コイの脂質過酸化物の吸収におよぼすビタミン E およびエトキシキンの影響について*

竹 内 昌 昭

(1971 年 9 月 25 日受理)

Effect of Vitamin E and Ethoxyquin on Absorption of Lipid Hydroperoxide in Carp

Masaaki TAKEUCHI**

The effect of antioxidants on the absorption of lipid hydroperoxide in carp, *Cyprinus carpio* has been studied.

The carp were divided into four groups. Group 3 was given synthetic diet with vitamin E (dl- α -tocopheryl acetate), Group 4 the diet with ethoxyquin (6-ethoxy-1,2-dihydro-2,2,4-trimethylquinoline) and the others synthetic diet only.

After they were fed on these diets for two weeks, the following ^{14}C -labelled compounds were administered by polyethylene catheter.

Group 1: $1\text{-}^{14}\text{C}$ -methyl linoleate ($1\text{-}^{14}\text{C}$ -ML)

Group 2: purified $1\text{-}^{14}\text{C}$ -methyl linoleate hydroperoxide, POV 5960 meq/kg ($1\text{-}^{14}\text{C}$ -MLHP)

Group 3: $1\text{-}^{14}\text{C}$ -MLHP plus vitamin E

Group 4: $1\text{-}^{14}\text{C}$ -MLHP plus ethoxyquin

After 24 hours, all the fish were killed. The distribution of radioactivity in various tissues was compared among the four groups.

The results are summarized as follows:

- 1) The carp absorbed little hydroperoxide of methyl linoleate.
- 2) The distribution of radioactivity in Group 3 was about the same as that in the control (Group 1). It is suggested therefore that vitamin E may act as a peroxide decomposer and stabilizing factor of intestinal epithelium.
- 3) Since the radioactivity in Group 4 was negligible, ethoxyquin was not effective for absorption of hydroperoxide *in vivo*.

脂質酸化生成物に起因する魚類の栄養障害については、最近多くの研究がみられ^{1~12)}、これに対するビタミン E の治癒ないし予防効果がコイ、ハマチなどで明らかにされている。

しかし、脂質の酸化生成物の魚体内への取り込みや蓄積についてはまったく明らかにされていない。酸化脂質には多くの酸化生成物が含まれていることから、そのまま（酸化生成物の混合されたものとして）与えてそれら多くの生成物の取り込みを個々にみることは不可能であり、各酸化生成物を単離して追跡すべきであるが、実際にはこの操作はむずかしく個々の脂質酸化生成物の取り込みに関する研究は少ない。

最近、酸化脂質から過酸化物を容易に分離することができるようになったことから、シロネズミ体内におけるその代謝について検討されるようになってきた。

従来、シロネズミでは過酸化物は吸収され生体に蓄積されるとするもの¹⁸⁾、酸化脂質は蓄積されないとするもの¹⁴⁾、過酸化物それ自身は吸収されないが、腸管で分解後吸収されるとするもの^{15,16)}などいろいろな考

* 東海区水産研究所業績 B 第 554 号

** 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab., Kachidoki, Chuo-ku, Tokyo, Japan)

Table 1. Composition of test diet.

Group	1, 2	3	4
Casein	60	60	60
Gelatin	11	10	10
Dextrin	15	15	15
Minerals*	3	3	3
Vitamins**	1	1	1
Methyl linoleate	10	10	10
Vitamin E	0	1	0
Ethoxyquin	0	0	1

* McCullum's salt No. 185.

** Supplies per kg of diet: Thiamine nitrate 10 mg, Riboflavin 100 mg, Ca-pantothenate 100 mg, Pyridoxine-HCl 40 mg, Inositol 500 mg, Biotin 2 mg, Folic acid 5 mg, Choline chloride 1500 mg, Nicotinamide 200 mg, B₁₂ 0.02 mg, p-Aminobenzoic acid 80 mg, Ascorbic acid 400 mg, Menadione 8 mg, dl- α -Tocopheryl acetate 50 mg, A 5000 IU, D 500 IU.

標識過酸化脂質の調製 サフラワー油から分離したリノール酸メチルエステルを担体として調製した 1-¹⁴C-リノール酸メチルエステル (1-¹⁴C-ML) に室温で通気し、粗過酸化物 (POV 約 4000 meq/kg) を得た。これを精製し¹⁷⁾、標識リノール酸メチルエステル過酸化物 (1-¹⁴C-MLHP) を得た。このものは、POV 5960 meq/kg で、リノール酸自身の純度による補正などを考慮して理論値から過酸化物の純度を計算すると 98% となつた。以下の実験では、すべてこの精製した標識過酸化物を使用した。

試料脂質の投与方法 供試魚を MS 222 で麻酔し、ポリエチレン製カテーテルを用いて、2 日間、1 日 1 回、第 1 区には 1-¹⁴C-ML を、他の 3 区には 1-¹⁴C-MLHP を前腸部内に経口投与した¹⁸⁾。投与量は、各試験区 1 回 1 尾あたり 0.1 ml (約 0.8 μ Ci に相当) であつた。各回とも試料脂質の投与直前に、第 3 区には E を、第 4 区にはエトキシキンを試料脂質の 10 分の 1 量同様に注入した。

脂質の抽出 2 回目の試料脂質投与 24 時間後に魚を取り揚げ、麻酔し尾柄部を切断し採血した後、背側筋肉、腹側筋肉 (ともに皮を含む)、肝臓、腎臓、腸管 (内容物を含む)、生殖巣、その他の内臓 (主として脂肪組織) および頭部その他の部分に分け、各部位から熱ベンゼンで脂質を抽出した¹⁹⁾。

放射能の測定 GM 管 (理研 Model RSC-2TI) により脂質の放射能を測定し、各部位の放射能を算出した。

結 果

魚体各部の放射能と、脂質の比放射能の測定結果を Table 2 に示した。

第 1 区の 1-¹⁴C-ML 投与コイでは投与放射能に対して魚体各部の脂質から回収された放射能の合計 (回収率) は約 12% で最も高く、第 2 区の 1-¹⁴C-MLHP 投与コイのそれは第 1 区の 20 分の 1 という極端に低い値を示した。しかし、第 3 区の 1-¹⁴C-MLHP と E を投与したコイの場合には、第 1 区に近い放射能の取り込み (回収率約 10%) を認めた。一方同様にしてエトキシキンを投与した第 4 区では、取り込まれた放射能の総計は第 2 区に近い値を示した。

このように、コイにおいては過酸化物はほとんど吸収されずに排泄されるが、その際 E が共存すれば生体内への取り込みが促進されることが認められた。

え方があり、十分に整理された結論は得られていない。

いつばう、魚類では過酸化物が吸収されるか否かについてはまったく研究されていない。

そこで、著者は放射性過酸化脂質を用いてその吸収と、酸化脂質の解毒に有効とされているビタミン E (dl- α -tocopheryl acetate, 以下 E と略記する) およびエトキシキン (6-ethoxy-1, 2-dihydro-2, 2, 4-trimethylquinoline) の過酸化物の吸収におよぼす影響をコイについて検討したので、その結果を報告する。

実 験 方 法

供試魚と飼料組成 十分予備飼育した体重 130~140 g のコイ *Cyprinus carpio* 1 年魚 12 尾を 4 群に分け、Table 1 に示す飼料で 2 週間飼育した後に標識化合物を投与した。飼育は循環水槽で行ない、試験期間中の水温は 25°C に保つた。

Table 2. Distribution of radioactivity in various tissues 24 hours after $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ML and $1\text{-}^{14}\text{C}$ -MLHP administration.

Tissue	Group	Radioactivity ($\times 10^{-2}$ cpm)				Specific activity ($\times 10^{-3}$ cpm/g of lipid in tissue)			
		1	2	3	4	1	2	3	4
Dorsal muscle and skin		5.2	1.6	1.7	0.6	1.5	0.4	0.6	0.2
Ventral muscle and skin		3.4	1.2	2.5	0.3	1.0	0.2	1.0	0.1
Hepatopancreas		32.3	2.4	43.3	1.9	37.7	2.0	55.7	3.2
Kidney		14.2	0.4	0.4	0.1	70.5	1.9	2.6	0.2
Intestine and contents		135.3	2.4	157.1	1.9	144.7	2.5	142.4	2.8
Gonad		9.6	0.7	0.6	0.3	3.3	0.4	0.2	0.7
Other viscera		28.4	2.3	9.5	1.2	62.2	6.7	36.8	5.1
Blood*		12.8	0.4	2.8	2.1	22.5	3.0	3.5	2.6
Others		21.3	2.4	2.8	2.2	1.5	0.6	0.3	0.2
Total		262.5	13.8	220.7	10.6				

* Calculated on basis of 5% of body weight.

第1区と第3区について各部分の放射能分布を比較すると、両試験区とも放射性脂質の大部分は腸管およびその内容物と肝臓に分布し、第3区では腎臓、生殖巣、血液の放射能がかなり低いことが特徴的である。

考 察

先述したように過酸化物の吸収についてはまだ不明な点が多いが、本実験の結果から考察すると、コイは過酸化物をほとんど吸収しない。しかし、Eにより放射性脂質の取り込みが増す理由として過酸化物が分解されることにより吸収が促進されるものならば、Eは腸管内で過酸化物の分解に関与し吸収を助ける働きをしたものと考えられる。

シロネズミに過酸化物を単独で与えるとその大部分は糞と共に排泄されるというが²⁰⁾、第2区の腸管およびその内容物の脂質の放射能が低いことから、本実験では排泄物の放射能は測定していないが、コイにおいても本来過酸化物の吸収は悪く、測定時にはすでにその大部分が排泄されたものと考えられる。しかし、このように吸収はごくわずかではあつても、長期間与えつづけた場合それが蓄積し生体に何んらかの影響をおよぼすことも考えられる。今後検討すべき課題としては、長期間の蓄積を考えて魚に取り込まれた脂質の本体はどのようなものであるかを明らかにすることが必要である。

$1\text{-}^{14}\text{C}$ -MLHP とEを投与した第3区では、放射性脂質が肝臓に多く見出されていることから、過酸化物の投与後肝臓に至る過程でEが何んらかの働きをしたことは容易に想像できる。

Eは生体内で脂質の過酸化過程で free radical の生成を抑制する因子として働くといわれているが^{21,22)}、ここではEはすでに生成した過酸化物をより吸収されやすいようなものに変えるか、あるいは過酸化物そのものの吸収を促進するように働くなど今までいわれてきた free radical inhibitor 以外の働きをしたと考えたと説明が容易になる。

衣巻ら²⁰⁾はシロネズミにおいて、Eの投与により過酸化物の吸収が増加したことに対し、Eが過酸化物の分解に寄与したのではないかという考えを提示している。本実験結果においてもEは peroxide decomposer として働くというこの考え方を支持することができる。

いつばアミン系抗酸化剤であるエトキシキンには peroxide decomposer としての働きはないので、第4区ではエトキシキンが過酸化物の分解吸収に促進的に働かず魚体に放射性脂質がほとんど見出されなかつたことも、この考え方からすると当然な結果ということになる。

しかし、Eが peroxide decomposer として過酸化物の分解に働き吸収を促進するとする考え方は、実験的に証明されていないので²³⁾、過酸化物の生体内への取り込みに対してEが有効に働いた理由はこれ以外にもあるかもしれない。

最近、Eは膜の安定化に働くといわれているが、これにはEの生体内抗酸化剤としての働き^{21,22)}のほかに、Eの isoprenoid chain が重要な役割を果たしているものと考えられている²⁴⁾。そこで、本実験の場合過酸化物による腸管内壁の破壊¹⁶⁾を防ぐのにEが働いたものと考ええることも可能である。

現在のところ以上の2つの考え方が有力であるが、ここでは 1-¹⁴C-MLHP とともに摂取したEは、腸管を保護し正常な吸収がいとなまれるように作用し、さらにその peroxide decomposer としての作用によって過酸化物を分解し吸収をより有利にしたものと考えことにする。

その点エトキシキン は 1-¹⁴C-MLHP のコイ体内への取り込みを促進するように働いていない。エトキシキンは膜の安定化に対してどの程度作用するか明らかでないが、合成抗酸化剤の生体内での働きはEと違っている²⁵⁾、エトキシキンのコイ体内での働きには、Eといちじるしい差異があつても、不思議ではないと考えられる。

ところで第1区と第3区の放射能の分布が類似しているとはいつても、細かくみると第3区の腎臓、生殖巣および血液の脂質の放射能が第1区のそれにくらべて低いことから、Eの働きによつて吸収された 1-¹⁴C-MLHP 由来の脂質の代謝が 1-¹⁴C-ML の代謝と同様であると考えするには若干の抵抗がある。

今回の実験は、あくまでも極度に精製した過酸化物を与えた短期間の生物試験である。したがつて一般の飼料性疾病のように、飼料の一部としていろいろの酸化生成物を含む変敗脂質を長期に亘つて摂取する条件の場合では、過酸化物の吸収やそれによぼすEやエトキシキンの作用についても、以上述べたような簡単な推定ではかたずかない複雑な面を含んでいるように思われる。ただ、できるだけ実験の系を簡単にして正確な結果を求めることは、複雑な系での代謝機構をときほごす上に重要であると考え。従来、とかくこうした点に欠陥のあつたことは KAUNITZ²⁶⁾ によつても指摘されているが、本研究は魚類について初めてこうした考えにもとづいて実験を行ない過酸化物の吸収の一端を明らかにしたものである。

要 約

コイにおける脂質過酸化物の吸収とそれによぼすビタミンEおよびエトキシキンの影響について検討するために、放射性リノール酸メチルエステル、同過酸化物を用いて実験を行ない、つぎの結果を得た。

1. 過酸化物のみ投与した場合はほとんど吸収されない。
2. 放射性リノール酸メチルエステル過酸化物とビタミンEとを投与した場合、放射性脂質がコイ体内に多く見出されたことから、ビタミンEが過酸化物の分解や腸管膜の安定化に働き、過酸化物の分解吸収を促進したものと考えた。
3. エトキシキンには、このような作用は認められなかつた。

おわりに、本文をとりまとめるにあたり、有益なご助言をいただいた東海区水産研究所衣巻豊輔氏ならびに実験に協力された加藤紀子氏に感謝する。

文 献

- 1) T. ONO, F. NAGAYAMA, and T. MASUDA: *J. Tokyo Univ. Fish.*, **46**, 97~106 (1960).
- 2) 川津浩嗣: 淡水研報, **11** (1), 29~42 (1961).
- 3) 古川 厚・梅津武司・村上恭祥・川上一清: 内海水研刊行物, C-4, 55~59 (1965).
- 4) 橋本芳郎・岡市友利・渡辺 武・古川 厚・梅津武司: 本誌, **32**, 64~69 (1966).
- 5) 渡辺 武・松浦康修・橋本芳郎: 同誌, **32**, 887~891 (1966).
- 6) 渡辺 武・土屋孝夫・橋本芳郎: 同誌, **33**, 843~847 (1967).
- 7) 渡辺 武・橋本芳郎: 同誌, **34**, 1131~1140 (1968).

- 8) 岡 正雄: 魚病研究, **1** (2), 1~19 (1967).
- 9) 古川 厚・梅津武司: 内海水研刊行物, C-4, 61~69 (1965).
- 10) 坂口宏海・浜口 章: 本誌, **35**, 1207~1214 (1969).
- 11) 川津浩嗣: 淡水研報, **14** (1), 1~10 (1964).
- 12) 本莊鉄夫・熊沢 恒・大崎雅勝・米村 健・柏 元三: 油化学, **16**, 135~136 (1967).
- 13) 金田尚志・石井清之助・酒井寿恵・荒井君枝: 東海水研報, **12**, 1~73 (1955).
- 14) H. KAUNITZ, C. A. STANETZ, and R. E. JHONSON: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **38**, 301~305 (1961).
- 15) J. S. ANDREWS, W. H. GRIFFITH, J. E. MEAD, and R. A. STEIN: *J. Nutrition*, **70**, 199~210 (1960).
- 16) J. G. BERGAN and H. H. DRAPER: *Lipid*, **5**, 976~980 (1970).
- 17) M. G. KOKATNUR, J. G. BERGAN, and H. H. DRAPER: *Anal. Biochem.*, **12**, 325~331 (1965).
- 18) Y. TSUCHIYA and M. KAYAMA: *Tohoku J. Agr. Res.*, **9**, 41~52 (1958).
- 19) 山川健重・杉井麒三郎・岩崎喜久子・衣巻豊輔・東 秀雄: ビタミン, **27**, 269~278 (1963).
- 20) 衣巻豊輔・柴田宣和・荒井君枝: 同誌, **35**, 188~194 (1967).
- 21) A. L. TAPPEL: in "Vitamins and Hormones" (R. S. HARRIS and I. G. WOOL, ed.), Vol. 20, 493~510, Academic Press, New York and London (1962).
- 22) L. A. WITTING: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **42**, 908~913 (1965).
- 23) 衣巻豊輔: 本誌, **36**, 854~859 (1970).
- 24) J. A. LUCY: *Biochem. J.*, **99**, 57 P (1966).
- 25) 福場博保: 食衛誌, **11**, 313~320 (1970).
- 26) H. KAUNITZ: *Food Technol.*, **21**, 60~64 (1967).