食餌によって起る肝腎障碍への抗脂肝物質特に コリンの影響について (I)

The Effect of Lipotropic Substances Especially Choline on Liver Kidney Disease Produced by Diet (I)

酸敗油の毒性に対するコリンの効果 The Effect of Choline on the Toxicity of Rancid Oil.

(昭和 33 年 9 月 6 日受理)

苔 米 地 孝 之 助
(Konosuke Tomabechi)

Rancid oil, either cod liver oil or soybean oil, produced slight fatty liver, lipid nephrosis of kidney, growth inhibition, and death on the rat. Choline had the therapeutic effect on the toxic symptoms induced by this oil especially on the kidney damage, but B₁₂, methionine and tocopherol were less effective. Survivals of this rancid oil experiments could recover from its toxic symptoms for 3 or 4 months after the experiments.

酸敗油の毒性については種々報告されており、その本体は脂質過酸化物とも、又重合物によるともいわれている。例えば金田¹⁻³⁾は高度不飽和酸のエチルエステルでも酸化せられざるものは全く毒性を認めないのに反し、酸化せるものでは、その過酸化物価の高いもの程毒性が強く、実験動物は何れも体重の減少、脱毛、遂には斃死すると報告している。これに対し Kaunitz⁴⁾らは長時間加熱通気したものでは過酸化物価は却つて減少するが毒性は強くなるとし Crampton⁵⁻⁸⁾らの述べている如く、その本体は重合物であるとしている。

著者は偶々自然酸敗した肝油を用いて飼育したラットの肝臓に脂肪沈着の著しいことを認め、これにコリンを投与したところコリンは酸敗油によつて発生した脂肪肝を軽減せしめるのみならず、その他の毒性症状則ち腎臓の中毒性変化、成長阻碍に対しても効果のあることを認めた。

実 験

実験動物はすべて同腹のラットを用い。これに自然酸敗或は通気加熱により酸化した肝油又は大豆油を適当量混合して与え成長状態を観察し、肝、腎等の臓器の重量、肝脂質量及びその組織学的検索、時に応じて肝蛋白、質量、肝脂過酸化物価、血清コレステロール量、血糖、血清 al-Pase、血清 V.C. 量、副腎 V.C. 量等を調べた。

測定法は肝脂質量は肝臓を乾燥粉末にした後 Soxhlet 法により、同じく蛋白質は Kjeldahl 法により肝脂過酸

化物価は Jessen ら⁹⁾の方法により脂質部分を抽出した後 Wheeler 法を改良した中村氏変法¹⁰⁾を用いて測定した。又血清コレステロールは Bloor 法¹¹⁾、血糖は Somogyi 法¹²⁾、血清 al-Pase は Bessey 法¹³⁾、V.C. は高橋氏法¹⁴⁾¹⁵⁾肝、腎の組織学的所見は Sudan III による脂肪染色を用いた。

実 験 I.

離乳前後 2 週間目頃から親鼠の飼料中に酸敗肝油を 2% の割に加え離乳後体重 30 g 位から、これを 2 群に別け 1 群には 1 匹当り塩化コリン 20 mg を毎日経口投与し、他群を対照として 12—19 日間飼育した。この際用いた肝油は自然酸化したもので過酸化物価は 212 (脂質 100 g 中の酸素 mg) 大豆油は 4、飼料 100 g 中の過酸化物価は 4.46 mg であった。

離乳前後の食餌組成は次の通り、

離 乳 前

粉 乳 20% カゼイン 12 大豆油 8

肝 油 2 エビオス 4 無機塩 4

(無機塩は Jones-Foster の混合塩¹⁶⁾を用いた。)

離 乳 後

カゼイン 18% 大豆油 8 肝 油 2

無機塩 4 澱粉にて 100% とする。

飼料 100 g 当り

B₁ 0.5 mg B₂ 0.8 mg,

B₆ 0.5 mg,

ビタミン

パントテン酸 4 mg,

ニコチン酸 4 mg, V.A. 100 I.U.
(を加う。)

実験結果は表 I, 図 I に示す通りで対照群は5匹中1匹が途中で死亡, 他の4匹も何れも実験初期に成長の停止又は減退が見られた。これに反しコリン投与群は良好に発育し, 初期の成長阻害はコリンにより防止されることが判明した。

表 I.

No.	肝重量		肝重量 / 体重	肝脂質	肝蛋白質	腎変化
	(g)	(%)	(乾燥 重量%)	(乾燥 重量%)	(肉眼的 所見)	
対 照 群	1	3.75	8.33	12	75	+
	2	3.84	8.00	15	67	+
	3	4.25	7.73	11	79	—
	4	実験開始後 8 日目に死亡				
	5	4.15	5.46	16	66	+
平均		4.00	7.38	14	72	75%
コ リ ン 群	6	3.01	4.93	7	74	—
	7	3.32	5.27	7	74	—
	8	3.56	5.65	9	72	—
	9	5.35	6.08	6	69	—
	10	5.17	6.46	6	74	—
平均		4.08	5.68	7	73	0%

図 I.

体重に対する肝臓の重量比は対照群の方が高く肝臓肥大を思わせ, 又脂質量も増加していた。腎臓は肉眼的に表面粗造凹凸があり, ところどころに白色の小さな斑点も見られ明らかに障害を蒙っていることが判った。組織学的所見としては肝臓の中心部近くに Sudan IV で染まる脂肪沈着が著しく, 中心静脈は少々拡大し, 多少肝細胞の排列の乱れが認められた。腎臓では主に細尿管特に糸球体に近い部分の上皮細胞基底部における脂肪沈

着, 細胞の混濁腫脹, 尿細管腔及び Bow man 氏嚢内への albumin の脱出があり, 中毒性の lipid nephrosis の状態を思わしめた。コリン投与群では肝中脂質量が全体的に少くなると共に中心部には全然見られず, 多少周辺部に残存しているのみであり, 又腎臓にも細尿管部に僅かの変化が認められるのみで組織学的変化からも両者に明瞭な差があることが見出された。

実験 II.

人工的に酸化した油でも自然酸敗のものと同様な毒性を有するか否かを確かめるべく, 新鮮な肝油を室温にて約 40 時間通気し過酸化価を 68 とし, これを 5% の割に飼料に加えてみた。結果は図, 表とも省略するが実験 I と略々同様で通気油の毒性も自然酸敗油の場合と同じ様にコリンにより軽減され得た。

実験 III.

前述の肝油を更に 80°C 16 時間加熱通気し, 過酸化価が 102 になったところで 120°C の乾燥器内に入れて加熱重合させ過酸化価が 54 に下つたものを飼料に 3% 加えた。その結果は表 II に示す通り肝, 腎, 脾, 胸腺, 副腎の各臓器重量比, 肝脂質量に何ら異常を認めず,

表 II.

No.	肝臓	腎臓	脾臓	副腎	胸腺	肝脂質	腎変化
	(体重に対する重量%)					(乾燥 重量 %)	(肉眼的 所見)
対 照 群	1	5.80	0.93	0.22	0.023	0.29	11 —
	2	4.91	0.93	0.25	0.016	0.40	9 —
	3	4.06	0.94	0.23	0.023	0.41	14 —
	平均	4.92	0.93	0.23	0.021	0.37	11 0%
メ チ オ ニ ン 群	4	4.76	0.98	0.25	0.020	0.40	12 —
	5	5.12	0.93	0.22	0.023	0.38	10 —
	6	4.97	0.93	0.23	0.020	0.35	10 —
	平均	4.95	0.95	0.23	0.021	0.38	11 0%
B ₁₂ 群	7	4.58	0.89	0.23	0.014	0.43	12 —
	8	4.28	—	0.21	0.022	0.38	12 —
	平均	4.43	0.89	0.22	0.018	0.41	12 0%

又成長, 肝腎の組織学的所見にも変化はなかつた。対照群の他に B₁₂ 群 (2γ), メチオニン群 (20 mg) を作ったが, これも対照群との間に全く差はなかつた。重合が毒性を現わす場合は重合の程度が問題になると思われるが, この実験では, その程度が軽かつた為であろうが重合物による毒性を証明することは出来なかつた。

実験 IV.

今迄の実験はすべて肝油を用いて行つたが, 植物油でも同様ではないかと考え, 今度は大豆油を用いてみた。

即ち新鮮な大豆油を 80°C, 18 時間通気加熱し, 過酸化
 物価を 75 にしたものを 14% 加えた。飼料 100 g 中の過
 酸化物価は 10,50 mg, 飼料組成は下記の通りである。

カゼイン 18% 大豆油 14% 無機塩 4%

澱粉にて 100% とす ビタミン 実験 I と同じ

結果 (第 III 表) は肝油の場合と全く同様であつたが,
 その症状は実験 I の場合より遙かに強く肝臓では重量比

表 III.

	No.	肝	臓	腎	臓	脾	臓	副	腎	胸	腺	肝脂肪
		体 重 に 対 す る 重 量 %										乾燥 重量 (%)
対 照 群	1	7.32	1.01	0.31	0.022	0.17	23					
	2	5.81	0.97	0.32	0.023	0.11	16					
	3	6.37	1.00	0.34	0.027	0.16	20					
	平均	6.50	0.99	0.32	0.024	0.15	20					
コ リ ン 群	4	5.09	0.91	0.26	0.026	0.25	13					
	5	4.83	0.91	0.28	0.024	0.17	15					
	6	4.11	0.89	0.34	0.027	0.19	18					
	平均	4.68	0.90	0.29	0.026	0.20	15					
B ₁₂ 群	7	実験開始後 16 日目に死亡										
	8	4.47	0.89	0.34	0.025	0.24	17					
V. E. 群	9	5.82	0.86	0.28	0.024	0.23	16					
	10	4.40	0.88	0.41	0.028	0.32	22					
	平均	5.11	0.87	0.35	0.026	0.28	19					
	No.	血 糖 (mg/dl)	血清コ レステ ロール (mg/dl)	血 清 al-Pa- se (mM)	血 清 V. C. (mg/dl)	副 腎 V. C. (mg)	腎変化 (肉眼的 変化)					
対 照 群	1	114	175	5.1	0.48	0.055	—					
	2	79	154	13.1	0.41	0.046	+					
	3	114	175	8.4		0.052	+					
	平均	102	168	8.9	0.45	0.051	67%					
コ リ ン 群	4	129	199	7.4	0.56	0.061	—					
	5	77	151	10.0	0.23	0.048	—					
	6	117	151	8.7	0.42	0.064	—					
	平均	108	167	8.7			0%					
B ₁₂ 群	7	実験開始後16日目に死亡										
	8	120	180	14.4	0.57	0.042	+					
V. E. 群	9	111	225	7.1	0.27	0.051	—					
	10	126	162	5.0	0.68	0.069	+					
	平均	119	194	6.1	0.48	0.060	50%					

の増加, 脂肪の増量があり, 腎臓は重量比の増加, 著しい肉眼的所見の外に腎臓周囲にも炎症が波及し右腎が肝臓と癒着しているものもあり, 又胸腺の萎縮が認められた。組織学的所見も実験 I と同様で肝臓の中心性脂肪沈着, 腎臓の lipid nephrosis が, その主なものであつた。(写真 1. 2.) これに対し, コリン投与群 1 匹当り (塩化コリン 20 mg) では全例において腎臓に変化は全く見られず, その他も正常であつたが唯肝脂質量が幾分増加している例も見られた。併し組織学的な検索では何れも肝の中心部からは脂肪が消失しており, 対照群との間に明瞭な差があつた (写真 3.) B₁₂ 群 (2γ), V. E 群 (20 mg) は例数は少いがやはり腎臓に幾分変化が認められ, コリンよりも劣っている様に思われる。

写 真

(1)

対照群の肝臓

(が著明である
中心性脂肪沈着像)

(2)

対照群の腎臓

(沈着している
細尿管上皮に脂肪が)

(3)

コリン投与群の肝臓

(ほとんど脂肪が消失し)

なお, 肝, 腎, 副腎, 等の機能を調べるべく行つた血清コレステロール, 血糖, 血清 al-Pase, 血清及び副腎中の V. C. 含量は例数の少いこともあるが 4 群の間に著しい差は認められなかつた。

実験 V.

肝油にしろ大豆油にしろ更に角酸敗した油はラットの

肝腎に障害を与え、これはコリンにより予防されるがコリンの投与量を増した時は、更に、その効果が顕著になるか否かを確かめるべく今回は投与コリン量を 20 mg 及び 100 mg の 2 種にしてみた。使用した油は実験 IV と略々同様にして作った過酸化物質 93 の大豆油で飼料中に 10% 加えた。

飼料中の過酸化物質は実験 IV と大差がないにも拘らず 4 匹の対照群中 3 匹迄は何れも実験開始後 5 日目に強き腎臓の結果死亡し生き残つたものも成長は全くとまり、肝、腎、その他に顕著な変化を呈していた(第 IV 表第 II 図)。コリン投与群はコリン量の如何に拘らず、すべて正常に発育し又腎臓にも変化は見られなかつたが、肝脂質量は 100 mg を与えたものでもかなり増加しているものもあり、コリン投与量の差による予防効果は余り明瞭で

表 IV.

	No.	肝臓	腎臓	脾臓	副腎	胸腺	肝脂質	肝脂質過酸化物価	
		(体重に対する重量%)						(乾燥重量%)	(mg/100g)
対照群	1	{ 実験開始後5日目に死亡							
	2								
	3								
	4	11.71	1.77	0.56	0.063	0.05	27	147	
コリン群 (20 mg)	5	5.05	1.06	0.47	0.029	0.32	11	527	
	6	4.64	0.94	0.35	0.026	0.33	16	60	
	7	5.35	0.83	0.27	0.021	0.27	16	196	
	8	4.29	0.89	0.29	0.023	0.28	16	25	
	平均	4.83	0.93	0.35	0.025	0.30	15	202	
コリン群 (100 mg)	9	4.91	0.99	0.39	0.025	0.28	14	42	
	10	5.17	0.93	0.25	0.027	0.24	20	267	
	11	5.72	1.06	0.22	—	0.25	8	40	
	平均	5.27	0.99	0.29	0.026	0.26	14	116	

表 V.

	No.	実験期間 (日)	肝	臓	腎	臓	脾	臓	胸	腺	副	腎	肝	脂	質	肝脂過酸 化 物 価	血清コレ ステロール
			(体 重 に 対 す る 重 量 %)										(乾燥重量 %)	(mg/100g)	(mg/dl)		
対 照 群	1	1— 30	11.71		1.77		0.56		0.05		0.063		27		147	—	
	2	30— 60	4.90		0.76		0.32		0.20		0.019		10		751	133	
	3	60— 90	4.10		0.91		0.39		0.19		0.022		12		171	132	
	4	90—120	4.07		0.89		0.47		0.21		0.027		12		2	166	
コ ッ ン 群	5	1— 30	4.83		0.93		0.35		0.30		0.025		15		202	—	
	6	30— 60	5.24		0.94		0.56		0.24		0.033		11		442	207	
	7	60— 90	4.26		0.88		0.35		0.18		0.017		7		17	297	
	8	90—120	3.82		0.82		0.39		0.13		0.027		11		0	183	

図 II.

はなかつた。即ちこの実験からコリンの作用は酸敗油による腎臓に最も有効であり、その量は 1 匹当たり 20mg で充分でそれ以上ふやしても効果の増大は期待し得ないと考えられる。

実験 VI.

実験 V と同様の飼料で飼育した対照群中生き残つたものをコリン投与群 (20 mg) と比較しながら約 1 カ月毎の変化を肝、腎の状態を主にして観察し、酸敗油の毒性が長期間に亘つて如何に持続するかを調べてみた。

実験開始後 2 カ月目位になると既に臓器の変化は殆んど見られなくなり、唯僅かに肝脂質中の過酸化物質が異常に高く、これが 3 カ月目迄続き、この時期迄過酸化物の処理が充分でないことを暗示している程度にしか過ぎなかつた。(表 V) コリン群でも肝脂過酸化物質は 2 カ月目には稍々高かつたが対照群より早く 3 カ月目には旧に復している。併し、血清コレステロール値は却つて対照群より高く、特に 2 ~ 3 カ月目が顕著であつたことは注目に値する。何れにせよラットは酸敗油というスト

レスに対し、適応性を持つており、その毒性により一時的に障害を蒙ることはあつても、又完全に正常に復する能力があると想像される。

考 察

コリンが何故酸敗油の毒性を防ぐことが出来るかという問題は、その毒性の本体とも関連して興味あることである。コリンは酸敗油によつて惹起された肝中の脂肪蓄積を防止するが実験 IV V でも見られる様にコリン群の中でも肝脂質量のかかなり多いものもあり、その作用は肝小葉中心部からの脂肪沈着を除くという点のみに限定されている様である。これに対し腎臓の変化はコリン欠乏症状の際に見られる lipid nephrosis のそれに極めてよく似ており、コリンの効果も顯著でコリンを投与したものでは腎臓に肉眼的変化を生じたものは一例もなく、腎臓に起因すると思われる死亡、生長阻害等もコリン投与により防止し得る。

コリンの作用は酸敗油の毒性の本体が過酸化物式は重合物であると考えたと首肯し得ない点がある。例えば実験 IV と V とを比べると V の方が飼料中の過酸化物量は IV に比して少いにも拘らず、腎臓による死亡率が高い。勿論、これは実験動物の個体差、食餌摂取量の差によつて毒性物質の吸収量等に違いがあることも考えられるが、その外にもコリン群でも肝脂の過酸化物価は対照群に比して、それ程減少していることはなく、コリン量を増しても余り変りがないなどコリンの効果に比してコリンと肝脂過酸化物価との間に余り関係がない様に見える点などである。

重合物の場合は、その程度を測定する適当な方法がない為はつきりしたことは分らないが、実験 II の場合はわざわざ重合させたにも拘らず何ら変化を認めないのに反し、その他の実験ではすべて腎臓に強い変化を来し死亡するものもあるなど、必ずしも重合物が酸敗油の毒性^{10-17 18)}の主体をなすとは考え難い。金田、Crampton、松尾らの実験は何れも濃度の高い過酸化物式は重合物を投与した為に見られたものであり、著者の実験に、そのまま当てはめ得るかは疑問であらう。

コリン欠乏食で脂肪肝を起させるにはバター、ラードなどの融点の高いもの程強く起るといわれている²⁰⁾。酸敗油による腎臓障害がコリン欠乏症状のそれと同一であるとは考え難いがコリンの作用機序という点から考えれば酸敗油の毒性の原因は過酸化物、重合物が生成された為ばかりではなく、この様な化学的变化に加うるに融点溶解性粘度などの物理的性質の変化も一役買っているのではないかと想像される。

結 論

肝油、或は大豆油の自然酸化物或は通気加熱して酸化したものを種々の割合に加えた飼料でラット飼育し次の様な結果を得た。

1) 肝油、大豆油の如何を問わず酸敗油はすべて同じ様な毒性を有し、軽度の脂肪肝腎臓の中毒性ネフローゼ、成長阻碍、時に死亡する。

2) コリンは、この毒性を予防することが出来、特に腎臓の変化に対しては顯著である。B₁₂ methionine, V.E 等の作用はコリンより劣る。

3) 酸敗油の毒性に耐えて生存した動物は3~4ヶ月で全く正常に復する。

文 献

- 1) 金田、石井：日本水産学会誌，**19**, 171 (1953)
- 2) 金田、桜井、石井：同 上 **20**, 50 (1954)
- 3) 金田、酒井、石井：同 上 **20**, 658 (1954)
- 4) H. Kaunits, C. A. Slanetz, & R. E. Johnson: J. Nutr., **55**, 577 (1955)
- 5) E. W. Crampton, F. A. Farmer & F. M. Berryhill: J. Nutr., **43**, 431 (1951)
- 6) E. W. Crampton, R. H. Common, F. A. Farmer, F. M. Berryhill & L. Wiseblatt: J. Nutr., **44**, 177 (1951)
- 7) E. W. Crampton, R. H. Common, F. A. Farmer, A. F. Wells & D. Crawford: J. Nutr., **49**, 333 (1953)
- 8) E. W. Crampton, R. H. Common, E. T. Pritchard & F. A. Farmer: J. Nutr., **60**, 13 (1956)
- 9) K. E. Jessen, J. Glavind, S. Hartmann & H. Dam: Acta Pathol. et Microbiol. Scand **29**, 73 (1951)
- 10) N. Matsuo, J. Biochem., Japan.: **41**, 647, (1954)
- 11) 高橋：医学と生物学：**31**, 257, (1954)
- 12) M. Somogyi: J. Biol. Chem., **160**, 69 (1945)
- 13) O. A. Bessey, O. H. Lowry & M. J. Brock: J. Biol. Chem., **16**, 321 (1946)
- 14) 高橋：ビタミン，**7**, 1017 (1954)
- 15) 高橋：ビタミン，**9**, 26 (1955)
- 16) J. H. Jones & C. Foster: J. Nutr. **24**, 245 (1942)
- 17) N. Matsuo: J. Biochem. (Japan), **41**, 481 (1954)
- 18) 松尾：栄養と食糧，**10**, 255 (1958)
- 19) D. A. Benton, A. E. Harper & C. A. Elvehjem: J. Biol. Chem., **218**, 693 (1956)

(国立公衆衛生院栄養生化学部)