水産動物内臓油利用に関する研究—Ⅶ.

スケトウタラ肝油から高度不飽和脂肪酸の濃縮
およびラットの血清コレステロール値低下利用

曾 根 博

(1962 年 2 月 28 日受理)

STUDIES ON UTILIZATION OF OILS AND FATS OBTAINABLE
FROM VISCERA OF AQUATIC ANIMALS—VIII.EXTRACTION OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN A
CONCENTRATED STATE AND THE *SERUM* CHOLESTEROL
REDUCTIVE ACTION OF THE EXTRACTION PRODUCT
ON THE RAT FEEDED THEREWITH

Hiroschi SONE*

As regards the fact that the quality and quantity of fat present in food is a potent influence on the cholesterol value of *serum*, there is adopted in general, as a conclusion drawn from a number of investigations with human beings as well as with test animals, a view that said action reflected in the lowering of cholesterol value of serum is characteristic of such fats as containing unsaturated fatty acids in a great proportion.

The author, aiming hereupon at a fuller utilization of the oil obtainable from viscera of aquatic animals, tried to prepare a product comprising mixed ethylesters of polyunsaturated fatty acids. The procedure he followed in the present work comprises subjecting the residual oil remaining after taking out vitamin A from liver oil by molecular distillation to ethanolysis to cause the production of mixed ethylesters of fatty acids (see Fig. 1), distilling the mixed esters into several fractions (see Table 3) and correctively treating the distillate fractions coming out in a temperature range from 180°C to 220°C to cause the separation of new fractions to be realized in accordance with their tendencies of forming addition products of urea (see Fig. 2). The author succeeded by this procedure in concentrating the polyunsaturated fatty acids contained in pollack liver oil into mixed ethylesters thereof, obtaining from an oil sample having an iodine value of 169.8 a preparation of mixed ethylesters with an yield of 16.5%, based on the amount of sample, the iodine value of which was estimated as 310.8 and the fatty acid constituent of which was gaschromatographically found to consist up to 77.19% of fatty acids of C₂₀ and above (see Table 4).

Next, to examine the reductive effect on cholesterol value of *serum*, the above obtained preparation of mixed ethylesters of polyunsaturated fatty acids was internally applied to a group of rats as test animal while two other groups of rats were feed with a hydrogenated coconut oil and safflower oil as control substance and referential one, respectively, both of which were used similarly to said preparation of mixed esters as added to feed (see Tables 1 and 2). When the groups of rats were measured every one week throughout the first 4 weeks of their body-weight (see Fig. 3), their contents of plasma cholesterol (see Fig. 4), plasma phospholipid (see Table 5) and total liver cholesterol (see Fig. 6), the following situations were illumined as results of the measurements:

* 理研ビタミン油株式会社 (Riken Vitamin Oil Co. Ltd., Shiba-minami-sakumacho 1-2-2, Minato-ku, Tokyo, Japan).

- 1) As for the increase in body-weight, the rat group dosed with mixed ethylesters of polyunsaturated fatty acid was lower in the rate of increase as compared with other groups of rats.
- 2) About the values of plasma cholesterol and C/P ratio, i. e., the ratio of the amount of plasma cholesterol to that of plasma phospholipid, the rat groups dosed with safflower oil and the residual oil in molecular distillation, respectively, showed fairly smaller values and the rat group dosed with mixed ethylesters of polyunsaturated fatty acids gave by far smaller values as compared with control rat group.

食物中の脂肪総量およびその種類が血清コレステロール値に大きな影響があることについては、人間または実験動物を使って多くの研究がある。一般的にいつて、飽和脂肪酸を多く含む植物脂肪は血清コレステロール値を高め、不飽和脂肪酸を多く含む植物油脂のサフラワー油、オリーブ油、コーンオイルなどは血清コレステロール値を低下させる作用があるといわれている。また水産動物油脂、たとえばタラ肝油¹⁾²⁾、いわし油³⁾⁴⁾、ニシン油⁵⁾などについて研究された結果によると、前述の植物油よりもその効果は大きく、その理由として魚油中の長鎖状の高度不飽和脂肪酸の⁶⁾⁷⁾影響によることが大きいとされている。

そこで著者は水産動物内臓油の利用研究として、スケトウタラ肝油から高度不飽和脂肪酸の濃縮およびそれによるラットの血清コレステロール値低下作用に関する研究を行なつた。すなわち、スケトウタラ肝油の分子蒸留残油（以下スケトウ残油と称す）では蒸留原油に比較して、ビタミンAおよびその他の不ケン化物の大半が除去されると同時に、低級脂肪酸を含むグリセライドが留去されて、比較的長鎖状の高度不飽和脂肪酸に富むグリセライドが濃縮されている。そこで、まずエタノリスンによつて脂肪酸エチルを得、蒸留分別法、尿素付加分別法を用いて、低級脂肪酸エチルおよび飽和脂肪酸エチルを除去して、さらに不飽和の高い長鎖状の高度不飽和脂肪酸を得る方法について検討を行なつた。これに次いで上記のスケトウ残油およびそれから濃縮した高度不飽和脂肪酸エチルについて動物の血清コレステロール値低下作用を検討するためにラットを用いて試験を行なつた。

実験方法

実験 1. スケトウタラ肝油分子蒸留残油から高度不飽和脂肪酸の濃縮

試料はスケトウタラ肝油 (V.A. 12,200 USPU/g, ケン化価 192.1, ヨウ素価ウィース法 155.3, 不ケン化物 2.13%) を分子蒸留した残油 (ケン化価 188.3, ヨウ素価 169.8, 不ケン化物 0.79%) を用いた。

実験は試料 2.0 kg をとり、Fig. 1 に示す方法でケン化し、不ケン化物をエーテルで抽出除去して石ケン液を塩酸分解し混合脂肪酸を得、これを塩酸の触媒によりエチルアルコールでエステル化し、スケトウ残油脂肪酸のエチルエステルを得た。つぎにこれを Table 3 に示す条件で分別蒸留し、分留による高ヨウ素価分はメタノールに溶かし、Fig. 2 に示す方法で尿素付加処理を2回行ない、析出する付加生成物をろ

Table 1. Properties of oil specimens used as added to feed in examining their effect on rat of lowering the cholesterol value of serum, the data of experiment concerned being illustrated in Figs. 3, 4, 5, 6 and Table 5.

Number of specimen	Kind of oil specimen	Saponification value	Iodine value	Unsaponifiable matter (%)	Remarks
No. 1	Molecular distillation residue of pollack liver oil	188.3	169.8	0.79	See Table 4
No. 2	Mixed ethylesters of polyunsaturated fatty acids*	—	310.8	Trace	
No. 3	Safflower oil	190.1	130.0	0.90	

* Obtained as concentration product from Specimen No. 1.

別し、メタノールで洗浄後最後の母液および洗液に水を加えてエーテルで抽出し、スケトウ残油高度不飽和酸エチルを得た。試料および製取したスケトウ残油高度不飽和酸はガスクロマトグラフィーにより組成脂肪酸を調べた。

実験 2. スケトウ肝油分子蒸留残油およびそれから濃縮した高度不飽和脂肪酸エチルによるラットの血清コレステロール値低下作用

試料としてはスケトウ残油およびそれから濃縮した高度不飽和脂肪酸エチルを用い、その効果を比較検討する目的で不飽和脂肪酸含量の比較的多い植物油のサフラワー油を、また対照として水添ヤシ油を用いた。それらの性状はつぎの Table 1 に示した通りである。

動物実験は生後 4 週 of SD 系雄ラットを 1 群 5 匹づつに分け、Table 2 に示す各種の餌で 2 および 4 週間飼育後頸部から採血、肝臓を摘出し、それぞれの Lipid 値を測定した。餌および水は自由摂取させ、体重は毎週 1 回午前中に測定した。Plasma cholesterol は ABELL ら⁹⁾の方法で、Plasma phospholipid の抽出は SPERRY ら⁹⁾の方法、定量は KING¹⁰⁾の方法で、Liver cholesterol は SPERRY ら¹¹⁾の方法で測定した。

結果および考察

実験 1.

試料スケトウ残油 2.0 kg をケン化後不ケン化物を除去し、エチルアルコールでエステル化して混合脂肪酸エチル 1.87 kg を得た。その詳細を Fig. 1 に示す。

Molecular distillation residue 2.0 kg.

- Added with 3.0% of 4N NaOH and heated under nitrogen atmosphere for 30 min. under reflux
- Removed of unsaponifiable matters by treating with ether
- Acidified with HCl
- Extracted with ether

Mixed fatty acids

- Added with 4% of 6% HCl in ethyl alcohol, heated under nitrogen atmosphere for 40 min. under reflux and washed with water

Mixed ethylesters of fatty acids, 1.87 kg.

Fig. 1. Scheme for obtaining the preparation of ethylester of fatty acid from residual oil remaining after molecular distillation of pollack liver oil.

Table 2. Composition of feed used in the biological test for examining the lowering of rats in their cholesterol value of serum, the experimental data concerned being shown in Figs. 3, 4, 5, 6 and Table 5.

Composition of feed	Group of rats as test animal			
	A	B	C	D
Casein		15.0		
Mixed salts		4.0		
Powdered filter paper		2.0		
Water soluble vitamin complex		0.5		
Oil soluble vitamin complex		0.5		
Cholesterol		1.0		
Sodium cholate		0.2		
Choline chloride		0.2		
Granulated sugar		66.6		
Hydrogenated coconut oil	10	5	5	5
Oil specimen No. 1	—	5	—	—
Oil specimen No. 2	—	—	5	—
Oil specimen No. 3	—	—	—	5

Table 3. Fractions of mixed ethylester of fatty acids obtained by fractional distillation of molecular distillation residue of pollack liver oil.

	Distillation temp. (°C.) under 4 mm.Hg	Yield (g.)	Iodine value
Original residual oil subjected to fractional distillation		1,860	161.5
Distillate			
Fraction 1	~170	182	86.3
Fraction 2	170~180	268	112.5
Fraction 3	180~195	515	160.3
Fraction 4	195~210	427	181.4
Fraction 5	210~220	400	200.3
Residue after fractionation	220~	48	171.3

得られた脂肪酸エチルを減圧蒸留し、つぎの Table 3 に示す結果を得た。

蒸留による高ヨウ素価留分として 180°C~220°C の留分 3, 4, 5 を混合し, 1338 g をメタノールに溶かし, 尿素付加処理による分別を行ない, ヨウ素価 310.8 の高度不飽和酸エチル 330 g を得た。その詳細をつぎの Fig. 2 に示す。

Fig. 2. Scheme for obtaining mixed ethylesters of Polyunsaturated fatty acids by subjecting distillate fractions of fatty acid ethylesters to the process of urea-addition.

得られた高度不飽和脂肪酸エチルは橙色の, 比較的魚臭の強い, 流動性の液体でガスクロマトグラフィーによつて組成脂肪酸を調べ, 試料のスケトウ残油と比較し, つぎの Table 4 に示す結果を得た。

Table 4. Gas-chromatographically determined distributions of fatty acid in the molecular distillation residue of pollack liver oil and the preparation of mixed ethylesters of polyunsaturated fatty acids concentratingly obtained thereof.

Gas-chromatography: Type, Kotaki GU-2; 2.5 m column with silicon grease coating; carrier gas, helium.

	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈	C ₂₀	C ₂₂	C ₂₄
Molecular distillation residue of pollack liver oil.....	3.26	19.42	28.71	23.23	23.21	1.14
Polyunsaturated fatty acid of pollack liver oil obtained as ethylester....	Trace	4.45	18.32	44.45	28.53	4.12

以上の結果からヨウ素価 155.3 のスケトウタラ肝油を分子蒸留し, ヨウ素価 169.8 の蒸留残油を得, それをエチルエステルとし, 分別蒸留, 尿素付加法などによりヨウ素価 310.8 で C₂₀ 脂肪酸 44.54%, C₂₂ 脂肪酸 28.53% からなる長鎖状の高度不飽和脂肪酸エチルを試料の蒸留残油に対し 16.5% の収率で得た。

実験 2.

ラット各群 5 匹づつについて Table 2 に示す各餌で週 1 回の体重, 2 および 4 週後の血漿コレステロール量, 血漿磷脂質, 肝総コレステロール量を測定し, その結果をそれぞれ図示すると, つぎの Fig. 3, 4, 5 および 6 のようになる。また以上の図示した結果および C/P (Total chlesterol/phospholipid) を計算し表で示すと Table 5 のようになる。

Fig. 3. Body-weight increases of rat groups bred with feeds varying only in the kind of oily substance added thereto, the values in the figure being each the mean among 5 individuals completing every rat group.

—○—○—, Group A (control); ..□..□.., Group B (dosed with molecular distillation residue of pollack liver oil); ---●---●---, Group C (dosed with mixed ethylesters of polyunsaturated fatty acids); --△--△--, Group D (dosed with safflower oil).

Fig. 5. Changes in the amount of plasma phospholipid observed for the same rat groups as those concerning Fig. 3.

Fig. 4. Changes in the amount of total plasma cholesterol observed for rat groups respectively bred with feeds varying only in the kind of oily substance added thereto, the values in the figure being each the mean among 5 individuals completing every rat group.

The marks are of the same meaning as in Fig. 3.

Fig. 6. Changes in the amount of total liver cholesterol observed for rat groups bred under the same condition as those concerning Fig. 3, but that greater number of rat individuals were used because of the necessary of extracting the liver to be examined. In the figure, the values are again the means among every 5 rat individuals, the marks being of the same meaning as in Fig. 3.

Table 5. Effect of the present preparation of mixed ethylesters in comparison with the effects of other oil specimens in reducing the cholesterol value of blood serum of rat dosed therewith. The values in the table are each the mean among 5 individuals completing every rate group.

Group of rats as test animal	Kind of oil specimen used as added to feed for rats	Body-weight (g.)		Plasmacholesterol (mg./dl.)		Phospholipid (mg./dl.)	C/P	Total liver cholesterol (%)
		Initial	Final	Range of measured value	Average			
A	Hydrogenated coconut oil	77	176	264-335	301	180	1.67	4.55
B	Molecular distillation residue of pollack liver oil	77	174	157-231	202	153	1.32	4.91
C	Ethylester of polyunsaturated fatty acid	78	138	142-193	167	138	1.21	4.53
D	Safflower oil	76	169	141-288	207	148	1.40	4.40

この実験から各群の体重増加を見ると、高度不飽和脂肪酸エチルを添加したC群は体重増加の減少が見られた。これは高度不飽和脂肪酸エチルは魚臭が強く、そのため飼料摂取量が少なく、また不安定なため分解物による多少の体重増加抑制作用があつたのではないと思われる。Plasma total cholesterolの増減をFig. 4 および Table 5 で見ると、対照のA群の平均値が 301 mg/dl に対し、サフラワー油添加区のD群およびスケトウ残油添加区のB群がそれぞれ 207 および 202 mg/dl でA群との差が見られ、とくにC群の高度不飽和脂肪酸エチルを添加した場合 167 mg/dl と顕著な差を示した。また C/P 比も改善が見られ、A群が 1.67 であるのに対しD群およびB群はそれぞれ 1.40 および 1.32 であり、C群の場合は 1.21 と低い値を示している。このようにいずれもC群がもつとも低い値を示しているのは、高度不飽和脂肪酸の含量の高いほど作用が強かつたことを示している。しかし、この群では体重増加が少なかつたことに留意し、判定は慎重を期したい。また、Liver cholesterol の値には対照および検体群ともいずれも大きな差は見られなかつた。

要 約

スケトウタラ肝油分子蒸留残油からの高度不飽和脂肪酸の濃縮法の検討を行ない、得られた高度不飽和脂肪酸エチルおよびスケトウタラ肝油分子蒸留残油、また比較の目的でサフラワー油、対照として水添ヤシ油をそれぞれ餌に添加した場合の動物の血清コレステロール値低下作用について、ラットを用いて実験した結果、

1) ヨウ素価 169.8 のスケトウタラ肝油分子蒸留残油をエチルエステルとし、蒸留分別法、尿素付加法を併用することによつて、沃素価 310.8 で C_{20} 以上の脂肪酸 77.19% からなる高度不飽和脂肪酸エチルを試料の蒸留残油に対し 16.5% の収率で得た。

2) ラットによる動物試験の結果、体重増加は高度不飽和脂肪酸エステル添加のものが他の群と比較して低い値を示した。

3) 血漿コレステロール値および C/P 比についてみると、サフラワー油およびスケトウタラ肝油分子蒸留残油を添加した検体群は対照群に比較してかなり低い値を示し、高度不飽和脂肪酸エチル添加群は顕著な差で低い値を示した。

4) 肝臓コレステロールの値については対照、検体各群ともいずれも大きな差は見られなかつた。

終わりに臨み、実験に御指導いただいた日本大学理工学部の松本太郎教授ならびに動物実験に御指導、御協力いただいた武田薬品工業株式会社研究所の荒蒔義知氏に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) A. P. GROOT: *Nature* No. 4669, 1191 (1959).
- 2) J. D. WOOD: *Nature* No. 4711, 473 (1960).
- 3) ANDERSON, J. F., KEYS, A. and GRANDE, F.: *J. Nut.* **62**, 421 (1957).
- 4) HEGSTED, D. M., GOLISIS, A. and STARE, F.: *J. Nut.* **63**, 377 (1957).
- 5) GORDON, H., LEWIS, B., EALES, L. and BROCK, J. F.: *Lancet* **2**, 1299 (1957).
- 6) HOWARD, E. W. and LAWRENCE, W. SMITH: *Am. J. Med. Science* June, 770 (1959).
- 7) 下岡 勉・外山修之: *油化学* **6**, 314 (1957).
- 8) ABELL, L. L., B. B. LEVY, B. B. BRODIE and F. E. KENDAL: *J. Biol. Chem.* **195**, 357 (1952).
- 9) SPERRY, W. M. and BRAND, F. C.: *J. Biol. Chem.* **213**, 69 (1955).
- 10) KING, E. J.: *Biochem J.* **26**, 292 (1932).
- 11) SPERRY, W. M. and WEBB, M.: *J. Biol. Chem.* **187**, 97 (1950).