The Activity of Docosaehaenoic Acid (DHA)-rich Phospholipid was different from that of DHA-rich Triacylglycerol in Spontaneously Hypertensive Rats

Yoko IRUKAYAMA-TOMOBE, Mamoru TSUCHIDA, Koji SAKAGUCHI,
Hidehiko HIBINO and Yukihiisa TANAKA

NOF Corporation Tsukuba Research Laboratory
(5-10, Tokodai, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-2635, JAPAN)

Edited by Y. Totani, Seikei Univ., and accepted July 16, 2001 (received for review June 4, 2001)

Abstract : Spontaneously hypersensitive rats (SHR) were fed test lipid diets for six weeks, which contained 30%-docosaehaenoic acid (DHA) phospholipid (DHA-PL) extracted from fish roe or 30%-DHA fish oil (DHA-TG). The control diet contained corn oil in the presence of test lipids.

After feeding, blood pressure in the DHA-TG and DHA-PL diet groups was found significantly lower compared to the control. Serum fatty acid content of dihomo- γ -linoleic acid (DHLnA) and Arachidonic acid (AA) of the DHA-PL diet group was significantly less than the control or DHA-TG diet group. Serum triacylglycerol, phospholipid and total cholesterol in the DHA-TG and DHA-PL diet groups were significantly less than in the control. Liver total cholesterol in DHA-PL was twice that in the DHA-TG diet group and control. The mechanism for cholesterol removal from blood by DHA-PL would thus appear to differ from that by DHA-TG.

Serum lipid peroxide (LPO) in the DHA-TG and DHA-PL diet groups was essentially the same as in the control.

J. Oleo Sci. 50, 945-950 (2001).

Key words : docosaehaenoic acid, phospholipid, spontaneously hypertensive rat, tail cuff blood pressure

1 緒 言

ドコサヘキサエン酸 (DHA; 22:6 n-3) には脳機能及び心疾患の予防, 抗炎症作用などの機能が報告されている。DHA はシクロオキシゲナーゼの基質とはならない (1) が, 5 あるいは 12-リポキシゲナーゼ (5-LOG, 12-LOG) の基質となり, DHA の過酸化体がヒドロキシル体に変換され, 血小板凝集能の抑制 (2), 平滑筋収縮阻害 (3) などを示す。しかしながら, アラキドン酸カスケードやエイコサノイドへの変換でのみ DHA の効果を説明する事は難しい。

例えば, 細胞膜に取り込まれた DHA がその膜流動性を高め, 外部からの刺激に対する応答に影響を与えている事が考えられる。

これまで DHA の生理活性の研究報告では魚油などのトリアシルグリセロール型 DHA (DHA-TG) あるいは高純度のエチルエステル (DHA-EE) が用いられてき

た。著者らは生態内ではリン脂質が DHA のリザベヤールとなっている事に注目し, 新しい DHA のキャリアとしてリン脂質の検討を行った。

リン脂質型の DHA (DHA-PL) を投与して得られる生理機能についてこれまでに報告はある。

DHA はリン脂質の sn-2 位に特異的に結合されている。その中でも sn-1 位にパルミチン酸あるいはオレイン酸が結合した DHA 含有ホスファチジルコリン (DHA-PC) には特に, 高い生理活性が報告されている。Asahi らは奇形腫細胞及び赤芽球性白血病細胞に対する分化誘導活性を報告している (4)。Hashimoto らは睡眠時間の増加機能 (5), Izaki らはラットの学習能亢進機能 (6), 記憶維持作用 (7) などを報告している。また, 5-LOG の活性阻害から抗炎症作用の可能性 (8) が示されている。著者らはマウスの耳介に 2,4-ジニトロ-1-フルオロベンゼン (DNFB) を塗布して作成した耳介浮腫の抑制によって DHA の抗炎症作用について評価した (9,10)。DHA を含有するリン脂質を投与したマウスは DHA 含有魚油を投与したマウスより高い抑制効果が認められたことを報告した。井上らは SHR-SP に DHA-

Corresponding author : Yukihiisa TANAKA

E-mail : yukihiisa_tanaka@nof.co.jp

PL を投与した結果、魚油群と比べて脳卒中による死亡率が低下し、寿命が有意に伸びたことを報告した (11)。このように DHA のキャリアの違いによって生理機能に差が認められる事が示唆された。

さらに、Takama らは四塩化炭素を投与した鶏の肝臓障害を軽減したことを報告し (12)、Hayashi らは慢性の肝炎患者に対して効果がある事を示唆している (13)。

一方、DHA は酸化を受け易いと考えられている。酸化を受けやすいことが DHA の医薬品や食品への応用を難しくしており、さまざまな酸化抑制の検討がされている (14)。しかしながら、DHA-PL は DHA-TG あるいは遊離脂肪酸、DHA-EE に比べて酸化安定性に優れている事が報告されている。

Komatsu ら (15,16)、武内ら (17) は DHA-PL を添加したイワシ油、サケ卵から調製した TG あるいはパーム油を保存した際に対照群よりも酸素吸収量は少なく、過酸化価、カルボニル価の上昇が抑制されることを報告している。これはリン脂質の含窒素基部分が関与した抗酸化効果であるとしている。

エイコサペンタエン酸 (C20:5, EPA) や DHA などの n-3 系高度不飽和脂肪酸の血清脂質に対する効果としてコレステロールや中性脂質の低下、または、上昇抑制 (18,19) などが報告されている。また、リン脂質それ自体にもコレステロールの低下作用、LDL の低下作用 (20,21) などが報告されている。しかしながら、両者の持つ血清脂質に対する効果は同じであるがその作用機序が異なる事が予想された。

著者らはこの両者の構造を併せ持つ DHA-PL を高血圧自然発症ラット (Spontaneously Hypertensive Rat: SHR) に投与し、とうもろこし油 (対照群)、及び構成脂肪酸組成が DHA-PL とほぼ同様である魚油の投与群と脂質代謝などを比較した。つまり、それぞれ 6 週間投与の後に血圧の変化及び血清脂質、血清中の脂質過酸化物、臓器の脂質組成などを比較し、脂質の代謝改善に対する DHA のキャリアの影響について検討を行った。

2 実 験

2.1 飼 料

1% の食塩を含有した低脂肪調整飼料は日本農産工業 (株) (横浜) より購入した。この飼料の組成を Table 1 に示した。また、それぞれの飼料は必須脂肪酸の供給のために紅花油を 1.2 wt% 及び試験油脂を 4.8 wt% 配合した。対照群は試験油脂の代わりにとうもろこし油を配合した。試験油脂は DHA-TG と DHA-PL であり、DHA-TG はカツオより調製した魚油、DHA-PL はイクラを Folch (22) の方法によって抽出して調製した脂質である。DHA-PL の脂質組成は TG, PC とホスファチジルエタノールアミン (PE) の混合物 (1:8:1 wt/wt/wt) である。全ての油脂には抗酸化剤として 0.2 wt% の α -ト

Table 1 The Composition of the Basal Diet.

Casein	20.0
L-Methionine	0.3
Sucrose	63.0
Mineral mixture*	3.5
Vitamin mixture*	1.0
Choline bitartrate	0.2
Cellulose powder	5.0
Salt	1.0
Test lipid**	6.0
	100.0

* AIN-75™

** Control diet : 4.8% corn oil + 1.2% safflower oil

DHA-TG diet : 4.8% tuna oil + 1.2% safflower oil

DHA-PL diet : 4.8% fish roe phospholipid + 1.2% safflower oil

Table 2 The Fatty Acid Composition of Test Diets (GC%).

	Control diet	DHA-TG diet	DHA-PL diet
16:0	11.2	10.6	13.1
16:1	0.2	4.9	1.4
18:0	2.2	2.2	8.7
18:1	23.9	14.5	11.9
18:2	61.4	16.2	15.5
18:3 (n-3)	—	0.6	0.2
20:4 (AA)	—	1.8	2.0
20:5 (EPA)	—	8.9	9.0
22:6 (DHA)	—	21.2	25.1
others	1.1	19.1	13.1

Control diet : 4.8% corn oil + 1.2% safflower oil

DHA-TG diet : 4.8% tuna oil + 1.2% safflower oil

DHA-PL diet : 4.8% fish roe phospholipid + 1.2% safflower oil

コフェノールを添加した。試験油脂を含有した飼料の脂肪酸組成を Table 2 に示した。

2.2 SHR の飼育条件

10 週齢のオス SHR はオリエンタルバイオサービス関東 (東京) より購入し、通常食 (日本クレア, 東京: CE-2) で 2 週間予備飼育した。血圧と体重を測定し、各群間のばらつきが各群で揃うように 1 群を 6 匹とし、各 1 匹づつを 1 ケージで 6 週間飼育した。

各飼料は 1 日の必要量をアルミ製の小袋に分包し、袋内を窒素置換し、口をシールして給餌まで 4°C で保管した。毎日新しい飼料を与え、油脂の過酸化劣化の影響を極力避けるようにした。おおむね週に 2 回の割合で体重

測定を行った。

2.3 血圧の測定

各ラットは無麻酔状態で収縮期血圧を尾部脈圧計 (Tail cuff sphygmomanometer MK-1100: 室町機械 (株), 東京) により測定した。測定値はそれぞれ5回測定した平均値で示した。

2.4 生化学的試験

6週間飼育後, ラットをペントバルビタール (50 mg/Kg) で麻酔下, 心臓より採血して屠殺した。血液は氷水中で約1時間静置したのちに3,500 rpm, 15分遠心分離して血清サンプルとした。肝臓, 腎臓を摘出し, 肝臓は生理食塩水を門脈から圧入して脱血し, -80°C で保管した。

脂質レベルは血清の脂肪酸組成, 血清 TG, PL, 総コレステロール (Tcho), 過酸化脂質量 (LPO), さらに肝機能の指標として GOT, GPT を測定した。なお, 一連の測定はそれぞれ Folch 法に従って, 脂質を抽出し, 測定キットを用いて測定した。脂質の脂肪酸分析はガスクロマトグラフィーによって定量分析した。

3 結果と考察

3.1 体重の変化

6週間の投与期間を通じて体重には有意な差は見られなかった。すべての個体において毛並みや糞の状態など給餌した飼料による影響は観察されなかった。

3.2 血圧の変化

対照群で1匹, DHA-TG 群で2匹のラットが測定中に死亡した。解剖を行っていないので詳細な原因は不明であるが, 測定時のストレスによる脳溢血と思われた。これらのラットはデータより除外した。6週間後の血圧の変化を Table 3 に示した。対照群に比べて DHA-PL 群及び DHA-TG 群では共に有意な低下を示した。個々のラットの血圧を投与直前と6週間後で比較しても対照群は有意な低下ではなかったが, DHA-PL 群及び DHA-TG 群では有意に低下した。両群の血圧の平均値も有意に低下した。

3.3 血清脂質の脂肪酸組成の変化

血清脂質の脂肪酸組成は飼料の脂肪酸組成を反映していた。ジホモガンマリノレン酸 (20:3, n-6; DHLnA), アラキドン酸 (20:4, n-6; AA), EPA, DHA の変化を Table 4 に示した。DHLnA は対照群に比べて DHA-TG 群は有意な差ではなかったが, DHA-PL 群では有意な減少があった。DHA-TG 群及び DHA-PL 群いずれにおいても投与した飼料の脂肪酸組成を反映し, AA は対照群に比べて有意に減少し, EPA, DHA は有意に増加した。また, DHA-PL 群では DHA-TG 群に比べて AA と DHLnA は有意に減少した。EPA 及び DHA は両群間に有意な差は無かった。

ほぼ同様な脂肪酸組成を持つ DHA-TG あるいは DHA-PL の2種類の DHA 飼料を投与した結果, その投与した DHA の脂質クラスが TG と PL であるため, 血清中の AA や DHLnA が n-3 系高度不飽和脂肪酸である EPA や DHA に置換される効率 (あるいは速度) が

Table 3 The Effects of Dietary Lipid on Blood Pressure (mmHg).

	Control diet	DHA-TG diet	DHA-PL diet
0 day	214.5 $\pm$ 14.7	221.2 $\pm$ 20.4	222.5 $\pm$ 23.1
42nd day	220.5 $\pm$ 8.0	191.0 $\pm$ 10.1* **	202.7 $\pm$ 6.7* **

Mean $\pm$ SD

*p<0.01 vs control diet, **p<0.01 vs value of 0 day

Table 4 Effects of Dietary Lipid on Concentration of Serum Fatty Acid (μM).

	Control diet	DHA-TG diet	DHA-PL diet
DHLnA	10.0 $\pm$ 1.4	9.5 $\pm$ 1.0	6.9 $\pm$ 0.5**, ++
AA	607.0 $\pm$ 27.8	224.9 $\pm$ 17.1*	112.4 $\pm$ 4.6*, +
EPA	1.4 $\pm$ 0.3	92.1 $\pm$ 13.9*	90.4 $\pm$ 5.8*
DHA	39.4 $\pm$ 7.1	238.3 $\pm$ 42.5*	275.2 $\pm$ 24.1*

Mean $\pm$ SEM

*p<0.01 vs control diet, **p<0.05 vs control diet

+p<0.01 vs DHA-TG diet, ++p<0.05 vs DHA-TG diet

影響を受けることが示唆された。DHA-PL 群の方が DHA-TG 群に比べて AA, DHLnA 濃度が有意に低下したことから DHA が結合する脂質クラスが n-6 系高度飽和脂肪酸の置換の効率（速度）に影響を及ぼしたことが示された。この結果、投与した脂質の脂質クラスは、n-6 系あるいは n-3 系高度不飽和脂肪酸から由来して産生されるサイトカインの産生比率にも影響を与える可能性が考えられ、そのサイトカインによって誘導される現象（症状）が影響を受けることが示唆された。

3.4 血清、臓器脂質の変化

血清 TG 濃度は対照群に比べ DHA-PL 群及び DHA-TG 群いずれも有意に減少した。DHA-TG 群では DHA-PL 群より減少の傾向があった（Table 5）。血清 PL 濃度は対照群に比べ DHA-PL 群及び DHA-TG 群いずれも有意に減少した。血清 Tcho 濃度は対照群と比べて DHA-TG 群及び DHA-PL 群で有意に減少した。DHA-PL 群では DHA-TG 群より減少の傾向があった（Table 5）。肝臓 TG 濃度は対照群と DHA-PL 群では有意な差はなかったが、DHA-TG 群では対照群及び DHA-PL 群と比較して有意に減少した。肝臓 PL 濃度は DHA-TG 群及び DHA-PL 群で低下の傾向が見られたが有意な低下ではなかった。肝臓 Tcho 濃度は対照群と比べて DHA-TG 群では有意な差は無かったが、DHA-PL 群では約 2 倍に増加し（Table 5）、対照群及び DHA-TG 群に比べ有意に高かった。

腎臓の脂質組成では TG 濃度、PL 濃度、Tcho 濃度のいずれも 3 群間に有意な差は認められなかった（Table 5）。

血清の LPO は 3 群間で有意差は見られなかった（Table 6）。つまり、本実験で示したように約 6 週間の DHA 投与では SHR の場合、生体内の抗酸化機能は有

効に作用し、生体内中での DHA の過酸化は十分に抑制されたものと考えられた。つまり DHA の過酸化物による組織への障害はほとんどないことが示唆された。

GOT, GPT は 3 群間で有意な差は認められなかった（Table 7）。

多くの研究によりヒトの血清中の脂質組成、特に、コレステロール濃度が上昇し、動脈で過酸化反応や炎症反応が併発して病変が発症することによって動脈硬化症が惹起されることが明らかとなっている（23）。高度不飽和脂肪酸にはコレステロール低下作用が報告されている。その作用機序は明確になっていないが、高度不飽和脂肪酸のコレステロールエステルが肝臓や組織によって急速に代謝され、その結果、コレステロールの代謝回転や排出を促進する可能性が報告されている（24,25）。本研究では DHA-PL 群では血清中の Tcho が対照群や DHA-TG 群より減少し、逆に肝臓中では Tcho は有意に高まった。この結果から血清中のコレステロールの回収は TG より PL の方が優位であることが推測された。つまり、DHA-TG 群と DHA-PL 群とではコレステロール代謝の作用機序に差異があることが示唆された。黒田らは SD 系ラットにオキアミから調製した DHA-PL を 2 週間投与している（26,27）。血清 Tcho は魚油群及び魚油と卵黄リン脂質を併せて投与した群、DHA-PL 群で減少しており、本報告の結果と一致している。

以上のことから DHA-TG, DHA-PL 群では血圧は対照群に比べ、いずれも同様に降下したが、その現象は同じでもその作用機序は異なることが推定された。

魚油に含まれる EPA の高血圧に対する治療効果は良く知られているが、これは強い血管弛緩作用を持つプロスタサイクリン (PG) I₂ の産生が増強され、血管収縮作用を持つトロンボキサン (TX) A₂ の産生が減少するこ

Table 5 Effects of Dietary Lipid on Concentration of Serum, Liver and Kidney Lipids.

	Control diet	DHA-TG diet	DHA-PL diet
Serum			
triacylglyceride (mg/dl)	221.0±45.7	83.3±17.2*	135.5±14.2*
phospholipid (mg/dl)	214.0±11.1	149.8±9.6*	141.7±4.9*
total cholesterol (mg/dl)	100.0±4.0	74.0±4.8*	61.3±2.8*
Liver			
triacylglyceride (mg/dl)	50.5±10.5	29.7±4.3*	62.6±6.1
phospholipid (mg/dl)	75.2±8.3	65.6±6.9	66.2±2.8
total cholesterol (mg/dl)	9.3±0.8	8.7±0.8	18.4±1.5*
Kidney			
triacylglyceride (mg/dl)	12.9±0.4	9.8±1.2	10.1±1.7
phospholipid (mg/dl)	48.8±2.7	50.5±1.3	51.4±1.7
total cholesterol (mg/dl)	14.2±0.7	15.1±0.3	16.1±0.6

Mean±SEM

*p<0.01 vs control diet

Table 6 Effects of Dietary Lipid on Concentration of Serum Peroxidized Lipid.

	Control diet	DHA-TG diet	DHA-PL diet
LPO (nM/ml)	4.3±0.2	4.8±0.2	5.0±0.2
Mean±SEM			

Table 7 Effects of Dietary Lipid on Concentration of GOT and GPT.

	Control diet	DHA-TG diet	DHA-PL diet
GOT (IU/L)	298.8±39.4	340.5±42.6	310.7±36.3
GPT (IU/L)	73.2±5.5	74.8±2.0	81.5±5.7
Mean±SEM			

とによって起こるとされている。血管弛緩作用を持つ因子として一酸化窒素 (NO) などがあるが、魚油は内皮依存性の血管弛緩反応を増強するという報告 (28) がある。また、SHR にスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を投与すると血圧は低下する (29)。これは NO をトラップする O₂ ラジカルが SOD 投与により代謝されることによると考えられている。

血圧を決定する最も重要な要素は心拍出量と末梢血管抵抗である。この両者は交感神経、体液量、腎機能、ホルモンなどにより調節され、高血圧はこれらのバランス異常によって発生する。腸間膜動脈血管床は最も血圧に影響を与える末梢抵抗血管であるが、魚油は SHR から単離した腸間膜動脈血管床の収縮反応を減少するという報告がある (30)。

魚油をはじめとした研究で、高血圧に対する作用機序は解明が進んでいる。これまでは DHA の供給の形態としてのリン脂質については検討されていない。本報告では投与形態の違いによる作用の差異を示し、作用機序の違いの一部を考察した。

しかしながら、大豆油と大豆リン脂質ではその生理機能に違いがあることと同様、DHA の場合も同じ脂肪酸組成でも投与される脂質クラスによって作用機序が異なることが示唆された。

4 総 括

SHR に魚卵より調製した DHA 濃度が 30% である DHA-PL と 30% DHA を含む DHA-TG を投与した。DHA-TG 投与群と DHA-PL 投与群では対照群に比べ血圧は有意に低下し、血清の DHLnA 及び AA 濃度は DHA-PL 投与群では DHA-TG 投与群及び対照群より有意に低下した。血清の TG, PL, Tcho 濃度は DHA-TG 及び DHA-PL 投与群では対照群に比べ有意に低下した。DHA-PL 投与群の肝臓の Tcho 濃度は DHA-TG 投与群及び対照群に比べ 2 倍高くなった。これらより、血清からのコレステロール除去の作用機序が DHA-PL

投与群と DHA-TG 投与群では異なることが予測された。血中の LPO は 3 群間で有意な差はなく、摂食した DHA や EPA などの高度不飽和脂肪酸は SHR の生体内の抗酸化機構によつての過酸化は抑制された。

本報告では明確な DHA-PL による血圧降下作用の機序は結論付けられなかった。しかしながら、DHA-TG のそれとは差があることが示唆された。

References

1. Fisher, S., von Schacky, C., Siess, W., Strasser, T. & Weber, P. C. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 907-918.
2. Croset, M., Sala, A., Folco, G. & Lagarde, M. (1988) *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 1275-1280.
3. Karanian, J.W., Kim, H.Y., Shingu, T., Yergey, J.A., Yoffe, A. & Salem, N. Jr. (1989) *Biomed. Biochim. Acta*, **47**, S79-S82.
4. Suzuki, M., Asahi, K., Isono, K., Sakurai, A. & Takahashi, N. (1992) *Develop Growth & Differ*, **34**, 301-304.
5. Hashimoto, M., Gong, X., Izaki, Y., Iriki, M. & Hibino, H. (1993) *Neuroscience Letter*, **158**, 29-32.
6. Izaki, Y., Hashimoto, H., Arita, J., Iriki, M. & Hibino, H. (1994) *Neuroscience Letter*, **167**, 171-174.
7. Izaki, Y., Hashimoto, M. & Arita, J. (1999) *Neuroscience Letter*, **260**, 146-148.
8. Corney, E.J., Shih, C. & Cashman, J.R. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3582-3584.
9. Morizawa, K., Tomobe, Y.I., Tsuchida, M., Nakano, Y., Hibino, H. & Tanaka, Y. (2000) *J. Jpn Oil Chem. Soc. (J. Oleo Sci.)*, **49**, 59-65.
10. Tanaka, Y., Tomobe, Y.I., Morizawa, K., Tsuchida, M., Nakano, N. & Hibino, H. (2000) *J. Jpn Oil Chem. Soc. (J. Oleo Sci.)*, **49**, 75-79.
11. Inoue, Y., Kanada, T., Kayama, M., Morizaki, M. & Saito, Y. (1999) *J. Lipid Nut.*, **8**, 120.
12. Takama, K., Suzaki, T., Fukunaga, K. & Suzuki, S., *Seafood Science and Technology*, Bigh E.G., Editor, 1992

- Fishing News Books Oxford London 210.
13. Hayashi, H., Tanaka, Y., Hibino, H., Umeda, Y., Kawamitsu, H., Fujimoto, H. & Amakawa, T. (1999) *Current Medical Research and Opinion*, **15**, 177-184.
 14. Inoue, Y., Misawa, Y. & Kondo, H. (1992) *New Food Industry*, **34**, No.10, 43-48.
 15. Komatsu, I., Yasuda, T., Suzuki, T., Fukunaga, K., Suzuki, S. & Takama, K. (1990) *Bull. Fac. Hokkaido Univ.*, **41**, 232-239.
 16. Komatsu, I., Yasuda, T., Fukunaga, K., Suzuki, T., Suzuki, S. & Takama, K. (1991) *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **38**, 633-639.
 17. Takeuchi, M., Hara, S., Hibino, H., Tanaka, Y. & Totani, Y. (1997) *J. Jpn Oil Chem. Soc. (J. Oleo Sci.)*, **46**, 1489-1494.
 18. Nakajima, S., Suetsuna, K. & Tsuchiya, T. (1994) *Nippon Suisangakkaishi*, **60**, 635-639.
 19. Ikeda, I., Wakamatsu, K., Inayoshi, A., Imaizumi, K., Sugano, M. & Yazawa, K. (1994) *J. Nutr.*, **124**, 1898-1906.
 20. Kimura, T. & Kudo, H. (1968) *Naika*, **21**, 535-543.
 21. Rampone, A.J. & Machida, C.M. (1981) *J. Lipids Res.*, **22**, 744-752.
 22. Folch, J., Lee, M. & Sloane, Stanley, G.H. (1957) *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
 23. Ross, R. (1990) *Nature*, **362**, 801-809.
 24. Paul, R., Ramesha, C.S. & Ganguly, J. (1980) *Adv. Lipid Res.*, **17**, 155-171.
 25. Herold, P.M. & Kinsella, J.E. (1986) *Am. J. Clin. Nutr.*, **43**, 566-598.
 26. Kuroda, K., Kobatake, Y., Nishide, E. & Yamaguchi, M. (1987) *Eiyogakuzasshi*, **45**, 263-274.
 27. Kuroda, K., Hosoyamada, Y. & Kobatake, Y. (1997) *J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci.*, **50**, 25-30.
 28. Shimokawa, H., Lam, J.Y., Chesebro, J.H., Bowie, E.J. & Vanhoutte, P.M. (1987) *Circulation*, **76**, 898-905.
 29. Nakazono, K., Watanabe, N., Matsuno, K., Sasaki, J., Sato, T. & Inoue, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10045-10048.
 30. Chu, Z.M., Yin, K. & Beilin, L.J. (1992) *Clin. Exp. Pharm. Physiol.*, **19**, 177-181.
-