

マウスにおいて魚油はウェイトリバウンドによる体重増加 および肝臓への脂肪蓄積を抑制する

餅 康 樹¹, 角 田 伸 代^{*1}, 柴 祥 子¹
村 木 悦 子¹, 加 園 恵 三¹

(2009年5月19日受付; 2009年12月14日受理)

要旨: 魚油のウェイトリバウンドに及ぼす影響について検討を行った。KK-A^yマウスを用い、増量期・減量期・リバウンド期を再現した。脂質源として牛脂(B食)または魚油(F食)を含有した2種の高脂肪食を作成した。増量期はすべてB食を与え、B食で減量しB食でリバウンドした群をB-B群、同様にB-F群、F-B群、F-F群およびB食をアドリブにて全期間摂取させた群(Control群)を設けた。リバウンド後の体重は、B-B、F-B群に比べ、B-F、F-F群でそれぞれ減少した。肝臓重量および肝臓中脂質量は、Control群と比べ、B-B、F-B群では増加したが、B-F、F-F群では減少した。またB-B、F-B群と比べ、B-F、F-F群では肝臓のSREBP-1c、FAS mRNA量が低下し、PPAR- α 、HSL mRNA量およびMTPタンパク質量が増加した。以上より、リバウンド期の魚油摂取は、体重増加と肝臓への脂肪蓄積を抑制することが示唆された。肝臓での脂肪蓄積抑制の機序として、肝臓での脂肪酸合成の抑制、脂肪分解や脂肪酸酸化の亢進および肝臓からのリポタンパク質分泌の正常化が関与すると推察された。

キーワード: 魚油, ウェイトリバウンド, 脂肪肝

肥満は、動脈硬化や高血圧症、脂質異常症などの生活習慣病を引き起こす主要な因子の一つである¹⁻³⁾。今日では多くのメディアで生活習慣病の危険性について取り上げられ、内臓脂肪蓄積とインスリン抵抗性を内在するメタボリックシンドロームといった言葉もわれわれにとって身近なものとなった。このような現状をふまえ、平成16年国民健康・栄養調査報告では、自分の適正体重を認識し、ウェイトコントロールを実践する者は成人の66%にも達することが報告されている⁴⁾。しかし、同報告では、習慣的に運動する者が成人全体の約3割であることも報告⁴⁾しており、多くは食事制限に依存したウェイトコントロールを行っていると考えられる。食事制限のみによる無理な減量は、ウェイトリバウンドを引き起こし、肥満をさらに助長してしまうケースも多く、生活習慣病のリスクをかえって高めてしまう恐れがある。

一方、魚油には、さまざまな効果が報告されている。Lombardo *et al.* は、高シヨ糖食に魚油を添加することで、摂食量を低下させ、体重の上昇を抑制する⁵⁾と報告しており、その他の先行研究⁶⁾⁷⁾でも、肥満の是正に魚油が有効であることが示唆されている。また、多くの動物実験で、魚油は血中および肝臓中脂質を低下させる効果を有することが報告されており⁸⁻¹⁰⁾、減量期に魚油を摂取

することで脂質代謝の改善が期待できる。

これらの効果に加え、魚食は日本人にとって馴染みあることから、減量のための食事設計に肉類の代替として、魚類を取り入れることは効果的であると考えられている。しかしながら、ウェイトリバウンド条件下においても、前述したような魚油の効果が得られるか否かについては、まだ明らかになっていない。

そこで本研究では、過度の減量およびウェイトリバウンド条件下における体重および血中・肝臓中脂質に対する魚油の影響について検討を行った。

実 験 方 法

1. 実験動物および飼育方法

実験動物は、4週齢のKK-A^y雌性マウス(日本クレア(株))を用いた。動物飼育室は室温25±3℃、湿度50±5%に調節し、明暗サイクルは12時間(明期:7:00-19:00、暗期:19:00-7:00)の環境とした。実験群は、各群4匹とし、同一ケージで1匹ずつの個別飼育とした。

実験飼料の基本組成はAIN-93Gに準拠し、脂質源として大豆油の代わりに牛脂(オリエンタル酵母工業(株))または魚油(日油(株))を用いた(表1)。脂質エネルギー比を30%に設定し、脂質源をすべて牛脂に変換した

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: ntsunoda@josai.ac.jp)

¹ 城西大学薬学部医療栄養学科 (350-0295 埼玉県坂戸市けやき台1-1)

表1 食餌組成

	B diet	F diet
Beef tallow	13.25	
Fish oil		13.25
Casein	21.11	21.11
Sucrose	9.21	9.21
β -Cornstarch	46.07	46.07
Vitamin mix	1.06	1.06
Mineral mix	3.69	3.69
Cellulose	5.28	5.28
L-Cystine	0.32	0.32
t-BHT	0.003	0.003
Total	100.00	100.00
Energy (kcal/100 g)	404.3	400.6
Fat energy ratio (%)	30.8	30.2

もの (B食) と魚油に変換したもの (F食) の2種を作成した。

1週間の予備飼育期間は、固形飼料 MF (オリエンタル酵母工業(株)) を与え、その後、増量期3週間、減量期2週間およびリバウンド期1週間の計6週間は、各実験食を用いて飼育した。増量期およびリバウンド期はアドリブ摂食、減量期は制限給餌にて飼育した。KK-A^yマウスは肥満モデル動物であるため、通常飼育においても体重が著しく増加する。われわれはこれまでに、KK-A^yマウスの体重を増加させずに横ばいを維持させるためには、増量期のアドリブ摂食量の60-80%に給餌量を制限する必要があることを確認している。よって、本研究の給餌量は、増量期におけるマウス個々のアドリブ摂食量の50%から開始し、体重が落ちなくなるごとに給餌制限を厳しくして最終的に摂食量を20%とし、増量期より短期間の2週間で10g減量を目指した急激な減量プログラムを再現した。なお、飲水は自由摂取とした。

実験群は、B食およびF食のどちらの飼料で減量期あるいはリバウンド期を飼育したかで分類した(図1)。増量期はすべてB食を与え、その後、B食で減量しB食でリバウンドした群をB-B群、B食で減量しF食でリバウンドした群をB-F群、F食で減量しB食でリバウンドした群をF-B群、F食で減量しF食でリバウンドした群をF-F群とし、合計4群に分けた。さらに対照として、B食をアドリブにて全実験期間の6週間摂取させた群(Control群)および、MF食をアドリブにて6週間摂取させた群(Normal群)を加え合計6群とした。

6週間の飼育終了後、ペントバルビタールナトリウム(大日本住友製薬(株))を0.648 mg/g体重、腹腔内投与することによって麻酔し、マウスの最終体重を測定した後、眼窩静脈より採血を行った。その後、肝臓を採取し、液体窒素で急速に凍結した。肝臓は-80℃、血漿は-30℃で凍結保存した。

なお、動物実験は、総理府の「実験動物の飼養および保管ならびに苦痛の軽減に関する基準」および城西大学

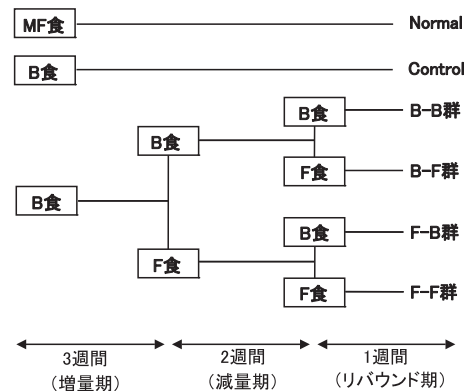


図1 実験群および期間

生命科学センターの「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に従って行った。

2. 体重測定

体重測定は、週1回定時に行った。

3. 血漿中脂質の測定

屠殺時に得た血漿サンプルを用いて、中性脂肪濃度(P-TG)、総コレステロール濃度(P-TC)および遊離脂肪酸濃度(P-NEFA)を測定した。P-TG、P-TCは、富士ドライケム(富士フィルム(株))を用いて測定した。P-NEFAは、NEFA C-テストワコー(和光純薬工業(株))にて測定した。

4. 肝臓中脂質の測定

屠殺解剖時に得た肝臓を用い、中性脂肪量(L-TG)、総コレステロール量(L-TC)および遊離脂肪酸量(L-NEFA)を測定した。

肝臓中粗脂質の抽出は、Bligh & Dyer法に従って行った¹¹⁾。肝臓(0.1-0.19g/マウス)を約5 mLのPBS(1.5 M NaCl, 30 mM KCl, 0.1 M NaHPO₄ · 12H₂O, 15 mM KH₂PO₄ [pH7.4])とともにポリトロン(PT 3100 POLYTRON)でホモジナイズした。これに、3 mLの1, 2-CM solution (CHCl₃:Methanol (MtOH)=1:2)、1 mLのクロロホルムおよび1 mLのPBSを加え、遠心後クロロホルム層を回収した。さらに、濃縮遠心機で恒量になるまで計量し、粗脂質を抽出した。

L-TG、L-TCおよびL-NEFA測定のため、クロロホルム処理したサンプルをそれぞれ200 μ L、100 μ Lおよび300 μ L分注し、濃縮遠心後、2,1-CM solution (CHCl₃:MtOH=2:1):1,1-TM solution (Triton X-100: MtOH=1:1)=1:1で加えた。さらに、それぞれを濃縮遠心し、10倍量の超純水で溶解した後、トリグリセライド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコーおよびNEFA C-テストワコー(和光純薬工業(株))にて測定を行った。

5. 肝臓の脂質代謝関連遺伝子 mRNA 量の検討

5.1 RNAの抽出 屠殺解剖時に得た肝臓を用い、mRNA量の測定を行った。なお、この検討は1群4匹のプールサンプルで行った。

肝臓 (0.1–0.19 g/マウス) を 4.2 mL の TRIzol Reagent (invitrogen) とともにポリトロンでホモジナイズした。その後、TRIzol Reagent の 0.3 倍量のクロロホルムを加えて遠心後、上清を得た。上清と同量の 2-プロパノールを加え、遠心後、沈殿物を 70% エタノールで洗浄し、空気乾燥することで RNA を得た。RNA は DEPC (diethyl pyrocarbonate) 処理滅菌水に溶解し、吸光度計 (Ultraspec 2100 pro UV/visible spectrophotometer) を用いて、260 nm にて濃度を測定した。精製した RNA は、 -80°C にて保存した。

5.2 mRNA 量の測定 5.1 で得た RNA を $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ に調整後、iCycler サーマルサイクラー (BIO RAD) にて、Real-Time RT-PCR を行った。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN) を用い、遺伝子を増幅した。

測定は、sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c, fatty acid synthase (FAS), peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α), hormone-sensitive lipase (HSL), microsomal triglyceride transfer protein (MTP) の 5 種について行った。使用したプライマー配列およびアニーリング温度は、SREBP-1c では Forward; 5'-TTGTGGAGCTCAAAGACCTG-3', Reverse; 5'-TGCAAGAAGCGGATGTAGTC-3', 60°C , FAS では Forward; 5'-GAGCTGCGGCTACGTGGCTA-3', Reverse; 5'-GCCGCCGTGAGGTTGCTGTT-3', 63°C , PPAR- α では Forward; 5'-GTGGCTGCTATAATTTGCTGTG-3', Reverse; 5'-GAAGGTGTCATCTGGATGGTT-3', 62°C , HSL では Forward; 5'-TGCCCAGGAGTGTGTCTGAG-3', Reverse; 5'-AGGACACCTTGGCTTGAGCG-3', 63°C , MTP では Forward; 5'-GCTCCCTCAGCTGGTGGAT-3', Reverse; 5'-CAGGATGGCTTCTAGCGAGTCT-3', 66°C とした。なお、結果については、Control 群の値を 1 としたときの各群の相対量で示した。

6. MTP タンパク質量の測定

6.1 タンパク質の抽出 採取した肝臓より、肝タンパク質の抽出およびタンパク量の測定を行った。なお、この検討は 1 群 4 匹のプールサンプルで行った。20 mM Tris-HCl バッファ (pH 7.4) に、0.25 M スクロース (和光純薬工業(株)), 2 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid; 和光純薬工業(株)), 2 mM EGTA (ethyleneglycol bis (beta-aminoethylether)- N,N,N,N -tetraacetic acid; 和光純薬工業(株)), 0.7 g/mL PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride; 和光純薬工業(株)) および $4\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptin (CALBIOCHEM) を加えた試薬を作成し、これを試薬 A とした。

肝臓 (0.5 g/マウス) は、10 mL の試液 A とともにポッター型ホモジナイザー (Iuchi Digital Homogenizer) でホモジナイズした。その後、ガーゼ濾過で結合組織などを除き、遠心 ($8,000\times g$, 10 min, 4°C) した。上清をさらに超高速遠心 ($100,000\times g$, 60 min, 4°C) し、ミクロソーム分画を得た。沈殿したミクロソーム分画に 1 mL の試

液 A を加えて溶解し、Bio-Rad Protein Assay (BIO RAD) にてタンパク質量を行った。その後サンプルは、窒素置換処理を施した後、 -30°C で保存した。

6.2 MTP タンパク質量の測定 7.5% の resolving gel および 3.0% の stacking gel からなる泳動ゲルを作成した。50 μg のタンパク質を含んだサンプルを各群において調製し、ミニプロテイン 3 (BIO RAD) にて電気泳動 (150 V, 90 min) を行った。サイズマーカーとしては、kaleidoscope prestained standards (BIO RAD) を用いた。

泳動後、CBB-R250 (和光純薬工業(株)) 染色およびニトロセルロースメンブレン (GS ヘルスケアバイオサイエンス) への転写を行った。CBB-R250 染色にて、すべての群でアプライしたタンパク質量に差がないことを確認した後、ミニトランスブロットセル (BIO RAD) を用いて、メンブレンへの転写 (100 V, 75 min) を行った。

MTP 抗体として、ヤギポリクローナル MTP 抗体 (SANTA CRUZ) を 200 倍希釈で 1 時間反応させた。化学発光は、ECL ウェスタンブロットティング検出システム (Amersham Japan) のプロトコールに準じて行った。感光時間は 2 時間とした。

7. 統計処理

本研究で得られた実験結果は、平均値 \pm 標準誤差 (Mean \pm SE) で示した。統計処理は、StatView J-5.0 ((株) ヒューリンクス) により、一元配置分散分析 (ANOVA) を用いて行い、2 群間の有意差は Fisher の PLSD (protected least significant difference test) により検定した。 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定し、アルファベットの異なる群間において有意差ありとした。また、リバウンドを再現させた 4 群 (B-B, B-F, F-B, F-F 群) については、Dr.SPSS II for Windows (エス・ピー・エス・エス(株)) を用い、二元配置分散分析を行い、主効果と交互効果について検討した。

実験結果

1. リバウンド期における摂取エネルギー量および体重推移

リバウンド期の摂取エネルギー量は、Normal 群: 20.2 ± 1.5 , Control 群: 23.0 ± 0.9 , B-B 群: 26.6 ± 0.5 , B-F 群: 22.6 ± 0.8 , F-B 群: 25.4 ± 0.9 , F-F 群: 21.5 ± 0.4 kcal/日/マウスであった。Normal 群と Control 群は同程度であり、Control 群に比べ、B-B 群では有意に増加していた。また、減量を行った 4 群で比較すると、B-B 群、F-B 群に比べ、B-F 群、F-F 群ではそれぞれ有意に減少した。この 4 群における二元配置分散分析の結果、減量期摂取油脂には有意差はなかったが、リバウンド期摂取油脂には有意差がみられた。交互効果に有意差はなかった。

実験期間中の体重推移の結果を図 2 に示す。最終体重において、Control 群に比べ、他群ではすべて有意に減少した。また、減量を行った 4 群で比較すると、B-B 群、

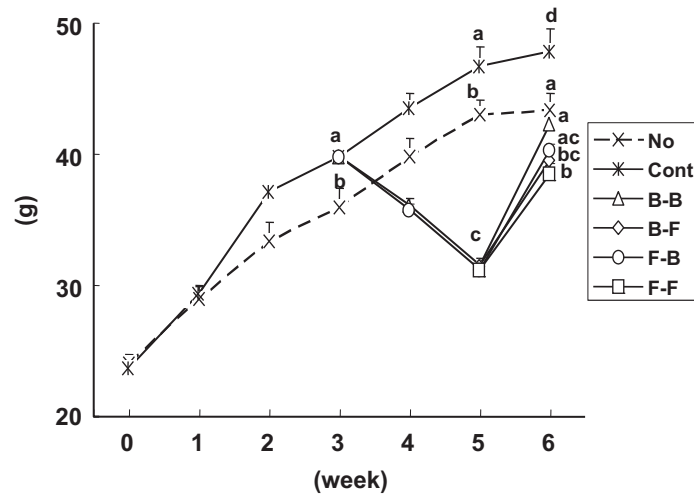


図2 体重推移

脂質エネルギー比を30%に設定し、そのすべてを牛脂または魚油に置き換えた食餌（B食およびF食）を用いて、3週間の増量期および2週間の減量期、1週間のリバウンド期を飼育した。図は、その体重推移を示している。値は Mean \pm SE ($n=4$) で示した。増量期終了時（第3週）、減量期終了時（第5週）および屠殺時のそれぞれにおいて、異なるアルファベット間で危険率5%未満の有意差があることを示す。なお、増量期は2群（Normal群、B食増量群）、減量期は4群（Normal群、Control群、B食減量群およびF食減量群）に分けて検討した（一元配置分散分析）。また、リバウンドを再現した4群（B-B、B-F、F-B、F-F群）の屠殺時体重において、二元配置分散分析を行った。主効果：減量期摂取油脂は有意差なし、リバウンド期摂取油脂は $p=0.006$ 、交互効果：有意差なしであった。No, Normal; Cont, Control.

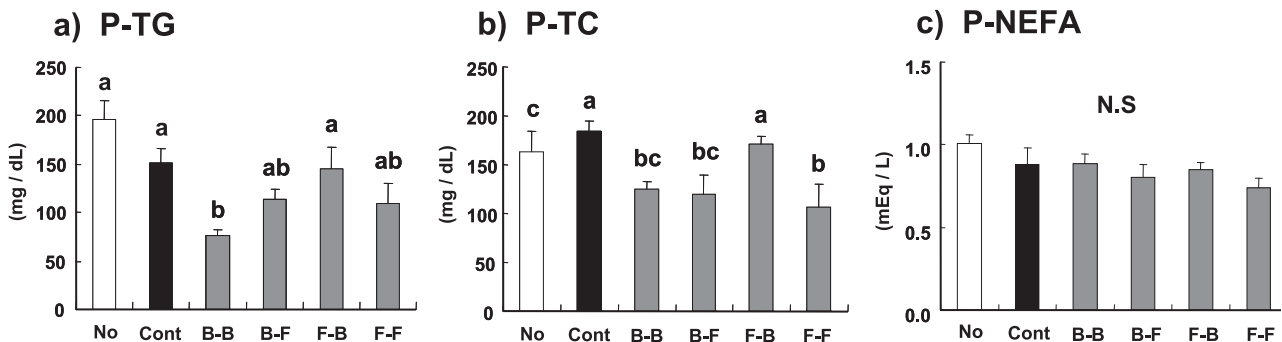


図3 血漿中脂質

実験期間（6週間）終了時にマウスを屠殺し、屠殺時に得た血漿サンプルを用いて、血漿中脂質量を測定した。P-TG、P-TC および P-NEFA は、それぞれ、血漿中の中性脂肪量、コレステロール量および遊離脂肪酸量である。値は、Mean \pm SE ($n=4$) で示し、異なるアルファベット間で危険率5%未満の有意差があることを示している（一元配置分散分析）。また、リバウンドを再現した4群（B-B、B-F、F-B、F-F群）において、二元配置分散分析を行った。a) 主効果：減量期摂取油脂は $p=0.069$ 、リバウンド期摂取油脂は有意差なし、交互効果： $p=0.041$ 、b) 主効果：減量期摂取油脂は有意差なし、リバウンド期摂取油脂は $p=0.052$ 、交互効果： $p=0.090$ 、c) 主効果、交互効果ともに有意差なしであった。No, Normal; Cont, Control.

F-B群に比べ、B-F群、F-F群ではそれぞれ有意に減少した。二元配置分散分析においても、リバウンド期摂取油脂に有意差が認められた。

2. 血漿中脂質

P-TG、P-TC および P-NEFA の結果を、図3に示す。P-TGに関して、Normal群と比較してControl群は低下する傾向を示し、Control群と比較してF-B群は同程度、B-B群は有意に低下し、B-F群およびF-F群は低下傾向を示した。また、B-F群とF-F群は同程度であったのに

対し、B-B群とF-B群では後者が有意に高かった。二元配置分散分析においては、減量期摂取油脂および交互効果に有意差が認められた。

P-TCに関し、Normal群に比べ、Control群は有意に上昇した。また、P-TG同様、Control群と比較し、F-B群は同程度、B-B群、B-F群およびF-F群は有意に低下したが、B-F群とF-F群は同程度であったのに対し、B-B群とF-B群では後者が有意に高かった。二元配置分散分析においては、リバウンド期摂取油脂および交互効果に有

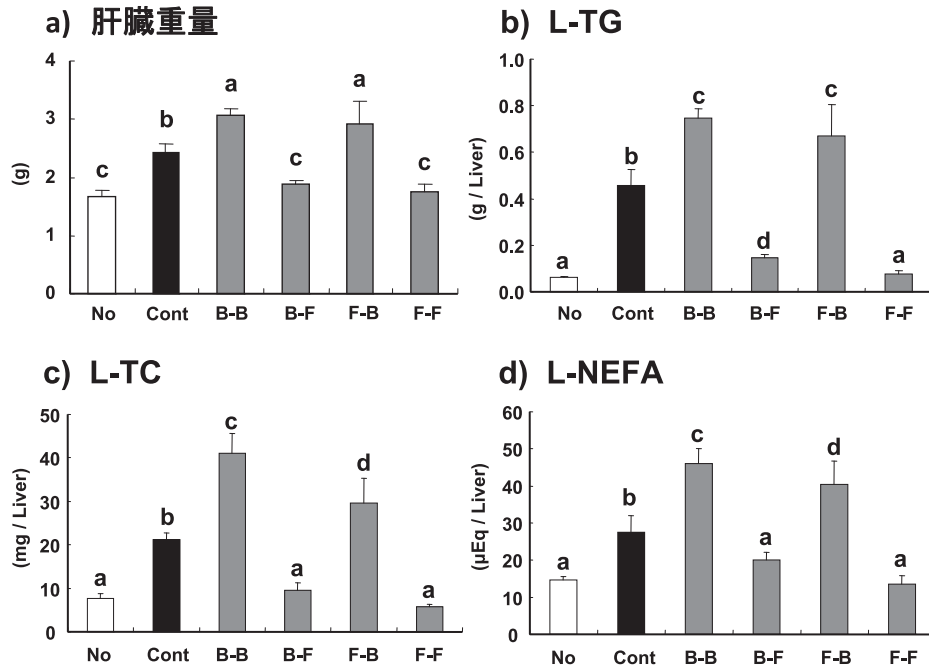


図4 肝臓重量および肝臓中脂質量

実験期間（6週間）終了時にマウスを屠殺し、屠殺時に得た肝臓を用いて、肝臓重量および各肝臓中脂質量を測定した。L-TG および L-TC, L-NEFA は、それぞれ、肝臓中の中性脂肪量、コレステロール量および遊離脂肪酸量である。値は、Mean ± SE (n=4) で示し、異なるアルファベット間で危険率 5% 未満の有意差があることを示している（一元配置分散分析）。また、リバウンドを再現した 4 群（B-B, B-F, F-B, F-F 群）において、二元配置分散分析を行った。a) 主効果：減量期摂取油脂は有意差なし、リバウンド期摂取油脂は $p < 0.001$ 、交互効果：有意差なし、b) 主効果：減量期摂取油脂は有意差なし、リバウンド期摂取油脂は $p < 0.001$ 、交互効果：有意差なし、c) 主効果：減量期摂取油脂は $p = 0.065$ 、リバウンド期摂取油脂は $p < 0.001$ 、交互効果：有意差なし、d) 主効果：減量期摂取油脂は有意差なし、リバウンド期摂取油脂は $p < 0.001$ 、交互効果：有意差なしであった。No, Normal; Cont, Control.

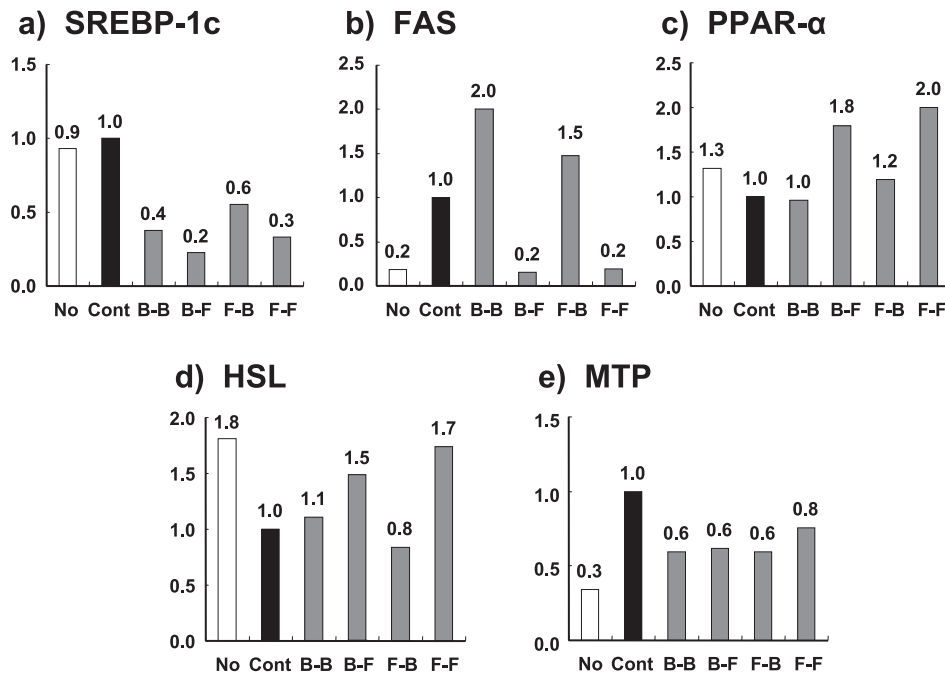


図5 肝臓中脂質代謝関連遺伝子 mRNA 量

実験期間（6週間）終了時にマウスを屠殺し、屠殺時に得た肝臓を用いて、肝臓中脂質代謝関連遺伝子 mRNA 量を検討した。測定検体として、各群のプールサンプル (n=4) を用いた。mRNA 量は Control 群を 1 とし相対量を示している。No, Normal; Cont, Control; SREBP-1c, sterol regulatory element bindind protein-1c; FAS, fatty acid synthase; PPAR-α, peroxisome proliferator-activated receptor-α; HSL, hormone-sensitive lipase; MTP, microsomal triglyceride transfer protein.

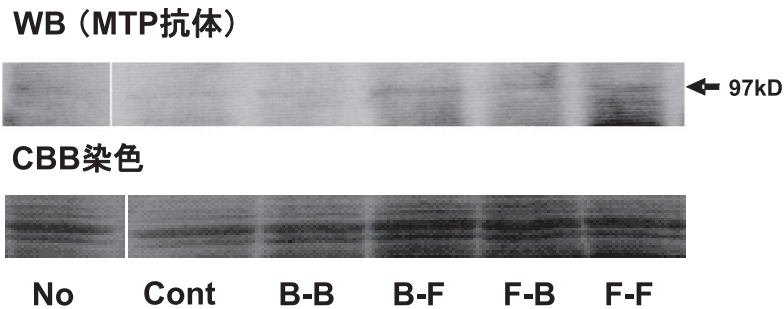


図6 肝臓中 MTP タンパク質量

実験期間 (6 週間) 終了時にマウスを屠殺し、屠殺時に得た肝臓を用いて、Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) タンパク質量を Western blot 法にて測定した。測定検体として、各群のプールサンプル ($n=4$) を用いた。上段は Western blot 法による MTP タンパク質量を示し、下段は電気泳動後のゲルの染色 (CBB-R250) 結果を示した。No, Normal; Cont, Control.

意傾向が認められた。

P-NEFA に関しては、すべての群において、有意差は認められなかった。

3. 肝臓重量および肝臓中脂質

肝臓重量および肝臓中の脂質量測定結果を図4に示す。肝臓重量においては、Control 群と比較し、B-B 群および F-B 群は有意に増加し、B-F 群および F-F 群では有意に減少した。また、Normal 群と、B-F 群および F-F 群は、同程度となった。二元配置分散分析においても、リバウンド期油脂摂取に有意差が認められた。

L-TG および L-TC, L-NEFA に関し、Normal 群と比較し、Control 群は有意に増加した。また、Control 群に比べ、B-B 群および F-B 群は有意に増加し、B-F 群および F-F 群は有意に減少した。二元配置分散分析においては、L-TC でのみ減量期摂取油脂に有意傾向が認められたが、L-TG および L-TC, L-NEFA のすべてでリバウンド期摂取油脂に有意差が認められた。

4. 肝臓中脂質代謝関連遺伝子 mRNA 量

各 mRNA 量の結果について、図5に示す。SREBP-1c に関しては、Normal 群と Control 群は同程度であった。また、Control 群と比べ、リバウンドを再現した4群では減少し、さらに B-B 群、F-B 群と比較し B-F 群、F-F 群ではおのおの約 1/2 量となった。

FAS に関しては、Control 群と比較し、B-B 群および F-B 群で増加したが、B-F 群および F-F 群では Normal 群と同程度まで著しく減少した。

PPAR- α に関しては、Control 群および B-B 群、F-B 群は Normal 群と同程度であり、B-F 群および F-F 群において増加した。

HSL に関しては、Normal 群と比べ、Control 群では減少した。また、Control 群と比べ、B-B 群および F-B 群は同程度であり、B-F 群および F-F 群において増加した。

MTP に関しては、Normal 群と比べ、Control 群は増加した。また、Control 群と比べ、リバウンドを再現した4群では減少した。

5. MTP タンパク質量

Western blot 法による MTP タンパク質量の測定結果を図6に示す。泳動ゲルを CBB-R250 染色し、泳動した各群のタンパク質量が同量であることを確認した (図6下段)。MTP 抗体を用い、各群の MTP タンパク質量を比較したところ、Normal 群に比べ、Control 群では減少した。また、Control 群と比較し、B-B 群は同程度、F-B 群ではやや増加した。さらに、B-F 群および F-F 群では、他群に比べ、顕著に増加した (図6上段)。

考 察

本研究では、肥満・糖尿病モデルマウスを用いて、牛脂をエネルギー比 30% で含有した食餌にて3週間の肥満誘導後、同食餌および魚油をエネルギー比 30% で含有した食餌を用いて、2週間の減量期と1週間のリバウンド期を設け、過度のウェイトリバウンド条件下における魚油の体重および血中・肝臓中脂質に対する影響について検討を行った。

本研究における実験食の油脂源は、魚油もしくは牛脂のみ (13.25% 重量比) であり、必須脂肪酸欠乏が懸念される。しかし、Stribosch *et al.* による先行研究では、魚油は 10% 重量比で食餌に含まれていれば、n-6 系脂肪酸量が必要量に達しており (エネルギー比でリノール酸 0.393%, アラキドン酸 0.236%, n-6 系脂肪酸 0.629%), 必須脂肪酸欠乏は生じないことを明らかにしている¹²⁾。本研究で用いた魚油には、n-6 系脂肪酸がエネルギー比で 0.990% 含まれており (リノール酸 0.390%, アラキドン酸 0.600%), 必要量を満たしている。また、牛脂の脂肪酸組成については、一般的組成から考えて、エネルギー比でリノール酸が 1% 程度含まれている。よって、本研究において、必須脂肪酸欠乏は生じていないと考えられる。

本研究の結果、減量期からリバウンド期まで牛脂を食べ続けた群に比べ、リバウンド期に魚油を摂取した群では、減量期の油脂の種類にかかわらず、摂取量および体

重が減少した。二元配置分散分析の結果も、リバウンド期摂取油脂が体重に影響を及ぼすことを裏付けている。これにより、ウェイトリバウンド条件下であっても、魚油は体重増加を抑制することが示唆された。また、リバウンド期に牛脂を摂取すると、ウェイトリバウンドを再現せずに牛脂を摂取し続けて顕著に肥満した群よりも、肝臓中脂質量および肝臓重量がさらに増加したのに対し、リバウンド期に魚油を摂取すると、肝臓中脂質量は減少し、肝臓重量もこれに伴い低下した。二元配置分散分析の結果も含め、リバウンド期に魚油を摂取すると、牛脂摂取に比べ、肝臓中脂質を低下させることが示唆され、先行研究で示されていた魚油の有効性が、ウェイトリバウンド条件下でも再現される結果となった。また、血漿中TGおよびTC濃度において、リバウンド期に魚油を摂取した群では、減量期にどちらの油脂を摂取していても同程度の値を示したのに対し、リバウンド期に牛脂を摂取した群では、減量期に魚油を摂取した群が牛脂を摂取した群よりも高値を示した。この結果は、リバウンド期に牛脂を摂取したマウスにおいては、減量期に摂取する油脂がリバウンド後の血中脂質に影響を与えることを示しており、急激な減量に対する牛脂と魚油の生体への影響が異なることを示唆した。二元配置分散分析においても、減量期摂取油脂とリバウンド期摂取油脂の間に交互効果が認められており、減量期とリバウンド期の油脂摂取が影響し合っており、血中脂質が変動すると考えられる。

これらのメカニズムを検討するため、肝臓における脂質代謝関連遺伝子 mRNA 量を解析した。肝臓や脂肪組織におけるコレステロール代謝や脂肪酸生合成などに関わる遺伝子の転写調節を担う SREBP-1c¹³⁻¹⁵⁾ やこれにより転写が活性化される脂肪酸合成酵素¹⁶⁾ (FAS) に関しては、リバウンド期に牛脂を摂取した群に比べ、魚油を摂取した群で減少した。先行研究では、多価不飽和脂肪酸による脂肪酸合成の抑制は、SREBP-1c および FAS の低下を介する¹⁷⁾¹⁸⁾ ことが報告されており、ウェイトリバウンド条件下でも、この報告と同様の結果が得られたことから、本研究での魚油による肝臓への脂質蓄積抑制メカニズムの一部には、この経路が関わっていることが示唆された。また、PPAR- α は脂質代謝、脂肪酸酸化を担う核内受容体であり¹⁹⁻²¹⁾、魚油により mRNA 量が増加する²²⁻²⁴⁾ ことが報告されている。本研究においても、リバウンド期の魚油摂取は、牛脂摂取に比べ PPAR- α mRNA 量を増加させた。さらに、HSL においても同様の傾向がみられた。このことから、リバウンド期の魚油摂取は、肝臓中脂質の脂肪酸への分解を促進し、さらに PPAR- α を介した脂肪酸 β 酸化を高めたと考えられ、前述の脂肪酸合成の抑制に加え、脂質分解および脂質酸化亢進も肝臓中脂質量の減少に関与していると考えられる。

肝臓からの中性脂肪等の分泌に関わる MTP は、mRNA レベルではリバウンドを再現した 4 群間に顕著

な差はみられなかった。しかし、Hussain *et al.* の報告²⁵⁾ から、タンパク質レベルでの制御が重要であると考え、Western blot 法を用いて MTP タンパク質量についても検討した。その結果、ウェイトリバウンド条件下において、リバウンド期に牛脂を摂取した群に比べ、魚油を摂取した群で明らかな増加がみられた。これにより、リバウンド期の魚油摂取は、リポタンパク質のアセンブルを改善し、肝臓からの中性脂肪やコレステロールの分泌を正常に保つことが推察された。また、リバウンド期に牛脂を摂取しても、その前の減量期の摂取油脂が牛脂であった群に比べ、魚油摂取群では MTP 量が増加した。この結果より、減量期に牛脂より魚油を摂取した群で牛脂によるリバウンド後の血中脂質が高値になった要因には、MTP を介した肝臓から血中への脂質分泌能の亢進が関与していると考えられた。しかし、血漿中中性脂肪値が Normal 群 (MF 食群) より高いわけではないことから、リバウンド期の魚油摂取は、肝臓から血中への脂質分泌を亢進しているというよりは、むしろ正常化していると考えられる。

以上より、リバウンド期の魚油摂取は、減量期からリバウンド期まで牛脂を摂取し続けるよりも、リバウンドによる摂食量および体重増加を抑制することが示唆された。また、リバウンド期に牛脂を摂取すると、ウェイトリバウンドを再現していない肥満マウスよりも、肝臓における脂肪合成を高め、肝臓中脂質量が増加した。一方、リバウンド期に魚油を摂取すると、肝臓における脂肪合成を抑制し、脂肪分解や酸化を促進させ、さらに肝臓からの脂肪分泌を正常化することで肝臓への脂肪蓄積を抑制することが示唆された。これらは、ウェイトリバウンドに及ぼす牛脂と魚油の肝臓に対する作用の違いを顕著に示す結果となった。また、リバウンド期に牛脂を摂取した群において、減量期にも牛脂を摂取すると、リバウンド後の血中脂質が魚油摂取群に比べ低下にした。KK-*A^y* マウスは肥満モデル動物であるため、肥満すると肝臓への脂肪蓄積も顕著となる。牛脂を摂取し続けることおよび減量・リバウンドという刺激が加わったことによって、肝臓への脂肪蓄積を助長し、肝臓でのタンパク質合成を阻害することでリポタンパク質の分泌を減少させ、その結果、リバウンド後の血中脂質が低下したことが推察された。

本研究では、牛脂および魚油のみで脂質エネルギー比を 30% に調整した食事を用いたこと、また、厳しい食事制限により減量期を再現したことにより、ウェイトリバウンドに及ぼす牛脂と魚油の影響の違いを明確に示すことができた。さらに、リバウンド期に牛脂を摂取していても、減量期の摂取油脂によって血中脂質の変化に差がみられたことから、牛脂と魚油の違いはリバウンド期のみでなく減量期間から影響を与えていることも示唆された。Schirmer & Phinney は、50 名の肥満者に、減量および維持期を実践させた後、 γ -リノレン酸を多く含む油脂

あるいはオリーブ油を多く含む油脂を1年間摂取させ、減量後の体重増加への影響を検討している²⁶⁾。この結果では、オリーブ油群に比べγ-リノレン酸群において、有意にリバウンド期における体重増加が抑制されたことが報告されている。γ-リノレン酸はn-6系脂肪酸であり、魚油に含まれるEPAおよびDHAはn-3系脂肪酸であるが、ヒトにおいても、摂取油脂の種類がリバウンドによる体重増加量に影響を及ぼすことを示唆する報告である。今後、ヒトでも本研究と同様の結果が得られるのか、さらなる研究が必要である。また、本研究により、魚油摂取の血中脂質調節作用だけでなく、肝臓内脂肪蓄積抑制効果も明らかになった。

わが国における魚介類の摂取量は、1997年の98gから2006年の80gまで、10年間に18gも減少している²⁷⁾。魚油の有効性に関するエビデンスが蓄積しつつある今日、日本古来の食文化を継承していくことの大切さを見直す必要があるだろう。

本研究を実施するにあたり、魚油(サンオメガDHA23)をご提供いただきました日油株式会社に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kawamoto R, Tomita H, Ohtsuka N, Inoue A, Kamitani A (2007) Metabolic syndrome, diabetes and subclinical atherosclerosis as assessed by carotid intima-media thickness. *J Atheroscler Thromb* **14**: 78-85.
- 2) Jardim PC, Gondim Mdo R, Monego ET, Moreira HG, Vitorino PV, Souza WK, Scala LC (2007) High blood pressure and some risk factors in a Brazilian capital. *Arq Bras Cardiol* **88**: 452-7.
- 3) Malmjöf K, Golozoubova V, Peschke B, Wulff BS, Refsgaard HH, Johansen PB, Cremers T, Rimvall K (2006) Increase of neuronal histamine in obese rats is associated with decreases in body weight and plasma triglycerides. *Obesity* **14**: 2154-62.
- 4) 健康・栄養情報研究会編(2007)平成16年国民健康・栄養調査報告. 第一出版, 東京.
- 5) Lombardo YB, Hein G, Chicco A (2007) Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids* **42**: 427-37.
- 6) Carpentier YA, Portois L, Malaisse WJ (2006) n-3 fatty acids and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* **83** (6 Suppl):1499S-504S.
- 7) Rossi AS, Lombardo YB, Lacorte JM, Chicco AG, Rouault C, Slama G, Rizkalla SW (2005) Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**: R486-94.
- 8) Yamazaki T, Nakamori A, Sasaki E, Wada S, Ezaki O (2007) Fish oil prevents sucrose-induced fatty liver but exacerbates high-safflower oil-induced fatty liver in ddy mice. *Hepatology* **46**: 1779-90.
- 9) Kudo N, Kawashima Y (1997) Fish oil-feeding prevents perfluorooctanoic acid-induced fatty liver in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **145**: 285-93.
- 10) Rustan AC, Christiansen EN, Drevon CA (1992) Serum lipids, hepatic glycerolipid metabolism and peroxisomal fatty acid oxidation in rats fed omega-3 and omega-6 fatty acids. *Biochem J* **283** (Pt 2): 333-9.
- 11) Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-7.
- 12) Stribosch AMR, Lee S, Arsenault AD, Andersson C, Gura MK, Bistrrian RB, Puder M (2008) Fish oil prevents essential fatty acid deficiency and enhances growth: clinical and biochemical implications. *Metabolism* **57**: 698-707.
- 13) Spielmann J, Shukla A, Brandsch C, Hirche F, Stangl GI, Eder K (2007) Dietary lupin protein lowers triglyceride concentrations in liver and plasma in rats by reducing hepatic gene expression of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Ann Nutr Metab* **51**: 387-92.
- 14) Li J, Nanayakkara A, Jun J, Savransky V, Polotsky VY (2007) Effect of deficiency in SREBP cleavage-activating protein on lipid metabolism during intermittent hypoxia. *Physiol Genomics* **31**: 273-80.
- 15) Korczyńska J, Stelmanska E, Nogalska A, Szolkiewicz M, Goyke E, Swierczynski J, Rutkowski B (2004) Upregulation of lipogenic enzymes genes expression in white adipose tissue of rats with chronic renal failure is associated with higher level of sterol regulatory element binding protein-1. *Metabolism* **53**: 1060-5.
- 16) Dentin R, Pégrier JP, Benhamed F, Fougère F, Ferré P, Fauveau V, Magnuson MA, Girard J, Postic C. (2004) Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* **279**: 20314-26.
- 17) Nakatani T, Kim HJ, Kaburagi Y, Yasuda K, Ezaki O (2003) A low fish oil inhibits SREBP-1 proteolytic cascade, while a high-fish-oil feeding decreases SREBP-1 mRNA in mice liver: relationship to anti-obesity. *J Lipid Res* **4**: 369-79.
- 18) Kim HJ, Takahashi M, Ezaki O (1999) Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. *J Biol Chem* **274**: 25892-8.
- 19) Hebbachi AM, Knight BL, Wiggins D, Patel DD, Gibbons GF (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency abolishes the response of lipogenic gene expression to re-feeding. Restoration of the normal response by activation of liver X receptor alpha. *J Biol Chem* **283**: 4866-76.
- 20) Torra IP, Chinetti G, Duval C, Fruchart JC, Staels B (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice. *Curr Opin Lipidol* **12** (3): 245-54.
- 21) Chinetti G, Fruchart JC, Staels B (2000) Peroxisome

- proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* **49**: 497–505.
- 22) Tanaka N, Sugiyama E, Aoyama T (2001) [Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha)]. *Nippon Rinsho* **59**: 296–300.
- 23) König B, Spielmann J, Haase K, Brandsch C, Kluge H, Stangl GI, Eder K (2008) Effects of fish oil and conjugated linoleic acids on expression of target genes of PPARalpha and sterol regulatory element-binding proteins in the liver of laying hens. *Br J Nutr* **21**: 1–9.
- 24) Neschen S, Morino K, Dong J, Wang-Fischer Y, Cline GW, Romanelli AJ, Rossbacher JC, Moore IK, Regittinig W, Munoz DS, Kim JH, Shulman GI (2007) n-3 Fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner. *Diabetes* **56**: 1034–41.
- 25) Hussain MM, Shi J, Dreizen P (2003) Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res* **44**: 22–32.
- 26) Schirmer MA, Phinney SD (2007) Gamma-linolenate reduces weight regain in formerly obese humans. *J Nutr* **137**: 1430–5.
- 27) 健康・栄養情報研究会編 (2009) 国民健康・栄養の現状—平成 18 年厚生労働省国民健康・栄養調査報告より—. 第一出版, 東京.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **63**: 69–77 (2010)

Original Paper

Fish Oil Suppresses Weight Gain and Fat Accumulation in the Liver on Weight Rebound in KK-*A^y* Mice

Yasuki Mochi,¹ Nobuyo Tsunoda,^{*1} Sachiko Shiba,¹ Etsuko Muraki¹
and Keizo Kasono¹

(Received May 19, 2009 ; Accepted December 14, 2009)

Summary: We investigated the effect of fish oil on weight rebound in KK-*A^y* mice. We used two types of experimental diet: one containing beef tallow (diet B) and one containing fish oil (diet F). All the mice were fed diet B *ad libitum* to induce obesity, and then divided into four groups as follows: 1) B-B group: fed diet B with calorie restriction during the weight reduction period, then fed diet B *ad libitum* during the weight rebound period, and—using the same protocol— 2) B-F group, 3) F-B group, and 4) F-F group. In addition, a control group were fed diet B *ad libitum* during the entire experimental period. Final body weight was decreased in the B-F and F-F groups in comparison with the B-B and F-B groups. Compared with the control group, liver weight and the level of liver lipid were increased in the B-B and F-B groups and decreased in the B-F and F-F groups. In the B-F and F-F groups, SREBP-1c and FAS mRNA in the liver were decreased and PPAR- α and HSL mRNA in the liver were increased, in comparison with the B-B and F-B groups. The present findings suggest that fish oil suppresses body weight gain and fat accumulation in the liver on weight rebound in mice. Suppression of fat accumulation in the liver is attributed to inhibition of fatty acid synthesis, enhancement of lipolysis and fatty acid oxidation, and normalization of lipoprotein secretion from the liver.

Key words: fish oil, weight rebound, fatty liver

* Corresponding author (E-mail : ntsunoda@josai.ac.jp)

¹ Department of Clinical Dietetics & Human Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Science, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama, Japan