カツオ (*Katsuwonus pelamis*) 卵巣油を投与したラットにおける水浸拘束ストレスの胃出血性損傷に及ぼす影響

大川勝正[§], 望月一男, 杉本芳邦, 鈴木敏博,
橋詰昌幸*, 喜多川知子*, 松本 透*, 横越英彦**

静岡県静岡工業技術センター

* 株式会社マルハチ村松

** 静岡県立大学

Effect of Ovary Lipids of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) on Gastric Injury in Rats Subject to Water Immersion Restraint Stress

Katunasa Ookawa[§], Kazuo Mochizuki,
Yoshikuni Sugimoto, Toshihiro Suzuki,
Masayuki Hashidume*, Tomoko Kitagawa*,
Toru Matumoto* and Hidehiko Yokogoshi**

Shizuoka Industrial Research Institute of Shizuoka
Prefecture, 2078 Makigaya, Aoi, Shizuoka 421-1298

* Maruhachi Muramatsu, Inc. 65-1 Jonokoshi,
Yaizu, Shizuoka 425-0025

** University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga,
Shizuoka 422-8526

Ovary lipids extracted from skipjack tuna (OLS) are rich in docosahexaenoic acid combined with phospholipids. When male Wistar rats were given OLS every day for 15 days, OLS gave a protective effect against acute stress. Gastric mucosal injury in OLS-fed rats exposed the water immersion restraint stress (27°C, 7 hrs; WIRS) was lower than that of the control rats exposed the WIRS alone. Then, oil was given to control rats with the same energy % of n-3 and n-6 fatty acids and in the same n-3 : n-6 fatty acid ratio as the OLS mixed oil. In general, the surplus secretion of corticosterone is one of the primary factors in gastric mucosal injury. However, the concentration of serum corticosterone in OLS-fed rats was the same as in the control rats.

(Received Oct. 3, 2005 ; Accepted Feb. 6, 2006)

静岡県は、鰹節や缶詰などカツオの水産加工業者が多い。平塚ら¹⁾は、カツオの加工副産物である卵巣や精巣を有効利用するため、リン脂質結合型のドコサヘキサエン酸(DHA)を多く含む油脂の抽出、製造方法を確立した。我々は、文部科学省の都市エリア産学官連携促進事業において、卵巣から抽出した油脂(カツオ卵巣油)の素材の付

加価値を高めるため、抗ストレス関連の機能性について検討を行うこととした。

今回は、カツオ卵巣油を継続的に摂取させた後、水浸拘束ストレスを負荷したときの所見を得たので報告する。

1. 実験方法

(1) 実験材料

平塚ら¹⁾の方法に従い、焼津市内鰹節工場より購入した冷凍の南方カツオ(*Katsuwonus pelamis*)より卵巣を摘出し、水洗、ボイル加熱、凍結乾燥、粉碎、エタノール抽出、ろ過、濃縮の工程を経て、カツオ卵巣油とした。

(2) 実験動物及び飼育

本試験には、日本SLC(浜松市)から購入した4週齢雄性ウィスター系ラットを用いた。ラットは、固形飼料(CE-2, クレア)にて3日間の馴化の後、カツオ卵巣油を投与するサンプル群16匹及びコントロール群15匹の2群に分けた。それぞれの群は、Table 1に示す配合の油脂を、毎日1回、17時より体重100gあたり500mgの割合で15回経口投与した。投与量は、ラットが体重100gあたり1日10gの摂取をするものとし、この飼料10gの5%が油脂であるとした。なお、コントロール群とサンプル群の油脂配合は、第3回International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, 1998理事会後の円卓会議が公表した成人推奨摂取量を参考に、飼料に混合したとき、n-3系脂肪酸とn-6系脂肪酸のエネルギー%及びこの比が計算上で同じとなるようにした。飼料は、AIN93に順じて調整し、自由摂取とした。ただし、油脂は、経口投与で摂取させるので、飼料中に配合していない。飲料水は、自由摂取とした。ラットは、温度23±1°C、湿度およそ55%、照明は12時間おきに自動に(7:00~19:00)暗に切り替わるよう調整した飼育室において、個別ケージで飼育した。飼育期間中は、毎日15時に体重及び飼料の摂取量を測定した。

なお、本試験は、「静岡工業技術センター動物実験委員会」の承認を得て、「静岡県静岡工業技術センターにおける動物実験の実施に関する指針」を遵守して実施した。

(3) ストレス負荷及びと殺

15回目の経口投与の後、サンプル群のラットは、ストレスを負荷しないサンプル1(S1)群8匹、ストレス負荷するサンプル2(S2)群8匹に分けた。コントロール群のラットも同様に、ストレスを負荷しないコントロール1(C1)群7匹、負荷するコントロール2(C2)群8匹に分けた。ラットは、15回目の経口投与後の翌日3時より24時間絶食とした²⁾。この後、水浸拘束ストレス(Water immersion restraint stress; WIRS, 27°C, 7時間)を負荷した。WIRSより解放したラットは、直ちに断頭によりと殺し、胃を摘出した。血液からは、血清を分離した。

(4) 胃の出血性損傷の観察及び面積率の算出

摘出した胃は、生理食塩水、10%ホルマリン液の順で洗浄した後、20分間10%ホルマリン液に浸漬して固定化し

〒421-1298 静岡県静岡市葵区牧ヶ谷 2078 番地

* 〒425-0025 静岡県焼津市城之腰 65-1

** 〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), ookawa@s-iri.pref.shizuoka.jp

Table 1 Composition of lipid for oral administration^{*1}

Lipids	Control (%w/w)	Test sample (%w/w)
Corn oil	0.0	24.0
Rapeseed oil	60.0	0.0
Sunflower oil	40.0	58.0
Ovary lipids of skipjack tuna	0.0	18.0

^{*1} 500 mg/100 g body-weight

た。浸漬した胃は、幽門部よりはさみを入れ、大弯側を切開し、再度 10% ホルマリン液で洗浄した²⁾。胃内部の表面は、デジタルカメラを用いて撮影した。

ストレスを負荷した群の画像は、市販の画像解析ソフトを用いて、出血性の損傷部の面積 (A) 及び胃部の面積 (B) 及びを算出し、 $100 \times A/B$ により出血性損傷の面積率を算出した。

(5) 血清中コルチコステロンの測定

血清中コルチコステロンは、ジクロロメタンで抽出の後、Scott らの方法³⁾ に順じて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により濃度測定した。

(6) 統計処理

データは、平均値±標準誤差 (mean±SE) で表した。胃出血性損傷の面積率は、C2 群、S2 群の 2 群間について、F 検定の後、Mann-Whitney U-test により有意水準 5% で比較した。血清中コルチコステロン濃度は、等分散性をバートレット検定した後、Tukey-Kramer test で各群間の差を検定した。

2. 実験結果及び考察

(1) 飼育期間中の体重及び摂餌

飼育開始及び飼育終了後の体重及び摂餌は、Fig. 1 に示すとおり。S 群のラットと C 群のラットは、体重の変動、摂餌量で違いは認められなかった。

(2) 胃内部の観察と血清中コルチコステロン

胃内部の写真は、Fig. 2 に示す。ストレスを負荷していないラットの胃表面は、C1 群及び S1 群ともに損傷は見られなかったが、ストレスを負荷した C2 群及び S2 群は、出血性の損傷が認められた。この時、カツオ卵巣油を摂取していた S2 群は、C2 群よりも損傷の度合いが低いように見受けられた。C2 群及び S2 群の画像処理により算出した出血性損傷の面積率及び血清中コルチコステロン濃度は、Table 2 に示す。S2 群の出血性損傷の面積率は、C2 群よりも有意に低い値を示し、カツオ卵巣油の摂取がストレス性の胃出血性損傷を抑制する可能性が示唆された。

本試験では、ストレス負荷による血清中コルチコステロン濃度の上昇は見られたが、ストレス負荷、無負荷のそれぞれで、C 群と S 群間で差異は見られなかった。

ストレスに反応して視床下部より副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンが分泌され、下垂体前葉から副腎皮質刺激ホ

Fig. 1 Body weight and food intake of rats

Sample rats were given the oil that was mixed ovary lipids of skipjack tuna (OLS), every day by oral administration. Control rats were given the mixed oil that had the same energy % of n-3 fatty acid, n-6 fatty acid and the ratio of fatty acids n-3 : n-6 as the OLS mixed oil.

●, body weight of control rats (n=15); ○, body weight of sample rats (n=16); ▲, food intake of control rats (n=15); △, food intake of sample rats (n=16)

ルモンの分泌が促される。これが副腎からの副腎皮質ホルモンの分泌を増加させ、過剰の副腎皮質ホルモンが胃酸分泌の亢進・胃粘膜分泌の減少・胃粘膜再生障害などの機序を介して潰瘍の形成に関与しているといわれている⁴⁾。また、コルチコステロンなどのグルココルチコイドは、胃粘膜保護作用のあるプロスタグランジンの産生を抑制することが知られている⁵⁾⁶⁾。このようなことから、カツオ卵巣油摂取によるコルチコステロンの過剰分泌抑制が、胃の出血性損傷の発症抑制につながると考えたが、コントロールとの違いは見られなかった。今回の試験における、カツオ卵巣油のストレス性胃出血性損傷の発症抑制は、コルチコステロン過剰分泌抑制とは、別の原因によるものと推察された。

3. 要 約

カツオ卵巣から抽出した油脂は、リン脂質と結合したDHAを多く含む。我々は、ウィスター系雄ラットを用いて、このカツオ卵巣油の抗ストレス性について検討した。ラットは、15日間毎日カツオ卵巣油を毎日摂取させた。水浸拘束ストレス (27℃, 7時間) を負荷したところ、カツオ卵巣油を摂取させたラットの胃出血性損傷の発症は、コントロールと比べて抑制されていた。一般に、コルチコステロンの過剰分泌は、ストレスによる胃の出血性損傷を発症させる要因の一つと考えられている。しかしながら、カツオ卵巣油を摂取させたラットの血清中コルチコステロン濃度は、コントロールのラットと変わらなかった。

Fig. 2 Picture ; the appearances of gastric inside

The dark areas pointed by the arrows were mucosal injuries.

Table 2 Rate of gastric mucosal injury area and serum corticosterone levels

Parameter	Oral administration group			
	Control 1	Control 2	Sample 1	Sample 2
Rate of gastric mucosal injury area (%)	—	16.0±3.3 ^a	—	7.4±3.2 ^b
Corticosterone levels (ng/mL)	118±28 ^a	634±39 ^b	177±81 ^a	631±56 ^b

The values are expressed as mean±S.E (control 1 : n=7, other : n=8). Values not sharing common superscript letters are significantly different at $P<0.05$. Control 1 : no-stress rats given the control oil, Control 2 : stress rats given the control oil, Sample 1 : no-stress rats given the OLS mixed oil, Sample 2 : stress rats given the OLS mixed oil.

文 献

- 1) 平塚聖一, 鈴木敏博, 橋詰昌幸, 松江葉子, 喜多川知子, 横山正秋, 田村昌巳, 藤井達也, 村松憲行, 静岡県, マルハチ村松, 「魚類の内臓から多価不飽和脂肪酸を構成成分とするリン脂質を含む脂質組成物を抽出するための方法, その方法に適用可能な魚類の内臓の保存方法, 及びその方法により抽出した脂質組成物」, 特許公開 2004-2663, 2004年1月8日.
- 2) 李 恩有, 小川秀道, ラットの実験的ストレス胃潰瘍に対する propofol 前投与の影響, 第45回日本麻酔学会, 310 (1998).
- 3) Scott, N.R. and Dixon, P.E., Determination of cortisol in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* **164**, 29-34 (1979).
- 4) 小林広幸, ストレスと胃潰瘍・急性胃粘膜病変, 「からだの中からストレスを見る」, 初版, 日本比較内分泌学会編, (学会出版センター, 東京), pp. 123-136 (2000).
- 5) 山本尚三, 生合成と代謝とその阻害薬, 「プロスタグランジン研究法 (上)」, 山本尚三, 鹿取信編, (東京化学同人, 東京), pp. 22-31 (1986).
- 6) 室田誠逸, プロスタグランジンの医薬への応用, 「プロスタグランジンの生化学—基礎と実験—」, 第1版, 室田誠逸編, (東京化学同人, 東京), pp. 130-148 (1982).

(平成 17 年 10 月 3 日受付, 平成 18 年 2 月 6 日受理)