

Table 13 心臓総脂質脂肪酸組成(%)

Group	1群	2群	3群	4群	5群	6群
LA level (%)	8.9	2.0	1.9	2.0	2.1	2.1
DHA level (%)	0	0.5	1.0	3.1	8.4	8.4(+ルチン)
Fatty acid						
14:0	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2
14:1 (n-7)	2.5	2.6	2.6	2.5	2.3	2.3
16:0	11.4	12.1	12.5	12.1	12.5	11.6
16:1 (n-9)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2
16:1 (n-7)	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4
16:2 (n-6)	0.7	0.9	1.1	0.9	0.7	1.0
18:0	19.5	18.9	18.8	19.2	19.3	19.6
18:1 (n-9)	9.8	12.6	13.2	11.1	9.0	9.3
18:2 (n-6)	18.7	14.2	13.2	13.4	15.5	14.2
20:0						
18:3 (n-3)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
20:1 (n-9)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3
20:2 (n-6)	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2
20:3 (n-6)	0.3	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4
20:4 (n-6)	20.1	17.7	15.6	13.4	11.3	11.7
20:4 (n-3)				0.1	0.1	0.1
20:5 (n-3)	0.1	0.2	0.2	0.6	0.7	0.8
22:4 (n-6)	1.1	0.5	0.3	0.2	0.2	0.2
22:5 (n-6)	0.9	0.4	0.4	0.6	0.8	0.8
22:5 (n-3)	2.2	1.6	1.5	1.4	1.5	1.6
22:6 (n-3)	9.3	14.8	17.1	21.4	23.2	23.2
others	2.1	1.7	1.8	1.5	1.5	1.8
Polyunsaturates (%)	53.7	51.1	50.0	52.7	54.7	54.3
Monounsaturates (%)	13.1	16.1	16.7	14.4	12.0	12.5
Saturates (%)	31.1	31.2	31.5	31.4	32.0	31.4
P/S ratio	1.73	1.64	1.59	1.68	1.71	1.73
n-6 (%)	41.3	33.5	30.0	28.2	28.4	27.5
n-3 (%)	11.7	16.7	18.9	23.6	25.6	25.8
n-6/n-3 ratio	3.53	2.01	1.59	1.19	1.11	1.07
DBI ¹⁾	2.10	2.21	2.24	2.41	2.51	2.48
P-Index ²⁾	143.3 (1.00)	153.9 (1.07)	157.0 (1.10)	174.0 (1.21)	180.2 (1.26)	181.2 (1.26)

I) Double bond Index : 平均の二重結合

II) Peroxidizability Index

()内の数字は1群を1.00とした比を表す。

強度においてはP-Index値とほぼ一致した変動を示しているが、TBA値においてはP-Index値から予測される程には高くなかった。腎臓、睪丸、脳は共役ジエン量、ケミルミネッセンス強度、TBA値全てP-Index値とほぼ一致した変動を示していた。心臓では、DHA 3.1en%以上ではP-Index値から予測される程には高くはならなかった。肝臓以外の組織において、過酸化脂質レベル比は、腎臓ルチン群のケミルミネッセンス強度を除いて、DHAの投与レベルの違いによる変化はほとんどみられなかった。

実験 2

血清 (Fig. 2) と肝臓 (Fig. 3) における過酸化脂質の変化及び血清 GOT、GPT 活性の変化 (Fig. 2) を示す。血清のヒドロペルオキシド (HPO) の量は対照群 (高レベル LA) に対して高レベル DHA 群でのみ有意な増加が見られた。血清の TBA 値は、対照群に対して EPA 群と等量混合群で増加傾向を示していたが統計的な有意差はなく、DHA 群と高レベル DHA 群でのみ有意な増加が見られた。水溶性蛍光物質では、対照群に対し高レベル DHA 群でのみ有意な差が見られた。組織実質細胞傷害の指標となる血清 GOT と GPT の活性は共にほとんど大きな変化はなかった。肝臓 ホールホモジネートの共役ジエン量は、対照群に対して DHA 群と高レベル DHA 群で増加傾向を示したが、統計的な有意差では見られなかった。肝臓ミクロソームの共役ジエン量の変化を肝臓単位重量当りで見ると、対照群に対していずれの n-3 系脂肪酸を投与した群でも増加傾向を示していたが、統計的な有意差は高レベル DHA 群にのみ見られた。また、肝臓ミクロソームの共役ジエン量の変化をタンパク質単位重量当りで見ると、対照群に対して EPA 群と DHA 群および高レベル DHA 群で有意な増加が見られた。肝臓のケミルミネッセンス強度は、対照群に対して各群で発光強度が増加し高値を示したが、EPA 群と高レベル DHA 群でのみ有意な差が見られた。TBA 値は、対照群にたいして、いずれの n-3 系脂肪酸を投与した群でもその不飽和度の増加に応じて増加しており、特に DHA 群での増加が著しかった。従って、TBA 値が最も投与する脂肪酸の不飽和度の上昇に対するレスポンスが高かった。

腎臓 (Fig. 3)、睪丸と心臓 (Fig. 4) における過酸化脂質の変化を示す。腎臓の共役ジエン量は、対照群に対して有意な変化が見られず、ケミルミネッセンス強度も個体差による分析値の変動が大きく高レベル DHA 群で増加傾向にはあるが、有意な変化ではなかった。腎臓の TBA 値は、対照群に対して EPA 群と等量混合群および DHA 群で有意な増加が見られたが、その差はわずかで、

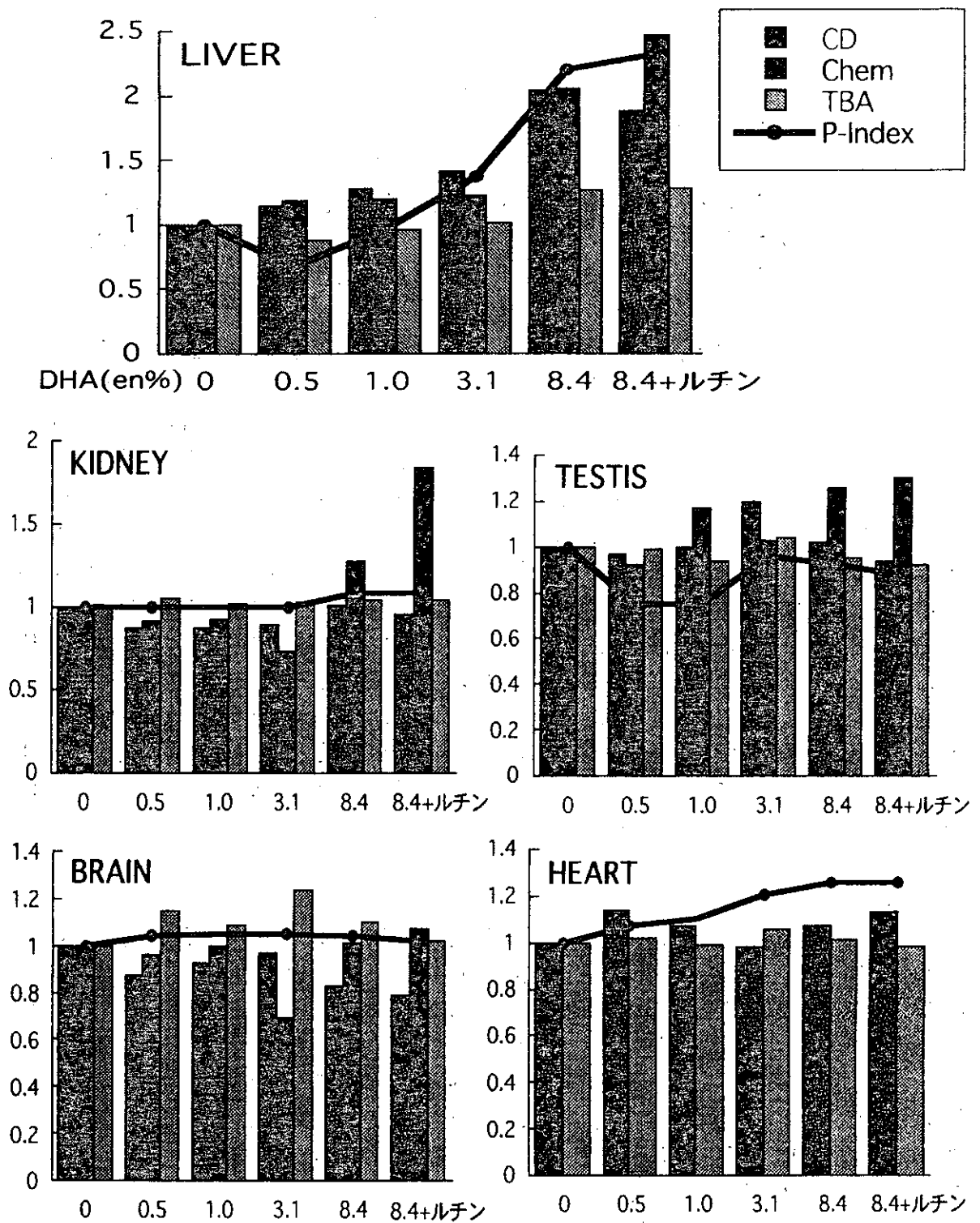


Fig. 1 組織過酸化脂質レベル比と総脂質のP-Index比の変動

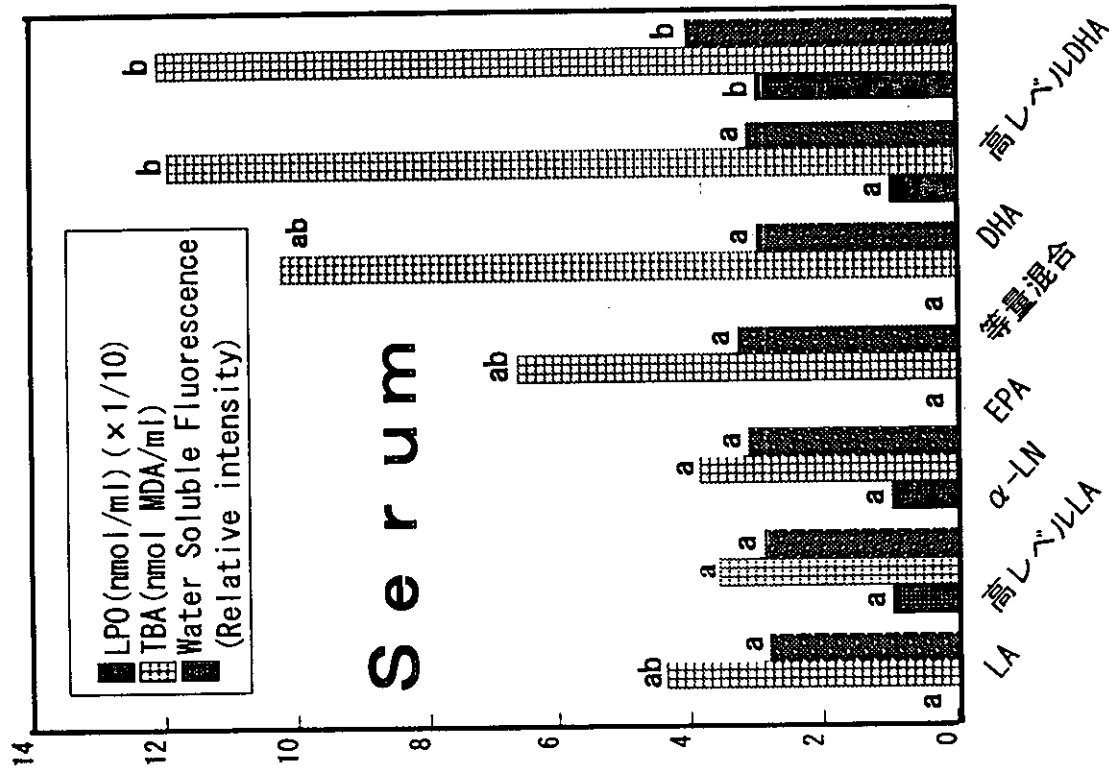
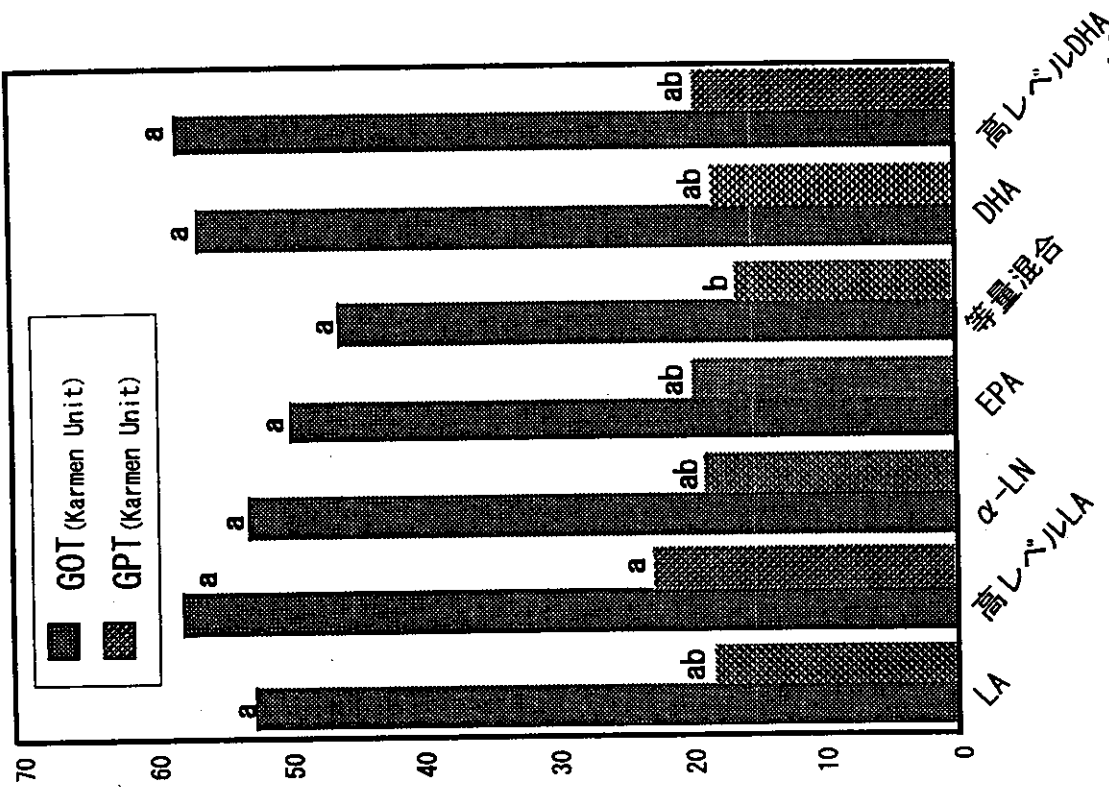


Fig. 2 血清の過酸化脂質レベル比とGPT, GOT活性

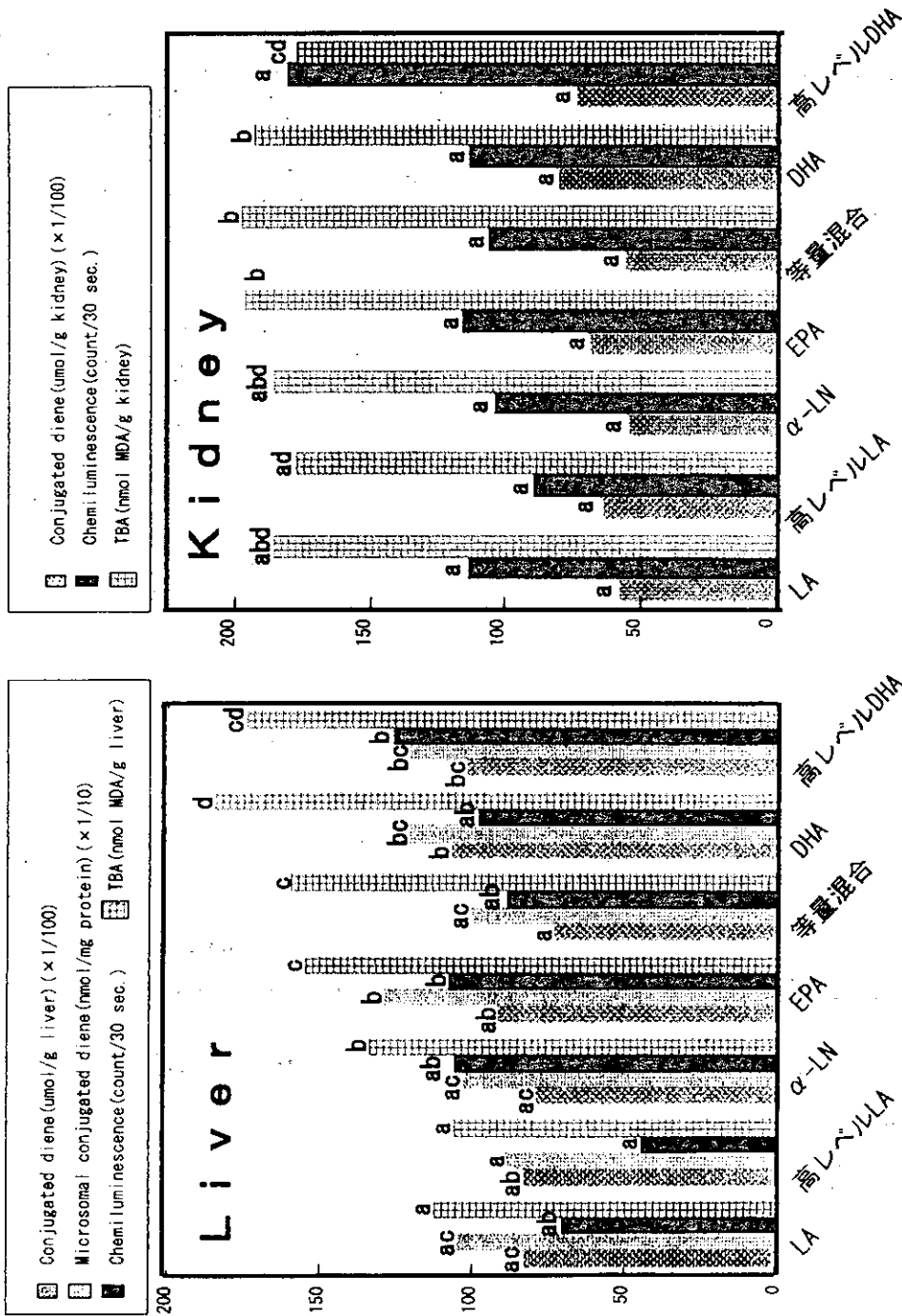


Fig. 3 肝臓と腎臓の過酸化脂質レベル

肝臓のTBA値ほどには大きな差とはならなかった。辜丸の共役ジエン量及びTBA値は、対照群に対してDHA群でのみ有意な増加が見られた。ケミルミネッセンス強度は、腎臓と同様に個体差が大きく、DHA群で増加傾向を示したが統計的な有意差が見られなかった。辜丸はn-3系脂肪酸の投与による影響を受けにくい組織であった。心臓の共役ジエン量は、対照群に対してEPA群、等量混合群、DHA群および高レベルDHA群で有意に増加し、TBA値は高レベルDHA群でのみ有意に増加した。

血清と肝臓(Fig.5)、腎臓と辜丸(Fig.6)における過酸化脂質スカベンジャー成分の変化を示す。血清の α -トコフェロール(α -Toc.)は、n-3系脂肪酸を投与したすべての群で有意な減少が見られ、高レベルDHA群でさらに低値を示した。しかし、血清のVE濃度は血清脂質レベルの影響を受けることから、血清脂質(総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質のトータル)あたりで見ると、対照群に対して高レベルDHA群でのみ有意な低下が見られた。肝臓の α -Toc.量も血清の濃度の場合と同様に著しい減少が見られ、高レベルDHA群ではさらに低値を示した。肝臓のASA量は対照群に対して、EPA群と高レベルDHA群で増加傾向が見られたが有意な差ではなかった。GSH量はEPA群でのみ対照群にたいして有意な増加が見られた。腎臓の α -Toc.量は、対照群に対しn-3系脂肪酸を投与したいずれの群も減少傾向を示したが、DHA群と高レベルDHA群でのみ統計的な有意差が見られた。ASA量は、いずれの群においても有意差は見られなかった。GSH量はEPA群と高レベルDHA群でのみ有意に増加した。辜丸の α -Toc.量は、対照群に対してLA群では有意に増加していた。一方、等量混合群、DHA群、高レベルDHA群では有意に減少していた。ASA量とGSH量は、対照群に対して共に有意な変化が見られなかった。

Fig.6に心臓における過酸化脂質スカベンジャー成分の変化及びFig.7に血清脂質濃度の変化を示す。心臓の α -Toc.量は、辜丸と同様に対照群に対してLA群で有意に増加し、等量混合群、DHA群、高レベルDHA群で有意に減少した。ASA量は、対照群(0.35 ± 0.03)に対して等量混合群(0.42 ± 0.06)と高レベルDHA群(0.41 ± 0.04)で増加しているが、実質的にはその差はほとんどなかった。GSH量はいずれの群間にも有意な差が見られなかった。心臓の α -Toc.量は対応する群どうしで比較したとき、組織の中で単位重量当りの含量が最も高く、逆にASA量、GSH量は最も低い値を示していた。また、測定した組織のLPOスカベンジャー成分を比較すると、辜丸と心臓は非常に変化の小さい組

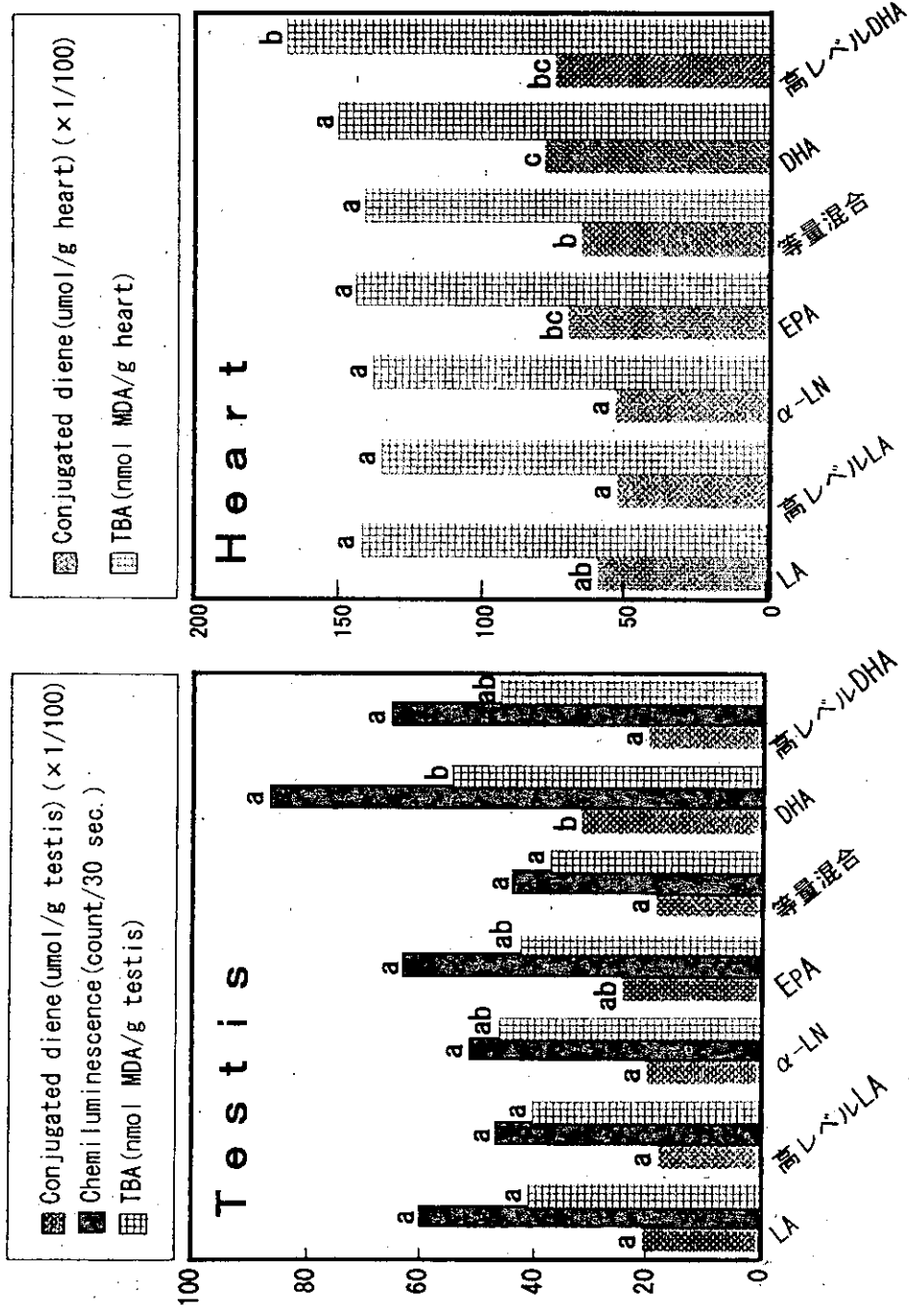


Fig. 4 睪丸と心臓の過酸化脂質レベル

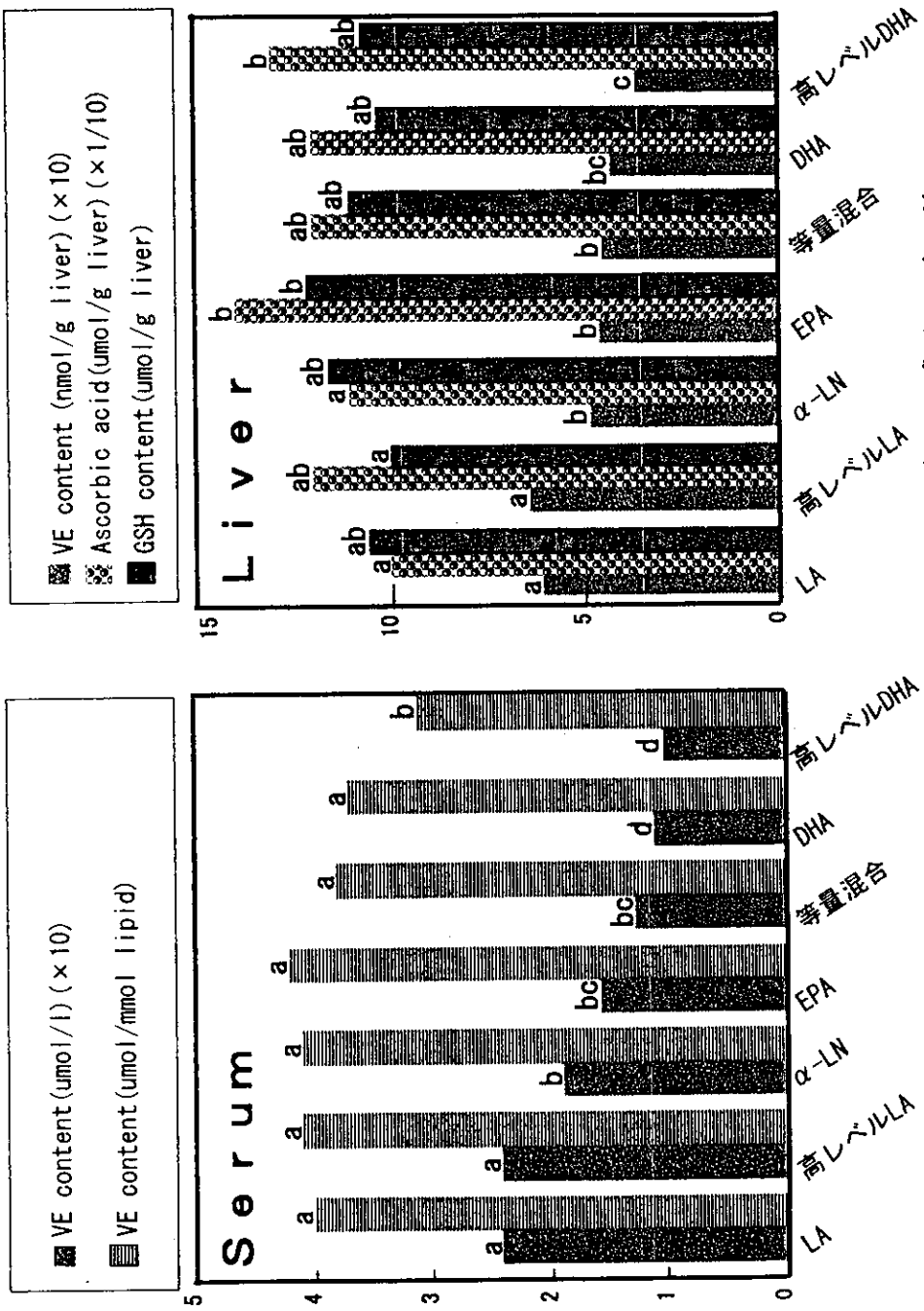


Fig. 5 血清と肝臓の過酸化脂質スカベンジャー成分レベル比

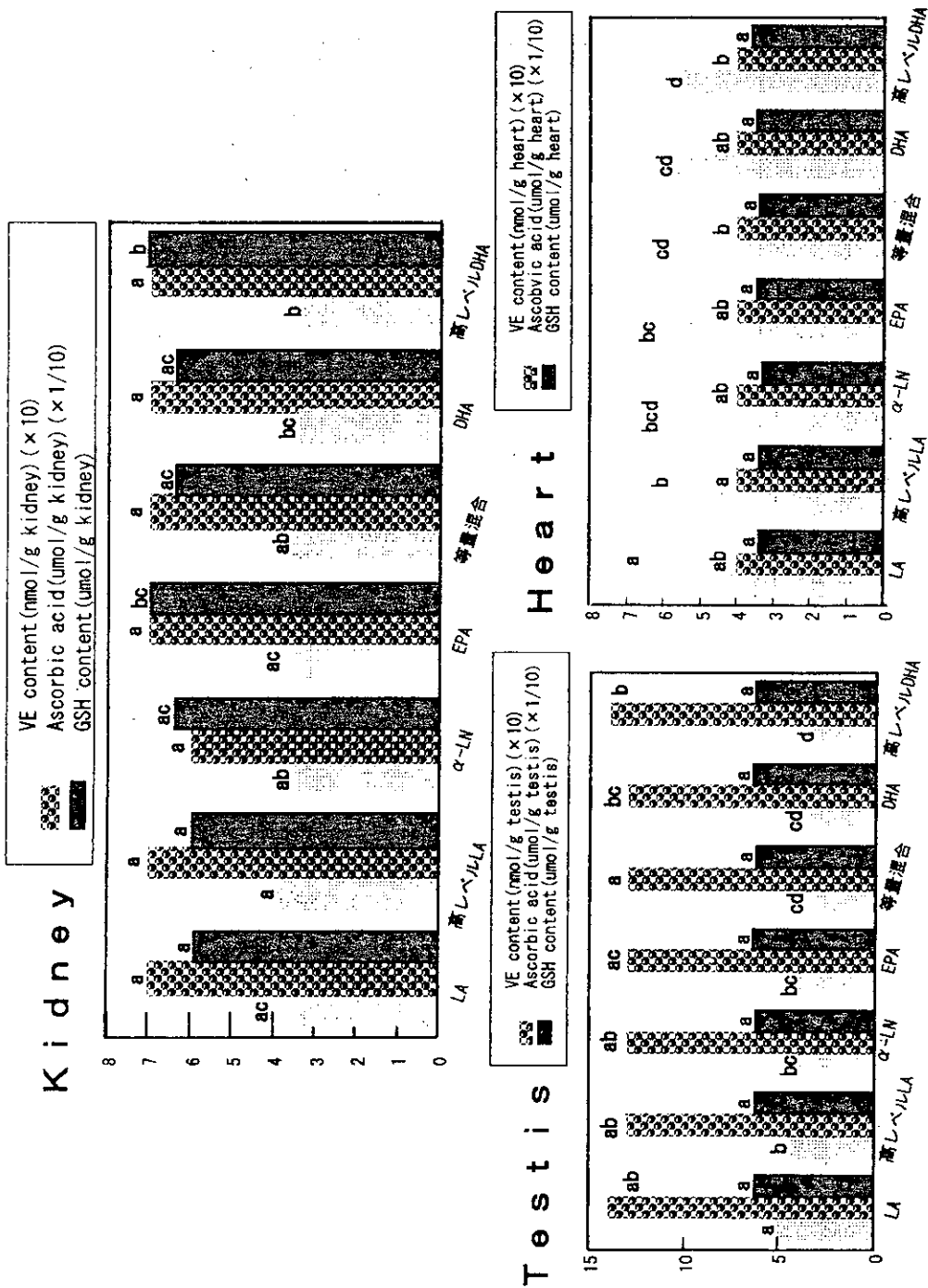


Fig. 6 腎臓、睾丸、心臓の過酸化脂質スカベンジャー成分レベル

織であった。

血清のTG、HDL-コレステロール、PLsの濃度は、n-3系脂肪酸を投与した全ての群で有意に減少し、とくに、後二者はDHAの摂取が3en%を超える群で低下が著しくなっていた。血清TCの濃度は、対照群に対しEPA群、等量混合群、DHA群、高レベルDHA群で有意に低下したが α -LN群での低下は観察されなかった。HDL-コレステロールをTC当りでみると、対照群に対し等量混合群で有意な低下を示したが、その差は大きくはなかった。

【考察】

魚油中に存在するEPAやDHAは食品中で油脂構成脂肪酸として酸化され易いばかりでなく、食品として体に取り込まれた時、体内においても同様に酸化され易く、抗酸化剤としてのVEの要求量が高めることが魚油を用いた研究により明らかにされている(1、2、8-10)。in vitroの試験からは、EPAとDHAはLAと比べてそれぞれ4および5倍も酸化され易いとされており(11)、VE欠乏状態ではさらに酸化が促進され、この係数が大きくなるとする結果も報告されている(12)。ところが、EPAやDHAはその存在状態によっては非常に酸化に対して抵抗性を示すばかりでなく、むしろ酸化安定性が高まるとする報告もあり、水系にこれらの脂肪酸を分散させた場合がその例(13、14)として考えられる。生体内での脂肪酸の存在状態は非常に多様であり、生体膜中に存在するリン脂質の構成脂肪酸を取り巻く微小環境の変化は、多価不飽和脂肪酸の酸化安定性を水系での分散の場合のように変化させることも十分に想像できる。従って、これらのn-3系脂肪酸は生体内ではその酸化のされ易さから予測される程には過酸化脂質・フリーラジカルの生成は高まっておらず、有害な影響も及ぼしていないのではないかと推察され、こうした考えに基づいて過去2年に渡り研究を進めてきた。

本年度は、実験1ではDHAの摂取変化による組織過酸化脂質・フリーラジカル生成感受性の変化を過酸化脂質のスカベンジャー成分の変動および組織脂質脂肪酸組成の変化との関連から成熟ラットを用いて検討を行った。何故なら、過酸化脂質・フリーラジカルの生成は年齢との関連が深いからである。また現在その生理効果が注目されているポリフェノール系抗酸化剤の一つであるルチンの影響についても合わせて検討した。なお、今回用いたラットは一年齢の成熟ラットで、一カ月の飼育期間を設けた。ラットの一年齢とは、人間では約30-35歳に相当し、ラットの一日は人間の約一カ月に相当する。よって一カ月の飼育期間は人間の約二

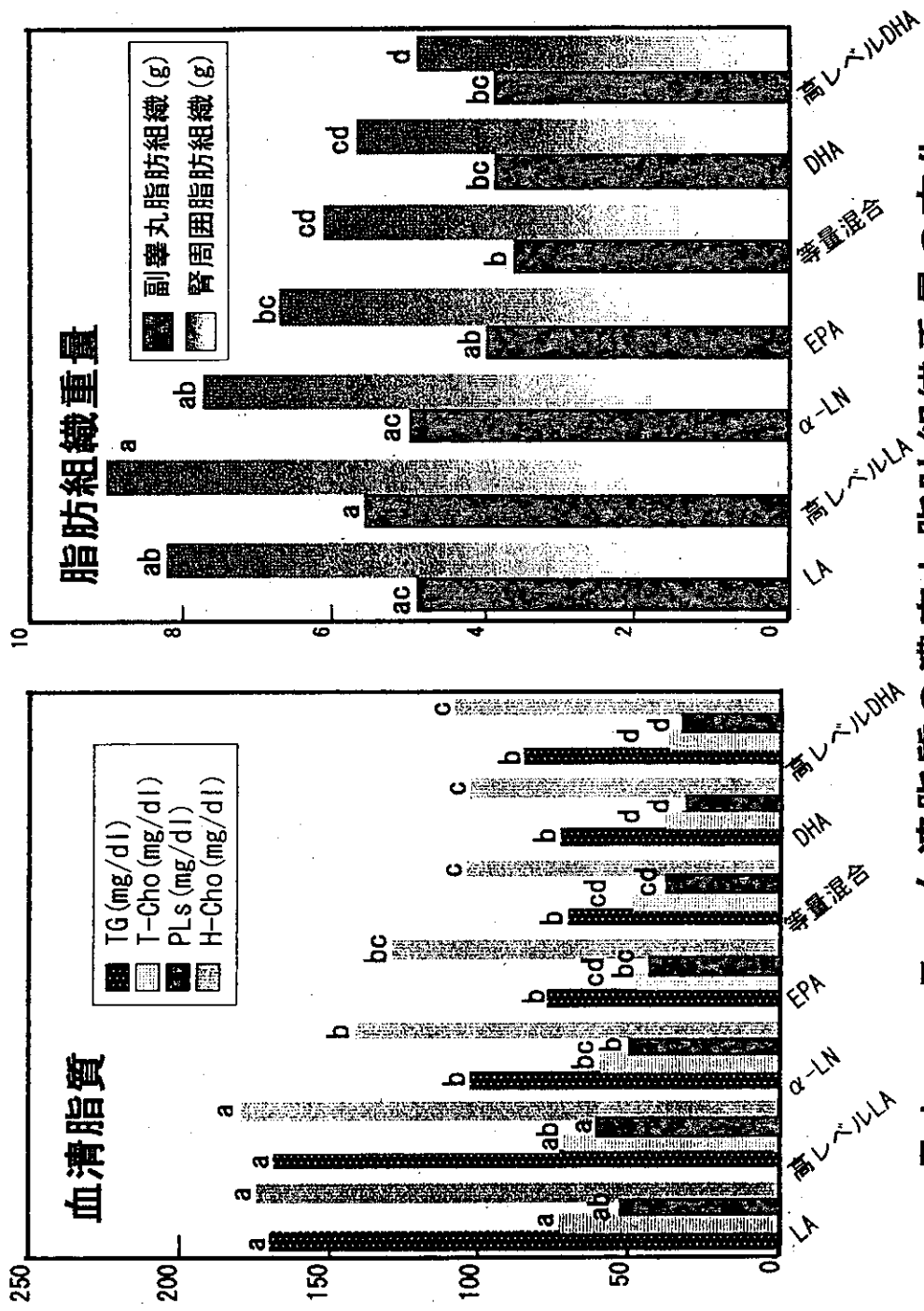


Fig. 7 血清脂質の濃度と脂肪組織重量の変化

年半に相当する事になる。

血清は、TBA値と水溶性蛍光物およびVEについて測定を行った。血清過酸化脂質の生成をみてみると、DHAの最大投与により有意に増加し、対照群と比べて約2倍の値が得られた。この時、抗酸化成分であるVEは、TBA値とは逆にDHAの投与レベルの増加に伴い減少している。対照群と比べてDHA最大群では2倍強の著しい減少が見られた。このVEの減少は、過酸化脂質の生成抑制に作用するとき分解・消費されたためと考えられる。血清のTBA値は、DHA最大群でのみ有意に増加したが、血清のVEはDHA 3.1en%群で既に有意に減少しているので、3.1en%群で過酸化脂質の増加がみられなかったのは、VEの抗酸化作用が効果的に作用した結果と考えられる。従って、過酸化脂質生成の基質になりやすいDHAが多量に存在するDHA最大群では、過酸化脂質の生成速度が速く、VEの抗酸化作用が追いつかなかったために有意に増加したと推測される。血清では、ルチンに過酸化脂質の生成抑制傾向が認められ、対照群と有意な差がなくなっていた。ルチンによる過酸化脂質生成抑制がみられたのは、分析した中では血清だけであった。ルチンの脂質過酸化反応抑制効果はin Vitroで良く知られているが(15)、ルチンが天然に存在する時はそのフラバン核に4個の水酸基とグルコースを結合させており、水溶性である。これが腸管で加水分解されて、グルコースを遊離し、脂溶性のアグリコンとしてリポタンパク質に結合して、血漿中に存在すると考えられている(15)。しかし、水酸基を4個持つために、水溶性の性質も合わせ持って血漿中に存在している。血清の過酸化脂質がどこで生成されるかは議論の残るところであるが、もし血液中で生成するとするならば、その生成の場は両親媒性の場であると考えられる。従って、両親媒性の性質を合わせ持つルチンが、過酸化脂質の生成を抑制するように働き得たのではないだろうか。一方、組織における過酸化脂質生成の場は生体膜という比較的脂溶性の強い場であり、そこでルチンが抗酸化性を発揮するためには、そこまで到達する必要がある。しかし、水溶性が比較的強いために到達しにくいと考えられ、組織で十分に抗酸化性を発揮できなかったのはこうした理由によるのかもしれない。そのメカニズムの詳細は、今後の研究の進展を待つことになる。

肝臓での過酸化脂質生成をみてみると、共役ジエン量(ミクロソームについてのみ示した)、ケミルミネッセンス強度、TBA値全てにおいてDHAの投与により増加がみられた。肝臓ミクロソームの共役ジエン量をみてみると、タンパク質当たりではDHA最

大群で増加傾向にはあるものの、有意な変化は認められなかった。しかし、単位重量当たりで見るとその増加は著しく、対照群に対してDHA最大群で約2倍の量を示していた。従って、単位タンパク質当たりで差がみられなかったのは、DHAの投与により小胞体タンパク質の生合成が高まったためと考えられる。

ミクロソームには細胞膜が多く存在しており、細胞膜の構成成分は主に脂質とタンパク質である。また、ミクロソームの脂質過酸化反応には電子伝達系の酵素が数多く関与している。肝ミクロソームによる脂質過酸化の活性は、肝ミクロソームの不飽和脂肪酸の含量に左右されるという報告(16、17)、そして脂肪酸の中ではDHAの含量と正相関するという報告(18)もあり、今回の肝臓総脂質脂肪酸で得られた結果をみても、過酸化脂質の生成が活性化されていると考えられる。DHAの投与によりミクロソームにおいて、DHAのレベルが非常に高まることは既に報告している(7)。

肝臓の過酸化脂質生成におけるDHA投与レベルに伴う増加は、共役ジエン量、ケミルミネッセンス強度、TBA値のレベルを比で表わし、総脂質脂肪酸組成より算出したP-Indexを比で現わしたものの変動を比較した際に(Fig.1)、共役ジエン量とケミルミネッセンス強度はP-Indexから予測されると同程度の増加がみられた。しかし、TBA値においてはP-Indexから予測される程には高まらなかった。過去の若齢ラットでの結果では、いずれの測定項目においてもP-Indexから予測される程には過酸化脂質の生成は高まらないという結果を得ている。今回の結果は、成熟ラットでの肝臓の過酸化脂質生成の過程において、脂質過酸化反応を初期段階に抑制し、二次生成物形成までの反応を促進させなかったと考えられる。この結果は成熟ラット特有のものと考えられる。この抑制のメカニズムの一つとして考えられるスカベンジャー成分についてみてみると、VEがDHAの投与レベルの増加に伴い著しく減少していた。 α -トコフェロールは脂質ペルオキシラジカルと反応して、 α -トコフェロキシルラジカルとなり、脂質過酸化反応の連鎖反応を初期の段階で停止させる。Scarpaら(19)は、 α -トコフェロキシルラジカルがAsAによってVEに再還元されることを明らかにした。また、この時生成されるデヒドロアスコルビン酸ラジカル中間体は、GSHによってAsAに再還元される(20)。従って、これらの3成分は抗酸化物質として重要な役割を果たす。VEの抗酸化能を高めるAsAは、過酸化脂質生成が有意に増加した最大レベルのDHA投与群で増加していたことから、VEの減少を抑制し、VEによる過酸化脂質の生成を抑制してい

るという一連の流れが考えられる。また、G S Hレベルには有意な変化は観察されなかったが、肝臓はそのレベルが分析した組織の中では最も高く維持され、このこともV Eの抗酸化性を高める要因になっていると考えられる。A s AやG S Hにはスーパーオキシドラジカル、ヒドロキシルラジカル、アルコキシルラジカルとそれぞれ速やかに反応し(21)、脂質過酸化反応を抑制するメカニズムもある。こうした一連の変化が総合されて、肝臓においては、脂質過酸化反応が初期の段階にとどまり、T B A値がP-I ndexから予測される程には上昇しなかったものと考えられる。

一方、G S H·P xはG S Hを基質として有機過酸化物をそのアルコール体に変換することにより還元的に分解し、組織や赤血球膜の損傷を防いでいる。肝臓のG S H·P x活性は最大レベルのD H Aの投与によりむしろ減少傾向を示したことから、過酸化脂質の生成抑制に対しあまり関与してないと考えられる。今回測定したG S H·P xは、セレン依存性の主に可溶性画分に存在する酵素である。従って、膜リン脂質中のsn-2位に多いとされるD H Aが酸化された場合、ホスホリパーゼA₂によって切り出されて初めてG S H·P xによって還元される。しかし、D H AはホスホリパーゼA₂の基質にはなりにくい(22)ために、G S H·P x活性は変動しにくかったものと思われた。

腎臓についてしてみると、過酸化脂質はいずれの測定項目にあってもD H A投与レベルの上昇に伴う増加は観察されなかった。この時スカベンジャー成分をみると、D H A最大群でV Eの有意な減少がみられるが、減少の程度は肝臓と比へれば著しく小さかった。D H A最大群では、この時A s AとG S Hの有意な増加がみられた。このことは、D H Aの急激な増加に伴う過酸化脂質の上昇反応に対して、これを抑制すべくA s AとG S Hの生合成を高め、それによりV Eの抗酸化性を高めるための生体の適応反応と考えられる。これらの結果から、腎臓では過酸化脂質スカベンジャー成分の効率的な変化により、脂質過酸化を抑制できたと考えられる。また脂肪酸組成でも、D H Aの投与により肝臓程大きな変化はなかったことも、過酸化脂質の生成を増加させない大きな要因の一つであろう。若齢ラットに今回とほぼ同レベルのD H Aを投与した時には、腎臓でわずかではあるが、有意に過酸化脂質の生成が増加することを観察している。この時には、腎臓の脂質へのD H Aの取り込みが、今回の成熟ラットに比へれば1.5-1.6倍程度まで上昇していた。ただし、P-Indexは1.1倍程度までしか上昇していなかった。これらのことを考えると、二重結合が多く、最も過酸化脂質の生成の基質になりやすいD H Aの変化が過酸化

脂質生成の面では重要なことを示唆している。

脳をみてみると、脳では投与するDHAレベルが増加しても過酸化脂質はほとんど変化がないか、むしろ共役ジエン量のように減少していた。VEの変化もほとんどなかったが、他の臓器と異なりAsAが増加し、しかも非常に高いレベルに維持されていた。従って、腎臓と同様に脂質過酸化に対し、スカベンジャー成分、特にAsAがVEとの協調作用で過酸化脂質の生成抑制に効果的に作用したと推測できる。また脂肪酸組成をみても、脳ではどの脂肪酸においてもDHAの投与による変化がほとんどみられなかった。極めてわずかにDHAが増加し、AAが減少した程度であった。ただし、脳のDHAはその組成および量ともに高い値に維持されているので、AsA量が高く維持されることは脳の抗酸化能を維持する上で大変重要と考えられる。

腎臓、辜丸、脳の過酸化脂質レベル比とP-Index比の変動をみてみると(Fig.1)、過酸化脂質の生成はP-Indexの変動とほぼ一致しており、P-Indexから予測される程には高まらなかった若齢ラットでの結果と異なり、この結果も成熟ラット特有のものと考えられる。ただし、成熟ラットでは飼料から組織へのDHAの取り込みが若齢ラット程ではなく、従って、脂肪酸組成中のDHAの増加も大きくなく、その組成値から算出するP-Index値も高まらないことがこうした変化と関係するかもしれない。いずれにしても、これらの組織は、成熟ラットでは過酸化脂質が増加しにくいことが明らかとなった。

心臓においては、過酸化脂質の測定は、共役ジエン量とTBA値について行った。心臓の脂肪酸組成は、DHAの投与レベルの増加に伴い、組成に非常に大きな増加がみられた。DHA0.5en%群で既に肝臓での組成%を上まっていた。しかし、投与するDHAレベルの増加に伴う過酸化脂質の増加はほとんどみられなかった。VE含量が、今回測定を行った5つの組織の中では最も高いことがその理由であろう。ただし、AsAとGSH含量は一番低かった。しかし、VEの減少程度は肝臓程には大きくはなく、DHA最大群にのみ有意な減少が認められた。心臓では、AsAやGSHは非常に含量は低い、GSHに他の組織ではみられなかった変化が観察された。すなわち、対照群以外のDHAを摂取した全ての群において有意な増加が認められたことである。脳におけるAsAの変化と大変似ている。この結果はVEの減少を抑制した要因の一つとして重要と考えられる。しかし、TBA値は肝臓と同様に高い値を示していた。やはり心臓では他の組織に比べDHAの組成が大きいことと、酸素の出入りが非常に多い組織であるから

であろう。

心臓の過酸化脂質レベル比とP-Index比の変動をみる (Fig. 1)、P-Index値から予測される程には生成が高まらなかった。組織単位重量当たりのVE含量が高いことが、脂質過酸化反応を抑制している大きな要因であると考えられる。これまで心臓はVE欠乏に近い状態で共役ジエンは著しく高まるが、TBA値は高まりにくい組織であることを観察している。DHAの組成が高いにもかかわらず、脂質過酸化反応の進行を抑える過酸化脂質のスカベンジャー成分のみでは説明できない何らかの未知の抗酸化機能が存在するのかもしれない。今後とも検討する必要がある組織といえよう。

これまで、若齢ラットと成熟ラットで得られた結果に大きな違いのあることを認めた。成熟ラットでは、組織の過酸化脂質生成に対してかなり抵抗性があるようである。この大きな要因の一つは、組織脂質への過酸化脂質生成基質になりやすい、例えば、DHAのような多価不飽和脂肪酸の取り込みとその代謝回転が、成熟ラットでは成長期の若齢ラット程には大きくないことが上げられよう。しかし老齢ラットではさらに脂質の代謝回転は遅くなるにもかかわらず、体全体の過酸化脂質生成のメルクマールとなる呼気中のエタンやペンタンの生成増加が報告されている (23)。この場合、それらの生成が高まるのは、28-30ヵ月齢になってからとされており、かなり老化が進んだ状態である。DHAは記憶学習やボケとの関連も取りざたされており、老齢ラットでの検討は今後の研究課題として興味深い。

本研究では、フラボノイド化合物の一つルチンによる変化は、血清を除いてほとんどみられなかった。近年、フラボノイド化合物の抗酸化作用に強い関心が寄せられており、食事からのフラボノイド摂取量は25mg程度に見積もられている (15)。フラボノイドの仲間であるカテキン類を豊富に含む緑茶の飲用とガン抑制に関する疫学調査は有名であるが、オランダの疫学調査では高齢者のフラボノイド摂取量と冠状動脈疾患に明らかな逆相関がある事も示された (15)。さらに、フラボノイドを投与したラットでは、血漿の抗酸化活性が強まることも確かめられた (15)。これは前述したような両親媒性の理由によるものであろう。

実験1で述べたように、ラットでの一ヶ月の投与期間は、人に外挿すると約二年半にも相当すると考えられ、このような長期間に渡って高レベルのDHAを投与したにもかかわらず、LPOの生成は高まりにくく、組織障害も起きていないことを考えると、たとえ、高レベルのDHAであっても生体内ではかなり安定に、

酸化から守られて存在していることを想像させる。しかし、さらに長期間摂取し続けても安全かどうかは不明であるし、老化に伴って、脂質過酸化反応により生成するリポフシンのような物質が少量ずつ蓄積されて、生体に有害な影響を起し得る可能性もあながち否定は出来ない。他の脂肪酸と比べれば、DHAが酸化されてLPOを生成しやすいことは事実であり、生涯に渡り魚を食べ続ける状況を考慮するならば、安全性の観点からは、LPOの生成が少ないにこした事はない。

従って、こうした視点に立って実験2では、n-3系脂肪酸の α -LN、EPA、DHAの投与によって組織過酸化脂質の生成を著しく高めず、なおかつ、多様な生理活性を引き出せるような食餌脂質中のn-3系脂肪酸の組み合わせについて、安全性の観点からは過酸化脂質の生成の面から、そして生理的有効性の面からは血清脂質の改善作用の面から検討した。この際、実験動物としては脂質過酸化反応に対する感受性の高い若齢ラットを用いて検討することにした。こうすることで、成熟動物では、摂取による安全性の許容範囲はさらに広いことが十分に類推されるからである。

血清はヒドロペルオキシド量(LPO)、TBA値、水溶性蛍光物質、GOT、GPT活性及びVE量について測定を行った。血清過酸化脂質の生成を見ると、Fig.2に示すように、ヒドロペルオキシド量、水溶性蛍光物質共に、高レベルDHA群でのみ有意に増加し、TBA値はDHA群と高レベルDHA群で3倍強の著しい増加が見られた。指標として測定した中で、脂質過酸化反応の中間から後半段階の生成物を測定対象としているTBA値は、DHA群と高レベルDHA群での値には差はないものの、食餌脂質中のDHAレベルの増加に伴って値が増加しており、脂質過酸化反応の初期段階で生成されるヒドロペルオキシドが高レベルDHA群でのみ有意に増加していることと考え合わせると、初期段階の脂質過酸化反応は大変速く進行しているように思える。また、水溶性蛍光物質は、脂質過酸化反応が十分に進行した後に生成が高まるので(24)、組織のリポフシンのような脂質過酸化反応の終末段階の生成物を測定対象にしていると考えられるが、この値は、高レベルDHA群でのみ増加していた。今回、組織のリポフシンは測定できなかったが、血清の水溶性蛍光物質が高レベルDHA群で有意に増加しているため、この群では、組織においてリポフシンの生成が高まっていることが十分に予想される。

以上の血清過酸化脂質生成の変化からは、脂質過酸化はDHA群と高レベルDHA群で有意に高まっていると考えられ、過酸化

脂質の生成抑制の面からはDHAのレベルを余り高くしない方が良く、等量混合群以下の飼料脂質の不飽和度に抑えておくことが推奨される。

過酸化脂質の生成とは逆に抗酸化成分であるVEの濃度は、Fig. 5に示すように、n-3系脂肪酸を投与したすべての群で有意に減少し、高レベルDHA群が最も低い値を示した。しかし、血清のVEレベルは血清脂質レベルの影響を受けることから(25)、血清脂質あたりでVEのレベルを表すと、高レベルDHA群でのみ有意に低下していた。VEは進行する脂質過酸化を抑制することで分解、減少するので、過酸化脂質レベルと α -トコフェロール濃度は逆の関連性がある(26)。従って、血清過酸化脂質が有意に増加していると考えられるDHA群では、高レベルDHA群ほどには過酸化脂質の生成は高まっていないのかもしれない。

一方、GOTとGPTの活性はFig. 2に示すように、共にほとんど大きな変化がなく、GPT活性で等量混合群に有意差が見られるが、むしろ活性は低下しており、また、その差はわずかであった。血清のtransaminaseレベルは正常なときは低いが、激しい組織破壊の後ではこれらの酵素は血清中に遊出してくる。従って、血清の過酸化脂質レベルが最も高かった高レベルDHA群でさえ、組織実質細胞の傷害が起きるほどには脂質過酸化反応は亢進していなかったことを示している。

肝臓における過酸化脂質の生成をみると、Fig. 3に示すように、共役ジエン量(ホールホモジネートとマイクロソーム)、ケミルミネッセンス強度、TBA値ではEPA群やDHA群及び高レベルDHA群で増加ないし増加傾向が見られ、特にTBA値は、n-3系脂肪酸を投与したすべての群で有意に増加し、DHA群と高レベルDHA群での増加が著しかった。共役ジエン量とケミルミネッセンス強度と比較すると、TBA値の比が対照群に対し、各群で食餌脂質脂肪酸の不飽和度に応じて良いレスポンスを示していることから、初期段階の反応は速やかに進行していると考えられ、若齢ラットを用いたこれまでの結果と同様の結果を得た。

肝臓は動物体内におけるリン脂質代謝の最も活発な組織であり、ラット肝臓の主なリン脂質はPC(約58%)で次いでPE(約20%)となっている(27)。肝臓でリン脂質の分子種が合成されると、DHAはホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルコリン(PC)、トリグリセリド(TG)の順で多く取り込まれる。また、DHAは膜のリン脂質のsn-2位に結合し、DHAを結合したPEは優先的にメチル化されてPCとなる。肝臓の各リン脂質中のDHAの割合は、PEで最も高く、さらに肝臓の

PE及びPCの脂肪酸組成の変化、すなわちP-Indexの変化は過酸化脂質のレベルと関連があるとする報告がなされている(26)。従って、今回の肝臓で得られた過酸化脂質レベルの結果を見ると、全体的にDHAレベルの高い群での過酸化脂質レベルが高まっております、これはLAと比べて5倍も酸化されやすいDHA(11)が肝臓の膜リン脂質、とくにPEやPCに多く取り込まれているために過酸化脂質レベルが高まったと考えられる。in vitroでの肝臓ミクロソームの脂質過酸化反応は、ミクロソーム脂質脂肪酸組成の中ではDHAと正相関するとの報告があり(18)、DHAの取り込みが高まれば、過酸化脂質の生成は増加することになる。そうした意味でも、本研究において、肝臓で過酸化脂質レベルを著しく高めないn-3系脂肪酸の組み合わせは、 α -LNリッチの群の組み合わせと言えるであろう。また、TBA値を除けば、等量混合群も過酸化脂質の生成は α -LN群と同程度であった。

肝臓のVEレベルは、Fig.5に示すように、n-3系脂肪酸を投与したすべての群で減少し、高レベルDHA群で最も低い値を示していた。水溶性抗酸化成分であるASA及びGSHでは、EPA群のGSHのみが有意に増加していたが、対照群との差はそれほど大きくはなく、全体的に見れば、n-3系脂肪酸の投与によっても大きな変化が見られなかったといえるであろう。

VE、ASA、GSHの3つの抗酸化成分はVEレベルの維持に相互に関係があり、トコフェロキシルラジカルはASAとの反応により、トコフェロールへ再還元され(19)、この反応で形成されたデヒドロアスコルビン酸はGSHとの反応により、再びASAへ還元される。このサイクルは、組織過酸化を抑制するメカニズムとして重要である。ASAとGSHはほとんど大きな変化は見られなかったが、肝臓ではそれらのレベルが高く維持されており、VEの抗酸化性を高め、過酸化脂質の生成を抑制する要因になっていると考えられる。

腎臓の過酸化脂質レベルをみると、Fig.3に示すように、高レベルDHA群でケミルミネッセンス強度が増加傾向にあるが有意差はなく、全体的に大きな変化がなかった。過酸化脂質が対照群と比較して有意に増加したのは、EPA群と等量混合群及びDHA群のTBA値であるが、この場合も対照群と比べて1.1倍程度の増加にすぎず、腎臓全体としては、過酸化脂質の生成はほとんど高まっていなかった。従って、腎臓は肝臓と比べて過酸化脂質の生成が増加しにくいと思われる。この時の抗酸化剤の変化を見ると、Fig.6に示すように、VEの減少程度は過酸化脂質と同様にわずか

で、DHA群と高レベルDHA群でのみ有意な減少が見られ、水溶性抗酸化物質であるAsAにも大きな変化が見られなかった。GSHはEPA群と高レベルDHA群で有意に増加していたが、その差はわずかであった。全体的にみて、良いレスポンスを示していたTBA値については、肝臓では高レベルDHA群で有意な増加を示したが、腎臓の高レベルDHA群は、対照群とほぼ同じ値を示した。これは抗酸化成分が有効に作用したためかもしくは、腎臓は血清脂質からDHAを取り込む活性が低いためか、あるいはDHAからEPAへ逆変換する活性が高いこと(7)等がその要因として考えられる。いずれにしても、腎臓については、いずれのn-3系脂肪酸の組み合わせ、あるいは高レベルDHAの投与でも、過酸化脂質は生成しにくい組織といえる。

睾丸をみてみると、Fig. 4に示すように、共役ジエン量とTBA値がDHA群でのみ有意に増加していたが、ケミルミネッセンス強度ではDHA群で増加傾向にあるものの統計的に有意な変化が見られなかった。さらに睾丸の共役ジエン量、ケミルミネッセンス強度及びTBA値は測定したすべての組織の対応する群どうしで比較してみて、最も値が低く、睾丸は過酸化脂質生成の感受性が著しく低い組織であると考えられる。睾丸はn-3系脂肪酸のレベルが増加しにくいこと(7)と関係していると思われる。一方、VEはFig. 6に示すように、n-3系脂肪酸を投与したすべての群で減少しているが、等量混合群、DHA群、高レベルDHA群でのみ有意な減少がみられた。VEについては、対照群もLA群より有意に低下していた。また、VEの抗酸化能を高めるAsAは、分析対象とした組織の対応する群どうしで比較すると、最も高く維持されていた。GSHは肝臓ほどではないが腎臓と同程度に維持されていた。従って、睾丸では、AsA及びGSHがVE(トコフェロキシラジカル)の還元再生反応を高めて抗酸化機能を亢進し、過酸化脂質の生成を抑制していると考えられ、若齢ラットを用いたこれまでの結果を再確認した。以上のことから、睾丸についても腎臓と同様に、いずれのn-3系脂肪酸の組み合わせ、あるいは高レベルDHAの投与でも、過酸化脂質は生成しにくい臓器といえる。

心臓についても、Fig. 4に示すように、共役ジエン量はEPA群、等量混合群、DHA群、高レベルDHA群のみで増加したが、TBA値には大きな変化がみられず、高レベルDHA群でのみ増加した。従って心臓では、脂質過酸化反応が初期段階の反応からさらに進行するのを抑制するメカニズムがあるように思われる。また、心臓は循環血液から効果的にDHAを取り込むことや、DH