水産物のシロネズミコレステロール代謝に およぼす影響に関する研究—II.

エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサ エン酸の効果比較

金田尚志・荒井君枝・徳田節子

(1964 年 1 月 20 日受理)

STUDIES ON THE EFFECTS OF MARINE PRODUCTS ON CHOLESTEROL METABOLISM IN RATS—II. THE COMPARISON OF THE EFFECTS OF EICOSAPENTAENOIC AND OF DOCOSAHEXAENOIC ACIDS

Takashi KANEDA, Kimie ARAI and Setsuko TOKUDA*

In a previous work¹⁾ the cuttlefish liver oil proved effective to reduce plasma cholesterol of rats. Problems arising from the study are if each of the two major highly unsaturated fatty acids of the oil, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids, is as effective as the other for cholesterol metabolism, and if these fatty acids follow the same reduction mechanism as that of linoleic acid. To examine these points rats were fed ad lib. for 12 weeks with either a fat-free diet, a diet containing 50 mg methyl eicosapentaenoate or the same amount of methyl docosahexaenoate separated from cuttlefish liver oil, with or without (1%) cholesterol. The results indicated that eicosapentaenoic acid could reduce plasma cholesterol more than docosahexaenoic acid. The reduction mechanism of each of these fatty acids, however, looks different from that of linoleic acid.

I. 緒 言

筆者の1人はさきにイカ肝油を用い、シロネズミのコレステロール代謝におよぼす影響について報告し¹⁾、イカ肝油は対照として用いたワタミ油以上にシロネズミの血漿コレステロールを減少させる効果を有することを認めた。その際、イカ肝油の効果は主として含有高度不飽和酸によると思われたが、イカ肝油中の高度不飽和酸はエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸より成り、これらがまったく同様の効果を有するかどうかは不明であつた。また、これら高度不飽和酸の血漿コレステロール低下作用が必須脂肪酸と同様な機構によるか否かもあまり明らかでなかつた。そこで上記両高度不飽和酸をなるべく多くふくんだ区分をとり、シロネズミの血漿コレステロールに与える影響の程度を比較した。

II. 実 験 の 部

1. 供試エステル：日本化学飼料製イカ肝油（沃素価 192.5, 不飽和物 3.78 %, $C_{20:5}$ 酸 7.3 %, $C_{22:6}$ 酸 18.1 %）を常法によりウムエステルングレシメチルエステルとし、3倍量の尿素および8倍量のメタノールを用いて尿素付加物をつくり、付加物を汙別、汙液よりメチルエステルを分け、2 mm/Hg の減圧下に分

Table 1. The component of methyl ester of highly unsaturated fatty acids used for feeding experiments (determined by gas-liquid chromatography)

Fatty acid	C _{20:5} Fraction	C _{22:6} Fraction	Methyl linoleate
C _{18:1}	2.0		1.3
C _{18:2}			93.5
C _{18:3}			4.6
C _{20:1}	4.7	2	
C _{20:4}	4.4		
C _{20:5}	51.7		
C _{22:6}	37.2	77	

溜した。肝、副腎は無水芒硝と練り脱水し、石油エーテルを用いて脂質を分ち試料とした。コレステロールの定量は NIEFT and DEUEL 法²⁾ によつた。

Table 2. Composition of diets.

Dietary constituents	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Sucrose	69.26	69.26	69.26	69.26	68.01	68.01	68.01	68.01
Casein	22.0	22.0	22.0	22.0	22.0	22.0	22.0	22.0
Celluloflour	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Salt mixture	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Choline chloride	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
Vitamin mixture	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Cholesterol					1.0	1.0	1.0	1.0
Bile salts					0.25	0.25	0.25	0.25
Methyl linoleate		100 mg				100 mg		
Methyl C _{20:5} fraction			50 mg				50 mg	
Methyl C _{22:6} fraction				50 mg				50 mg

The vitamin mixture had the following composition: Casein 44 g; p-aminobenzoic acid 1g; inositol 1g; tocopherol 1g; ascorbic acid 1g; thiamine 0.5g; Ca-pantothenate 0.4g; niacin 0.4g; vitamin B₁₂ 0.3mg; riboflavin 0.2g; pyridoxine 0.1g; vitamin A 20000 I.U.; vitamin D 2000 I.U.; folic acid 0.02g, menadione 0.05g; biotin 0.01g.

Table 3. Gain in weight and percentage of liver to body weight and liver total lipids.

Group No.	Wt. gain after 12 weeks (g)	Liver wt./Body wt. (%)	Total lipid liver* (mg/g)
I	164	3.80	71.0±1.1
II	183	3.93	70.1±1.1
III	173	3.28	57.9±1.1
IV	194	3.83	69.8±1.4
V	147	5.86	235.5±2.2
VI	198	4.97	130.6±2.1
VII	165	4.12	161.9±1.5
VIII	211	4.73	143.4±1.9

* Including standard error of the mean.

溜した。ガスクロマトグラフィーによるこれらエステル脂肪酸組成は Table 1 のごとくである。なお対照として用いたリノール酸メチルはサフラワー油より尿素法により分取した。

2. 動物試験法: 南加州大系の乳離れしたばかりの雄のシロネズミを各群 8 匹用いた。すなわち Table 2 に示す飼料を自由に摂取せしめ、不飽和酸はいずれも口中へ強制的に与え 12 週間飼育した。試験終了後ネブプタールを用いてネズミを麻酔し、心臓より血液を分ち、ヘパリンにより凝固を防ぎ、遠沈後、血漿に対しエタノール・アセトン等量混液 14 倍を加え、遠

3. 試験結果: Table 3, 4 に示したようにネズミは飼料を嫌悪せずに食べ試験中死亡したものはなかった。

エイコサペンタエン酸メチル給与群の血漿コレステロール値は給与量加里ノール酸メチルの半分 (50 mg) であつたにもかかわらずリノール酸メチルとほぼ同程度となつた。ドコサヘキサエン酸メチルを与えた群の血漿コレステロール値はエイコサペンタエン酸メチル群よりもかなり高かつた。しかし、肝コレステロールについては結果

Table 4. Plasma, liver and adrenal cholesterol levels.

Group No.	Plasma cholesterol			Liver cholesterol			Adrenal cholesterol	
	Total* mg %	Free* mg %	% Free	Total* mg/g	Free* mg/g	% Free	Total mg/g	Free mg/g
I	41.3±1.0	13.3±0.9	32.0	2.49±0.29	1.32±0.23	53.0	47.4	4.9
II	35.0±1.8	15.3±1.1	43.6	2.14±0.24	1.30±0.24	60.8	22.9	4.1
III	47.8±0.9	12.9±0.8	27.0	2.05±0.11	1.04±0.19	50.8	39.4	4.0
IV	48.3±1.1	—	—	1.87±0.33	1.12±0.15	59.8	43.3	4.1
V	139.8±2.6	48.2±1.8	34.5	75.63±1.5	6.14±0.54	8.1	48.4	3.3
VI	85.4±1.2	22.6±0.7	26.4	29.39±1.2	2.63±0.35	8.9	33.3	2.1
VII	93.9±1.6	23.3±0.8	24.9	61.54±1.5	3.66±0.23	5.9	43.0	2.8
VIII	117.0±2.7	22.1±1.9	18.8	36.85±1.2	3.32±0.45	9.0	51.0	2.4

* Including standard error of the mean.

は逆になりドコサヘキサエン酸群の方が低くなつたが、倍量を与えたリノール酸よりも悪い結果となつた。副腎コレステロールについては飼料にコレステロールを加えた群も加えぬ群もほぼ似たような値で著しい差は認められていない。

III. 考 察

以上の結果から考察すると、イカ肝油中のエイコサペンタエン酸はシロネズミの血漿コレステロールを低下させる作用を有するといえる。しかし、ドコサヘキサエン酸はエイコサペンタエン酸ほどの効果がないようである。すなわち、Table 4 の結果によれば、ドコサヘキサエン酸 77 % をふくむメチルエステル 50 mg を与えた第VIII群はエイコサペンタエン酸 52 % をふくむ第VII群にくらべ血漿コレステロールはかなり高い。この結果によると、第VIII群の血漿コレステロール降下作用は混在するエイコサペンタエン酸によるところが多いように思われる。つまり、もしも第VII群がエイコサペンタエン酸のみであり、第VIII群がドコサヘキサエン酸のみの試料であつたならば、両群の血漿コレステロール値はさらに差を生じたのではないかと想像される。一方、肝コレステロール値はドコサヘキサエン酸の方がエイコサペンタエン酸より低くなつている。また対象として用いたリノール酸は血漿、肝コレステロールをいずれも減少せしめた。すなわち、リノール酸は血漿および肝コレステロールをともに低下させる作用があるのに対し、エイコサペンタエン酸は血漿コレステロールを、ドコサヘキサエン酸は肝コレステロールを低下させるが、リノール酸のように血漿、肝コレステロールをともに低下させる作用は認められなかつた。これらの点より考え、高度不飽和酸の作用機構は必須脂肪酸であるリノール酸とは異なるようである。

必須脂肪酸および魚油中の主たる高度不飽和酸の構造はつぎのごとく考えられている。

リノール酸 (9, 12-オクタデカジエン酸)

リノレン酸 (9, 12, 15-オクタデカトリエン酸)

アラキドン酸 (5, 8, 11, 14-エイコサテトラエン酸)

C_{20:5} 酸 (5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸)

C_{22:6} 酸 (4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサエン酸)

すなわち、この構造式によると魚油中のエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸の二重結合位置はメチル基側より数えるとそれぞれ 3, 6, 9, 12, 15 および 3, 6, 9, 12, 15, 18 となる。

THOMASSON ら³⁾によると、不飽和酸が必須脂肪酸としての効果を示すためにはメチル基から数えて 6:7 位, 9:10 位に二重結合を有する必要があるが、リノレン酸のごとく 3:4 位に二重結合を有するものは必須脂肪酸としての効力を減じ、アラキドン酸のごとく 12:13 位に二重結合を有するものは効力を増すという。この Thomasson の説によると、イカ肝油中の高度不飽和酸はいずれも必須脂肪酸としての効果を有することになる。しかし Thomasson の説を信ずればリノレン酸同様 3:4 位に二重結合を有するため効果は減殺され、またアラキドン酸のごとく 12:13 位に二重結合があるため効力を増すとも考えられる。

Table 5. Plasma cholesterol levels of rats fed with methyl linoleate or ethyl arachidonate.

Group	Plasma cholesterol		
	Total* mg %	Free* mg %	% Free
Fat-free (Without cholesterol)	43.5±0.76	11.8±0.62	27.1
Methyl linoleate 100 mg (Without cholesterol)	55.3±1.05	12.8±0.47	23.2
Ethyl arachidonate 50 mg (Without cholesterol)	48.8±0.86	9.6±0.47	19.7
Fat-free (With cholesterol)	12.29±2.68	25.8±1.12	21.0
Methyl linoleate 100 mg (With cholesterol)	61.0±1.11	16.2±0.56	26.6
Ethyl arachidonate 50 mg (With cholesterol)	66.6±0.83	16.4±0.31	24.6

* Including standard error of the mean.

筆者らの試験においてリノール酸は高度不飽和酸の 2 倍給与しており、このリノール酸をアラキドン酸に直すと、エイコサペンタエン酸を主とする第Ⅶ群においてはその効果はアラキドン酸とほぼ同様ということになる。しかし、ドコサヘキサエン酸を主とする第Ⅷ群の血漿コレステロールに対する効果はエイコサペンタエン酸群にくらべはるかに劣ることより考え、エイコサペンタエン酸の効果はアラキドン酸以上のように見える。

もしもメチル基から数えて 3:4 位に二重結合を有するエイコサペンタエン酸がアラキドン酸よりも効果があるとすると、これは Thomasson のいう考え方とは一致しないことになり、この点についてはさらに検討する必要がある。

いずれにしろ、エイコサペンタエン酸とドコサヘキサエン酸の作用は同一ではなく、また必須脂肪酸とも異なるようである。

なお前報¹⁾において、ネズミの摂取した餌の量からリノール酸摂取量を計算すると、対照として用いたワタミ油給与群では 1 日 1 匹当たり 1.1 g となつた。またイカ肝油給与群では 0.5 g の高度不飽和酸を摂取したことになる。イカ肝油中のエイコサペンタエン酸は 7.3 %, ドコサヘキサエン酸は 18.1 % であつたがこれら高度不飽和酸の血漿コレステロールに対する効果はリノール酸の 4 倍弱であつた。しかるに本試験においてはエイコサペンタエン酸を主とする区分でも 2 倍弱となつている。

PRIVETT ら⁴⁾はマグロ油中のエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸は必須脂肪酸欠乏ネズミの成長は促進するが、欠乏症は治癒せず、ちょうどリノレン酸と同じような生理作用を有するという。

イカ肝油中のエイコサペンタエン酸とアラキドン酸のちがいは、前者がメチル基から数えて 3:4 位に二重結合を一つ余計にもつているということであり、その他の構造はまったく同じである。

筆者の 1 人は Table 5 に示すごとくアラキドン酸とリノール酸の効力を比較したが、アラキドン酸はリノール酸の 2 倍弱の効力を有していた。

本試験の結果、エイコサペンタエン酸はドコサヘキサエン酸以上に血漿コレステロールを低下させる作用のあること、またリノール酸とは作用機構が異なることなどを認めたが、構造との関係を論ずるにはアルカリ異性化、Bromination などにより二重結合位置を移動せしめ、その効果を再判定するような試験も必要のように思われる。

IV. 摘 要

イカ肝油より分離したエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸のシロネズミコレステロール代謝におよぼす影響を検討し、前者は後者以上に血漿コレステロールを低下せしめる作用のあることを認めた。ただし、その作用機構はリノール酸とは異なるようである。

イカ肝油を提供された日本化学飼料株式会社に厚く謝意を表する。

文 献

- 1) KANEDA, T. and ALFIN-SLATER, R. B.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 40, 336~8 (1963).
- 2) NIEFT, M. L. and DEUEL, H. J. Jr.: *J. Biol. Chem.*, 177, 143 (1949).
- 3) THOMASSON, H. J. and IONGH, H.: *Fette und Seifen*, 57, 390 (1955).
- 4) PRIVETT, O. S., AAES-JØRGENSEN, E., HOLMAN, R. T. and LUNDBERG, W. O.: *J. Nutrition*, 67, 423~32 (1959).