

修士論文

カヤ油に含まれるシアドン酸（非メチレン介在型不飽和脂肪酸）
のラット脂質代謝への影響

専攻	生物産業創成科学専攻
指導教員	池田郁男教授
学籍番号	A6AM1324
氏名	角掛 久美子

目次

序論	1
第1章 非メチレン介在型不飽和脂肪酸(シアドン酸)の単離とラット脂質代謝への影響	
1. 緒言	5
2. 方法	6
3. 結果	18
4. 考察	36
第2章 カヤ油に含まれるシアドン酸(非メチレン介在型不飽和脂肪酸)の肥満モデルラットに対する脂質代謝への影響	
1. 緒言	40
2. 方法	41
3. 結果	51
4. 考察	64
第3章 シアドン酸のラットにおける吸収についての検討	
1. 緒言	67
2. 方法	68
3. 結果	72
4. 考察	77
総括	78
参考文献	80
謝辞	85

序論

近年、食の欧米化と運動不足により、日本でも肥満を基盤とする糖尿病、高血圧、動脈硬化症などの生活習慣病、いわゆるメタボリックシンドローム患者が増加し、社会的にも問題となっている。また、非飲酒者であっても、脂肪肝に肝実質の壊死、炎症、線維化所見が加わった非アルコール性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis : NASH）を発症する場合があります、この場合基礎疾患として、肥満、高脂血症、糖尿病がある事が多く、近年、急速に関心が高まっている。

脂肪肝とは、肝細胞の中にトリグリセリドが肝重量の5%以上蓄積した状態をいい、最近では成人男性の25%~30%が、成人女性の15~20%が脂肪肝とされ、年々増加傾向にある。脂肪肝には急性脂肪肝と慢性脂肪肝があるが、急性脂肪肝は主に薬物中毒に由来するが、慢性脂肪肝のうち最も多くみられるのは、アルコール多飲と肥満によるものである。これは近年のアルコール消費量の増加と国民の栄養状態の向上ならびに社会生活の多様性から来る、摂取カロリーの過剰とされている。また脂肪肝の発症には、脂肪酸の合成の促進あるいは脂肪酸の β 酸化の抑制、アポ蛋白の分泌抑制など複雑な経路が関わっているとされる。脂肪肝は通常何の症状も発現しないが、進行すると肝炎、肝硬変になることが知られている他、肥満をとともなうことが多いため、糖尿病や高脂血症、動脈硬化など生活習慣病を合併する危険性があり、健康上、注意が喚起されている。脂肪肝の治療には、脂肪肝の原因となる生活習慣を改善することが必要である。そのため、アルコールやカロリー摂取の抑制等の食事療法や運動療法が行われているが、ストレスや生活時間が不規則な現代社会では、脂肪肝を治療・予防することは難しいのが現状である。そこで、現代ではメチオニン、葉酸、コリン、ビタミンB6、セレン、亜鉛、タウリン等の栄養成分のサプリメントや医薬品による脂肪肝の予防改善が試みられているが、過剰摂取による弊害の危惧があり、日常規則的に、かつ容易に摂取可能な食事の形態で脂肪肝を予防する食品の開発が期待されている。また、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）や非アルコール性脂肪肝（NAFLD）の治療にも、生活習慣や栄養療法の改善、肥満の解消が原則である。

食事に含まれる一般の動植物性食用油脂を構成している脂肪酸は、大部分が炭素数偶数であり、主要な不飽和脂肪酸の構造についても二重結合の立体配置および位置分布にも規則性がある。すなわち、二重結合はcis配置をとり、二重結合を2個以上含む多価不飽和脂肪酸（PUFA）においては、二重結合は1,4-ペンタジエン構造を基本単位としている。リノール酸やアラキドン酸などに挙げられるように、通常は二重結合間にメチレン基を1個挟んだ構造をとっているが、天然にはこれらの範疇に入らない特殊な脂肪酸が存在しており、これ

らの脂肪酸には特異的な機能性を持つものがあると報告され、注目を集めている。その一つに、二重結合間にメチレン基を複数個挟んだ構造を持つ非メチレン介在型不飽和脂肪酸 (NMIFA ; Non-Methylene Interrupted Fatty Acid) があり、広く裸子植物の種子油中に含まれることが知られている¹⁾。NMIFA には、ピノレン酸【18:3(5c,9c,12c)】やその異性体のコロンビン酸【18:3(5t,9c,12c)】、シアドン酸【20:3(5c,11c,14c)】、ジュニペロン酸【20:4(5c,11c,14c,17c)】などがあり、このタイプの脂肪酸の代謝や生理作用には、通常の高価不飽和脂肪酸とは異なる生理効果があるのではないかと考えられている。

NMIFA はその特異的な分子構造から、通常の PUFA とは異なる生理効果を有するのではないかと考えられ、近年では様々な実験報告がなされている。Houtsmuller²⁾や Elliott³⁾は、ラットを用いた実験においてコロンビン酸が必須脂肪酸 (リノール酸) の代替作用を有することを認めた。Sugano⁴⁾は、ピノレン酸を含む *Pinus koraiensis* の種子油をラットに与えたところ、コレステロール (Chol) 低下作用が認められたと報告している。Assert⁵⁾の実験では、ピノレン酸とシアドン酸を共に含む *Pinus pinaster* の種子油をラットに与えたところ、血清のトリグリセリド (TG) 濃度及び VLDL-TG 濃度は低下したが、*Pinus koraiensis* (シアドン酸含有量はごくわずか) の種子油を投与した場合には、その効果が低かったことを報告した。また Pasquier⁶⁾らは、*Pinus pinaster* 種子油はラットの脳や乳房、肝臓、血液、乳の脂肪酸組成を変化させることを報告している。Ikeda⁷⁾は、シアドン酸とジュニペロン酸を共に含む *Biota orientalis* の種子油をラットに与えたところ、血清 Chol 濃度と肝臓 TG 濃度が低下したことを認めた。Berger と German⁸⁾は、*Biota orientalis* と同様にシアドン酸とジュニペロン酸を共に含む *Platycladus orientalis* の種子油をマウスに与えた実験において、シアドン酸が肝臓のホスファチジルイノシトール (PI) に相当量取り込まれアラキドン酸レベルを低下させたと報告している。培養細胞を用いた Tanaka⁹⁾の実験でも、同様の現象を確認している。また、Tanaka¹⁰⁾は、炭素数 20(C₂₀)の NMIFA 残基を持つ PI の分子種が有効なシグナル分子であるジアシルグリセロール (DAG) の供給源となりうるかどうか調べたところ、シアドン酸やジュニペロン酸のような C₂₀-NMIFA をもつ DAG は、Protein Kinase C (PKC) の有効な活性化因子であることが示され、これら C₂₀-NMIFA 残基をもつ PI は有効なシグナル分子の供給源となることを報告した。

裸子植物の種子油中には、複数の NMIFA が共存していることが多いため、油脂としての効果がどの脂肪酸に起因するのかを特定することは難しい。その中で、針葉樹類の種子油中に NMIFA の $\Delta 5$ 脂肪酸が存在していることが知られているが、当研究室の高橋¹¹⁾は、針葉樹以外の植物を含めた東洋産ナッツに

着目し、カヤ (*Torreya nucifera*) の種子から総脂質を抽出して、その脂肪酸組成を測定し、NMIFA として唯一シアドン酸が約 8% 含まれることを確認した。

また、当研究室の長田¹²⁾ は、シアドン酸を含む食餌性カヤ油をラットに与え、その脂質代謝に及ぼす影響について検討し、その結果、食餌性カヤ油には強いトリグリセリド低下作用があること、また、肝臓の脂肪酸合成が抑制されることが示唆された。しかし、この実験は食餌性カヤ油を投与しての実験でありシアドン酸の効果として結論づけるには、シアドン酸を単離しての検討が必要となる。そこで本研究では、まず第 1 章として、カヤ油からシアドン酸を単離した後、シアドン酸を添加した飼料をラットに与えて飼育し、その脂質代謝に及ぼす影響について検討した。

さらに、カヤ油投与によるラット肝臓トリグリセリド濃度の低下が顕著であったため、抗肥満作用について検討するために、肥満モデルラットとして OLETF ラット (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats) に着目した。OLETF ラットは、胃の幽門を閉ざすことによる満腹感の調節や膵酵素の分泌に関与する消化管ホルモンのひとつであるコレシストキニン (CCK) に関するレセプターが欠損しているために過食症により肥満となり、糖尿病のほかに高脂血症も発症する¹³⁾。Kawano ら¹⁴⁾ は、Charles River Canada Inc. より購入した Long-Evans ラットから肥満を呈し、尿糖を排泄しているが体重の減少がほとんどなく、糖尿病の進行が緩徐であるラットを発見し、それを選抜交配することにより、II 型糖尿病を自然発症する OLETF の系を確立した。これとは別に糖尿病を発症しない系統 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットもほぼ同時に確立されている。OLETF ラットは生後 8~9 週頃より LETO ラットに比べ過食となり、体重増加も著しく、顕著な肥満となる。さらに加齢とともに耐糖能は低下し、雄性 OLETF の場合、30 週齢でほぼ 90% が糖尿病となる¹⁵⁾。一方雌性ラットの発症率は低く、24 週齢未満での発症は低率か皆無である¹⁶⁾。LETO ラットは高齢にいたっても糖尿病の発症は認められていない。このような性状をもつ OLETF ラットは、インスリン非依存性 (II 型) 糖尿病および肥満モデルラットとして広く様々な研究で用いられている。Okauchi ら¹⁷⁾ は OLETF ラットを肥満させるために cafeteria 食の手段を用いている。cafeteria 食はラットが好んで摂食するカロリーの高い、チョコチップクッキー、焼きせんべいなどを与え肥満させようとするものである。27 週齢で明らかに体重増加が顕著で肥満を示し、インスリン抵抗性も発症した。そこで本研究では、第 2 章として、OLETF ラットを肥満モデルラットとして、LETO ラットをコントロールとして用い、高スクロース食を与えることで、より肥満しやすくさせ、カヤ油摂取によるシアドン酸の肥満抑制作用について検討した。

また、シアドン酸は先で述べたように、通常の脂肪酸と比較して特殊な構造

を有している。そのため、吸収に対して差異が出るか、その影響を検討する必要がある。食餌により摂取された脂質は、小腸上皮細胞へ吸収された後、カイロミクロンを形成し、胸管リンパへと放出される。そこで胸管リンパカニューレーション法¹⁸⁾を用い、ラットの胸管にチューブを入れ、リンパ液を集めることで脂質の吸収を詳細に調べることが出来る。

従って、第3章では、ラット胸管リンパカニューレーション法を用いて、シアドン酸のリンパへの吸収について検討した。



シアドン酸 20:3(5c,11c,14c-Eicosatrienoic acid)

非メチレン介在型不飽和脂肪酸(シアドン酸)の単離とラット脂質代謝への影響

1. 緒言

裸子植物であるカヤ (*Torreya nucifera*) の種子から採取したカヤ油には、通常の不飽和脂肪酸の構造とは異なり、非メチレン介在型不飽和脂肪酸の一つであるシアドン酸(20:3 ; 5Z,11Z,14Z-エイコサトリエン酸)が約 10%含まれている。リノール酸やアラキドン酸などに挙げられるように、通常は二重結合間にメチレン基を一つ挟んだ構造をとっているが、天然にはこれらの範疇に入らない特殊な脂肪酸が存在しており、これらの脂肪酸には特異な機能性を持つものがあると報告され、注目を集めている。その一つに、二重結合間にメチレン基を複数個挟んだ構造を持つ非メチレン介在型不飽和脂肪酸 (NMIFA ; Non-Methylene Interrupted Fatty Acid) があり、広く裸子植物に見られる。このタイプの脂肪酸の代謝や生理作用には、通常の高価不飽和脂肪酸とは異なる生理効果があるのではないかと考えられている。

当研究室の高橋は、針葉樹以外の植物を含めた東洋産ナッツに着目し、カヤ (*Torreya nucifera*) の種子から総脂質を抽出して、その脂肪酸組成を測定し、シアドン酸が約 8%含まれることを確認した。また、当研究室の長田はカヤ油を試験食としてラットに与えたところ、食餌性カヤ油に脂質代謝改善作用があることを認めた。

そこで本研究では、食餌性カヤ油の生理作用がシアドン酸に由来しているのかを明らかにするため、カヤ油からシアドン酸を単離した後、ラットに与え、その脂質代謝に及ぼすシアドン酸の効果を調べることを目的とした。

2. 実験方法

2.1 カヤ油からシアドン酸の単離

2.1.1 アルカリによる油脂の加水分解^{1 9)}

<目的>アルカリによって、油脂を遊離脂肪酸の状態にする。

30容の丸底フラスコにカヤ油（(有)鹿北製油）約 300g を秤り取った。このフラスコに 90g の KOH をできるだけ少量の水に溶かし、1.5ℓのエタノールを加え混合した溶液を加えた。次に、還流冷却器をつけて、マントルヒーターにて 3 時間煮沸させた。

その後、蒸留用の冷却器に取り換え、エタノールの大部分（約半分）を留去させた後、少し冷却し、分液ロートに移し、多量の温水（残っている溶液と同等量；約 1ℓ）を加えて内容物を溶解させた。

少しの冷却後、温かいうちに希硫酸を加えて完全に酸性にした。（pH 試験紙にて確認）その後、脂肪酸が上層に分離した。

しばらく冷却させた後、石油エーテルで脂肪酸を抽出し、抽出液は洗液中に硫酸の反応が出なくなるまで繰り返し水洗した。

その後、水洗後の石油エーテル抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。
（4℃にて 1 晩放置。）

脱水後、ブフナーロートにて吸引ろ過し、エバポレーターでろ液から石油エーテルを留去し、濃縮し、遊離脂肪酸濃縮物を得た。（冷蔵保存）

2.1.2 尿素付加法^{1 1)}

<目的>2.1.1 で得られた遊離脂肪酸濃縮物から、飽和脂肪酸を取り除き、多価不飽和脂肪酸の濃縮物とするため。

30容三角フラスコに得られた遊離脂肪酸濃縮物に移し、メタノール 10を加えて溶解し、さらに尿素 200g を加えた。

(遊離脂肪酸を 20%尿素/メタノール溶液 10で溶解)

70°Cに保った湯浴中で、透明になるまで完全溶解させた。



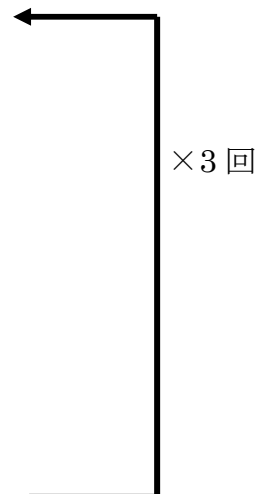
4°Cで一晩放冷



生成した結晶（尿素アダクト）を吸引ろ過。ろ過後の結晶はブフナーロート上にてメタノールで洗い、除去した。



ろ液は三角フラスコに戻し、さらに尿素 200g を加えた。



3回の尿素付加終了後、結晶を除いたろ液を分液ロートに移し、6N 塩酸を加えて pH2 以下にした。

その後、ヘキサン 1.50を加え、よく混和し、しばらく静置した。

静置後に、ヘキサン層を別の三角フラスコにとり、下層を分液ロートに戻して、再度、ヘキサン 10を加え、抽出した。

得られたヘキサン層を合わせ、3 回約 10の水で水洗し、酸性を示さなくなったことを確認後、無水硫酸ナトリウムで脱水。一晩放置した。

無水硫酸ナトリウムを吸引ろ過により除去後、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、残渣を濃縮多価不飽和脂肪酸とした。

2.1.3 リパーゼエステル化法¹¹⁾

<目的>2.1.2 尿素付加法で反応後の濃縮物は、ほぼリノール酸とシアドン酸の濃縮物であるが、この濃縮物からできるだけリノール酸を除去するために、リノール酸に特異的に作用する *Rhizopus delemar* リパーゼを用い、リノール酸をエステル画分として除去後、非エステル画分にシアドン酸を濃縮することで純度を高める。

300ml 容ビーカーに得られた濃縮多価不飽和脂肪酸:ラウリルアルコール=1:2(mol/mol)をとり、これに水 20ml、*Rhizopus delemar* リパーゼ 20000 単位 (U) を加え、混合した。

恒温器にスターラーを設置し、30℃で約二日間反応させた。

反応終了後、器具の都合上、反応液の半量をリパーゼが入らないように上澄みから採取し、0.5N 水酸化カリウム(30%エタノール溶液)を 1.10加え、混合した。
〔残りの半量はリパーゼを吸引ろ過により除去後、上記と同操作を行った。以下の操作も同じ。〕

混合液を分液ロートに移し、ヘキサン 1.50で未反応のラウリルアルコールおよびエステル化したリノール酸を抽出し、ヘキサン層（上層）を除去した。

反応液（下層）に 6N 塩酸を加えて、pH2 以下の強酸性下にし、ヘキサン 1.50で未反応の遊離脂肪酸を抽出した。

これを約 10の水で 3 回水洗し、酸性を示さなくなったことを確認後、無水硫酸ナトリウムで脱水。4℃で一晩放置した。

無水硫酸ナトリウムを吸引ろ過により除去後、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、残渣としてシアドン酸濃縮物が得られた。

以上、カヤ油からシアドン酸濃縮物が得られるまでの全精製過程を約 5 回繰り返し、得られたシアドン酸濃縮物はエチルエステル化し、冷凍保存した。

2.1.4 エチルエステル化²⁰⁾

<目的> 試料油を調製する際に、シアドン酸をエチルエステルとして添加するため。

得られたシアドン酸濃縮物をナスフラスコに取り、硫酸—エタノール溶液を加え溶解し、フラスコに還流冷却器を付けて加熱し、マントルヒーターにて1 h 沸騰させた後、冷却させた。

冷却後、内容物を分液ロートに移し、水を加えた後、毎回石油エーテルを用いて2回抽出した。

抽出液を合わせ、洗浄した水が酸性を示さなくなるまで、水洗を繰り返した。

十分な水洗後、石油エーテル溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水。4°Cで一晩放置した。

無水硫酸ナトリウムを吸引ろ過により除去後、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、シアドン酸のエチルエステル化物が得られ、ラットの餌に添加する時まで冷凍保存した。食餌中の油脂は得られたシアドン酸エチルエステルをコーン油に添加することにより調製した。

2.1.5 シアドン酸濃縮物の脂肪酸組成

得られたシアドン酸濃縮物の脂肪酸組成は、脂肪酸を三フッ化ホウ素メタノール法²¹⁾によりメチル化し測定した。

試料油を約 50mg ねじ付き試験管に取り、0.5M NaOH/MeOH を 1ml 加え、90°Cのブロックヒーターにて 7 分間加熱した。三フッ化ホウ素メタノール試薬を 1ml 加え、2 分間沸騰後、ヘキサン 5ml を加え、さらに 1 分間加熱した。その後、ヘキサン層が試験管の首に達するまで NaCl 飽和水溶液を加え、しばらく放置した後、ヘキサン層を分取、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、ろ過し、GC サンプルとした。分析条件を以下に示す。

- GC 装置
GC-2010 (島津)
- カラム
CP-Sill88 WCOT カラム 0.25mm×60m (Chrompack)
- 検出
水素炎イオン化検出器 (FID)
- カラム温度
170°C 2 分間保持後、4°C/分で 225°C まで昇温
225°C で 15 分保持
- 試料注入部温度(Inj)
220°C
- 検出部温度 (Det)
250°C
- キャリアーガス
He
- 記録計
Chromatocorder21

2.2 動物実験

本研究は、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」に従って計画を策定し、実施した。

2.2.1 実験動物

実験動物としては Sprague-Dawley 系雄性ラット 4 週齢（日本クレア(株)）を用いた。ラットは室温 20~25°C、明暗サイクル 12 時間（照明時間 8:00~20:00）に設定された動物棟にて飼育した。また、ラットは全て個飼いのワイヤーケージにて 1 匹ずつ飼育した。

2.2.2 実験飼料

予備飼育期間中は市販の固形飼料 CE-2（日本クレア(株)）を与えた。また試験食は、基本的に AIN-93G^{2,2)} に従い、食餌中油脂含量が 10%となるよう調製した。（Table 1）

群分け・コーン油食群（食餌中の油脂がコーン油のみ）

- ・ 5%シアドン酸添加油食群（食餌中油脂のうちシアドン酸 5%含む）
- ・ 10%シアドン酸添加油食群(食餌中油脂のうちシアドン酸 10%含む)

以上の 3 群に分け、1 群 7 匹 (n=7) とした。

コーン油に対して、シアドン酸添加濃度が 5%、及び、10%となるよう調整し、実際に作成した試料油の脂肪酸組成を Table 2 に示す。脂肪酸組成の分析は以前に示した測定法（三フッ化ホウ素メタノール法）に基づく。

2.2.3 飼育条件

市販飼料 CE-2 で 1 週間予備飼育後、体重がほぼ等しくなるよう 3 群*に分け、それぞれの試験食を与えてさらに 2 週間飼育した。なお、飼育期間を通して、飼料および飲料水は自由摂取させた。また、体重、摂食量は毎日測定した。

試験飼育期間終了後、最終日に 8 時間（5:00~13:00）絶食させ、エーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し、屠殺した。また、臓器（肝臓、心臓、脾臓、腎臓）、脂肪組織（腸間膜、腎周囲+後腹膜、精巣周囲）を回収した。肝臓は液体窒素で瞬間凍結させ、採血により得られた血液は遠心分離（3000rpm, 20min, 5°C）して血清を分離した。回収した血清は分析まで -30°C で保存した。

*3 群；コーン油食群（コーン群）

5%シアドン酸添加油食群（5%群）

10%シアドン酸添加油食群（10%群）

2.3 測定項目

解剖後、以下に示す項目を測定した。

測定項目：体重、摂食量

臓器（肝臓、心臓、脾臓、腎臓）重量

脂肪組織（腸間膜、腎周囲＋後腹膜、精巣周囲）重量

血清脂質、肝臓脂質濃度

血清および肝臓脂質脂肪酸組成

肝臓脂質代謝関連酵素活性

エイコサノイド産生

2.4 脂質濃度分析

2.4.1 血清および肝臓脂質濃度の分析

血清中の総コレステロール、HDL-コレステロール濃度をコレステロール E-テストワコーにより、トリグリセリド濃度をトリグリセライド E-テストワコーにより、リン脂質濃度をリン脂質 C-テストワコーにより、遊離脂肪酸(FFA)の濃度を NEFA C-テストワコー（和光純薬工業(株)）により比色法を用いて測定した。

また、肝臓中の脂質を後述の方法で抽出し、Triton-X100 を加えて可溶化後、血清濃度測定時の方法に準じて肝臓総コレステロール、トリグリセリド濃度をそれぞれ、コレステロール E-テストワコー、トリグリセライド E-テストワコーにより測定した。また、肝臓総リン脂質は化学的定量法により、サンプルを 5 倍希釈後、70%過塩素酸を加え、180~190℃で 1 時間加熱後、冷却させた。次に水、2.5%モリブデン酸アンモニウム、10%アスコルビン酸を順に加え、ビーズを乗せて 5 分間煮沸した。冷却後、上記と同様比色法により測定した。

2.4.2 肝臓脂質の抽出

Folch 法²³⁾に従い抽出した。すなわち、肝臓 0.5g をガラスホモジナイザー (10ml 容) に入れ、MeOH(15ml)でホモジナイズした。次にクロロホルム(30ml)で管壁、ガラスを洗浄した後、すべてを 50ml 容メスフラスコに入れ、加温抽出 (40℃×30 分) した。冷却後、常温に戻し、ろ過直前にクロロホルム : MeOH = 2 : 1 溶液で 50ml まで Fill up した。その後、No.2 のろ紙でろ過し、ろ液を共栓付きメスシリンダーに集めた。ろ液量の約 20%の水を加え、共栓を水にぬらして 2 回ゆっくりと転倒混和した。これを 5℃で一晩放置後、常温に戻し、上層 (水-MeOH 層) を除去した。残りを濃縮用丸底フラスコに移し、減圧濃縮した。MeOH を約 4ml 加えて、水を共沸させた。その後、クロロホルム 2ml、ヘキサン 2ml×2 回で順に丸底フラスコを洗浄し、内容液を 25ml 容メスフラスコ

に完全に移し、サンプルとした。サンプルは -35°C にて脂質分析時まで保存した。

2.5 肝臓および血清の脂質脂肪酸組成分析

2.5.1 肝臓脂質脂肪酸組成

肝臓脂質を Folch らの方法にて抽出し、薄層クロマトグラフィーにより脂質の分画を行った。展開溶媒として石油エーテル/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/水(65:25:4)でリン脂質画分を分離し、それらの脂肪酸組成を 2.1.5 と同様にガスクロマトグラフィーにより分析した。

2.5.2 血清脂質脂肪酸組成

血清脂質は血清 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、2.5.1 と同様に薄層クロマトグラフィーにより脂質を分画後、TG 画分、リン脂質画分をガスクロマトグラフィーにより分析した。

2.6 脂質代謝関連酵素の活性測定

肝臓をホモジナイズし、遠心分離後、上清を分取して、肝臓総ホモジネート画分を得た。上清の残りを超遠心分離し、そこから上清を分取して肝臓サイトソルを得た。得られたサイトソルを用いて脂肪酸生合成系の酵素活性を、また総ホモジネートを用いて β 酸化系の酵素活性を測定した。

2.6.1 脂肪酸生合成系酵素活性の分析

①脂肪酸合成酵素の活性は Kelley らの方法で分析した²⁴⁾。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 $6,220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

②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²⁵⁾。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。

③リンゴ酸酵素活性は Ochoa らの方法で分析した²⁶⁾。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。

2.6.2 脂肪酸 β 酸化系酵素活性の分析

④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²⁷⁾。最終濃度 0.04mM パルミトイル CoA、0.25mM DTNB (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid))、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(2-nitro-5-thio benzoic acid) のモル吸光係数 $13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

⑤アシル CoA オキシダーゼ活性は Hashimoto らの方法で分析した²⁸⁾。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 (フラクション 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 $6,390 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。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。

また、2.6.1 と 2.6.2 における調製した酵素源中のタンパク質量は、Lowry 法に従って定量した²⁹⁾。

脂肪酸生合成系酵素・・・脂肪酸合成酵素(FAS)、リンゴ酸酵素(ME)、
グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)

脂肪酸 β 酸化系酵素・・・カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ(CPT)、
アシル CoA オキシダーゼ(ACO)

2.7 エイコサノイド産生

大動脈は採取後、脂肪等を除去し氷冷した生理食塩水中に保存した。プロスタサイクリン(PGI₂)産生量は、約 1.5cm (約 20mg) の大動脈を Krebs-Henseleit bicarbonate 緩衝液 (pH7.4) で 25°C、30 分間インキュベートすることにより PGI₂ を産生させ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}³⁰⁾ を 6-keto-prostaglandin F_{1α} enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical Co.) で測定した。

トロンボキサン A₂ (TXA₂) 産生量は、採取した血液を 30 分室温放置し凝固させた後、37°C で 30 分間インキュベートすることにより TXA₂ を産生させ、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。

2.8 統計処理

データは平均値±標準誤差で示し、一元配置分散分析を行い 3 群間の差を分析した。危険率 5%以下であった場合に有意差ありとし、有意差が生じた場合は Tukey-Kramer 法により多重比較検定を行い、群間の差が危険率 5%以下の場合をもって有意差ありと判定した。

Table 1 Composition of experimental diets

Ingredients	wt%
Cornstarch	36.75
Casein	20.0
α -Cornstarch	13.2
Sucrose	10.0
Fat	10.0
Cellulose	5.0
Mineral mixture(AIN-93G)	3.5
Vitamin mixture(AIN-93)	1.0
L-Cystine	0.3
Choline bitartrate	0.25
tert-Butylhydroquinone	0.0014
Total	100

Table 2 Fatty acid composition (wt%) of dietary fats

Fatty acids	Corn	5%	10%
16:0	10.3	9.8	8.7
18:0	1.7	1.7	1.5
18:1 n-9	28.6	26.5	24.0
18:2 n-6	57.3	55.1	53.9
18:3 n-3	0.8	0.8	0.8
20:3 (Δ5,11,14)※	—	4.8	9.9
others	1.2	1.3	1.2

※シアドン酸

3. 結果

3.1. カヤ油からシアドン酸の単離

- 得られたシアドン酸濃縮物の収率は 8.1%であり、純度は 53.6%であった。なお、シアドン酸濃縮物の脂肪酸組成において、シアドン酸以外の脂肪酸はほぼリノール酸 (40.5%) のみであった。
- 食餌に含まれる油脂のうち、シアドン酸濃度が 5%および 10%となるよう調整したところ、実際に作成した試料油のシアドン酸添加濃度はそれぞれ、4.8%および 9.9%となった。(Table 2) よってシアドン酸添加濃度は、それぞれ 5%および 10%に近い値を得ることができた。

カヤ油からシアドン酸濃縮物を得る精製過程において、カヤ油にはリノール酸が相当量含まれており、リノール酸を完全に除去するのは困難であったため、今回得られたシアドン酸濃縮物は純度が 53.6%となり、シアドン酸以外はほぼリノール酸となった。また、今回の実験では、ラットに与える食餌に添加する分量が必要なため、大量に精製することが必要となった。そのため、各反応へと順に移行するに従い、ロスも増え、収率低下につながったと考えられる。また、濃縮段階で有機溶媒を完全に留去しきれていなかったことも原因として考えられるので、今後、この点を改善することにより、収率向上につながると考えられる。

3.2. 動物試験

3.2.1. 体重、摂食量、臓器重量

各試験食で 2 週間飼育した後のラットの体重増加量、摂食量、臓器重量は、各群間での差は見られなかった。(Table 3)

3.2.2. 脂肪組織重量

腎周囲+後腹膜脂肪組織において、コーン油食群 (1.62g/100g 体重) と比べて 5%および 10%シアドン酸添加油食群 (5%群: 1.25 g/100g 体重, 10%群: 1.13 g/100g 体重) での有意な低下が見られ、また腸間膜脂肪組織において、10%シアドン酸添加油食群 (1.04 g/100g 体重) でコーン油食群 (1.34 g/100g 体重) と比べ有意な低下が見られた。また、精巣周囲の脂肪組織においては、有意差は得られなかったもののコーン油食群 (1.21 g/100g 体重) に対して、5%、及び 10%シアドン酸添加油食群での低下 (5%群: 1.01 g/100g 体重、10%群: 1.02 g/100g 体重) が確認できた。よって、総脂肪重量においてもコーン油食群 (4.16

g/100g 体重) に対し、10%シアドン酸添加油食群で有意な低下が得られ、5%群 (3.36 g/100g 体重) よりも 10%群 (3.19 g/100g 体重) でより強い低下が確認できた。(Fig. 1, Table 4)

3.2.3. 血清脂質濃度

総コレステロール濃度において、コーン油食群 (104mg/dL) に比べ 10%シアドン酸添加油食群 (76.5 mg/dL) で有意な低下が見られた。遊離脂肪酸濃度において、コーン油食群 (0.43mEq/L) よりも 5%シアドン酸添加油食群 (0.34mEq/L) で有意に低く、さらに 5%群よりも 10%シアドン酸添加油食群 (0.26 mEq/L) で有意な低下が見られた。また、トリグリセリド濃度においては、有意差は得られなかったものの、コーン油食群 (214.3 mg/dL) に対して、5%群 (162.3 mg/dL)、及び 10%シアドン酸添加油食群 (144.9 mg/dL) での減少傾向が確認できた。HDL-コレステロール、リン脂質濃度においても、トリグリセリド濃度と同様な傾向がみられた。(Fig. 2, Table 5)

3.2.4. 肝臓脂質濃度

トリグリセリド濃度において、コーン油食群 (60.3mg/g 肝臓) に対し、5%群 (38.1 mg/g 肝臓) 及び 10%のシアドン酸添加油食群 (29.4 mg/g 肝臓) で有意な低下が見られ、さらに、10%シアドン酸添加油食群のトリグリセリド濃度 (29.4 mg/g 肝臓) はコーン油食群 (60.3mg/g 肝臓) の約 1/2 程度となっており、顕著な差として現れた。総コレステロール濃度、及びリン脂質濃度においては群間での差は認められなかった。(Fig. 3, Table 6)

3.2.5 血清および肝臓脂質の脂肪酸組成

Table 7~12 に、血清および肝臓のトリグリセリド (TG)、リン脂質 (PL) 画分における脂肪酸組成を示した。シアドン酸添加油食群では、シアドン酸は血清および肝臓のすべての脂質画分に取り込まれており、その分アラキドン酸濃度が低くなる傾向が見られた。

血清脂質について、上記の点以外は、TG 画分にてオレイン酸(18:1)がコーン油食群 > 5%群 > 10%群の順に低く、リノール酸(18:2 n-6)がコーン油食群 < 5%群 < 10%群の順に高値を示した。血清リン脂質の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) 画分のステアリン酸(18:0)はコーン油食群 > 5%群 > 10%群の順に低値を示した。またホスファチジルエタノールアミン (PE) 画分のパルミチン酸(16:0)はコーン油食群に比べ、5%、10%のシアドン酸添加で高値を示した。また、PE 画分のドコサペンタエン酸 (22:5 n-3) がコーン油食群に対して 5%、10%シアドン酸添加群で増加していた。(Table 7~9)

肝臓脂質について、シアドン酸添加油食群では、シアドン酸含量が濃度依存的に含まれており、TG 画分ではリノール酸(18:2 n-6)がコーン油食群 < 5%群 < 10%群の順に高かった。一方で、オレイン酸(18:1)はコーン油食群 > 5%群 > 10%群の順に低値を示した。また、パルミチン酸 (16:0) がコーン油食群と比べ、シアドン酸添加群で低くなった。PC、PE 画分では、シアドン酸添加油食群でシアドン酸の含量が増加した分、濃度依存的にアラキドン酸含量が減少していた。アラキドン酸の代わりにシアドン酸が取り込まれていることが確認できた。また PC、PE 画分のステアリン酸(18:0)はコーン油食群 > 5%群 > 10%群の順に低い値を示した。(Table 10~12)

3.2.6 脂質代謝関連酵素の活性測定

肝臓における脂質代謝関連酵素の活性は Table 10 に示す。脂肪酸合成系酵素については、脂肪酸生合成の律速酵素である脂肪酸合成酵素 (FAS) において、コーン油食群に比べ 10%群で有意に減少した。また、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 (G6PDH)は、5%および 10%シアドン酸添加油食群で有意に低い値を示し、リンゴ酸酵素活性(ME)においても 10%群で有意に低く、5%よりも 10%でより低値を示した。

また、脂肪酸β酸化系酵素では、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 (CPT) 活性が 5%および 10%の 2 群がコーン油食群に比べ高く、有意差が認められた。また、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 (ACO) 活性は、コーン油食群に比べ、10%群で有意に高く、濃度依存的に活性が上昇した。

3.2.7 エイコサノイド産生

大動脈 PGI₂ および血小板 TXA₂ 産生量を Fig. 4~6 および Table 14~16 に示す。大動脈 PGI₂ 産生量は 3 群間で有意差は見られなかった。血小板 TXA₂ 産生量は、3 群間で有意差は認められなかったが、コーン油食群と比べ 5% および 10% 群において添加量依存的に減少する傾向がみられた。

Table 3 Body weight, Food intake, Tissue weight

	Groups		
	Corn	5%	10%
Initial body weight (g)	155±2	157±3	156±2
Final body weight (g)	287±7	290±6	283±5
Body weight gain (g)	133±5	133±3	128±4
Food intake (g/day)	21.7±0.4	21.1±0.6	20.4±0.7
Tissue weight (g/100g body weight)			
liver	4.6±0.1	4.6±0.2	4.8±0.2
heart	0.35±0.01	0.36±0.01	0.34±0.01
spleen	0.34±0.03	0.28±0.01	0.30±0.01
kidney	0.80±0.02	0.83±0.02	0.79±0.02

Each value represents means ± SE of seven rats.

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

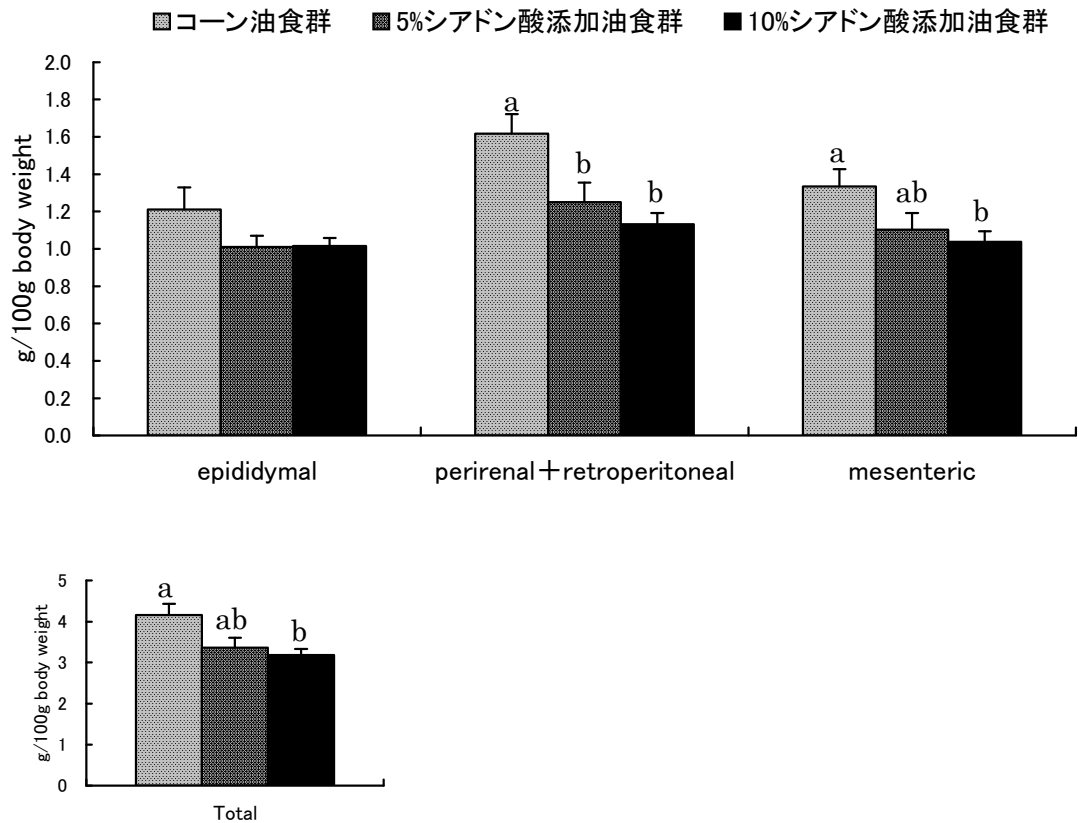


Fig. 1 Relative Visceral fat weight
 Each value represents means \pm SE of seven rats.
 Values with different superscript letters are significantly different at $P < 0.05$.

Table 4 Relative Visceral fat weight (g/100g body weight)

	Groups		
	Corn	5%	10%
epididymal	1.21 \pm 0.12	1.01 \pm 0.06	1.02 \pm 0.04
perirenal+retroperitoneal	1.62 \pm 0.10 ^a	1.25 \pm 0.10 ^b	1.13 \pm 0.06 ^b
mesenteric	1.34 \pm 0.09 ^a	1.10 \pm 0.09 ^{ab}	1.04 \pm 0.06 ^b
Total	4.16 \pm 0.27 ^a	3.36 \pm 0.24 ^{ab}	3.19 \pm 0.15 ^b

Each value represents means \pm SE of seven rats.
 Values with different superscript letters are significantly different at $P < 0.05$.

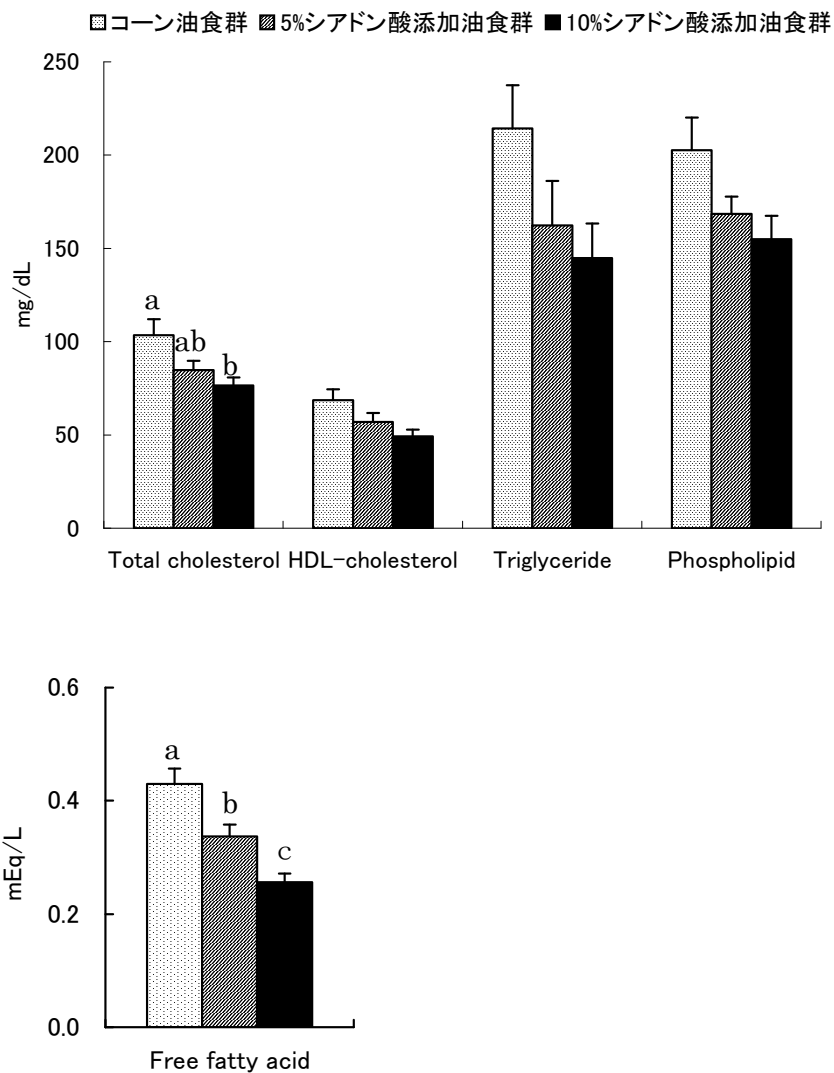


Fig. 2 Lipid concentration of serum in rats

Table 5 Lipid concentration of serum in rats

Serum lipid concentration	Groups		
	Corn	5%	10%
Total cholesterol(mg/dL)	104 ± 8 ^a	84.8 ± 4.9 ^{ab}	76.5 ± 4.3 ^b
HDL-cholesterol(mg/dL)	68.6 ± 5.8	57.0 ± 4.8	49.3 ± 3.6
Triglyceride(mg/dL)	214 ± 23	162 ± 24	145 ± 18
Phospholipid(mg/dL)	203 ± 18	168 ± 9	155 ± 13
Free fatty acid(mEq/L)	0.430 ± 0.027 ^a	0.337 ± 0.021 ^b	0.256 ± 0.016 ^c

Each value represents means ± SE of seven rats.

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

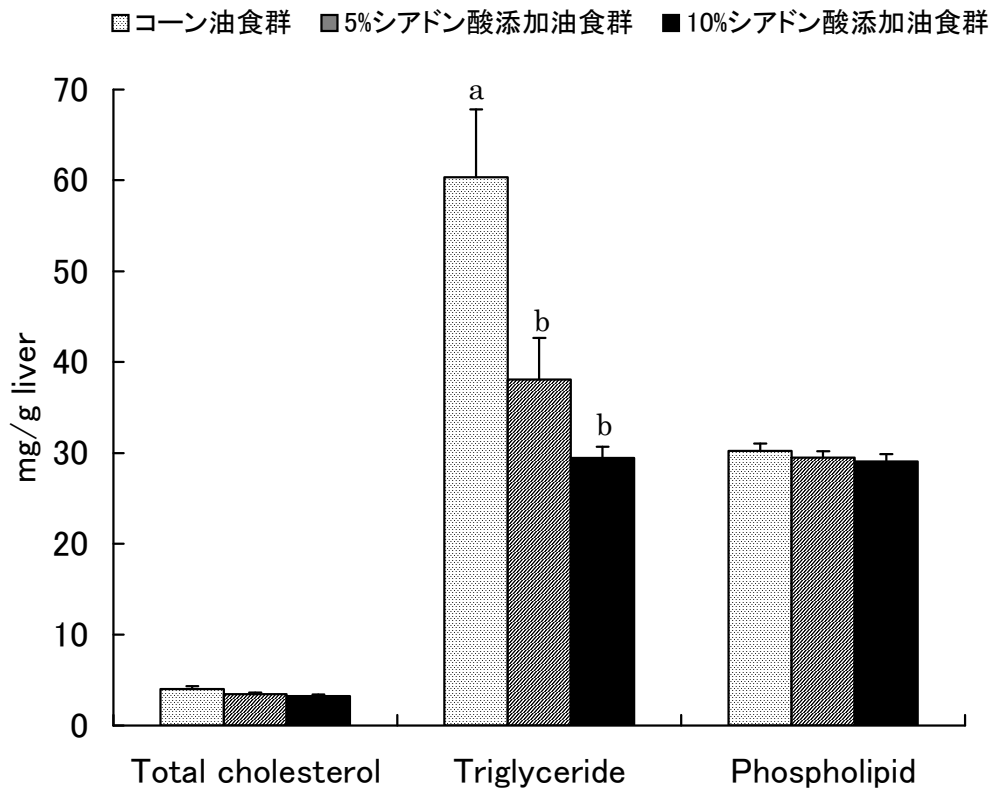


Fig. 3 Lipid concentration of liver in rats

Table 6 Lipid concentration of liver in rats

	Groups		
	Corn	5%	10%
liver lipid concentration(mg/g liver)			
Total cholesterol	4.01 ± 0.32	3.44 ± 0.16	3.23 ± 0.20
Triglyceride	60.3 ± 7.5 ^a	38.1 ± 4.6 ^b	29.4 ± 1.3 ^b
Phospholipid	30.2 ± 0.8	29.5 ± 0.7	29.1 ± 0.8

Each value represents means ± SE of seven rats.

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

Table 7 Fatty acid Composition(wt%) of triglyceride in serum

Fatty acids	Groups		
	Corn	5%	10%
14:0	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2
14:1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
16:0	23.0 ± 1.2 ^a	22.4 ± 1.8 ^a	19.8 ± 1.2 ^b
16:1	3.8 ± 1.0	2.7 ± 1.4	2.3 ± 1.1
18:0	2.4 ± 0.3	2.3 ± 0.4	2.5 ± 0.4
18:1	28.3 ± 2.7 ^a	23.5 ± 3.2 ^b	21.9 ± 1.8 ^b
18:2 n-6	28.5 ± 4.5 ^a	31.6 ± 4.0 ^{ab}	34.1 ± 1.5 ^b
18:3 n-3	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2
20:3(Δ 5,11,14)	0.0 ± 0.0 ^a	2.1 ± 0.9 ^b	5.3 ± 0.7 ^c
20:4 n-6	6.2 ± 1.3	7.1 ± 2.2	6.4 ± 2.4
22:4 n-6	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.6	2.0 ± 0.7
22:5 n-3	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
22:6 n-3	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2
n-6 PUFA	36.6 ± 6.2 ^a	40.7 ± 6.8 ^{ab}	42.5 ± 4.6 ^b
n-6 PUFA*	36.6 ± 6.2 ^a	42.8 ± 7.5 ^{ab}	47.8 ± 5.1 ^b
n-3 PUFA	2.0 ± 0.4	2.0 ± 0.5	1.8 ± 0.5
total PUFA	38.7 ± 1.6 ^a	44.8 ± 2.0 ^b	49.6 ± 1.3 ^b

Means ± SE, n=7 rats.

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

*: n-6PUFA + 20:3(Δ 5,11,14)

Table 8 Fatty acid Composition(wt%) of Phosphatidylcholine in serum

Fatty acids	Groups		
	Corn	5%	10%
16:0	19.6 ± 2.2	20.2 ± 2.4	20.3 ± 1.9
16:1	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.2
18:0	31.8 ± 2.7 ^a	28.4 ± 3.9 ^{ab}	26.3 ± 3.0 ^b
18:1	6.4 ± 0.7	5.9 ± 1.0	5.3 ± 0.8
18:2 n-6	10.1 ± 1.6	9.8 ± 2.3	10.5 ± 1.8
18:3 n-3	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.4
20:3(Δ5,11,14)	0.0 ± 0.0 ^a	3.7 ± 1.0 ^b	7.3 ± 1.9 ^c
20:4 n-6	22.6 ± 2.0	23.2 ± 1.9	21.2 ± 1.3
22:4 n-6	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2
22:6 n-3	1.4 ± 0.4	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.2
n-6 PUFA	32.9 ± 3.8	33.3 ± 4.4	32.0 ± 3.3
n-6 PUFA*	32.9 ± 3.8 ^a	37.0 ± 5.2 ^{ab}	39.3 ± 4.3 ^b
n-3 PUFA	1.7 ± 0.5	1.9 ± 0.5	2.0 ± 0.6
total PUFA	34.7 ± 0.8 ^a	38.8 ± 1.1 ^{ab}	40.7 ± 1.3 ^b

Means ± SE, n=7 rats.

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

*: n-6PUFA + 20:3(Δ5,11,14)

Table 9 Fatty acid Composition(wt%) of Phosphatidylethanolamine in serum

Fatty acids	Groups		
	Corn	5%	10%
16:0	12.6 ± 6.5 ^a	18.2 ± 1.2 ^b	19.3 ± 1.4 ^b
16:1	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1
18:0	27.1 ± 4.0 ^a	22.7 ± 2.5 ^{ab}	20.8 ± 1.5 ^b
18:1	6.0 ± 0.9	5.5 ± 0.9	5.3 ± 0.5
18:2 n-6	13.6 ± 3.4	13.4 ± 2.4	13.4 ± 1.7
18:3 n-3	0.6 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.3
20:3(Δ5,11,14)	0.0 ± 0.0 ^a	5.8 ± 1.0 ^b	10.3 ± 2.3 ^c
20:4 n-6	30.3 ± 5.3 ^a	25.6 ± 3.0 ^{ab}	21.0 ± 1.9 ^b
22:4 n-6	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.2
22:5 n-3	0.1 ± 0.2 ^a	0.3 ± 0.1 ^b	0.3 ± 0.1 ^b
22:6 n-3	4.4 ± 1.3	3.8 ± 0.7	3.5 ± 0.5
n-6 PUFA	44.4 ± 8.9 ^a	39.6 ± 5.6 ^{ab}	35.1 ± 3.8 ^b
n-6 PUFA*	44.4 ± 8.9	45.4 ± 6.5	45.4 ± 5.8
n-3 PUFA	5.1 ± 1.8	4.5 ± 0.8	4.4 ± 0.9
total PUFA	49.5 ± 1.5	49.9 ± 0.6	49.9 ± 0.9

Means ± SE, n=7 rats.

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

*: n-6PUFA + 20:3(Δ5,11,14)

Table 10 Fatty acid Composition(wt%) of triglyceride in liver

Fatty acids	Groups		
	Corn	5%	10%
14:0	1.2±0.2	1.0±0.2	1.2±0.3
14:1	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.1
16:0	37.6±4.1 ^a	30.9±4.4 ^b	28.3±4.7 ^b
16:1	7.2±2.4 ^a	4.6±2.1 ^b	4.2±2.0 ^b
18:0	2.2±0.6	2.0±0.3	2.2±0.7
18:1	34.0±1.4 ^a	30.3±2.9 ^{ab}	27.3±3.1 ^b
18:2 n-6	16.3±6.4 ^a	27.6±7.3 ^b	30.4±6.9 ^b
18:3 n-3	0.4±0.1	0.6±0.2	0.7±0.1
20:3(Δ 5,11,14)	0.0±0.0 ^a	0.8±0.5 ^b	2.1±0.8 ^c
20:4 n-6	0.6±0.1 ^a	1.4±0.7 ^b	1.6±0.9 ^b
n-6 PUFA	16.9±6.4 ^a	29.0±7.8 ^b	32.0±7.7 ^b
n-6 PUFA*	16.9±6.4 ^a	29.8±8.1 ^b	34.1±8.2 ^b
n-3 PUFA	0.4±0.1	0.6±0.2	0.7±0.1
total PUFA	21.0±1.4 ^a	30.4±3.1 ^b	34.8±3.2 ^b

Means±SE, n=7 rats.

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

*: n-6PUFA + 20:3(Δ 5,11,14)

Table 11 Fatty acid Composition(wt%) of Phosphatidylcholine in liver

Fatty acids	Groups		
	Corn	5%	10%
14:0	0.1±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1
16:0	17.1±1.2	17.8±1.4	19.0±0.9
16:1	0.9±0.3	0.9±0.3	0.8±0.2
18:0	22.4±2.3 ^a	20.4±2.7 ^{ab}	19.3±1.6 ^b
18:1	6.7±1.4	6.2±0.9	6.3±0.5
18:2	13.2±2.0	13.1±2.2	13.7±1.7
18:3	0.4±0.3	0.4±0.1	0.4±0.1
20:3(Δ 5,11,14)	0.0±0.0 ^a	2.9±0.7 ^b	5.7±1.4 ^c
20:4	31.0±1.4 ^a	29.8±1.4 ^{ab}	27.0±2.2 ^b
22:5	0.3±0.1	0.3±0.0	0.3±0.1
22:6	3.8±0.4	4.2±0.4	3.7±0.3
n-6 PUFA	44.5±3.5	43.2±3.5	41.0±3.8
n-6 PUFA*	44.5±3.5	46.1±3.8	46.7±5.1
n-3 PUFA	4.2±0.6	4.6±0.4	4.1±0.4
total PUFA	48.7±0.4	50.6±0.5	50.7±0.5

Means±SE, n=7 rats.

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

*: n-6PUFA + 20:3(Δ 5,11,14)

Table 12 Fatty acid Composition(wt%) of Phosphatidylethanolamine in liver

Fatty acids	Groups		
	Corn	5%	10%
14:0	0.6±0.1	0.6±0.0	0.6±0.1
16:0	17.2±0.6	17.9±0.8	18.7±1.3
16:1	0.3±0.0	0.3±0.1	0.3±0.0
18:0	25.8±1.8	24.2±1.8	23.0±1.4
18:1	5.0±1.3	4.4±1.2	4.4±0.7
18:2	3.7±0.7	3.8±0.8	4.1±0.9
18:3	0.3±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1
20:3(Δ 5,11,14)	0.0±0.0 ^a	1.9±0.3 ^b	3.4±0.6 ^c
20:4	28.8±0.7 ^a	26.9±0.7 ^b	26.1±1.6 ^b
22:5	0.8±0.2	0.8±0.1	0.8±0.1
22:6	11.0±1.1	11.9±1.2	10.6±0.7
n-6 PUFA	33.3±0.7	31.5±1.5	31.0±2.1
n-6 PUFA*	33.3±0.7	33.4±1.7	34.4±2.5
n-3 PUFA	11.3±1.1	12.2±1.2	11.0±0.7
total PUFA	44.8±0.3	45.7±0.3	45.5±0.6

Means±SE, n=7 rats.

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

*: n-6PUFA + 20:3(Δ 5,11,14)

Table 13 Activities of fatty acid synthase, malic enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase, carnitine palmitoyl transferase and acyl-CoA oxidase in liver

Enzymes	Groups		
	Corn	5%	10%
	(nmol/min/mg protein)		
Fatty acid synthase	17.3±1.3 ^a	11.6±1.6 ^{ab}	8.35±2.02 ^b
Malic enzyme	73.0±12.7 ^a	57.7±8.6 ^{ab}	51.4±8.6 ^b
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	113±22 ^a	62.6±16.3 ^b	52.2±14.5 ^b
Carnitine palmitoyl transferase	4.20±0.25 ^a	5.14±0.14 ^b	5.36±0.25 ^b
Acyl-CoA oxidase	2.88±0.35 ^a	3.21±0.22 ^{ab}	3.48±0.29 ^b

Each value represents means±SE of seven rats.

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

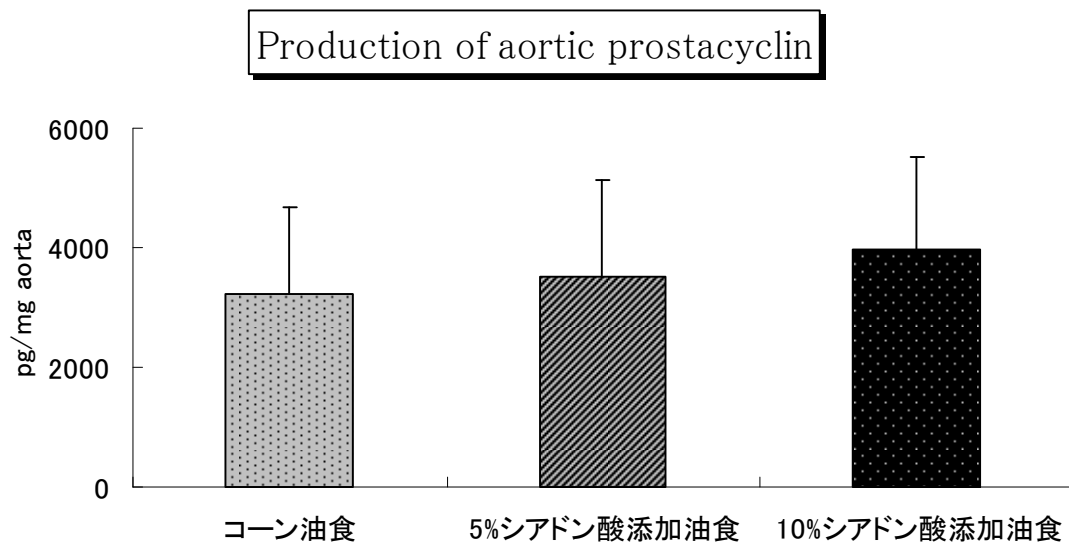


Fig. 4 Production of aortic prostacyclin
Each value represents mean \pm SE of seven rats

Table 14 Production of aortic prostacyclin

	Groups		
	Corn	5%	10%
(pg/mg aorta)	3240 \pm 539.4	3530 \pm 599.5	3960 \pm 592.5

Each value represents means \pm SE of seven rats.

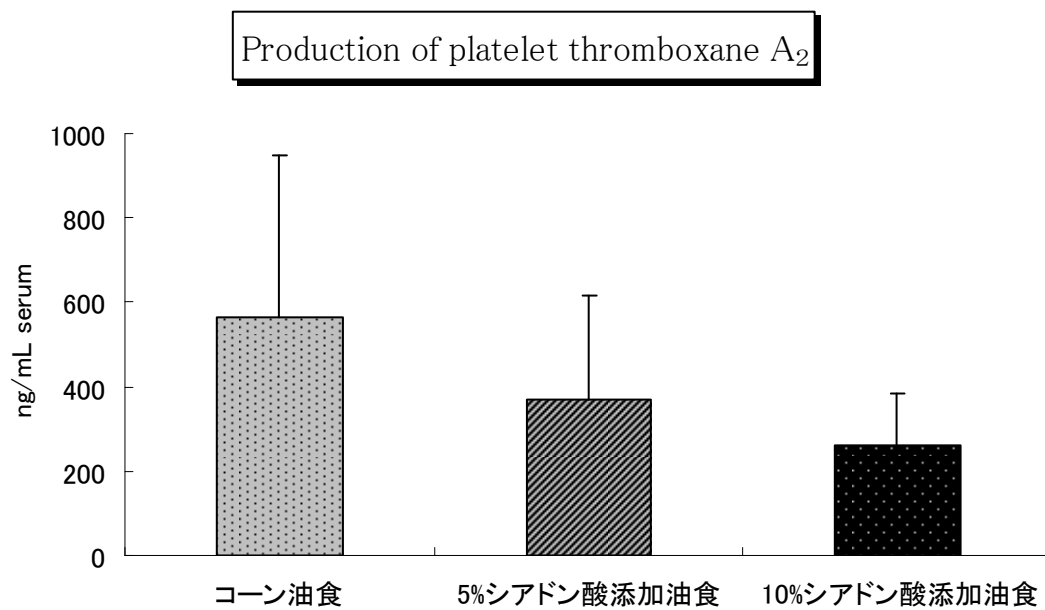


Fig. 5 Production of platelet thromboxane A₂
Each value represents mean ± SE of seven rats

Table 15 Production of platelet thromboxane A₂

	Groups		
	Corn	5%	10%
(ng/ml serum)	566 ± 144	372 ± 92.9	263 ± 45.8

Each value represents means ± SE of seven rats.

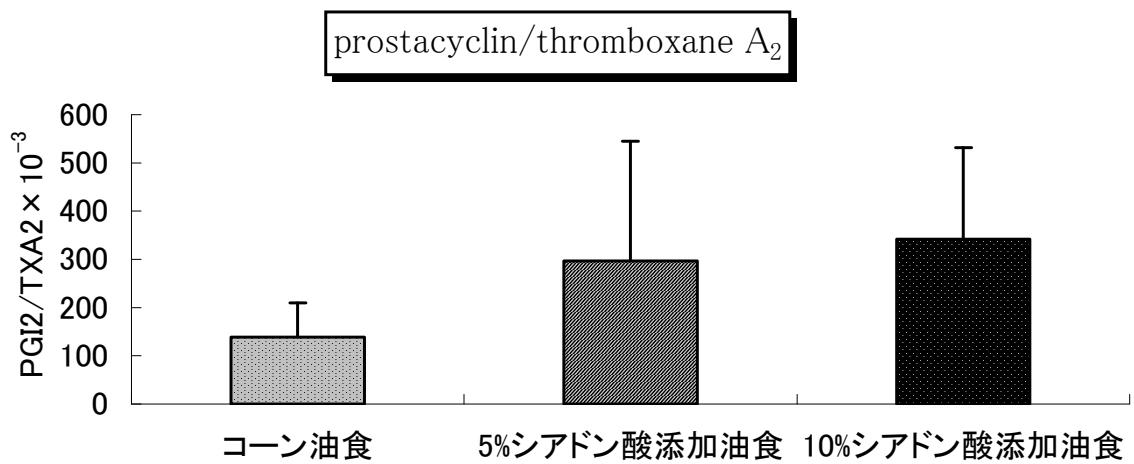


Fig. 6 Ratio of aortic prostacyclin and platelet thromboxane A₂
Each value represents mean ± SE of seven rats

Table 16 Ratio of aortic prostacyclin and platelet thromboxane A₂

	Groups		
	Corn	5%	10%
(PGI ₂ /TXA ₂ × 10 ⁻³)	139 ± 27.0	297 ± 93.8	341 ± 71.9

Each value represents means ± SE of seven rats.

PGI₂ : prostacyclin

TXA₂ : thromboxane A₂

4. 考察

動物実験について、実験動物は以前の長田が用いたラットと同じ SD 系の雄性ラット（日本クレア(株)）を用い、2 週間飼育後のラットの体重増加量や摂食量、臓器重量に関して、群間での差が認められなかったことにより、どの群のラットも健全に成育したと言える。また必須脂肪酸欠乏による皮膚の炎症も見られなかったことから、コーン油食およびシアドン酸添加油食における n-3 PUFA 不足もラットの健康状態へは影響していなかったと思われる。

今回の実験において、シアドン酸を添加した群で脂肪組織重量が減少したことから、シアドン酸を摂取することで内臓脂肪重量の低下につながるということが分かった。また、以前、食餌性カヤ油をラットに与えて飼育した長田の実験において、顕著な影響が見られたのは血清及び肝臓トリグリセリド濃度であった。これらはカヤ油摂取により他の群の 1/2 程度にまで低下が確認されていたが、今回の実験においても、血清トリグリセリド濃度において有意差は得られなかったものの、シアドン酸添加油食群での低下が確認でき、ほぼ同様の結果が得られた。これは、各群での個体間のバラつきが大きかったために有意差は認められなかったと考えられる。さらに、肝臓 TG 濃度の低下とともに減少が認められることの多い血清総コレステロール濃度について³¹⁾、コーン油食群に比べ、10%シアドン酸添加油食群で有意な低下が確認できた。また、肝臓脂質濃度については、肝臓総コレステロール濃度、およびリン脂質濃度は群間での差は見られなかったが、肝臓トリグリセリド濃度において、5%及び 10%シアドン酸添加油食群で有意に低く、10%シアドン酸添加油食群はコーン油食群の約 1/2 程度となった。これは一般に、肝臓トリグリセリド濃度が低下すると、肝臓 VLDL の肝臓からの分泌が抑えられ、結果、血清のコレステロール濃度も低下するとされている³²⁾。このような効果は、魚油あるいはエイコサペンタエン酸 (EPA) を用いた実験でも広く認められている。^{33) 34)} また、血清の HDL-コレステロール濃度もシアドン酸添加群で減少していたが、これは以下のためであると考えられる。それは、今回はラットを用いて実験しており、通常、ラットではヒトよりも HDL-コレステロールが多く存在し、(これは HDL-コレステロールを LDL、IDL、VLDL コレステロールに転送するタンパク質であるコレステロールエステル転送タンパク質の CETP がラットにおいては欠損しているためである。) そのために、HDL-コレステロールが低下する傾向にある³⁵⁾ と考えられる。*Biota orientalis* の種子油をラットに与えた Ikeda ら³⁶⁾ の実験では、肝臓 TG 濃度とともに血清コレステロール濃度も低下していた。ちなみにここで用いられた種子油には、シアドン酸の他にジュニペロン酸 (含有量としてはシアドン酸の約 2 倍) と α -リノレン酸もかなり多く含まれていた。Asset ら³⁷⁾ は、ピノレ

ン酸とシアドン酸を同程度含む *Pinus pinaster* 種子油をラットに与えると血清 TG 濃度は有意に低下するが、ピノレン酸とごくわずかのシアドン酸を含む *Pinus koraiensis* 種子油ではその効果が半減することを認めた。またこの際、どちらの油を用いてもそれぞれのコントロール群と比べて血清コレステロール濃度には有意差がなかったと報告している。また血清遊離脂肪酸濃度については、コーン油食群に比べ 5%シアドン酸添加油食群で有意に低く、5%よりもさらに 10%シアドン酸添加油食群で有意に低い結果が得られた。これは、シアドン酸添加群で脂肪組織重量が減少していたことから、脂肪組織から切り出される遊離脂肪酸も減少するため、血清遊離脂肪酸濃度が低下したと考えられる³⁸⁾。以前の長田による実験においても、カヤ油群で遊離脂肪酸濃度が低下する傾向がみられたので、今回も同様の結果が得られたと考えられる。

以上のような報告や長田による実験結果と今回の実験結果から、肝臓および血清の TG 濃度低下には、カヤ油中に含まれるシアドン酸が関与していたと考えられる。これは、実験に用いたコーン油とシアドン酸添加油の脂肪酸組成において、シアドン酸添加油にシアドン酸が含まれる点以外はほぼ同じ組成（コーン油はシアドン酸含有量がリノール酸に置き換わった形）であったこと、以前のカヤ油投与による実験とシアドン酸単離で投与した今回の実験で同様の結果が得られたことから、そのように考察できる。また、血清及び肝臓の脂質濃度は、食餌中のシアドン酸添加濃度に依存し、低くなる傾向が確認された。

血清および肝臓脂質の脂肪酸組成分析より、シアドン酸は、今回分画した血清 TG、PC、PE 画分および肝臓 TG、PC、PE 画分のすべての脂質画分に取り込まれており、存在率としては肝臓よりも血清中に多く含まれていた。この結果は長田によるカヤ油摂食試験の結果と同様の傾向であり、今回の実験の方がより顕著に血清中にシアドン酸が多く存在していた。Berger ら³⁹⁾はシアドン酸が PI に多く蓄積することを確認したが、Ikeda ら⁴⁰⁾もまた、シアドン酸は血清および肝臓のリン脂質に取り込まれやすく、肝臓 TG にはほとんど取り込まれないことを報告した。一方、今回の実験では、全体的に PL に多く取り込まれる傾向はあったが、集中的に PL に存在していたわけではなく、シアドン酸は肝臓 TG にも取り込まれていた。本研究と比較して、上記の報告における両者の実験にはシアドン酸と共にジュニペロン酸が多く混在する油を用いていたことから、その取り込まれ方に違いが現れたのではないかと考えられる。

またどの脂質画分にも、シアドン酸が不飽和化したものや鎖長伸長してできたと考えられるような脂肪酸は存在しなかった。これに関しては Tanaka ら⁴¹⁾による、脂肪酸の不飽和化および鎖長伸長には $\Delta 5$ 位あるいは $\Delta 6$ 位に始まるメチレン中断型のシス型二重結合が不可欠である、との報告がある。同じく、田

中⁴²⁾は、培養細胞を用いた実験において、シアドン酸が脂肪酸 β 酸化により代謝され炭素数 16 のジエン酸 16:2(7,10) を生じリノール酸やアラキドン酸を増加させたと報告しているが、今回の実験ではそのようなシアドン酸の鎖長短縮物は検出されなかった。しかし、シアドン酸が β 酸化を全く受けずに蓄積していたとは考えにくく、微量でも β 酸化を受けていると考えられる。おそらく今回の実験でも、シアドン酸は β 酸化を受け、16:2(7,10) を経てリノール酸やアラキドン酸へと代謝されていたと思われるが、16:2(7,10) からリノール酸への変換が速やかに行われるために、16:2(7,10) 量が検出されるレベルではなかったのだと考えられる。

主に PE 画分において、シアドン酸添加油食群では、アラキドン酸量が減少していた。これはシアドン酸がアラキドン酸よりも優先的にリン脂質に取り込まれたためではないかと考えられた。肝臓 TG 画分では、アラキドン酸量が 10% シアドン酸添加油食群においてもコーン油食群とほぼ同程度に取り込まれていたが、これは肝臓 TG それ自体の濃度が約 1/2 程度にまで低下していたため、アラキドン酸の絶対量としては、同様にシアドン酸添加油食群で減少したことになると考えられる。

次に、肝臓リン脂質画分において、シアドン酸が取り込まれたかわりにアラキドン酸量が減少していたため、エイコサノイド産生について調べた。アラキドン酸から作られ、血小板凝集作用を持つ血小板トロンボキサン A₂ 産生をみると、シアドン酸添加群で低い傾向がみられた。これは肝臓リン脂質画分の脂肪酸組成から、シアドン酸添加油食群において、アラキドン酸量が減少したことによると考えられた。また、大動脈 PGI₂ 産生量では、5%および 10%シアドン酸添加油食群において、若干の増加傾向がみられたが、群間で有意差はみとめられなかった。これは、PGI₂ 産生量がリン脂質画分におけるアラキドン酸含量に影響を受けにくいこと、また個体差が大きいことにより差が見られなかったと考えられる。

シアドン酸添加油食群において、肝臓 TG 濃度に有意な低下がみられたことから、肝臓脂質代謝系酵素活性を測定した。脂肪酸生合成系酵素活性について、脂肪酸合成酵素 (FAS) とリンゴ酸酵素 (ME) の活性は、10%シアドン酸添加群においてコーン油食群に比べ有意な低下を示した。また、グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) では、5%および 10%のシアドン酸添加群両群において、有意な低下がみられた。合成系酵素どれも濃度依存的な減少傾向であった。したがって、脂肪酸生合成の抑制が示唆された。また、脂肪酸 β 酸化系酵素においては、アシル CoA オキシダーゼ (ACO) およびカルニチンアシルトランスフェラーゼ (CPT) のどちらにおいても、コーン油食群に比べ 10%シアドン酸添加群で有意に高くなる傾向であり、特に CPT 活性においては 5%シア

ドン酸添加群でも有意に高くなり、脂肪酸 β 酸化系が亢進していることが示唆された。長田のカヤ油投与試験では、脂肪酸生合成系の抑制が示唆され、脂肪酸 β 酸化系の亢進は確認されていないが、今回の実験では合成系の抑制と β 酸化系の亢進が考えられた。おそらく以前の長田による実験では、カヤ油のほかにコーン油、大豆油を使用しており、今回の実験で使用していない大豆油とも比較がなされていたため、結果が一致しなかったとも一因として考えられる。

以上のことより、シアドン酸添加の食餌をラットに与えることにより、血清コレステロール濃度および肝臓トリグリセリド濃度の顕著な低下が確認され、これは脂肪酸合成系の抑制と β 酸化系の亢進に起因することが示された。従って、食餌性カヤ油の脂質代謝改善作用は、シアドン酸に由来することが示唆された。

第2章

カヤ油に含まれるシアドン酸（非メチレン介在型不飽和脂肪酸）の 肥満モデルラットに対する脂質代謝への影響

1. 緒言

脂肪肝は、アルコール消費量の増加と国民の栄養状態の向上ならびに社会生活の多様性から来る摂取カロリーの過剰により、年々増加傾向にある。脂肪肝は、進行すると肝炎、肝硬変になることが知られている他、肥満をともなうことが多いため、糖尿病や高脂血症、動脈硬化など生活習慣病を合併する危険性があり、健康上、注意が喚起されている。これらの治療には、肥満の原因となる生活習慣や栄養状態を改善することが必要であり、日常規則的に、かつ容易に摂取可能な食事の形態で脂肪肝を予防する食品の開発が期待されている。

そこで、非メチレン介在型不飽和脂肪酸の一つで、通常の不飽和脂肪酸とは異なる構造を持つシアドン酸(5c,11c,14c-eicosatrienoic acid)を約10%含むカヤ油に着目したところ、食餌性カヤ油は、強いトリグリセリド蓄積抑制作用があり、肝臓の脂肪酸合成を抑制することが確認された。また、第1章において、カヤ油のトリグリセリド低下作用がカヤ油に含まれるシアドン酸に由来するのか調べたところ、シアドン酸添加群のラットにおいて、肝臓トリグリセリド濃度および血清コレステロール濃度の有意な低下が見られ、これは脂肪酸生合成系の抑制と脂肪酸 β 酸化系の亢進に起因すると考えられた。このことから、カヤ油の脂質代謝改善作用はシアドン酸に由来することが確認できた。

そこで、第2章では、OLETFラット (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats) を肥満モデルラットとして用い、食餌性カヤ油の摂取によるシアドン酸の抗肥満作用について調べることを目的とした。

2. 実験方法

2.1. 実験試料

2.1.1 試料用油脂

実験には、カヤ油（サミット製油（株））、コーン油（キューピー（株））を用い、食餌と混合した。

2.1.2 脂肪酸分析

動物実験に使用する油脂について以下のように脂肪酸分析をおこなった。硫酸-メタノール溶液（2：230, by vol）2mlを加え、80℃で2時間加熱しトランスメチル化を行った。飽和 NaCl 溶液 2mlを加え、脂肪酸メチルエステルをヘキサン 2ml で抽出し、ガスクロマトグラフィー分析に供した。分析条件を以下に示す。また、試料油の脂肪酸組成を Table 17 に示す。

- GC 装置
GC-2010（（株）島津製作所）
- カラム
Omegawax 320 (30m×0.32mm×0.25μm)
- 検出
水素炎イオン化検出器（FID）
- カラム温度
200℃
- 試料注入部温度(Inj)
250℃
- 検出部温度（Det）
250℃
- キャリアーガス
He
- 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って行った。

2.2 動物実験

本研究は、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」に従って計画を策定し、実施した。

2.2.1 実験動物

実験動物として、以下の2種を用いた。

飼育動物・OLETF ラット(Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats)

→肥満モデル

・LETO ラット(Long-Evans Tokushima Otsuka rats)

→コントロール

どちらも雄性、4週齢（大塚製薬(株)徳島研究所）を用いた。

ラットは室温 20~25°C、明暗サイクル 12 時間（照明時間 8:00~20:00）に設定された動物棟にて飼育した。また、ラットは全て個飼いのワイヤーケージにて1匹ずつ飼育した。

2.2.2 実験飼料

1週間の予備飼育期間中は、市販の固形飼料 CE-2（日本クレア(株)）を与えた。また試験食は、基本的に AIN-93G^{4,3)}に従い、食餌中油脂含量が 10%となるよう調整した。また、より肥満しやすくするために食餌組成中のβ-コーンスターチをスクロースに置き換えたため、食餌組成 (wt%) はカゼイン 20.0、α-コーンスターチ 13.2、ショ糖 46.7486、脂肪 10.0、セルロース 5.0、ミネラル混合 (AIN-93G-MX) 3.5、ビタミン混合 (AIN-93-VX) 1.0、L-シスチン 0.3、重酒石酸コリン 0.25 および tert-ブチルヒドロキノン 0.0014 となり、高スクロース食とした。食餌組成を Table 18 に示す。

2.2.3 飼育条件

市販飼料 CE-2（日本クレア(株)）で1週間予備飼育後、OLETF 群につき体重がほぼ等しくなるよう2群(n=8)に分け*、カヤ油食およびコーン油食の試験食を与えた。LETO 群にはコーン油食を与え、6週間試験飼育を行った。なお、飼育期間を通して、食餌および飲料水は自由摂取させた。

試験飼育期間終了後、最終日に8時間(6:00~14:00)絶食させ、エーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し、屠殺した。また、臓器（肝臓、心臓、脾臓、腎臓）、脂肪組織（腸間膜、腎周囲+後腹膜、精巣周囲）を回収した。肝臓は液体窒素で瞬間凍結させ、採血により得られた血液は遠心分離（3000rpm,20min,5°C）して血清を分離した。回収した血清は分析まで-80°Cで保存した。

*群分け：LETO コーン油 (LETO 群)
OLETF コーン油 (OC 群)
OLETF カヤ油 (OT 群)
[n=8 3群]

2.3 測定項目

解剖後、以下に示す項目を測定した。

測定項目：体重、摂食量〔飼育期間中〕

臓器（肝臓、心臓、脾臓、腎臓）重量

脂肪組織（腸間膜、腎周囲＋後腹膜、精巣周囲）重量

血清脂質、肝臓脂質濃度

肝臓リン脂質画分脂肪酸組成

肝臓脂質代謝関連酵素活性

エイコサノイド産生

mRNA 発現量

2.3 脂質濃度分析

2.3.1 血清および肝臓脂質濃度の分析

第1章 2.4.1 と同様に、血清中の総コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセリド、リン脂質濃度、および肝臓総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質濃度を測定した。

2.3.2 肝臓脂質の抽出

Folch 法に従い、第1章 2.4.2 と同様の方法で抽出した。

2.4 肝臓リン脂質画分脂肪酸組成

第1章 2.5.1 と同様に分析した。

2.5 脂質代謝関連酵素の活性測定

第1章 2.6と同様に下記に示す脂質代謝関連の酵素活性を測定した。

脂肪酸生合成系酵素・・・脂肪酸合成酵素(FAS)、リンゴ酸酵素(ME)、
グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)

脂肪酸 β 酸化系酵素・・・カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ
(CPT)、アシル CoA オキシダーゼ(ACO)

2.6 エイコサノイド産生

エイコサノイド産生としてトロンボキサン A₂ (TXA₂) 産生量を測定した。TXA₂ 産生量は、解剖後に採取した血液を 30 分室温放置し凝固させた後、37°C で 30 分間インキュベートすることにより TXA₂ を産生させ、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.) を用いて測定した。

2.7 肝臓の脂質代謝関連遺伝子発現量

2.7.1 Total RNA の抽出

-80°Cで凍結保存しておいた 0.5g の肝臓から約 0.05g を採取し、ISOGEN(ニッポンジーン) を用いて Total RNA を抽出した (Fig. 7)。そのうち 20 μ L を depecH₂O で 30 倍希釈し、260nm および 280nm の波長で吸光度を測定して RNA 濃度を求めた(OD260=1 のとき RNA 濃度は 40 μ g/mL)。さらに電気泳動によって RNA の純度をチェックした。すなわち、エッペンドルフチューブに RNA 5 μ g 相当の RNA 溶液、5 \times Gel loading buffer 3 μ L および dH₂O を合せて 15 μ L となるよう混合し、サーマルサイ클ラーを用いて 65°C~70°C で 5 分加温し、変性させた (RNA の変性)。この反応液 15 μ L をすべて、予め作製した 1%アガロースゲル (アガロース(TaKaRa)1.2g、1 \times TAE バッファー (トリス-酢酸-EDTA バッファー) 120mL 加え、電子レンジで 5 分加熱後、蒸発した水分を補充し 5 分間室温で放置した後、容器に流して約 30 分間ゲルを固めて作製。) のウェルにのせ、TAE バッファー (トリス-酢酸-EDTA バッファー) を流した泳動層にセットし、100V で 30 分電気泳動。UV トランスイルミネーターで検出、デジタルカメラで撮影した。

2.7.2 逆転写反応

2.7.1 で精製した Total RNA から cDNA を合成した (Fig. 8)。

2.7.3 リアルタイム PCR 法による mRNA 発現量測定

2.7.2 で合成した cDNA を用い、リアルタイム PCR 法にて以下 5 つの脂質代謝調節因子およびそれらの標的遺伝子の mRNA 相対発現量を測定した (Fig. 9)。なおノーマライズには、Elongation factor 1 (翻訳伸長因子) を用いた。

- ・ 脂肪酸合成酵素 (FAS)
- ・ グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH)
- ・ リンゴ酸酵素-1 (ME-1)
- ・ カルニチンアシルトランスフェラーゼ-1 (CPT-1)
- ・ アシル CoA オキシダーゼ-1 (ACO-1)

2.8 統計処理

データは平均値±標準誤差で示し、一元配置分散分析を行い 3 群間の差を分析した。危険率<5%であった場合に有意差ありとし、有意差が生じた場合は Tukey-Kramer 法により多重比較検定を行い、群間の差が危険率<5%の場合をもって有意差ありと判定した。

Table 17 Fatty acid composition (wt%) of dietary fats.

	Corn	Torreyia
16:0	10.5	8.6
16:1	0.2	0.4
18:0	1.7	2.6
18:1 n-9	29.9	24.1
18:2 n-6	55.4	47.3
18:3 n-3	0.9	1.0
20:0	0.4	N.D.
20:1	0.3	0.8
20:2	N.D.	2.7
20:3 (Δ 5,11,14)	N.D.	10.9
others	0.7	1.6
total	100	100

※Corn・・・コーン油

※Torreyia・・・カヤ油

Table 18 Composition of experimental diets

Ingredients	wt%
α -Cornstarch	13.2
Casein	20.0
Sucrose	46.7486
Fat	10.0
Cellulose	5.0
Mineral mixture(AIN-93G)	3.5
Vitamin mixture(AIN-93)	1.0
L-Cystine	0.3
Choline bitartrate	0.25
tert-Butylhydroquinone	0.0014
Total	100

※高スクロース食の組成(AIN-93Gに基づく)

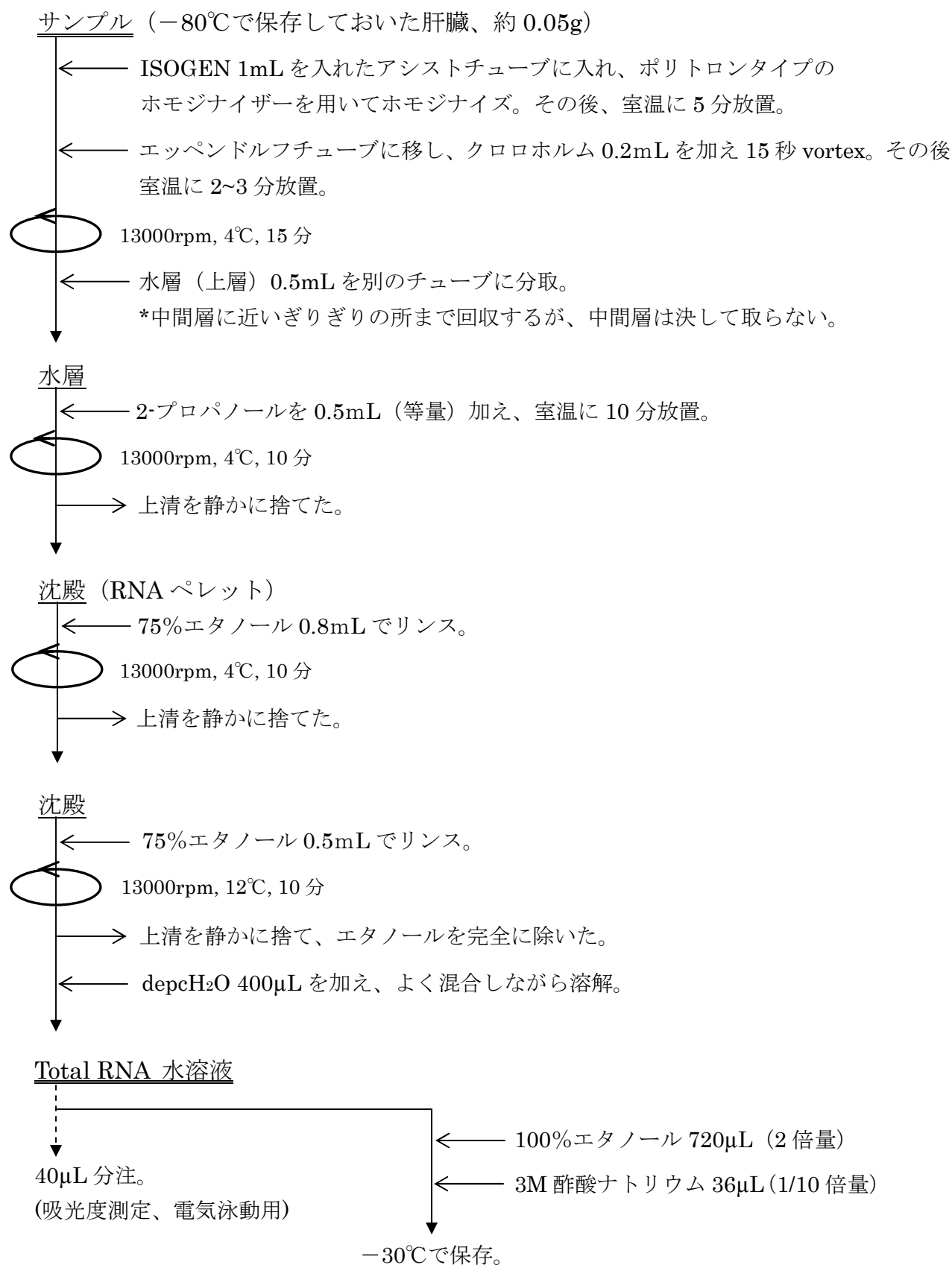
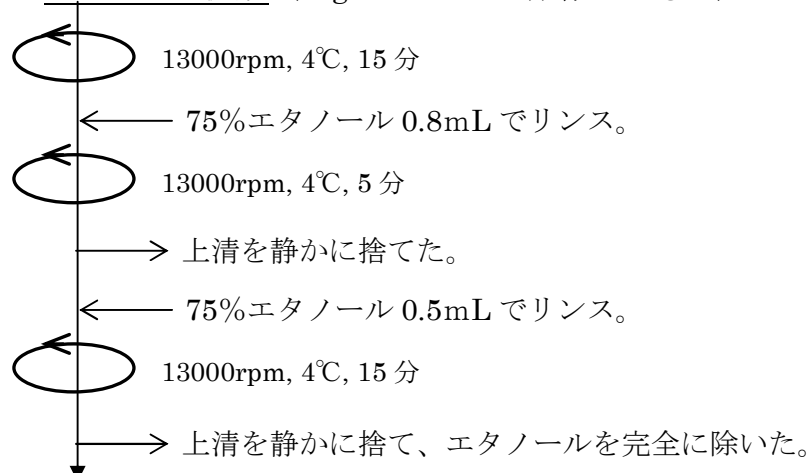
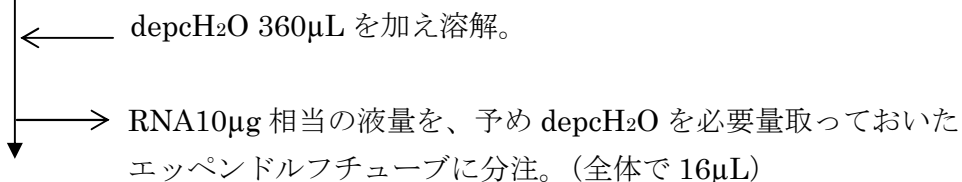


Fig. 7 Purification of total RNA.

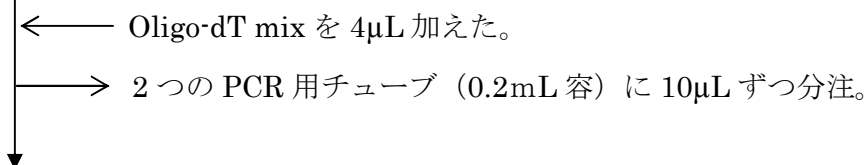
エタノール沈殿 (Fig. 7 で-30°C保存したもの)



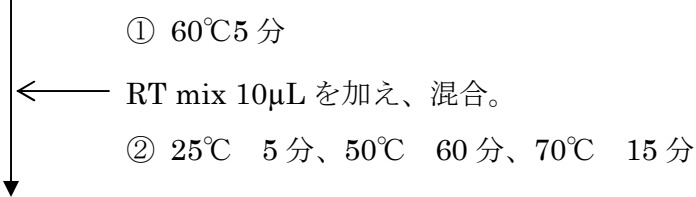
沈殿



RNA 溶液



サーマルサイクラーにて逆転写反応。



depcH₂O を 180μL 加えて 1/10 倍希釈し、-30°C で保存。

<i>Oligo-dT mix</i>			RT+ (μL)	RT- (μL)
	μL	5×RT バッファー	4	4
dNTP mix	1	0.1M DTT	1	1
Oligo-dT	1	RNase OUT	0.5	0.5
Random Primer	0.01	Super Script III	0.25	-
(×52 で調製)	2	dH ₂ O	4.25	4.5
		(各々×26 で調製)	10	10

Fig. 8 Synthesis of cDNA.

Fig. 8 で合成した cDNA をサンプルとし、以下の条件で測定を行った。

FAS	1/30 倍希釈 cDNA 5 μ L + M.M.①	20 μ L	} MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate に 12 μ L 分注。 (M.M. : Master Mix)
G6PDH	1/30 倍希釈 cDNA 5 μ L + M.M.②	20 μ L	
ME-1	1/30 倍希釈 cDNA 5 μ L + M.M.③	20 μ L	
CPT-1	1/30 倍希釈 cDNA 5 μ L + M.M.④	20 μ L	
ACO-1	1/30 倍希釈 cDNA 5 μ L + M.M.⑤	20 μ L	
EF-1	1/30 倍希釈 cDNA 5 μ L + M.M.⑥	20 μ L	

* 装置

7300 Real Time PCR SYSTEM を用いた。

* 温度条件

Stage1 95 $^{\circ}$ C 10sec Reps1

Stage2 95 $^{\circ}$ C 5sec Reps40

60 $^{\circ}$ C 31sec

Stage3 (Dissociation Stage)

95 $^{\circ}$ C 15sec

60 $^{\circ}$ C 30sec

95 $^{\circ}$ C 15sec

M.M.の配合 (μ L)

	2 \times SYBR [®] Premix Ex Taq [™]	Fw Primer	Rv Primer	dH ₂ O	Total
	(タカラバイオ(株))	(10 μ M)	(10 μ M)		
M.M.①-⑥	12.5	0.5	0.5	6.5	20

Fig. 9 Measurement of mRNA expression levels of lipid metabolism-related genes.

3. 結果

3.1 成長、摂食量、臓器重量

各試験食で6週間飼育した後のラットの成長および摂食量は、LETO 群に比べ OLETF 群で有意に増加したが、OC、OT 群間では差は見られず、カヤ油摂取による影響はみられなかった。また臓器重量（肝臓、心臓、腎臓、脾臓）においても OC、OT 群間で差はなく、カヤ油摂取による影響はみられなかった。(Table 19)

3.2 脂肪組織重量

腎周囲+後腹膜脂肪組織において、LETO 群(2.09g/100g 体重)に比べ OLETF 群 (OC 群 : 4.00 g/100g 体重, OT 群 : 3.63 g/100g 体重) で有意に増加したが、OC 群と比較して OT 群で有意な減少がみられ、カヤ油摂取による減少がみられた。

精巣周囲の脂肪組織(LETO 群 : 1.67 g/100g 体重, OC 群 : 2.59 g/100g 体重, OT 群 : 2.44g/100g 体重) および腸間膜脂肪組織(LETO 群 : 1.31 g/100g 体重, OC 群 : 2.37 g/100g 体重, OT 群 : 2.25g/100g 体重) においては、有意差は得られず、OT 群が OC 群と比べ、わずかな減少傾向であった。よって、総脂肪重量においても LETO 群 (5.07g/100g 体重) に比べ、OLETF 群 (OC 群 : 8.96 g/100g 体重, OT 群 : 8.32 g/100g 体重) で有意に増加したが、OC、OT の2群間では、カヤ油摂取によるわずかな減少傾向がみられた。(Table 20)

3.3 血清脂質濃度

血清トリグリセリド濃度において、LETO 群 (88.5 mg/dL) に対して、OC 群 (407 mg/dL) が有意に増加したが、OC 群 (407 mg/dL) と比較して OT 群 (250 mg/dL) で有意な減少がみられた。総コレステロール濃度においても、LETO 群 (150 mg/dL) に対して、OC 群 (211 mg/dL) が有意に増加したが、OT 群 (187 mg/dL) で有意な減少がみられた。HDL-コレステロール濃度においては、3群間で差はみられなかった。リン脂質濃度では LETO 群 (198mg/dL) に対して、OC 群 (324 mg/dL) が有意に増加したが、OT 群 (281 mg/dL) で有意な減少がみられた。遊離脂肪酸濃度においては、LETO 群 (0.444mEq/l) に対して、OLETF 群 (OC 群 : 0.901 mEq/l, OT 群 : 0.793 mEq/l) が有意に

増加し、OC、OT の 2 群間では差が見られなかったが、カヤ油摂取により減少する傾向が見られた。これらのなかでも特に血清 TG 濃度が、カヤ油摂取により顕著に減少した。(Table 21)

3.4 肝臓脂質濃度

トリグリセリド濃度において、LETO 群 (13.8mg/g liver) に対し、OC 群 (32.7 mg/g liver) で 2 倍以上に有意に増加したが、OT 群 (25.1 mg/g liver) は OC 群に対し有意な減少がみられた。総コレステロール濃度、及びリン脂質濃度においては群間での差は認められなかった。(Table 22)

3.5 肝臓リン脂質画分脂肪酸組成

肝臓ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン画分の脂肪酸組成を(Table 23~24) に示す。カヤ油を与えた OT 群では、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンの両画分にシアドン酸 (20:3 Δ 5,11,14) が含まれていた。また、両画分において、OT 群でシアドン酸 (20:3 Δ 5,11,14) が取り込まれたかわりに、アラキドン酸 (20:4 n-6) が減少していた。

肝臓ホスファチジルコリン画分では、パルミチン酸 (16:0) が LETO 群に比べ OLETF 群で有意に低く、ステアリン酸(18:0)が OLETF 群で有意に高かった。また、リノール酸 (18:2 n-6)、ドコサペンタエン酸(22:5 n-6)は、LETO 群に比べ OLETF 群で有意に高くなった。ドコサヘキサエン酸(22:6 n-3)は、LETO 群に対して OC 群で有意に低値を示したが、この OC 群に対し OT 群は有意に高い値を示した。n-3 系多価不飽和脂肪酸含量は LETO 群、OT 群に対し、OC 群が低値を示した。また、シアドン酸を n-6 系多価不飽和脂肪酸の総量に加えると、3 群間での n-6 系多価不飽和脂肪酸の割合はほぼ等しくなった。

肝臓ホスファチジルエタノールアミン画分では、パルミチン酸(16:0)が LETO 群>OT 群>OC 群の順で有意に低くなった。オレイン酸(18:1 n-9)は、LETO、OC 両群に対し、OT 群で有意に低値を示した。また、リノール酸 (18:2 n-6) が LETO 群に比べ、OLETF 群で有意に低く、ドコサペンタエン酸(22:5 n-6)は LETO 群に比べ、OLETF 群で有意に高い値を示した。さらに、3 群間で n-3 系多価不飽和脂肪酸含量はほぼ等しく、n-6 系多価不飽和脂肪酸についても、シアドン酸も n-6 系多価不飽和脂肪酸の総量に含めるとほぼ 3 群で等しくなった。

3.6 肝臓脂質代謝関連酵素活性

肝臓における脂質代謝関連酵素の活性を(Table 25)に示す。脂肪酸合成系酵素の活性は、いずれもカヤ油摂取によりわずかに減少する傾向があった。脂肪酸合成の律速酵素である脂肪酸合成酵素 (FAS) と、リンゴ酸酵素 (ME) の活性は OC 群に比べ OT 群で減少傾向がみられた。また、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(G6PDH)活性は、LETO 群に対し OC 群で3倍以上に有意に増加しているが、OT 群は OC 群と比べ有意に減少していた。

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 (CPT) 活性は、LETO 群<OC 群<OT 群の順に、活性が上昇する傾向がみられた。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 (ACO)活性は、LETO、OC の2群に対し OT 群が有意に高値を示した。

3.7 肝臓の脂質代謝関連遺伝子発現量

Table 27 に、肝臓脂質代謝関連遺伝子の相対発現量を示した。脂肪酸合成系酵素活性にて OC・OT 群間で有意差が認められたグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PDH)の遺伝子は、mRNA レベルでは差が認められなかったが、OT 群で減少する傾向がみられた。また、脂肪酸合成系酵素である脂肪酸合成酵素 (FAS) と、リンゴ酸酵素 (ME) の遺伝子でも mRNA レベルでは差が認められなかったが酵素活性の結果と同様に OC 群と比べ OT 群で減少する傾向はわずかにみられた。

脂肪酸 β 酸化系酵素であるカルニチンアシルトランスフェラーゼ (CPT) の遺伝子は、mRNA レベルでは差が認められず、酵素活性で有意な差が得られたアシル CoA オキシダーゼ(ACO)の遺伝子においても、mRNA レベルでは有意な差が認められなかった。傾向としては、酵素活性と同様に OC 群に比べ、OT 群で上昇する傾向がみられた。

3.8 エイコサノイド産生

血小板TXA₂産生量は(Fig. 10, Table 26)に示す。血小板TXA₂産生量は、LETO群に比べてOC・OT両群で有意に低くなり、OC群よりもさらにOT群の方が低値を示した。そこで、OC群・OT群の2群につき、独立した2群の検定としてt検定を行うと、有意差が認められ、OC群に比べOT群が有意に低い値を示した。

Table 19 Body weight, Food intake, Tissue weight

	Groups		
	LETO	OC	OT
Initial body weight (g)	114 ± 6 ^a	136 ± 3 ^b	136 ± 4 ^b
Final body weight (g)	334 ± 10 ^a	432 ± 4 ^b	433 ± 5 ^b
Body weight gain (g)	220 ± 7 ^a	296 ± 5 ^b	297 ± 4 ^b
Food intake (g/day)	15.8 ± 0.4 ^a	22.1 ± 0.3 ^b	22.0 ± 0.3 ^b
Tissue weight (g/100g body weight)			
liver	3.59 ± 0.09	3.69 ± 0.06	3.63 ± 0.04
heart	0.28 ± 0.00 ^a	0.25 ± 0.00 ^b	0.25 ± 0.00 ^b
spleen	0.21 ± 0.01 ^a	0.18 ± 0.00 ^b	0.18 ± 0.00 ^b
kidney	0.53 ± 0.01 ^a	0.59 ± 0.01 ^b	0.60 ± 0.01 ^b

Each value represents means ± SE of eight rats.

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

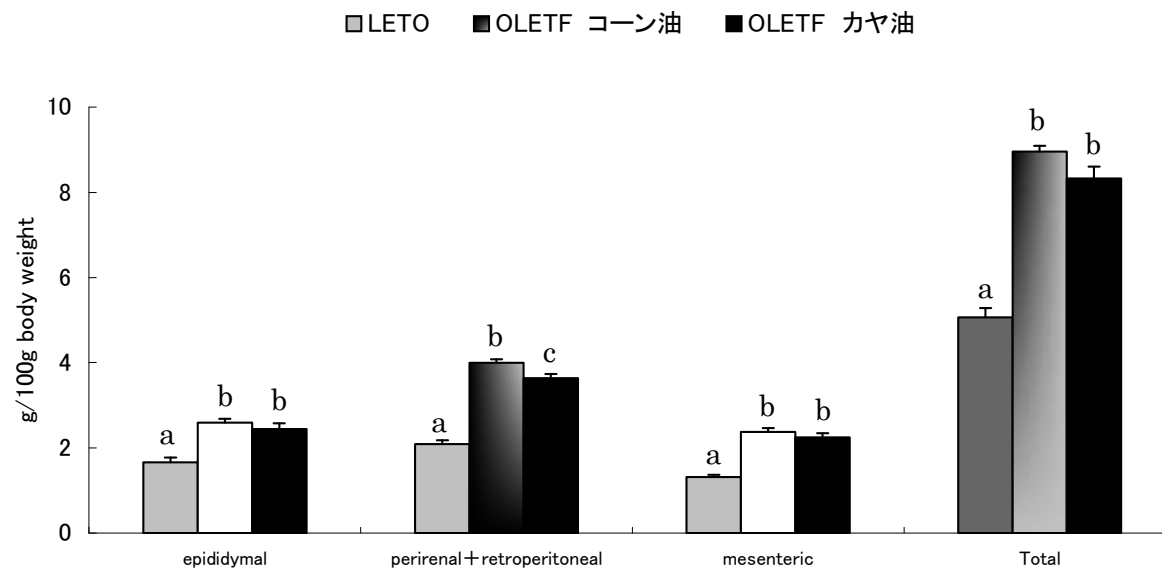


Fig. 10 White adipose tissue weight

Each value represents means \pm SE of eight rats.

Values with different superscript letters are significantly different at $P < 0.05$ in the Tukey-Kramer test.

Table 20 White adipose tissue weight

	Groups		
	LETO	OC	OT
White adipose tissue weight (g/100g body weight)			
perirenal+retroperitoneal	2.09 \pm 0.09 ^a	4.00 \pm 0.08 ^b	3.63 \pm 0.11 ^c
epididymal	1.67 \pm 0.11 ^a	2.59 \pm 0.09 ^b	2.44 \pm 0.13 ^b
mesenteric	1.31 \pm 0.06 ^a	2.37 \pm 0.09 ^b	2.25 \pm 0.09 ^b
Total	5.07 \pm 0.22 ^a	8.96 \pm 0.13 ^b	8.32 \pm 0.28 ^b

Each value represents means \pm SE of eight rats.

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

Table 21 Lipid concentration of serum in rats

	Groups		
	LETO	OC	OT
Serum lipid concentration			
Total cholesterol(mg/dL)	150±4 ^a	211±8 ^b	187±4 ^c
HDL-cholesterol(mg/dL)	110±4	124±5	113±3
Triglyceride(mg/dL)	88.5±6.3 ^a	407±14 ^b	250±16 ^c
Phospholipid(mg/dL)	198±6 ^a	324±13 ^b	281±5 ^c
Free fatty acid(mEq/L)	0.444±0.023 ^a	0.901±0.043 ^b	0.793±0.042 ^b
Atherogenic index	0.376±0.039 ^a	0.706±0.046 ^b	0.661±0.027 ^b

Each value represents means±SE of eight 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 22 Lipid concentration of liver in rats

	Groups		
	LETO	OC	OT
liver lipid concentration(mg/g liver)			
Total cholesterol	3.46±0.04	3.28±0.09	3.48±0.08
Triglyceride	13.8±1.0 ^a	32.7±2.8 ^b	25.1±1.0 ^c
Phospholipid	34.1±0.4	33.9±0.5	34.1±0.3

Each value represents means±SE of eight rats.

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

Table 23 Fatty acid Composition(wt%) of Phosphatidylcholine in liver

Fatty acids	Groups		
	LETO	OC	OT
16:0	23.0 ± 0.7 ^a	15.4 ± 0.5 ^b	16.7 ± 0.4 ^b
16:1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
18:0	17.5 ± 0.5 ^a	24.8 ± 0.4 ^b	23.4 ± 0.3 ^b
18:1n-9	2.4 ± 0.1	2.4 ± 0.2	1.9 ± 0.2
18:1n-7	4.6 ± 0.2	5.2 ± 0.3	4.8 ± 0.1
18:2n-6	6.3 ± 0.3 ^a	4.9 ± 0.4 ^b	4.0 ± 0.3 ^b
20:1	0.2 ± 0.0 ^a	0.1 ± 0.0 ^b	0.2 ± 0.0 ^{ab}
20:2n-6	0.6 ± 0.1 ^a	0.3 ± 0.0 ^b	0.7 ± 0.0 ^a
20:3(Δ 5,11,14)	n.d.	n.d.	4.3 ± 0.3
20:3n-6	0.3 ± 0.0 ^a	0.6 ± 0.0 ^b	0.4 ± 0.0 ^c
20:4n-6	38.0 ± 0.6 ^{ab}	39.2 ± 0.7 ^a	35.7 ± 0.7 ^b
22:4n-6	0.5 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.0 ^b	0.4 ± 0.0 ^a
22:5n-6	1.7 ± 0.1 ^a	2.4 ± 0.2 ^b	2.6 ± 0.2 ^b
22:5n-3	0.2 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^b	0.2 ± 0.0 ^a
22:6n-3	3.0 ± 0.1 ^a	2.6 ± 0.1 ^b	2.9 ± 0.1 ^a
SFA	40.5 ± 0.5	40.1 ± 0.5	40.1 ± 0.3
MUFA	7.7 ± 0.3	8.4 ± 0.4	7.4 ± 0.3
n-6 PUFA	47.3 ± 0.4 ^a	47.7 ± 0.4 ^a	43.7 ± 0.5 ^b
n-3 PUFA	3.2 ± 0.1 ^a	2.7 ± 0.1 ^b	3.2 ± 0.1 ^a
total PUFA	50.5 ± 0.5	50.4 ± 0.5	51.1 ± 0.4
n-6/n-3	14.7 ± 0.4 ^a	17.9 ± 0.9 ^b	13.9 ± 0.3 ^a
Desaturation.index	6.2 ± 0.3 ^a	8.6 ± 1.1 ^{ab}	9.4 ± 0.9 ^b

Means ± SE, n=8rats. Values with different superscript roman letters are significantly different at P<0.05.

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

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

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

Table 24 Fatty acid Composition(wt%) of Phosphatidylethanolamine in liver

Fatty acids	Groups		
	LETO	OC	OT
16:0	14.1 ± 0.3 ^a	12.5 ± 0.2 ^b	13.3 ± 0.6 ^{ab}
16:1	0.2 ± 0.0 ^a	0.4 ± 0.0 ^b	0.4 ± 0.0 ^b
18:0	19.2 ± 0.2	19.9 ± 0.3	19.8 ± 0.2
18:1n-9	3.4 ± 0.1 ^a	3.3 ± 0.1 ^a	2.9 ± 0.1 ^b
18:1n-7	3.8 ± 0.2	4.0 ± 0.2	3.5 ± 0.1
18:2n-6	4.7 ± 0.5 ^a	3.1 ± 0.2 ^b	2.9 ± 0.2 ^b
20:1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
20:2n-6	0.7 ± 0.1 ^a	0.3 ± 0.0 ^b	0.6 ± 0.1 ^a
20:3(Δ 5,11,14)	n.d.	n.d.	3.0 ± 0.1
20:3n-6	0.2 ± 0.0 ^a	0.4 ± 0.0 ^b	0.3 ± 0.0 ^b
20:4n-6	32.8 ± 0.5 ^a	34.4 ± 0.3 ^b	31.5 ± 0.4 ^a
22:4n-6	2.1 ± 0.1 ^a	1.5 ± 0.0 ^b	1.5 ± 0.1 ^b
22:5n-6	4.5 ± 0.3 ^a	6.6 ± 0.4 ^b	6.4 ± 0.5 ^b
22:5n-3	0.8 ± 0.0 ^a	0.7 ± 0.0 ^b	0.7 ± 0.0 ^b
22:6n-3	11.1 ± 0.5	10.8 ± 0.2	10.6 ± 0.3
SFA	33.3 ± 0.4	32.4 ± 0.3	33.1 ± 0.8
MUFA	7.6 ± 0.2 ^{ab}	7.8 ± 0.2 ^a	7.0 ± 0.2 ^b
n-6 PUFA	45.0 ± 0.5 ^a	46.3 ± 0.4 ^a	43.3 ± 0.6 ^b
n-3 PUFA	11.9 ± 0.5	11.5 ± 0.2	11.3 ± 0.4
total PUFA	56.9 ± 0.3	57.7 ± 0.5	57.5 ± 0.9
n-6/n-3	3.8 ± 0.2	4.1 ± 0.1	3.8 ± 0.1
Desaturation.index	7.7 ± 0.9 ^a	11.6 ± 0.6 ^b	11.4 ± 0.9 ^b

Means ± SE, n=8rats. Values with different superscript roman letters are significantly different at P<0.05.

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

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

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

Table 25 Activities of fatty acid synthase, malic enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase, carnitine palmitoyl transferase and acyl-CoA oxidase in liver

Enzyme	Groups		
	LETO	OC	OT
	(nmol/min/mg protein)		
Fatty acid synthase	16.5 ± 1.1 ^a	20.4 ± 0.7 ^b	18.4 ± 0.9 ^{ab}
Malic enzyme	53.6 ± 4.0 ^a	126 ± 6 ^b	114 ± 4 ^b
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	39.4 ± 3.7 ^a	149 ± 8 ^b	121 ± 7 ^c
Carnitine palmitoyl transferase	3.48 ± 0.18 ^a	4.09 ± 0.28 ^{ab}	4.34 ± 0.14 ^b
Acyl-CoA oxidase	2.91 ± 0.13 ^a	2.95 ± 0.10 ^a	3.73 ± 0.14 ^b

Each value represents means ± SE of eight rats.

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

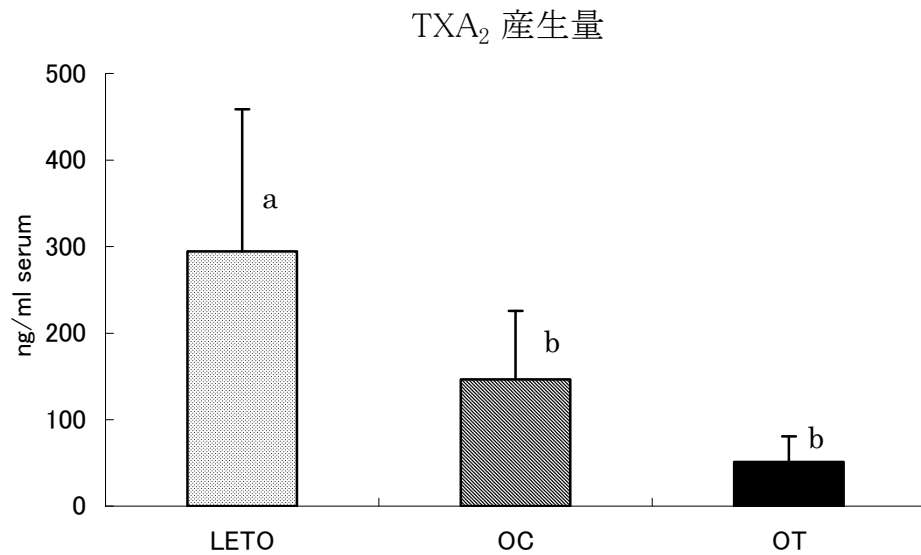


Table 26 Production of platelet thromboxane A₂

	Groups		
	LETO	OC	OT
(ng/ml serum)	295 ± 58.1 ^a	147 ± 28.0 ^b	50.9 ± 10.5 ^b

Each value represents means ± SE of eight rats.

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

Fig. 11 Production of platelet thromboxane A₂

Each value represents means ± SE of eight rats.

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

TXA₂ : thromboxane A₂

OC: OLETF コーン油食群

OT: OLETF カヤ油食群

Table 27 Relative mRNA levels of lipid metabolism-related genes in the liver of rats

	Groups		
	LETO	OC	OT
Fatty acid synthase	1.00 ± 0.14	1.45 ± 0.36	0.802 ± 0.136
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1.00 ± 0.10 ^a	3.43 ± 0.43 ^b	2.47 ± 0.25 ^b
Malic enzyme-1	1.00 ± 0.11 ^a	3.25 ± 0.42 ^b	2.68 ± 0.21 ^b
Carnitine palmitoyl transferase-1	1.00 ± 0.10	1.26 ± 0.08	1.29 ± 0.10
Acyl CoA oxidase-1	1.00 ± 0.07 ^a	1.41 ± 0.06 ^b	1.44 ± 0.10 ^b

Means ± SE, n=8 rats.

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

4. 考察

動物実験について、実験動物は OLETF ラットおよび LETO ラットを用いたが、6 週間飼育後のラットの体重増加量や摂食量、臓器重量に関して、LETO 群に比べ OLETF ラットで有意に増加したことから OLETF ラットでは肥満を呈し、OLETF ラットであるコーン油食群 (OC 群) とカヤ油食群 (OT 群) の 2 群間では差が認められなかったことから、体重増加量や摂食量、臓器重量に関してはカヤ油摂取による影響はみられなかった。

脂肪組織重量においては、LETO 群に比べ OLETF 群で有意に増加し、肥満を呈していた。OC 群と OT 群を比較すると、腎周囲脂肪組織において有意な減少がみられたが、全体的にカヤ油摂取でわずかな減少が見られるものの第 1 章と比べると減少の程度が小さい。このことから内臓脂肪重量において、シアドンの作用は OLETF ラットでは効果が小さいということが考えられた。

本実験において、血清総コレステロール濃度、血清トリグリセリド濃度および肝臓トリグリセリド濃度において、LETO 群に対し OLETF 群で有意に増加していたが、カヤ油摂取により OC 群と比べ OT 群が有意に減少していた。このことから OLETF ラットは十分に肥満していたがカヤ油摂取により血清および肝臓トリグリセリド濃度を減少させたと言える。血清総コレステロール濃度が OT 群で有意に低下したことは、肝臓トリグリセリド濃度が低下すると、肝臓 VLDL の肝臓からの分泌が抑えられ、結果、血清のコレステロール濃度も低下する¹⁷⁾ ことによると考えられる。これら実験結果は第 1 章の結果とほぼ同様の傾向であった。特に血清および肝臓トリグリセリド濃度においてシアドンの生理作用は肥満モデルラットにおいても効果があることが示されたが、内臓脂肪重量の低下という効果までは達しないことが考えられた。

カヤ油摂取により肝臓 TG 濃度に有意な低下がみられたことから、そのメカニズムを解明するために肝臓脂質代謝系酵素活性を測定した。脂肪酸合成系酵素活性について、グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) において、カヤ油摂取により有意に酵素活性が低下した。脂肪酸合成酵素 (FAS) とリンゴ酸酵素 (ME) の活性についても OC 群に比べ OT 群で低下する傾向はみられた。この結果は第 1 章での結果とほぼ同じ傾向である。また、合成系酵素全てにおいて、LETO 群と比較して OLETF 群では大いに活性が上昇し合成系酵素活性が亢進されるが、カヤ油摂取で抑制される傾向がみられた。

また、脂肪酸 β 酸化系酵素においては、アシル CoA オキシダーゼ (ACO) の活性が OT 群で有意に上昇しており、カヤ油摂取により脂肪酸 β 酸化系が亢進す

ることが示された。カルニチンアシルトランスフェラーゼ (CPT) 活性においてもカヤ油摂取で活性が上昇する傾向がみられた。さらに、CPT 活性が LETO 群に比べ OLETF 群のほうが高く、脂肪酸 β 酸化系が亢進しているが、それ以上に脂肪酸合成系の酵素が大きく活性化しているために、脂肪が蓄積していると考えられる。

今回得られた酵素活性の実験結果は第 1 章での結果とほぼ同じ傾向を示し、肥満モデルラットにおいても、脂肪酸合成系の抑制と β 酸化系の亢進により、カヤ油摂取で肝臓 TG 濃度が有意な減少を示したと考えられる。

肝臓の酵素活性に有意差がみられたことから、さらにそのメカニズムをさぐるために肝臓の脂質代謝関連遺伝子について mRNA 発現量の解析に試みた。脂肪酸合成系酵素である、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-1 の 3 つにおいて、カヤ油摂取で減少する傾向は見られたが、どれも有意差は認められなかった。これは屠殺時に 8 時間絶食させているため、全体的に活性が下がり、発現量の差が出にくいためと考えられる。また脂肪酸 β 酸化系においても、カヤ油摂取による差は見られなかったが、酵素活性と同様に OT 群で発現量が高くなる傾向は見られた。以上から、脂肪酸合成系酵素活性の抑制と β 酸化系の亢進は mRNA 発現量において調節されていると一概には言えないが、その可能性はあると考えられる。

肝臓リン脂質である、PC、PE 画分の脂肪酸組成分析より、シアドン酸はどちらの画分にも取り込まれており、第 1 章と同様にシアドン酸が取り込まれたかわりにアラキドン酸量が減少していた。これは、リノール酸からアラキドン酸への転換が抑制されているとも考えられるが、OT 群でのリノール酸の割合は増加していないことから、アラキドン酸がよりも優先的にシアドン酸が取り込まれたためと考えられる。

肝臓リン脂質画分において、アラキドン酸量が減少していたため、エイコサノイド産生について調べた。アラキドン酸から作られ、血小板凝集作用を持つ血小板トロンボキサン A₂産生をみると、OC、OT 群で有意に低い値を示した。また OC、OT の 2 群で有意差検定してみると、OT 群は OC 群に比べ低く、有意差が認められた。第 1 章では今回の実験結果ほど大きな差は見られなかったことから、OLETF ラットではシアドン酸が肝臓よりも血清のリン脂質画分に多く取り込まれ、血清リン脂質のアラキドン酸レベルを低下させるのではないかと推測される。

以上のことより、肥満モデルラットにカヤ油含有の食餌を与えると、ほぼ第 1

章と同様に、血清コレステロール濃度および肝臓トリグリセリド濃度の顕著な低下が確認され、脂肪酸合成系が抑制され β 酸化系が亢進するということが示唆された。またこの作用は mRNA レベルでの制御が関与していることが示された。従って、シアドン酸の脂質代謝改善作用は遺伝的に肥満を呈するラットにおいても効果が認められ、シアドン酸を含むカヤ油の摂取は、肥満の軽減、脂質代謝の改善に有益であると考えられた。

第3章

シアドン酸のラットにおける吸収についての検討

1. 緒言

第1章と第2章において、カヤ油の生理作用やカヤ油に含まれるシアドン酸が脂質代謝に与える影響について検討してきたが、序論でも述べたように、シアドン酸は非メチレン介在型不飽和脂肪酸の一つで、通常脂肪酸とは異なる構造を持ち、二重結合間にメチレン基を複数個挟んだ構造を持っている。この特殊な構造から、シアドン酸は通常とは異なる吸収を示すのか、あるいは吸収阻害があるのか、リンパへの吸収について他の脂肪酸と差があるのかどうか検討する必要がある。

そこで第3章では、カヤ油からシアドン酸を単離後、比較対照の脂肪酸としてアラキドン酸を取り上げ、シアドン酸と比較して吸収率に差があるかどうか調べることを目的とした。なお投与する脂肪酸はエチルエステル化したものを用いた。また、カヤ油からシアドン酸を単離する過程でシアドン酸の純度は60%となり、シアドン酸以外の40%はほぼリノール酸となるため、シアドン酸エチルエステルとリノール酸エチルエステルの混合物となる。従ってアラキドン酸群においてもリノール酸エチルエステルと混合し、純度を60%でそろえた。さらに、シアドン酸とアラキドン酸のリンパへの吸収を調べるのにラット胸管リンパカニューレーション法¹⁸⁾を用いた。この方法は摂取した脂質の吸収を調べるモデルとして用いられている方法である。食餌摂取された脂質は、小腸上皮細胞へ吸収された後、カイロミクロンを形成し、小腸リンパへ放出された後、胸管リンパへと流入する。そこでラットの胸管にチューブを入れ、リンパ液を集めることで脂質の吸収を詳細に調べることが出来る。

2. 実験方法

2.1 試料用脂質

ラットに投与する脂質はシアドン酸濃縮物〔カヤ油（サミット製油(株)）から単離したもの〕のエチルエステルおよびアラキドン酸エチルエステル（サントリー(株)）とし、2群でおこなった。

- ・アラキドン酸エチルエステル投与群（AA群）
- ・シアドン酸エチルエステル投与群（SA群）

2.2 試料用脂質の調製および分析

シアドン酸は、上述した 2.1.1～2.1.3 に基づき、油脂のアルカリによる加水分解、尿素付加法、リパーゼエステル化法によりシアドン酸濃縮物を得た。さらに得られたシアドン酸濃縮物を 2.1.4 と同様にエチルエステル化し、分析に供した。また、シアドン酸濃縮物の純度が約 60%であったため、アラキドン酸エチルエステルはリノール酸エチルエステルと混合し、純度を 60%でそろえた。

試料脂質の脂肪酸組成分析は GC-2014（(株) 島津製作所）の装置を用い、他の条件は第 2 章、第 1 節の 2.1.2 と同様で、ガスクロマトグラフィー分析により試料油の脂肪酸組成を測定した。試料油の脂肪酸組成を Table 29 に示す。

2.3 胸管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、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」に従って計画を策定し、実施した。

2.3.1 実験動物および食餌

体重 250–270g の 8 週齢 Sprague-Dawley 系雄性ラット（日本クレア）を室温 21～25℃、明暗サイクル 12 時間（照明時間 8：00～20：00）に設定された動物棟にて飼育し、ラット納入後数日間には市販固型飼料（CE-2、日本クレア（株)）と水を自由摂食させた。

2.3.2 胸管リンパカニューレーション手術

3～6 日の予備飼育後、ネンブタール麻酔(0.1%v/wBW)のもとで胸管リンパカニューレーション手術を行なった。リンパチューブは single lumen clear vinyl tube SV-35 (Critichley Electrical Products, Auburn, Australia 夏目製作所) を用いた。その後胃チューブ (single lumen polyethylene tube SP-55) (Critichley Electrical Products, Auburn, Australia 夏目製作所) の装着を行な

い、139mM グルコースー85mMNaCl 水溶液（等張液）をリンパ液採取終了まで 3.4mL/hr (HARVARD APPARATUS)で連続的に注入した。

2.3.3 手術後からラットの回復

手術後はラットをリストレイニングケージに固定し、手術直後から電球により保温して体温低下を防いだ。実験期間中は飲水として 139mM グルコースー85mMNaCl 水溶液を自由に飲ませた。手術後数時間はリンパチューブ内でしばしばフィブリンの形成によりチューブが詰まるので定期的にフィブリンを取り除いた。夕方から翌朝までのリンパ液を氷冷したメスシリンダーに集めた。

2.3.4 試験液の調製

翌朝ブランクとして 2 時間リンパ液を採取した。これはもともとリンパ液中に内因性の脂肪酸が存在するため、試験液投与後のリンパ液中の脂肪酸量から内因性脂肪酸量を差し引くことにより、見かけの吸収率を測定するためである。このブランクのリンパ流量をもとに、アラキドン酸エチルエステルを含むエマルジョンを投与する群 (AA 群) とシアドン酸エチルエステルを含むエマルジョンを投与する群 (SA 群) の 2 群に群分けした。

2.3.5 試験液の投与

試験液の組成は Table 30 に示す。なお、シアドン酸エチルエステルは精製過程からほぼリノール酸エチルエステルとの混合状態で純度 60%であったため、アラキドン酸エチルエステルもリノール酸エチルエステルとの混合油とし、純度 60%にそろえた。試験液は超音波ホモジナイザー (Sonifier Model 250, Branson Ultrasonics Corporation) によりエマルジョン化して、直ちに胃チューブより 3mL シリンジ (ニプロ) を用いて 1 匹あたり 3mL 注入した。続いて 139mM グルコースー85mMNaCl 水溶液を胃チューブより注入し、投与液を完全に胃内に入れた。

2.3.6 リンパ液回収

投与後経時的に (3,6,9,24 時間後) リンパ液を全量採取した。その際、リンパ液の凝固を防ぐために 9 時間後までは 600 μ l、9-24 時間は 1500 μ l の EDTA 溶液 (100mg EDTA \cdot 2Na/mL 脱イオン水) をあらかじめ入れてある氷冷したメスシリンダーを用いた。リンパ液は転倒混和後、約 12ml をプラスチックチューブに採取した。各時間帯のリンパ流量をもとに 0-24 時間のリンパ液 (再構成リンパ) を構成して分析結果の指標とした。なお、採取したリンパ液は、分析時まで -35°C で冷凍保存した。

2.3.7 試験液およびリンパ液の脂肪酸分析

試験液からは 0.05mL、リンパ液からは 0.5mL をサンプリングし、Folch 法に従い 20 倍量のクロロホルム：メタノール=2：1 で抽出した。内部標準としてペンタデカン酸(15：0)(Sigma)を加え、硫酸-メタノール溶液 (2：230, by vol) 2ml を加えた後、80°C で 2 時間加熱しトランスメチル化を行った。飽和 NaCl 溶液 2ml を加え、脂肪酸メチルエステルをヘキサン 2ml で抽出し、ガスクロマトグラフィー分析に供した。分析条件は 1-2 と同様とした。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 チャート(%)
- B：内部標準(15:0)の GLC チャート(%)
- C：内部標準(15:0)添加量(1.001mg)
- a：投与液のサンプリング量(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 >

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

< 各時間ごとの脂肪酸吸収率 >

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 チャート(%)
- B：内部標準(15:0)の GLC チャート(%)
- C：内部標準(15:0)添加量(2.002mg)
- 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/hr)
- 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)

2.4 統計処理

データは平均値±標準誤差で示し、一元配置分散分析を行い 3 群間の差を分析した。危険率<5%であった場合に有意差ありとし、有意差が生じた場合は **Tukey-Kramer** 法により多重比較検定を行い、群間の差が危険率<5%の場合をもって有意差ありと判定した。

3. 結果

3.1 ラットの体重およびリンパ流量

ラットの体重および各時間のリンパ流量を Table 28 に示す。実験に用いたラットの体重およびリンパ流量については、2 群間で有意差は認められなかった。

3.2 試験脂質のリンパへの吸収率

アラキドン酸エチルエステルおよびシアドン酸エチルエステルのリンパへの吸収率は (Fig. 12~13, Table 31~32) に示す。

シアドン酸エチルエステル (SA 群) とアラキドン酸エチルエステル (AA 群) のリンパ中への吸収率の差を比較検討した。AA 群、SA 群にそれぞれ約 40% 含まれているリノール酸エチルエステルの吸収率をみると、アラキドン酸エチルエステルおよびシアドン酸エチルエステルの吸収率の動向とほぼ同じ傾向を示した。(Fig. 12, Table 31)

さらに、AA 群と SA 群の 24 時間における吸収率を比べると SA 群の方が早い時間に吸収率が高くなっているが 24 時間後ではほぼ同様の吸収率となった。AA 群のほうが SA 群に比べ、0~3 時間後および 0~6 時間後の吸収率の増加がやや緩やかであり AA 群のほうが吸収が遅いが、AA 群および SA 群の両群ともに投与後、0~3 時間が一番高い吸収率を示した。(Fig. 13, Table 32)

Table 28 Body weight and lymph flow

Groups	Body weight (g)	lymph flow (ml)				
		0-3h	3-6h	6-9h	9-24h	0-24h
AA	300±2	18.3±1.8	20.4±1.9	18.7±2.0	101±14	158±17
SA	300±2	19.9±2.0	18.8±2.1	19.7±2.9	89.0±13	147±13

Means±SE, n=6-8 rats.

Table 29 Fatty acid Composition(wt%) of dietary fats

Fatty acids	Groups	
	SA	AA
18:1 n-9	2.4	n.d.
18:2 n-6	30.9	39.6
20:1	2.3	n.d.
20:2 n-6	2.3	n.d.
20:3(Δ 5,11,14)※	59.9	n.d.
20:4 n-6	n.d.	60.0

n.d.:not detected

※シアドン酸

Table 30 Composition of test emulsion

	Groups	
	AA	SA
Taurocholic acid sodium salt	200mg	200mg
Albumin, bovine serum, essentially fatty acid free	50mg	50mg
Arachidonic acid ethylester	200mg	—
Sciadonic acid ethylester	—	200mg
Water	2.78ml	2.78ml

3ml投与液/匹

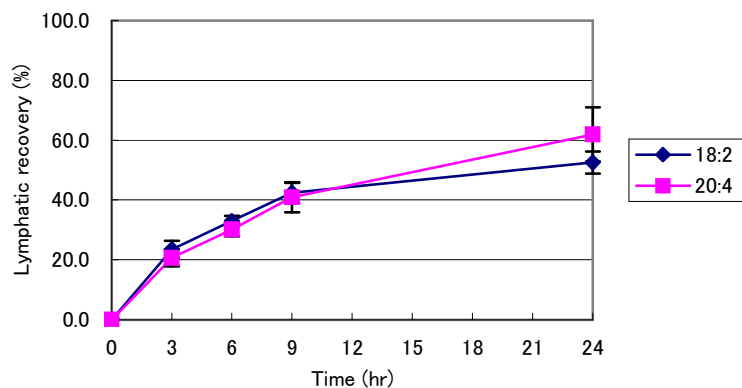


Fig. 12-a Lymphatic recovery of 18:2 n=6 and 20:4 n=6

Each value represents mean \pm S.E. of 6-8 rats.

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

Table 31-a Lymphatic recovery of 18:2 and 20:4

Time(hr)	Groups	
	18:2	20:4
0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
3	23.5 \pm 2.9	20.7 \pm 2.8
6	33.0 \pm 1.7	30.1 \pm 2.3
9	42.4 \pm 3.3	40.9 \pm 5.0
24	52.5 \pm 3.7	61.9 \pm 9.1

Means \pm SE, n=6 rats.

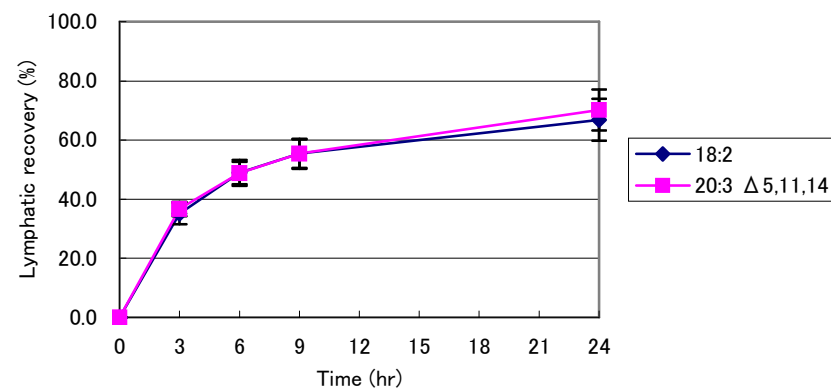


Fig. 12-b Lymphatic recovery of 18:2 n=6 and 20:3 Δ 5,11,14

Table 31-b Lymphatic recovery of 18:2 and 20:3 (Δ 5,

Time(hr)	Groups	
	18:2	20:3 Δ 5,11,14
0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
3	35.1 \pm 3.6	36.7 \pm 2.4
6	48.9 \pm 4.4	48.8 \pm 3.8
9	55.4 \pm 5.1	55.4 \pm 4.8
24	66.8 \pm 7.1	70.1 \pm 6.9

Means \pm SE, n=8 rats.

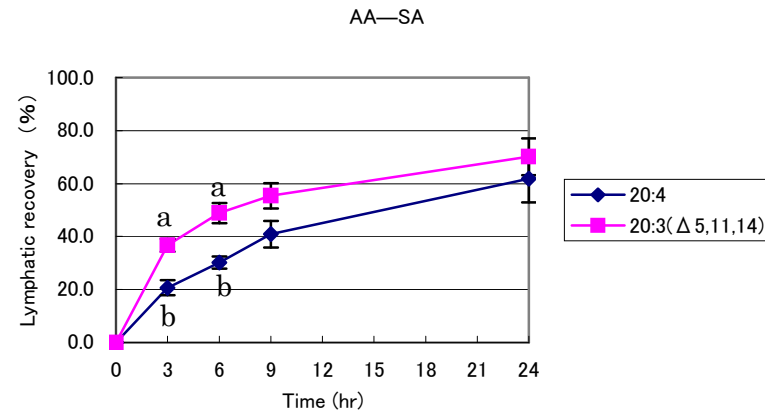


Fig. 13-a Lymphatic recovery of 20:4 n-6 and 20:3 Δ 5,11,14

Each value represents mean ± S.E. of 6-8 rats.

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

Table 32-a Lymphatic recovery of 20:3(Δ 5,11,14) and 20:4

Time(hr)	Groups	
	20:3 Δ 5,11,14	20:4
0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
3	36.7 ± 2.4 ^a	20.7 ± 2.8 ^b
6	48.8 ± 3.8 ^a	30.1 ± 2.3 ^b
9	55.4 ± 4.8	40.9 ± 5.0
24	70.1 ± 6.9	61.9 ± 9.1

Means ± SE, n=6-8 rats.

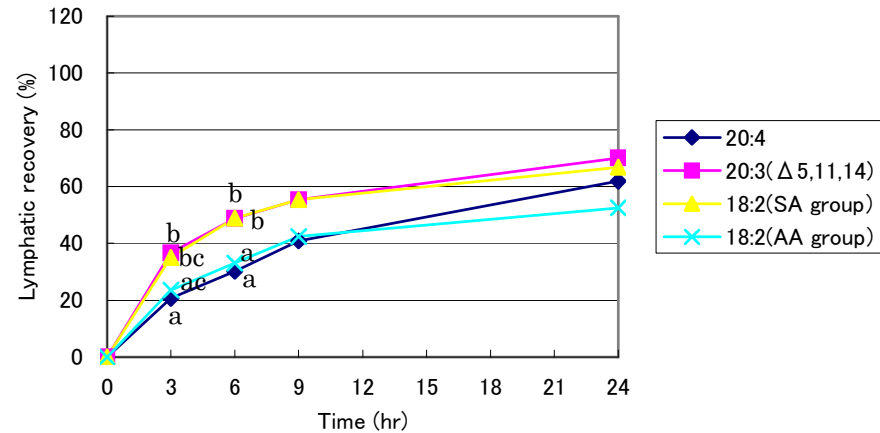


Fig. 13-b Lymphatic recovery of 20:4, 20:3 Δ 5,11,14 , 18:2(SA group) and 18:2(AA group)

Each value represents mean ± S.E. of 6-8 rats.

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

Table 32-b Lymphatic recovery of 20:4, 20:3(Δ 5,11,14), 18:2(AA group) and 18:2(SA group)

Time(hr)	Groups			
	20:4	20:3 Δ 5,11,14	18:2(AA group)	18:2(SA group)
0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
3	20.7 ± 2.8 ^a	36.7 ± 2.4 ^b	23.5 ± 2.9 ^{ac}	35.1 ± 3.6 ^{bc}
6	30.1 ± 2.3 ^a	48.8 ± 3.8 ^b	33.0 ± 1.7 ^a	48.9 ± 4.4 ^b
9	40.9 ± 5.0	55.4 ± 4.8	42.4 ± 3.3	55.4 ± 5.1
24	61.9 ± 9.1	70.1 ± 6.9	52.5 ± 3.7	66.8 ± 7.1

Means ± SE, n=6-8 rats.

4. 考察

AA 群と SA 群の 24 時間における吸収率はほぼ同程度であったが、AA 群のほうが吸収が遅かった。また、AA 群および SA 群にそれぞれ約 40%含まれているリノール酸エチルエステルの吸収率をみると、アラキドン酸エチルエステルおよびシアドン酸エチルエステルとほぼ同様な傾向で吸収されていた。

一般に、投与する形態の種類による吸収性の差は、投与 24 時間後においてはエチルエステルよりもトリグリセリドの形態であるほうが吸収率は高いとされている⁴⁴⁾。in vitro において、エチルエステルはトリグリセリドよりも腭リパーゼの反応を受けにくいことが報告されており⁴⁵⁾、このため、エチルエステルの吸収率が低いと考えられている。また、エチルエステルはトリグリセリドとともに投与することで小腸内腔での加水分解が進み、吸収率が上がることから、第 1 章や第 2 章における摂食試験では、今回測定した結果よりも多くリンパへ吸収されていると考えられる。(第 1 章では、シアドン酸エチルエステルをコーン油に添加しており、第 2 章では、シアドン酸を含んでいるカヤ油を用いて餌を調製している。)

以上より、シアドン酸はその構造が特殊であるが、リノール酸と同様にリンパへ吸収され、摂取後数時間はアラキドン酸よりも高い吸収率で吸収される。24 時間後ではほぼ同程度に吸収され、アラキドン酸とシアドン酸とでは吸収率に差がないことが示された。

総括

近年、食の欧米化と運動不足により、日本でも肥満を基盤とする糖尿病、高血圧、動脈硬化症などの生活習慣病、いわゆるメタボリックシンドローム患者が増加し、社会的にも問題となっている。さらに基礎疾患として、肥満、高脂血症、糖尿病がある事が多く、近年、急速に関心が高まっている。肥満、脂肪肝の治療には、その原因となる生活習慣を改善することが必要である。そのため、アルコールやカロリー摂取の抑制等の食事療法や運動療法が行われているが、ストレスや生活時間が不規則な現代社会では、脂肪肝を治療・予防することは難しいのが現状である。そこで日常規則的に、かつ容易に摂取可能な食事の形態で脂肪肝を予防する食品の開発が期待されている。

裸子植物であるカヤ (*Torreya nucifera*) の種子から採取したカヤ油は、通常の不飽和脂肪酸の構造とは異なり、非メチレン介在型不飽和脂肪酸の一つであるシアドン酸 (20:3 ; 5Z,11Z,14Z-エイコサトリエン酸) が約10%含まれている。そのため、通常の食用油とは異なる健康機能を有することが考えられた。

当研究室の長田により、食餌性カヤ油には脂質代謝改善作用があること、また、強いトリグリセリド低下作用があり、肝臓の脂肪酸合成が抑制されることが確認された。

そこで本研究では、まず第1章として、食餌性カヤ油の生理作用がシアドン酸に由来しているのかを明らかにするため、カヤ油からシアドン酸を単離した後、ラットに与え、その脂質代謝に及ぼすシアドン酸の効果を調べた。

カヤ油からシアドン酸を単離し、コーン油にシアドン酸を添加した試料油を用いて、ラット脂質代謝への影響をみると、血清および肝臓トリグリセリド濃度の強い低下を観察し、これは肝臓脂質代謝関連酵素活性の分析により、脂肪酸合成の抑制と β 酸化系の亢進に起因することが示唆された。また肝臓リン脂質画分にシアドン酸の蓄積がみられ、シアドン酸が取り込まれたかわりにアラキドン酸量が減少していた。これは、アラキドン酸から作られ、血小板凝集作用を持つ血小板トロンボキサン A_2 産生において、シアドン酸添加群で低い傾向がみられたことから分かるように、シアドン酸はアラキドン酸とおきかわって、肝臓や血清リン脂質中に取り込まれることが示唆された。また、全体を通して5%よりも10%でより強い効果が得られ、濃度依存的にシアドン酸の効果がみられた。

以上から、カヤ油の脂質代謝改善作用は、シアドン酸に由来することが示唆された。

そこで、第2章では、OLETF ラット (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats) を肥満モデルラットとして用い、食餌性カヤ油の摂取によるシアドン酸の肥満抑制作用について調べた。脂肪組織重量において、カヤ油摂取により腎周囲脂肪組織が有意な低下を示した。また、カヤ油摂取による血清および肝臓トリグリセリド濃度の有意な低下は、第1章での結果と同様に OLETF ラットにおいても確認された。肝臓トリグリセリド濃度の強い低下を受け、肝臓脂質代謝関連酵素活性を測定したところ、脂肪酸合成系酵素においては、LETO 群に比べ、OLETF 群で有意に活性が上昇したが、カヤ油摂取により、合成系酵素活性が低下し、脂肪酸合成が抑制されていることが示唆された。また、脂肪酸 β 酸化系酵素においては、カヤ油摂取により活性が上昇し、脂肪酸 β 酸化が亢進されることが示された。これら酵素活性の実験結果も第1章とほぼ同様に得られ、肥満モデルラットにおいても同じメカニズムで効果がみられることが示唆された。また、TXA₂産生量において、カヤ油摂取による有意な低下がみられ、これは、シアドン酸が肝臓リン脂質に取り込まれたかわりにアラキドン酸量が減少したためと考えられた。さらに、mRNA 発現量を分析した結果、脂質代謝系酵素活性測定から示唆された脂肪酸合成の抑制と β 酸化系の亢進はmRNAレベルでの調節によるとは言い切れないが、mRNA 発現量で制御されている可能性はあると考えられる。

以上のことから、シアドン酸の脂質代謝改善作用は、遺伝的に肥満を呈するモデルラットにおいても効果があり、脂肪蓄積抑制に寄与することが示唆された。

現在において、カヤ油は食用としても用いられているが、その利用頻度は少ない。第1章で5%のシアドン酸添加によっても効果が見られたことにより、今後カヤ油をブレンドした油脂などでより実用的に活用され、健康に寄与することが期待できる。

参考文献

- 1) Wollf RL, Deluc LG, Marpeau AM. Conifer seeds: Oil content and fatty acid composition. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 73, 765-71 (1996).
- 2) Houtsmuller UMT. Columbinic acid, a new type of essential fatty acid. *Prog. Lipid. Res.* 20, 889-96 (1981).
- 3) Elliott WJ, Morrison AR, Sprecher HW, Needleman P. The metabolic Transformations of columbinic acid and the effect of topical application of the major metabolites on rat skin. *J. Biol. Chem.* 260, 987-92 (1985).
- 4) Sugano M, Ikeda I, Wakamatsu K, Oka T. Effect of Δ^5 polyunsaturated fatty acids maritime pine (*Pinus Pinaster*) seed oil on the fatty acid profile of the developing brain of rats. *Br. J. Nutr.* 72, 775-83 (1994).
- 5) Asset G, Staels B, Wollf RL, Bauge E, Madj Z, Fruchart JC, Dallongeville J. Effect of *Pinus Pinaster* and *Pinus koraiensis* seed oil supplementation on lipoprotein metabolism in the rat. *Lipids* 34, 39-44 (1999).
- 6) Pasquier E, Ratnayake WMN, Wollf RL. Effect of Δ^5 polyunsaturated fatty acids maritime pine (*Pinus Pinaster*) seed oil on the fatty acid profile of the developing brain of rats. *Lipids* 36, 567-74 (2001).
- 7) Ikeda I, Oka T, Koba K, Sugano M, Lie Ken Jie MSF. 5c, 11c, 14c-Eicosatrienoic acid 5c, 11c, 14c, 17c-Eicosatetraenoic acid of *Biota orientalis* seed oil affect lipid metabolism in the rat. *Lipids* 27, 500-4 (1992).
- 8) Berger A, German JB. Extensive incorporation of dietary Δ^5 , 11, 14 eicosatrienoate into phosphatidylinositol pool. *Biochim. Biophys. Acta.* 1085, 371-6 (1991).
- 9) Tanaka T, Takimoto T, Morishige J, Kikuta Y, Sugiura T, Satouti K. Non-methylene-interrupted polyunsaturated fatty acids: Effective

- substitute for arachidonate of phosphatidylinositol. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 264, 683-8 (1999).
- 10) Tanaka T, Morishige J, Takai Y, Hirano K, Satouti K. Production and protein kinase C activation of diacylglycerols containing polymethylene-interrupted PUFA. *Lipids* 40, 155-162 (2005).
 - 11) 高橋斉, 東洋産ナッツ脂質中の微量脂肪酸の分析、濃縮と代謝, 修士論文, 東北大学 (平成 15 年度) .
 - 12) 長田ゆう子, ラットの脂質代謝に及ぼす食餌性カヤ油の影響, 卒業論文, 東北大学 (平成 16 年度).
 - 13) Funakoshi A, Miyasaka K, Shinozaki H, Masuda M, Kawanami T, Takata Y, Kono A. An animal model of congenital defect of gene expression of chole-cystokinin (CCK)-A receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 210, 787-796 (1995)
 - 14) Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 41, 1422-28 (1992)
 - 15) Kawano K, Personal communications.
 - 16) Shi K, Mizuno A, Sano T, Ishida K, Shima K. Sexual difference in the incidence of diabetes mellitus in Otsuka-Long-Evans-Tokushima-Fatty rats.: Effects of castration and sex hormone replacement on its incidence. *Metabolism* 43, 1214-1220 (1994)
 - 17) Okauchi N, Mizuno A, Zhu M, Ishida K, Sano T, Noma Y, Shima K. Effects of obesity and inheritance on the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Diab Res Clin Pract* 29, 1-10 (1995)
 - 18) 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一 (2000) *食品機能研究法*, 21-24.

- 19) 三井哲夫, 満田久輝, 秦忠夫. 農芸化学実験書 (第2巻) 京都大学農学部農芸化学教室編, 715-6 (1957).
- 20) 日本油化学会編, 基準油脂分析試験法(I), 2.4.1.1 (1996).
- 21) 清野肇, 中里敏, 三階貴男, 無類井健夫, 吉田治朗, 低級酸を含む油脂からの三フッ化ホウ素メタノール試薬による脂肪酸メチルエステルの調製, 油化学, 26,405 (1997).
- 22) American Institute of Nutrition. AIN-93 purified diets for laboratory Rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123, 1939-51 (1993).
- 23) Folch, J., Lees, M. and Stanley, G. H. S. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509. (1957)
- 24) Kelley, D. S., Nelson, G. J. and Hunt, J. E. *Biochem. J.* 235, 87-90. (1986)
- 25) Kelley, D. S., Kletzien, R.F. *Biochem. J.* 217, 543-549. (1984)
- 26) Ochoa, S. in "Methods in Enzymology", Vol. 1, ed. by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic Press, New York, pp. 739-753 (1995)
- 27) Markwell, M. A. K., McGroarty, E. J., Bieber, L. L. and Tolbert, N. E. *J. Biol. Chem.* 248, 3426-3432. (1973)
- 28) Hashimoto, T., Miyazawa, S., Gunarso, D. and Furuta, S. *J. Biochem.* 90, 415-421. (1981)
- 29) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275. (1951)
- 30) Lee, J. H., Fukumoto, M., Nishida, H., Ikeda, I. and Sugano, M. *Journal of Nutrition* 119, 1893-1899. (1989)

- 31) Ikeda I, Oka T, Koba K, Sugano M, Lie Ken Jie MSF.
5c,11c,14c-Eicosatrienoic acid 5c,11c,14c,17c-Eicosatetraenoic acid of
Biota orientalis seed oil affect lipid metabolism in the rat. *Lipids* 27,
500-4, (1992).
- 32) Beynen AC, Katan MB. Why do polyunsaturated fatty acids lower
serum cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 42, 560-3 (1985).
- 33) Harris WS, Connor WE, Inkeles SB, Illingworth DR. *Metabolism* 33,
1016, (1984).
- 34) Sanders TAB, Sullivan DR, Reeve J, Thompson GR. *Arteriosclerosis* 5,
459, (1985).
- 35) 栄養機能化学研究会, 栄養機能化学 (第2版), 63-84 (2005).
- 36) Asset G, Staels B, Wolff RL, Bauge E, Madj Z, Fruchart JC,
Dallongeville J. Effect of *Pinus pinaster* and *Pinus koraiensis* seed oil
supplementation on lipoprotein metabolism in the rat. *Lipids* 34,
39-44, (1999).
- 37) Elliott WJ, Morrison AR, Sprecher HW, Needleman Philip. The
metabolic transformations of columbinic acid and the effect of topical
application of the major metabolites on rat skin. *J. Biol. Chem.* 260,
987-92, (1985).

- 38) 栄養機能化学研究会, 栄養機能化学 (第2版), 63-84 (2005).
- 39) Berger A, German JB. Extensive incorporation of dietary Δ -5,11,14 eicosatrienoate into phosphatidylinositol pool. *Biochim. Biophys. Acta.* 1085, 371-6, (1991).
- 40) Ikeda I, Oka T, Koba K, Sugano M, Lie Ken Jie MSF. 5c,11c,14c-Eicosatrienoic acid 5c,11c,14c,17c-Eicosatetraenoic acid of *Biota orientalis* seed oil affect lipid metabolism in the rat. *Lipids* 27, 500-4, (1992).
- 41) Tanaka T, Takimoto T, Morishige J, Kikuta Y, Sugiura T, Satouti K. Non-methylene-interrupted polyunsaturated fatty acids: Effective substitute for arachidonate of phosphatidylinositol. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 264, 683-8 (1999).
- 42) 田中保, ポリメチレン中断型脂肪酸の代謝と生理効果, 杉山産業化学研究所年報, 85-99, (平成14年度)
- 43) AIN-93 purified diets for laboratory Rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123, 1939-51 (1993).
- 44) Hwang, D. H. and Boudreau, M. *Journal of Nutrition* 118, 427-437. (1988)
- 45) Ikeda, I, Sasaki, E, Yasunami H, Nomiyama, S, Nakayama, M, Sugano, M, Imaizumi, K, Yazawa, K *Biochimica et Biophysica Acta* 1259, 297-304. (1995)

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。

また、日頃から色々のご助言、ご協力頂いた生体分子機能学研究室の諸先輩方に深く感謝すると共に、互いに切磋琢磨し、励まし合いながら支えてくれた修士の仲間、研究室の仲間感謝します。

最後に、本実験の遂行にあたり尊い命を犠牲にして頂いたラットたちに感謝すると共に、心からご冥福をお祈り申し上げます。