

修士論文

ラットにおける n-3 および n-6 系多価不飽和脂肪酸の
生理作用に関する研究

東北大学大学院 農学研究科
生物産業創成科学専攻
生体分子機能学研究室
指導教官 池田 郁男
学籍番号 A6AM1319
氏名 高橋 尚子

目次

序論 (1)

第一章 ラットにおける n-3 系ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸の生理作用の比較

緒言 (6)

方法 (7)

結果 (18)

考察 (35)

第二章 ラットにおける n-3 系ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸の吸収

緒言 (39)

方法 (40)

結果 (44)

考察 (47)

第三章 アラキドン酸がラットの脂質代謝に及ぼす影響

緒言 (49)

方法 (50)

結果 (53)

考察 (62)

総括 (64)

参考文献 (67)

謝辞 (70)

序論

今日、心筋梗塞を中心とした心血管系疾患と、脳梗塞、脳卒中を中心とした脳血管障害による死亡は、日本人の死因統計上がんと共に大きな位置を占め、死因の 30%に及んでいる (1)。食習慣や休養・運動習慣の乱れ、喫煙や加齢が高血圧症、高脂血症、肥満耐糖異常などの危険因子を招来して動脈硬化を進展させ、最終的には心筋梗塞、脳梗塞、脳卒中などの血管系の重篤な合併症を引き起こす。日本は世界に先駆けて高齢化しており、益々その頻度の増加が予想され、その有効な予防対策は必須の課題である。

脂質はエネルギー源として重要であるばかりでなく、多様な生理機能をもっている。我々が栄養成分として摂取する脂質の大部分であるトリグリセリドは体内に長い間貯蔵できるエネルギー源であり、リン脂質は組織の細胞膜を形成している。これらは脂肪酸を構成成分として含んでおり、日常摂取する脂肪酸の種類は血栓塞栓性疾患と密接に関係している。脂肪酸は二重結合の数により飽和脂肪酸、一価不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸に分類され、脂肪酸の種類により生理作用が異なることが知られている。飽和脂肪酸は血清総コレステロールおよび低密度リポタンパク質 (LDL) コレステロールを増加させ、飽和脂肪酸の摂取を不飽和脂肪酸にかえると血清総コレステロール、LDL コレステロールは低下する。多価不飽和脂肪酸には n-6 系と n-3 系があり、必須脂肪酸として重要な役割をもつ。

n-6 系多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸 (20:4n-6,AA) は生体内でリン脂質に多く含まれており、細胞膜を構成する主要な脂肪酸の一つで、神経系や免疫系の機能にも関わっている。細胞膜が生理的刺激を受けるとホスホリパーゼ A₂ が活性化され、リン脂質からアラキドン酸が遊離する。次いで遊離したアラキドン酸はミクロソームに存在するシクロオキシゲナーゼの作用により速やかに代謝されて、局所的生理活性物質であるエイコサノイドに変換される (2)。エイコサノイドは炎症や痛み、アレルギー、血圧調節、血液凝固等の諸機能を仲介する。アラキドン酸からは大動脈で作られ、血小板凝集抑制作用を有するプロスタグランジン I₂ (PGI₂) や血小板で作られ、血小板凝集作用を有するトロンボキサン A₂ (TXA₂) などの主要なエイコサノイドが合成される。しかし、アラキドン酸を過剰に摂取するとトロンボキサン A₂ による血小板凝集、血管収縮を亢進し、血栓形成、心筋梗塞の引き金となる悪影響が懸念される (3-9)。

n-3 系多価不飽和脂肪酸のエイコサペンタエン酸 (20:5n-3,EPA) やドコサヘキサエン酸 (22:6n-3,DHA) は血清トリグリセリド (TG) 濃度低下作用や血小板凝集抑制作用、心筋梗塞の予防作用、アレルギー疾患や発ガン抑制作用など多岐

にわたる有用な作用をもつことが知られている (10-15)。n-3 系多価不飽和脂肪酸による心筋梗塞の予防作用は n-3 系多価不飽和脂肪酸がアラキドン酸と競合して組織リン脂質の 2 位に取り込まれるため、リン脂質中のアラキドン酸を減少させ、アラキドン酸から合成されるエイコサノイド産生を抑制することによって由来する (16-19)。また、エイコサペンタエン酸から合成されるトロンボキサン A₃の血小板凝集作用は、トロンボキサン A₂に比べて弱く、プロスタグランジン I₃はプロスタグランジン I₂とほぼ同程度の血小板凝集抑制作用を示す。よって、n-3 系多価不飽和脂肪酸は高脂血症や脳卒中等の生活習慣病を予防する機能性食品成分として注目されている。

n-3 系多価不飽和脂肪酸を多く含む天然に存在する油脂は海産動物油であるが、哺乳動物と魚類ではトリグリセリド中での結合位置が異なることが知られている。種類にもよるが魚油では n-3 系多価不飽和脂肪酸はトリグリセリドの sn-2 位に多く、海産動物のアザラシに含まれる油では sn-1 位及び 3 位に多く含まれている。このアザラシの肉を多量に摂取しているイヌイットは冠動脈疾患が非常に少ないという疫学調査がある (20)。sn-1 位及び 3 位にエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸が多く結合しているアザラシ油と sn-2 位にエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸が多く結合している魚油をラットに摂食させ、効果を比較する研究が以前に行われた (21)。その結果、アザラシ油を摂食したラットでは魚油を摂食したラットに比べ、肝臓及び血清トリグリセリド濃度が低下した。n-3 系多価不飽和脂肪酸はリノール酸 (18:2,n-6) からアラキドン酸への転換を抑制することが知られているが、アザラシ油で肝臓及び血清リン脂質画分のアラキドン酸の割合が低く、血清ホスファチジルコリン画分と肝臓ホスファチジルエタノールアミン画分の n-3 系多価不飽和脂肪酸の割合が高かった。さらに、血小板凝集抑制作用のある大動脈プロスタサイクリンと血小板凝集作用のあるトロンボキサン A₂の比はアザラシ油で高かった。以上の結果から、アザラシ油は魚油よりもエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸の作用が強く動脈硬化症に予防的であることが示された。

グリセロールの特定の位置に特定の脂肪酸が結合し、特別の機能性を発揮するトリグリセリドは構造脂質と呼ばれ、その作用について幾つか報告がある (22-29)。Yamamoto らは、リノール酸がトリアシルグリセロールの sn-2 位に多い油脂と sn-1 位及び 3 位に多い油脂を調整し、ラットに与えたところ、sn-2 位にリノール酸が多い油脂で血漿コレステロール濃度低下作用を確認した (28)。このように構造脂質には様々な報告があるが、メカニズムは未だ不明である。

アザラシ油での効果もエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸のトリグリセリド中での結合位置の違いによるものと考えられるが、この実験で用いたアザラシ油には n-3 系ドコサペンタエン酸 (22:5n-3,DPA) が魚油の 4 倍量、食

餌脂肪中の 1.2%含まれていた。n-3 系ドコサペンタエン酸はエイコサペンタエン酸からドコサヘキサエン酸へ代謝される際の間体と考えられているが、その生理作用をエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸と比較した研究は報告されていない。よってアザラシ油の効果は n-3 系ドコサペンタエン酸による作用とも考えられる。そこで第一章では n-3 系ドコサペンタエン酸の生理作用をエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸と比較するため、ラットの摂食試験を行った。そして、血清及び肝臓の脂質濃度、肝臓における脂質代謝関連酵素の活性、各組織の脂肪酸組成、エイコサノイド産生に及ぼす影響を比較した。続く第二章では n-3 系ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸のリンパへの吸収率を調べた。

次に、これまで n-6 系多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸は高血圧や炎症の原因であるエイコサノイドの前駆体であることから、どちらかという悪玉という見方がされてきた。しかし、1993 年に Carlson らによって乳幼児の成長におけるアラキドン酸の重要性が示されて以来 (30)、アラキドン酸の機能性に注目が集まっている。Birch らは、成熟児に調製乳、ドコサヘキサエン酸配合調製乳、ドコサヘキサエン酸+アラキドン酸配合調製乳を生後 5 日目から 17 週目まで与え、18 ヶ月目に総合的な知能、運動量を比較した。精神運動発達指標（歩行、ジャンプ、お絵かき）では有意差は見られなかったが、ドコサヘキサエン酸のみでなくアラキドン酸も配合することにより全米平均を上回る結果を得た。精神発達指標（言語能力や記憶力）はドコサヘキサエン酸のみでなくアラキドン酸も配合することで有意に高値を示した (31)。欧米ではアラキドン酸やドコサヘキサエン酸を配合した調製乳が発売され、一般的となっている。近年では、高齢者では年齢とともに脳のアラキドン酸が減少すること、また栄養としてアラキドン酸を補うことで脳のアラキドン酸量が改善し、脳機能の低下が抑えられることがヒトおよびラットによる試験の結果から明らかとなった (32)。脳にはアラキドン酸とドコサヘキサエン酸は約 1 : 1 で含まれている (33)。Kotani らは老齢ラット (18.5 ヶ月齢) にアラキドン酸配合飼料 (アラキドン酸量 : 40mg/日) またはアラキドン酸を含まない飼料を与え、20.3 ヶ月目からプールで場所課題訓練 (プール内の決まった場所に水面下に見えない台を設置し、異なる複数の出発点からこの台へ泳ぐことを学習させ、次に台を取り除き 60 秒間遊泳させ、台のあった領域の探索行動で記憶の最終確認をする) を行った。その結果、アラキドン酸を摂食したラットは有意に長時間、台のあった場所を探索したが、アラキドン酸を摂食していないラットではそのような傾向はなく、アラキドン酸が学習速度によい影響を与えること、それが脳内のアラキドン酸量と相関することを示した (34)。ヒトにおいても老化により減少した脳のアラキドン酸を、アラキドン酸を摂取して補うことで、学習・記憶能力が高まることや認知応答、

抑うつ状態の改善などが報告されている (35-37)。

しかし、一方でアラキドン酸摂取によるトロンボキサン A₂ などのエイコサノイド過剰産生による血小板凝集、血栓形成、心筋梗塞という悪影響が懸念される (3-9)。そこで第三章では平均的な日本人の日常摂取量、および市販のサプリメントで推奨されている量、その 2 倍量の食餌アラキドン酸が及ぼす影響をラットで検討した。

本論文では以下の略号を用いた。

SFA：飽和脂肪酸、MUFA：一価不飽和脂肪酸、PUFA：多価不飽和脂肪酸、EPA：エイコサペンタエン酸、DPA：ドコサペンタエン酸、DHA：ドコサヘキサエン酸、AA：アラキドン酸、sn：stereospecific numbering、TG：トリグリセリド、CoA：コエンザイム A、PGI₂：プロスタサイクリン、TXA₂：トロンボキサン A₂、PC：ホスファチジルコリン、PE：ホスファチジルエタノールアミン、VLDL：超低密度リポタンパク質、HDL：高密度リポタンパク質、EDTA：エチレンジアミン四酢酸ナトリウム、NAD：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、NADP：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸、DTNB：ジチオビス (2-ニトロ安息香酸)、FAD：フラビンアデニンジヌクレオチド

第一章 ラットにおける n-3 系ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸の生理作用の比較

緒言

n-3 系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) であるエイコサペンタエン酸 (20:5n-3,EPA) やドコサヘキサエン酸 (22:6n-3,DHA) は血清脂質濃度低下作用や組織リン脂質中のアラキドン酸 (20:4n-6,AA) 量を減少させることによる AA 由来のエイコサノイド産生を抑制し、心筋梗塞予防作用をもつことが知られている (16-19)。

この n-3 系多価不飽和脂肪酸は海産動物であるアザラシに含まれる油ではトリグリセリド(TG)の sn-1 位または 3 位に多く結合しているという特徴がある。以前の研究において、アザラシ油と sn-2 位に EPA、DHA が多く結合している魚油をラットに摂食させ、その生理作用を比較した結果、アザラシ油を摂食したラットで、魚油を摂食したラットよりも血清と肝臓の TG 濃度が低く、肝臓リン脂質中の AA の低下作用が強いなど、n-3 系多価不飽和脂肪酸の効果が強いことが示された (21)。この実験では n-3PUFA 量はアザラシ油と魚油で等しくしていたため、アザラシ油効果での効果は TG 中での EPA、DHA の結合位置の違いによる作用と推測されるが、アザラシ油には魚油の 4 倍量、食餌脂肪中の 1.2%相当の n-3 系ドコサペンタエン酸 (22:5n-3,DPA) が含まれていた。よってアザラシ油での効果は DPA の作用とも考えられる。DPA は EPA から DHA へ代謝される際の間体と考えられているが、これまでその生理作用を EPA、DHA と比較した研究はなく、生理作用は明らかとなっていない。

そこで DPA、EPA あるいは DHA をラットに摂食させ、脂質代謝に及ぼす効果の違いを検討した。

実験方法

<実験試薬>

用いた試薬は以下の通りである。

食餌脂質は以下 6 つの油脂を混合して調製した。パーム油（不二製油）、ハイオレイックサフラワー油（日清オイリオグループ）、ハイリノールサフラワー油（日清オイリオグループ）、エイコサペンタエン酸エチルエステルおよびドコサペンタエン酸エチルエステルおよびドコサヘキサエン酸エチルエステルは日本水産より提供していただいた。

デキストラン硫酸水溶液 (Sigma)、塩化マグネシウム 6 水和物 (和光純薬工業)、トリグリセライド E-テストワコー (和光純薬工業)、コレステロール E-テストワコー (和光純薬工業)、リン脂質 C-テストワコー (和光純薬工業)、リン酸二水素カリウム (和光純薬工業)、イソプロパノール (和光純薬工業)、70%過塩素酸 (和光純薬工業)、モリブデン酸アンモニウム (半井化学)、アスコルビン酸 (和光純薬工業)、Tris (hydroxymethyl) aminomethane (和光純薬工業)、EDTA・2Na (Dojindo)、Sucrose (和光純薬工業)、炭酸ナトリウム (関東化学)、水酸化銅五水和物 (半井化学)、酒石酸カリウムナトリウム四水和物 (半井化学)、フェノール試薬 (半井化学)、トリクロロ酢酸 (和光純薬工業)、水酸化ナトリウム (和光純薬工業)、Albumin bovine serum (Sigma)、Potassium phosphate, monobasic (和光純薬工業)、Acetyl-CoA (Sigma)、NADPH (Sigma)、Malonyl-CoA (Sigma)、Magnesium chloride hexahydrate (関東化学)、塩酸 (和光純薬工業)、Glucose(D-)-6-phosphate disodium salt (オリエンタル酵母)、NADP⁺ (オリエンタル酵母)、Phosphogluconate dehydrogenase (オリエンタル酵母)、Triethanolamine (半井化学)、L(-)-Malic acid (和光純薬工業)、Manganese chloride tetrahydrate (関東化学)、Triton X-100 (Sigma)、Palmitoyl-CoA lithium salt (Sigma)、L-carnitine hydrochloride (Sigma)、Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) (半井化学)、4-Aminoantipyrine (和光純薬工業)、Phenol (関東化学)、水酸化カリウム (和光純薬工業)、Flavin adenine dinucleotide disodium salt (FAD) (Sigma)、Peroxidase from Horseradish (和光純薬工業)、塩化カリウム (和光純薬工業)、硫酸マグネシウム (和光純薬工業)、炭酸水素ナトリウム (和光純薬工業)、ギ酸 (和光純薬工業)、酢酸 (和光純薬工業)、プリムリン (Aldrich)、硫酸 (和光純薬工業)、塩化ナトリウム (和光純薬工業)。

また、以下の溶媒は和光純薬工業から購入し、蒸留したものを用いた。
アセトン、ヘキサン、ジエチルエーテル、クロロホルム、メタノール、エタノール

<実験動物と飼料>

本研究は、「東北大学における動物実験に関する指針」に従って計画を策定し、実施した。

実験動物はSD系雄性ラット4週齢（日本クレア）を用いた。飼育条件は室温約24℃、12時間の明暗サイクル（8:00点灯、22:00消灯）とし、金属ケージにて個別飼育をした。予備飼育期間は市販固形飼料CE-2（日本クレア）と水を自由摂取させた。6日間予備飼育後、平均体重161gのラットを6匹ずつ4群に群分けした。

実験食はAIN-93G純化食を用い、脂肪が食餌中10%となるようにした。食餌組成をTable 1に示す。

食餌n-3系ドコサペンタエン酸（DPA）、エイコサペンタエン酸（EPA）、ドコサヘキサエン酸（DHA）による生理作用を比較するためには、他の脂肪酸による影響が出ないように、食餌脂肪の含量、脂肪酸組成を等しくする必要がある。そこで、パーム油、ハイオレイックサフラワー油、ハイリノールサフラワー油、及びEPAエチルエステルとDPAエチルエステル、DHAエチルエステルを用いて、平均的日本人の食餌脂肪酸組成に近くなるよう、飽和脂肪酸（SFA）：一価不飽和脂肪酸（MUFA）：n-6多価不飽和脂肪酸（PUFA）：n-3PUFA=33：33：23：10に調製した。コントロール群はSFA：MUFA：n-6PUFA=33：33：33に調製し、n-3PUFAを含まない食餌とした。n-3PUFAを含まない群（CO群）、食餌脂肪中に10%EPAエチルエステルを含む群（EPA群）、食餌脂肪中に10%DPAエチルエステルを含む群（DPA群）、食餌脂肪中に10%DHAエチルエステルを含む群（DHA群）の4群を設けて、ラットに21日間摂食させた。使用した油脂の混合割合をTable 2、各群の食餌脂肪酸組成はTable 3に示す。

各群の混合油を食餌へ混合後、酸化を防ぐため、1日分ごとにハイバリア保存袋に入れ、アルゴンガス封入し、-25℃で保存した。さらに、油の酸化を防ぐ目的で、ラットには18時から翌朝9時に限って摂食させた。

ラットに3週間摂食させた後、最終日に7時間（7:00-14:00）絶食し、エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血、屠殺し、各組織（肝臓、心臓、脾臓、脳、大動脈、脂肪組織）を摘出した。臓器は分析まで-80℃で保存した。

<測定項目および方法>

血清脂質濃度

○ 血清分画

血液を採取してから30分室温で放置した後、氷中で保存し、3000rpm、4℃で遠心分離し、血清を得た。

○ 高密度リポタンパク質 (HDL) 分画

血清 1000 μ L に対し、分画試薬 (デキストラン硫酸水溶液 : 塩化マグネシウム 6 水和物 = 1 : 1) を 100 μ L 加えた。5 秒間混和後、室温に 10 分間放置し、室温にて 3000rpm で 10 分間遠心分離を行った。沈殿が生じた場合は上清を、凝集した成分が浮遊した場合は 26G 針でエッペンチューブに穴を開け下層を、凝集成分が全体にある場合は再度攪拌、遠心分離を行った。凝集成分が取り除けないものに関しては一度全てを 2.5mL 容の注射筒に移し、Whatman のフィルターを用いてろ過を行った。

○ 血清トリグリセリド (TG) 濃度

トリグリセライド E-テストワコー (和光純薬工業) を用いた。
血清 20 μ L または標準液 (グリセリン 31.2mg/dL = トリオlein 300mg/dL 相当) を水で 1/2 薄釈した溶液 20 μ L を試験管にサンプリングし、発色試薬を 1.5mL 加え混和した。その後 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートし、常温に戻した後、ブランクを対照として 660nm の吸光度を測定した。

○ 血清総コレステロール濃度

コレステロール E-テストワコー (和光純薬工業) を用いた。
血清 20 μ L または標準液 (200mg/dL 相当) を水で 1/2 薄釈した溶液 20 μ L を試験管にサンプリングし、発色試薬を 1.5mL 加え混和した。その後 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートし、常温に戻した後、ブランクを対照として 660nm の吸光度を測定した。

○ 血清 HDL コレステロール濃度

HDL 分画を行った後の血清について、総コレステロールと同様の操作を行った。

○ 血清リン脂質 (PL) 濃度

リン脂質 C-テストワコー (和光純薬工業) を用いた。
血清 20 μ L または標準液 (塩化コリン 54mg/dL = リン脂質 300mg/dL 相当) を水で 1/2 薄釈した溶液 20 μ L を試験管にサンプリングし、発色試薬を 1.5mL 加え混和した。その後 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートし、常温に戻した後、ブランクを対照として 660nm の吸光度を測定した。

肝臓脂質濃度

○ 肝臓脂質抽出

脂質の抽出は Folch らの方法 (38) で行った。肝臓 0.5g をメタノール 15mL、続いてクロロホルム 30mL でホモジナイズし、50mL 容メスフラスコに移した後、40°C、30 分加温抽出した。常温に戻した後、クロロホルム：メタノール=2：1 で 50mL に fill up し、50mL 容メスシリンダーにろ過してタンパクを除去した。ろ液量の 20%容の脱イオン水を加え、共栓をして転倒混和し、5°Cで一晩放置した。

抽出液の上層を除去し（境界面の白濁層にはリン脂質層が含まれるため残した）、メタノールでメスシリンダーから下層を丸底フラスコに全て洗いこんだ。濃縮装置にセットし、窒素ガスを吹きつけながら減圧吸引を行って溶媒を除去した。水分を完全に除去した後、クロロホルムを加えても濁りがないことを確認した後に（濁った場合は水分を含んでいるため再びメタノールを入れて減圧濃縮を繰り返した）、ヘキサンを加え、ヘキサンで濃縮キャピラリー、共栓を洗い、25mL 容メスフラスコに移した（fill up は分析直前に行うようにしたため、この時点ではしなかった）。

○ 肝臓トリグリセリド濃度

トリグリセライド E-テストワコー（和光純薬工業）を用いたが、これは本来血清用のキットである。血清の脂質はリポタンパクを形成しているため、発色試薬に溶解し反応する。しかし、肝臓抽出脂質は溶解しないため以下のようにイソプロパノールに溶解させる方法を行った。

濃縮後の肝臓脂質を 25mL 容メスフラスコにヘキサンで fill up した後、0.5mL サンプルングし、窒素ガスでドライアップした。次にヘキサン 5mL に溶解して、ボルテックスをし、すぐに別の試験管に 0.5mL とった。ドライアップ後、イソプロパノール 100 μ L を加えボルテックスをして脂質を完全に溶解させ、脱イオン水 20 μ L を加え、発色試薬を 1.5mL 加え混和した。スタンダード (60 μ g) は標準液 (グリセリン 31.2mg/dL=トリオレイン 300mg/dL 相当) 20 μ L にイソプロパノール 100 μ L を加えボルテックスをし、発色試薬 1.5mL を加え混和した。その後 37°C で 5 分間インキュベートし、常温に戻した後、ブランクを対照として 660nm の吸光度を測定した。

反応液に濁りがある場合は 2.5mL 容の注射筒に移し、Whatman のフィルターを用いてろ過を行って濁りを除去してから、吸光度を測定した。

○ 肝臓コレステロール濃度

コレステロール E-テストワコー（和光純薬工業）を用いたが、これは本来血

清用のキットである。血清の脂質はリポタンパクを形成しているため、発色試薬に溶解し反応する。しかし、肝臓抽出脂質は溶解しないため以下のようにイソプロパノールに溶解させる方法を行った。

濃縮後の肝臓脂質を 25mL 容メスフラスコにヘキササンで fill up した後、0.5mL サンプルングし、窒素ガスでドライアップした。イソプロパノール 100 μ L を加えボルテックスをして脂質を完全に溶解させ、脱イオン水 20 μ L を加え、発色試薬を 1.5mL 加え混和した。スタンダードは (40 μ g) 標準液 (200mg/dL 相当) 20 μ L にイソプロパノール 100 μ L を加えボルテックスをし、発色試薬 1.5mL を加え混和した。その後 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートし、常温に戻した後、ブランクを対照として 660nm の吸光度を測定した。

反応液に濁りがある場合は 2.5mL 容の注射筒に移し、Whatman のフィルターを用いてろ過を行って濁りを除去してから、吸光度を測定した。

○ 肝臓リン脂質濃度

血清用のリン脂質キットはコリン基を定量して測定するものだが、肝臓中にはその他のリン脂質が多く含まれるためキットでは測定できない。そのため、肝臓リン脂質濃度は化学法 (39) で測定した。濃縮後の肝臓脂質を無リン洗浄した試験管に 1mL サンプルングし、ドライアップした。次にヘキササン 5mL に溶かし、ボルテックスをかけ、そこから無リン洗浄した別の試験管に 1mL とった。ドライアップ後、70%過塩素酸 1mL を加え攪拌し、180 $^{\circ}$ C で 1 時間加熱し、溶液が無色になったところで取り出した。常温に戻した後、脱イオン水 5mL を加えた。スタンダードは以下のように作成した。110 $^{\circ}$ C で 1 時間乾燥させた KH_2PO_4 を 439.4mg 量り取り、脱イオン水に溶解して 100mL に fill up した (1mgP/mL)。この原液を 100 倍希釈し (10 μ gP/mL)、0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL を無リン洗浄した試験管にそれぞれサンプルングし、脱イオン水を 5.0、4.8、4.6、4.4、4.2、4.0mL 加えボルテックスをした (0、2、4、6、8、10 μ g)。この後の操作はスタンダードも同様に行った。2.5%モリブデン酸アンモニウム 1mL を加え、よく攪拌し、10%アスコルビン酸を 1mL 加えた。攪拌後、試験管にビー玉をのせて 5 分間煮沸し、常温に戻してから 820nm の吸光度を測定した。

肝臓脂質代謝関連酵素活性

○ 酵素源の調製

肝臓約 1.5g を氷冷下で 0.25M ショ糖と 1mM EDTA を含む 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) 12mL でホモジナイズした。その後、700 \times g、5 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離して核を沈殿させ、上清の総ホモジネート画分を得た。浮遊している脂

肪を除去した後、よく混合してカルニチンアシルトランスフェラーゼ、アシル CoA オキシダーゼ活性測定用のホモジネート画分としてサンプリングし、 -80°C で保存した。さらに残りの総ホモジネート画分を $125000\times g$ 、 4°C で 60 分間遠心分離してマイクロソームを沈殿させ、上清のサイトソル画分を得た。これをよく混合して脂肪酸合成酵素、グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸酵素活性測定用のサイトソル画分としてサンプリングし、 -80°C で保存した。

○ 酵素活性測定

<各画分のタンパク量>

各画分のタンパク量は Lowry 法で測定した (40)。サンプルをガスクロチューブに $100\mu\text{L}$ サンプリングし、10% (w/v) のトリクロロ酢酸を 1.5mL 加えボルテックスをかけた後、 3000rpm で 15 分遠心分離し、上清を除いた。この沈殿にエタノール：エーテル：塩酸 = 75 : 24 : 1 (v/v/v) 溶液を 1mL 加え、軽くボルテックスをかけて 10°C 、 3000rpm で 15 分遠心分離し、上清を除いてガスクロチューブをろ紙上に逆さまにし、溶液を完全に除去した。(水分が除去しにくい時はドライヤーを用いて乾燥させた。) 0.8N NaOH を 1mL 加え、 $60^{\circ}\text{C}\sim 80^{\circ}\text{C}$ のウォーターバスの中で完全に沈殿を溶かした。脱イオン水 1mL を加えボルテックスをかけてよく攪拌し、試験管にサンプリングし (サイトソル : $125\mu\text{L}$ 、ホモジネート : $60\mu\text{L}$)、 0.4N NaOH で希釈した (サイトソル : $375\mu\text{L}$ 、ホモジネート : $440\mu\text{L}$)。スタンダードには Bovine Serum Albumin ($100\mu\text{g} / 0.5\text{mL } 0.4\text{N NaOH}$ 溶液) を 0、10、20、40、60、80、 $100\mu\text{L}$ を試験管にサンプリングし、 0.4N NaOH を 500、450、400、300、200、100、 $0\mu\text{L}$ 加えたものを用いた (0、10、20、40、60、80、 $100\mu\text{g}/0.5\text{mL}$)。この後の操作はスタンダードも同様に行った。500A reagent (0.1N NaOH、2% Na_2CO_3) : B1 reagent (0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) : B2 reagent (1% 酒石酸 NaK) = 100 : 1 : 1 (v/v/v) の割合で混合した溶液を 2.5mL 加え、ボルテックスをかけ、約 10 分放置した。次いでフェノール試薬 250mL を加え、ボルテックスをかけ、60 分以上暗所放置した。ガラスセルを用いて分光光度計で 660nm における吸光度を測定した。

<脂肪酸合成酵素活性>

脂肪酸合成酵素活性は Kelley らの方法で分析した (41)。最終濃度 0.05mM アセチル CoA、 0.3mM NADPH および 0.2mM EDTA を含む 100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) にサイトソルを添加し、NADPH の減少を 30°C 、 340nm で 1.5 分間追跡し (ブランク)、その後マロニル CoA (最終濃度 0.2mM) を加えて混合し、さらに 5 分間追跡した (総容量 1mL)。得られた吸光度の傾きからブランクの傾きを差し引くことにより、NADPH の減少速度を求めた (NADPH のモル吸

光係数 6,220)。

<グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性>

グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性は Kelley らの方法で分析した (42)。最終濃度 3.3mM グルコース 6-リン酸、1.2mM NADP、0.5 U 6-ホスホグルコネイトデヒドロゲナーゼおよび 30mM 塩化マグネシウムを含む 100mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.6) に、サイトソルを添加し、生成した NADPH の増加を 30°C、340nm で 4 分間吸光度を追跡し (総容量 1mL)、得られた吸光度の傾きから NADPH の生成速度を求めた。

<リンゴ酸酵素活性>

リンゴ酸酵素活性は Ochoa らの方法で分析した (43)。最終濃度 1.2mM L-リンゴ酸、4mM 塩化マンガン、1.2mM NADPH を含む 64mM トリエタノールアミン緩衝液 (pH7.4) にサイトソルを添加し (総容量 1mL)、27°C、340nm で 2 分間吸光度を追跡し、得られた吸光度の傾きから NADPH の生成速度を求めた。

<カルニチンアシルトランスフェラーゼ活性>

カルニチンアシルトランスフェラーゼ活性は Markwell らの方法で分析した (44)。最終濃度 0.04mM パルミトイル CoA、0.25mM DTNB、1.25mM EDTA および 0.1% Triton-X100 を含む 58mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に総ホモジネートを添加し、30°C、412nm で 5 分間追跡し (ブランク)、その後 L-カルニチン (最終濃度 1.25mM) を添加し、CoA の生成を 5 分間追跡した (総容量 1mL)。得られた吸光度の傾きからブランクの傾きを差し引くことにより CoA の生成速度を求めた (CoA と DTNB から生じる黄色色素 TNB のモル吸光係数 13,600)。

<アシル CoA オキシダーゼ活性>

アシル CoA オキシダーゼ活性は Hashimoto らの方法で分析した (45)。最終濃度 0.1mM パルミトイル CoA、10.6mM フェノール、0.82mM 4-アミノアンチピリン、10 μ M FAD、4U ペルオキシダーゼ (ホースラディッシュ) および 0.2mg ウシアルブミン (フラクシオン V、脂肪酸フリー) を含む 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) に総ホモジネートを添加し (総容量 1mL)、30°C、500nm で 11 分間吸光度を追跡し、得られた吸光度の傾きから過酸化水素の生成速度を求めた (過酸化水素とフェノール、4-アミノアンチピリン、ペルオキシダーゼによって生じる紅色色素のモル吸光係数 6,390)。アシル CoA オキシダーゼ活性はタンパク質濃度に依存するため、ウシアルブミンを過剰量加えた。

組織リン脂質、トリグリセリドの脂肪酸分析

肝臓および脂肪組織の脂質は Folch らの方法 (38) で抽出した。

肝臓ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、トリグリセリド (TG) 画分は肝臓濃縮脂質 25mL から 2mL サンプルングした。

心臓 PC、PE 画分は心臓約 0.1g をクロロホルム：メタノール=2：1 (v/v) 溶媒 2mL に入れ、POLYTRON (KINEMATICA) を用いてホモジナイズし、抽出したサンプルから 1mL サンプルングした。

血清 PC、カルジオリピン (CL) 画分は血清 0.5mL をクロロホルム：メタノール=2:1 (v/v) 溶媒 10mL で抽出したサンプルを全てサンプルングした。

脳 PC、PE 画分は脳約 0.6g をクロロホルム：メタノール=2：1 (v/v) 溶媒 12mL に入れ、POLYTRON (KINEMATICA) を用いてホモジナイズし、抽出したサンプルから 0.13mL サンプルングした。

脂質は薄層クロマトグラフィーにより分画を行った。展開溶媒はクロロホルム：メタノール：水=65：25：4 で PC、PE 画分を、石油エーテル：ジエチルエーテル：酢酸=82：18：1 で TG 画分を、クロロホルム：メタノール：酢酸：水=50：37.5：3.5：2 で脳 PC、PE 画分および心臓 CL 画分を分離した。展開後、アセトンに溶解した 0.001% プリムリンを噴霧し、真空ポンプで 30 分吸引乾燥した。紫外線下でバンドを確認してはぎ取り、硫酸：メタノール=1：115 溶液 (v/v) 2mL を加え、80°C で 2 時間加熱しトランスメチル化を行った。室温に戻した後、飽和 NaCl 溶液 2mL とヘキサン 2mL を加えて 5 分間攪拌し、3000rpm、5 分間の遠心分離後に上層を回収することで脂肪酸メチルエステルを抽出し、以下の分析条件でガスクロマトグラフィーにより分析した。

分析条件

- ・ ガスクロマトグラフ GC-2010、GC-2014 (島津製作所)
- ・ カラム Omegawax 320 (30m×0.32mm×0.25μm)
- ・ キャリヤーガス ヘリウム
- ・ カラム温度 200°C
- ・ 注入口温度 250°C
- ・ 検出器 (FID) 温度 250°C
- ・ カラム流量 2.0mL/min
- ・ スプリット比 30:1

なお、ピークの同定は標品との保持時間の比較により行った。

エイコサノイド産生

○ プロスタサイクリン (PGI₂) 産生量

PGI₂ はガラスに付着するため、使用したガラス器具は全てシリコナイズしたものをを用いた。

大動脈を採取後、脂肪等を除去し、氷冷下で生理食塩水を入れたプラスチックチューブ中に保存した。大動脈を約 1.5cm (心臓からの距離が同じ場所を採取するようにした) 切り取り、ろ紙で生理食塩水を拭き取り、精秤して記録した。大動脈の管を切り開いて試験管に入れ、氷冷下でバブリング (CO₂ : O₂ = 5% : 95%) した Krebs-Henseleit bicarbonate 緩衝液 (pH7.4) 1mL を入れた。なお、Krebs-Henseleit bicarbonate 緩衝液は 1.54M 塩化カリウムを 308μL、0.77M リン酸二水素カリウムを 154μL、0.77M 硫酸マグネシウムを 154μL、0.77M 炭酸水素ナトリウムを 3.234mL 加え、0.9%塩化ナトリウム水溶液で 100mL に fill up して作成した。

その後、大動脈を入れた試験管を 25°C で正確に 30 分間インキュベートして大動脈を取り除くことにより PGI₂ を産生させた。サンプルを 3%ギ酸で酸性にし (リトマス紙を入れて確認)、2mL 酢酸エチルで 2 回、1000rpm、5 分遠心分離により抽出した。上層を冷却しながらドライアップし、無水エタノール 2mL を加え -80°C で保存した。PGI₂ の産生量はその安定な代謝産物である 6-ケト-プロスタグランジン F_{1α} (17) を 6-keto-prostaglandin F_{1α} enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical Co.) で測定した。サンプルは無水エタノール 20μL を 8000 倍希釈して測定した。

○ トロンボキサン A₂ (TXA₂) 産生量

採取した血液 1mL を氷中保存した後、37°C で 30 分間インキュベートすることによりトロンボキサン A₂ (TXA₂) を最大限産生させた。3000rpm、4°C で 10 分遠心分離し、上清を回収し、-80°C で保存した。TXA₂ 産生量はその安定な代謝産物であるトロンボキサン B₂ (TXB₂) を Thromboxane B₂ enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical Co.) で測定した。サンプルはコントロール群を 2000 倍、EPA、DPA、DHA 群を 500 倍に希釈して測定した。

<統計処理>

データは平均値±標準誤差で示した。また、データは一元配置分散分析を行い 3 群間の差を分析した。P<0.05 で有意差ありとし、有意差が生じた場合は Tukey-Kramer の多重比較検定を行い、P<0.05 をもって有意差ありと判定した。

Table 1 Composition of experimental diets

Ingredients (g/kg diet)	
Cornstarch	367.5
Fat [*]	100
Casein	200
α -Cornstarch	132
Sucrose	100
Cellulose	50
Mineral mixture (AIN-93G)	35
Vitamin mixture (AIN-93)	10
L-Cystine	3
Choline bitartrate	2.5
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.001

^{*}See Table 2

Table 2 Fat content of experimental diets

Fats	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
	g/kg diet			
Palm	60.62	62.27	62.30	62.30
High oleic safflower	5.36	6.62	6.63	6.63
High linoleic safflower	34.03	20.66	20.67	20.67
EPA ethyl ester	-	10.44	-	-
DPA ethyl ester	-	-	10.41	-
DHA ethyl ester	-	-	-	10.41

Table 3 Fatty acid composition (wt%) of dietary fats

Fatty acid	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
12:0	0.1	0.2	0.1	0.2
14:0	0.7	0.7	0.7	0.7
16:0	29.2	30.3	30.1	29.7
16:1	0.2	0.2	0.1	0.2
18:0	3.3	3.0	3.0	3.1
18:1	32.8	32.9	33.0	32.9
18:2	32.6	23.1	23.3	23.3
20:5n-3	-	8.7	-	-
22:5n-3	-	-	8.7	-
22:6n-3	-	-	-	9.0
SFA	33.3	34.2	33.9	33.7
MUFA	33.0	33.1	33.1	33.1
PUFA	32.6	31.8	32.0	32.3
n-6/n-3	-	2.7	2.7	2.6

SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid;
 PUFA, polyunsaturated fatty acid

結果

成長、摂食量、肝臓重量および脂肪組織重量

成長、摂食量、肝臓重量、脾臓重量および脂肪組織重量は Table 4 に示す。成長、摂食量、脾臓重量、腎周囲・後腹膜脂肪組織重量には 4 群間で有意差はなかった。体重 100g 当たりの肝臓重量では、コントロール群と比較して EPA 群で有意に減少した。

血清および肝臓脂質濃度

血清および肝臓脂質濃度は Table 5 に示す。血清トリグリセリド (TG) およびリン脂質濃度はコントロール群に比べ、EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に低下したが、n-3 系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) 摂取の 3 群間に有意差はなかった。血清総コレステロール濃度はコントロール群に比べ、EPA 群、DPA 群で減少傾向はあったが、DHA 群でのみ有意に低下した。血清 HDL コレステロール濃度は 4 群間に有意差はみられず、血清リン脂質濃度はコントロール群と比べ EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に減少した。ヒトにおいて動脈硬化指数として示されている Atherogenic index {※計算式(総コレステロール—HDL コレステロール) / HDL コレステロール}はコントロール群に比べ EPA 群、DPA 群、DHA 群で同程度に減少した。

肝臓総コレステロール濃度はコントロール群に比べ、DHA 群でのみ有意に低下した。肝臓 TG 濃度はコントロール群に比べ、EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に低下したが、n-3PUFA 摂取の 3 群間に有意差はなかった。肝臓リン脂質濃度は 4 群間に有意差はなかった。

肝臓酵素活性

肝臓における脂質代謝に関係する酵素の活性は Table 6 に示す。脂肪酸合成酵素の活性は群間で有意差はなかったが、コントロール群で EPA 群および DPA 群よりも高い傾向がみられた。脂肪酸合成系に NADPH を供給するグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性はコントロール群に比べ EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に減少した。また、リンゴ酸酵素活性は、群間で有意差はみられなかった。

ミトコンドリアでの β -酸化の指標となるカルニチンアシルトランスフェラーゼ活性は、コントロール群に比べて EPA 群で増加傾向を示し、DPA 群、DHA 群で有意に高かった。ペルオキシソーム β -酸化系の初発酵素であるアシル CoA オ

キシダーゼ活性は、コントロール群に比べ EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に高く、EPA 群<DPA 群<DHA 群の順であった。

肝臓脂肪酸組成

肝臓ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、トリグリセリド (TG) 画分および血清 PC 画分の脂肪酸組成は Table 7~9 に示す。

n-6 PUFA の割合は PC、PE 画分で、コントロール群に比べて EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に減少し、n-6PUFA の割合は DPA 群>EPA 群=DHA 群の順であった。アラキドン酸 (20:4n-6) の割合はコントロール群に比べ EPA、DPA、DHA 群で有意に低下したが、DPA 群では低下作用が弱かった。リノール酸 (18:2n-6) からアラキドン酸への転換の割合を示す Desaturation index はコントロール群と比べ、EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に減少したが、n-3PUFA 摂取の 3 群間で有意差はなかった。

一方、n-3PUFA の割合はコントロール群に比べ EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に増加し、コントロール群<DPA 群<EPA 群=DHA 群の順であった。さらに、DPA 群よりも EPA 群で、有意にはではないがドコサペンタエン酸(22:5n-3,DPA) の割合が高かった。また、DHA 群において DPA よりもエイコサペンタエン酸 (20:5n-3,EPA) の割合が高かった。

TG 画分では、n-3PUFA の割合 PUFA の割合が少ないため、リン脂質画分ほどの増加は見られなかった。

血清脂肪酸組成

血清 PC 画分の脂肪酸組成は Table 10 に示す。

PC、PE 画分とも、肝臓 PC 画分と同様の傾向が見られ、n-6PUFA の割合はコントロール群に比べて EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に減少し、n-6PUFA の割合は DPA 群>EPA 群=DHA 群の順であった。アラキドン酸の割合はコントロール群に比べ EPA、DPA、DHA 群で有意に低下したが、DPA 群では低下作用が弱かった。

一方、n-3PUFA の割合はコントロール群に比べ EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に増加し、コントロール群<DPA 群<EPA 群=DHA 群の順であった。

心臓脂肪酸組成

心臓 PC、PE、カルジオリピン (CL) 画分の脂肪酸組成は Table 11~13 に示す。

PC 画分では、n-6PUFA の割合はコントロール群に比べて EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に減少し、有意差はないが DHA 群で減少傾向が強く、DPA 群で弱かった。アラキドン酸の割合はコントロール群に比べ EPA、DPA、DHA 群で有意に低下したが、DPA 群は EPA 群、DHA 群よりも高い傾向を示し、DHA 群では EPA 群と比べ有意に低かった。n-3PUFA の割合はコントロール群に比べて EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に高く、DHA 群で高い傾向がみられた。DHA 群ではドコサヘキサエン酸 (22:6n-3,DHA) の割合が有意に増加した。

PE 画分では、n-6PUFA の割合は肝臓リン脂質画分と同様の傾向を示し、コントロール群に比べて EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に減少し、n-6PUFA の割合はコントロール群>DPA 群>EPA 群=DHA 群の順であった。アラキドン酸の割合は DPA 群で、EPA 群、DHA 群と比べ高い傾向を示し、DHA 群では EPA 群、DPA 群と比べ有意に低かった。一方、n-3PUFA の割合はコントロール群<DPA 群<EPA 群<DHA 群の順に有意に増加した。DHA 群では DHA の割合が有意に増加した。

カルジオリピン画分は、n-6PUFA の割合は群間に有意差はなかった。カルジオリピン画分では脂肪酸の約 82%をリノール酸が占めており、食餌脂肪酸の違いによるリノール酸含量に影響はなかった。一方、n-3系 PUFA の割合はコントロール群と比べ EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に増加し、他の画分と異なり、EPA 群<DHA 群<DPA 群の順に高かった。

脳リン脂質脂肪酸組成

脳 PC、PE 画分の脂肪酸組成は Table 14,15 に示す。

脳 PC 及び PE 画分において、コントロール群と比べ、EPA 群、DPA 群、DHA 群で n-6PUFA の割合が有意に減少した。アラキドン酸の割合は、有意差はないが DPA 群で、EPA 群、DHA 群と比べ高い傾向を示した。一方、n-3PUFA の割合はコントロール群と比べ EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意に増加した。DHA の割合が DHA 群で他の 3 群に比べ有意に高かった。

しかし、他の組織と比較して脳 PC、PE 画分は食餌脂肪酸の影響は小さかった。

エイコサノイド産生

大動脈 PGI₂ および血小板 TXA₂ 産生量は Table 16 に示す。

大動脈 PGI₂ 産生量はコントロール群と比較して、EPA 群、DPA 群、DHA 群

で減少傾向を示したが、有意差はみられなかった。

血小板 TXA₂ 産生量はコントロール群と比べ DHA 群で有意に減少し、EPA 群、DPA 群では有意差はないが減少傾向を示した。しかし、DPA 群は EPA 群及び DHA 群よりも減少作用は弱かった。

Table 4 Body weight, food intake, liver weight, and visceral fat weight

	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
Initial body weight (g)	162 ± 2	161 ± 2	161 ± 2	161 ± 2
Final body weight (g)	339 ± 11	342 ± 9	343 ± 5	353 ± 6
Body weight gain (g)	177 ± 10	180 ± 7	182 ± 4	192 ± 4
Food intake (g/day)	22.0 ± 0.7	22.5 ± 1.0	22.4 ± 0.4	23.3 ± 0.6
Liver weight (g)	16.1 ± 0.9	14.4 ± 0.3	15.1 ± 0.6	15.8 ± 0.6
Liver weight (g/100g body weight)	4.72 ± 0.12 ^a	4.23 ± 0.14 ^b	4.41 ± 0.11 ^{ab}	4.48 ± 0.11 ^{ab}
Spleen weight (g)	0.83 ± 0.06	0.81 ± 0.02	0.89 ± 0.03	0.82 ± 0.04
Spleen weight (g/100g body weight)	0.25 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.23 ± 0.01
Perirenal fat weight (g)	6.32 ± 0.40	6.29 ± 0.85	6.00 ± 0.34	6.66 ± 0.29
Perirenal fat weight (g/100g body weight)	1.86 ± 0.09	1.82 ± 0.20	1.75 ± 0.09	1.89 ± 0.10

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

Table 5 Lipid concentration of serum and liver

	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
Serum lipid concentration (mg/dL)				
Total cholesterol	79.9 ± 6.0 ^a	62.1 ± 3.9 ^{ab}	63.5 ± 5.0 ^{ab}	61.0 ± 2.7 ^b
HDL-cholesterol	44.7 ± 3.3	40.8 ± 2.9	43.0 ± 4.1	42.6 ± 1.8
Triglyceride	354 ± 47 ^a	136 ± 18 ^b	152 ± 10 ^b	140 ± 17 ^b
Phospholipid	182 ± 12 ^a	117 ± 6 ^b	132 ± 6 ^b	124 ± 5 ^b
Atherogenic index	0.788 ± 0.804 ^a	0.522 ± 0.329 ^b	0.478 ± 0.224 ^b	0.431 ± 0.509 ^b
Liver lipid concentration (mg/g liver)				
Total cholesterol	3.79 ± 0.16 ^a	3.51 ± 0.19 ^{ab}	3.38 ± 0.15 ^{ab}	3.01 ± 0.05 ^b
Triglyceride	49.9 ± 1.6 ^a	32.3 ± 2.9 ^b	32.4 ± 2.4 ^b	32.0 ± 1.8 ^b
Phospholipid	28.9 ± 1.0	29.8 ± 0.5	29.6 ± 0.6	29.1 ± 0.5

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

HDL, high density lipoprotein; atherogenic index: (total cholesterol – HDL-cholesterol) /HDL-cholesterol.

Table 6 Activities of fatty acid synthase, Glucose-6-phosphate dehydrogenase, malic enzyme, carnitine palmitoyl transferase and acyl-CoA oxidase in liver

Enzyme	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
	(nmol/min/mg protein)			
Fatty acid synthase	11.3 ± 1.2	9.7 ± 0.6	9.7 ± 0.6	11.4 ± 0.5
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	81.7 ± 3.6 ^a	48.5 ± 2.7 ^b	60.1 ± 2.4 ^{bc}	62.3 ± 4.5 ^c
Malic enzyme	56.5 ± 3.7	46.0 ± 3.8	53.5 ± 2.5	59.1 ± 4.1
Carnitine palmitoyl transferase	4.18 ± 0.24 ^a	4.85 ± 0.22 ^{ab}	5.61 ± 0.23 ^b	5.39 ± 0.17 ^b
Acyl-CoA oxidase	2.05 ± 0.04 ^a	2.91 ± 0.08 ^b	3.37 ± 0.14 ^{bc}	3.55 ± 0.22 ^c

Each vales represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

Table 7 Fatty acid composition(wt%) of phosphatidylcholine in liver

Fatty acids	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
16:0	19.2 ± 0.8 ^a	22.7 ± 0.6 ^b	22.5 ± 0.8 ^b	23.3 ± 0.6 ^b
16:1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1
18:0	21.3 ± 0.8	19.3 ± 0.9	19.0 ± 0.9	19.6 ± 0.8
18:1n-9	3.0 ± 0.3 ^a	3.3 ± 0.3 ^{ab}	4.4 ± 0.4 ^b	4.2 ± 0.3 ^{ab}
18:1n-7	3.5 ± 0.2 ^a	2.5 ± 0.2 ^b	2.7 ± 0.2 ^b	1.9 ± 0.1 ^b
18:2n-6	7.8 ± 0.7 ^a	11.2 ± 0.9 ^b	13.4 ± 0.7 ^{bc}	14.1 ± 0.5 ^c
20:2n-6	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
20:3n-6	1.1 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.1 ^b	2.2 ± 0.1 ^b
20:4n-6	35.4 ± 1.1 ^a	13.6 ± 0.6 ^b	15.8 ± 0.5 ^b	10.1 ± 0.5 ^c
20:5n-3	-	11.3 ± 0.6 ^a	5.6 ± 0.4 ^b	5.4 ± 0.7 ^b
22:4n-6	0.5 ± 0.0	-	-	-
22:5n-6	2.5 ± 0.2	-	-	-
22:5n-3	0.1 ± 0.0 ^a	4.2 ± 0.3 ^b	3.7 ± 0.3 ^b	0.7 ± 0.1 ^a
22:6n-3	2.6 ± 0.2 ^a	7.8 ± 0.3 ^b	8.1 ± 0.7 ^b	16.4 ± 0.4 ^c
SFA	40.5 ± 0.3 ^a	42.0 ± 0.5 ^{ab}	41.5 ± 0.8 ^{ab}	42.9 ± 0.3 ^b
MUFA	7.3 ± 0.6	6.6 ± 0.6	8.1 ± 0.6	6.9 ± 0.4
n-6 PUFA	47.7 ± 0.5 ^a	26.6 ± 0.7 ^b	31.5 ± 0.7 ^c	26.6 ± 0.8 ^b
n-3 PUFA	2.8 ± 0.2 ^a	23.3 ± 1.0 ^b	17.4 ± 0.5 ^c	22.5 ± 0.9 ^b
total PUFA	50.5 ± 0.7	49.8 ± 0.5	48.9 ± 0.7	49.1 ± 0.4
n-6/n-3	17.5 ± 0.9 ^a	1.2 ± 0.1 ^b	1.8 ± 0.1 ^b	1.2 ± 0.1 ^b
Desaturation index	4.9 ± 0.6 ^a	1.4 ± 0.2 ^b	1.3 ± 0.1 ^b	0.9 ± 0.0 ^b

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

n-6PUFA=18:2+20:2+20:3+20:4+22:4+22:5

n-3PUFA=20:5+22:5+22:6

Desaturation index=[(20:3n-6+20:4n-6)/18:2n-6]

Table 8 Fatty acid composition(wt%) of phosphatidylethanolamine in liver

Fatty acids	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
16:0	18.4 ± 0.5 ^a	21.3 ± 0.4 ^b	21.5 ± 0.5 ^b	22.8 ± 0.5 ^b
16:1	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
18:0	23.5 ± 0.3	22.6 ± 0.6	22.4 ± 0.6	23.2 ± 0.5
18:1n-9	2.5 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.1 ^{bc}	2.2 ± 0.1 ^{ab}	1.9 ± 0.1 ^c
18:1n-7	2.7 ± 0.2 ^a	1.5 ± 0.2 ^b	1.5 ± 0.1 ^b	1.0 ± 0.1 ^b
18:2n-6	3.8 ± 0.2 ^a	4.4 ± 0.2 ^{ab}	4.7 ± 0.3 ^b	3.9 ± 0.1 ^{ab}
20:2n-6	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
20:3n-6	0.5 ± 0.0 ^{ab}	0.4 ± 0.0 ^a	0.5 ± 0.0 ^b	0.5 ± 0.0 ^{ab}
20:4n-6	31.6 ± 0.6 ^a	11.7 ± 0.2 ^b	15.7 ± 0.4 ^c	11.4 ± 0.5 ^b
20:5n-3	-	10.6 ± 0.2 ^a	5.5 ± 0.4 ^b	4.8 ± 0.5 ^b
22:4n-6	1.5 ± 0.1	-	-	-
22:5n-6	5.5 ± 0.3	-	-	-
22:5n-3	0.4 ± 0.0 ^a	8.2 ± 0.4 ^b	7.2 ± 0.5 ^b	0.9 ± 0.1 ^a
22:6n-3	6.6 ± 0.2 ^a	14.1 ± 0.4 ^b	15.5 ± 0.9 ^b	27.0 ± 0.4 ^c
SFA	41.9 ± 0.5 ^a	43.8 ± 0.4 ^b	43.9 ± 0.6 ^b	46.0 ± 0.4 ^c
MUFA	5.6 ± 0.2 ^a	4.0 ± 0.2 ^{bc}	4.0 ± 0.3 ^b	3.2 ± 0.1 ^c
n-6 PUFA	42.8 ± 0.3 ^a	16.7 ± 0.3 ^b	21.2 ± 0.4 ^c	15.8 ± 0.6 ^b
n-3 PUFA	6.9 ± 0.2 ^a	32.9 ± 0.5 ^b	28.2 ± 0.5 ^c	32.8 ± 0.7 ^b
total PUFA	49.8 ± 0.5	49.6 ± 0.3	49.4 ± 0.5	48.5 ± 0.3
n-6/n-3	6.2 ± 0.2 ^a	0.5 ± 0.0 ^b	0.8 ± 0.0 ^b	0.5 ± 0.0 ^b
Desaturation index	8.68 ± 0.6 ^a	2.8 ± 0.1 ^b	3.5 ± 0.3 ^b	3.1 ± 0.1 ^b

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

n-6PUFA=18:2+20:2+20:3+20:4+22:4+22:5

n-3PUFA=20:5+22:5+22:6

Desaturation index=[(20:3n-6+20:4n-6)/18:2n-6]

Table 9 Fatty acid composition (wt%) of triglyceride in liver

Fatty acids	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
14:0	1.8 ± 0.1 ^a	0.9 ± 0.0 ^b	1.0 ± 0.1 ^b	0.9 ± 0.1 ^b
16:0	37.4 ± 1.0 ^{ab}	34.2 ± 1.0 ^a	36.1 ± 0.8 ^{ab}	38.6 ± 1.2 ^b
16:1	7.7 ± 0.4 ^a	5.1 ± 0.4 ^b	5.2 ± 0.3 ^b	5.7 ± 0.5 ^b
18:0	1.8 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.1 ^a	2.4 ± 0.1 ^b	2.7 ± 0.1 ^b
18:1n-9	39.8 ± 0.8 ^a	36.1 ± 0.6 ^b	37.7 ± 0.5 ^{ab}	36.7 ± 0.6 ^b
18:1n-7	0.11 ± 0.0	-	-	-
18:2n-6	9.9 ± 0.8 ^a	13.2 ± 0.7 ^b	11.5 ± 0.6 ^{ab}	9.7 ± 1.0 ^a
20:1	0.2 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^b	0.2 ± 0.0 ^{ab}	0.2 ± 0.0 ^{ab}
20:4n-6	0.4 ± 0.1 ^a	0.2 ± 0.0 ^b	0.3 ± 0.0 ^{ab}	0.2 ± 0.0 ^b
20:5n-3	-	2.6 ± 0.22 ^a	1.0 ± 0.1 ^b	0.5 ± 0.1 ^b
22:4n-6	0.2 ± 0.1	-	-	-
22:5n-6	0.1 ± 0.0	-	-	-
22:5n-3	-	3.1 ± 0.4 ^a	2.7 ± 0.3 ^a	0.6 ± 0.1 ^b
22:6n-3	-	1.2 ± 0.1 ^a	1.2 ± 0.1 ^a	3.5 ± 0.4 ^b
SFA	40.5 ± 1.1 ^{ab}	37.2 ± 1.1 ^a	39.5 ± 0.9 ^{ab}	42.3 ± 1.2 ^b
MUFA	47.8 ± 0.8 ^a	41.5 ± 0.8 ^b	43.1 ± 0.4 ^b	42.6 ± 0.6 ^b
n-6 PUFA	10.6 ± 0.9 ^{ab}	13.4 ± 0.7 ^a	11.7 ± 0.6 ^{ab}	9.8 ± 1.0 ^b
n-3 PUFA	-	6.9 ± 0.7 ^a	4.9 ± 0.5 ^{ab}	4.6 ± 0.6 ^b
total PUFA	10.6 ± 0.9 ^a	20.4 ± 1.4 ^b	16.7 ± 1.0 ^{bc}	14.4 ± 1.5 ^a
n-6/n-3	-	2.0 ± 0.1	2.5 ± 0.2	2.2 ± 0.2
Desaturation index	0.04 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.00 ^b

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

n-6PUFA=18:2+20:4+22:4+22:5

n-3PUFA=20:5+22:5+22:6

Desaturation index=[20:4 n-6/18:2 n-6]

Table 10 Fatty acid composition (wt%) of phosphatidylcholine in serum

Fatty acids	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
16:0	19.4 ± 0.3 ^a	24.1 ± 0.7 ^b	23.8 ± 0.8 ^b	23.2 ± 0.9 ^b
16:1	0.6 ± 0.1 ^a	0.5 ± 0.1 ^{ab}	0.5 ± 0.1 ^{ab}	0.3 ± 0.1 ^b
18:0	21.7 ± 0.5	19.6 ± 0.7	19.6 ± 0.8	20.4 ± 0.7
18:1n-9	4.6 ± 0.1 ^a	5.5 ± 0.1 ^b	5.8 ± 0.3 ^b	5.4 ± 0.2 ^b
18:1n-7	3.0 ± 0.2 ^a	1.9 ± 0.2 ^b	2.1 ± 0.2 ^b	1.5 ± 0.1 ^b
18:2n-6	15.6 ± 1.0 ^a	19.2 ± 0.2 ^b	20.1 ± 0.6 ^{bc}	22.1 ± 0.7 ^c
20:2n-6	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
20:3n-6	1.1 ± 0.1 ^a	1.3 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.1 ^b
20:4n-6	26.8 ± 1.2 ^a	9.0 ± 0.3 ^{bc}	11.0 ± 0.5 ^b	6.5 ± 0.2 ^c
20:5n-3	-	7.5 ± 0.3 ^a	3.0 ± 0.2 ^b	2.6 ± 0.4 ^b
22:4n-6	0.6 ± 0.0	-	-	-
22:5n-6	2.6 ± 0.2	-	-	-
22:5n-3	-	4.0 ± 0.2 ^a	3.9 ± 0.3 ^a	0.6 ± 0.1 ^b
22:6n-3	2.4 ± 0.1 ^a	6.2 ± 0.2 ^b	6.8 ± 0.4 ^b	14.3 ± 0.6 ^c
SFA	41.2 ± 0.4 ^a	43.7 ± 0.5 ^b	43.4 ± 0.3 ^b	43.6 ± 0.6 ^b
MUFA	8.1 ± 0.4	8.0 ± 0.3	8.4 ± 0.4	7.3 ± 0.2
n-6 PUFA	47.0 ± 0.2 ^a	29.8 ± 0.4 ^b	33.3 ± 0.4 ^c	31.0 ± 0.8 ^b
n-3 PUFA	2.4 ± 0.1 ^a	17.6 ± 0.4 ^b	13.7 ± 0.4 ^c	17.5 ± 0.8 ^b
total PUFA	49.4 ± 0.2 ^a	47.3 ± 0.5 ^b	47.0 ± 0.5 ^b	48.5 ± 0.5 ^{ab}
n-6/n-3	19.4 ± 0.5 ^a	1.7 ± 0.1 ^b	2.4 ± 0.1 ^b	1.8 ± 0.1 ^b
Desaturation index	1.9 ± 0.2 ^a	0.5 ± 0.0 ^b	0.6 ± 0.1 ^b	0.4 ± 0.0 ^b

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

n-6PUFA=18:2+20:2+20:3+20:4+22:4+22:5

n-3PUFA=20:5+22:5+22:6

Desaturation index=[(20:3n-6+20:4n-6)/18:2n-6]

Table 11 Fatty acid composition(wt%) of phosphatidylcholine in heart

Fatty acids	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
16:0	19.0 ± 0.4 ^a	21.6 ± 0.4 ^b	21.2 ± 0.4 ^b	22.4 ± 0.5 ^b
16:1	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
18:0	24.8 ± 0.3 ^a	22.6 ± 0.1 ^b	23.3 ± 0.1 ^b	21.6 ± 0.2 ^c
18:1n-9	4.2 ± 0.2	4.8 ± 0.1	4.3 ± 0.2	4.6 ± 0.2
18:1n-7	4.7 ± 0.2 ^a	4.0 ± 0.2 ^b	3.7 ± 0.1 ^b	3.5 ± 0.2 ^b
18:2n-6	9.7 ± 1.0 ^a	12.1 ± 0.8 ^{ab}	10.7 ± 0.6 ^{ab}	13.6 ± 0.6 ^b
20:2n-6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0
20:3n-6	0.3 ± 0.0 ^a	0.4 ± 0.0 ^{ab}	0.4 ± 0.0 ^b	0.5 ± 0.0 ^c
20:4n-6	31.4 ± 1.0 ^a	18.4 ± 0.8 ^{bc}	20.5 ± 0.6 ^b	16.2 ± 0.7 ^c
20:5n-3	-	3.6 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.1 ^b	0.9 ± 0.1 ^c
22:4n-6	1.1 ± 0.1	-	-	-
22:5n-6	2.5 ± 0.1	-	-	-
22:5n-3	0.4 ± 0.0 ^a	5.9 ± 0.5 ^b	9.4 ± 0.5 ^c	0.7 ± 0.1 ^a
22:6n-3	1.6 ± 0.1 ^a	4.2 ± 0.2 ^b	2.9 ± 0.2 ^{ab}	14.0 ± 0.7 ^c
SFA	43.9 ± 0.5	44.3 ± 0.4	44.5 ± 0.3	44.0 ± 0.5
MUFA	9.1 ± 0.3	9.2 ± 0.4	8.2 ± 0.3	8.3 ± 0.3
n-6 PUFA	43.9 ± 0.6 ^a	31.0 ± 0.7 ^b	31.8 ± 0.4 ^b	30.5 ± 0.6 ^b
n-3 PUFA	2.0 ± 0.1 ^a	13.7 ± 0.7 ^b	13.8 ± 0.6 ^b	15.6 ± 0.6 ^b
total PUFA	45.9 ± 0.7	44.7 ± 0.7	45.5 ± 0.4	46.1 ± 0.7
n-6/n-3	22.9 ± 1.4 ^a	2.3 ± 0.2 ^b	2.3 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.1 ^b
Desaturation index	3.5 ± 0.5 ^a	1.6 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.2 ^b	1.3 ± 0.1 ^b

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

n-6PUFA=18:2+20:2+20:3+20:4+22:4+22:5

n-3PUFA=20:5+22:5+22:6

Desaturation index=[(20:3n-6+20:4n-6)/18:2n-6]

Table 12 Fatty acid composition(wt%) of phosphatidylethanolamine in heart

Fatty acids	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
Unknown1	0.9 ± 0.0 ^a	1.4 ± 0.1 ^b	1.2 ± 0.1 ^{ab}	1.4 ± 0.1 ^b
Unknown2	4.8 ± 0.1	5.2 ± 0.1	5.2 ± 0.2	4.9 ± 0.2
16:0	7.5 ± 0.2 ^a	8.6 ± 0.1 ^{ab}	8.7 ± 0.4 ^b	9.9 ± 0.4 ^c
16:1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Unknown3	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1
Unknown4	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1
18:0	22.5 ± 0.3	22.5 ± 0.4	23.2 ± 0.3	22.8 ± 0.6
18:1n-9	3.4 ± 0.2 ^{ab}	3.2 ± 0.2 ^{ab}	3.8 ± 0.1 ^a	3.0 ± 0.1 ^b
18:1n-7	2.6 ± 0.2 ^a	1.5 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.0 ^c	1.4 ± 0.1 ^b
18:2n-6	5.2 ± 0.4	4.8 ± 0.4	4.7 ± 0.3	4.8 ± 0.2
20:2n-6	0.1 ± 0.0	-	-	-
20:3n-6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
20:4n-6	23.8 ± 0.4 ^a	13.5 ± 0.5 ^b	15.1 ± 0.5 ^b	9.1 ± 0.4 ^c
20:5n-3	-	3.9 ± 0.2 ^a	1.5 ± 0.1 ^b	0.7 ± 0.1 ^c
22:4n-6	3.0 ± 0.1 ^a	0.3 ± 0.0 ^b	0.2 ± 0.0 ^b	0.1 ± 0.0 ^b
22:5n-6	7.8 ± 0.5	-	-	-
22:5n-3	0.9 ± 0.0 ^a	9.5 ± 0.4 ^b	14.0 ± 0.4 ^c	0.8 ± 0.1 ^a
22:6n-3	10.9 ± 0.6 ^a	19.3 ± 0.5 ^b	13.6 ± 0.8 ^a	34.5 ± 0.9 ^c
SFA	29.9 ± 0.3 ^a	31.1 ± 0.4 ^{ab}	32.0 ± 0.3 ^b	32.7 ± 0.8 ^b
MUFA	6.2 ± 0.3 ^a	4.9 ± 0.2 ^b	5.9 ± 0.1 ^a	4.6 ± 0.2 ^{bc}
n-6 PUFA	40.1 ± 0.4 ^a	18.8 ± 0.8 ^b	20.3 ± 0.7 ^b	14.2 ± 0.5 ^c
n-3 PUFA	11.8 ± 0.6 ^a	32.6 ± 0.7 ^b	29.0 ± 0.7 ^c	36.1 ± 1.0 ^d
total PUFA	51.9 ± 0.6 ^a	51.4 ± 0.3 ^a	49.3 ± 0.2 ^b	50.2 ± 0.8 ^{ab}
n-6/n-3	3.5 ± 0.2 ^a	0.6 ± 0.0 ^b	0.7 ± 0.0 ^b	0.4 ± 0.0 ^b
Desaturation index	4.8 ± 0.4 ^a	3.0 ± 0.3 ^{bc}	3.3 ± 0.2 ^b	2.0 ± 0.1 ^c

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

n-6PUFA=18:2+20:2+20:3+20:4+22:4+22:5

n-3PUFA=20:5+22:5+22:6

Desaturation index=[(20:3n-6+20:4n-6)/18:2n-6]

Table 13 Fatty acid composition (wt%) of cardiolipin in heart

Fatty acids	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
16:0	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.2
16:1	0.5 ± 0.0 ^a	0.5 ± 0.0 ^{ab}	0.4 ± 0.0 ^b	0.4 ± 0.0 ^b
18:0	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1
18:1n-9	3.0 ± 0.3	3.3 ± 0.4	3.2 ± 0.3	2.7 ± 0.1
18:1n-7	4.3 ± 0.5	4.4 ± 0.3	4.4 ± 0.3	4.0 ± 0.2
18:2n-6	82.7 ± 1.6	82.3 ± 1.6	81.3 ± 0.9	82.8 ± 0.3
20:2n-6	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.0
20:3n-6	1.0 ± 0.1 ^a	0.9 ± 0.1 ^a	1.2 ± 0.1 ^{ab}	1.3 ± 0.1 ^b
20:4n-6	1.9 ± 0.3 ^a	1.1 ± 0.1 ^b	1.4 ± 0.1 ^{ab}	1.0 ± 0.0 ^b
20:5n-3	-	0.4 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^b	-
22:4n-6	0.2 ± 0.0	-	-	-
22:5n-6	2.5 ± 0.2	-	-	-
22:5n-3	0.2 ± 0.0 ^a	1.1 ± 0.1 ^b	2.4 ± 0.2 ^c	0.2 ± 0.0 ^a
22:6n-3	1.3 ± 0.3 ^a	1.4 ± 0.2 ^a	1.6 ± 0.2 ^a	3.2 ± 0.2 ^b
SFA	1.9 ± 0.3	2.3 ± 0.3	2.6 ± 0.2	2.7 ± 0.3
MUFA	7.8 ± 0.8	8.2 ± 0.7	8.0 ± 0.5	7.1 ± 0.2
n-6 PUFA	88.8 ± 1.2	85.0 ± 1.2	84.3 ± 0.8	85.5 ± 0.3
n-3 PUFA	1.5 ± 0.3 ^a	2.9 ± 0.4 ^b	4.1 ± 0.4 ^c	3.5 ± 0.2 ^{bc}
total PUFA	88.3 ± 1.0	87.8 ± 0.9	88.4 ± 0.6	88.9 ± 0.4
n-6/n-3	67.5 ± 11.2 ^a	33.4 ± 6.8 ^b	21.5 ± 2.3 ^b	25.2 ± 1.4 ^b
Desaturation index	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

n-6PUFA=18:2+20:2+20:3+20:4+22:4+22:5

n-3PUFA=20:5+22:5+22:6

Desaturation index=[(20:3n-6+20:4n-6)/18:2n-6]

Table 14 Fatty acid composition(wt%) of phosphatidylcholine in brain

Fatty acids	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
16:0	41.8 ± 0.3	41.8 ± 0.2	42.1 ± 0.5	42.3 ± 0.6
16:1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
18:0	13.6 ± 0.2	13.6 ± 0.1	13.4 ± 0.2	13.2 ± 0.2
18:1	28.7 ± 0.2	29.5 ± 0.1	29.1 ± 0.3	29.3 ± 0.3
18:2n-6	0.8 ± 0.0 ^a	0.9 ± 0.0 ^b	0.9 ± 0.0 ^{bc}	1.0 ± 0.0 ^c
20:1	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0
20:3n-6	0.2 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.0 ^b	0.3 ± 0.0 ^b	0.4 ± 0.1 ^b
20:4n-6	6.7 ± 0.1 ^a	5.4 ± 0.1 ^b	5.7 ± 0.0 ^b	5.3 ± 0.2 ^b
22:4n-6	0.8 ± 0.0 ^a	0.6 ± 0.0 ^{bc}	0.6 ± 0.0 ^b	0.5 ± 0.0 ^c
22:5n-6	0.3 ± 0.0	—	—	—
22:5n-3	—	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	—
24:0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
22:6n-3	3.7 ± 0.1 ^a	4.0 ± 0.1 ^a	4.1 ± 0.1 ^a	4.7 ± 0.3 ^b
SFA	55.6 ± 0.2	55.6 ± 0.2	55.7 ± 0.3	55.6 ± 0.5
MUFA	30.1 ± 0.2	30.9 ± 0.1	30.5 ± 0.3	30.7 ± 0.3
n-6 PUFA	8.8 ± 0.1 ^a	7.1 ± 0.1 ^b	7.5 ± 0.0 ^b	7.2 ± 0.3 ^b
n-3 PUFA	3.7 ± 0.1 ^a	4.3 ± 0.1 ^b	4.3 ± 0.1 ^b	4.7 ± 0.3 ^b
total PUFA	12.4 ± 0.2	11.5 ± 0.1	11.9 ± 0.1	11.9 ± 0.5
n-6/n-3	2.38 ± 0.04 ^a	1.65 ± 0.03 ^{bc}	1.74 ± 0.03 ^b	1.53 ± 0.03 ^c
Desaturation index	9.01 ± 0.27 ^a	6.56 ± 0.13 ^b	6.55 ± 0.18 ^{bc}	5.71 ± 0.24 ^c

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

n-6PUFA=18:2+20:3+20:4+22:4+22:5

n-3PUFA=22:5+22:6

Desaturation index=[(20:3n-6+20:4n-6)/18:2n-6]

Table 15 Fatty acid composition(wt%) of phosphatidylethanolamine in brain

Fatty acids	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
Unknown1	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.0
Unknown2	4.8 ± 0.1	4.8 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.1
16:0	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.1 ± 0.2	3.9 ± 0.1
16:1	0.2 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.0 ^b	0.2 ± 0.0 ^{ab}	0.2 ± 0.0 ^{ab}
Unknown3	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1
Unknown4	10.6 ± 0.2	10.7 ± 0.2	10.6 ± 0.2	10.7 ± 0.1
Unknown5	3.5 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.0	3.3 ± 0.0
Unknown6	2.5 ± 0.0	2.6 ± 0.1	2.5 ± 0.0	2.5 ± 0.0
18:0	15.3 ± 0.1	14.9 ± 0.1	15.2 ± 0.2	14.7 ± 0.3
18:1	14.2 ± 0.2 ^{ab}	14.9 ± 0.2 ^a	14.6 ± 0.2 ^{ab}	14.0 ± 0.3 ^b
18:2n-6	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
20:0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
20:1	1.8 ± 0.0	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.0
20:3n-6	0.5 ± 0.0 ^a	0.6 ± 0.0 ^b	0.6 ± 0.0 ^b	0.6 ± 0.0 ^c
20:4n-6	12.3 ± 0.1 ^a	11.0 ± 0.2 ^b	11.3 ± 0.1 ^b	10.8 ± 0.2 ^b
20:5n-3	—	0.3 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^b	—
22:4n-6	5.2 ± 0.1 ^a	4.5 ± 0.1 ^b	4.5 ± 0.1 ^b	4.3 ± 0.1 ^b
22:5n-6	1.2 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.0 ^b	0.3 ± 0.0 ^b	0.3 ± 0.0 ^b
22:5n-3	0.2 ± 0.0 ^a	1.0 ± 0.1 ^b	0.9 ± 0.1 ^b	0.4 ± 0.0 ^c
22:6n-3	18.3 ± 0.2 ^a	20.1 ± 0.3 ^a	20.0 ± 0.4 ^a	23.5 ± 0.8 ^b
SFA	19.9 ± 0.2	19.4 ± 0.2	19.5 ± 0.4	18.9 ± 0.4
MUFA	16.2 ± 0.2 ^{ab}	16.9 ± 0.3 ^a	16.6 ± 0.2 ^{ab}	15.9 ± 0.3 ^b
n-6 PUFA	19.4 ± 0.1 ^a	16.6 ± 0.3 ^b	17.0 ± 0.2 ^b	16.3 ± 0.3 ^b
n-3 PUFA	18.5 ± 0.2 ^a	21.3 ± 0.3 ^b	21.1 ± 0.4 ^b	23.9 ± 0.8 ^c
total PUFA	37.9 ± 0.3	37.9 ± 0.5	38.1 ± 0.6	40.2 ± 1.1
n-6/n-3	1.05 ± 0.01 ^a	0.78 ± 0.01 ^b	0.81 ± 0.01 ^b	0.68 ± 0.01 ^c
Desaturation index	39.53 ± 2.31	36.58 ± 1.70	35.63 ± 1.34	33.51 ± 1.51

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

n-6PUFA=18:2+20:3+20:4+22:4+22:5

n-3PUFA=22:5+22:6

Desaturation index=[(20:3n-6+20:4n-6)/18:2n-6]

Table 16 Production of aortic prostacyclin and platelet thromboxane A₂

	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
Production of aortic prostacyclin (ng/mg aorta)	3.29 ± 0.75	2.18 ± 0.53	1.90 ± 0.32	2.22 ± 0.27
Production of platelet thromboxane A ₂ (ng/mL serum)	69.8 ± 17.4 ^a	31.2 ± 10.8 ^{ab}	43.8 ± 4.9 ^{ab}	22.1 ± 3.0 ^b
Ratio of aortic prostacyclin and platelet thromboxane A ₂	0.0605 ± 0.0172	0.1179 ± 0.0393	0.0434 ± 0.0069	0.0846 ± 0.0130

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

考察

エイコサペンタエン酸 (20:5n-3,EPA)、ドコサペンタエン酸 (22:5n-3,DPA)、ドコサヘキサエン酸 (22:6n-3,DHA) のエチルエステルをラットに与え、脂質代謝への影響を比較した。食餌脂肪中の飽和、モノ不飽和、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の割合および n-3PUFA と n-6PUFA の割合は脂質代謝とエイコサノイド産生に影響を及ぼすことが知られている (46,47)。そのため食餌脂肪はそれらの割合をできる限り一定となるように調整したものをを用いた。

このような実験条件下で、コントロール群と比べて、EPA 群、DPA 群、DHA 群では血清および肝臓のトリグリセリド (TG) 濃度が低下した。しかし、DPA 群において EPA 群と DPA 群よりも TG 濃度が低下するという事は確認できず、先の実験で報告されたアザラシ油での強い血清および肝臓の TG 濃度の低下は DPA による作用ではないと考えられた。また、食餌 DHA は EPA よりも肝臓でのコレステロール合成を抑制するため、強いコレステロール濃度低下作用を有することが知られている (14)。今回も血清と肝臓の総コレステロール濃度の有意な低下が DHA 群でみられ、これまでの知見と一致した。DPA のコレステロール濃度低下作用は DHA ほど強くなく、EPA と同程度の低下作用を持つことがわかった。食餌魚油は実験動物とヒトにおいて血清 TG 濃度低下作用を示すことはすでによく知れており、(48-52)、この効果は主に EPA に帰されている (13)。n-3PUFA、特に EPA は一般に肝臓での脂肪酸合成の抑制および β -酸化の亢進により、肝臓での超低密度リポタンパク質 (VLDL) の生成、分泌を低下させ血中 TG 濃度低下作用を発揮すると考えられている (53,54)。

そこで本実験では、EPA 群、DPA 群、DHA 群で現れた肝臓 TG 濃度低下作用がこれまで知られている魚油と同様の作用機序によるものか、また DPA 群で強い作用があるのか検討するため、肝臓の脂質代謝関連酵素の活性に与える影響を比較した。一般に魚油の摂取により脂肪酸合成系酵素の活性は低下することが知られているが、本実験では原因は明らかではないが、EPA 群、DPA 群、DHA 群において脂肪酸合成酵素およびリンゴ酸酵素の活性の低下はみられなかった。グルコース 6 リン酸脱水素酵素はコントロール群と比べ、EPA 群、DPA 群、DHA 群において有意に低下したが、DPA 群で特別に強く低下することはなかった。一方、 β -酸化系酵素の活性は増加する傾向にあり、これまでの知見と一致した。 β -酸化系酵素であるカルニチンパルミトイル転移酵素及びアシル CoA 酸化酵素の活性はコントロール群と比べ、EPA 群、DPA 群、DHA 群において有意に増加したが、DPA 群で特別に強い作用はなかった。このことより、EPA 群、DPA

群、DHA 群でみられた肝臓及び血清 TG 濃度の低下は主に β -酸化の亢進に起因する可能性が考えられた。また、脂質代謝関連酵素の活性は EPA、DHA 摂取と比べて、DPA の摂取による特別な影響はないように思われた。

肝臓および血清における脂肪酸組成分析の結果、食餌脂肪における n-3PUFA の種類の違いが、n-6PUFA および n-3PUFA の組織への取り込まれ方に異なる影響を与えることを示した。一般に、n-3PUFA を摂取すると組織リン脂質に多く取り込まれ (55,56)、また、リノール酸 (18:2n-6) からアラキドン酸 (20:4n-6) への転換を抑制するとされている。結果的に、組織リン脂質中のアラキドン酸の割合は低下し、リノール酸の割合は上昇する。本実験でもこれらの知見は EPA 群、DPA 群、DHA 群において一致し、エイコサノイド前駆体となる肝臓および血清リン脂質のアラキドン酸含量はコントロール群に比べ、n-3PUFA 摂取の 3 群で有意に減少したが、DPA 群では減少は弱くなっていた。リノール酸からアラキドン酸への転換の割合を示す Desaturation index は EPA 群、DPA 群、DHA 群で有意差はなかったため、この原因は DPA 群でリノール酸からアラキドン酸への転換抑制が弱いということはないと考えられる。リン脂質の n-3PUFA の割合が DPA 群では少なかった。そのために DPA 群で n-6PUFA の割合が高くなり、おそらくはアラキドン酸の割合が高くなっているものと考えられる。実際、EPA 群ではリン脂質画分に摂取した EPA がある程度取り込まれて DPA と DHA も増えており、DHA 群では DHA はかなりの量を取り込まれ EPA も増えていた。しかし、DPA 群では摂取した DPA はあまりリン脂質に取り込まれておらず、EPA と DHA も増えていなかった。DPA は肝臓リン脂質に取り込まれにくい可能性が考えられる。先の実験で、アザラシ油を摂食させたラットは魚油を摂食させたラットよりも肝臓リン脂質のアラキドン酸の割合の強い低下が見られたが (21)、これは DPA による作用ではないと思われる。なお、DPA 群で EPA が取り込まれており、また、DHA 群で EPA が取り込まれていたことから、逆転換が起こっている可能性が示唆された。

心臓の PC、PE 画分では EPA、DPA、DHA の摂取により n-3PUFA の割合が有意に増加した。特に DHA の摂取によって多量に DHA が取り込まれており、EPA、DPA を摂取した際よりアラキドン酸低下作用は強かった。心臓 PC、PE 画分においては DHA が取り込まれやすいという脂肪酸分配の臓器特異性が示された。魚を多く摂取すると心疾患にかかるリスクが減少することが日本人を対象とした疫学調査から示されており (57)、これは魚油が血清脂質濃度低下作用、血小板凝集抑制作用などによる寄与が大きいためと考えられるが、DHA が心臓にとりこまれやすいことも貢献している可能性がある。心臓リン脂質には他の組織

のリン脂質によりも EPA は取り込まれにくく、DPA は取り込まれやすいことも示された。心臓のカルジオリピン画分の脂肪酸組成は他の組織と異なり n-3PUFA の割合が DPA 群において高くなっていた。ラットの心筋ミトコンドリアのカルジオリピンの脂肪酸側鎖の約 80% はリノール酸であるが、いわし油を 20% 含む食餌を与えると、10 日間で心筋ミトコンドリアのカルジオリピン中のリノール酸は 35% 程度に激減し、酸素消費量が著しく低くなることが報告されている (58)。しかし、今回の食餌中 1% の EPA、DPA、DHA 量ではリノール酸の割合に影響を与えてはいなかった。

脳のリン脂質において、DHA を摂食すると脳リン脂質中の DHA の割合は増加したが、DPA および EPA は摂食しても脳のリン脂質脂肪酸組成にはほとんど影響を及ぼさなかった。よって、脳リン脂質には食餌 DHA は少量だが取り込まれ、食餌 EPA と DPA は取り込まれにくいことが示された。これは脳の毛細血管にある血液脳関門で選択的透過が行われるためと考えられ、n-3PUFA の中で血液脳関門を通過できるのは DHA のみであることが示唆された。

魚油を摂取するとリン脂質アラキドン酸の割合が減少するため、アラキドン酸から作られ血小板凝集作用をもつ血小板 TXA₂ 産生量は低下することが報告されている (59)。本実験でも血小板 TXA₂ 産生量はコントロール群と比べて EPA 群、DPA 群、DHA 群で減少傾向を示したが、DPA 群では減少作用は弱かった。DPA 群では EPA 群、DHA 群よりも肝臓リン脂質のアラキドン酸の割合の低下作用が弱かったが、DPA 群では血小板膜リン脂質でのアラキドン酸量においても同様の影響があり、DPA 群では血小板 TXA₂ 産生量の有意な低下が認められなかったものと考えられる。一方、血小板凝集抑制作用をもつ大動脈 PGI₂ 産生量は群間で有意差はなかったが、これは、PGI₂ 産生量がリン脂質画分のアラキドン酸含量の増減の影響を受けにくいためであると考えられる。この結果、DPA は血小板凝集抑制作用、抗血栓作用が弱いことが示唆され、アザラシ油で魚油を摂食したラットよりも TXA₂ 産生量が低かったが (21)、これは DPA による作用ではないと考えられる。

以上より、食餌 n-3 系ドコサペンタエン酸の血清と肝臓脂質濃度への影響はエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸と同程度であり、組織リン脂質中のアラキドン酸含量低下作用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も弱いことが示された。よって以前アザラシ油を摂食させたラットでみられた魚油よりも強い n-3 系多価不飽和脂肪酸の効果は、少なくとも n-3 ドコサペンタエン酸による作用ではないことがわかった。アザラシ油での効果はエ

イコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸のトリグリセリド中での結合位置の違いによる作用の可能性が高いと思われる。

第二章 ラットにおける n-3 系ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸の吸収

緒言

第一章では、ラットにおいて、食餌 n-3 ドコサペンタエン酸 (22:6n-3,DPA) による血清及び肝臓脂質濃度の低下作用はエイコサペンタエン酸 (20:5n-3,EPA) およびドコサヘキサエン酸 (22:6n-3,DHA) と同程度であるが、肝臓と血清リン脂質アラキドン酸含量の低下作用は EPA、DHA よりも弱いことが示された。これは DPA 摂食群ではリン脂質中の n-3 系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の割合が低かったため、DPA は摂食してもリン脂質に取り込まれにくいことが原因であると考えられた。

このように、第一章では DPA の効果が EPA および DHA よりも弱いということが示されたが、DPA の吸収が EPA、DHA よりも低いため、組織リン脂質に取り込まれにくかったという可能性もある。魚油とアザラシ油の効果をラットで比較した先の実験では、魚油よりアザラシ油を摂食したラットで、肝臓と血清リン脂質のアラキドン酸の割合が低く、n-3PUFA の割合が高かった (21)。この実験では魚油とアザラシ油はトリグリセリド態で摂食させていたが、第一章の実験では EPA、DPA、DHA をエチルエステル態で与えた。一般にトリグリセリド態よりもエチルエステル態の方が吸収は低いことが知られている。同じエチルエステル態でも EPA より DHA の方が吸収率は低いというように吸収率に違いがある (60)。しかし、DPA のエチルエステルの吸収については報告がされていない。

そこで、胸管リンパ管カニューレーション手術を施したラットに EPA または DPA または DHA のエチルエステルを投与し、リンパ液中に回収される脂肪酸量を定量することにより DPA の吸収率を EPA、DHA と比較した。

実験方法

<実験試薬>

実験に用いた試薬は以下の通りである。

トリオレイン (Sigma)、エイコサペンタエン酸エチルエステルおよびドコサペンタエン酸エチルエステルおよびドコサヘキサエン酸エチルエステルは日本水産より提供していただいた (第一章と同一のもの)。albumin, bovine serum, $\geq 96\%$, essentially fatty acid free (Sigma)、タウロコール酸ナトリウム (ナカライテスク)、塩化ナトリウム (和光純薬工業)、D(+)-グルコース (Dextrose, Anhydrous) (和光純薬工業)、EDTA・2Na (Dojindo)、ネンブタール注射液 (大日本住友製薬)、ペンタデカン酸 (Sigma)、硫酸 (和光純薬工業)、塩化ナトリウム (和光純薬工業)

また、以下の溶媒は和光純薬工業から購入し、蒸留したものを用いた。
ヘキサン、クロロホルム、メタノール

<実験動物とリンパカニューレーション手術およびアフターケア>

本研究は、「東北大学における動物実験に関する指針」に従って計画を策定し、実施した。

実験動物は体重 250-270g の SD 系雄性ラット 8 週齢 (日本クレア) を用いた。飼育条件は室温約 24°C、12 時間の明暗サイクル (8:00 点灯、22:00 消灯) とし、金属ケージにて個別飼育をした。予備飼育期間は市販固形飼料 CE-2 (日本クレア) と水を自由摂取させた。3~6 日間の予備飼育後、ネンブタール麻酔下でラットの胸管に single lumen clear vinyl tube SV-35 (内径 0.5mm、外径 0.9mm Critichley Electrical Products) (Auburn) (Australia 夏目製作所) を、胃管には single lumen polyethylene tube SP-55 (内径 0.8mm、外径 1.2mm Critichley Electrical Products) (Auburn) (Australia 夏目製作所) を挿入する手術を施した。手術後、ラットをリストレイニングケージに固定し、電球によって保温してラットの体温の低下を防ぎ、保温下で一晩回復させた。実験期間中は飲水として 139mM グルコースおよび 85mM 塩化ナトリウムを含む等張液を水差しから与え、また、胃管を通じてこの水溶液をシリンジポンプ (HARVARD APPARATUS) にて 3.4mL/hr で注入した。リンパ液は氷冷したメスシリンダーに回収した。手術後数時間はリンパチューブ内でフィブリンの形成がおこり、チューブが詰まりやすいので、定期的に胸管チューブのフィブリンを除去するようにした。

<試験液エマルションの調整および投与>

カニューレーション手術の翌朝、一晚のリンパ流量をもとにトリオレインを投与（コントロール群）、EPA エチルエステルを投与(EPA 群)、DPA エチルエステルを投与（DPA 群）または DHA エチルエステルを投与（DHA 群）する群に群分けを行い、ブランクとして 2 時間リンパ液を集めた。これはリンパ液中の内因性脂肪酸量を求めるためであり、試験液エマルション投与後のリンパ液中の脂肪酸量からこの内因性脂肪酸量を差し引くことより、投与した脂肪酸の吸収率を測定することができる。トリオレインまたは EPA エチルエステルまたは DPA エチルエステルまたは DHA エチルエステルを含む試験液エマルションを投与直前に超音波ホモジナイザー（Sonifier Model 250, Branson Ultrasonics Corporation）により超音波処理して作成した。試験液エマルションの組成を Table 17 に示す。エマルションは胃管より 3mL シリンジ（ニプロ）を用いて投与し、続いて 139mM グルコースおよび 85mM 塩化ナトリウムを含む等張液を胃管より注入し、投与液を完全に胃内に入れた。投与液は 50 μ L \times 5 連をねじ口チューブに採取し、アルゴンガスを封入後、-35 $^{\circ}$ C で保存した。（試験液エマルション脂肪酸量分析のため）

<試験液投与後のリンパ液採取>

投与後、リンパ液を経時的（0-3hr、3-6hr、6-9hr、9-24hr）に氷冷したメスシリンダーに回収した。その際、メスシリンダーにはリンパ液の凝固を防ぐため、予め 100mg/mL のエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA）溶液を添加した。EDTA 溶液の添加量は投与後 9 時間までは 200 μ L/リンパ回収時間（h）の割合とし（0-3hr、3-6hr、6-9hr は EDTA 溶液 0.6mL 添加）、9-24hr は EDTA 量が多くなるため、1.5mL とした。メスシリンダーに採取したリンパ液は約 12mL をプラスチックチューブに取り、氷冷下、5 $^{\circ}$ C で保存した。

<再構成リンパの作成>

投与後 24 時間のリンパ液を回収した後、各時間のリンパ流量をもとに 0-24 時間のリンパ液を 10mL 作成した（再構成リンパ）。この再構成リンパを分析結果の指標として、各時間の脂肪酸量の分析を行うこととした。再構成リンパを作成後、リンパ液は分析時まで-35 $^{\circ}$ C で保存した。

<投与試験液およびリンパ液中の脂肪酸量の分析>

脂質の抽出は Folch らの方法 (38) で行った。

○ 投与試験液中の脂肪酸

メタノール 2mL を入れた試験管に、試験投与液を 0.05mL サンプルングし、ペンタデカン酸 (15:0、1mg/mL クロロホルム) を内部標準として 1mL 加えた。クロロホルム 3mL を加え 40°C、30 分加温抽出した。その際、最初は試験管のふたを緩めておき、試験管が温まった後にふたを閉め、10 分ごとに転倒混和した。常温に戻した後、20%容の脱イオン水を加え、ふたをして転倒混和し、5°Cで一晩放置した。

抽出液の上清を除去し、窒素でドライアップをし、水を除去するためメタノールを数滴加えて再びドライアップした。その後、第一章同様、硫酸メタノール法によりトランスメチル化を行い、ガスクロマトグラフィーにより分析をした。

○ リンパ液中の脂肪酸

メタノール 3.3mL を入れた試験管に、リンパ液を 0.5mL サンプルングし、ペンタデカン酸 (15:0、0.2mg/mL クロロホルム) を内部標準として 1mL 加えた。クロロホルム 5.7mL を加え、その後の操作は試験投与液と同様に行い、脂質を抽出してトランスメチル化を行い、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸量を分析した。

脂肪酸の吸収量は試験液投与後のリンパ液中の脂肪酸量から、ブランクとして回収した -2~0hr のリンパ液中の脂肪酸量を差し引いて求めた。また再構成リンパ分析結果の指標とした。脂肪酸の吸収率は下記の計算法により求めた。

計算法

投与液中の脂肪酸量 (X) は以下の方法で求めた。

$$X = A \times C / B \times 3 / a \quad (\text{mg}/3\text{mL})$$

A : 脂肪酸の GLC ピーク面積 (%)

B : 内部標準 (15:0) の GLC ピーク面積 (%)

C : 内部標準 (15:0) 添加量 (1.000mg)

a : 投与液のサンプルング量 (0.05mL)

脂肪酸の吸収率は以下の方法で求めた。

<-2~0 時間のリンパ液中の脂肪酸量>

$$T = A \times C / B \times L / b / 2 \quad (\text{mg/hr})$$

<各時間の脂肪酸吸収率>

0~3、3~6、6~9 時間

$$(A \times C / B \times L / b - T \times 3) / X \times 100 \quad (\%)$$

9~24 時間

$$(A \times C / B \times L / b - T \times 15) / X \times 100 \quad (\%)$$

A : 脂肪酸の GLC ピーク面積 (%)

B : 内部標準 (15:0) の GLC ピーク面積 (%)

C : 内部標準 (15:0) 添加量 (2.000mg)

L : リンパ流量 (EDTA 含む) (mL)

T : -2~0 時間のリンパ液中の脂肪酸量 (mg)

X : 投与液中の脂肪酸量 (mg)

b : リンパ液サンプリング量 (0.5mL)

<統計処理>

データは平均値±標準誤差で示した。また、データは一元配置分散分析を行い4群間の差を分析した。P<0.05 で有意差ありとし、有意差が生じた場合は Tukey-Kramer の多重比較検定を行い、P<0.05 をもって有意差ありと判定した。

Table 17 Test emulsion

	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
Sodium taurocholate	200mg	200mg	200mg	200mg
Bovine serum albumin , essentially fatty acid free	50mg	50mg	50mg	50mg
Water	2.78mL	2.78mL	2.78mL	2.78mL
Triolein	200mg	-	-	-
EPA ethyl ester	-	200mg	-	-
DPA ethyl ester	-	-	200mg	-
DHA ethyl ester	-	-	-	200mg
Total	3mL	3mL	3mL	3mL

結果

体重およびリンパ液量

ラットの体重および時間毎のリンパ液流量を Table 17 に示す。体重およびリンパ液流量に群間で有意差はなかった。

Table 18 Body weight and lymph flow

groups	Body wt. g	Lymph flow mL				
		0-3h	3-6h	6-9h	9-24h	0-24h
Control	303 ± 3	20.1 ± 1.9	18.7 ± 1.5	18.3 ± 2.2	74.8 ± 12.2	132 ± 15
EPA	303 ± 2	18.4 ± 1.9	18.5 ± 1.3	19.6 ± 1.4	65.1 ± 7.4	122 ± 6
DPA	301 ± 2	18.2 ± 1.7	18.0 ± 2.0	18.9 ± 2.0	89.3 ± 8.8	144 ± 13
DHA	296 ± 2	18.6 ± 1.4	20.4 ± 1.9	20.3 ± 1.1	98.0 ± 9.1	157 ± 11

Each value represents mean±SE of sis-eight rats.

リンパ液中の脂肪酸の吸収率

リンパ液中の脂肪酸の吸収率を Fig.1 および Table 19 に、各時間の脂肪酸の吸収率を Fig.2 および Table 20 に示す。EPA 群では 0~24 時間のリンパ液中に DPA が $0.5 \pm 0.1\%$ 、DHA が $0.6 \pm 0.6\%$ 、DPA 群では EPA が $4.3 \pm 0.4\%$ 、DHA が $0.6 \pm 0.3\%$ 、DHA 群では EPA が $1.3 \pm 0.2\%$ 、DPA が $0.3 \pm 0.1\%$ 存在していた。DPA 群と DHA 群に EPA が存在したということは腸細胞中での DPA および DHA から EPA への逆転換を示唆している。よって、Fig.1、2 および Table 19、20 ではコントロール群はオレイン酸 (18:1n-9) の吸収率を示し、EPA 群、DPA 群、DHA 群はエイコサペンタエン酸 (20:5n-3,EPA) とドコサペンタエン酸 (22:5n-3,DPA) とドコサヘキサエン酸 (22:6n-3,DHA) をたした吸収率を示す。コントロール群と比べ、EPA 群、DPA 群および DHA 群の吸収率は、投与後 3 時間目から 24 時間後まで有意に低かった。さらに、DHA 群は吸収率が最も低く、24 時間後では EPA 群と比べて有意に低かった。DPA 群と EPA 群では吸収の速度および 24 時間の吸収率は若干 EPA 群の方が高かったが、ほぼかわらなかった。

脂肪酸の吸収率はオレイン酸 > EPA = DPA > DHA の順であり、DPA の吸収は EPA、DHA よりも低いということはない。

Table 19 Cumulative recovery (%) of oleic acid or eicosapentaenoic acid or docosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid in thoracic duct lymph

	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
0~3hr	47.4 ± 4.2 ^a	32.2 ± 3.3 ^b	31.0 ± 2.4 ^b	21.2 ± 2.9 ^b
0~6hr	70.3 ± 9.7 ^a	42.0 ± 3.1 ^b	44.8 ± 3.8 ^b	30.8 ± 5.2 ^b
0~9hr	89.5 ± 8.7 ^a	52.4 ± 2.2 ^b	51.6 ± 4.6 ^b	36.2 ± 6.5 ^b
0~24hr	118 ± 5 ^a	70.5 ± 3.1 ^b	68.6 ± 5.9 ^{bc}	47.7 ± 7.8 ^c

Each value represents mean±SE of six-eight rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

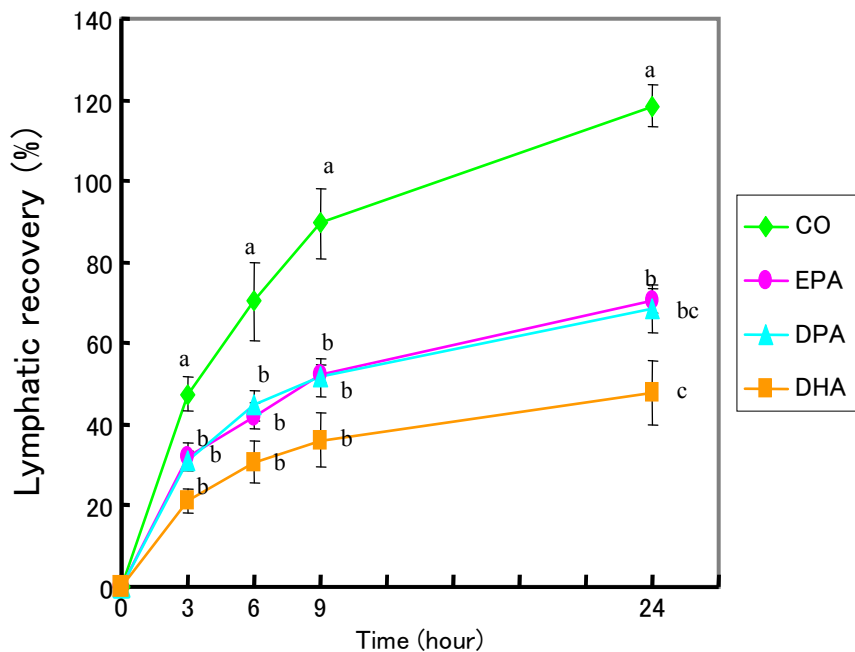


Fig.1 Cumulative recovery of oleic acid or eicosapentaenoic acid or docosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid in thoracic duct lymph of rats after intragastric administration of a fat emulsion containing triolein or eicosapentaenoic acid ethyl ester or docosapentaenoic acid ethyl ester or docosahexaenoic acid ethyl ester.

Values with superscript letters are significantly different at P<0.05.

Table 20 Periodic recovery (%) of oleic acid or eicosapentaenoic acid or docosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid in thoracic duct lymph

	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
0~3hr	47.4 ± 4.2 ^a	32.2 ± 3.3 ^b	31.0 ± 2.4 ^b	21.2 ± 2.9 ^b
3~6hr	22.9 ± 7.3	9.84 ± 1.21	13.7 ± 1.8	9.63 ± 2.52
6~9hr	19.2 ± 3.6 ^a	10.4 ± 1.6 ^b	6.82 ± 0.97 ^b	5.36 ± 1.48 ^b
9~24hr	28.9 ± 8.0	18.1 ± 2.6	17.0 ± 3.7	11.6 ± 2.01

Each value represents mean±SE of six-eight rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

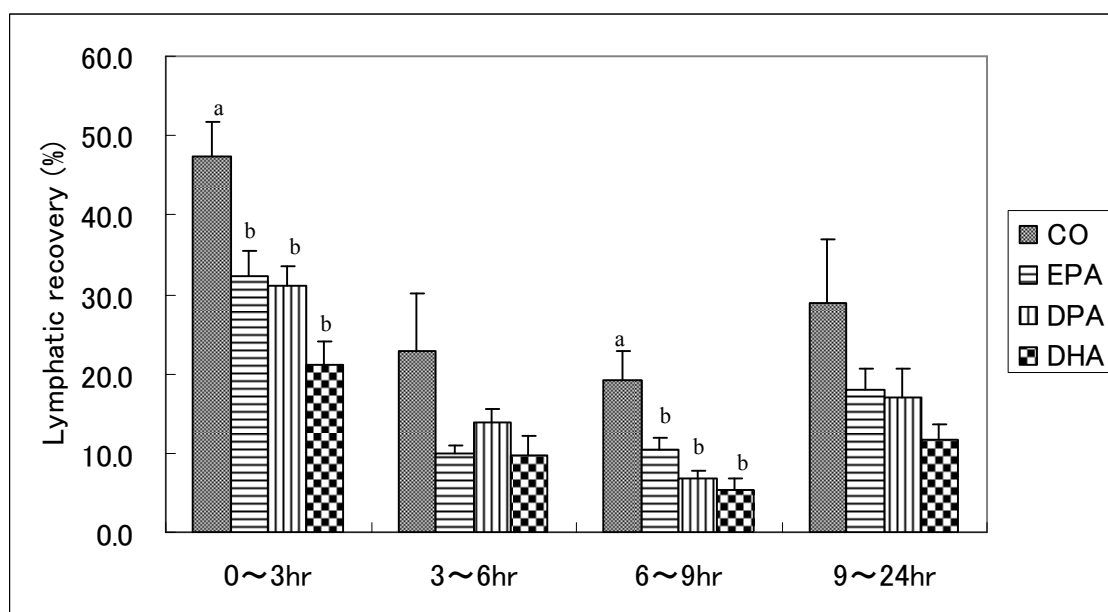


Fig.2 Periodic recovery of oleic acid or eicosapentaenoic acid or docosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid in thoracic duct lymph of rats after intragastric administration of a fat emulsion containing triolein or eicosapentaenoic acid ethyl ester or docosapentaenoic acid ethyl ester or docosahexaenoic acid ethyl ester.

Values with superscript letters are significantly different at P<0.05.

考察

ドコサペンタエン酸エチルエステル (22:5n-3,DPA) のリンパへの吸収率をエイコサペンタエン酸エチルエステル (20:5n-3,EPA) およびドコサヘキサエン酸エチルエステル (22:6n-3,DHA) と比較したところ、DPA の吸収の速度と 24 時間後の吸収率は EPA とほぼ等しかった。一方、DPA は DHA よりも吸収速度は早く、投与後 24 時間後の吸収率は DHA よりも高かった。

今回、EPA エチルエステルは DHA エチルエステルよりも吸収が有意に高く、今までの報告 (60) と一致した。EPA の吸収はどんな形態で投与しても DHA よりも高い傾向にあるとされている。トリグリセリドの sn-2 位に DHA が多い魚油を投与した場合、胸管リンパ中に吸収された DHA もトリグリセリドの sn-2 位に結合しているものが大部分であるのに対して、EPA は投与した魚油中では sn-2 位に大部分が結合しているが、胸管リンパ中での EPA は sn-2 位のみならず sn-1,3 位にもかなり結合した形で見出されることが知られている (61)。これは腓リパーゼの DHA と EPA に対する特異性の差によるものと推定される。今回、DPA のエチルエステルは EPA と比べて吸収速度と吸収率はほぼ等しく、DHA よりも吸収速度は早く吸収率も高かった。この結果より、DPA の腓リパーゼの特異性は EPA と同等で、DHA よりも高いのではないかと推測される。腓リパーゼの特異性が異なるため、エチルエステルの吸収速度と吸収率に差が生じたと考えられる。

トリオレインと比較すると EPA エチルエステル、DPA エチルエステル、DHA エチルエステルは吸収が遅く、24 時間後の吸収率は有意に低かった。これは n-3 系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が腓リパーゼに抵抗性があるためと、今回投与した 3 種の n-3PUFA はエチルエステルの形態だったためと思われる。EPA および DHA の投与形態による吸収性の差は短期投与の場合に顕著で、投与 24 時間後では、遊離脂肪酸>トリグリセリド>エチルエステルの順とされている (60)。in vitro において、エチルエステルはトリグリセリドよりも腓リパーゼの反応を受けにくいことが報告されており (60)、これがエチルエステルの吸収率の低さの原因と考えられている。しかし、ヒトにおいては EPA と DHA はトリグリセリドでもエチルエステルでも吸収は同じであるという報告がある (62-66)。Lawson らは、魚油エチルエステルを投与する際、高脂肪食 (総脂質 44g) と同時に摂取させると、低脂肪食 (総脂質 8g) と同時に摂取させた場合と比較して、エチルエステルの吸収は 3 倍に増加したと報告しており、このことからエチルエステルはトリグリセリドと一緒に与えることで小腸内腔での加水分解が進むことが示唆された (67)。よって第一章の摂食試験ではエチルエステルに他の植物油のトリグリセリドを混合して与えていたため、今回のリンパの吸収実験が正確に摂食試験と一致するわけではないと思われる。しかし、同じエチルエステルとして EPA、DPA、DHA を投与しているため、この 3 種の吸収率の比較は可能である。

今回の研究では、DHA は EPA よりも吸収速度は遅く、投与 24 時間後の吸収率が有意に低かった。しかし、DPA は EPA と比べて吸収速度および吸収率に差はなく、DHA と比べて吸収速度は早く、吸収率も高かった。よって、第一章で

は DPA は摂食しても組織リン脂質中の n-3PUFA 量が EPA、DHA を摂食した際よりも低かったのだが、これは DPA の吸収率の低さによるものではないことが示された。

第三章 アラキドン酸がラットの脂質代謝に及ぼす影響

緒言

n-6 系多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸 (20:4n-6, AA) は必須脂肪酸であり、生体内ではリン脂質に多く含まれている。細胞膜のリン脂質に蓄積された AA はホスホリパーゼ A₂ によって遊離し、シクロオキシゲナーゼの作用により速やかに代謝されて、血小板凝集作用をもつ血小板トロンボキサン A₂ (TXA₂) や血小板凝集抑制作用をもつ大動脈プロスタサイクリン (PGI₂) などの主要なエイコサノイドが合成される (2)。AA は過剰に摂取すると TXA₂ の過剰産生により血小板凝集が亢進し、血管収縮、血栓形成、心筋梗塞の引き金となるような悪影響を及ぼす可能性がある (3-9)。

一方、AA は人の組織を構成する重要な脂肪酸であり神経系、免疫系などの機能にも関わっている。AA は乳幼児の成長に重要であり (30)、乳幼児の脳の発達においても重要であることが報告されている (31)。また、近年では高齢化社会に伴い老人性痴呆が増加している。このような患者の脳では AA やドコサヘキサエン酸の量が減少していることが確認されている。しかし、AA を摂取することで脳内の AA 量が改善され (32)、学習・記憶能力が高まることや認知応答、活動リズムが改善することなどが知られている (34-36)。Kotani らはもの忘れの自覚症状をもつ高齢者が AA とドコサヘキサエン酸を 240mg/日、90 日間摂取した際、図形や言葉をごく短時間記憶しておく能力と注意集中力に改善が見られたと報告している (37)。AA の摂取量を補うため、サプリメントも市販されている。

そこで本研究では、日本人が日常的に摂取している AA 量および市販のサプリメントで推奨されている AA 量における食餌 AA の影響について検討した。

実験方法

<実験試薬>

食餌脂質は以下5つの油脂を混合して調製した。パーム油（不二製油）、ハイオレイックサフラワー油（日清オイリオグループ）、ハイリノールサフラワー油（日清オイリオグループ）、アラキドン酸エチルエステル（サントリー）、エゴマ油（スギヤマ薬品）。

<実験動物と飼料>

実験動物はSD系雄性ラット4週齢（日本クレア）を用いた。飼育条件は室温約24°C、12時間の明暗サイクル（8:00点灯、22:00消灯）とし、金属ケージにて個別飼育した。予備飼育期間は市販固形飼料CE-2（日本クレア）と水を自由摂取させた。4日間予備飼育後、平均体重119gのラットを6匹ずつ4群に群分けした。

実験食はAIN-93G純化食を用い、脂肪が食餌中10%となるようにした。食餌組成は第一章と同様であり、Table 1に示す。

食餌脂肪酸組成はアラキドン酸(20:4n-6,AA)以外の影響が出ないように、飽和脂肪酸(SFA):一価不飽和脂肪酸(MUFA):多価不飽和脂肪酸(PUFA)=30:40:30となるよう調製した。n-6PUFAとn-3PUFAの比は日本人の平均的比であるn-6PUFA:n-3PUFA=4:1とした。n-3PUFA源は α -リノレン酸(18:3n-3)とした。試料油の調製にはパーム油、ハイオレイックサフラワー油、ハイリノールサフラワー油、エゴマ油、AAエチルエステルを使用した。AAエチルエステルを添加した群はその分リノール酸含量を減らして、n-6PUFAの量を調製した。アラキドン酸を含まない群(CO群)、日本人の日常的に摂取しているAA量に相当する食餌脂肪中に0.5%アラキドン酸を含む群(0.5%AA群)、サプリメントで推奨されているAA量に相当する食餌脂肪中に1.0%アラキドン酸を含む群(1.0%AA群)、および食餌脂肪中に2%アラキドン酸を含む群(2.0%AA群)を設けて、ラットに21日間摂食させた。使用した油脂の混合割合をTable 21、各群の食餌脂肪酸組成はTable 22に示す。

各群の混合油を食餌へ混合後、食餌は酸化を防ぐため、1日分ごとにハイバリア保存袋に入れ、アルゴンガス封入し、-25°Cで保存した。さらに、酸化を防ぐ目的で、給餌は毎日18時に行った。

3週間摂食させた後、最終日に7時間(7:00-14:00)絶食し、エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血、屠殺し、各組織(肝臓、心臓、脾臓、脳、大動脈、脂肪組織)を摘出した。臓器は分析まで-80°Cで保存した。

<測定項目および方法>

血清および肝臓脂質濃度、各組織のリン脂質脂肪酸組成

分析は第一章と同様に行った。

エイコサノイド産生量

分析は第一章と同様に行った。

PGI₂の産生量は6-ケト-プロスタグランジンF_{1α}の入った無水エタノール20μLを8000倍希釈して測定した。

TXA₂産生量はサンプルを500倍に希釈して測定した。

<統計処理>

データは平均値±標準誤差で示した。また、データは一元配置分散分析を行い3群間の差を分析した。P<0.05で有意差ありとし、有意差が生じた場合はTukey-Kramerの多重比較検定を行い、P<0.05をもって有意差ありと判定した。

Table 21 Fat content of experimental diets

Oils	Groups			
	Control	0.5%AA	1.0%AA	2.0%AA
	g/kg diet			
Palm	52.89	52.91	53.00	53.23
High oleic safflower	16.73	16.81	16.90	17.01
High linoleic safflower	19.62	19.00	18.30	16.91
Perilla oil	10.76	10.76	10.76	10.76
Arachidonic acid ethyl ester	-	0.52	1.04	2.09

Table 22 Fatty acid composition (wt%) of dietary fats

Fatty acid	Groups			
	Control	0.5%AA	1.0%AA	2.0%AA
14:0	0.6	0.6	0.6	0.6
16:0	26.3	26.4	26.6	26.4
16:1	0.2	0.1	0.1	0.2
18:0	3.1	3.0	3.0	3.1
18:1	39.2	39.0	39.2	39.3
18:2	23.7	23.5	22.8	21.8
18:3	5.9	6.1	5.9	5.9
20:0	0.3	0.3	0.3	0.3
20:1	0.2	0.2	0.2	0.2
20:4	-	0.5	0.9	1.9
22:0	0.1	0.1	0.1	0.1
SFA	30.4	30.4	30.7	30.5
MUFA	39.5	39.4	39.5	39.7
PUFA	29.7	30.0	29.6	29.6
n-6/n-3	4.00	3.95	4.00	3.99

SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid;
 PUFA, polyunsaturated fatty acid

結果

成長、摂食量、肝臓重量および脂肪組織重量

成長、摂食量、肝臓重量、脾臓重量および脂肪組織重量は Table 23 に示す。成長、摂食量、脾臓重量には 4 群間で有意差はなかった。腎周囲・後腹膜脂肪組織重量は 0.5%AA 群、1.0%AA 群と比べ、2.0%AA 群は有意に減少した。

血清および肝臓脂質濃度

血清および肝臓脂質濃度は Table 24 に示す。測定した血清および肝臓脂質濃度のすべての項目において、群間で有意差はなかった。肝臓トリグリセリド濃度は、コントロール群と比較してアラキドン酸を摂取した 3 群において減少傾向はみられたが、有意差はなかった。

肝臓リン脂質脂肪酸組成

肝臓ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE) 画分の脂肪酸組成は Table 25,26 に示す。

PC 画分において、n-6 系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の割合はコントロール群に比べ 0.5%AA 群で上昇傾向を示し、1.0%AA 群と 2.0%AA 群では有意に高かった。アラキドン酸 (20:4n-6,AA) の割合はコントロール群に比べ AA 摂取の 3 群では有意に高く、0.5%AA 群 < 1.0%AA 群 < 2.0%AA 群の順に高かった。リノール酸の割合はコントロール群と比較し、0.5%AA 群で減少傾向を示し、1.0%AA 群と 2.0%AA 群で有意に減少した。しかし、通常食に相当する 0.5%AA 群とサプリメント推奨量に相当する 1.0%AA 群間ではリノール酸および AA、n-6PUFA の割合に有意差はなかった。一方、n-3PUFA の割合はコントロール群と比べ、1.0%AA 群で減少傾向を示し、2.0%AA 群で有意に減少した。

PE 画分では n-6PUFA の割合はコントロール群と比べ、2.0%AA 群でのみ有意に増加し、AA の割合もコントロール群と比較して 2.0%AA 群でのみ有意に高い値を示した。一方、n-3PUFA の割合はコントロール群と比較して、1.0%AA 群と 2.0%AA 群で有意に減少した。

脳リン脂質脂肪酸組成

脳 PC、PE 画分の脂肪酸組成は Table 27,28 に示す。

PC、PE 画分において、n-6PUFA の割合および AA の割合は群間で有意差はなかったが、わずかに 2.0%AA 群では他の 3 群よりも割合が高かった。n-3PUFA の割合も群間で有意差はなかったが、PE 画分では n-6PUFA/n-3PUFA がコントロール群と比べ 2.0%AA 群で有意に高かった。しかし、脳リン脂質脂肪酸組成では食餌 AA の影響はほとんどみられなかった。

エイコサノイド産生

大動脈プロスタサイクリン (PGI₂) および血小板トロンボキサン A₂ (TXA₂) 産生量は Table 29 に示す。

血小板 TXA₂ 産生量はコントロール群 < 0.5%AA 群 < 1.0%AA 群 < 2.0%AA 群の順に高くなったが、有意差はなかった。

大動脈 PGI₂ 産生量および大動脈 PGI₂ 産生量と血小板 TXA₂ 産生量の比には 3 群間で有意差はなかった。

Table 23 Body weight, food intake, liver weight, perirenal fat weight, spleen weight

	Groups			
	Control	0.5%AA	1.0%AA	2.0%AA
Initial body weight (g)	119 ± 2	119 ± 1	119 ± 1	119 ± 1
Final body weight (g)	289 ± 4	295 ± 7	300 ± 9	286 ± 6
Body weight gain (g)	170 ± 4	176 ± 6	181 ± 8	167 ± 6
Food intake (g/day)	20.3 ± 0.4	20.6 ± 0.5	20.8 ± 0.6	19.3 ± 0.6
Liver weight (g)	13.5 ± 0.7	13.2 ± 0.7	14.1 ± 1.0	12.7 ± 0.6
Liver weight (g/100g body weight)	4.67 ± 0.21	4.45 ± 0.15	4.66 ± 0.22	4.42 ± 0.13
Spleen weight (g)	0.75 ± 0.05	0.78 ± 0.04	0.79 ± 0.02	0.84 ± 0.06
Spleen weight (g/100g body weight)	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.29 ± 0.02
Perirenal fat weight (g)	4.82 ± 0.69 ^{ab}	5.57 ± 0.24 ^a	5.48 ± 0.39 ^a	3.53 ± 0.14 ^b
Perirenal fat weight (g/100g body weight)	1.66 ± 0.23 ^{ab}	1.89 ± 0.08 ^a	1.82 ± 0.08 ^a	1.24 ± 0.06 ^b

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

Table 24 Lipid concentration of serum and liver

	Groups			
	Control	0.5%AA	1.0%AA	2.0%AA
Serum lipid concentration(mg/dL)				
Total cholesterol	96.6 ± 6.1	89.8 ± 8.4	95.1 ± 6.9	85.9 ± 5.7
HDL-cholesterol	62.6 ± 6.3	58.3 ± 7.2	57.9 ± 5.8	54.5 ± 4.1
Triglyceride	192 ± 30	228 ± 12	245 ± 45	145 ± 16
Phospholipid	189 ± 7	185 ± 8	200 ± 12	175 ± 7
Atherogenic index	0.573 ± 0.075	0.578 ± 0.095	0.674 ± 0.097	0.585 ± 0.055
Liver lipid concentration(mg/g liver)				
Total cholesterol	3.18 ± 0.15	3.20 ± 0.10	3.22 ± 0.06	3.25 ± 0.11
Triglyceride	52.6 ± 14.8	31.8 ± 4.4	35.3 ± 5.1	30.1 ± 2.5
Phospholipid	29.0 ± 1.0	30.4 ± 0.6	31.3 ± 1.0	30.9 ± 0.5

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

HDL, high density lipoprotein; athrogenic index:(total cholesterol – HDL-cholesterol) /HDL-cholesterol.

Table 25 Fatty acid composition(wt%) of phosphatidylcholine in liver

Fatty acids	Groups			
	Control	0.5%AA	1.0%AA	2.0%AA
16:0	18.6 ± 0.5	18.4 ± 0.5	19.2 ± 0.8	20.2 ± 0.5
16:1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0
18:0	21.2 ± 0.7	19.7 ± 0.5	20.6 ± 0.9	19.2 ± 0.4
18:1n-9	4.1 ± 0.2	3.6 ± 0.4	3.2 ± 0.2	3.6 ± 0.2
18:1n-7	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.3	2.6 ± 0.1	2.3 ± 0.2
18:2n-6	9.4 ± 0.7 ^a	7.6 ± 0.5 ^{ab}	6.4 ± 0.4 ^b	6.8 ± 0.3 ^b
20:2n-6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
20:3n-6	1.3 ± 0.1 ^a	1.1 ± 0.1 ^{ac}	0.8 ± 0.1 ^{bc}	0.6 ± 0.1 ^b
20:4n-6	30.0 ± 0.8 ^a	33.9 ± 1.3 ^b	35.9 ± 0.4 ^b	36.8 ± 0.8 ^b
20:5n-3	0.7 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	0.5 ± 0.1 ^{ab}	0.3 ± 0.0 ^b
22:4n-6	0.2 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.0 ^b
22:5n-6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
22:5n-3	0.9 ± 0.1 ^a	1.0 ± 0.1 ^a	1.0 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.1 ^b
22:6n-3	8.6 ± 0.3 ^a	8.8 ± 0.3 ^a	7.6 ± 0.5 ^a	6.1 ± 0.2 ^b
SFA	39.8 ± 0.7	38.1 ± 0.3	39.8 ± 0.4	39.4 ± 0.4
MUFA	7.2 ± 0.4	6.8 ± 0.7	6.4 ± 0.3	6.5 ± 0.3
n-6 PUFA	41.3 ± 0.2 ^a	43.2 ± 0.8 ^{ab}	43.9 ± 0.4 ^b	45.0 ± 0.4 ^b
n-3 PUFA	10.2 ± 0.3 ^{ab}	10.5 ± 0.2 ^a	9.1 ± 0.5 ^b	7.8 ± 0.2 ^c
total PUFA	51.5 ± 0.4	53.7 ± 0.9	53.0 ± 0.2	52.9 ± 0.6
n-6/n-3	4.1 ± 0.1 ^a	4.1 ± 0.1 ^a	4.9 ± 0.3 ^b	5.8 ± 0.2 ^c
Desaturation index	3.5 ± 0.4 ^a	4.7 ± 0.4 ^{ab}	5.8 ± 0.4 ^b	5.6 ± 0.4 ^b

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

n-6PUFA=18:2+20:2+20:3+20:4+22:4+22:5

n-3PUFA=20:5+22:5+22:6

Desaturation index=[(20:3n-6+20:4n-6)/18:2n-6]

Table 26 Fatty acid composition(wt%) of phosphatidylethanolamine in liver

Fatty acids	Groups			
	Control	0.5%AA	1.0%AA	2.0%AA
16:0	18.0 ± 0.3	18.1 ± 0.2	19.3 ± 0.6	18.9 ± 0.2
16:1	0.2 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^{ab}	0.3 ± 0.0 ^b	0.2 ± 0.0 ^{ab}
18:0	24.4 ± 0.5 ^a	22.7 ± 0.4 ^b	23.2 ± 0.5 ^{ab}	23.1 ± 0.2 ^{ab}
18:1n-9	2.2 ± 0.1 ^a	2.4 ± 0.1 ^{ab}	2.6 ± 0.1 ^b	2.6 ± 0.1 ^b
18:1n-7	1.5 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.1 ^{ab}	2.1 ± 0.1 ^b	1.9 ± 0.2 ^{ab}
18:2n-6	2.3 ± 0.4	2.8 ± 0.3	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1
20:2n-6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0
20:3n-6	0.4 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.0 ^{ab}	0.3 ± 0.0 ^b	0.3 ± 0.0 ^b
20:4n-6	27.3 ± 0.4 ^a	28.3 ± 0.4 ^a	28.0 ± 0.5 ^a	30.3 ± 0.2 ^b
20:5n-3	1.1 ± 0.1 ^a	0.9 ± 0.1 ^{ab}	0.7 ± 0.1 ^{bc}	0.5 ± 0.0 ^c
22:4n-6	0.4 ± 0.0 ^a	0.5 ± 0.0 ^a	0.5 ± 0.0 ^b	0.8 ± 0.0 ^c
22:5n-6	0.3 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.0 ^a	0.4 ± 0.0 ^{ab}	0.5 ± 0.0 ^b
22:5n-3	1.8 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.2 ^a	2.9 ± 0.2 ^b
22:6n-3	17.8 ± 0.3 ^a	16.9 ± 0.4 ^{ab}	15.3 ± 0.6 ^b	12.8 ± 0.2 ^c
SFA	42.4 ± 0.4 ^a	40.7 ± 0.4 ^b	42.4 ± 0.2 ^a	42.0 ± 0.3 ^{ab}
MUFA	3.9 ± 0.2 ^a	4.5 ± 0.2 ^{ab}	5.0 ± 0.2 ^b	4.7 ± 0.3 ^{ab}
n-6 PUFA	30.9 ± 0.2 ^a	32.3 ± 0.4 ^b	32.3 ± 0.5 ^{ab}	34.8 ± 0.2 ^c
n-3 PUFA	20.6 ± 0.3 ^a	19.7 ± 0.3 ^a	18.1 ± 0.6 ^b	16.2 ± 0.2 ^c
total PUFA	51.5 ± 0.4 ^{ab}	52.1 ± 0.3 ^a	50.4 ± 0.2 ^b	51.0 ± 0.2 ^{ab}
n-6/n-3	1.5 ± 0.0 ^a	1.6 ± 0.1 ^{ab}	1.8 ± 0.1 ^b	2.2 ± 0.0 ^c
Desaturation index	14.0 ± 2.7	11.4 ± 2.0	9.9 ± 0.3	10.6 ± 0.2

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

n-6PUFA=18:2+20:2+20:3+20:4+22:4+22:5

n-3PUFA=20:5+22:5+22:6

Desaturation index=[(20:3n-6+20:4n-6)/18:2n-6]

Table 27 Fatty acid composition(wt%) of phosphatidylcholine in brain

Fatty acids	Groups			
	Control	EPA	DPA	DHA
Unknown1	0.9 ± 0.0 ^a	1.4 ± 0.1 ^b	1.2 ± 0.1 ^{ab}	1.4 ± 0.1 ^b
Unknown2	4.8 ± 0.1	5.2 ± 0.1	5.2 ± 0.2	4.9 ± 0.2
16:0	7.5 ± 0.2 ^a	8.6 ± 0.1 ^{ab}	8.7 ± 0.4 ^b	9.9 ± 0.4 ^c
16:1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Unknown3	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1
Unknown4	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1
18:0	22.5 ± 0.3	22.5 ± 0.4	23.2 ± 0.3	22.8 ± 0.6
18:1n-9	3.4 ± 0.2 ^{ab}	3.2 ± 0.2 ^{ab}	3.8 ± 0.1 ^a	3.0 ± 0.1 ^b
18:1n-7	2.6 ± 0.2 ^a	1.5 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.0 ^c	1.4 ± 0.1 ^b
18:2n-6	5.2 ± 0.4	4.8 ± 0.4	4.7 ± 0.3	4.8 ± 0.2
20:2n-6	0.1 ± 0.0	-	-	-
20:3n-6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
20:4n-6	23.8 ± 0.4 ^a	13.5 ± 0.5 ^b	15.1 ± 0.5 ^b	9.1 ± 0.4 ^c
20:5n-3	-	3.9 ± 0.2 ^a	1.5 ± 0.1 ^b	0.7 ± 0.1 ^c
22:4n-6	3.0 ± 0.1 ^a	0.3 ± 0.0 ^b	0.2 ± 0.0 ^b	0.1 ± 0.0 ^b
22:5n-6	7.8 ± 0.5	-	-	-
22:5n-3	0.9 ± 0.0 ^a	9.5 ± 0.4 ^b	14.0 ± 0.4 ^c	0.8 ± 0.1 ^a
22:6n-3	10.9 ± 0.6 ^a	19.3 ± 0.5 ^b	13.6 ± 0.8 ^a	34.5 ± 0.9 ^c
SFA	29.9 ± 0.3 ^a	31.1 ± 0.4 ^{ab}	32.0 ± 0.3 ^b	32.7 ± 0.8 ^b
MUFA	6.2 ± 0.3 ^a	4.9 ± 0.2 ^b	5.9 ± 0.1 ^a	4.6 ± 0.2 ^{bc}
n-6 PUFA	40.1 ± 0.4 ^a	18.8 ± 0.8 ^b	20.3 ± 0.7 ^b	14.2 ± 0.5 ^c
n-3 PUFA	11.8 ± 0.6 ^a	32.6 ± 0.7 ^b	29.0 ± 0.7 ^c	36.1 ± 1.0 ^d
total PUFA	51.9 ± 0.6 ^a	51.4 ± 0.3 ^a	49.3 ± 0.2 ^b	50.2 ± 0.8 ^{ab}
n-6/n-3	3.5 ± 0.2 ^a	0.6 ± 0.0 ^b	0.7 ± 0.0 ^b	0.4 ± 0.0 ^b
Desaturation index	4.8 ± 0.4 ^a	3.0 ± 0.3 ^{bc}	3.3 ± 0.2 ^b	2.0 ± 0.1 ^c

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

n-6PUFA=18:2+20:2+20:3+20:4+22:4+22:5

n-3PUFA=20:5+22:5+22:6

Desaturation index=[(20:3n-6+20:4n-6)/18:2n-6]

Table 28 Fatty acid composition(wt%) of phosphatidylethanolamine in brain

Fatty acids	Groups			
	Control	0.5%AA	1.0%AA	2.0%AA
Unknown1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1
Unknown2	5.4 ± 0.1	5.4 ± 0.1	5.4 ± 0.1	5.7 ± 0.1
16:0	3.8 ± 0.7	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.1
16:1	1.0 ± 0.7	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Unknown3	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.2
Unknown4	11.3 ± 0.1	11.1 ± 0.1	11.3 ± 0.1	11.5 ± 0.1
Unknown5	3.5 ± 0.0	3.4 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.7 ± 0.1
Unknown6	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.6 ± 0.1
18:0	15.4 ± 0.1	15.5 ± 0.1	15.5 ± 0.2	15.5 ± 0.1
18:1n-9	12.7 ± 0.1	12.8 ± 0.2	12.8 ± 0.3	12.6 ± 0.1
18:1n-7	1.7 ± 0.0	1.7 ± 0.0	1.7 ± 0.0	1.7 ± 0.0
18:2n-6	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1
20:0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
20:1	1.7 ± 0.0	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1
20:3n-6	0.5 ± 0.0 ^a	0.5 ± 0.0 ^{ab}	0.5 ± 0.0 ^a	0.4 ± 0.0 ^b
20:4n-6	11.5 ± 0.1	11.6 ± 0.2	11.7 ± 0.2	11.9 ± 0.1
22:4n-6	4.7 ± 0.1 ^a	4.8 ± 0.1 ^{ab}	4.9 ± 0.1 ^{ab}	5.0 ± 0.1 ^b
22:5n-6	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0
22:5n-3	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
22:6n-3	19.1 ± 0.4	19.2 ± 0.4	18.5 ± 0.3	18.5 ± 0.2
SFA	19.5 ± 0.7	20.4 ± 0.1	20.4 ± 0.3	20.3 ± 0.1
MUFA	17.1 ± 0.7	16.5 ± 0.3	16.5 ± 0.4	16.2 ± 0.1
n-6 PUFA	17.3 ± 0.2	17.5 ± 0.2	17.7 ± 0.2	18.0 ± 0.2
n-3 PUFA	19.4 ± 0.4	19.4 ± 0.4	18.8 ± 0.3	18.7 ± 0.2
total PUFA	36.7 ± 0.5	36.9 ± 0.5	36.5 ± 0.5	36.7 ± 0.3
n-6/n-3	0.89 ± 0.01 ^a	0.90 ± 0.01 ^a	0.94 ± 0.01 ^{ab}	0.96 ± 0.01 ^b
Desaturation index	41.87 ± 1.51	44.13 ± 1.11	45.62 ± 2.34	46.73 ± 5.15

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

n-6PUFA=18:2+20:3+20:4+22:4+22:5

n-3PUFA=22:5+22:6

Desaturation index=[(20:3n-6+20:4n-6)/18:2n-6]

Table 29 Production of aortic prostacyclin and platelet thromboxane A₂

	Groups			
	Control	0.5%AA	1.0%AA	2.0%AA
Production of aortic prostacyclin (ng/mg aorta)	2.43 ± 0.48	2.42 ± 0.30	3.24 ± 0.94	2.67 ± 0.48
Production of platelet thromboxane A ₂ (ng/mL serum)	57.8 ± 8.3	82.5 ± 13.1	94.5 ± 7.9	129 ± 33
Ratio of aortic prostacyclin and platelet thromboxane A ₂	0.0477 ± 0.0125	0.0336 ± 0.0068	0.0368 ± 0.0125	0.0346 ± 0.0161

Each value represents mean±SE of six rats. Values with different superscript letters are significantly different at P<0.05.

考察

食餌脂肪中 0.5%、1.0%または 2.0%のアラキドン酸エチルエステルをラットに与え、食餌アラキドン酸 (20:4,AA) の影響を検討した。食餌脂肪中の飽和、モノ不飽和、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の割合および n-3PUFA と n-6PUFA の割合は脂質代謝とエイコサノイド産生に影響を及ぼすことが知られている (46,47)。そのため食餌脂肪は第一章同様、それらの割合をできる限り一定となるように調整したものをを用いた。

このような実験条件下で、血清および肝臓脂質濃度は群間で有意差はなく、日本人通常食の 2 倍程度のアラキドン酸を摂取しても脂質濃度に影響は及ぼさないことが確認された。腎周囲・後腹膜脂肪組織重量はコントロール群と比較して 2.0%AA 群で有意に減少した。今回と同様に、食餌脂肪中 5%AA をラットに与えると白色脂肪組織重量が減少したという報告がある (68)。しかし、この実験では脂肪組織総脂質の脂肪酸組成、血糖、アディポネクチン濃度にはほとんど変化がなく、アラキドン酸による体脂肪減少作用の原因は明らかとはされなかった。しかし、本研究でも 2.0%AA 群で白色脂肪組織重量は減少したことから、メカニズムは明らかではないが、食餌脂肪中 2%~5%のアラキドン酸は白色脂肪組織重量を減少させる作用を有するようである。

肝臓脂肪酸組成分析の結果、食餌脂肪中 0.5%~2%の AA 食は、AA 無添加のコントロール群と比べ、エイコサノイドの前駆体となる肝臓リン脂質 AA の割合を有意に増加させた。しかし、肝臓リン脂質 AA の割合は通常食相当量である 0.5%AA 群とサプリメント推奨量の 1.0%AA 群を比較すると、1.0%AA 群の方が高いが有意差はなかった。よって、通常食の 2 倍量の AA を摂取しても肝臓リン脂質の AA 量には影響を及ぼさないようである。

脳のリン脂質は少量の AA を摂食してもほとんど脂肪酸組成に影響を及ぼさなかった。一般に高齢者はリノール酸から AA への変換能が低いことが知られている (69)。通常飼料で飼育した若齢ラットと老齢ラットの脳の AA 量を比較すると老齢ラットでは AA 量が低下しており、それが AA を強化した飼料で飼育することにより改善できるという報告がある (32)。しかし、今回のような 5 週齢の若齢ラットでは脳内の AA は飽和状態に達していたため、それ以上に AA は脳には取り込まれなかった可能性がある。

アラキドン酸から合成される主要なエイコサノイドである、血小板 TXA₂ 産生量はコントロール群と比べて AA 摂食の 3 群で、AA の摂食量が増えるにつれて増加傾向を示した。しかし、4 群間に有意差はなかった。また、大動脈 PGI₂ 産生量も群間で差がなかったことから、アラキドン酸は日常摂取量の 2 倍程度摂取しても TXA₂ 産生量に影響はないといえる。健常人において、食事以外に 1500mg/日のアラキドン酸を経口摂取した結果、食事だけの場合と比べて、血小板凝集能および血液凝固因子に有意差は認められなかったという報告がある

(70)。

以上より、アラキドン酸は主要なエイコサノイドの前駆体であるが、日常摂取量やサプリメントで推奨されている量を摂取しても血小板凝集、血栓形成にはほとんど影響がないことが示唆された。

総括

多価不飽和脂肪酸 (PUFA) には n-6 系と n-3 系があり、必須脂肪酸として重要な役割をもつ。n-6PUFA のアラキドン酸 (20:4n-6,AA) からは主要なエイコサノイドが合成されるが、過剰摂取では血小板トロンボキサン A₂ (TXA₂) の過剰産生により血小板凝集が亢進し、血栓形成、心筋梗塞などの悪影響が懸念される。n-3PUFA のエイコサペンタエン酸 (20:5n-3,EPA) やドコサヘキサエン酸 (22:6n-3,DHA) は血清トリグリセリド (TG) 濃度低下作用や組織リン脂質中の AA を減少させることによる AA 由来のエイコサノイド産生を抑制するため、心筋梗塞の予防作用が知られている。近年食生活の欧米化に伴い高血圧や脳卒中、高脂血症などの生活習慣病が増加しており、n-3 系多価不飽和脂肪酸によるこれらの疾患の予防が期待されている。

以前の研究で、n-3PUFA が豊富な海産動物油である魚油とアザラシ油では、同じ n-3PUFA 含量であるにも関わらず、アザラシ油の方が強い血清と肝臓 TG 濃度低下作用を示し、肝臓リン脂質のアラキドン酸低下作用を強く発揮した。アザラシ油では EPA、DHA は TG の sn-1 位または 3 位に多く結合しており、一方魚油では sn-2 位に多い。よって、アザラシ油での効果は TG 中の EPA、DHA の結合位置の違いによる作用と推測できるが、この研究ではアザラシ油にはドコサペンタエン酸 (22:5n-3,DPA) が魚油の 4 倍量、食餌脂肪中 1.2%含まれていた。DPA の生理作用はあまり知られておらず、アザラシ油の効果は DPA による作用とも考えられるため、第一章では DPA の脂質代謝への影響を EPA、DHA と比較した。

その結果 DPA の血清および肝臓 TG 濃度を EPA、DHA と同程度に低下させ、この作用は肝臓の脂肪酸 β-酸化系酵素の活性の上昇によるものであった。しかし、酵素活性においても DPA による EPA、DHA よりも強い効果はみられなかった。

さらに、エイコサノイドの前駆体となる組織リン脂質の脂肪酸組成を測定したところ、DPA は肝臓と血清リン脂質のアラキドン酸含量の低下作用が EPA、DHA よりも弱いことが示された。この原因は DPA によるリノール酸からアラキドン酸への転換抑制が EPA、DHA よりも強いためではなく、摂取した DPA が肝臓リン脂質に取り込まれにくいためだと考えられた。心臓リン脂質脂肪酸組成においても、DPA の摂食は EPA、DHA を摂食した際よりもアラキドン酸低下作用が若干弱かった。心臓リン脂質には DHA が取り込まれやすく、また、DPA も他の組織に比べると取り込まれやすかったが、EPA は取り込まれにくいという脂肪酸分配の臓器特異性が見られた。なお、今回の実験で摂食させた食餌脂肪中 10%の EPA、DPA、DHA 量ではカルジオリピン中のリノール酸の割合には影響を与えておらず、心筋ミトコンドリアの機能に障害は生じさせないと考えられた。脳リン脂質では DHA 摂食によりリン脂質中の DHA の割合が少しではあるが有意に増加した。DPA、EPA の摂食は脳リン脂質脂肪酸組成にはほとんど変化を及ぼさず、脳のリン脂質脂肪酸組成は食餌による影響は受けにくいことが示された。これは血液脳関門で選択的透過が行われるためと考えられ、n-3PUFA の中で血液脳関門を通過できるのは DHA のみであることが示唆された。

血小板リン脂質のアラキドン酸から作られる血小板トロンボキサン A₂ (TXA₂) 産生量は EPA、DPA、DHA 摂食により減少したが、DPA による減少作用は EPA、DHA よりも弱かった。これは肝臓リン脂質同様、DPA は血小板膜のリン脂質アラキドン酸の低下作用が弱かったためと推測される。

以上のように DPA は EPA、DHA と同程度に血清と肝臓脂質濃度低下作用を有し、また、肝臓リン脂質のアラキドン酸量低下作用は弱く、したがってアラキドン酸由来の TXA₂ 産生低下作用も弱いことが示された。

このことから、DPA は吸収が EPA、DHA よりも低い可能性が考えられた。魚油とアザラシ油の効果をラットで比較した先の実験では、魚油よりアザラシ油を摂食したラットで肝臓リン脂質の n-3PUFA の割合が高かった。この実験では魚油とアザラシ油はトリグリセリド態で摂食させていたが、第一章の実験では EPA、DPA、DHA をエチルエステル態で与えた。一般にトリグリセリド態よりもエチルエステル態の方が吸収は低いことが知られているが、同じエチルエステル態でも脂肪酸の種類によって吸収率が異なることが知られている。

そこで、第二章では EPA、DPA、DHA のラット胸管リンパへの吸収を調べたが、DPA の吸収の速さは EPA と同程度であり、DHA よりも早かった。24 時間後の吸収率は EPA とほぼ同程度であり、DHA よりも高かった。今回リンパへの投与はエチルエステルを他の脂肪酸が存在しないエマルジョン条件で行ったため、実際の摂食試験とは必ずしも吸収が一致するわけではない。しかし、同条件下で、DPA は EPA、DHA よりも吸収が低いということはなかった。よって、DPA は摂食しても組織リン脂質中の n-3PUFA 量が EPA、DHA を摂食した際よりも取り込まれにくいことが示された。

次に、アラキドン酸 (20:4,AA) はヒトの組織を構成する重要な必須脂肪酸であり、免疫系、神経系の調節に関わっている。近年、老化により脳内の AA 量が低下すること、そして AA を摂取することで脳内の AA 量が改善し、記憶力向上、日内リズムの改善をもたらすことが報告されてきた。しかし、AA は主要なエイコサノイド前駆体であるため、AA の摂取により TXA₂ の産生量が過剰になり、血小板凝集、血栓形成という悪影響を引き起こす可能性がある。そこで第三章では日本人の日常摂取量 (食餌脂肪中 0.5%の AA を含む)、及びサプリメントで推奨されている量 (食餌脂肪中 1.0%の AA を含む) の食餌 AA の影響をラットで調べた。

その結果、血清と肝臓の脂質濃度は今回摂食させた AA 量では影響は出なかった。また、作用機構は不明であるが、日常摂取量の 4 倍量の (食餌脂肪中 2.0%が AA)AA 量では白色組織重量を減少させた。

肝臓リン脂質の AA 量は AA 摂取により増加するが、日常摂取量とサプリメントで推奨されている量では取り込まれた AA 量に有意差はなかった。TXA₂ 産生量は AA の摂取により増加したが、日常摂取量とその 2 倍程度の AA 量の摂取では有意差がなかった。脳のリン脂質脂肪酸組成において、食餌脂肪中 2.0%量の AA を摂食したラットでは、脳リン脂質 AA 量が若干増加したが、日常摂取量やサプリメント推奨量の食餌 AA 量では脳リン脂質脂肪酸組成に影響を与えなかった。

以上より、アラキドン酸は日常摂取量の 2 倍程度摂取しても血小板凝集、血

栓形成にはほとんど影響せず、心疾患リスクを高める可能性は低いことが示唆された。

今日、日本人でも食生活の欧米化や運動不足による冠動脈疾患のような生活習慣病の問題は深刻化してきており、心血管系疾患と脳血管障害による死因は30%に及んでいる。また高齢化社会に伴い老人性痴呆が増加している。このような社会において機能性食品やサプリメントを利用した疾患予防への関心は高まっており、n-3PUFA の摂取およびアラキドン酸の摂取はこれらの改善に有効である。今回の研究は第一章の EPA、DPA、DHA の実験および第三章のアラキドン酸の実験、実験動物を用いて 3 週間という短期間の摂食を行って得られた結果である。本研究の結果はヒトに対してそのまま当てはめることはできないが、多価不飽和脂肪酸の有効性と安全性を研究していく上で有用な情報を与えられると考えられる。

参考文献

- 1) 日本動脈硬化学会 (2007) 動脈硬化症疾患予防ガイドライン2007
- 2) 鹿山光編 AA, EPA, DHA –高度不飽和脂肪酸 恒星社厚生閣
- 3) E. Arehart, S. Gleim, Z. Kasza, K. M. Fetalvero, K. A. Martin, J. Hwa (2007) *Current Medicinal Chemistry*, 14, 2161-2169.
- 4) Cheng, Y., Austin, S.C., Rocca, B., Koller, B.H., Coffman, T.M., Grosser, T., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A. (2002) *Science*, 296, 539.
- 5) Gryglewski, R.J., Bunting, S., Moncada, S., Flower, R.J., Vane, J.R. (1976) *Prostaglandins*, 12, 685.
- 6) Dusting, G.J., Moncada, S., Vane, J.R. (1977) *Prostaglandins*, 13, 3.
- 7) Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., Vane, J.R. (1976) *Nature*, 263, 663.
- 8) Grosser, T., Fries, S., FitzGerald, G.A. (2006) *J. Clin. Invest.*, 116, 4.
- 9) Vane, J.R. (1983) *Br. J. Pharmacol.*, 79, 821.
- 10) Harris, W. S. (1989) *J. Lipid Res.*, 30, 785-807.
- 11) Kinsella, J. E., Lokesh, B. and Stone, R. A. (1990) *Am. J. Clin. Nutr.*, 52, 1-28.
- 12) Simopoulos, A. P. (1991) *Am. J. Clin. Nutr.*, 54, 438-463.
- 13) Ikeda, I., Wakamatsu, K., Inayoshi, A., Imaizumi, K., Sugano, M. and Yazawa, K. (1994) *J. Nutr.*, 124, 1898-1906.
- 14) Ikeda, I., Wakamatsu, K., Yasunami, H., Sugano, M., Imaizumi, K., and Yazawa, K. (1993) in “Advances in Polyunsaturated Fatty Acid Research”, ed. by Yasugi, T., Nakamura, H. and Soma, M., Excerpta medica, Amsterdam, pp. 223-226.
- 15) Reddy, B. S., Burill, C. and Rigotty, J. (1991) *Cancer Res.*, 51, 487-491
- 16) S. Endres, R. Ghorbani, V.E. Kelley, K. Georgilis, G. Lonnemann, J.M.W. van der Meer, J.G. Cannon, T.S. Rogers, M.S. Klempner, P.C. Weber, E.J. Schaeffer, S.M. Wolff, C.A. Dinarello (1989) *N. Eng. J. Med.* 320, 265-271.
- 17) G.E. Caughey, E. Mantzioris, R.A. Gibson, L.G. Cleland, M.J. James, (1996) *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 116-122.
- 18) S.N. Meydani, A.H. Lichtenstein, S. Cornwall, M. Meydani, B.R. Goldin, H. Rasmussen, C.A. Dinarello, E.J. Schaefer. (1993) *J. Clin. Invest.* 92, 105-113.
- 19) T.M. Trebble, S.A. Wootton, E.A. Miles, M. Mullee, N.K. Arden, A.B. Ballinger, M.A. Strioud, P. C. Calder. (2003) *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 376-382.
- 20) Nobmann ED. Ponce R. Mattil C. Devereux R. Dyke B. Ebbesson SO. Laston S. MacCluer J. Robbins D. Romenesko T. Ruotolo G. Wenger CR. Howard BV. (2005) *Journal of Nutrition.* 135, 856-62.
- 21) 吉田弘子 (1997) 九州大学博士論文
- 22) 遠藤泰志 (1996) 日本食品科学工学会誌, 43, 1163-1169.
- 23) Tso, P. (1985) in “Advances in Lipid Research”, Vol.21, ed. by Paoletti, R. and Kritchevsky, D., Academic Press, Orlando, pp. 143-186.
- 24) Nelson, G. J. and Ackman, R. G. (1988) *Lipids*, 23, 1005-1014.
- 25) Kritchevsky, D., *Nutr. Rev.*, 46, 177 (1988)
- 26) Kritchevsky, D., Tepper, S. A., Vesselinovitch, D. and Wissler, R. W. (1973) *Atheroscler.*, 17, 225-243
- 27) Kritchevsky, D., Davidson, L. M, Weight, M., Kriek, N. P. J. and du Plessis, J. P (1982) *Atheroscler.*, 42, 53-58
- 28) Yamamoto, I., Sugano, M., Kadota, A., Sato, Y. and Wada, M. (1969) *J. Biochem.*,

- 66,685-691
- 29) 青山敏明 (1996) 九州大学博士論文
 - 30) Carlson SE, Werkman SH, Peeples JM, Cooke RJ, Tolley EA (1993) *J Am Oil Chem Soc* 75, 1815-1819.
 - 31) Birch EE, Garfield S, Hoffman DR, Uauy R, Birch DG (2000) *Dev Med Child Neurol* 42, 174-181.
 - 32) McGahon BM, Murray CA, Horrobin DF, Lynch MA (1999) *Neurobiol Aging* 20, 643-653
 - 33) M.Sonderberg et al., (1991) *Lipids* 26, 421-425.
 - 34) Kotani S, Nakagawa H, Tokimasa T, Akimoto K, Kawashima H, Toyoda-Ono Y, Kiso Y, Okaichi H, Sakakibara M (2003) *Neurosci Res* 46, 453-461.
 - 35) Okaichi Y, Ishikura Y, Akimoto K, Kawashima H, Yoyoda-Ono Y, Kiso Y, Okaichi H (2005) *Physiol Behav* 31, 617-623.
 - 36) Fukaya T, Gondaria T, Kashiya Y, Kotani S, Ishikura Y, Fujikawa S, Kiso Y, Sakakibara M (2007) *Neurobiol aging*, 28, 1179-1186.
 - 37) Kotani S et al., (2006) *Neurosci. Res.*, 56. 159-164.
 - 38) Folch, J., Lees, M. and Stanley, G. H. S. (1957) *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
 - 39) Rouser, G., Fkeischer, S. and Yamamoto, A. (1970) *Lipids* 5, 494-496.
 - 40) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
 - 41) Kelley, D. S., Nelson, G. J. and Hunt, J. E. (1986) *Biochem. J.* 235, 87-90.
 - 42) Kelley, D. S., Kletzien, R.F. (1984) *Biochem. J.* 217, 543-549.
 - 43) Ochoa, S. (1995) in "Methods in Enzymology", Vol. 1, ed. by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic Press, New York, pp. 739-753
 - 44) Markwell, M. A. K., McGroarty, E. J., Bieber, L. L. and Tolbert, N. E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 3426-3432.
 - 45) Hashimoto, T., Miyazawa, S., Gunarso, D. and Furuta, S. (1981) *J. Biochem.* 90, 415-421.
 - 46) Lee, J. H., Fukumoto, M., Nishida, H., Ikeda, I. and Sugano, M. (1989) *Journal of Nutrition* 119, 1893-1899.
 - 47) Lee, J. H., Ikeda, I. and Sugano, M. (1992) *Nutrition* 8, 162-166.
 - 48) Saynor, R. and Gillott, T. (1992) *Lipids* 27, 533-538.
 - 49) Nydahl, M. C., Gustafsson, I. B. and Vessby, B. (1994) *American Journal of Clinical Nutrition* 59, 115-122.
 - 50) Nordoy, A., Hatcher, L. F., Ullmann, D. L. and Connor, W. E. (1993) *American Journal of Clinical Nutrition* 57, 634-639.
 - 51) Baltzell, J. K., Wooten, J. T. and Otto, D. A. (1991) *Lipids* 26, 289-294.
 - 52) Raclot, T. and Groscolas, R. (1994) *American Journal of Clinical Nutrition* 60, 72-78.
 - 53) Wong, S. H., Nestel, P. J., Trimble, R. P., Storer, G. B., Illman, R. J. and Topping, D. L. (1984) *Biochimica et Biophysica Acta* 792, 103-109.
 - 54) Surette, M. E., Whelan, J., Broughton, K. S. and Kinsella, J. E. (1992) *Biochimica et Biophysica Acta* 1126, 199-205.
 - 55) Ikeda, I., Yoshida, H., Tomooka, M., Yosef, A., Imaizumi, K., Tsuji, H. and Seto, A. (1998) *Lipids* 33, 897-904.
 - 56) Yeo, Y. K. and Holub, B. J. (1990) *Lipids* 25, 811-814.
 - 57) Hiroyasu Iso and Yukio Furuichi et al (1998) *Compar Biochem and Physiol Part B.*

121, 223-231.

- 58) 原一郎監修、島崎弘幸、町田芳章編集 油脂の栄養と疾病 幸書房
- 59) Hwang, D. H. and Boudreau, M. (1988) *Journal of Nutrition* 118, 427-437.
- 60) Ikeda, I, Sasaki, E, Yasunami H, Nomiya, S, Nakayama, M, Sugano, M, Imaizumi, K, Yazawa, K (1995) *Biochimica et Biophysica Acta* 1259, 297-304.
- 61) Chernenko, G. A., Barrowman, J. A., Kean, K. T., Herzberg, G. R., Keough, K. M. W. (1989) *Biochem. Biophys. Acta* 1004, 95.
- 62) Boustani, S.E., Coltte, C., Monnier, L., Descomps, B., Crastes de Paulet, A. and Mendy, F. (1987) *Lipids* 22, 711-714.
- 63) Yang, L.-Y., Kuksis, A. and Myher, J. J. (1989) *Biochem. Cell Biol.* 67, 192-204.
- 64) Krokan, H. E., Bjerve, K. S. and Mork, E. (1993) *Biochem. Biophys. Acta* 1168, 59-67.
- 65) Yang, L.-Y., Kuksis, A. and Myher, J. J. (1990) *J. Lipid Res.* 31, 137-148.
- 66) Nordy, A., Barstad, L., Connor W. E. and Hatcher. L. (1991) *Am. J. Clin. Nutr.* 5, 1185-1190.
- 67) Lawson, L. D. and Hughes, B. G. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152, 328-335.
- 68) 橋口 健司 九州大学修士論文
- 69) Bourre, J M. (2004) *Journal of Nutrition, Health & Aging.* 8 (3), 163-74.
Nelson GJ, Schmidt PC , Bartolini G, Kelley DS,

謝辞

本研究を行うにあたり、御懇篤なる御指導を賜った池田郁男教授に深甚の謝意を表します。

また、本研究中、多くの御指導と御鞭撻を頂いた東京工科大学遠藤泰志教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に協力された日本水産株式会社、土居崎 信滋氏、山口 秀明氏に厚く御礼申し上げます。

本研究中、有益な助言をして下さった生体分子機能学分野の諸先輩方、お互いに支えて励ましあった同級生、実験に協力して下さった皆様に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり尊い命を犠牲にいただいた多くのラットに感謝すると共に、心から御冥福をお祈り申し上げます。