高温脱臭ヤツメ鰻油及びイワシ油摂取マウスへの実験的リステリア感染の影響¹⁾

峯尾 哲,^{*,a} 小西靖彦,^b 佐藤康二,^c 柳沢厚生,^c
石川恭三,^c 倉田宗司^d

(財) 河野臨牀医学研究所薬理学研究室,^a 微生物学研究室,^b
杏林大学医学部第二内科学教室,^c 城西大学薬学部^d

Effects of Experimental *Listeria monocytogenes* Infection on Mice Fed on Lamprey or Sardine Oil Prepared under High-Temperature Deodorization¹⁾

Satoshi MINEO,^{*,a} Yasuhiko KONISHI,^b Koji SATOH,^c
Atsuo YANAGISAWA,^c Kyozo ISHIKAWA,^c
and Munetsugu KURATA^d

Department of Pharmacology^a and Department of Microbiology,^b The Kohno
Clinical Medicine Research Institute, 4-4 Kitashinagawa 3-chome,
Shinagawa-ku, Tokyo 140, Japan, Second Department of Internal
Medicine, Kyorin University School of Medicine,^c Mitaka, Tokyo
181, Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai
University,^d Keyakidai, Sakado, Saitama 350-02, Japan

(Received July 24, 1991)

Fresh lamprey (F-La) or sardine (F-Sa) oil is known to contain a large amount of *n*-3 polyunsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids. When F-La or F-Sa was deodorized with steam at 280°C under 1 mmHg for 1 h (H-La and H-Sa, respectively), the contents of EPA and DHA were reduced and unidentified peaks were newly detected by gas-liquid chromatography.

To know the biological influence of these high-temperature deodorized oils, the sterilizing function of the macrophage against *Listeria monocytogenes* was investigated in male ddY mice fed H-La or H-Sa. One week feeding of H-La or H-Sa lowered the LD₅₀ values of the bacteria injected intravenously. Numbers of the viable bacteria on the day 3 after intravenous injection were about 10 times higher in the liver and 5 times higher in the spleen of mice fed H-La or H-Sa as compared with those of the control group. These results suggest that the sterilizing function of fixed macrophages both in the liver and the spleen was suppressed in mice fed H-La or H-Sa.

Keywords—lamprey oil; sardine oil; eicosapentaenoic acid; docosahexaenoic acid; high-temperature deodorization; fixed macrophage; *Listeria monocytogenes*; intravenous injection

日本で古くより薬用として用いられているカワヤツメ (*Entosphenus japonicus* MARTENS) は、円口類ヤツメウナギ科 (Petromyzontidae) に属し、その搾油中には *n*-3 系多価不飽和脂肪酸 (*n*-3 PUFA) であるエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) が多く含まれている。²⁾ EPA や DHA を多く含有する魚油は血清脂質低下作用,⁸⁻¹⁰⁾ 血小板凝集能低下作用,¹¹⁾ さらに免疫抑制や増強作用¹²⁻¹⁵⁾ を有することが報告されている。一方、魚油に含まれる *n*-3 系 PUFA は炭素鎖が長く、二重結合の数が多いため加工処理あるいは加熱による変化を受けやすい。我々は *n*-3 系 PUFA を多く含む油を 1 mmHg の減圧下に水蒸気を通じながら 280°C で 1 時間脱臭処理したところ、EPA や DHA の含量が減少し、その減少量に応じてガスクロマトグラフのチャート上の EPA 及び DHA の保持時間の直後に新しいピークを観察した。^{16,17)} この高温脱臭処理した油をマウスに 1 週間摂取させると、肝臓の肥大と血清中の中性脂肪量の低下、さらに網内皮系機能の低下が認められた。¹⁸⁻¹⁸⁾ このことは高温脱臭処理により新たに生成した物質が肝臓に興味ある生物活性を示すと考えられた。そこで本実

験では高温脱臭処理したヤツメ鰻油あるいはイワシ油（ヤツメ鰻油と同様 *n*-3 系 PUFA を豊富に含有する）を摂取させたマウスにリステリアを感染させ、感染初期におけるマクロファージのリステリア排除に対する影響を検討した。

実験の部

飼料 飼料に添加するヤツメ鰻油 (La) とイワシ油 (Sa) は先報¹⁸⁾と同様に処理した。すなわち、日本薬局方の肝油の製造法に基づいて調製した新鮮油 (F)、その油を 1 mmHg の減圧下、水蒸気を通じながら 180°C で 1 時間脱臭処理した油 (L)、同様に 280°C で処理した油 (H) である。それぞれの油を飼育繁殖用飼料 (CE-2, 日本クレア, 東京) に 5% の割合で添加した。対照飼料は CE-2 とした。

動物 4 週齢の雄性 ddY マウス (日本エスエルシー, 静岡) を CE-2 で予備飼育後、実験飼料と水を自由摂取させた。飼育環境は室温 23±1°C, 湿度 55±5%, 照明は 12 時間サイクル (6 時点灯 18 時消灯) とした。動物は 1 群 5 匹で行い、LD₅₀ は 1 濃度あたり 5 匹用いた。

感染 *Listeria monocytogenes* (臨床分離株: 血清型 4b) を用いた。感染は実験食給餌 1 週間目に実施した。まず、生菌を腹腔 (i.p.: 4×10⁶—6.25×10⁴ colony forming unit (CFU)) あるいは静脈 (i.v.: 3.1×10⁵—2.4×10⁸ CFU) 注射して 14 日後まで観察し、それぞれの投与ルートにおける LD₅₀ を求めた。さらに、対照群と H-La, H-Sa 群について生菌 i.v. 注射 2 日後及び 3 日後に肝臓、脾臓を摘出した。臓器重量に応じて蒸留水を加え、ホモジナイズ後に希釈系列をつくり、混濁培養 48 時間後のコロニー数から臓器内生菌数を求めた。また、各群に生菌 3×10⁸ CFU を i.p. 注射し、30 分、1、2 時間後に腹水を採取、ギムザ染色後顕微鏡下で観察、細胞内外の菌数を測定した。なおマクロファージを誘導するために菌注射 3 日前に 5% ペプトン 0.2 ml を i.p. 注射した。

結果及び考察

リステリア感染の LD₅₀ に対する影響 (Table I)

リステリア感染 3 日後より死亡する個体が観察され、11 日後以降死亡する個体はなかった。リステリア i.v. 注射による LD₅₀ は F-La, F-Sa, L-La, L-Sa 群共に対照群の LD₅₀ 3.0×10⁴ CFU と差がなかった。一方、H-La 群では約 5 倍、H-Sa 群で 4 倍弱の低下が認められた。i.p. 注射は対照群の 4.2×10⁵ CFU に対し、その値は La 群よりも Sa 群で低い傾向が認められた。

リステリア感染後の肝臓及び脾臓中の生菌数に対する影響

H-La 群の肝臓中生菌数 (Fig. 1-A) はリステリア i.v. 注射 2 日後、3 日後とも対照群より約 10 倍多かった。脾臓中では肝臓中ほど差はないが、2 日から 3 日後にかけて対照群の生菌数は減少方向にあるのに対し、H-La 群は菌数が減少せず、3 日後には

TABLE I. Effect of Dietary Oils on LD₅₀ of *Listeria monocytogenes* in Mice

Diet	LD ₅₀ (CFU/mouse)	
	i.v. inj.	i.p. inj.
CE-2	3.0×10 ⁴	4.2×10 ⁵
F-La	2.0×10 ⁴	6.2×10 ⁵
L-La	2.3×10 ⁴	1.2×10 ⁶
H-La	5.9×10 ³	6.2×10 ⁵
F-Sa	4.2×10 ⁴	2.7×10 ⁵
L-Sa	3.6×10 ⁴	3.6×10 ⁵
H-Sa	7.9×10 ³	2.7×10 ⁵

Number of male mice in each CFU was five. *L. monocytogenes* was administrated intravenously (i.v.: 3.1×10⁵—2.4×10⁸ CFU) or intraperitoneally (i.p.: 4.0×10⁶—6.25×10⁴ CFU) after one week feeding of the experimental diets. The test animals were observed for 14d after challenge.

Fig. 1. Effect of Dietary Oils on Numbers of Viable Bacteria in the Liver and Spleen after i.v. Injection of *L. monocytogenes*

The results represent mean±S.D. a) denote statistically significant differences from animals fed on CE-2. ($p < 0.05$).

(A) 1×10⁸ i.v.; (B) 2×10⁸ i.v.
—, liver; ---, spleen. ●, CE-2. ■, (A) H-La; (B) H-Sa.

対照群の約 5 倍高値を示した。Fig. 1-B の結果は攻撃菌量が Fig. 1-A の 2 倍量であるが、対照群の肝臓、脾臓中生菌数は 2 日後と 3 日後で変わらない。しかし、H-Sa 群では 3 日後の生菌数は 2 日後よりも増加し、3 日後の生菌数は肝臓中で対照群より約 10 倍、脾臓中では約 5 倍多く、このことから H 群のリステリア排除能の低下が示された。

リステリア感染に対する腹腔内細胞の細菌処理能に対する影響

Fig. 2 に腹腔内のマクロファージと好中球の比と菌を取り込んでいる細胞の割合を示した。2 時間までは 3 群間に顕著な差は認められなかったが、3 時間になると対照群ではマクロファージ内にもはや菌はほとんど観察されず、好中球内にも約 1/3 以下しか菌が認められず、リステリアはかなり処理されたと考えられた。一方、H-La、H-Sa 群では好中球の約 5 割に菌が観察された。したがって H 群は菌の処理がやや遅い傾向がみられたが、有意な差は認められなかった。次に、細胞外菌数を細胞 1 個あたりに換算して、30 分後の値を 100 として表すと (Fig. 3)、対照群は 2 時間で 12%、3 時間では 1% 以下となった。これに対して H-La 群は 2 時間では 25%、3 時間では 9% と有意差はなかったが対照群よりも減少が遅かった。一方、H-Sa 群では 2 時間で約 60%、3 時間で約 30% と細胞外菌数の減少が低かった。この結果と細胞内菌数の結果とをあわせて考えると、対照群では時間の経過とともに菌が細胞内外から排除されているが、H-La 群では、好中球に残っている菌数の割合が対照群よりやや高く、細胞外菌数の減少も有意差はないが遅い傾向が示された。これに対して、H-Sa 群では細胞内外ともに菌が残存しており、H-La 群よりもさらに菌の排除が遅い。リステリア菌 i.p. 注射による LD₅₀ が H-La 群に比較して、H-Sa 群が低値を示した結果とも一致するものと考えられるが、H-La 群と H-Sa 群との相違の原因は明らかでない。

一方、静注感染させたリステリアは、肝・脾臓内において増殖し、その排除には好中球が機能しておらず感染 3 日後までは免疫系の関与もないとされている¹⁰⁾ので、この時期までの体内での菌増殖の程度を決定するのは固定マクロファージの貪食・殺菌能、及び血中からのマクロファージ浸潤能と数、それらの貪食・殺菌能の総和と考えられる。本実験におけるリステリア i.v. 注射の臓器内生菌数の結果と、すでに報告¹⁸⁾した高温脱臭処理した魚油を摂取したマウスにおけるカーボニクリアランスの訂正貪食指数 (α) 値の低下から、高温脱臭処理したヤツメ鰻油やイワシ油を摂取したマウスでは、固定あるいは血中マクロファージの機能が低下していることが示唆された。

Fig. 2. Influences of Dietary Oils on Function of Intraperitoneal Cells of Mice

The results represent mean $\pm$ S.D.
M, M ϕ ; P, PMN.

Fig. 3. Influences of Dietary Oils on Intraperitoneal Cells of Mice

The results represent mean $\pm$ S.D. a) denote statistical significances from animals fed on CE-2, ($p < 0.05$).

本実験で得られた高温脱臭処理油の影響は、ヤツメ鰻油やイワシ油に共通に含まれる EPA や DHA が高温処理により変化した物質が関与していると考えられる。一方、クロフィブレートを代表とする高脂血剤がラットやマウスの肝臓を肥大させると同時に、肝ペルオキシソームを増殖させること、また肝癌の発生にも関与する可能性があること^{20,21)}が報告されている。高温脱臭処理魚油あるいは窒素気流下高温処理した *n*-3 系 PUFA が肝ペルオキシソームを増殖させる（未発表）ことから、活性成分の化学構造を明らかにし、他の肝ペルオキシソーム増殖作用を有する物質との構造と活性の比較検討は大変興味深く現在研究中である。

謝辞 各種油を供与いただきました、北海道水産工業株式会社（東京）に深謝致します。

引用文献

- 1) 本論文の主要部は日本薬学会第 108 年会, 1988 年 4 月, 広島で発表した。
- 2) 佐藤康二, 柳沢厚生, 石川恭三, 峯尾 哲, 松本 仁, 佐藤利夫, 油化学, **38**, 184 (1989).
- 3) Y. Kobatake, K. Kuroda, S.-Y. Chung, S. Innami, *Ann. Rep. Natl. Inst. Nutr.*, **31**, 19 (1982).
- 4) T. O. Lossonczy, H. C. Bronsgeest-Schoute, C. M. Gent, R. J. J. Hermus, *Am. J. Clin. Nutr.*, **31**, 1340 (1978).
- 5) D. P. Sen, C. S. Bhandary, I. A. S. Murti, S. Narasimha Rao, B. Mukta, A. P. Pal, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 297 (1977).
- 6) Y. Kobatake, F. Hirahara, S. Innami, E. Nishide, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29**, 11 (1983).
- 7) K. Hirai, Y. Ohno, T. Nakano, K. Izutani, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **20**, 101 (1984).
- 8) Y. Kobatake, K. Kuroda, H. Jinnouchi, E. Nishide, S. Innami, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **30**, 357 (1984).
- 9) T. R. Kingsley, D. L. Snyder, *Lipids*, **23**, 564 (1988).
- 10) 橋詰博幸, 稲場 均, 溝田雅洋, 薬理と治療, **14**, 6197 (1986).
- 11) 室田誠逸, 森田育男, 医学のあゆみ, **130**, 787 (1984).
- 12) J. D. Prickett, D. R. Robinson, A. D. Steinberg, *J. Clin. Invest.*, **68**, 556 (1981).
- 13) J. D. Prickett, D. R. Robinson, A. D. Steinberg, *Arthritis Rheum.*, **26**, 133 (1983).
- 14) L. G. Cleland, J. K. French, W. H. Betts, G. A. Murphy, M. J. Elliot, *J. Rheumatol.*, **15**, 1471 (1988).
- 15) J. D. Prickett, D. R. Robinson, K. J. Bloch, *Immunology*, **46**, 819 (1982).
- 16) 峯尾 哲, 小西靖彦, 目鳥幸一, 田中利明, 佐藤康二, 柳沢厚生, 石川恭三, 松本 仁, 佐藤利夫, 医学のあゆみ, **147**, 207 (1988).

-
- 17) 峯尾 哲, 小西靖彦, 目鳥幸一, 田中利明, 佐藤康二, 柳沢厚生, 石川恭三, 松本 仁, 佐藤利夫, 日本
栄養・食糧学会誌, **42**, 417 (1989).
 - 18) 峯尾 哲, 小西靖彦, 目鳥幸一, 田中利明, 佐藤康二, 柳沢厚生, 石川恭三, 松本 仁, 佐藤利夫, 薬誌,
110, 27 (1990).
 - 19) K. Tatsukawa, M. Mitsuyama, K. Takeya, K. Nomoto, *J. Gen. Microbiol.*, **115**, 161 (1979).
 - 20) J. K. Reddy, N. D. Lalwani, *Crit. Rev. Toxicol.*, **12**, 1 (1983).
 - 21) J. K. Reddy, *Biochem. Soc. Trans. U. K.*, **18**, 91 (1990).