報 文

硬化魚油に関する栄養学的研究 (第4報)

ラットにおけるL-アスコルビン酸生合成及び
ある種の肝酵素活性に及ぼす硬化魚油の影響

岡本 隆久*・知見 憲次*・丸山 武紀*・兼松 弘*・新谷 勲*
志村 光雄**・亀井 正治***・藤田 忠雄***・神戸 保***
佐々木清司***・菅野 道廣****

* 財団法人 日本食品油脂検査協会 (〒103 東京都中央区日本橋浜町 3-27-8)

** 日本マーガリン工業会 (〒103 東京都中央区日本橋浜町 3-27-8)

*** 大阪市立環境科学研究所 (〒543 大阪市天王寺区東上町 8-34)

**** 九州大学農学部 (〒812 福岡市東区箱崎 6-10-1)

Nutritional Studies on Hardened Fish Oil. IV.

Influence of Hardened Fish Oil on Biosynthesis of L-Ascorbic Acid
and Some Hepatic Enzymatic Activities in Rats

Takahisa OKAMOTO*, Kenji CHIMI*, Takenori MARUYAMA*, Hiromu KANEMATSU*, Isao NIHYA*,
Mitsuo SHIMURA**, Masaharu KAMEI***, Tadao FUJITA***, Tamotsu KAMBE***,
Kiyoshi SASAKI***, and Michihiro SUGANO****

* Japan Institute of Oils & Fats, Other Foods Inspection, Foundation
(3-27-8, Nihonbashi-Hamacho, Chuo-ku, Tokyo, 〒103)

** Japan Margarine, Shortening & Lard Industries Ass.
(3-27-8, Nihonbashi-Hamacho, Chuo-ku, Tokyo, 〒103)

*** Osaka City Institute of Public Health and Environmental Science
(8-34, Tojocho, Tennoji-ku, Osaka-shi, 〒534)

**** Kyushu University, School of Agriculture
(6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka-shi, 〒812)

The influence of hardened fish oil (HFO) on the biosynthesis of L-ascorbic acid and certain hepatic enzymatic activities was investigated in the following 2 feeding experiments using male rats (Exp. I, Exp. II). In Exp. I, the animals were fed diets containing 20% HFO, 20% soybean oil (SO) or 5% SO (control) for 56 days, and in Exp. II, diets containing 20% HFO, HFO replaced with 1~10% safflower oil or SO (control) for 28 days. Urinary excretion and concentration of L-ascorbic acid in the liver, kidney and serum and the concentration of cytochrome P-450 and activities of uridine diphosphate glucose dehydrogenase in liver microsomes were measured.

- 1) In Exp. I, temporary increase in liver weight in the HFO group and its resumption with prolonged feeding were confirmed.
- 2) The urinary excretion of L-ascorbic acid in the HFO group markedly increased after 4 and 14 days, but was resumed with prolonged feeding. The liver and kidney levels of L-ascorbic acid also increased, but not those in the serum, suggesting stimulation of L-ascorbate biosynthesis by HFO. This increase was suppressed to some extent by the addition of safflower oil at 3% or more.

- 3) In Exps. I and II, the content of cytochrome P-450 and activity of uridine diphosphate glucose dehydrogenase in liver microsome of the HFO group were somewhat less than those of the SO group, suggesting HFO not to induce these liver microsomal enzymatic activities.

1 緒 言

硬化魚油は、炭素数 18 以外に 16, 20 及び 22 のトランス-不飽和脂肪酸(以下トランス酸)を含むため、わが国では植物硬化油よりむしろ優れた物理的特性を持つ油脂として多種多様の食品に広く使用されている。しかし、トランス酸は相当するシス酸とは異なる生物学的性質を示す^{1), 2)}ことから、硬化魚油の栄養・生理的影響については、その生産に携わる者は充分把握しておく必要がある。

以上の観点から、さきにラットの成長及び組織脂質組成に及ぼす硬化魚油の影響を大豆油及びその硬化油と比較³⁾し、ついでリノール酸源としてのサフラワー油添加の影響^{4), 5)}について検討した。その結果、硬化魚油の摂取による不利な影響はとくに認められなかったが、必須脂肪酸の欠乏により体重増加率の低下や、肝臓脂質中のアラキドン酸(20:4 n-6)の減少がみられた。しかし、これらはいずれもサフラワー油添加で回復し、そして硬化魚油摂取による必須脂肪酸欠乏の解消に最低限必要でかつ物理的性質には影響しない水準はサフラワー油として3%であることを明らかにした。

一方、硬化魚油の摂取はラット肝臓の相対重量の軽度な一時的増大の原因となることを見いだした³⁾が、これは3%以上のサフラワー油添加で改善される⁵⁾ことが示された。必須脂肪酸欠乏及び必須脂肪酸・ビタミンE欠乏のラットで相対肝臓重量の増大とともに肝ミクロソームのシトクロム P-450 活性の減少が報告⁶⁾され、また PCB, アミノピリンなどの投与による尿中及び組織中の L-アスコルビン酸の増加及び uridine-diphosphate (UDP) glucose 脱水素酵素活性の増大が報告⁷⁾され、これは薬・毒物投与で L-アスコルビン酸の生合成が刺激されることによるとされた。また、その生合成を刺激する一因に物理的ストレス⁸⁾も示唆されている。

そこで、本報では硬化魚油及び大豆油を含む飼料で飼育したラットを用いて、硬化魚油摂取による L-アスコルビン酸生合成及びある種の肝臓酵素活性に及ぼす影響を検討し、併せてその影響に対するリノール酸補給の効果を、低水準のサフラワー油を加えた硬化魚油を含む飼料で飼育したラットを用いて検討したので報告する。

2 実 験

2.1 実験動物及び飼育方法

前報：油化学, 37, 717 (1988)

実験動物 (S.D. 系雄ラット)、試験飼料の基本組成(牛乳カゼイン 20, 油脂 20, とうもろこしデンプン 33, ショ糖 20.4, 粉末セルロース 2, ビタミン混合 1, 塩混合 3.5, 塩化コリン 0.1%), 飼育方法及び動物の処理方法は基本的に前報⁵⁾と同じである。ただし、本報では次の 2通りの条件で 1 匹ずつ代謝ケージ (15×18×24 cm) に入れて飼育したラットを使用した。すなわち実験 I では、融点 34℃ の硬化魚油 (HFO) 及び精製大豆油 (SO) をそれぞれ基本組成どおり 20% 含有する高脂肪飼料と、対照飼料として SO を一般的水準⁹⁾の 5% とし、その分とうもろこしデンプンを 48% に増量した飼料を使用した。この 3 種の飼料で 5 日及び 56 日間飼育したラットから肝臓を摘出した。飼育開始後 4, 14, 24, 34 及び 44 日目にそれぞれ 1 日分の尿を採取した。実験 II では、飼料への油脂添加量を 20% とし、油脂には HFO 及びその 1~10% をサフラワー油で置き換えたもの (1~10% S/F) 並びに対照として 20% SO を使用した。これら 6 群から 5 日間及び 28 日間飼育後に採血したのち肝臓、じん臓を摘出した。飼育開始後 4 日, 14 日及び 25 日目に尿を採取した。なお、使用した HFO の脂肪酸組成は飽和酸: 40.5, シス-モノ不飽和酸: 22.3, トランス-モノ不飽和酸: 21.4 (16:1:4.3, 18:1:8.4, 20:1:5.1, 22:1:3.6%), その他 16.8% である。また、さきに HFO 群で相対肝臓重量の一時的増大³⁾が認められたので、短期飼育による影響を調べるために 5 日間の飼育期間を設定した。

2.2 分析方法

飼育中のラットの体重及び飼料摂取量並びに肝臓重量は前報⁵⁾と同様に測定した。

尿は採取直後に 10% メタリン酸を加え、肝臓及びじん臓は細かく切り、その一部に 10% メタリン酸を加えてホモジナイズし、遠心分離して得た上澄み液を検液とし、ジニトロフェニルヒドラジン法⁷⁾で L-アスコルビン酸を定量した。また、血清の場合は分離直後に 10% メタリン酸を加え、10% トリクロロ酢酸で除タンパクしたのち、高速液体クロマトグラフィーで定量した。その条件は、カラム: Fine SIL C 18, 4.6×250 mm; 移動相: 1% リン酸, 0.8 mL/min; 検出器: 紫外部分光度計 (254 nm) である。

シトクロム P-450 は Eastbrook らの方法¹⁰⁾で定量した。すなわち氷冷した 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.6; 10⁻³ M EDTA を含む) を用いて 25% 肝臓ホモジネートを調製し、10,000×g, 30 min 遠心分離して得た上澄

み液について測定した。また、UDP glucose 脱水素酵素活性は Strominger らの方法⁷⁾で測定した。すなわち、氷冷した 0.15 M 塩化カリウム液を用いて 25% 肝臓ホモジネートを調製し、10,000×g, 10 min 遠心分離し、その上澄み液を酵素液として測定した。

2・3 統計処理法

結果は、一元配置分散分析を行ったのち、t-検定により有意差検定を行った。

3 結果及び考察

3・1 実験 I におけるラットの体重増加と肝臓重量

実験 I で 56 日間飼育したラットの体重増加量と飼料摂取量を Table-1 に示す。対照群と比較すると、HFO 群の体重増加量及び飼料摂取量はいずれも有意に低いことを示したが、飼料効率（体重増加量/飼料摂取量）では両群間にはほとんど差はなかった。一方、SO 群の場合は飼料摂取量は有意に低いが、体重増加量がむしろやや高いことから、飼料効率では対照群より有意に高かった。

これら 3 群の 5 日間及び 56 日間飼育時における肝臓重量を Table-2 に示す。HFO 群の相対肝臓重量は、5

日後では対照群より有意に高かったが、56 日後では、有意差がなかった。SO 群の場合は 5 日後及び 56 日後とも対照群と有意差が認められなかった。このことは前報³⁾の観察と一致した。必須脂肪酸欠乏のラットにおいて相対肝臓重量の増大傾向が報告⁶⁾されていることから、HFO 食の必須脂肪酸欠乏が原因の一つと推察される。

3・2 実験 I における L-アスコルビン酸の尿中排泄量及び肝ミクロソームのシトクロム P-450

56 日間の飼育中にラットから尿中に排泄された L-アスコルビン酸量の経日変化を Fig.-1 に示す。対照群と比較して、HFO 群の尿中 L-アスコルビン酸排泄量は飼育 4 日目で明らかに高く、14 日目でさらに著しく増加したのち、24 日目になると約半減し、以後漸減して 44 日目で他の 2 群と有意差がみられなくなった。一方、SO 群の場合は全飼育期間を通してあまり大きな変化を示さず、対照群と有意差は認められなかった。HFO 群において、L-アスコルビン酸の生合成が刺激されて尿中排泄量が一時的に増加するが、飼育期間延長とともに正常に戻る現象は、上述の相対肝臓重量の変化

Table-1 Effects of 20% hardened fish oil or soybean oil on body weight gain and food intake of rats during feeding for 56 d.

Group	Body weight gain (g)	Food intake (g)	food efficiency (weight gain / food intake)
Control	296±16	919±45	0.322±0.005
SO	308±32	806±53 ^a	0.382±0.020 ^a
HFO	254±16 ^a	787±21 ^a	0.324±0.014

Indicated as mean±SD of 5 rats per group.

a : Significantly different from the control group ($p<0.05$).

Control : 5% soybean oil diet.

SO : 20% soybean oil diet.

HFO : 20% hardened fish oil diet.

Fig.-1 Effects of 20% hardened fish oil or soybean oil on urinary excretion of L-ascorbic acid in rats.

Table-2 Effects of 20% hardened fish oil or soybean oil on the liver weight of rats.

Group	At 5 d			At 56 d		
	Body weight (g)	Liver		Body weight (g)	Liver	
		Weight (g)	Relative weight (g/100 g body weight)		Weight (g)	Relative weight (g/100 g body weight)
Control	118±3	6.63±0.16	5.61±0.19	373±18	19.5±1.6	5.23±0.38
SO	116±8	6.26±0.61	5.37±0.27	386±36	18.8±1.6	4.79±0.31
HFO	115±3	8.03±0.36 ^a	6.97±0.23 ^a	328±16 ^a	18.6±0.7	5.66±0.19

Indicated as mean±SD of 5 rats per group.

a : Significantly different from the control group ($p<0.05$).
for abbreviations, see Table-1.

Table-3 Effects of 20% hardened fish oil or soybean oil on liver microsomal cytochrome P-450 in rats. (nmol/mg protein)

Group	At 5 d	At 56 d
Control	0.27±0.05	0.33±0.04
SO	0.34±0.05	0.35±0.07
HFO	0.30±0.07	0.37±0.03

Indicated as mean±SD of 5 rats per group.

For abbreviations, see Table-1.

にほぼ対応することから両現象は密接に関連するものと考えられる。しかしその刺激は飼育期間延長に伴う順応により軽減されるため、排せつ量が減少し、正常値に戻ったと推察される。

ついで、5日間及び56日間飼育時におけるミクロソーム中のシトクロム P-450 量を Table-3 に示す。5日間及び56日間飼育とも多少の相異はみられるが3群間に有意差は認められなかった。シトクロム P-450 は肝ミクロソームの薬物代謝において末端の酸化酵素に関連するヘムタンパク質の1種¹⁰⁾であり、その複合体活性が必須脂肪酸欠乏及び必須脂肪酸・ビタミンE欠乏の飼料で6か月間飼育したラットでグルタチオンペルオキシダーゼ活性に平行して低下すると報告⁹⁾されている。本報の HFO 群も必須脂肪酸欠乏^{3), 4)}であるが、シトクロム P-450 自体の量で比較したため対照群と有意差が認められなかったものであろう。

3・3 実験Ⅱにおける L-アスコルビン酸の尿中排せつ量及び組織中含量

実験Ⅱにおいて、HFO 及びその一部 (1~10%) をサフラワー油で置き換えた油脂で飼育したラットの尿中 L-アスコルビン酸排せつ量の経日変化を SO 群と比較して Table-4 に示す。実験Ⅰと同様に、HFO 群の尿中排せつ量は飼育4日目では SO 群より著しく高く、14日目ではさらに増加したのち急減し、25日目では4日目より低くなった。HFO の一部をサフラワー油で置き換えた場合の経日変化はほぼ類似するが、サフラワー油の添加量が増すほど尿中 L-アスコルビン酸排せつ量は低くなる傾向がみられ、とくに4日目では3%以上の添加群が HFO 群より有意に低かった。また25日目の排せつ量で SO 群が他群より有意に低いことから、前報³⁾の相対肝臓重量の場合と同様に、HFO 摂取による L-アスコルビン酸の尿中排せつ量増大は56日間摂取で回復するが、28日間ではいまだ影響が残ること、そしてその影響は必須脂肪酸欠乏の解消に必要な低水準のリノール酸補給である程度改善されると推測される。従って、必須脂肪酸欠乏が一時的な L-アスコルビン酸生合成への刺激の一因と考えられる。

L-アスコルビン酸の尿中排せつ量に関連して、5日

Table-4 Effects of low levels of linoleate supplementation as safflower oil to hardened fish oil on urinary excretion of L-ascorbic acid in rats.

(μ g/100 g body weight·d)

Group	Feeding periods (d)		
	4	14	25
HFO	551±64 ^A	667±127 ^A	377±104 ^{ACa b}
1% S/F	492±57 ^A	665±159 ^A	406±124 ^{Ab}
3% S/F	361±51 ^B	556±123 ^{ABa}	331±67 ^{ACb}
5% S/F	357±84 ^B	527±199 ^{ABa}	317±57 ^{ACb}
10% S/F	304±26 ^B	439±122 ^B	240±96 ^{Cb}
SO	174±14 ^C	130±40 ^{Ca}	99.1±13.8 ^{Bab}

Indicated as mean±SD of 5 rats per group.

A~C: Values in the same column not bearing same superscript letter are significantly different ($p<0.05$).

a: Significantly different from the value for 4 d-feeding ($p<0.05$).

b: Significantly different from the value for 14 d-feeding ($p<0.05$).

(1~10)% S/F: 20% HFO, replaced 1(or 3,5,10)% safflower oil diets.

For abbreviations, see Table-1.

間及び28日間飼育時における肝臓、じん臓及び血清中の L-アスコルビン酸含量を Table-5 に示す。肝臓では、各群とも28日後の L-アスコルビン酸含量は5日後より有意に増加したが、5日及び28日後とも HFO へのサフラワー油添加量が増すほど L-アスコルビン酸含量は減少する傾向がみられ、その傾向は28日後でより明確となった。じん臓の場合もほぼ同様の傾向がみられた。一方、血清の場合は、飼育期間延長により増加した。また、HFO にサフラワー油を添加するとむしろ高くなる例があったが添加量との関連がなく、全体として明確な影響を示さなかった。しかし、いずれの場合も SO 群の L-アスコルビン酸含量がもっとも低かった。これは尿中排せつ量の場合と同様 L-アスコルビン酸生合成が刺激されたためであろう。しかし、組織中の L-アスコルビン酸はある程度保持されるので、その含量は尿中排せつ量の経時的減少に対応しないようであり、そのため、5日後より28日後のほうが有意に高かったと思われる。また、HFO 摂取に伴う肝臓、じん臓の L-アスコルビン酸含量の増加がサフラワー油添加量に応じて軽減される傾向を示したのは、前述の尿中排せつ量の場合と同傾向の応答であった。しかし、血清の場合は、変動が大きいため低水準のリノール酸補給による変化を検出できなかった。

Table-5 Effects of low levels of linoleate supplementation as safflower oil to hardened fish oil on levels of L-ascorbic acid in tissues of rats.

Group	Liver ($\mu\text{g/g}$)		Kidney ($\mu\text{g/g}$)		Serum ($\mu\text{g/mL}$)	
	At 5 d	At 28 d	At 5 d	At 28 d	At 5 d	At 28 d
HFO	161 $\pm$ 31 ^A	229 $\pm$ 14 ^{Aa}	87.6 $\pm$ 6.1 ^A	148 $\pm$ 10 ^{Aa}	3.44 $\pm$ 0.24 ^{AB}	8.56 $\pm$ 2.41 ^{ACa}
1% S/F	148 $\pm$ 17 ^A	190 $\pm$ 33 ^{Ba}	90.6 $\pm$ 17.7 ^A	144 $\pm$ 6 ^{Aa}	3.54 $\pm$ 0.77 ^{AB}	9.69 $\pm$ 1.74 ^{Aa}
3% S/F	134 $\pm$ 8 ^{AD}	149 $\pm$ 12 ^{Ca}	80.6 $\pm$ 4.5 ^A	126 $\pm$ 10 ^{Ba}	3.53 $\pm$ 0.92 ^{AB}	12.7 $\pm$ 1.0 ^{Ba}
5% S/F	111 $\pm$ 23 ^{DE}	140 $\pm$ 11 ^{Ca}	77.6 $\pm$ 8.3 ^{AD}	105 $\pm$ 12 ^{Ca}	3.96 $\pm$ 0.48 ^{AB}	8.30 $\pm$ 1.61 ^{ACa}
10% S/F	91.9 $\pm$ 13.8 ^{CE}	117 $\pm$ 9 ^{Da}	73.3 $\pm$ 13.8 ^{AC}	79.9 $\pm$ 15.6 ^D	4.04 $\pm$ 0.72 ^A	10.9 $\pm$ 2.5 ^{ABa}
SO	80.4 $\pm$ 11.0 ^{BC}	111 $\pm$ 7 ^{Da}	64.2 $\pm$ 4.2 ^{BC}	69.2 $\pm$ 8.1 ^D	2.83 $\pm$ 0.55 ^B	7.62 $\pm$ 0.9 ^{Ca}

Indicated as mean $\pm$ SD of rats per group.

A~E : Values in the same column not bearing same superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

a : Significantly different from the value for 5 d-feeding ($p < 0.05$).

For abbreviations, see Tables-1 and 4.

3・4 実験Ⅱにおける肝ミクロソーム中の

UDP glucose 脱水素酵素活性

5日間及び28日間飼育時における肝ミクロソーム中のUDP glucose 脱水素酵素活性の結果をTable-6に示す。なお酵素活性はこの酵素作用に伴って生成したNADHの μ モル数を酵素液中のタンパク質1mg当たりで表した。5日後の酵素活性は、HFO群がもっとも低く、サフラワー油の添加でわずかに高くなり、SO群がもっとも高い値を示したが、各群間に有意差は認められなかった。28日後での酵素活性は各群とも5日後より多少低下し、SO群が1% S/F群以外の各群より高い傾向はあるが、サフラワー油添加量との関連性は明確とはいえない。この酵素はL-アスコルビン酸生成経路に属し、UDP glucoseのglucuronic acidへの酸化を触媒するが、PCBなどの投与実験において肝臓の酵素活性とL-アスコルビン酸量との間の相関関係⁷⁾が報告されている。しかし、本報ではHFO群の酵素活性が対照のSO群よりむしろ低かったことから、ラットのL-アスコルビン酸生成系においてHFO摂取により刺激を受ける経路はPCBなどの薬・毒物のそれとは異なるように思われる。(昭和63年6月15日受理)

文 献

- 1) L. Boothby, *Confect. Prod.*, 1983 Aug., 411
- 2) M.T. Juillet, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, 80, 445 (1978)
- 3) 岡本隆久, 知見憲次, 丸山武紀, 兼松 弘, 新谷 助, 志村光雄, 亀井正治, 藤田忠雄, 神戸 保, 佐々木清司, 菅野道廣, 油化学, 37, 177 (1988)
- 4) 岡本隆久, 知見憲次, 丸山武紀, 兼松 弘, 新谷 助, 志村光雄, 亀井正治, 藤田忠雄, 神戸 保, 佐々木清司, 菅野道廣, 油化学, 37, 255 (1988)
- 5) 岡本隆久, 知見憲次, 丸山武紀, 兼松 弘, 新谷 助, 志村光雄, 亀井正治, 藤田忠雄, 神戸 保, 佐々木清司,

Table-6 Effects of low levels of linoleate supplementation as safflower oil to hardened fish oil on activities of liver microsomal UDP-glucose dehydrogenase in rats.

Group	UDP-glucose dehydrogenase activity (μmol of NADH produced /min $\cdot$ mg protein)	
	At 5 d	At 28 d
HFO	39.3 $\pm$ 6.5	32.5 $\pm$ 2.1 ^{AB}
1% S/F	39.9 $\pm$ 4.6	38.5 $\pm$ 5.9 ^A
3% S/F	41.7 $\pm$ 3.8	32.2 $\pm$ 5.4 ^{ABa}
5% S/F	41.1 $\pm$ 5.8	33.6 $\pm$ 4.8 ^{AB}
10% S/F	41.1 $\pm$ 4.0	30.4 $\pm$ 2.7 ^{Ba}
SO	42.2 $\pm$ 5.8	37.2 $\pm$ 5.1 ^A

UDP : Uridine diphosphate.

Indicated as mean $\pm$ SD of 5 rats per group.

A, B : Values in the same column not bearing same superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

a : Significantly different from the value for 5 d-feeding ($p < 0.05$).

For abbreviations, see Tables-1 and 4.

菅野道廣, 油化学, 37, 717 (1988)

- 6) G.E. Jensen, J. Clausen, *Lipids*, 16, 137 (1981)
- 7) F. Horio, A. Yoshida, *J. Nutr.*, 112, 416 (1982)
- 8) N. Subramanian, B.K. Nandi, A.K. Majumder, I.B. Chatterjee, *Biochem. Pharmacol.*, 23, 637 (1974)
- 9) 藤井壽子, 小山良修, “改定6版動物実験手法”, 協同医学出版, 東京(1975) p. 20
- 10) 麻生芳郎, 大森義仁監修, “新しい薬物代謝-生体内運動と実験のすべて”, 広川書店, 東京(1974) p. 542