

ラットの血液凝固系および血小板凝集に対するイワシ油および綿実油の繰り返し経口投与の効果

松下映夫*¹・井上晋一*¹・田中竜介*¹

Effects of Repeated Oral Administration of Sardine Oil and Cotton Seed Oil on Blood Coagulation and Platelet Aggregation in Rats

Teruo Matsushita*¹, Shin-ichi Inoue*¹ and Ryusuke Tanaka*¹

Effects of repeated oral administration of sardine oil and cotton seed oil on blood coagulation and platelet aggregation in rats were examined. Treatments of rats with 3.0g/kg/day of sardine oil and cotton seed oil for 28 days changed in the fatty acid composition of lipids in their liver and blood. The levels of n-3 and n-6 unsaturated fatty acids showed the tendency to increase and decrease in the rats treated with sardine oil (sardine oil group) in comparison with control rats. Meanwhile, the change in fatty acid composition into the opposite direction was observed in the case of rats treated with cotton seed oil (cotton seed oil group). Treatments of rats with sardine oil and cotton seed oil changed in the parameters of thromboelastogram reflecting that whole blood coagulation system was slightly inhibited and enhanced, respectively. These results support that feeding of fish oil including n-3 unsaturated fatty acids especially eicosapentaenoic acid (EPA) demonstrated anti-thrombus effect due to change in fatty acid composition of lipids. In the present study, adenosine 5'-diphosphoric acid (ADP)-induced platelet aggregation and inhibition of platelet aggregation by a prostaglandin I₂ derivative were not influenced by the treatment of rats with sardine oil or cotton seed oil, unexpectedly. Further examination should be needed to clarify the anti-thrombus effect of fish oil.

Key words : Arachidonic acid, Blood cells, Collagen, Fish oils, Haematology.

1 緒 言

魚油はエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などのn-3系高度不飽和脂肪酸を豊富に含むため、魚食は虚血性心疾患など血栓性の疾患の予防はもとより多岐にわたる健康機能が期待されている¹⁾。魚油に含まれるEPAに関しては、その高純度のエチルエステル体が循環器系や高脂血症の医薬品として応用されている^{2,3)}。EPAの抗血栓作用を説明する作用機序の一つとして血小板凝集能抑制作用が知られおり、EPAの摂取により血小板膜のアラキドン酸含量が減少しEPA含量が増加することが関係しているとされている³⁻⁷⁾。すなわち、アラキドン酸から生じるプロスタグランジン類の一つであるトロンボキサンA₂は血小板凝集を強く惹起するが、EPAから生じるト

ロンボキサンA₃の凝集惹起作用は非常に弱い作用しか示さないことや⁸⁾、EPAがアラキドン酸の代謝に影響を与えることによりトロンボキサンA₂産生が抑制される⁸⁾ために、EPAの抗血栓作用が発現すると考えられている。この様に、血小板凝集に係わるEPAの作用とアラキドン酸カスケード/プロスタグランジン系は密接な関係にある。一方、EPAの摂取や投与により、赤血球変形能の上昇や血液粘度の低下などがみられ、血液レオロジーの改善作用が報告されている^{4,9)}。この血液レオロジーの改善作用にも赤血球膜に含まれるEPA含量の増加が関係している¹⁰⁾とされ、EPAの体内への摂取は血液凝固系にも影響を与えると考えられる。

フィブリン (繊維素) がその網目状構造に赤血球を巻き込んで血液の凝塊を作る血液凝固反応は非常に複雑で多段

2005年8月17日受付. Received August 17, 2005.

* 1 水産大学校食品科学科 (Department of Food Science and Technology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagata-honmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).

階の過程を経て進行するが、血小板凝集もその多段階の過程の一部に関与している。EPAの体内摂取により出血時間が延長することが報告されているが^{11,12)}、その多くは上述したEPAの血小板凝集抑制作用と関係づけて説明されており¹³⁻¹⁶⁾、EPA摂取の血液凝固系に対する直接的な影響についてはその詳細はあまり知られていない^{17,18)}。トロンボエラストグラム測定装置は血液凝固の全過程を自動的に測定し、凝固系パラメーターを求めて凝固系の状態を総合的に評価するもの^{19,20)}である。一般に血液凝固系の検討には、1) 血液が内因系や外因系の刺激を受けて凝固反応を開始するまでの時間を測定する方法や、2) 血液凝固反応の進行時間を測定する方法などが用いられるが、トロンボエラストグラム法は、上記1), 2)に加えて、凝固反応の進行速度や凝固反応により生成した凝塊(血餅)の強度(堅固さ)も加えた凝固の全過程のパラメーターを測定し、血液凝固系を総合的に把握できる優れた方法である。しかしながら、EPAを含め魚油の投与による血液凝固系への影響をトロンボエラストグラムで検討した報告は今までみあたらない。

一方、アラキドン酸より生じるプロスタグランジン類の一つにプロスタグランジンI₂(PGI₂)があり、血管内皮細胞で産生されるPGI₂は血小板凝集を抑制する役割をしている。実際に、正常の個体から得られた血液では、コラーゲンやADPなどの凝集惹起物質による血小板凝集反応はPGI₂やその安定誘導体である Beraprost Sodium (BPS) の処理により抑制される。しかしながら、EPAを投与した個体の血液において、PGI₂の血小板凝集抑制作用がどの様に影響を受けるかについては検討されていない。

本研究では、ラットを用いて、EPAなどn-3系高度不飽和脂肪酸を豊富に含む魚油であるイワシ油のくりかえし投与が血液凝固系および血小板凝集系に影響を与えるか、そして、PGI₂が存在するとそれらが影響を受けるかについて、非投与(無処置)のラットおよび綿実油投与のラットの場合と比較しながら、トロンボエラストグラム測定装置と血小板凝集能測定装置を用いて検討したので報告する。

2 材料および方法

2.1. 試薬

イワシ油(山桂産業(株), 大阪市中央区), 綿実油(MP Biomedicals, Aurora, OH, USA), ツイーン60(和光純薬, 大阪市中央区), adenosine 5'-diphosphoric acid (ADP) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA), 3.8%クエン酸ナト

リウム溶液(SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA)はそれぞれ括弧内に示した会社より購入したものをを用いた。PGI₂の効果の検討にはその安定な誘導体である Beraprost Sodium (BPS)^{21,22)}を用いた。BPSは東レ(株)(東京都中央区)で合成されたものを使用した。その他の試薬・溶媒等は特級のものを使用した。

2.2. 実験動物

Wistarラット(オス, 6週齢)を九動(株)(佐賀県鳥栖市)より購入し、動物室(室温23-26℃, 湿度40-60%, 照明時間7:00-19:00)で1週間予備飼育した後、実験に供した。固形飼料(CRF-1, (株)ケービー・オリエンタル, 佐賀県鳥栖市)と水道水は自由に摂取させた。

2.3. イワシ油および綿実油の投与

イワシ油または綿実油と12%ツイーン60含有生理食塩水を1:2の割合で混合して乳化液を作成し、3.0g/kgの用量で1日1回、経口ゾンデ付き注射筒を用いて強制的に胃内投与を行い、それを28日間継続した。最終投与の翌日に、血液および肝臓を採取し測定に供した。

2.4. 採血と肝臓の摘出

ラットをエーテル麻酔下で頸動脈にポリエチレンチューブ(内径15mm)のカニユーレを挿入し約13-15mlの血液を試験管内に採取した。試験管内に1/9容の3.8%クエン酸ナトリウム含有生理食塩水を加えて血液の凝固を防止した。血液中の脂肪酸組成の測定用として、血液1.0mlを試験管に分取し、クロロホルム/メタノール混液(2:1)4.0mlを加えて激しく振とう混和した後、測定時まで冷凍保存(-30℃)した。残りの血液は室温に置き、血球細胞数等の測定、血小板凝集能の測定、トロンボエラストグラムの測定に供した。また、肝臓を摘出し生理食塩水で洗浄した後、脂肪酸組成測定時まで冷凍保存(-30℃)した。

2.5. 血球細胞数等の測定

ラットの血液(全血)40μlより、動物用自動血球計数装置(PCE-170型)(エルマ販売(株), 東京都文京区)を用いて、赤血球数、白血球数、血小板数、ヘモグロビン量を測定した。

2.6. トロンボエラストグラム^{19,20)}の測定

ROTEMトロンボエラストグラム測定装置(ペンタファーマ社, ドイツ)を用いた。この装置では、血液(37℃に加

温)に差し込まれたプラスチック製のピンが一定速度で左右に回転しながら回転するため、容器であるカップと回転するピンとの間に存在する血液に“ずり応力”が加わり、この刺激が引き金となって十分な濃度のカルシウムイオンの存在下で凝固反応が開始・進行し、血液が凝固した凝塊(血餅)が最終的に形成される。この一連の反応がトロンボエラストグラムとして記録され、各種の凝固パラメーター、即ち、clotting time (CT:凝固反応時間), clot formation time (CFT:凝塊形成時間), maximum clot firmness (MCF:凝塊最大強度), clot formation rate (CFR:凝塊形成速度)が測定される²⁰⁾。

この装置に装着したプラスチック製のカップに分取した検体血液(全血)300 μ lにCaCl₂(最終濃度=13.3mM)を添加し凝固反応を開始させ、トロンボエラストグラムを得た。また、一部の実験ではPGI₂の安定誘導体であるBPSの溶液30 μ lをあらかじめ検体血液に加え2分間プレインキュベーションした後、同様にCaCl₂を添加し凝固反応を開始させた。

2.7. 血小板凝集能の測定

遠心分離機(久保田製作所製, KN-70)により、血液を約1100 rpm (160 x g)で10分間遠心分離し、上層より多血小板血漿 (PRP)を採取した。血小板凝集能はレーザー散乱光検出器を装備した血小板凝集能測定装置²³⁾であるPA-20(興和(株), 名古屋市)を用いて37℃で測定した。調製した300 μ lのPRPが入ったキュベットを機器に装着し、マイクロピペットで3 mM CaCl₂を添加(3 μ l)した後、6~60 μ Mのadenosine 5'-diphosphoric acid (ADP)を添加して凝集を惹起させた。また、PGI₂の安定誘導体であるBPSの凝集抑制効果を測定する実験では、ADP添加2分前にBPS(3.3~100nM)を添加し、ADPによる凝集反応への影響を調べた。

2.8. 血液および肝臓の脂肪酸組成の測定

2.8.1. ラット肝臓の脂質の抽出:

ラット肝臓2gを精秤し、クロロホルム/メタノール混液(2/1)を30ml加え、小型ホモジナイザー(IKA WORKS, INC社製, T25 basic)を用いて攪拌後、水4mlを加え、遠心分離機(久保田製作所製, KN-70)を用いて2,500rpmで10分間遠心分離を行った。上層を除去後、下層をナシ型フラスコにとり、エバポレーターで溶媒を除去した後、クロロホルム/メタノール混液(2/1)を加えて10mg/mlに調整し、これを肝臓脂質溶液とした。

2.8.2. ラット血液の脂質の抽出:

採取した血液1mlにクロロホルム/メタノール混液(2/1)を4ml加えボルテックスで攪拌した後、凍結保存しておいた検体を室温に戻し溶解した。遠心分離機を用いて2,500rpmで10分間遠心分離を行った。上層を除去後、下層をねじ付き試験管に移し、遠心濃縮機で溶媒を濃縮し、これを血液脂質とした。

2.8.3. ガスクロマトグラフィー (GC) による脂肪酸分析:

肝臓脂質10mgおよび血液脂質全てをネジ付き試験管に入れ、2.8%ナトリウムメトキシド500 μ l, ベンゼン100 μ l, を加え50℃で20分間加熱した。加熱後、酢酸50 μ l, 蒸留水2ml, ヘキサン4mlを加え、1500rpmで5分間遠心分離を行った。遠心後上層を別の試験管に移し、遠心濃縮機で溶媒を濃縮後、アセトン100 μ lを加えて溶解し、そのうちの2 μ lをGC (GC-14A=島津製作所, 京都市)による分析に供した。GCの分析条件は以下のとおりである。キャリアーガスはヘリウムを使用し、流速0.8ml/minで行った。インジェクターの温度は250℃, 検出器の温度は350℃, カラムの昇温プログラムは初期温度150℃, 昇温勾配3℃/min, 最終温度220℃で3分間保持した。検出は水素炎イオン化検出器で行った。

2.9. 飼料 (CRF-1), イワシ油, 綿実油中の脂肪酸組成の測定

飼料からの脂質の抽出は、前述(2.8.1.)の肝臓中の脂質の抽出と同様に行ない測定試料とした。イワシ油および綿実油はそのまま一部を採取し測定試料とした。これらの脂肪酸分析は前述(2.8.3.)と同様の方法でGCにより行なった。

2.10. 統計処理

比較する群間の等分散を確認し、*t*-検定を実施した。

3 結果

3.1. イワシ油および綿実油の28日間くりかえし投与の体重等への影響

イワシ油および綿実油を3.0g/kgの用量でくりかえし投与したときの、ラットの体重変化をFig. 1に示す。非投与(無処置)群に比べて若干イワシ油投与群の体重が大である傾向、そして綿実油投与群は体重が小である傾向にあっ

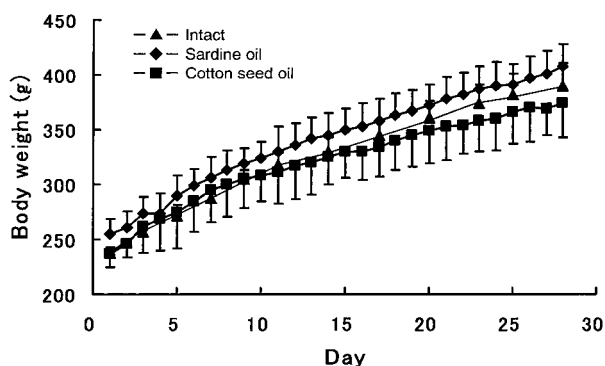


Fig. 1. Body weight of the rats administered orally with sardine oil or cotton seed oil.

Rats were divided to 3 groups. The first group of rats (N=5) was not treated as a control (Intact) and the other 2 groups of rats (N=4x2) were treated with 3.0g/kg/day of sardine oil or cotton seed oil for 28 days, respectively. Body weight of each rat was measured every day in the morning.

たが、それぞれの群間どうしには有意の差は認められず、すべての群でラットの体重は順調な増加曲線を示した。また、28日間の観察（目視）をとおして、体調不良のラットは出現しなかった。

3.2. イワシ油および綿実油の28日間くりかえし投与の血球細胞数等への影響

イワシ油および綿実油の28日間くりかえし投与終了後のラット血液中の白血球数、赤血球数、ヘモグロビン値および血小板数を測定した結果をTable 1に示す。イワシ油投

与群と非投与（無処置）群の間、イワシ油投与群と綿実油投与群の間、および綿実油投与群と非投与（無処置）群の間には差がみられなかった。

3.3. イワシ油および綿実油の28日間くりかえし投与のトロンボエラストグラムに対する影響

一般に、正常なラットのトロンボエラストグラムはFig. 2に示すようなグラフとして得ることができる。Fig. 2に示すように4つの凝固パラメーター即ち、凝固反応時間（CT）、凝塊形成時間（CFT）、凝塊最大強度（MCF）、凝塊形成速度（CFR）がトロンボエラストグラムの解析より得られる。

イワシ油および綿実油の連日投与終了後のラット血液の全血凝固系の状態について知るために、トロンボエラストグラム装置を用いて測定した。得られたトロンボエラストグラムの4つの凝固パラメーターについてまとめた結果を、Table 2に示す。非投与（無処置）群に比べて、綿実油投与群で凝固反応時間（CT）が有意に短縮し、イワシ油投与群では反対に延長する傾向にあった。綿実油投与群とイワシ油投与群の間では凝固反応時間（CT）において明らかな有意差が認められた。凝塊形成時間（CFT）は各群の間に有意な差は無かったが、綿実油投与群で短縮する傾向が大であった。凝塊最大強度（MCF）および凝塊形成速度（CFR）については差がみられなかった。

Table 1. Effects of repeated oral administrations of sardine oil or cotton seed oil on the blood cells counts and hemoglobin concentration in rats.

| Group (Treatment) | White blood cell ($\times 10^9/\mu\text{l}$) | Red blood cell ($\times 10^6/\mu\text{l}$) | Hemoglobin (g/dl) | Platelet ($\times 10^9/\mu\text{l}$) |
|-----------------------|--|--|-------------------|--|
| I (Intact) | 10.4 \pm 1.4 | 6.74 \pm 0.44 | 12.6 \pm 0.7 | 453 \pm 10 |
| II (Sardine oil) | 9.1 \pm 0.4 | 6.24 \pm 0.35 | 12.4 \pm 0.6 | 460 \pm 31 |
| III (Cotton seed oil) | 7.5 \pm 2.0 | 6.92 \pm 0.49 | 12.8 \pm 0.6 | 695 \pm 277 |
| II vs I | NS | NS | NS | NS |
| III vs I | NS | NS | NS | NS |
| II vs III | NS | NS | NS | NS |

Each result represents mean \pm standard deviation. NS means statistically not significant. Number of rats: Intact; n=5, sardine oil; n=4, cotton seed oil; n=4.

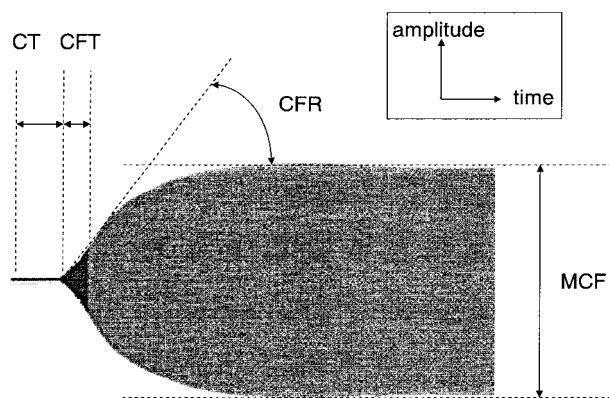


Fig. 2. A typical thromboelastogram of rat whole blood with continuous recording of clot formation and firmness after the addition of Ca^{2+} (13.3mM).

The following parameters are measured: coagulation time (CT) (sec), clot formation time (CFT) (sec), maximum clot firmness (MCF) (mm) and clot formation rate (CFR) (°). Horizontal length shows time and vertical length shows amplitude of clot firmness.

トロンボエラストグラムの測定時に PGI_2 の安定誘導体である BPS (100 μ M) を血液に添加しておいた場合には、添加しなかった場合に比べて凝塊最大強度 (MCF) が低下し、イワシ油投与群においてその低下幅が最も大であった。BPS が存在しない条件下では群間に差は認められないが、BPS 存在下において凝塊最大強度 (MCF) を比べた場合、イワシ油投与群において、非投与群との間および綿実油投与群との間に有意な差が認められた。

3.4. イワシ油および綿実油の28日間くりかえし投与の血小板凝集能に対する作用

イワシ油および綿実油のくりかえし投与終了後のラット血液の血小板凝集能について、多血小板血漿 (PRP) を調製して測定した。Fig. 3 に凝集惹起剤として ADP (2~60 μ M) を用いた時の凝集能の測定結果を示す。非投与 (無処置) のラットの血液において、2~20 μ M の ADP 添加により濃度依存的に血小板凝集が惹起され、20~60 μ M で凝集能はプラトーに達した。イワシ油投与群および綿実油投与群の血液においても、ほぼ同様に ADP による血小板凝集能が観察され、非投与 (無処置) のラットとの間には有意な差は認められなかった。

ADP (20 μ M) 刺激による血小板凝集に対して、 PGI_2 の安定誘導体である BPS (3.3~100nM) の抑制効果について検討した。非投与 (無処置) 群、イワシ油投与群、綿実油投与群の間ではほぼ同様の濃度依存性の BPS による凝集抑制作用が認められ、作用濃度や抑制効果において有意差は認められなかった (Fig. 4)。

3.5. イワシ油および綿実油の28日間くりかえし投与の肝臓および血液中の脂肪酸組成に対する影響

投与に用いたイワシ油および綿実油の脂肪酸組成の測定結果を Table 3 に示す。また飼料 (CRF-1) に含まれる脂質の脂肪酸組成についても Table 3 に示す。飼料中の脂質

Table 2. Effects of repeated oral administrations of sardine oil or cotton seed oil on the thromboelastogram of blood in rats.

| Group (Treatment) | Parameters of thromboelastogram | | | | | | | |
|-----------------------|---------------------------------|-------------|----------|-----------|------------|-------------|----------|-----------|
| | A | | | | B | | | |
| | CT (sec) | CFT (sec) | MCF (mm) | CFR (°) | CT (s) | CFT (s) | MCF (mm) | CFR (°) |
| I (Intact) | 440 ± 51.3 | 400 ± 158.2 | 61 ± 9.1 | 39 ± 10.0 | 278 ± 51.6 | 206 ± 134.5 | 53 ± 4.9 | 57 ± 13.6 |
| II (Sardine oil) | 605 ± 153.8 | 300 ± 94.2 | 66 ± 4.3 | 45 ± 8.2 | 269 ± 65.5 | 271 ± 55.5 | 36 ± 2.9 | 47 ± 6.1 |
| III (Cotton seed oil) | 341 ± 26.9 | 222 ± 47.9 | 65 ± 1.4 | 51 ± 8.2 | 328 ± 92.1 | 232 ± 93.7 | 46 ± 3.6 | 53 ± 6.4 |
| II vs I | NS | NS | NS | NS | NS | NS | P<0.01 | NS |
| III vs I | P<0.05 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| II vs III | P<0.05 | NS | NS | NS | NS | NS | P<0.01 | NS |

A: in the absence of BPS B: in the presence of BPS (100 μ M)
 Abbreviations: CT: clotting time, CFT: clot formation time, MCF: maximum clot firmness, CFR: clot formation rate
 Each result represents mean \pm standard deviation. NS means statistically not significant. Number of rats: Intact; n=5, sardine oil; n=4, cotton seed oil; n=4.

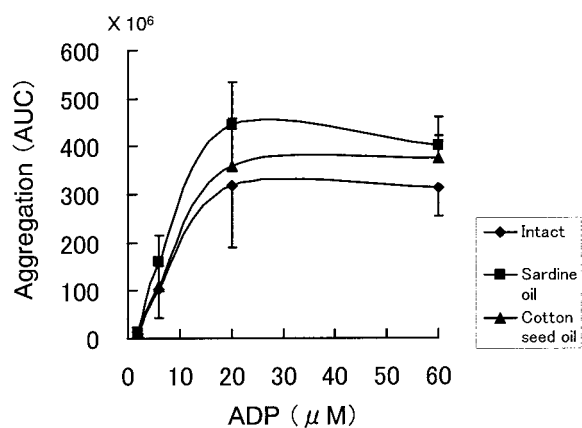


Fig. 3. Concentration response curves of the platelet aggregation reactions induced by ADP.

Platelet rich plasma (PRP) obtained from rats treated with sardine oil or cotton seed oil was used (N=4). PRP from non-treated rats was used as a control (Intact) (N=5). Each PRP was pre-incubated with 3 mM CaCl_2 (added) at 37°C for 2 - 3 min and ADP (2, 6, 20, 60 μM) was added for the start of aggregation reaction. Platelet aggregates were measured with a particle counting method using laser-light scattering for 10 min after the addition of ADP and aggregation curves (x-axis: time, y-axis: counts of aggregates) were obtained. Intensity of aggregation of each PRP was indicated by "area under the curve (AUC)" of each aggregation curve. Each point and vertical bar in the figure represents the mean and standard deviation of 4 - 5 rats of each group.

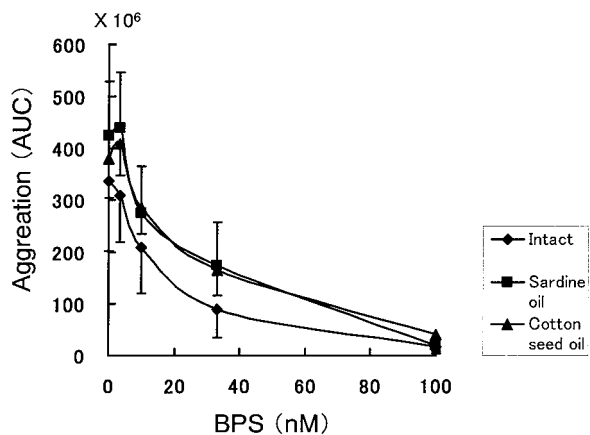


Fig. 4. Concentration response curves of the inhibitory effect of beraprost sodium (BPS) on platelet aggregation induced by ADP.

Platelet rich plasma (PRP) obtained from rats treated with sardine oil or cotton seed oil was used (N=4). PRP from non-treated rats was used as a control (Intact) (N=5). Each PRP was pre-incubated with 3 mM CaCl_2 (added) at 37°C for 2 - 3 min in the presence of vehicle or BPS (3.3, 10, 33, 100nM) and ADP (20 μM) was added for the start of aggregation reaction. Platelet aggregates were measured with a particle counting method using laser-light scattering for 10min after the addition of ADP and aggregation curves (x-axis: time, y-axis: counts of aggregates) were obtained. Intensity of aggregation of each PRP was indicated by "area under the curve (AUC)" of each aggregation curve. Each point and vertical bar in the figure represents the mean and standard deviation of 4 - 5 rats of each group.

Table. 3. Fatty acid compositions of sardine oil, cotton seed oil and feed (CRF-1) used.

| Fatty acids | Composition (%) | | |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| | Sardine oil | Cotton seed oil | Feed (CRF-1) |
| Palmitic acid (16:0) | 27.24 | 19.40 | 16.09 |
| Stearic acid (18:0) | 5.91 | 2.40 | 2.97 |
| Oleic acid (18:1 n-9) | 15.35 | 18.30 | 25.43 |
| Linoleic acid (18:2 n-6) | 1.71 | 58.40 | 47.33 |
| Linolenic acid (18:3 n-3) | 0.00 | 0.40 | 3.74 |
| Arachidonic acid (20:4 n-6) | 1.88 | 0 | 0 |
| EPA (20:5 n-3) | 11.42 | 0 | 1.01 |
| DPA (22:5 n-3) | 3.28 | 0 | 0 |
| DHA (22:6 n-3) | 9.60 | 0 | 1.76 |
| Total | 100.00 | 100.00 | 100.00 |

にはリノール酸 (18:2 n-6), オレイン酸 (18:1 n-9), パルミチン酸 (16:0) が多く含まれるが, さらにn-3系の不飽和脂肪酸である α -リノレン酸 (18:3 n-3), エイコサペンタエン酸 (EPA) (20:5 n-3), ドコサヘキサエン酸 (DHA) (22:6 n-3) が合計6.5%程度含まれていた。綿実油にはリノール酸 (18:2 n-6), オレイン酸 (18:1 n-9), パルミチン酸 (16:0) が多く含まれるが, 飼料と異なる点はn-3系の不飽和脂肪酸が殆ど含まれないことであり, 僅かに α -リノレン酸 (18:3 n-3) が0.4%程度検出されるだけである。一方, イワシ油ではこれらと大きく異なり, パルミチン酸 (16:0) とオレイン酸 (18:1 n-9) が同様に多く含まれるものの, n-6系の不飽和脂肪酸であるリノール酸 (18:2 n-6) は1.71%と少なくなっており, アラキドン酸 (20:4 n-6) 1.88%を加えてもたかだか3.6%である。一方, 魚油の特徴であるn-3系の不飽和脂肪酸のEPA (20:5 n-3) 11.42%, ドコサペンタエン酸 (22:5 n-3) 3.28%, DHA (22:6 n-3) 9.60%が合計して24.3%と多く含まれていた。すなわち, 不飽和脂肪酸については, 「イワシ

油はn-3系を, 綿実油はn-6系を含み, 飼料 (CRF-1) はn-6系と若干のn-3系を含む」とまとめることができる。

Fig. 5に肝臓中の脂質の脂肪酸組成の測定結果を示す。飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (16:0) およびステアリン酸 (18:0) ではイワシ油投与群も綿実油投与群も非投与 (無処置) 群との差はみられなかった。n-9系不飽和脂肪酸のオレイン酸 (18:1 n-9) については, イワシ油投与群で有意に増加していた。n-6系不飽和脂肪酸においては, 非投与 (無処置) 群に比較して綿実油投与群のリノール酸 (18:2 n-6) が有意に増加し, イワシ油投与群のアラキドン酸 (20:4 n-6) が有意に減少していた。また, リノール酸 (18:2 n-6) についてイワシ油投与群と綿実油投与群の間に有意差がみとめられた。n-3系不飽和脂肪酸については, EPA (20:5 n-3) が非投与 (無処置) 群に比して, イワシ油投与群で増加する傾向が認められ, 綿実油投与群では有意に減少していた。したがって, イワシ油投与群と綿実油投与群ではn-6系とn-3系の不飽和脂肪酸の組成において逆の方向に影響を及ぼ

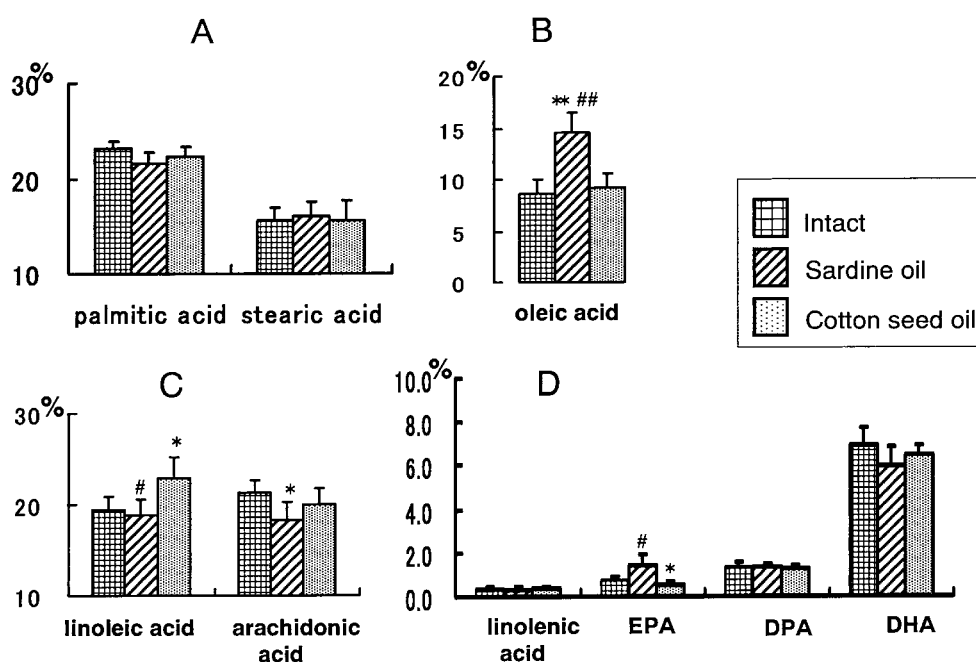


Fig. 5. Fatty acid compositions of the lipids in rat liver.

Each liver obtained from rats treated with sardine oil or cotton seed oil was used (N=4). Liver from non-treated rats was used as a control (Intact) (N=5). Fatty acid composition of each liver was determined by the method as indicated in the Method section. Panel A, B, C and D show the % levels of saturated fatty acids, n-9 unsaturated fatty acid, n-6 unsaturated fatty acids and n-3 unsaturated fatty acids, respectively. Each column and vertical bar represents the mean and standard deviation of 4-5 rats of each group.

**P<0.01 vs Intact group, *P<0.05 vs Intact group,

##P<0.01 vs Cotton seed group, #P<0.05 vs Cotton seed group.

す傾向が認められた。なお、肝臓中に含まれる脂質含量(重量%)は、非投与(無処置)群 $4.12 \pm 0.51\%$ ($n = 5$), イワシ油投与群 $4.46 \pm 0.31\%$ ($n = 4$), 綿実油投与群 $4.46 \pm 0.36\%$ ($n = 4$)であり、これらの群間に差はみられなかった。

Fig. 6に血液中の脂質の脂肪酸組成の測定結果を示す。飽和脂肪酸であるパルミチン酸(16:0)およびステアリン酸(18:0)ではイワシ油投与群も綿実油投与群も非投与(無処置)群との間に差はみられなかった。n-9系不飽和脂肪酸のオレイン酸(18:1 n-9)については、イワシ油投与群で有意に増加し、綿実油投与群では有意に減少していた。n-6系不飽和脂肪酸においては、無処置群に比較して綿実油投与群のアラキドン酸(20:4 n-6)が有意に増加した。イワシ油投与群のアラキドン酸(20:4 n-6)は非投与(無処置)群に対し有意ではないが減少する傾向にあり、イワシ油投与群と綿実油投与群の間には有意差がみとめられた。n-3系不飽和脂肪酸については、EPA(20:5 n-3)が非投与(無処置)群に比して、イワシ油投与群で有意に増加し、綿実油投与群で有意ではないが減少する傾向にあった。したがって、肝臓の場合と

同様の変化が血液においても観察され、イワシ油投与群と綿実油投与群ではn-6系とn-3系不飽和脂肪酸の組成において逆の方向に影響を及ぼす傾向が認められた。

4 考 察

イワシ油など、EPAやDHAに代表されるn-3系高度不飽和脂肪酸を豊富に含む魚油の摂取の多岐にわたる健康機能性については多くの報告が蓄積されている¹⁾。特にその血小板凝集系や血液凝固系など血液・血球に対する作用と魚油の摂取により細胞膜に取り込まれたn-3系高度不飽和脂肪酸、そのなかでもEPAの存在比の変化とが相関するという報告が多い^{4-7, 10-12, 16)}。

本研究におけるラットへの魚油の投与量については以下のように考察できる。実験に用いたWistarラットは平均して体重1kgあたり通常70~80g程度の飼料(CRF-1)を1日に摂取する。この飼料には脂質が4%含まれているので、この飼料をとおしてラットが摂取する脂質の量は1日あたり、約3g/kg体重と計算される。本研究においては、イワシ油と綿実油の投与により、ラットが摂取する脂質に

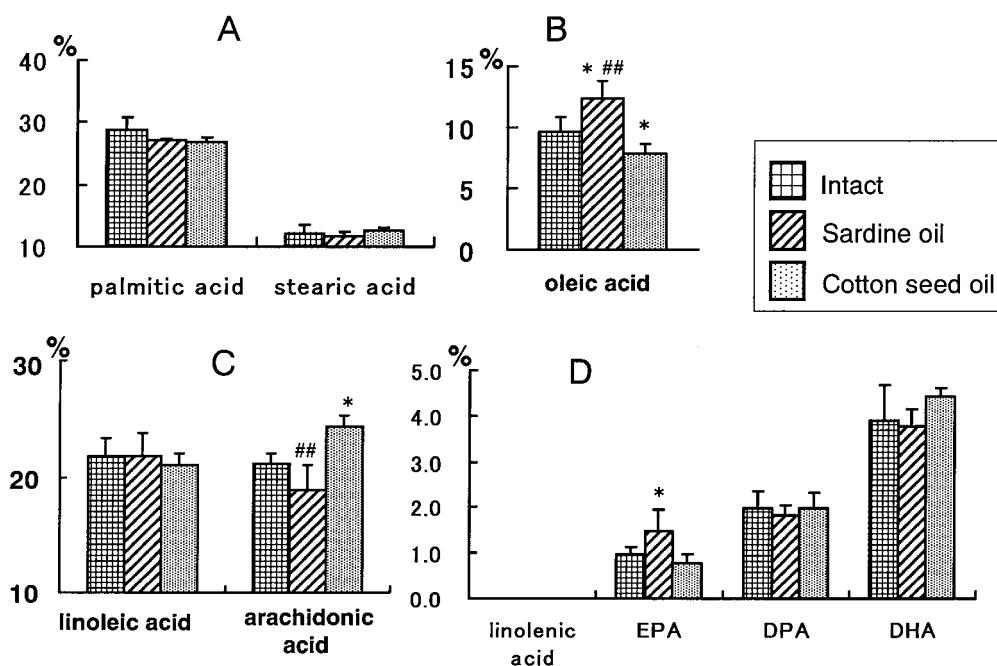


Fig. 6. Fatty acid compositions of the lipids in rat blood.

Each blood obtained from rats treated with sardine oil or cotton seed oil was used (N=4). Blood from non-treated rats was used as a control (Intact) (N=5). Fatty acid composition of each blood was determined by the method as indicated in the Method section. Panel A, B, C and D show the % levels of saturated fatty acids, n-9 unsaturated fatty acid, n-6 unsaturated fatty acids and n-3 unsaturated fatty acids, respectively. Each column and vertical bar represents the mean and standard deviation of 4-5 rats of each group.

*P<0.05 vs Intact group, **P<0.01 vs Cotton seed group.

含まれる不飽和脂肪酸の中身、すなわちn-6系とn-3系の割合を変化させた状態をつくりだし、この変化が血小板凝集系および血液凝固系へどのように影響するかをみるために、イワシ油および綿実油投与量を、1日あたり3.0g/kg体重に設定した。この条件下ではイワシ油または綿実油の投与により摂取される脂質量と、飼料(CRF-1)から摂取される脂質量とがほぼ同量(3g/kg体重)となる。実際に、この用量でイワシ油および綿実油の28日間くりかえし投与を行ったラットでは、後述するように、組織中に含まれる脂質中の脂肪酸組成に異なった変化を与えることができたうえに、体重変化・体調観察・血球細胞数等の測定・観察結果から、油の投与に由来する毒性が発現して健康を害しているという兆候は全く無いと考えられた。従って、本研究で明らかとなった、血小板凝集系および血液凝固系の測定結果は、ラットの正常な生理機能発現の範囲を逸脱していないものであり、イワシ油および綿実油の投与による脂肪酸組成の変化の及ぼす影響をみる実験系として適切と考えられる。

イワシ油と綿実油に含まれる不飽和脂肪酸の構成比、すなわちn-6/n-3比は大きく異なり、イワシ油はn-3系を、一方、綿実油はn-6系を含むことを実際の測定により確認した。そして、ラットへの28日間くりかえし投与後では、肝臓および血液中の脂質の脂肪酸組成、特に不飽和脂肪酸組成において、イワシ油投与群と綿実油投与群では逆方向に変化を起こさせる傾向が観察された。すなわち、イワシ油投与群ではn-6系が減少しn-3系が増加する方向に変化する傾向が、綿実油投与群ではn-6系が増加しn-3系が減少する方向に変化する傾向が観察された。特に、イワシ油投与群ではアラキドン酸の減少とEPAの増加がはっきりと観察された。これらの結果はEPAの投与などで既に報告¹⁻⁸⁾されているものと同様の変化であった。さらにイワシ油投与群においてはn-9系不飽和脂肪酸であるオレイン酸の組成の増加も観察された。イワシ油も綿実油もオレイン酸を同程度に含むので、なぜイワシ油投与群のみでその組成が増加したのかは現時点では不明である。オレイン酸系列の代謝では、オレイン酸(18:1 n-9)から炭素鎖の伸長と不飽和化の増大によりエイコサトリエン酸(20:3 n-9)が生成するが、魚油が必須脂肪酸欠乏時にみられるエイコサトリエン酸(20:3 n-9)の増加を抑制する作用を示すことが明らかとなっている²⁰⁾。したがって、本研究で観察されたイワシ油投与によるオレイン酸組成の増加には、オレイン酸代謝系の阻害が関係している可能性がある。

全血凝固系についてトロンボエラストグラム装置を用いて測定した結果より、イワシ油投与群と綿実油投与群の間に差が観察された。特に、凝固反応時間(CT)においては無処置群に対してイワシ油投与群と綿実油投与群では逆方向に変化し、イワシ油投与群では凝固反応時間(CT)が延長する方向へシフトした。また、BPS存在下の凝塊最大強度(MCF)はイワシ油投与群において減少した。これらより、イワシ油投与は全血凝固系を抑制する作用があること、そして綿実油投与は全血凝固系に対し増強する傾向があることが明らかとなった。これらの全血凝固系の変化はおそらく上述した不飽和脂肪酸の組成変化に起因しているものと考えられる。

EPAの投与による血小板凝集能の抑制が種々報告されている⁴⁻⁷⁾が、今回の実験では、イワシ油投与および綿実油投与により無処置のラットとの間に血小板凝集能の差は認められなかった。今回のようなイワシ油投与で体内に摂取されるEPA量では、血小板凝集能の抑制には不十分である可能性がある。また凝集惹起剤として今回はADPを用いている。EPAのエチルエステル投与によりウサギの血小板でADPによる凝集が、他の刺激(コラーゲン、アラキドン酸)の場合と同様にADP刺激でも減弱すると報告されている¹⁶⁾ので、刺激剤の違いによるものとは考えにくい。コラーゲンやアラキドン酸など他の血小板刺激物質を用いた検討も行ない確認する必要がある。

血小板凝集を抑制するPGI₂の安定誘導体であるBPSの添加は血小板凝集を抑制したが、その抑制作用がイワシ油投与ラットで増強されているという結果は得られなかった。イワシ油投与による今回の結果のみで結論づけるのは早計であるが、PGI₂の血小板凝集抑制作用はEPAの摂取によって殆ど影響を受けないことが考えられた。

要約すると、本研究では、通常の餌の摂取に上乗せしてイワシ油および綿実油を連日投与することにより、ラットの組織中の脂質の不飽和脂肪酸組成、特にn-6系/n-3系の比を変化させることが可能であることがわかった。イワシ油投与ではn-3系不飽和脂肪酸、特にEPAの組成が増加していた。また、イワシ油投与群と綿実油投与群の間でトロンボエラストグラムにより測定した血液凝固系のパラメーターに変化が認められ、イワシ油投与は全血凝固系に抑制的に働く可能性が示唆された。イワシ油のこの作用はn-3系不飽和脂肪酸、特にEPAの組成の増加が原因となっていると考えられる。これらは、血栓症予防・治療効果につながる「魚油摂取の抗血栓作用」を支持するデータとして重要であると考えられる。

文 献

- 1) 原健次：生理活性脂質EPA・DHAの生化学と応用，幸書房，東京都，(1996)。
- 2) 新薬の紹介：イコサペントエン酸エチル。薬局 41, 1621-1623 (1990)。
- 3) 五島雄一郎，熊谷朗，葛谷文男，山本章，八杉忠男，沼野藤夫，秦葭哉，松田保：イコサペント酸エチル製剤(MND-21)の臨床薬理学的検討。臨床医薬，8, 1293-1309 (1992)。
- 4) A. Hirai, T. Terao, M. Takenaga, S. Kobayashi, H. Makuta, A. Ozawa, T. Fujita, Y. Tamura, H. Kitagawa and A. Kumagai : Effect of supplementation of highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on hemostatic function in healthy subjects. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.*, 17, 838-845 (1987)。
- 5) S. N. Meydani : Modulation of cytokine production by dietary polyunsaturated fatty acids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 200, 189-193 (1992)。
- 6) N. Akahane, S. Ohba, J. Suzuki, T. Wakabayashi, T. Nakahara, K. Yanagi and N. Ohshima : Antithrombotic activity of a symmetrical triglyceride with eicosapentaenoic acid and gamma-linolenic acid in guinea pig mesenteric microvasculature. *Thromb. Res.*, 78, 441-450 (1995)。
- 7) M. E. Surette, J. Whelan, G. Lu, I. Hardard'ottir and J. E. Kinsella : Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids modify Syrian hamster platelet and macrophage phospholipids fatty acyl composition and eicosanoid synthesis : a controlled study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1255, 185-191 (1995)。
- 8) P. Needleman, A. Raz, M. S. Minkes, J. A. Ferrendel and H. Sprecher : Triene prostaglandins: Prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 944-948 (1979)。
- 9) 田村泰，平山愛山，寺野隆，吉田尚，熊谷朗：魚油多価不飽和脂肪酸(Eicosapentaenoic acid : EPA)の抗血栓・抗動脈硬化および抗炎症作用の機序に関する研究。感染・炎症・免疫，15, 379-390 (1985)。
- 10) T. Terano, A. Hirai, T. Hamazaki, S. Kobayashi, T. Fujita, Y. Tamura and A. Kumagai : Effect of oral administration of highly purified eicosapentaenoic acid on platelet function, blood viscosity and red cell deformability in healthy human subjects. *Atherosclerosis*, 46, 321-331 (1983)。
- 11) A. A. Ahmed and B. J. Holub : Alteration and recovery of bleeding times, platelet aggregation and fatty acid composition of individual phospholipids in platelets of human subjects receiving a supplement of cod-liver oil. *Lipids*, 19, 617-624 (1984)。
- 12) C. M. Wojenski, M. J. Silver and J. Walker : Eicosapentaenoic acid ethyl ester as an antithrombotic agent : comparison to an extract of fish oil. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1081, 33-38 (1991)。
- 13) S. Fischer and P. C. Weber : Thromboxane A₂ (TXA₂) is formed in human platelets after dietary eicosapentaenoic acid (C20: 5 omega 3) . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116, 1091-1099 (1983)。
- 14) E. Tremoli, P. Maderna, F. Marangoni, S. Colli, S. Eligini, I. Catalano, M. T. Angeli, F. Pazzucconi, G. Gianfranceschi and G. Davi : Prolonged inhibition of platelet aggregation after n-3 fatty acid ethyl ester ingestion by healthy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61, 607-613 (1995)。
- 15) E. Malle, W. Sattler, E. Prenner, H. J. Leis, A. Hermetter, A. Gries and G. M. Kostner : Effects of dietary fish oil supplementation on platelet aggregability and platelet membrane fluidity in normolipemic subjects with and without high plasma Lp(a) concentrations. *Atherosclerosis*, 88, 193-201 (1991)。
- 16) M. Sato, Y. Katsuki, K. Fukuhara, H. Kawano, M. Mizota, Y. Hamada and Y. Kunihiro : Effects of highly purified ethyl all-cis-5,8,11,14,17-icosapentaenoate (EPA-E) on rabbit platelets. *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 362-367 (1993)。
- 17) O. Haglund, R. Wallin, R. Luostarinen and T. Saldeen : Effects of a new fluid fish oil concentrate, ESKIMO-3, on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and blood pressure. *J. Intern. Med.*, 227, 347-353 (1990)。
- 18) C. D. Lox : The effects of dietary marine fish oils (omega-3 fatty acid) on coagulation profiles in men. *Gen. Pharmacol.*, 21, 241-246 (1990)。
- 19) M. Okazaki, E. Furuya, Y. Shin and K. Sakamoto : Studies on alterations in blood coagulative and fibri-

- nolytic activities after single and multiple administrations of carbon tetrachloride in mice. *Japan. J. Pharmacol.*, **41**, 447-458 (1986).
- 20) A. Calatzis, S. Haas, O. Godje, A. Calatzis, R. Hipp and J. N. Walenga : Thromboelastographic coagulation monitoring during cardiovascular surgery with the ROTEG coagulation analyzer. In *Management of Bleeding in Cardiovascular Surgery* (ed. by Pifarre R), Hanley & Belfus Inc., Philadelphia, PA, USA, pp. 215-226 (2000).
- 21) 西尾伸太郎：ペラプロストナトリウムの薬理作用, *現代医療*, **24**, 109-117 (1992).
- 22) 佐々木理恵, 車谷元, 松下映夫：安定型プロスタサイクリン誘導体ペラプロストナトリウムのヒト血小板粘着・凝集とPDGF放出作用に対する作用, *血栓と循環*, **5**, 420-424 (1997).
- 23) 佐藤金夫, 尾崎由基男, 矢富裕, 久米章司：散乱光を用いた粒子計測法による血小板凝集能の測定, *日本血栓止血学会誌*, **8**, 55-61 (1997).
- 24) 鹿山 光：3. 必須脂肪酸, その代謝と機能, “AA, EPA, DHA-高度不飽和脂肪酸” (鹿山光編), 恒星社厚生閣, 東京都, pp. 44-81 (1995).