかにした。なお、 α -トコフェロールの添加によりこの作用が抑えられるこ

とから、魚介類に存在する酸性物質のHbに対する作用機作としてヘム鉄を介した不飽和脂肪酸の酸化反応による可能性が示唆された。⁸⁾ 一方、魚の含有量と同濃度のEPAをマウスに投与すると斃死する事実から、マウス致死作用にEPA, DHA等の高級不飽和脂肪酸が関与していることが示唆された。⁹⁾ なお、Hb酸化作用、マウス致死作用ともに生ほしからの試料は生鮮からのものに比べ強かった。^{7,9)} これらの事実は、魚介類に多く含まれるEPA等の不飽和脂肪酸やその酸化物がこれらの作用を有することを示すものであった。

本研究では、これらの作用が魚介類に豊富に含まれているEPAやその酸化物によるものかどうかを証明するために、EPAと酸化EPAのマウスに対する致死効果及びMetHb生成作用について検討した。その結果、酸化EPAに強いMetHb生成作用を認めた。

実験材料及び方法

実験材料 EPAはすでに報告した¹⁰⁾ EPAメチルエステルを加水分解して得たEPAに、抗酸化剤として0.2%の α -トコフェロールを添加したものをを用いた。なお、標準品として、不飽和脂肪酸はSigma社のstearidonic acid (C_{18:4}, SDA), arachidonic acid (C_{20:4}, AA), docosahexaenoic acid (C_{22:6}, DHA)を用いた。

DL- α -トコフェロールは和光純薬KKより購入した。

マウスは体重20g前後のddY系雄マウス(船橋農場KK), 血球は羊保存血(コージンKK)を用いた。

実験方法 1) EPAの自動酸化——1gのEPA(0.2%の α -トコフェロールを含む)を三角フラスコに薄く広げ、37°Cで1週間振とうし、自動酸化を行った。EPA酸化度はヨード滴定法¹¹⁾によって測定し、過酸化価(POV)として表した。自動酸化終了後4mlのメタノールに溶解し試験原液(EPA-Ox)とした。その2mlは薄層クロマトグラフィー(TLC)分析に供した。なお、未処置EPAもEPA-Oxと同濃度になるようメタノールに溶解し、試験原液(EPA)とした。

2) TLCによる分画——自動酸化終了後のEPA-Ox 0.5gをあらかじめ150°C, 2時間加熱処理したTLCプレート(Silica gel, 0.5 mm, Merck)に塗布し、石油エーテル-ジエチルエーテル-酢酸(74:15:1)で展開した。ヨウ素によりEPA並びに

Fig. 1. Thin-Layer Chromatograms of EPA and Oxidized EPA with Shaking at 37°C for 1 Week

Developing solvent; petroleum ether/diethyl ether/acetic acid (74:15:1).

その酸化物を確認した後、同時に展開した別のプレートの各分画(Fig. 1に示したFr. 1並びに2)のゲルをかき取り、メタノール50 mlで2回抽出した。N₂ガス下でメタノールを留去し、残さを2 mlのメタノールに溶解し試験原液(Fr. 1, Fr. 2)とした。TLCプレートからの抽出操作による回収率(%)はHPLCにて測定したEPA-Ox標品のEPAのピーク面積(S)に対するEPA-OxをTLCにて分離抽出して得た試料中のEPAのピーク面積(Sf)の比、(Sf)/(S)×100から算出した。なお、TLC上の α -トコフェロールの確認はDual-wavelength TLC scanner(CS-910, Shimadzu Co. Ltd.)を用い、Ex=295 nm, Em=400 nmにて行った。

3) HPLC分析——自動酸化後のEPA酸化生成物の確認ならびに未酸化EPAの量は既に報告した方法⁹⁾でHPLC分析により行った。それぞれの試験原液を500倍に希釈し、その20 μ lをHPLCに注入した。HPLCはShimadzu LC-6A(島津製作所製), 検出器はShimadzu SPD-6A(島津製作所製), 記録計はShimadzu C-R6A(島津製作所製)を用いた。分析条件はカラム: ODS (4.6 mm i.d. x 250 mm), 移動相: アセトニトリル-メタノール-水-リン酸(53:20:17:0.1), 流速: 1.2 ml/min, 測定波長: 195 nm, 230 nm並びに280 nm。

EPA並びにEPA-OxのHPLCによるピーク面積から、未酸化EPAの量を概算した。

4) マウス腹腔内投与試験——EPA, EPA-Ox, 及び Fig. 1 に示した EPA-Ox の TLC 分画により得た Fr. 1 と Fr. 2 のメタノール溶液を, 1% の Tween 60 を含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) によりそれぞれ 2, 4, 8, 16 倍に希釈し, その 0.2 ml を 4 匹のマウス腹腔内に注射した. 対照群として 50% メタノール 0.2 ml を 4 匹のマウス腹腔内に投与した.

5) Hb に及ぼす影響——マウス試験に用いた PBS による 2, 4, 8 倍希釈試料溶液 50 μ l を 2% の赤血球 (RBC) 懸濁液に添加し, 1 時間後の Hb 変化を既報⁸⁾に従い測定し, MetHb 生成率で表示した.

結 果

1) EPA の自動酸化による性状の変化

EPA を 37°C, 1 週間インキュベートし自動酸化させた時の EPA-Ox の過酸化度 (POV 値) は 3807 mequiv/Kg であった. 一方, EPA の POV 値は 0 であった. EPA-Ox を TLC で分画すると, Fig. 1 に示したように大半が原点にとどまり R_f 値 0.15 に検

出される物質はごくわずかであった. なお, 未酸化 EPA 並びに α -トコフェロールの R_f 値はそれぞれ 0.2, 0.47 であり, Fr. 2 には α -トコフェロールは含まれていないことが明らかとなった.

EPA, EPA-Ox 並びに TLC 分離後の Fr. 1 と Fr. 2 の HPLC クロマトグラムを Fig. 2 と 3 に示す. EPA を 195 nm でモニターした結果, 91.9% の EPA 以外の主な不飽和脂肪酸としてステアリン酸 (SDA) が 2.0%, アラキドン酸 (AA) が 4.3% 含まれていることが確認された. HPLC による EPA 並びに EPA-Ox の未酸化 EPA のピーク面積から換算すると 46% の EPA が自動酸化されていることが認められた. SDA 及び AA もそれぞれ 39%, 38% 酸化された. なお TLC プレートからの抽出回収率は 78% であった. 195 nm でモニターした場合 (Fig. 2 A), EPA 標品では SDA より短い保持時間をもつ物質は検出されなかったが, EPA-Ox では多くの物質が検出され, 自動酸化により極性の高い物質が生成されていることが示唆された. 不飽和脂肪酸の自動酸化生成物のうち共役ジエンを有するもの

Fig. 2. HPLC Analysis of Various Samples Monitored at 195 nm (A) and 280 nm (B).

Conditions; column; ODS (4.6 mm x 250 mm), mobile phase; acetonitrile/methanol/water/phosphoric acid (53:20:17:0.1), flow rate; 1.2 ml/min.

Fig. 3. HPLC Analysis of a Sample (TLC, Fr. 1) Monitored at 230 nm

HPLC conditions were the same as in Fig. 2.

は 230 nm 付近, 共役ジエノンを有するものは 280 nm 付近に最大吸収をもつことが知られている¹²⁾ ので, 同様に 280 nm で検討したところ (Fig. 2 B), EPA-Ox では 3—4 分付近に保持時間をもつ多くの物質が生成し, その大部分は TLC 分画の Fr. 1 に対応した。また, Fr. 1 を 230 nm でモニターすると, Fig. 3 に示したように 2—3 分, 5—6 分付近に多くの物質が確認され, Fr. 1 は多種の EPA 酸化物を含んでいる可能性が示唆された。

2) マウスに対する致死効果

各試料のマウス腹腔内投与後の毒性を投与 1 時間後並びに 24 時間後の致死率 (%) として表示した (Fig. 4)。2, 4, 8, 16 倍希釈液のマウス 1 匹あたりの実質投与量は, EPA, EPA-Ox についてそれぞれ 25, 12.5, 6.3, 3.2 mg に相当し, EPA 酸化率並びに TLC 回収率 (本実験においては EPA の酸化物を含む画分についても EPA の回収率を用いた) から換算すると Fr. 1 では 9.0, 4.5, 2.3, 1.2 mg, Fr. 2 では 10.5, 5.3, 2.7, 1.4 mg に相当した。投与 1 時間後における致死作用は酸化 EPA のみで認められ, EPA-Ox については 12.5 mg 投与で致死率 50%, 25 mg 投与で 100%, Fr. 1 については 9 mg 投与で 50% であった。なお, 対照群は 24 時間生存し, 無処置マウスとの差異は認められなかった。毒性の強さの指標として投与 24 時間後における致死率から対数正規確率紙により LD_{50} を求めた結果, EPA ; 7.3 mg, EPA-Ox ; 9.0 mg, Fr. 1 ; 4.2 mg, Fr. 2 ; 7.4 mg であり, Fr. 1 のマウス致死作用は他の 3 試料より強いことが示された。なお, 0.2% の α -

Fig. 4. Dose-dependent Lethal Toxicity of 4 Samples

○—○; EPA containing 0.2% α -tocopherol, ●—●; EPA-Ox, ■—■; Fr. 1 and □—□; Fr. 2 at 1 and 24 h after the injection to mouse. Vertical line represents a percentage of dead mice to the number of injected mice.

Fig. 5. Methemoglobin Synthesis for 1 h after Addition of Various Samples to Red Blood Cell Suspension (RBS)

A) EPA; B) EPA-OX; C) Fr. 2; D) Fr. 1.

トコフェロールを含む EPA の 12.5 mg 投与群にさらに α -トコフェロールを 2, 4, 8 % 添加した場合もすべて 24 時間以内に斃死し, α -トコフェロールの致死防御効果は認められなかった。

3) MetHb 生成

Fig. 5 は 1% Tween-PBS で希釈した各溶液濃度における 60 分後の MetHb 生成率を示したものである。生成率は $\text{Fr. 1} > \text{EPA-Ox} > \text{Fr. 2} > \text{EPA}$ の順に高かった。MetHb 生成の強さを比較するため 2 倍希釈液(絶対量として EPA, EPA-Ox は 6.25 mg, Fr. 1 は 2.24 mg, Fr. 2 は 2.63 mg)における MetHb 生成率を絶対量で除すと, EPA; 9.12×10^{-3} , EPA-Ox; 136×10^{-3} , Fr. 1; 446×10^{-3} , Fr. 2; 60×10^{-3} となる。EPA-Ox は EPA の 14.9 倍 Fr. 1 は Fr. 2 の 7.4 倍であり, この結果は EPA の酸化物を含む画分が強い Hb 酸化作用をもつことを示している。今回用いた濃度のメタノールでは Hb 酸化に何等影響を与えなかった。

考 察

著者らはこれまで魚介類の脂溶性画分に存在する酸性物質が O_2Hb を MetHb に酸化すること,^{6,7)} この作用は多価不飽和脂肪酸 (PUFA) によるものであり, その二重結合数に依存すること⁸⁾ を報告してきた。また, この作用が α -トコフェロールにより阻害されることから, ヘム鉄を触媒とする Polyunsaturated fatty acid (PUFA) の酸化による可能性を示唆した。

今回, 魚介類に含まれる PUFA のなかでも含有量の高い EPA を用い自動酸化後の Hb 酸化について検討したところ, POV 値が 3807 を示した酸化 EPA では著しい変化を示し, TLC により分画された Fr. 1 の Hb 酸化作用が著しく強かった事実 (Fig. 5) は EPA の酸化により生じた物質の Hb 酸化への関与が大きいことを示唆している。今回用いた EPA の Hb 酸化作用が既報⁸⁾ にくらべ著しく低かったのは酸化防止剤として 0.2% の α -トコフェロールが添加されているためであるが, TLC により分画された Fr. 2 のように α -トコフェロールを含まない EPA の Hb 酸化作用は 6.6 倍に上昇した (Fig. 5)。

寺尾¹³⁾ は AA の自動酸化により 6 種類の, また一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) による酸化により 8 種類のモノヒドロペルオキシドが生成されること, 反応の進行によってはジペルオキシドも生成されることを報告している。自動酸化速度は二重結合数が多いほど大きいことから,^{14,15)} EPA の自動酸化では 6 種類以上のモノヒドロペルオキシドが生成されているものと考えられる。Cho ら¹⁵⁾ の報告した EPA 酸化物の TLC クロマトグラムから判断すると, 本実験の Fr. 1 のうち R_f 0.15 付近に少量検出された物質がヒドロ

ペルオキシドであり原点付近の物質がその二次産物と推測される。Fr. 1 に含まれる物質を HPLC で分離し, 230 nm で測定した場合, EPA より極性の大きな物質が多く検出された (Fig. 3) 事実は, EPA の自動酸化により多種のヒドロペルオキシドが生じている可能性を示している。

リノール酸ヒドロペルオキシドの Hb による酸化分解で 5 種類の分解物が生じ, その反応に酸素ラジカル ($\text{LOO}\cdot$, $\text{LO}\cdot$) が関与している可能性が報告されている。¹²⁾ 一方, MetHb の生成は O_2^- , H_2O_2 等の活性酸素により引き起こされることが明らかにされている。¹⁶⁾ 今回, Fr. 1 の MetHb 生成率が Fr. 2 の 7.4 倍という高値を示した理由の一つとして, EPA ヒドロペルオキシドの Hb による酸化分解で生じる酸素ラジカルが, 結果的に Hb の酸化を促進させたものと考えられる。

EPA 酸化物を含む画分, EPA-Ox, Fr. 1 の各 12.5 mg, 9.0 mg 投与マウスは投与 1 時間後に 50% が斃死した。このことは EPA の自動酸化生成物のマウス致死発現時間が EPA より短いことを示している。生体内ではリノール酸の場合, その酸化物である低分子の 4-ヒドロキシノネナール, 4-ヒドロキシオクテナール等のアルデヒドが強い毒性を発揮することが知られている。¹⁷⁾ 本実験で用いた酸化 EPA にすでに致死毒性を持つ分解物が含まれている可能性も否定できないが, ヒドロペルオキシドからの酸化分解は酸素ラジカル反応であり, 毒性の強い分解物が生ずる速度が速いため生体への反応も早く表れたものと考えられる。

EPA 投与 24 時間後のマウス致死作用については, その LD_{50} 値は, α -トコフェロールの有無にかかわらず同程度であった。この事実は, α -トコフェロールは EPA の Hb 酸化を阻害するが, マウスに対する毒性は阻害しないことを示している。また, 高濃度の α -トコフェロールでもマウス毒性を軽減しなかった事実は, EPA のマウス致死作用がその酸化に伴うラジカル反応のみによるものではないことを示唆している。EPA は血小板, 白血球をはじめとする細胞内で oxygenase 等種々の酵素によりプロスタグランディンやロイコトリエン等の生理活性物質に代謝されることが知られていることから,^{4,18)} 今後この点も含めた検討が必要であろう。

ま と め

EPA ならびに酸化 EPA (EPA-Ox; 37°C にて 1 週間振とうによる自動酸化生成物) のヘモグロビン

酸化作用, マウス致死作用について調べた。なお, EPA-Ox については TLC により EPA 酸化物を含む画分 (Fr. 1) と未酸化 EPA (Fr. 2) に分画し, それぞれの分画について作用を調べた。Fr. 1 (EPA 酸化物を含む画分) に含まれる物質を HPLC により分離し 230 nm, 280 nm で測定した結果, EPA より極性の大きな物質が多く確認され, EPA の酸化物が生成されている可能性が示唆された。ヘモグロビン酸化については, EPA 酸化物を含む画分 (Fr. 1) が未酸化 EPA (Fr. 2) に比べ 7.4 倍強かった。EPA のヘモグロビン酸化作用は 0.2% α -トコフェロール含有 EPA の 6.6 倍であった。マウス致死発現時間に

ついては EPA 酸化生成物の方が EPA に比べ早く, 腹腔内投与 24 時間における LD₅₀ は酸化 EPA (EPA-Ox); 9.0 mg, Fr. 2 (未酸化 EPA); 7.4 mg, EPA; 7.3 mg, Fr. 1 (EPA 酸化物); 4.2 mg であり, Fr. 1 (EPA 酸化物) のマウス致死作用がより強かった。EPA に最大 8% の α -トコフェロールを添加しても EPA のマウス致死率に変化は認められなかった。以上の結果から, EPA によるヘモグロビン酸化作用はその自動酸化によるラジカルの関与が示唆されたが, マウス致死作用についてはそれ自身に由来すると考えられる。

引用文献

- 1) P. Needleman, A. Raz, M.S. Minks, J.A. Ferrendelli, H. Sprecher, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **76**, 944 (1979).
- 2) T. Hamazaki, A. Hirai, T. Terano, J. Sajiki, S. Kondo, T. Fujita, Y. Tamura, A. Kumagai, *Prostaglandins*, **23**, 557 (1982).
- 3) S. Fischer, P.C. Weber, *Nature (London)*, **307**, 165 (1984).
- 4) D.W. Goldman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 282 (1983).
- 5) T. Nakamura, Y. Hama, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 271 (1988).
- 6) J. Sajiki, K. Takahashi, *Eisei Kagaku*, **35**, 414 (1989).
- 7) J. Sajiki, K. Takahashi, *Eisei Kagaku*, **37**, 467 (1991).
- 8) 佐二木順子, 高橋勝弘, *衛生化学*, **36**, 51 (1990).
- 9) J. Sajiki, K. Takahashi, *Lipids*, submitted for publication.
- 10) T. Hamazaki, M. Urakaze, M. Makuta, A. Ozawa, Y. Soda, H. Tatsumi, S. Yano, A. Kumagai, *Lipids*, **22**, 994 (1987).
- 11) 金田尚志, 植田伸夫, 過酸化脂質実験法, 医歯薬出版, 東京, 1983, p.59.
- 12) M. Hamberg, *Lipids*, **10**, 87 (1974).
- 13) 寺尾純二, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **64**, 1819 (1990).
- 14) K. Miyashita, T. Takagi, *JAACS*, **63**, 1380 (1986).
- 15) S.Y. Cho, K. Miyashita, T. Miyazawa, K. Fujimoto, T. Kaneda, *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **53**, 813 (1987).
- 16) E.W. Kellogg, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **252**, 6721 (1977).
- 17) 金沢和樹, 日本栄養, 食糧学会誌, **43**, 1 (1990).
- 18) T. Lee, *New Eng. J. Med.*, **312**, 1217 (1985).