

糖・脂質代謝改善に寄与する魚油成分の探索に関する研究

柴 様子

目次

総論の部

緒言

第 1 章 水素添加魚油を用いた魚油含有不飽和脂肪酸の役割に関する検討：

糖・脂質代謝に及ぼす影響

第 1 節 マウスにおける脂質代謝および糖質代謝に対する魚油に含まれる不飽和脂肪酸による作用の解析

第 2 節 マウスの肝臓および子宮周囲白色脂肪組織の脂肪酸分析および脂肪酸合成に関わる遺伝子発現量の解析

第 3 節 水素添加魚油食に必須脂肪酸を補足した実験における脂質分布への影響

第 4 節 本章の小括および考察

第 2 章 水素添加魚油を用いた魚油含有不飽和脂肪酸の役割に関する検討：

脂肪細胞の分化に及ぼす影響

第 1 節 マウスにおける子宮周囲白色脂肪組織の組織学的検討

第 2 節 マウスにおける子宮周囲白色脂肪組織の分化および酸化に関わる遺伝子および糖取り込みに関わる遺伝子の発現量の解析

第 3 節 本章の小括および考察

第 3 章 パルミトオレイン酸 (C16:1) の糖・脂質代謝改善作用に関する検討

第 1 節 マウスにおける糖質代謝に対するパルミトオレイン酸の影響

第 2 節 マウスにおける脂質代謝に対するパルミトオレイン酸の影響

第 3 節 マウスにおける子宮周囲白色脂肪組織の組織学的検討

第 4 節 本章の小括および考察

総括

謝辞

実験の部

第 1 章

第 2 章

第 3 章

引用文献

本論文で使用した略語一覧

- Akt : serin/threonine protein kinase, セリン/スレオニンプロテインキナーゼ
- BMI : body mass index, 体格指数
- DAG : diacylglycerol, ジアシルグリセロール
- DHA : docosahexaenoic acid, ドコサヘキサエン酸
- Elovl6 : fatty acid elongase 6, 脂肪酸伸長鎖酵素 6
- EPA : eicosapentaenoic acid, エイコサペンタエン酸
- FO : fish oil, 魚油
- GLUT4 : glucose transporter 4, 糖輸送担体 4
- H & E : hematoxylin and eosin, ヘマトキシリン・エオジン染色
- HFO : hydrogenated fish oil, 水素添加魚油
- HOMA-IR : Homeostasis model assessment-insulin resistance, インスリン抵抗性指数
- ITT : insulin tolerance test, インスリン負荷試験
- LF-SBO : low fat energy percent of soybean oil, 低脂質エネルギー比大豆油
(本論文では脂質エネルギー比 10%)
- NAFL : nonalcoholic fatty liver, 非アルコール性脂肪肝
- NAFLD : nonalcoholic fatty liver disease, 非アルコール脂肪性肝疾患
- NASH : nonalcoholic steatosis, 非アルコール性脂肪性肝炎
- NEFA : non-esterified fatty acids, 遊離脂肪酸
- OGTT : oral glucose tolerance test, 経口糖負荷試験
- PL : phospholipid, リン脂質
- PPARs : peroxisome proliferator activated receptor, ペルオキシソーム増殖活性化因子受容体
- SBO : soybean oil, 大豆油
- SCD1 : stearoyl CoA desaturase, 不飽和化酵素 1
- TC : total cholesterol, 総コレステロール
- TG : triglyceride, 中性脂肪
- VLDL : very-low density lipoprotein, 超低密度リポタンパク質
- WAT : white adipose tissue, 白色脂肪組織

総論の部

総論の部

緒言

わが国は、第二次世界大戦後、急速な経済復興と飛躍的な国民生活水準向上のため食糧事情や衛生状態が改善し、医療が発達したことにより、世界一の長寿国となった。しかし、感染症が減少した代わりに、生活様式の欧米化に伴い、肥満の増加、糖尿病、高血圧、動脈硬化などの関連病態を呈する患者数が増加し、医療福祉のみならず社会問題としても大きな影響を与える事態となっている。悪性新生物、心疾患、脳血管疾患の順に死亡順位の上位を占め、これらが死因の半数以上を占めている [1]。こうした背景の中、平成 12 年には『健康日本 21』が掲げられ、健康増進法が公布されたことで、国民の健康維持・増進の重要性の増大と健康への意識の見直しを図りつつある。

上述したような病態は、往々にして、単独ではなく合併して存在することが多い。過食や運動不足（身体活動の低下）といった生活習慣上の問題が一因で発症する糖尿病、高血圧、肥満、脂質異常症のような疾患を併せ持つ病態を、当初は「死の 4 重奏」「インスリン抵抗性症候群」「シンドローム X」など研究者によって様々に呼称されてきた。しかし、平成 17 年に入ると、これらはメタボリックシンドロームに統一され、その診断基準も作成されるに至った。平成 20 年国民健康・栄養調査結果によると、男性では約 50%、女性では約 20%においてメタボリックシンドロームが強く疑われる者、または予備群と推定され、40 歳以上から急速に増加している [2]。こうしたメタボリックシンドロームの根底には、肥満やインスリン感受性の低下が存在していると考えられている。それゆえ、肥満とインスリン感受性の低下の原因究明と予防法や治療法の確立がきわめて重要である。

メタボリックシンドロームに関連する疾患の発症・進行には、食習慣、身体活動（運動習慣）、休養、喫煙、飲酒等の生活習慣が密接に関わっているが、世界各国のもつ疾病構造や食文化を考慮すると、食の影響の大きいことが理解できる。昭和年代までのわが国では、一人

当りの魚介類摂取量は世界で最も高い水準にあり [3]、動脈硬化や心疾患などの代謝性疾患罹患率は低水準であった [4]。しかし、平成 19 年から魚介摂取量が肉類摂取量を下回るようになり、現在では魚介類の摂取量は、一人当たり約 14 g も減少するに至っている [2]。このような魚介類摂取量低下に伴う肉類摂取量増加が、わが国における代謝性疾患罹患率上昇の一因として考えられている。

魚は、特有の脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid ; EPA)、ドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid ; DHA) といった n-3 系多価不飽和脂肪酸を豊富に含む。EPA や DHA などの n-3 系多価不飽和脂肪酸の効能は、1970 年代、グリーンランドにおける Dyerberg らの疫学調査により初めて明らかにされた。彼らは、これら脂肪酸の豊富な海生動物や魚を多く食するエスキモー人の心疾患死亡率が極めて低いという事実から、その心疾患予防効果を見出した [5]。彼らにより、魚の摂取は心疾患や脳血管疾患などを予防する上で重要であることが報告されてから、魚や魚油の有効性に関する研究が急速に進んだ。近年では、魚油において脂質異常に対する効果が大きく、血栓症 [6]、動脈硬化症 [7]をはじめ、糖尿病 [8]、炎症性疾患 [9]、脳機能関連疾患 [10] など様々な疾患に対する予防や改善効果が臨床研究で明らかとなり、世界的に魚を摂取することが推奨され始めている。

先行研究において、魚油は糖・脂質代謝改善作用を有することが報告されている。魚油は、コレステロール調節領域結合蛋白質やペルオキシゾーム増殖活性化因子受容体 (peroxisome proliferator activated receptor ; PPARs) などを介し脂質代謝関連酵素活性を調節することで、肝臓におけるトリグリセリド (triglyceride ; TG) や総コレステロール (total cholesterol ; TC) の合成を減少させ [11-14]、血漿脂質低下作用や体重増加抑制作用を有する [15]。また魚油は、マウスにおいて糖代謝にも影響することも知られている [16, 17]。このような魚油の代謝調節作用は、魚油に含まれる EPA や DHA が担っていると考えられている。しかしながら、近年、ラットにおいて魚油による肝臓での脂肪酸酸化酵素への生理学的活性が EPA や DHA による活性だけでは再現できないという報告 [18] や、EPA や DHA 摂取マウスでは魚油による効果とは対照的に血糖値や血漿脂質濃度に効果が見られなかったとの報告があり [19]、魚油による糖・脂質代謝への作用が EPA と DHA による作用のみでは説

明できない結果が得られている。よって、魚油による糖・脂質代謝調節作用には、EPA や DHA による作用に加えて魚油に含まれる他の成分による効果もあることが推察されるが、その成分は同定されていないのが現状である。

以上のことから、本研究では、糖・脂質代謝に影響する魚油成分を探索することを目的とした。第 1 章では、糖・脂質代謝改善に寄与する魚油成分を調べるため、魚油の脂肪酸と同じ鎖長の脂肪酸を全て飽和させた水素添加魚油を用いて、魚油に含まれる不飽和脂肪酸による糖・脂質代謝への作用を明らかにした [20]。第 1 章において、水素添加魚油食摂取マウスの肝臓脂質量が増加していたにも関わらず耐糖能が悪化しなかったという予想外の結果も得られたため、第 2 章では、魚油および水素添加魚油の作用を脂肪細胞分化の観点から検討し、脂肪細胞で大きく変化した脂肪酸代謝や脂肪細胞サイズの変化が糖代謝の維持に寄与していることを見出した。第 3 章では、水素添加魚油食摂取マウスの体内でパルミトオレイン酸が増加していたという第 1 章の結果と、魚油中にパルミトオレイン酸が比較的多く含まれるという事実から、食物ではなく純度の高いパルミトオレイン酸単独を比較的低用量で経口投与した場合の効果について、魚油および EPA 摂取群を対照として比較検討し、魚油による糖・脂質代謝への有益な作用には EPA や DHA などの n-3 系多価不飽和脂肪酸に加えて、パルミトオレイン酸による作用も含まれることを明らかにした [21]。以下、検討結果を論じる。

第 1 章 水素添加魚油を用いた魚油含有不飽和脂肪酸の役割に関する検討：糖・脂質代謝に及ぼす影響

魚油は全脂肪酸の約 7 割が不飽和脂肪酸であり、EPA や DHA も不飽和脂肪酸である。よって、魚油の効果を担っている成分として、不飽和脂肪酸が有力であると考えた。しかし、不飽和脂肪酸のみの作用を検討するためには、既報のように魚油に豊富に含まれる EPA や DHA といった単独で購入可能な脂肪酸を各々使用する方法では、多数ある不飽和脂肪酸全ての作用を解析することは難しく、含量が少なく未知の不飽和脂肪酸は解析できない。不飽和脂肪酸のみを抽出することは工業的に極めて難しく困難であるという。そこで、不飽和脂肪酸をほぼ完全に除いた魚油を作成し、通常の魚油の作用と比較することで不飽和脂肪酸による作用を解析することとした。不飽和脂肪酸を除いた魚油は、工業的に大量生産が可能な水素添加を行うことで作成した。この方法であれば、不飽和脂肪酸の炭素鎖長を変えずにそのまま飽和脂肪酸に構造変化させた完全な水素添加魚油を用いることができる。これまでに部分的な水素添加魚油を用いて生体組織中の脂肪酸分析を行った実験が数例あるが [22-24]、これほど完全な水素添加魚油を用いた報告はなく、糖・脂質代謝調節作用を検討した報告もない。

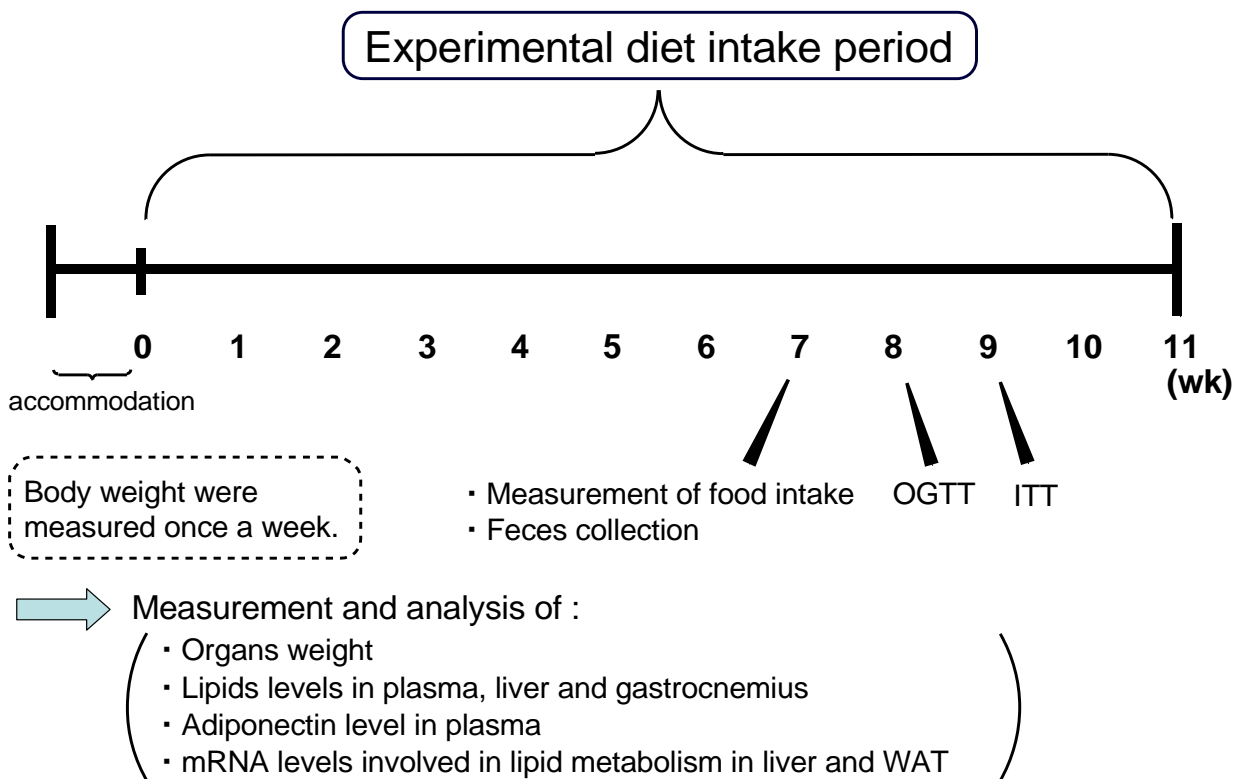
そこで、本章では、C57BL/6J 雌性マウスを用い、食餌誘導性糖・脂質代謝異常の改善効果を魚油と水素添加魚油で比較検討することにより、魚油の効果における魚油含有不飽和脂肪酸の役割について検討を行うこととした。

梅崎友美修士論文研究において、糖・脂質代謝への魚油含量の影響を脂質エネルギー比 10～50%まで比較検討した結果、脂質エネルギー比 50%の魚油食摂取マウスでは、インスリン感受性は維持されていたものの膵臓 β -細胞の障害が見られたことを見出している（梅崎友美修士 平成 18 年度修士論文発表）。この研究では、脂肪エネルギー比 40%を用いると、対照群であるサフラワー油では糖・脂質代謝異常を誘導でき、また魚油では膵臓 β -細胞の障害の少ないことがわかっている。そこで、本研究では、膵臓 β -細胞への障害の程度を抑えて魚油

の効果を検討でき、対照群において糖・脂質代謝異常が誘導できる食餌の脂質エネルギー比として、40%を用いることとした。

第 1 節 マウスにおける脂質代謝および糖質代謝に対する魚油に含まれる不飽和脂肪酸による作用の解析

実験のスケジュールを Scheme 1 に示す。実験食は、油脂源に魚油 (Fish oil; FO)、水素添加魚油 (Hydrogenated fish oil; HFO)、対照として大豆油 (Soybean oil; SBO) を用いた脂質エネルギー比 40%を含む AIN-93G 組成を基に調製した食餌とした。6 週齢の C57BL/6J 雌性マウスを 1 週間馴化後、5 匹ずつ 3 群に分け、各実験食を 11 週間自由摂取させた。実験食で使用した油脂の特徴を Table 1 に示す。実験食の特徴として、魚油は



Scheme 1. Experimental protocol in this study.

EPA や DHA などの n-3 系の多価不飽和脂肪酸を豊富に含み、水素添加魚油は魚油に含まれるこれらの不飽和脂肪酸と同じ鎖長の飽和脂肪酸を含む。一方、大豆油は n-6 系のリノール酸 (C18:2) を多く含む (Table 1)。

まず、実験飼育期間中の食餌摂取量および糞重量を比較した。結果を Table 2 に示す。食餌摂取量と糞重量は 3 群の中で HFO 群で有意に増加した ($P < 0.01$, Table 2)。そこで、各群における吸収エネルギー量が同じであるか確認するため、餌の物理的燃焼値を測定し、食餌摂取量を乗じて見かけ上の吸収エネルギー量を算出したところ、各群における有意差は見られず、同等量であった (Table 2)。この結果から、3 群ともに食餌の吸収エネルギー量は同程度であることが示され、HFO 群における食餌摂取量の増加は糞重量増加に伴うエネルギー排泄増加分を補うためであると考えられる。

Table 1. Profiles of dietary oils.

Fatty acid (%)	SBO	FO	HFO
14:0 (Myristic acid)	0.1	3.0	2.9
16:0 (Palmitic acid)	9.7	18.2	22.9
16:1 (Palmitoleic acid)	—	4.2	1.4
18:0 (Stearic acid)	3.7	4.9	26.4
18:1 n-9 (Oleic acid)	25.6	18.8	0.1
18:2 n-6 (Linoleic acid)	50.1	1.3	—
18:3 n-3 (α -Linolenic acid)	7.1	0.8	—
20:0 (Arachidic acid)	0.4	—	12.4
20:4 n-6 (Arachidonic acid)	0.1	2.0	—
20:5 n-3 (EPA)	—	6.8	—
22:0 (Behenic acid)	0.5	—	27.4
22:5 n-6 (Docosapentaenoic acid ; DPA)	—	—	—
22:6 n-3 (DHA)	—	22.8	—
S : M : P	15 : 26 : 57	10 : 10 : 14	95 : 2 : 0
n-6 / n-3 ratio	7.0	0.1	0
<i>trans</i> - fatty acid (%)	2	< 2	< 2

また、この 3 群は食餌油脂の脂肪酸に特徴があることから、1 日あたりに吸収された脂肪酸量 (g) とモル (mol) を調べた。SBO 群と比較して、吸収された脂肪酸量 (g) は FO 群と HFO 群において有意に減少したものの、モル (mol) は FO 群で減少し、HFO 群で増加した。これらの結果は、HFO 群では HFO 食中の短鎖の飽和脂肪酸をより多く取り込んだことを示している。

Table 2. Food intake, fecal weight and absorbed energy, absorbed fatty acids and body weight, liver and white adipose tissue (WAT) weight.

	SBO	FO	HFO
Food intake (g/ 5 mice per day)	13.0 ± 0.8 ^a	12.2 ± 0.4 ^a	17.8 ± 0.4 ^b
Fecal weight (g/ 5 mice per day)	1.3 ± 0.1 ^a	1.3 ± 0.1 ^a	4.3 ± 0.1 ^b
Absorbed energy (kcal/ 5 mice per day)	51.2 ± 3.5	50.8 ± 1.7	52.2 ± 1.8
Absorbed fatty acids (g/ 5 mice per day)	2.0 ± 0.1 ^a	1.5 ± 0.1 ^b	1.3 ± 0.1 ^b
Absorbed fatty acids (mmol/ 5 mice per day)	8.5 ± 0.5 ^a	6.6 ± 0.2 ^b	11.0 ± 0.2 ^c
Initial body weight (g)	17.9 ± 0.4	17.7 ± 0.5	17.9 ± 0.4
Final body weight (g)	27.4 ± 2.6 ^a	21.6 ± 0.3 ^b	22.5 ± 0.7 ^b
Body weight gain (g)	9.5 ± 2.3 ^a	3.9 ± 0.3 ^b	4.6 ± 0.4 ^b
WAT weight (g/mouse)	0.7 ± 0.2 ^a	0.2 ± 0.0 ^b	0.2 ± 0.0 ^b
Liver weight (g/mouse)	0.9 ± 0.1 ^a	0.9 ± 0.0 ^a	1.4 ± 0.1 ^b

Food intake and the amount of feces were simultaneously measured for 4 days around 7 wk. Each data point represents the mean ± SE of 5 mice for 4 days. ^{a, b, c} Values not sharing the same superscript are significantly different at $P < 0.05$ by Fisher's PLSD test. Mice were sacrificed after a 4-h fast, and WAT and liver weights were measured at 11 wk. Each data point represents the mean ± SE of 5 mice. ^{a, b} Values not sharing the same superscript are significantly different at $P < 0.05$ by Fisher's PLSD test.

飼育期間の最終体重および体重増加量は、SBO 群と比較して FO 群と HFO 群で有意に減少した ($P < 0.05$, Table 2)。子宮周囲白色脂肪組織 (White adipose tissue ; WAT) 重量

は、最終体重と相関して SBO 群に比べ、FO 群と HFO 群で有意に減少した (Table 2)。しかし、肝臓重量は、3 群の中で HFO 群において有意に増加した ($P < 0.05$, Table 2)。

魚油は脂質代謝改善作用を持つことから、脂質代謝における魚油の不飽和脂肪酸の作用を調べた。血漿脂質濃度、肝臓中および骨格筋 (腓腹筋) 中の脂質量の結果を Table 3 に示す。血漿 TG 濃度は、HFO 群において他群と比較して有意に減少した ($P < 0.05$, Table 3)。血漿 TC 濃度は、SBO 群と比較して、FO 群および HFO 群で有意に減少した ($P < 0.05$, Table 3)。一方、血漿遊離脂肪酸 (non-esterified fatty acids ; NEFA) 濃度に、3 群間での差は見られなかった ($P < 0.05$, Table 3)。肝臓中の脂質量において、総脂質量、TG、TC、NEFA 量は、SBO 群と比較して FO 群で有意差は認められなかったが、HFO 群では他群と比較して有意に増加した ($P < 0.05$, Table 3)。よって、HFO 群での肝臓重量の増加は、肝臓中への脂質蓄積が原因であることが示唆された。さらに、腓腹筋中の脂質量を測定したところ、総脂質量は、SBO 群と比較して FO 群および HFO 群において増加する傾向が見られた ($P = 0.1$, Table 3)。TG 量と NEFA 量においては、3 群間での差は見られなかったものの、TC 量は FO 群で有意に増加した ($P < 0.05$, Table 3)。

以上のことから、脂質代謝において、魚油摂取は肝臓中脂質量を増加させずに血漿脂質濃度を減少させるのに対し、水素添加魚油摂取は血漿脂質濃度を減少させるが、血漿 TG 濃度を魚油摂取以上に低下させ、肝臓中脂質量を増加させてしまうことから、魚油中の不飽和脂肪酸は、血漿と肝臓における脂質量、特に TG 量を正常に保つ作用のあることが示唆された。また魚油は、糖代謝や耐糖能を改善させることが知られていることから [16, 17]、耐糖能への魚油による作用を調べるため、実験食摂取 8 週目に経口糖負荷試験 (Oral glucose tolerance test ; OGTT)、9 週目にインスリン負荷試験 (Insulin tolerance test ; ITT) を実施した。OGTT では、6 時間絶食下にて 1 mg/g body weight で D-グルコース溶液を経口投与し、投与前 (0 分)、投与後 15、30、60、120 分の 5 時点にて尾静脈より血糖値を測定した。ITT では、0.75 mU/g body weight でインスリン溶液を腹腔内投与し、投与前 (0 分)、投与後 10、20、30 分の 4 時点にて尾静脈より血糖値を測定した。結果を Figure 1 に示

す。OGTT、ITT とともに、全ての時点における血糖値に 3 群間での有意差は見られなかった (Figure 1 A, B)。

Table 3. Lipids levels in plasma, liver and gastrocnemius.

	SBO	FO	HFO
<i>Plasma</i>			
TG (mmol/L)	0.48 ± 0.04 ^a	0.40 ± 0.05 ^a	0.26 ± 0.05 ^b
TC (mmol/L)	1.64 ± 0.23 ^a	0.96 ± 0.07 ^b	1.14 ± 0.07 ^b
NEFA (mmol/L)	0.42 ± 0.06	0.35 ± 0.03	0.38 ± 0.04
<i>Liver</i>			
Total lipid (g/liver)	0.08 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.02 ^b
TG (μmol/liver)	39.7 ± 7.2 ^a	26.3 ± 4.3 ^a	66.3 ± 8.8 ^b
TC (μmol/liver)	9.1 ± 0.9 ^a	7.2 ± 0.2 ^a	18.0 ± 2.6 ^b
NEFA (μmol/liver)	7.7 ± 0.7 ^a	6.5 ± 0.3 ^a	12.9 ± 1.3 ^b
<i>Gastrocnemius</i>			
Total lipid (mg/gastrocnemius)	1.91 ± 0.11	3.56 ± 0.66	3.10 ± 0.53
TG (μmol/gastrocnemius)	1.16 ± 0.33	0.84 ± 0.09	0.54 ± 0.05
TC (μmol/gastrocnemius)	0.41 ± 0.00 ^a	0.52 ± 0.02 ^b	0.42 ± 0.02 ^a
NEFA (μmol/gastrocnemius)	1.00 ± 0.03	1.08 ± 0.05	0.99 ± 0.03

Mice fed each diet for 11 wk were sacrificed after a 4-h fast at 11 wk, and insulin levels in plasma, TG, TC, NEFA levels in plasma and the liver, total lipid levels in the liver and gastrocnemius were measured. Each data point represents the mean ± SE of 5 mice. ^{a, b} Values not sharing the same superscript are significantly different at $P < 0.05$ by Fisher's PLSD test.

さらに、11 週目の屠殺時の 4 時間絶食下における血糖値を測定したところ、SBO 群と比較して FO 群、HFO 群で有意に減少した ($P < 0.05$, Table 4)。しかし、血漿インスリン濃度とインスリン抵抗性指標の Homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) は、3 群間で有意差を認めなかった (Table 4)。インスリン感受性に関わる血

漿アディポネクチン濃度を測定したところ、SBO 群と比較して FO 群では増加傾向 ($P = 0.1$, Table 4) が見られたが、HFO 群は SBO 群と同程度であり、FO 群のような増加は見られなかった。

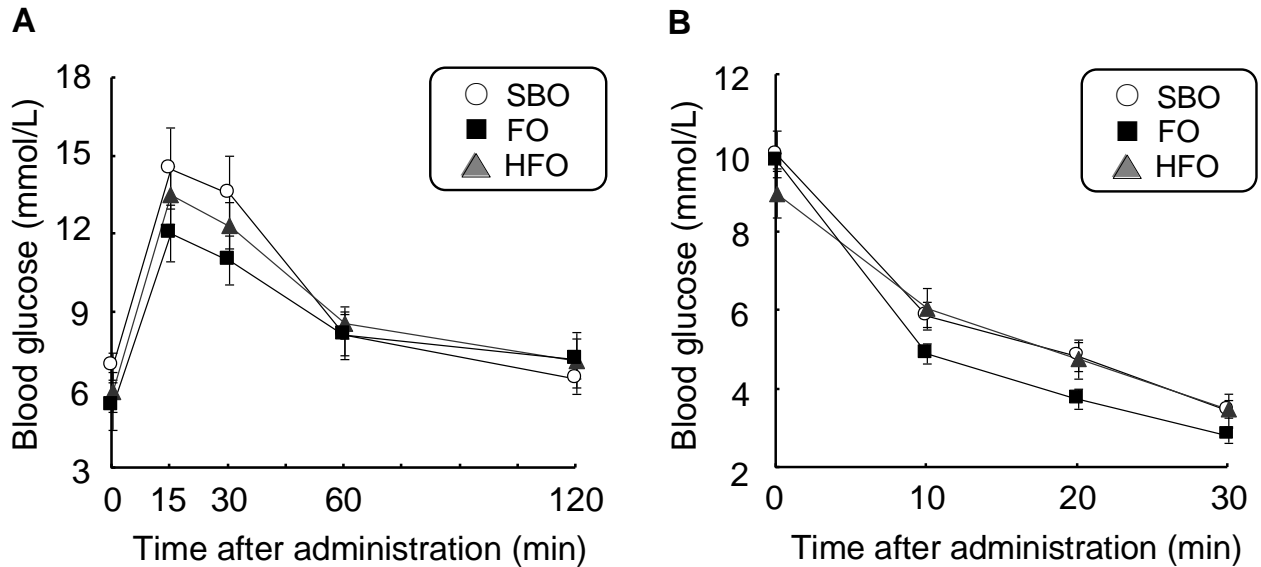


Figure 1. OGTT and ITT. (A) Oral glucose tolerance test (OGTT). Mice after a 6-h fast were administered D-glucose (1 mg/g body weight) orally at 8 wk. Blood glucose levels were measured at indicated times. Each data point represents the mean \pm SE of 5 mice. (B) Insulin tolerance test (ITT). Mice were administered insulin (0.75 mU/g body weight) intraperitoneally at 9 wk. Blood glucose levels were measured at indicated times. Each data point represents the mean \pm SE of 4 to 5 mice.

Table 4. Blood glucose, plasma insulin level and HOMA-IR.

	SBO	FO	HFO
Blood glucose (mmol/L)	7.06 ± 0.37 ^a	5.64 ± 0.42 ^b	5.80 ± 0.24 ^b
Plasma insulin (pmol/L)	87.2 ± 17.0	80.1 ± 24.9	94.9 ± 22.9
HOMA-IR	4.6 ± 1.0	3.5 ± 1.3	4.1 ± 1.1
Plasma adiponectin (µg/mL)	16.8 ± 2.0	26.6 ± 4.0	16.6 ± 2.3

Blood glucose levels were measured before sacrificed. Mice fed each diet for 11 wk were sacrificed after a 4-h fast at 11 wk, and insulin and adiponectin levels in plasma were measured. Each data point represents the mean ± SE of 5 mice. ^{a, b} Values not sharing the same superscript are significantly different at $P < 0.05$ by Fisher's PLSD test.

以上のことから、糖代謝においては、対照群である SBO 群と FO 群との間に、血漿インスリン濃度および HOMA-IR の値を変化させる程の差が認められなかったため、明確に魚油の不飽和脂肪酸の役割を示すことはできなかった。なお、魚油および水素添加魚油摂取により 4 時間絶食下における血糖値が減少していたことから、これらの群で糖代謝が改善する可能性が考えられたが、魚油と水素添加魚油間での差異はなく、魚油の不飽和脂肪酸の関与は少ないことが示唆された。アディポネクチン値においては、魚油摂取によって増加傾向が認められたにもかかわらず水素添加魚油摂取では認められなかったことから、魚油の不飽和脂肪酸がアディポネクチン値上昇に関与している可能性が考えられた。加えて、驚くべきことに、一般的に肝臓中脂質量が増加すると耐糖能は悪化すると考えられているが [25]、水素添加魚油摂取により肝臓中脂質量が著しく増加したにもかかわらず、OGTT や ITT、絶食時の血糖値が魚油摂取と同程度に保たれるという予想外の結果が得られた。

第 2 節 マウスの肝臓中および子宮周囲白色脂肪組織の脂肪酸分析および脂肪酸合成に関わる遺伝子発現量の解析

第 1 節において、魚油の不飽和脂肪酸は、血漿と肝臓の両組織における脂質、特に TG 量のバランスを維持する作用を持つことが明確に示され、さらに興味深いことに、水素添加魚油摂取によって肝臓中脂質量は増加するものの糖代謝は悪化しないことが示された。最近では、組織中の脂肪酸組成もまた糖代謝に影響を与えることが報告されている [26]。そこで本節では、脂質代謝に大きな影響を与える肝臓と WAT における脂肪酸組成および脂肪酸代謝に関わる遺伝子発現量を測定することとした。

第 1 節と同条件のもと FO、HFO、SBO を摂取させた C57BL/6J 雌性マウスを用いた。第 1 節において、HFO 群で糞重量が増加していたことから (Table 2)、組織中の脂肪酸組成を検討するにあたり、まず糞中の脂肪酸組成を解析した。結果を Figure 2 に示す。

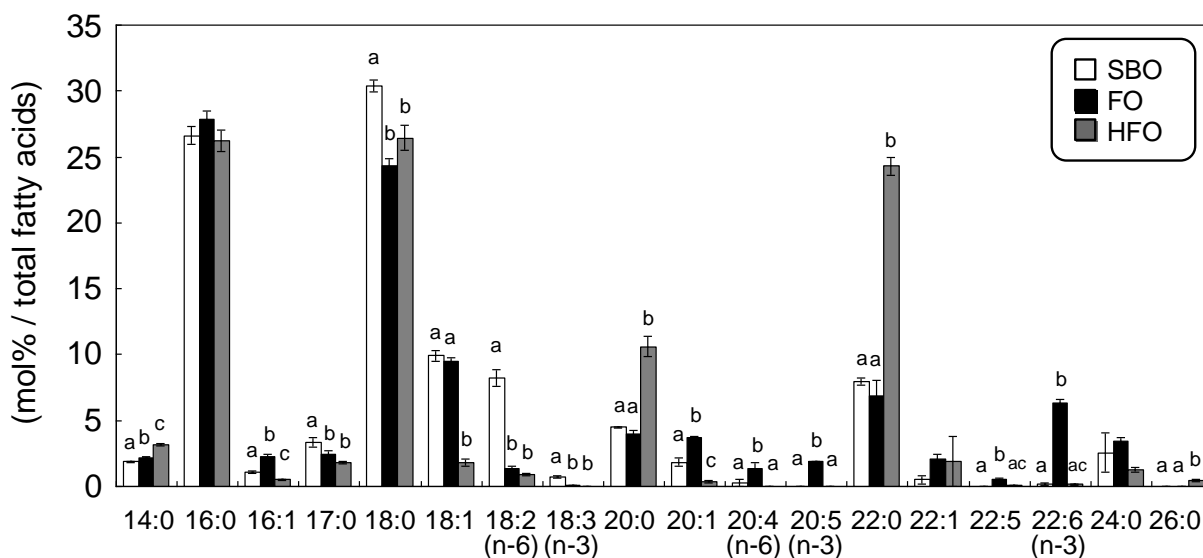


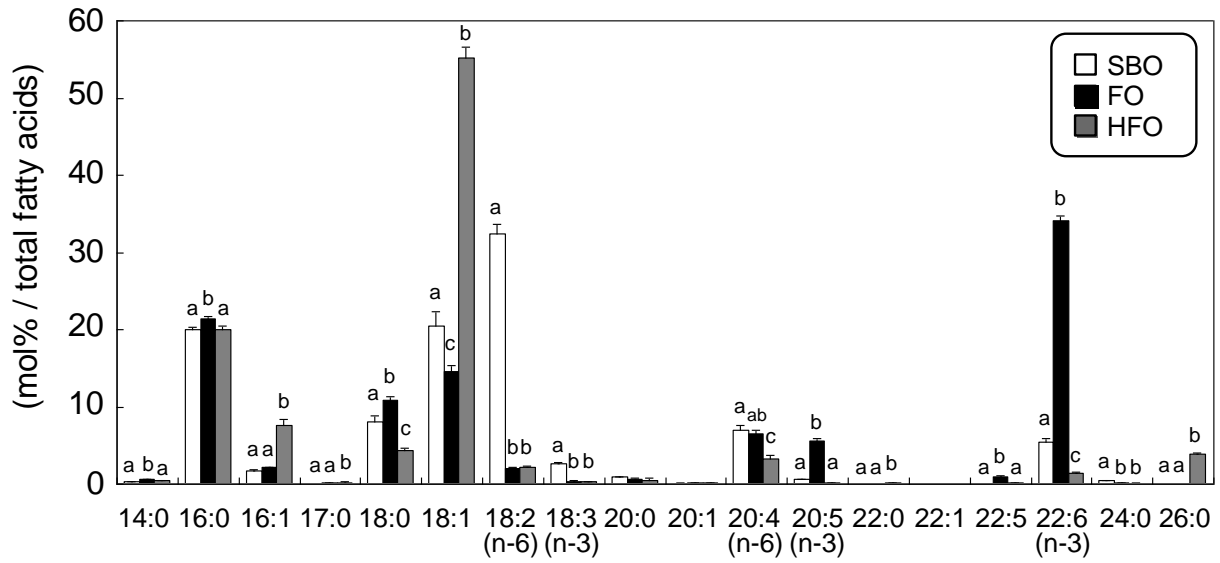
Figure 2. Fatty acids composition in feces. Fatty acids in feces were measured by gas chromatography. Each data point represents the mean \pm SE of 5 mice. The open column shows the SBO group, closed column shows the FO group, and shaded columns is the HFO group. ^{a, b, c} Values not sharing the same superscript are significantly different at $P < 0.05$ by Fisher's PLSD test.

3 群の中で HFO 群において、ミリスチン酸 (C14:0)、アラキジン酸 (C20:0)、ベヘン酸 (C22:0)、デカン酸 (C26:0) が有意に増加した ($P < 0.05$, Figure 2)。一方で、SBO 群と比較して HFO 群および FO 群の両群では、パルミチン酸 (C16:0) に差は見られなかったものの、ステアリン酸 (C18:0) が有意に減少した ($P < 0.05$, Figure 2)。このことは、HFO 群では、多く含有されている飽和脂肪酸を単に排出していたのではなく、必要な脂肪酸を体内に保持したことが推察される。さらに、水素添加魚油の脂肪酸はほぼ飽和脂肪酸であるが、糞中に排泄された脂肪酸の中には、飽和脂肪酸だけでなく、不飽和脂肪酸も含まれていたことから、肝臓や WAT など脂質代謝の主要な組織において脂肪酸代謝が大きく変化していることが示唆された。

次に肝臓および WAT における脂肪酸組成と脂肪酸代謝に関わる遺伝子発現量を解析した。その結果を Figure 3 に示す。肝臓では、3 群の中で HFO 群において、パルミトオレイン酸 (C16:1)、オレイン酸 (C18:1)、デカン酸 (C26:0) が有意に増加した ($P < 0.05$, Figure 3A)。WAT における脂肪酸組成では、3 群の中で HFO 群において C16:1 と C18:1 が有意に増加した ($P < 0.05$, Figure 3B)。

HFO 群では、糞中と同様に肝臓や WAT においても、食餌中にはほとんど含まれない不飽和脂肪酸が増加していた。そこで、この要因を調べることにした。HFO 群において、肝臓中で一価不飽和脂肪酸のパルミトオレイン酸 (C16:1) とオレイン酸 (C18:1) が増加していたことから、これらの脂肪酸代謝に重要な役割を担う酵素として知られる脂肪酸鎖長伸長化酵素 (fatty acid elongase 6 ; Elovl6) と不飽和化酵素 (stearoyl-CoA desaturase ; SCD1) の遺伝子発現量を調べた。これらの酵素が機能する脂肪酸代謝経路を Figure 4 に示す。また、Elovl6 と SCD の遺伝子発現量の結果を Figure 5 に示す。

A : Fatty acids composition in Liver



B : Fatty acids composition in WAT

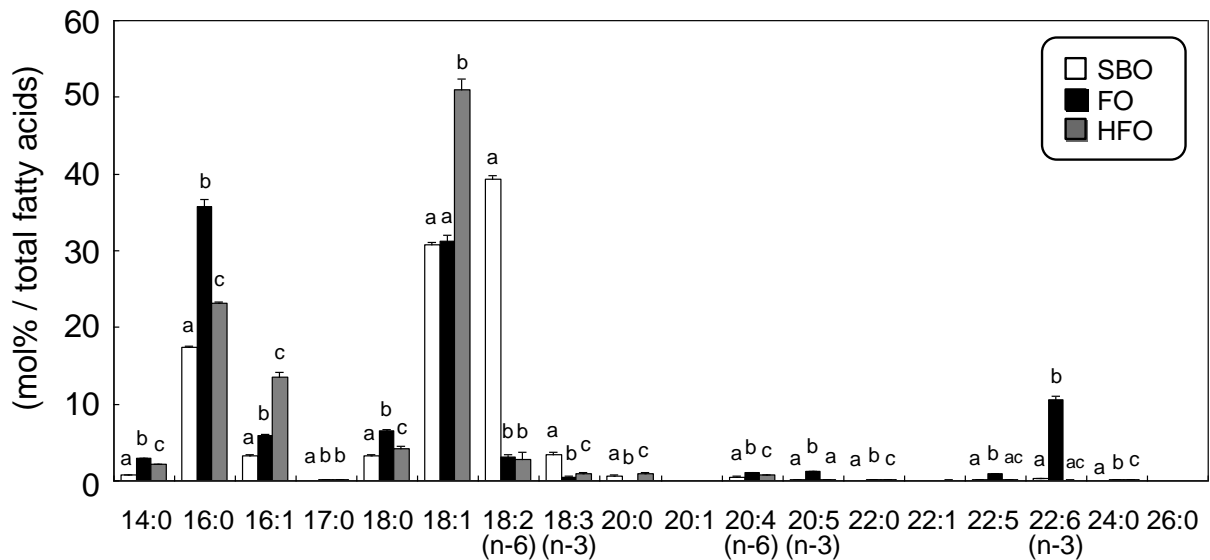


Figure 3. Fatty acid compositions in liver (A) and WAT (B). Fatty acids in liver and WAT were measured by gas chromatography. Each data point represents the mean \pm SE of 5 mice. The open column shows the SBO group, closed column shows the FO group, and shaded columns is the HFO group. ^{a, b, c} Values not sharing the same superscript are significantly different at $P < 0.05$ by Fisher's PLSD test.

肝臓中の Elov16 の遺伝子発現量は、SBO 群と比較して FO 群と HFO 群において減少した (Figure 5A)。しかし、対照的に WAT 中の Elov16 の遺伝子発現量は HFO 群において SBO 群と FO 群よりも増加した。一方、肝臓と WAT の SCD1 遺伝子発現量は、FO 群、SBO 群と比較して HFO 群において著しく増加した (Figure 5B)。これらの結果から、FO 群に比べ HFO 群において、肝臓では鎖長伸長は同程度で不飽和化のみが亢進していたが、WAT ではどちらも亢進していることが示された。

このことから、HFO 群では Elov16、SCD1 の遺伝子発現量の増加により鎖長伸長や不飽和化を亢進させ、パルミトオレイン酸とオレイン酸のような一価不飽和脂肪酸を多く合成していることが示唆された。

さらに、Elov16 および SCD の作用を示すために、ステアリン酸 (C18:0) とパルミチン酸 (C16:0) 比率、オレイン酸 (C18:1) とパルミトオレイン酸 (C16:1) 比率、C16:1 と C16:0 比率、C18:1 と C18:0 比率を表し、どの脂肪酸の合成量が増加したのかを調べた。結果を Figure 6 に示す。肝臓および WAT における C18:0 と C16:0 比率、C18:1 と C16:1 比率は Elov16 の作用を反映し、C16:1 と C16:0 比率、C18:1 と C18:0 比率は SCD の作用を反映している。その結果、肝臓および WAT の HFO 群において C16:1 と C16:0 比率、C18:1 と C18:0 比率が有意に増加し、加えて、HFO 群の WAT において C18:1 と C16:1 比率が有意に低下した (Figure 6A, B, $P < 0.05$)。これらの脂肪酸比率の結果から、HFO 群では他群と比較して、よりパルミトオレイン酸を合成したことが示された。

よって、HFO 食の摂取は、肝臓および WAT で Elov16、SCD1 を介してパルミトオレイン酸とオレイン酸を合成し、さらには肝臓よりも WAT において脂質代謝を大きく変化させたことが示唆された。

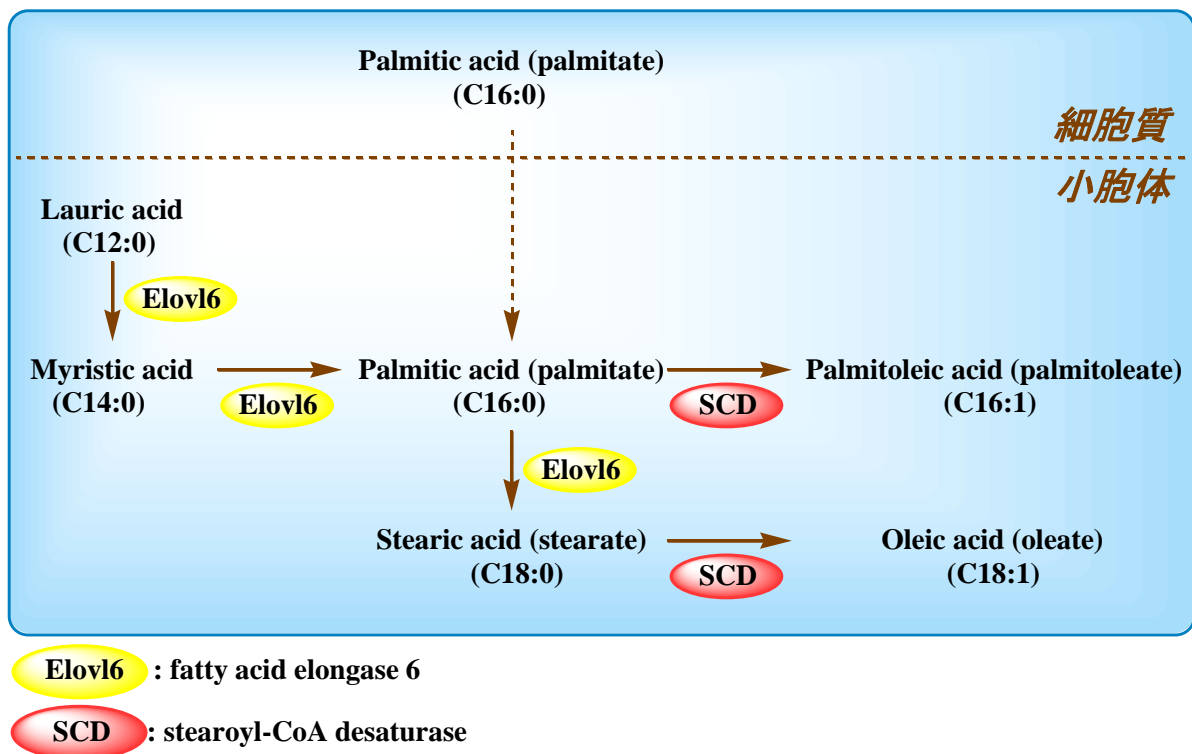


Figure 4. Function of Elov6 and SCD *in vivo*.

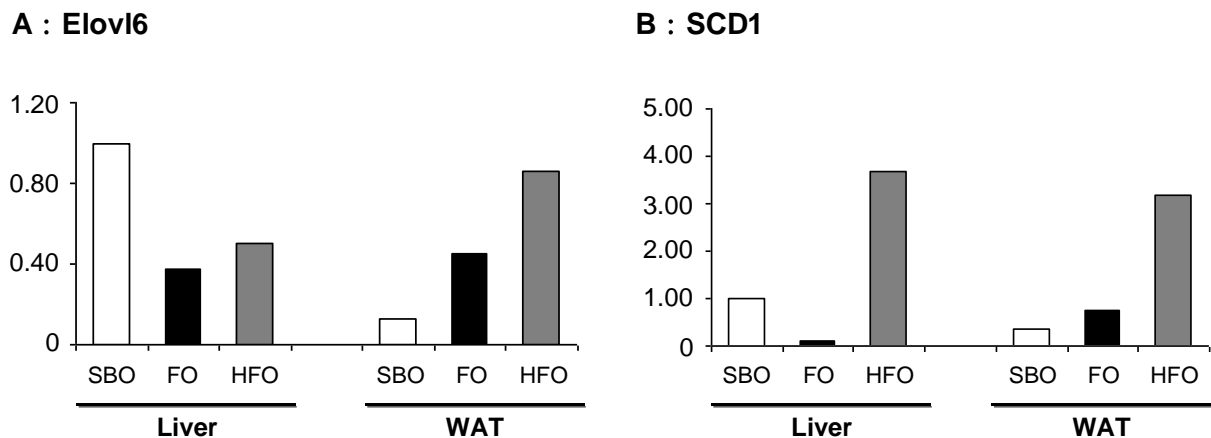
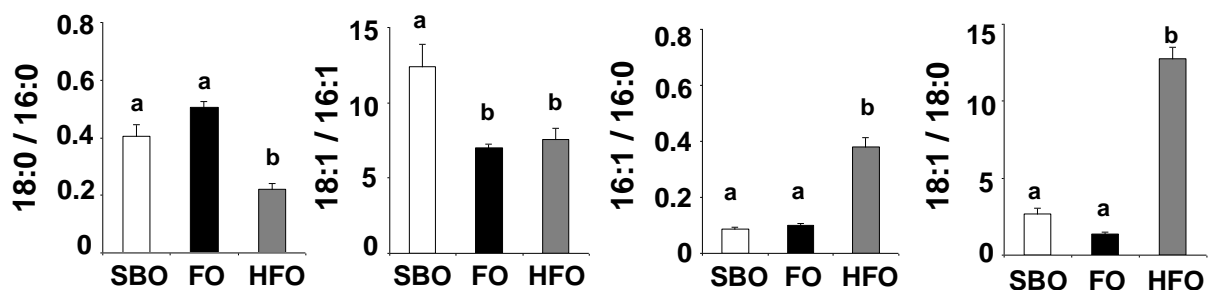


Figure 5. Real-time RT-PCR of mRNA involved fatty acid metabolism in the liver and WAT.

Mice fed each diet for 11 wk were sacrificed after a 4-h fast, and livers or WAT samples from five mice in each group were mixed, and total RNA was extracted. Quantitative real-time RT-PCR analysis was performed using total RNA extracted from the liver or WAT. Elov6 (A) and SCD1 (B) mRNA levels in the liver and WAT of the SBO, FO and HFO groups. Levels of mRNA are represented as ratios to each liver mRNA level in the SBO group.

A : Liver



B : WAT

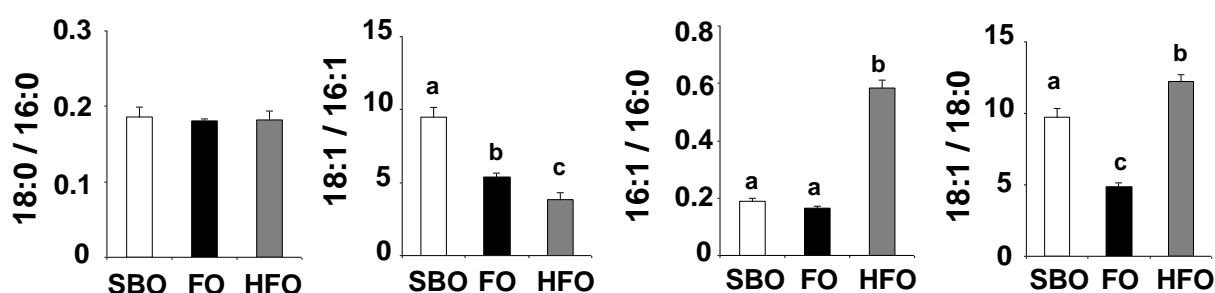


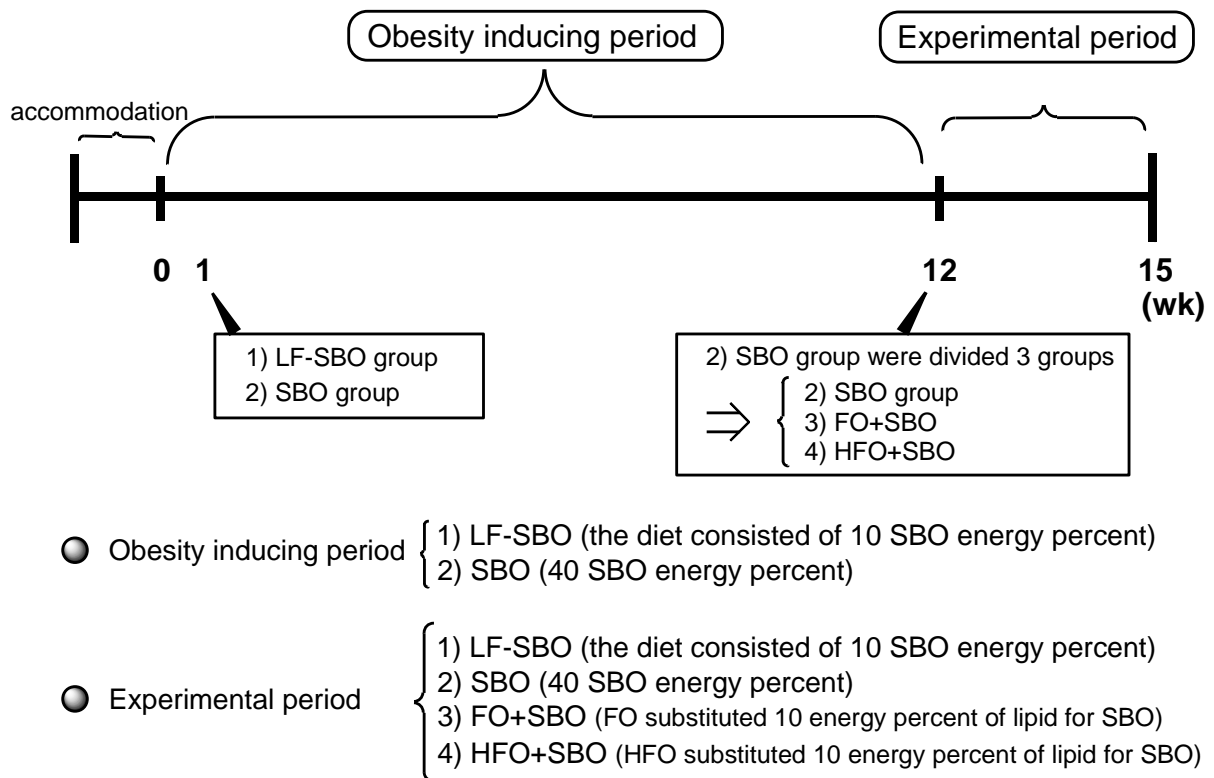
Figure 6. The ratio of stearic acid (C18:0) to palmitic acid (C16:0), oleic acid (C18:1) to palmitoleic acid (C16:1), C16:1 to C16:1 and C18:1 to C18:0 in the liver (A) and WAT (B). Each data point represents the mean \pm SE of 5 mice. The open column shows the SBO group, closed column shows the FO group, and shaded columns is the HFO group. ^{a, b, c} Values not sharing the same superscript are significantly different at $P < 0.05$ by Fisher's PLSD test.

第 3 節 水素添加魚油食に必須脂肪酸を補足した実験における脂質分布への影響

HFO 食は、必須脂肪酸（リノール酸、 α -リノレン酸）をほとんど、あるいは、全く含んでいない。よって、HFO 食を長期にわたり摂取した場合、必須脂肪酸欠乏を生じる可能性を否定できない。そこで、必須脂肪酸を補足するため食餌の脂質エネルギー比 40%のうち 10%分を SBO で置き換えた実験を行った（この成果は、伊藤加奈子学士による平成 20 年

度卒業論文発表データに基づいている)。その際、魚油および水素添加魚油の効果を比較検討するために、あらかじめ高脂肪食摂取による肥満と糖・脂質代謝異常を引き起こしておくことにした。実験計画を Scheme 2 に示す。

まず、脂質エネルギー比 40%の SBO 食(SBO)と脂質エネルギー比 10%の SBO 食(Low fat energy percent of SBO ; LF-SBO)の各々をマウスに 12 週間摂取させた(肥満誘導期)。その後、SBO 群を 1) 脂質エネルギー比 30% FO + 脂質エネルギー比 10% SBO (FO+SBO) 群、2) 脂質エネルギー比 30% HFO + 脂質エネルギー比 10% SBO (HFO+SBO) 群に分け、3 週間摂取させた(実験期)。



Scheme 2. Experimental protocol in this supplementary study.

肥満誘導期の最終体重と体重増加量の結果を Table 5 に示す。最終体重と体重増加量は、LF-SBO 群と比較して SBO 群において有意に増加した。次に、実験期における最終体重および体重増加量と、WAT および肝臓重量を Table 6 に示す。FO+SBO 群と比較して、HFO+SBO 群において最終体重および体重増加量、WAT 重量は有意に減少した。また、血漿 TG、TC 濃度と肝臓中 TG、TC 量を Table 6 に示す。FO+SBO 群と比較して HFO+SBO 群において、血漿 TG 濃度は有意に減少し、肝臓中総脂質量および TG 量は有意に増加した。

これらの結果は、第 1 節における HFO 群の結果と同様の結果であったことより、第 1 節の結果は必須脂肪酸欠乏によってもたらされた結果ではなく、HFO 摂取による影響であることが示された。

Table 5. Body weight in the obesity inducing period in the supplementary experiment

	LF-SBO	SBO
Initial body weight (g)	19.3 ± 0.4	19.3 ± 0.2
Final body weight (g)	27.2 ± 0.9	30.2 ± 1.0 *
Body weight gain (g)	7.9 ± 0.8	10.9 ± 0.8 *

Control group was fed LF-SBO and other mice were fed SBO for 12 wk to induce obesity. Data is shown as the mean ± SE of 4 mice. Astarisks indicate the significant difference at $P < 0.05$ by Student's t test between the LF-SBO and the SBO groups.

Table 6. Body weight and lipid levels in plasma and liver in the experimental period in the supplementary experiment

	FO+SBO	HFO+SBO
Initial body weight (g)	30.2 ± 0.7	30.2 ± 1.7
Final body weight (g)	31.3 ± 0.9	26.8 ± 0.9*
Body weight gain (g)	1.1 ± 0.8	-3.5 ± 1.0*
WAT weight (g)	1.3 ± 0.1	0.7 ± 0.2*
Liver weight (g)	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.3
Plasma		
TG (mmol/L)	0.52 ± 0.1	0.26 ± 0.0**
TC (mmol/L)	1.36 ± 0.1	1.42 ± 0.2
Liver		
Total lipid (g/liver)	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.01*
TG (μmol/liver)	32.6 ± 2.8	48.9 ± 3.7*

Diet induced obese mice fed SBO for 12 wk were divided into two groups, and fed FO+SBO and HFO+SBO for an additional 3 wk. Mice were sacrificed after 4-h fast at 15wk. WAT and liver weights, TG, TC levels in plasma and total lipid, TG levels in liver were measured. Data is shown as the mean ± SE of 3-4 mice. Astarisks indicate the significant difference at $P < 0.05$ by Student's t test between the FO+SBO and the HFO+SBO groups.

第 4 節 本章の小括および考察

本章では、魚油中の不飽和脂肪酸と同じ鎖長の飽和脂肪酸を含む水素添加魚油を用いることで、マウスにおける糖・脂質代謝改善への不飽和脂肪酸の作用を検討した。その結果、魚油が血漿 TG 濃度と肝臓中 TG 量の両方を低下させた一方、水素添加魚油では血漿 TG 濃度をさらに低下させ、その分、肝臓中 TG 量を著しく増加させた。このことから、魚油に含

まれる不飽和脂肪酸は、血漿 TG 濃度が低下し過ぎないように、また肝臓へ蓄積し過ぎないように調節する働き、つまり血液と肝臓中の TG 量のバランスを維持する働きを担う主要な成分であることを見出した。

先行研究において、魚油は血漿 TG 濃度や肝臓中 TG 量を減少させることが数多く報告されている [11, 17]。特に、魚油は肝臓において強力な脂質低下作用を有し、魚油および n-3 系多価不飽和脂肪酸が非アルコール性脂肪肝を改善させたとの報告もされている [27]。本研究において、HFO 群における肝臓中脂質（総脂質、TG、TC、NEFA）量は顕著に増加したが、一方で血漿 TG 濃度は FO 群以上に減少した。HFO 群と同様に飽和脂肪酸を豊富に含む牛脂食を摂取したマウスでは、血漿と肝臓中両方の TG 量が増加したと報告されている [28]。また、部分的あるいは不完全な水素添加魚油食を摂取したマウスにおいては、血漿 TG 濃度は低下するが肝臓中 TG 量には変化が見られないとの報告がある [29]。一方で、オレイン酸を豊富に含む食事では、very-low density lipoprotein (VLDL) の肝臓からの分泌量が減少することにより、血漿 TG 濃度は減少し、肝臓中 TG 量は増加することが報告されている [30, 31]。この報告の TG 量変化は、本研究と同様の結果であった。本研究でも、HFO 群の肝臓および WAT でオレイン酸量が顕著に増加していたことから、HFO 群におけるオレイン酸が血漿 TG 濃度の減少および肝臓中 TG 量の増加に起因している可能性がある。以上の結果から、魚油に含まれる不飽和脂肪酸および組織で合成される不飽和脂肪酸は、肝臓中 TG 量を減少させ、血漿および肝臓両組織間の TG 量を維持していると推測される。

一方で、体重および WAT 重量、血漿 TC 濃度に関しては、SBO 群と比較して FO 群と同程度に HFO 群においても減少した。本章での脂肪酸解析において、HFO 群の肝臓および WAT ではパルミトオレイン酸とオレイン酸が顕著に増加した。HFO 群の肝臓と WAT において SCD1 の遺伝子発現量が増加していたことから、これらの一価不飽和脂肪酸は、SCD1 の作用により、飽和脂肪酸から *de novo*（新規合成）合成されたと推測できる。最近の研究において、パルミトオレイン酸を豊富に含むマカダミアナッツを摂取した人では体重

と body mass index (BMI) が減少すると報告された [32]。さらに、脂肪組織でのパルミトオレイン酸の新規合成は、肝臓での脂質生成の抑制および β -酸化の亢進に繋がることも報告されている [26]。以上のことから、パルミトオレイン酸を含む食事 (食餌) およびパルミトオレイン酸の新規合成が、肝臓および WAT における脂質分解と β -酸化を亢進させることによって体重と WAT 重量の減少を導く可能性が示唆される。

糖代謝においては、HFO 群の肝臓に TG が蓄積されていたため耐糖能は悪化するものと予想された。しかし、第 1 節における OGTT と ITT の結果から、どの時点においても血糖値に 3 群間での差は見られなかった。多価不飽和脂肪酸、パルミトオレイン酸やオレイン酸のような一価不飽和脂肪酸は、糖代謝および耐糖能を改善させることが報告されている [26, 33, 34]。また、パルミトオレイン酸は serin/threonine protein kinase (Akt) のリン酸化を介して肝臓中のインスリンシグナルを増加させることも報告されている [33]。これらのことから、本研究結果は、マウスにおいて脂肪組織で新規に合成されたパルミトオレイン酸が血中に分泌され、骨格筋でのインスリン作用を増加させる可能性を示唆している [26]。また、人において、オレイン酸豊富な食事によって血糖値が低下することも示されている [34, 35]。それゆえ、組織で新規に合成されたパルミトオレイン酸やオレイン酸が糖代謝を改善したと推測された。

インスリン感受性に関わる血漿アディポネクチン濃度に関しては、FO 群で増加傾向が見られたものの HFO 群では SBO 群と差が認められなかったことから、血漿アディポネクチン濃度の上昇には魚油の不飽和脂肪酸による作用が寄与している可能性が示唆された。

本研究で使用した水素添加魚油は、特にステアリン酸 (C18:0)、アラキジン酸 (C20:0) やベヘン酸 (C22:0) のような長鎖の飽和脂肪酸を多く含む。これら長鎖の飽和脂肪酸は、糞へ排泄されやすいことが知られている [29]。本章での糞中脂肪酸分析結果においても HFO 群ではアラキジン酸やベヘン酸の排泄量が増加した。HFO 群での食餌摂取量の増加は、これら脂肪酸の糞中への排泄増加によって起こるエネルギー不足を補うためであり、ゆえに、他群と比較しても同程度に吸収エネルギー量が維持されていたと考えられる。

このように、HFO 食は必須脂肪酸をほとんど、あるいは、全く含んでいない。このことから必須脂肪酸を添加した実験を行ったところ（第 3 節）、必須脂肪酸を添加していない HFO 群の結果と HFO+SBO 群における血漿 TG 濃度の低下および肝臓中 TG 量の増加という結果が同様であった。これらのことより、HFO 群での必須脂肪酸の有無を考慮せずとも以上に述べた本研究結果による推測が妥当であると考えられる。

以上をまとめると、本研究結果から、魚油の不飽和脂肪酸は肝臓中脂質量を減少させ、血液、肝臓および WAT といった組織間の脂質レベルのバランスを維持する作用を有することが示唆された。加えて、HFO 群において新規に合成されたパルミトオレイン酸やオレイン酸は、耐糖能を改善し、脂質代謝に作用する能力を持つ可能性も示唆された。

第 2 章 水素添加魚油を用いた魚油含有不飽和脂肪酸の役割に関する検討：脂肪細胞の分化に及ぼす影響

第 1 章において、水素添加魚油（HFO）摂取で、肝臓脂質が著しく増加していたにもかかわらず耐糖能が維持されていた一方、水素添加魚油食摂取によって、WAT でパルミトオレイン酸（C16:1）とオレイン酸（C18:1）が顕著に増加したことが示された。水素添加魚油に含まれる脂肪酸はほぼ飽和脂肪酸であるため、このような不飽和脂肪酸が増加した背景には、第 1 章でみられた WAT における SCD1 の遺伝子発現量増加に代表されるような脂肪酸代謝の大きな変化が存在していることが推察される。脂肪組織においてパルミトオレイン酸が新規に合成されると、脂質代謝および糖代謝に有益な作用をもたらすことが報告されている [26]。また、PPARs を介した脂肪細胞の分化状態は脂肪細胞のサイズを変化させることで、インスリン感受性と密接に関わり、細胞サイズが肥大するとインスリン抵抗性の要因となることが、数多くの先行研究によって示されている [36, 37]。よって、WAT での脂肪酸代謝の変化が PPARs を介した脂肪細胞の分化状態を変化させ、HFO 群における耐糖能維持に重要な役割を果たしている可能性がある。しかし、これまでに水素添加魚油による脂肪組織での脂肪細胞サイズの変化と糖代謝の関連性を調べた報告はない。

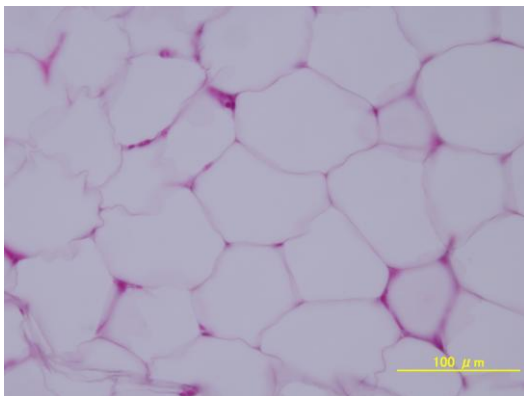
そこで本章では、水素添加魚油摂取、つまり魚油中の不飽和脂肪酸が脂肪細胞の分化に及ぼす影響について検討した。

第 1 節 マウスにおける子宮周囲白色脂肪組織の組織学的検討

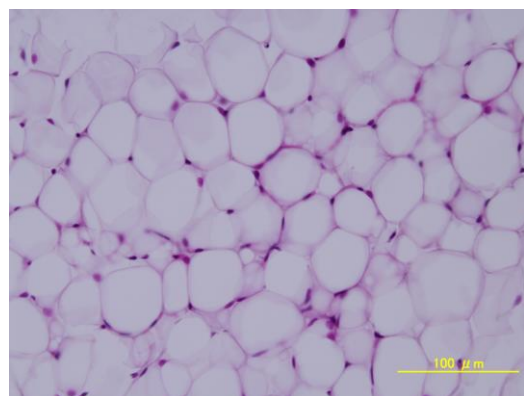
第 1 章と同条件のもと FO、HFO、SBO 食を摂取させた C57BL/6J 雌性マウスを用いた。第 1 章で述べたように、HFO 群において、体重および WAT 重量は SBO 群と比較して FO 群と同程度に減少しており、4 時間絶食下での血糖値も FO 群と同程度に有意に減

少していることが示されている（第 1 章, Table 4）。そこでまず、インスリン感受性と関連性の深い脂肪細胞のサイズを検討するために、脂肪細胞の組織学的検討を行った。Hematoxylin and eosin (H&E) 染色の結果を Figure 7 に示す。脂肪細胞のサイズは、SBO 群と比較して FO 群では小型化していた ($P < 0.01$)。また、HFO 群においても FO 群と同程度に小型化していることが示された (SBO vs HFO, $P < 0.01$) が、FO 群と HFO 群に有意差は認められなかった。脂肪細胞の平均サイズとその分布を Figure 8 に示す。その結果、SBO 群と比較して、FO 群および HFO 群でともに小型化しており、分布も脂肪細胞サイズの小さい方へシフトしていることが示唆された。しかし、FO 群と HFO 群に有意差は認められなかった。

A : SBO



B : FO



C : HFO

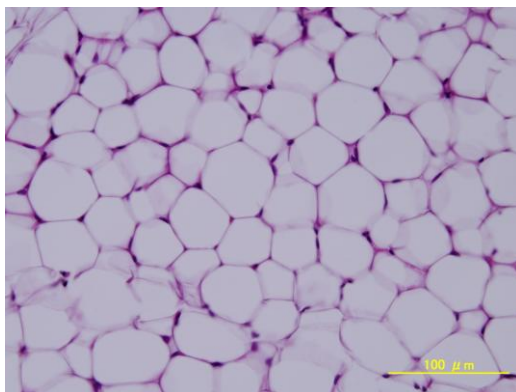
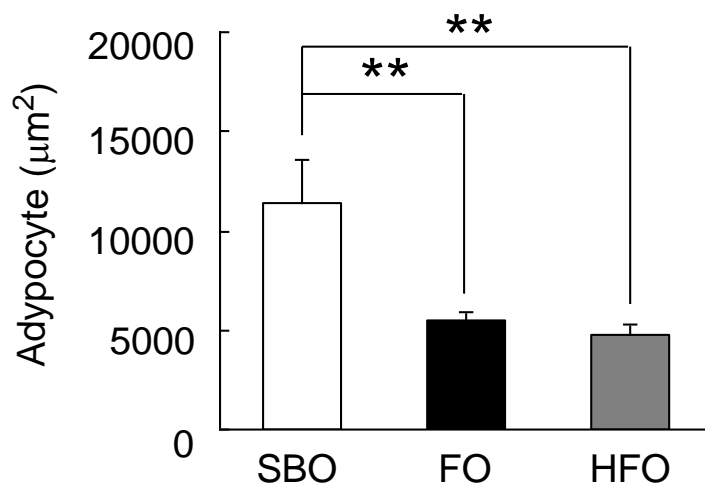


Figure 7. Hematoxylin and eosin stained WAT.

Mice fed each diet for 11 wk were sacrificed after a 4-h fast, and perimetric WAT sections were stained with hematoxylin and eosin (x 400).

A



B

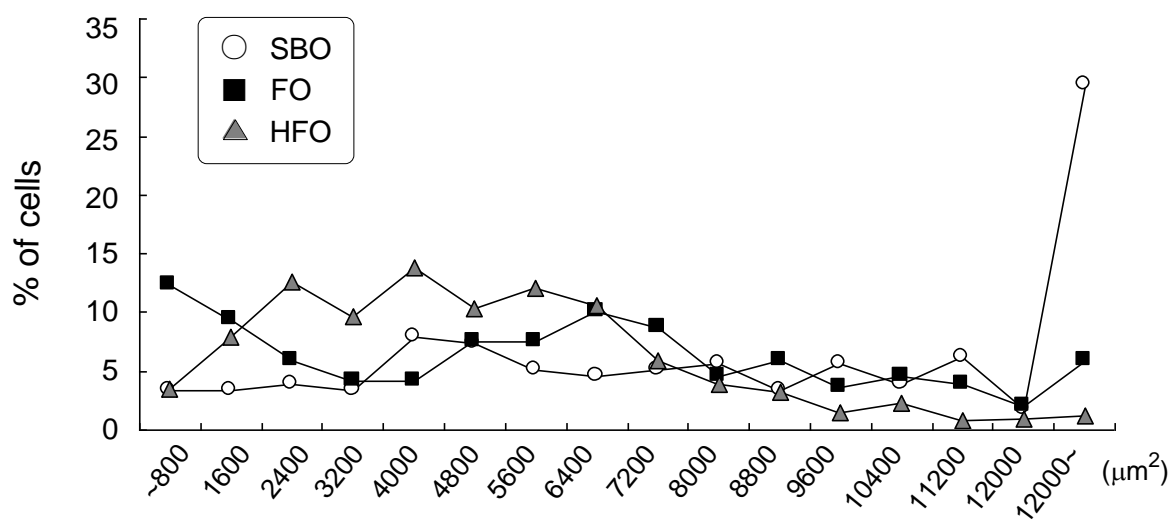


Figure 8. Representative histological section of WAT.

A) Mean adipocyte area is given as μm^2 . B) The data are expressed as the percentage of cells found in a given adipocyte area. Data is shown as mean \pm SE (n=5).

第 2 節 マウスにおける子宮周囲白色脂肪組織の分化および酸化に関わる遺伝子および糖取り込みに関わる遺伝子発現量の解析

第 1 節において、HFO 群の脂肪細胞は、FO 群と同程度まで小型化していることが示されたため、脂肪細胞の分化・酸化に関わる遺伝子および糖取り込みに関わる遺伝子の発現量を調べた。結果を Figure 9 に示す。PPAR α 、PPAR γ は核内受容体スーパーファミリーの一員で糖・脂質代謝のホメオスタシスに関連しており、体内および食品に存在する脂溶性生理活性物質をリガンドとして幅広い生理作用を持つ。脂肪組織において、PPAR α は脂肪酸酸化、エネルギー代謝調節作用を有し、PPAR γ は脂肪細胞における分化・増殖、脂肪酸合成、アディポサイトカイン分泌、インスリン感受性を調節する作用を有する [38]。

まず、これらの遺伝子発現量を解析した。PPAR γ は、SBO 群と比較して FO 群で増加したが、HFO 群では FO 群ほどの増加は示されなかった (Figure 9A)。PPAR α は、SBO 群と比較して FO 群で顕著に増加し、HFO 群においてもやや増加した (Figure 9B)。糖の取り込みには糖輸送担体 4 (glucose transporter 4 ; GLUT4) が役割を担っており、糖取り込みの律速段階となっている。WAT における GLUT4 の遺伝子発現量は、SBO 群と比較して FO 群で約 2 倍と顕著に増加し、HFO 群では約 3 倍まで FO 群よりもさらに増加した (Figure 9C)。

これらの結果から、HFO 群の WAT では、糖取り込みに関わる GLUT4 の遺伝子発現量は顕著に増加したものの、脂肪細胞の分化・酸化に関わる遺伝子発現量は大きな増加を示さなかった。

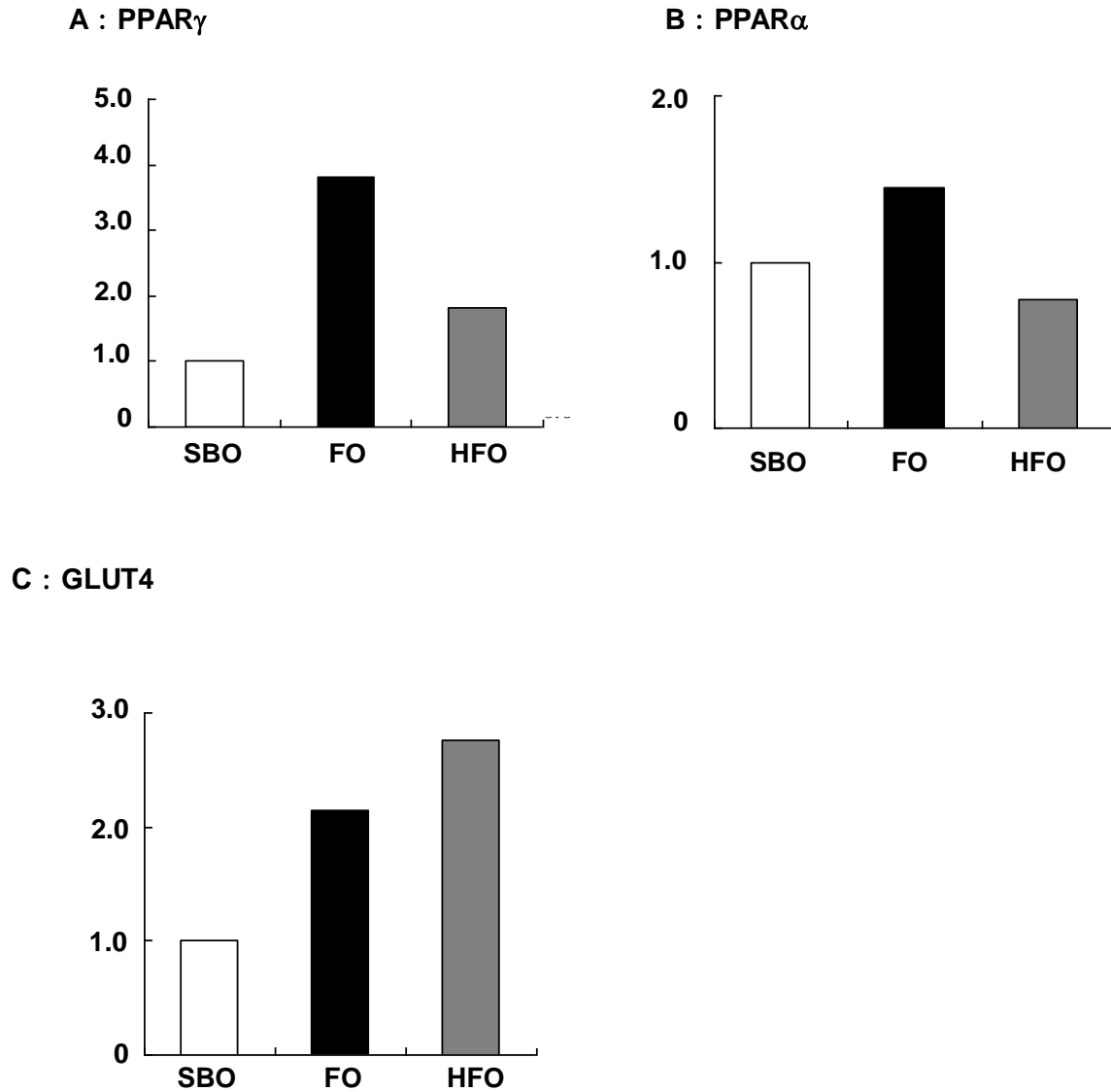


Figure 9. Real-time RT-PCR of mRNA involved glucose and lipid metabolism and insulin sensitivity in the WAT.

Mice fed each diet for 11 wk were sacrificed after a 4-h fast, and WAT samples from five mice in each group were mixed, and total RNA was extracted. Quantitative real-time RT-PCR analysis was performed using total RNA extracted from the WAT. PPAR γ (A), PPAR α (B) and GLUT4 (C) mRNA levels in the WAT of the SBO, FO and HFO groups. Levels of mRNA are represented as ratios to each liver mRNA level in the SBO group.

第 3 節 本章の小括および考察

本章では、ほぼ飽和脂肪酸しか含まない水素添加魚油食により、WAT でパルミトオレイン酸やオレイン酸などの一価不飽和脂肪酸が顕著に増加したことから、水素添加魚油摂取、つまり魚油中の不飽和脂肪酸が脂肪細胞の分化に及ぼす影響について検討した。

その結果、驚くべきことに、水素添加魚油食を摂取したことによって、WAT の脂肪細胞のサイズが魚油食摂取における効果と同等に小型化することを見出した。さらに脂肪細胞の小型化に伴って、脂肪組織におけるインスリン感受性が高まり、GLUT4 の遺伝子発現量が顕著に増加したことが示された。

FO 群に含まれる不飽和脂肪酸は PPAR α や PPAR γ のリガンドとしてこれらを活性化し、糖・脂質代謝やインスリン感受性、総合してエネルギー代謝を制御しているため、本章の FO 群で PPAR α 、PPAR γ の遺伝子発現量が増加、脂肪細胞が小型化し、なおかつ GLUT4 の遺伝子発現量が増加したことは理論的に合致する。しかし、HFO 群では FO 群と同程度に脂肪細胞が小型化したにも関わらず、PPAR γ および PPAR α の遺伝子発現量の増加は認められなかった。これまで飽和脂肪酸はインスリン感受性を低下させるとともに、GLUT4 の遺伝子発現量も低下させることが報告されているため [39]、本研究結果は既報と異なる。HFO 群では、PPAR α および PPAR γ のリガンドとしての作用をもつ（多価）不飽和脂肪酸をほとんど含んでいないため PPAR α および PPAR γ の遺伝子発現量が増加しなかったと考えられる。この結果に第 1 章の結果を加味すると、HFO 群では脂肪細胞が分化したのではなく、水素添加魚油が多く含有する長鎖の飽和脂肪酸が、脂肪細胞に取り込まれにくく肝臓に取り込まれやすい特性を有するために、脂肪細胞が小型化した可能性が考えられる。もともと長鎖飽和脂肪酸を水素添加魚油のように多量に含有する油脂はなく、長鎖飽和脂肪酸の脂肪細胞への取りこまれやすさに関する報告はないため推測の域をでないが、HFO 群で血漿アディポネクチン濃度の増加が認められないという第 1 章の結果から考えても、脂肪細胞が小型化したとはいえ、脂肪細胞の質自体は魚油とは異なることが示唆される。また、HFO

群では、脂肪細胞で新規に合成されたパルミトオレイン酸が“リポカイン”としてホルモン様に作用し、体内の代謝活性化に貢献している可能性もある。今後は、以上の様な作用を有するか否か検討が必要である。

以上のことから、本章では、水素添加魚油食摂取によって魚油摂取と同程度に脂肪細胞が小型化し、GLUT4 の遺伝子発現量が増加したことでインスリン感受性が亢進し、糖の取り込みに関して良好な結果をもたらすことを見出した。この結果は PPAR α 、PPAR γ による脂肪酸酸化や脂肪細胞の分化亢進ではなく、長鎖飽和脂肪酸が脂肪細胞に取り込まれにくいことによる脂肪細胞の小型化がもたらしたものであると考えられる。よって魚油中の不飽和脂肪酸は、肝臓、血中、脂肪細胞への脂肪分布を適正に行い、脂肪細胞の PPAR γ および PPAR α の遺伝子発現量を増加させ、適度に分化させる作用を有すると考えることができる。また、水素添加魚油食摂取によって肝臓脂質量が増加しても耐糖能の悪化を抑制した背景には、以上のような結果に加え、WAT で増加したパルミトオレイン酸やオレイン酸のような一価不飽和脂肪酸がもたらす糖代謝への役割が推察された。

第 3 章 パルミトオレイン酸 (C16:1) の糖・脂質代謝改善作用に関する検討

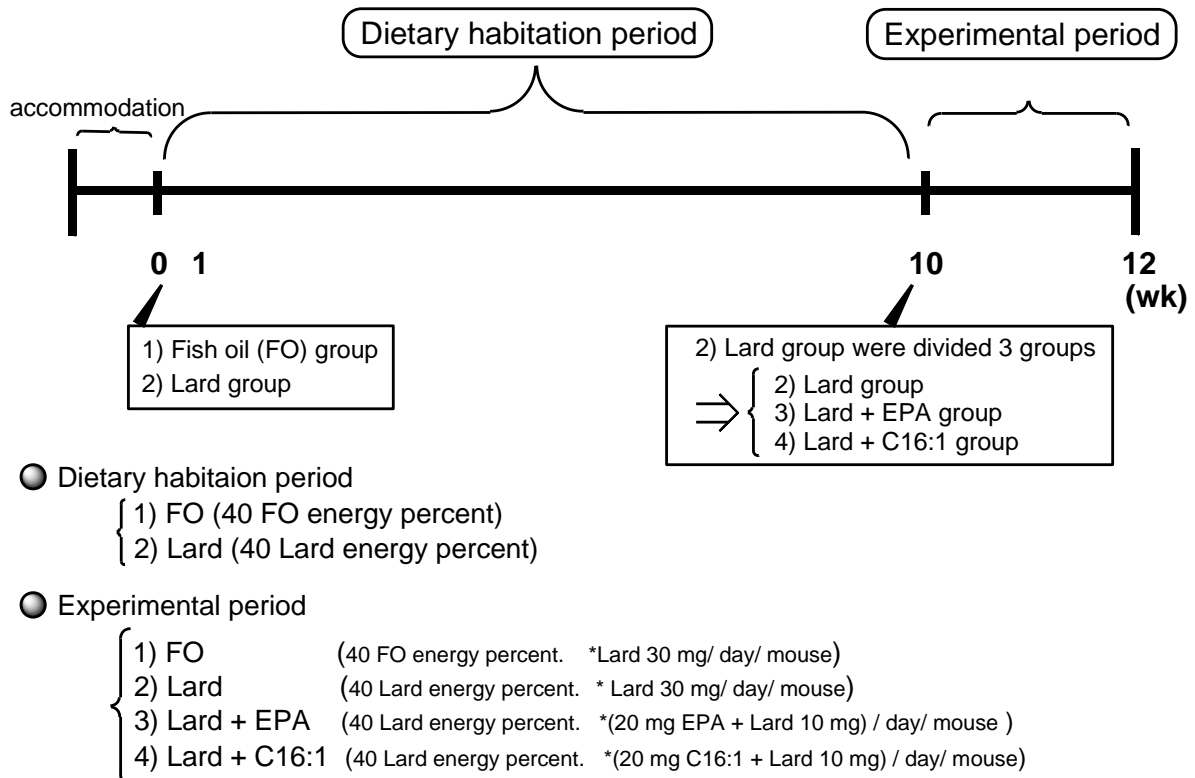
第 1 章および 2 章の結果から、水素添加魚油によって肝臓や WAT で増加したパルミトオレイン酸やオレイン酸などの一価不飽和脂肪酸が糖代謝に有益な役割を担っている可能性が示された。特に、体内で合成されたパルミトオレイン酸は“リポカイン”と称される程、糖・脂質代謝に関連している因子として注目されている [26]。パルミトオレイン酸はマカダミアナッツに豊富に含まれるが、魚油にも比較的多く含まれていることから、魚油による作用の一部に EPA や DHA に加えてパルミトオレイン酸の作用が含まれる可能性がある。しかし、これまでのパルミトオレイン酸に関する報告において、パルミトオレイン酸純品をマウスに摂取させた例はなく、糖・脂質代謝に果たす役割はわかっていない。

以上のことから本章では、パルミトオレイン酸に着目し、魚油による糖・脂質代謝への有益な作用の一部にパルミトオレイン酸が関与しているか否かを調べる目的として、ラード食摂取マウスに純品なパルミトオレイン酸を経口的に摂取させ、食餌誘発性代謝異常に対する改善効果を純品な EPA を摂取させた場合とで比較検討した。

第 1 節 マウスにおける糖質代謝に対するパルミトオレイン酸の影響

実験スケジュールを Scheme 3 に示す。6 週齢の C57BL/6J 雌性マウスを 1 週間馴化後に 2 群に分けた。実験食は、油脂源に魚油 (Fish oil ; FO)、ラード (Lard oil ; Lard) を用い、第 1 章と第 2 章と同様に脂質エネルギー比 40%に設定し、AIN-93G 組成を基に調製した。これら実験食をマウスに 12 週間自由摂取させた。実験食で使用した油脂の特徴を Table 7 に示す。まず、7 週齢から 10 週間を食餌馴化期間とし、魚油食、ラード食を摂取させた。その後、Lard 食群を 3 群に分け、Lard 食を摂取し続ける対照群に加え、EPA、パルミトオレイン酸摂取群を設けた。EPA およびパルミトオレイン酸の摂取量は、魚油食を

摂取した時と同程度となるように、第 1 章における魚油食の食餌摂取量を基に各脂肪酸摂取量を算出し、1 日あたりのパルミトオレイン酸摂取量を算出した。魚油食摂取下のマウスのパルミトオレイン酸摂取量は 1 日あたり約 20 mg であったため、本研究においてパルミトオレイン酸の摂取量をマウス 1 匹あたり 1 日 20 mg と設定した。比較対照として用いた EPA 摂取量もパルミトオレイン酸と同等量にするため 20 mg とした。パルミトオレイン酸および EPA、それぞれ 20 mg はマウスの口に入れやすくするために 10 mg のラードに混ぜ、ミクロスパーテルを用いて、マウスに経口摂取で 2 週間投与した。以下、Lard 食摂取下で EPA 経口摂取群を Lard+EPA 群、Lard 食摂取下で パルミトオレイン酸経口摂取群を Lard+C16:1 群とする。また、FO 群、Lard 群には、ラード 30 mg を同様に経口摂取させた。この 2 週間における食餌は、魚油食、ラード食それぞれを各群に自由摂取させている。



Scheme 3. Experimental protocol in this study.

食餌馴化期中（10 週間）に食餌摂取量を測定し、食餌馴化期間終了時には体重、4 時間絶食下空腹時血糖値、血漿インスリン、TG、TC 濃度を測定し、HOMA-IR を算出した。その結果を Table 8 に示す。食餌摂取量から算出したエネルギー摂取量に、2 群間での差はなく同程度であった。食餌馴化期間開始時、終了時の体重および体重増加量においても、2 群間での差はなかった。4 時間絶食下における空腹時血糖値は、2 群間での差はなかったものの、血漿インスリン濃度は FO 群と比較して Lard 群において有意に増加した ($P < 0.05$)。血漿 TG、TC 濃度は FO 群と比較して Lard 群で有意に増加した ($P < 0.01$)。これらの結果から、糖代謝および脂質代謝ともに FO 群よりも Lard 群において悪化していると判断した。

Table 7. Profiles of dietary oils.

Fatty acids	(%)	Fish oil (FO)	Lard (Lard)
14:0	(Myristic acid)	3.0	1.6
16:0	(Palmitic acid)	18.2	23.0
16:1	(Palmitoleic acid)	4.2	2.3
18:0	(Stearic acid)	4.9	13.0
18:1 n-9	(Oleic acid)	18.8	40.0
18:2 n-6	(Linoleic acid)	1.3	8.9
18:3 n-3	(α -Linolenic acid)	0.3	0.5
20:0	(Arachidic acid)	—	0.2
20:4 n-6	(Arachidonic acid)	2.0	0.1
20:5 n-3	(EPA; eicosapentaenoic acid)	6.8	—
22:0	(Behenic acid)	—	—
22:6 n-3	(DHA; docosahexaenoic acid)	22.8	—
S:M:P		10:10:14	38:42:10
n-6 /n-3 ratio		0.1	18.0

Fatty acids in fish oil were measured by gaschromatography, and that in lard were based on the food composition table in Japan.

Table 8. Energy intake, body weight and parameters in plasma during the dietary habitation period (~10 wk).

		FO	Lard
Energy intake	(kcal/mouse/day)	9.7 ± 0.4	9.4 ± 0.5
Initial body weight	(g)	18.4 ± 0.4	18.2 ± 0.2
At 10 wk body weight	(g)	24.1 ± 0.3	24.1 ± 0.3
Body weight gain	(g)	6.5 ± 0.4	6.6 ± 0.2
Blood glucose	(mmol/L)	6.69 ± 0.40	6.03 ± 0.22
Plasma insulin	(pmol/L)	55.7 ± 4.20	72.9 ± 3.88 *
HOMA-IR		2.7 ± 0.2	3.2 ± 0.2
Plasma TG	(mmol/L)	0.62 ± 0.03	0.83 ± 0.03 **
Plasma TC	(mmol/L)	1.16 ± 0.02	2.65 ± 0.09 **

Energy intake was calculated using amount of food intake for 3 days at 6 wk. Blood samples of mice fed each diet for 10 wk were collected from the retro-orbital plexus after a 4-h fast. Each data point represents the mean ± SE of 5 mice in FO group and 14 mice in Lard group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ for Lard group compared to FO group.

その後、Lard 群を 3 群に分け、2 週間の EPA、パルミトオレイン酸の経口摂取期間に食餌摂取量を測定し、この期間終了時に体重、WAT、肝臓および腓腹筋重量、4 時間絶食下における血糖値、血漿インスリン、アディポネクチン濃度を測定し、HOMA-IR を算出した。これらに対するパルミトオレイン酸による効果を EPA および魚油摂取による効果と比較した。結果を Table 9, 10 に示す。

まず、2 週間の実験期におけるエネルギー摂取量に、4 群間での差は見られなかった (Table 9)。最終体重、WAT 重量、腓腹筋重量においても 4 群間での差は見られなかった (Table 9)。しかし、肝臓重量は、FO 群でのみ、他群と比べ、有意に増加した ($P < 0.05$, Table 9)。これは、先行研究で示されている通り、魚油食摂取によるペルオキシゾームの増加によると考えられる。次に、この 2 週間の糖代謝に関する解析結果を Table 10 に示す。

空腹時血糖値、血漿インスリン濃度、HOMA-IR、血漿アディポネクチン濃度に 4 群間での有意差は見られなかった (Table 10)。

Table 9. Energy intake, body weight and organs weight during the experimental period (10~12 wk).

	FO	Lard	Lard + EPA	Lard + C16:1
Energy intake (kcal/mouse/day)	11.5 ± 0.2	10.1 ± 0.4	10.1 ± 0.8	10.5 ± 0.3
Final body weight (g)	24.4 ± 0.3	24.5 ± 0.3	25.3 ± 0.3	24.9 ± 0.4
WAT weight (g)	0.38 ± 0.06	0.49 ± 0.03	0.58 ± 0.06	0.50 ± 0.07
Liver weight (g)	1.05 ± 0.03 ^a	0.83 ± 0.04 ^b	0.82 ± 0.02 ^b	0.84 ± 0.04 ^b
Gastrocnemius weight (g)	0.22 ± 0.00	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.00	0.23 ± 0.01

Energy intake was calculated using amount of food intake for 3 days at 11 wk. Mice fed one of the four experimental diets for 12 wk were killed after a 4-h fast, and WAT, liver, and gastrocnemius weights were measured. Each data point represents the mean ± SE of 4 to 5 mice. ^{a, b} Values not sharing the same superscript are significantly different at $P < 0.05$ by Fisher's PLSD test.

Table 10. Effects on glucose metabolism during the experimental period by oral administration of palmitoleate or EPA with high lard diet.

	FO	Lard	Lard + EPA	Lard + C16:1
Blood glucose (mmol/L)	6.64 ± 0.73	7.42 ± 0.61	6.70 ± 0.30	6.94 ± 0.23
Plasma insulin (pmol/L)	76.3 ± 23.3	93.3 ± 25.4	74.8 ± 21.5	81.5 ± 15.4
HOMA-IR	3.9 ± 1.4	5.3 ± 1.8	3.7 ± 1.0	4.9 ± 0.8
Plasma adiponectin (µg/dL)	50.8 ± 5.7	44.1 ± 2.4	50.7 ± 1.9	49.0 ± 3.8

Blood glucose levels were measured after a 4h fast by cutting the tail end. Mice fed one of the four experimental diets for 12 wk were killed after a 4-h fast, and then blood samples were collected from the postcaval vein. Each data point represents the mean ± SE of 4 to 5 mice.

しかし、血糖値、血漿インスリン濃度、HOMA-IR は、FO 群と比較して Lard 群で高値を示し、Lard+EPA 群、Lard+C16:1 群で FO 群と同程度か FO 群と Lard 群の中間値まで改善していた。血漿アディポネクチン濃度においても Lard 群で低値を示したが、Lard+EPA 群および Lard+C16:1 群で FO 群と同程度のレベルまで増加していた。これらの結果は、2 週間という比較的短期間での C16:1 の摂取により Lard 食摂取で悪化した糖代謝が EPA と同程度あるいは魚油食レベルまで改善する可能性を示している。しかし、飼育開始 10 週目と比べ、12 週目では Lard 食摂取により糖代謝が悪化しているものの悪化の程度が緩やかであったことから、C16:1 摂取による改善作用が明確には認められなかったため、今後は長期間でのさらなる検討が必要であると考えられる。

第 2 節 マウスにおける脂質代謝に対するパルミトオレイン酸の影響

第 2 節では、脂質代謝に対するパルミトオレイン酸の影響について検討した。結果を Table 11 に示す。血漿 TG 濃度には、各群における有意差は認められなかったが、FO 群と比較して Lard 群で高値を示し、Lard+EPA 群、Lard+C16:1 群で FO 群と Lard 群の中間値を示した。一方、血漿 TC 濃度には有意差が認められた ($P < 0.01$, Table 11)。Lard 群の血漿 TC 濃度が最も高く、FO 群は最も低値を示し、Lard+EPA 群および Lard+C16:1 群は Lard 群と FO 群の中間に位置した。このことは、魚油摂取程の効果は見られなかったものの、EPA およびパルミトオレイン酸の摂取によって、Lard 群で悪化した TC 濃度を改善できることを見出した。血漿 NEFA 濃度においては、4 群間での差は見られなかった (Table 11)。

次に、肝臓中の脂質量の結果について述べる。肝臓中総脂質量は、FO 群と比較して Lard 群で有意に増加したが ($P < 0.05$, Table 11)、興味深いことに、Lard 群と比べて Lard+EPA 群および Lard+C16:1 群で FO 群と同程度まで有意に減少した ($P < 0.05$, Table 11)。肝

臓中 TG 量は、FO 群よりも Lard 群で増加傾向を示したが ($P=0.1$, Table 11)、Lard+EPA 群および Lard+C16:1 群では Lard 群との差は認められなかった。臓中 TC 量および NEFA 量も FO 群と比較して Lard 群で有意に増加したが ($P < 0.05$, Table 11)、Lard+EPA 群および Lard+C16:1 群においては Lard 群との有意差は認められなかった (Table 11)。臓中リン脂質 (phospholipid ; PL) 量は、各群での有意差は認められなかった (Table 11)。これらの結果から、C16:1 および EPA の摂取によって臓中総脂質量の減少が認められたが、TG、TC、NEFA、PL 量には有意差がないことより、これら以外の臓中の脂質画分 (lipid class) を減少させたことが考えられた。そこで、各群におけるプールサンプルでの測定という予備的検討ではあるが、他の脂質画分としてセラミドおよびジアシルグリセロール (diacylglycerol ; DAG) 量を調べた。臓中 DAG 量は、FO 群および Lard+EPA 群において Lard 群よりも低値を示したが (Table 11)、Lard+C16:1 群との差は見られなかった。この結果から、臓中総脂質量減少のメカニズムが、パルミトオレイン酸と EPA では異なることが推察された。

Table 11. Effects on lipid metabolism during the experimental period by oral administration of palmitoleate or EPA with high lard diet.

		FO	Lard	Lard + EPA	Lard + C16:1
Plasma					
TG	(mmol/L)	0.33 ± 0.05	0.45 ± 0.06	0.40 ± 0.02	0.36 ± 0.03
TC	(mmol/L)	1.01 ± 0.10 ^a	2.32 ± 0.10 ^b	1.56 ± 0.11 ^c	1.61 ± 0.07 ^c
NEFA	(mmol/L)	0.48 ± 0.06	0.45 ± 0.04	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.01
Liver					
Total lipid	(g/liver)	0.058 ± 0.003 ^a	0.063 ± 0.003 ^b	0.043 ± 0.006 ^a	0.049 ± 2.69 ^a
TG	(μmol/liver)	33.1 ± 3.70	34.5 ± 4.09	32.5 ± 3.53	31.5 ± 3.00
TC	(μmol/liver)	10.6 ± 0.45 ^a	12.1 ± 0.40 ^b	12.3 ± 0.44 ^b	11.7 ± 0.90 ^b
NEFA	(μmol/liver)	6.12 ± 0.16 ^a	6.26 ± 0.44 ^b	6.26 ± 0.34 ^b	5.75 ± 0.28 ^{ab}
PL	(mg/liver)	14.95 ± 0.67	10.24 ± 0.38	10.34 ± 0.91	9.90 ± 0.70
Ceramid (pooled sample) (mg/liver)		1.08	0.45	0.38	0.46
DAG (pooled sample) (mg/liver)		0.22	1.41	0.57	1.80

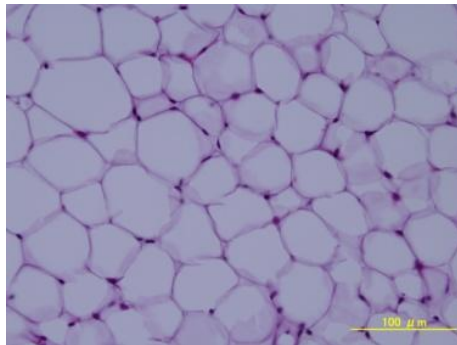
Mice fed one of the four experimental diets for 12 wk were killed after a 4-h fast, and then blood samples were collected from the postcaval vein. Total lipid, TG, TC, NEFA, and PL levels in the liver were measured. Others levels were calculated by subtracting the sum of TG, TC, NEFA, and PL levels from the total lipid levels. Each data point represents the mean ± S.E. of 4 to 5 mice. ^{a, b, c} Values not sharing the same superscript are significantly different at $P < 0.05$ by Fisher's PLSD test. Ceramid and DAG levels in the mixed liver section from each group were measured using TLC.

第 3 節 マウスにおける子宮周囲白色脂肪組織の組織学的検討

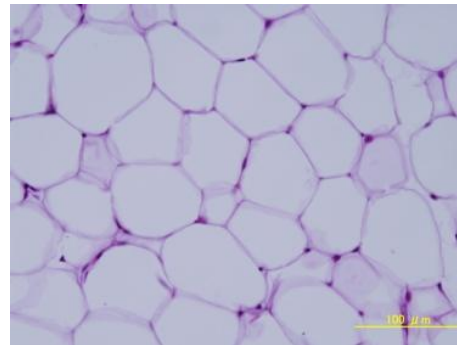
第 1 章において、水素添加魚油摂取の肝臓と WAT でパルミトオレイン酸が増加したこと、第 2 章において、水素添加魚油摂取が魚油食と同程度まで脂肪細胞を小型化させたことから、パルミトオレイン酸の経口摂取によっても、脂肪細胞のサイズが変化している可能性がある。そこで、WAT の組織学的検討を行った。WAT の脂肪細胞の H&E 染色の結果を Figure 10 に示す。脂肪細胞の形態において、FO 群と比較して Lard 群においては、脂肪細胞が大きい傾向がみられた。しかし、Lard 群と比較して Lard+EPA 群および

Lard+C16:1 群においては脂肪細胞が小さくなっている脂肪細胞も見られるが、2 週間でのパルミトオレイン酸および EPA の摂取による変化はほとんど見られなかった。

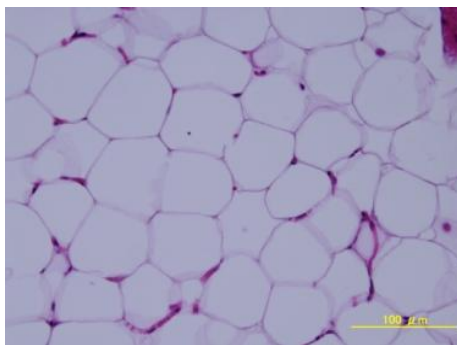
A : FO



B : Lard



C : Lard + EPA



D : Lard + C16:1

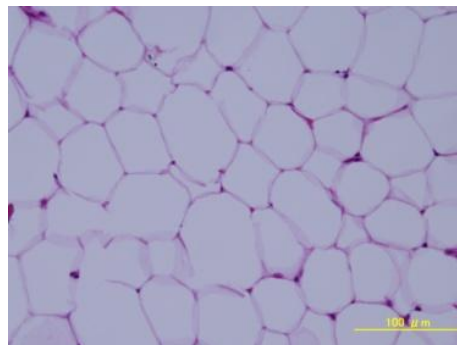


Figure 10. Hematoxylin and eosin stained WAT.

Mice fed each diet for 12 wk were killed after a 4-h fast, and perimetric WAT sections were stained with hematoxylin and eosin (x400).

第 4 節 本章の小括および考察

本章では、第 1 章と 2 章の結果および先行研究結果から、マウスにおける糖・脂質代謝改善作用に魚油の不飽和脂肪酸のうちパルミトオレイン酸の関与が期待されたため、体内合成ではなく、経口摂取したパルミトオレイン酸単独の役割に着目し検討を行った。

本研究におけるパルミトオレイン酸のマウスへの投与（摂取）量は、マウスが 1 日に摂取した魚油食に含有されているパルミトオレイン酸量と同等量であるため、マウスが通常摂取可能な範囲内である。また、これまでにパルミトオレイン酸単独をマウスに摂取させた例はない。

ラード食摂取によって増加した血漿 TG と TC 濃度、肝臓中総脂質量は、パルミトオレイン酸を摂取したことにより明らかに減少し、さらにパルミトオレイン酸による肝臓中総脂質量減少効果は EPA 摂取と同等であった。比較的少量、なおかつ 2 週間という比較的短期間でのパルミトオレイン酸投与によるこのような結果は驚くべきことである。そのうえ、これまでのパルミトオレイン酸に関する研究では、パルミトオレイン酸を豊富に含むマカダミアナッツを用いているためパルミトオレイン酸以外の複数の脂肪酸を含んでいるが、本研究においては、純粋なパルミトオレイン酸のみを使用している。マカダミアナッツ食を用いた臨床研究では、体重 kg 当たりのパルミトオレイン酸量を算出すると本研究におけるパルミトオレイン酸量よりも少ない [40, 41]。一方、動物を用いた研究では、ハムスター 1 匹当たり 165 mg/日（マウス 1 匹当たりに換算すると約 26 mg/日）のパルミトオレイン酸をマカダミアナッツ油食より摂取しており [42]、体重当たりのパルミトオレイン酸量に換算すると、本研究でのパルミトオレイン酸量とほぼ同量である。また、これらの研究における摂取期間は、6 週間、30 日間、5 週間と本研究の 2 週間よりも長期である [40, 41, 42]。このように、パルミトオレイン酸を摂取すると、比較的少量かつ短期間での摂取でさえも脂質代謝および糖代謝改善に有効であることが本研究で明らかとなった。

本研究において、肝臓中 TG、TC 量への影響は、パルミトオレイン酸と EPA 摂取どちらにおいても認められなかった。しかしながら、パルミトオレイン酸と EPA は肝臓中総脂質量を明らかに減少させており、肝臓中 NEFA、PL 量ともに差は認められなかったことから、TG、TC、NEFA および PL 以外の他の脂質成分（脂質画分）の増加を減少させたことが推察される。また、本研究では、肝臓中脂質の 50%は TG であった。これまでの研究において、ラード食摂取マウスの肝臓中 TG 量は、魚油食摂取マウスと比較して増加するか、

あるいは差はないことが報告されている [43-48]。最近の研究では、TG や fatty acyl-CoA、DAG、セラミド、glycosphingolipid などの脂肪酸代謝物の肝臓蓄積が、脂肪性肝炎 (hepatic steatosis) やインスリン抵抗性に関わることが次第に明らかになってきている [43-52]。DAG に関していえば、非アルコール性脂肪肝 (NAFL; nonalcoholic fatty liver) や非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH; nonalcoholic steatosis) を含む非アルコール性脂肪性肝疾患

(NAFLD; nonalcoholic fatty liver disease) の患者において DAG 量が増加しているとの報告がなされている [53, 54]。本研究においては、DAG 量は、ラード食群で魚油食群よりも増加し、EPA 摂取で減少したが、パルミトオレイン酸摂取による影響は見られなかった。このことは、パルミトオレイン酸でなく EPA や DHA などの n-3 系多価不飽和脂肪酸が肝臓の DAG 量を減少させていると示唆できる。それゆえ、EPA とパルミトオレイン酸では、肝臓中脂質量を減少させるメカニズムが異なるのかもしれない。また、脂肪細胞の組織学的検討結果において、脂肪細胞のサイズが変化していなかったことから、パルミトオレイン酸の作用に脂肪細胞のサイズはあまり関与していないことが示唆された。よって、魚油の作用を担う不飽和脂肪酸には、パルミトオレイン酸以外の他の脂質成分の関与も示唆された。

要約すると、本章は、脂質代謝および糖代謝の調節に経口摂取した純品で比較的低量のパルミトオレイン酸が寄与する可能性を検討し、パルミトオレイン酸が EPA 同様にラード食で増加した肝臓中脂質量を減少させることを立証した。それゆえ、本研究において、EPA に加えてパルミトオレイン酸も魚油による脂質代謝を調節する鍵となる役割を有することが示唆された。しかし、糖代謝においては、パルミトオレイン酸による明らかな改善作用は認められなかったが、長期間でのパルミトオレイン酸の摂取によっては糖代謝が改善される可能性が残されている。

今後はさらに、パルミトオレイン酸による脂質代謝および糖代謝調節のメカニズムの解明が必要である。

総括

魚油摂取によってもたらされる糖・脂質代謝改善作用は、主として魚油に多く含まれる EPA や DHA といった多価不飽和脂肪酸による作用であると考えられている。魚油は EPA や DHA 以外にも他の脂肪酸を多く含むため、本研究では、糖・脂質代謝改善効果を示す魚油の成分を検討することを目的に、まず魚油中の脂肪酸の炭素鎖長を変えずに飽和脂肪酸にした水素添加魚油を用いて魚油に含まれる不飽和脂肪酸の作用についての検討を行った。続いて、水素添加魚油を用いて魚油に含まれる不飽和脂肪酸の脂肪細胞の分化に及ぼす影響を調べた。これらの結果から、魚油にも比較的多く含まれるパルミトオレイン酸が新たに糖・脂質代謝に有益な作用を示す可能性が示唆されたため、さらに、高純度のパルミトオレイン酸を比較的低用量で経口摂取した場合の糖・脂質代謝への作用について魚油および EPA と比較して検討を行った。

本研究に基づき、以下の諸点を明らかにすることができた。

1. 水素添加魚油摂取によって肝臓中脂質量（総脂質量、TG、TC、NEFA）は顕著に増加したが、血漿 TG 濃度は魚油摂取以上に低下した。このことから、魚油の不飽和脂肪酸は、肝臓中脂質量を減少させ、また血漿と肝臓および WAT における TG レベルのバランスを維持する作用を持つことを示すことができた。また、血糖値の低下およびアディポネクチン値の上昇に、魚油の不飽和脂肪酸が関与している可能性も示すことができた。さらに興味深いことに、水素添加魚油摂取によって肝臓中脂質量が増加するものの血糖値が魚油摂取時と同程度に維持されたこと、また肝臓および WAT においてパルミトオレイン酸（C16:1）とオレイン酸（C18:1）が増加していたことから、体内の脂肪酸代謝が大きく変化したことを見出し、これらの一価不飽和脂肪酸が耐糖能の維持に役割をなしていることが推察できた。

2. 水素添加魚油は魚油摂取と同等に脂肪細胞を小型化したが、PPAR γ 、PPAR α の遺伝子発現量を増加させなかった。このことは、長鎖不飽和脂肪酸が脂肪細胞に取り込まれにくい可能性のあることと、血漿アディポネクチン濃度が魚油摂取のように増加していないことから、分化や酸化による脂肪細胞の小型化であるとは考えにくいと示唆された。よって、魚油に含まれる不飽和脂肪酸は PPAR γ 、PPAR α の遺伝子発現量を増加させ、脂肪細胞を適度に分化させる作用のあることを見出した。また、水素添加魚油摂取は、魚油摂取と同程度あるいはそれ以上に GLUT4 を増加させ、エネルギー代謝を亢進させていることから、魚油の不飽和脂肪酸が GLUT4 の遺伝子発現量を低下させたのではなく、脂肪細胞の小型化によってもたらされた結果であり、このことが血糖値維持の一部に反映されていることを見出した。それゆえ、魚油の不飽和脂肪酸は血糖値維持にも寄与していることを見出した。加えて、WAT において合成されたパルミトオレイン酸やオレイン酸などの一価不飽和脂肪酸が影響している可能性のあることを示唆し、WAT での脂肪酸代謝の変化が糖代謝に有益な作用をもたらすことを見出された。

3. 比較的低用量の高純度のパルミトオレイン酸をマウスに経口摂取させた結果、血漿 TG、TC 濃度および肝臓中総脂質量は明らかに減少し、この効果は高純度の EPA を用いて経口摂取させた時と同等の結果であることを立証した。よって、EPA や DHA に加えてパルミトオレイン酸が魚油による脂質代謝調節作用の鍵となる役割を有することを示すことができた。糖代謝においては、影響が顕著ではなかったもののパルミトオレイン酸摂取によって血糖値が低値を示していたことから、長期間でのパルミトオレイン酸の摂取による糖代謝への作用も期待できると考えられた。パルミトオレイン酸の効果が魚油摂取群(第 2 章、第 1 節)のように脂肪細胞のサイズの変化に依存しないことから、魚油の作用を担う不飽和脂肪酸には、今回検討した脂肪酸以外の脂質成分も関与する可能性が示唆された。

本研究では、水素添加魚油を用いた新しいアプローチから、糖・脂質代謝改善に寄与する魚油成分を探索した。

本研究結果から、魚油による糖・脂質代謝調節メカニズムには不飽和脂肪酸が大いに貢献しており、EPA や DHA に加えて新たにパルミトオレイン酸が脂質代謝の適正維持に寄与していることを見出した (Figure 11)。また、脂質を構成する種々の脂肪酸比率の差などに起因する脂質の“質”も糖・脂質代謝調節に対する作用の特徴づけに重要であることが示唆された。本研究結果は、総合的に多くの機能を持つ魚油の成分を医療分野に応用していく上での有用な情報を提供できたと考える。

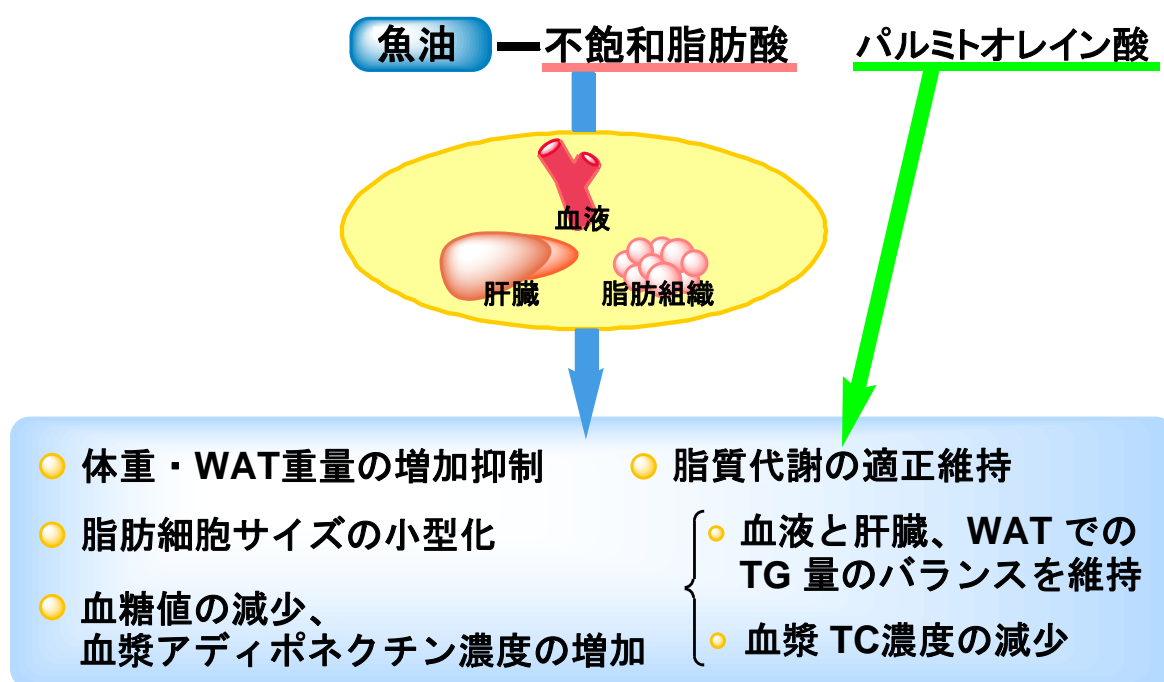


Figure 11. Conclusion

謝辞

本研究に際し、素晴らしい研究テーマを与えていただくと共に終始ご指導並びにご鞭撻を賜りました 城西大学薬学部医療栄養学科 食毒性学講座教授兼薬学科生理学講座教授 加園恵三先生に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導並びにご鞭撻を賜りました 城西大学薬学部医療栄養学科 食毒性学講座講師 角田伸代先生に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始ご指導並びにご助言を賜りました 城西大学薬学部医療栄養学科 食毒性学講座助手 村木悦子先生に深甚なる謝意を表します。

本論文の審査並びに活発なご討論をいただきました 城西大学薬学部医療栄養学科 病態解析学講座教授 小林 順先生、城西大学薬学部薬学科薬品物理化学研究室教授 関 俊暢先生に深謝の意を表します。

本研究に際し、終始有益なご助言並びにご激励賜りました 聖徳大学人間栄養学部人間栄養学科教授 池本真二先生、お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科教授 藤原葉子先生、園田麻里子先生、譚 淑儀博士に深謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、ご協力いただきました 梅崎友美修士、餅 康樹修士、和久津昌紀修士、伊藤加奈子学士、渡辺香織学士にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

実験遂行に際して、城西大学薬学部医療栄養学科 食毒性学講座（旧臨床栄養学講座）の皆様のご協力並びにご理解の下に本研究を遂行できたことを感謝致します。

また、これまでの過程にあたりまして、終始多大なるご指導並びにご鞭撻を賜りました 城西大学薬学部医療栄養学科 食毒性学講座 加園恵三先生、角田伸代先生、村木悦子先生、並びに薬学科 衛生化学講座教授 川嶋洋一先生、毒性学講座教授 工藤なをみ先生、生薬学講座 助教 田村雅史先生、現 城西国際大学薬学部教授 光本篤史先生、佐藤陽子先生、現 島根大学医学部 片倉賢紀先生に深く感謝の意を表します。

最後に、終始支えていただきました 私の家族に深く感謝致します。

実験の部

実験の部

第 1 章 水素添加魚油を用いた魚油含有不飽和脂肪酸の役割に関する検討：糖・脂質代謝に及ぼす影響

1. 実験動物および飼育条件

実験動物には、6 週齢の C57BL/6J 雌性マウス（日本クレア株式会社）を用いた。動物飼育室は、温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、明暗サイクル 12 時間（明期 7:00~19:00）の環境とした。動物実験における実験動物の取り扱い、城西大学動物実験規定に従って行った。マウスに、固形飼料（MF, オリエンタル酵母工業株式会社）および水を自由に摂取させ、1 週間馴化を行った。その後、体重測定を行い、各群 5 匹ずつ、4 群に分けて実験食を開始した。食餌は、毎日新しいものを摂取させ、1 週間に 1 回体重測定を行った。各実験食摂取開始後 7 週目に食餌摂食量および糞重量の測定を行い、8 週目に経口糖負荷試験（OGTT）、9 週目にインスリン負荷試験（ITT）を行った。実験食で 11 週間飼育後、4 時間絶食させ、ソムノペンチル（6 mg/ml/10 g 体重、共立製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で、ヘパリン処理したシリンジを用いて、腹大静脈より採血した。肝臓、子宮傍白色脂肪組織（WAT）、腓腹筋を採取し、血液からは $9100 \times \text{g}$ 、 4°C で、10 分間遠心分離後、血漿を得た。分析時まで、各組織は液体窒素に浸漬後に -80°C 、血漿は -30°C で凍結保存した。

2. 食餌組成

食餌は、AIN-93G を基本とし、脂質エネルギー比 40% に設定した。脂質エネルギー比増加による摂取量減少を考慮し、糖質と脂質以外の成分が AIN-93G と同量摂取できるように栄養素密度を上げた。また、本実験では餌の乾燥固形化を行っていないため、乾燥固形化の際に成型を助ける α -スターチの重量分を β -スターチに置き換えた。食餌は 1 ヶ月毎に調製した粉餌に適量の超純水を加え、固形状にしてラップに包み、マウスに与えるまで餌の酸化を

防ぐために -30°C にて保存した。実験群は、1) 対照として大豆油食群 (Soybean oil diet ; SBO)、2) 魚油を使用した魚油食群 (Fish oil diet ; FO)、3) 魚油中の不飽和脂肪酸の影響を除くため、脂肪酸の鎖長を変えずにほぼ全てを飽和化した水素添加魚油食群 (Hydrogenated fish oil diet ; HFO) とし、11 週間、各実験食を自由摂取させた。

さらに、第 3 節における必須脂肪酸補足実験では、実験群を 1) 10%脂質エネルギー比の大豆油食群 (Low fat diet ; LF-SBO)、2) 40%脂質エネルギー比の大豆油食群 (SBO)、必須脂肪酸を補うために 3) 40%脂質エネルギー比の魚油食 (FO) のうち 10%の脂質エネルギー比を大豆油に置き換えた魚油食群 (FO+SBO)、4) 40%脂質エネルギー比の水素添加魚油食 (HFO) のうち 10%脂質エネルギー比を大豆油に置き換えた水素添加魚油食群 (HFO+SBO) の 4 群とした。肥満誘導期として LF-SBO 食あるいは SBO 食を 10 週間、自由摂取させた後、実験期には SBO 食群を FO+SBO 食と HFO+SBO 食を摂取させた 2 群に分け、2 週間自由摂取させた。

食餌組成を Table 12 に示す。また、使用した油脂の脂肪酸組成については、魚油および水素添加魚油はガスクロマトグラフィーにて測定した結果を日油株式会社より提供いただき、大豆油はガスクロマトグラフィーにて測定した。油脂の特徴については 第 1 章本文の Table 1 に示した。表中の一部は 0.1%未満を検出限界として表している。この組成表から、HFO 群に与えた食餌の油脂はほぼ 100%が飽和化されており、不飽和脂肪酸摂取の影響は確実に除去できると考えられる。

魚油原料 (魚油および水素添加魚油) には、サンオメガ DHA23 (日油株式会社より提供) を使用した。対照として用いた精製大豆油は、和光純薬工業株式会社より購入した。精製飼料のカゼイン、スクロース、 β -スターチ、AIN-93 ビタミン混合及び AIN-93G ミネラル混合、セルロースパウダーは、オリエンタル酵母工業株式会社、L-シスチン、*t*-ブチルヒドロキノンは和光純薬工業株式会社より購入した。

Table 12. Dietary composition

	SBO, FO or HFO	FO+SBO or HFO+SBO	LF-SBO
	(g / kg diet)	(g / kg diet)	(g / kg diet)
β -starch	389.5	389.5	566.6
Casein	231.2	231.2	188.0
Sucrose	77.9	77.9	113.3
Dietary oil	188.0	{ 50.0 (SBO) 138.0 (FO or HFO)	40.0
Cellose	57.8	57.8	47.0
AIN-93 vitamin mix (VX) (added choline bitartrate)	11.6	11.6	9.4
AIN-93 mineral mix (MX)	40.5	40.5	32.9
L-cysitn	3.5	3.5	2.8
<i>t</i> -butylhydroquinone	0.038	0.038	0.008
Total energy	4299.0 kcal/kg		3533.8 kcal/kg
Carbohydrate	39% on a calorie basis		69% on a calorie basis
fat	40% on a calorie basis		10% on a calorie basis
Protein	21% on a calorie basis		21% on a calorie basis

3. 食餌摂食量および糞重量の測定、吸収エネルギー量の算出

各実験食開始後 7 週目 (マウス 14 週齢) に、4 日間連続で食餌摂食量および糞重量を測定した。実験方法は角田らの報告に従った [30]。餌の食べこぼし量を測定するため、マウス (n = 5) を金網とその下に新聞紙を敷いたケージにて 1 日飼育後、糞を回収し、食べこぼしおよび残った餌を集め、乾熱滅菌器 (SANYO STERILIZER, 三洋電機株式会社) を用いて、120°C で、24 時間水分を除去した。1 日の摂食量は、乾燥した給餌前の餌重量から餌の

食べこぼしおよび食べ残し重量を引いて求めた。糞は、室温で 24 時間乾燥させた後、重量を測定した。次に、吸収エネルギー量を算出するために、食餌と糞の物理的燃焼値を測定した。各群の食餌は真空凍結乾燥機 (LABCONCO, 朝日ライフサイエンス株式会社) にて乾燥後に粉状にし、糞はフードミルを用いて粉状にした。これらをそれぞれ秤量して、雁皮紙に包装し、ニッケル線を巻き、自動ポンプ型熱量計 (CA4PJ, 島津製作所) で食餌と糞の物理的燃焼値をそれぞれ測定した。これらの測定値から予め測定した雁皮紙の物理的燃焼値を差し引き、さらに、食餌の物理的燃焼値を食餌摂食量に乗じて求めた食餌摂取量の物理的燃焼値から糞の物理的燃焼値を引いて、吸収エネルギー量を算出した。

$$\text{吸収エネルギー量 (kcal/5 mice/day)} = [\text{食餌摂食量 (g)} \times \text{食餌の物理的燃焼値 (kcal)}] - [\text{糞重量 (g)} \times \text{糞の物理的燃焼値 (kcal)}]$$

この 1 日当たりの吸収エネルギー量は、エネルギー摂取量から糞のエネルギー量を差し引いて算出したものであるため、真に生体内に吸収されたエネルギーではない。

食餌摂取量、糞重量、吸収エネルギー量は、4 日間の平均値を求め、その標準誤差を算出した。

4. 経口糖負荷試験 (Oral glucose tolerance test ; OGTT)

各実験食開始後 8 週目 (マウス 15 週齢) に経口糖負荷試験を施行した。マウス (n = 5) を 6 時間 (7 : 00~13 : 00) 絶食させた後、グルコース投与前の空腹時血糖値を測定した。その後、20% D-グルコース溶液 (第一糖注, 第一三共株式会社) を滅菌蒸留水にて 2 倍希釈し、グルコース 1 mg/ g 体重 を経口投与し、投与後 15、30、60、120 分の血糖値を測定した。血糖値は、マウス尾静脈から採血し、血糖値測定機器 (Ascensia™ デキスター ZII, バイエル薬品株式会社) を用いて測定した。

5. インスリン負荷試験 (Insulin tolerance test ; ITT)

各実験食開始後 9 週目 (マウス 16 週齢) に、摂食時において、インスリン負荷試験を施行した。ヒューマリン R 注 U-100 (ヒトインスリン、10 mL、日本イーライリリー株式会社) を大塚生理食塩水 (20 mL、大塚製薬株式会社) で希釈し、75 mU/mL の濃度とした。インスリン投与前および腹腔内投与 (0.75 mU/g 体重) 後、10、20、30 分の血糖値を測定した。血糖値測定には OGTT と同様の方法を用いた。

6. 空腹時血糖値、血漿インスリン、アディポネクチン濃度および血漿中脂質 (中性脂肪、総コレステロール、NEFA) 濃度の測定、HOMA-IR の算出

空腹時血糖値は、屠殺前 (4 時間絶食下、7 : 00~11 : 00) にマウス尾静脈から採血して測定した。

血漿インスリン、アディポネクチン濃度および脂質濃度は、屠殺時 (4 時間絶食下) に採取した血液から得た血漿を用いて測定した。血漿インスリン濃度の測定には、インスリン測定キット (森永生科学研究所) を、血漿アディポネクチン濃度の測定には、マウス/ラットアディポネクチン ELISA キット (大塚製薬株式会社) を用いた。血漿 TG、TC 濃度は、富士ドライケムスライド TG・PIII、TCHO・PIII (FUJIFILM) を用い、富士ドライケム (DRI-CHEM 3500, FUJIFILM) にて測定した。血漿 NEFA 濃度は、NEFA C-テストワコー (和光純薬工業株式会社) にて測定した。

インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR は、4 時間絶食下の血漿インスリン濃度 ($\mu\text{U/mL}$) に空腹時血糖値 (mg/dl) を乗じた値を 405 で除して求めた。

7. 肝臓および腓腹筋中の脂質 (総脂質、TG、TC、NEFA) 量の測定

屠殺時に採取し、 -80°C で凍結保存した肝臓 (100~200 mg) および腓腹筋 (100~200 mg) をリン酸緩衝液中 (pH 7.4) でホモジナイザー (PT 3100, KINAMATICA, Inc., Littau/Lucerne, Switzerland) を用いて粉碎し、Bligh & Dyer 法 [55] に従って、総脂質

を抽出した。抽出した総脂質中の TG 量測定には、トリグリセライド E-テストワコー（和光純薬工業株式会社）、TC 量測定には、コレステロール E-テストワコー（和光純薬工業株式会社）、NEFA 量測定には、NEFA C-テストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いた。

8. 糞、肝臓および WAT における脂肪酸分析

糞、肝臓および WAT における総脂質の抽出は、Folch 法に従って行った [56]。すなわち、臓器を細かく切り刻み、クロロホルム：メタノール = 2:1 を加えてよく混合し、一晩放置した。内部標準物質にはエタノールに溶解した 50 mM のペンタデカン酸 (C15:0) を使用し、これを糞および肝臓の脂質抽出液には 15 μ L、WAT の脂質抽出液には 20 μ l 加えた。漏斗と濾紙を使って濾過し、蒸留水を加え、よく振とうした。遠心分離後、上清を除去し、下層部に脂質抽出液を得た。脂質抽出液のメチルエステル化の詳細は藤原（藤山）らの方法を用いて行った [57]。溶媒をエバポレーターで涸渇させ、無水メタノール：塩化アセチル混合液を加え、混合した。ネジ付き試験管に移し、浴槽にて 80°C、2 時間インキュベートした。常温まで冷まし、ヘキサンを加えて混合した。上層部を試験管に移し、2%の炭酸水素カリウムを加え、遠心分離した。上層を試験管へ移し、脂肪酸メチルエステルを得た。得られた脂肪酸メチルエステルサンプルを適量のヘキサンで溶解し、ガスクロマトグラフィー (Shimadzu GC-14A equipped with FID and Chromatopac C-R4A) を用いて脂肪酸組成を分析した。カラムには Rascot Stilliar 5CP capillary column (0.2 μ m \times 50 m; Nihon Chromato Works, Tokyo, Japan) を用いた [57]。

9. RNA 抽出および RT-PCR による遺伝子発現量の測定

Total RNA は 4 時間絶食下でソムノペンチルにて麻酔後に摘出し、-80°Cにて凍結保存した肝臓、WAT より抽出した。TRIzol reagent (Invitrogen, USA) を用いて、ポリトロン (PT 3100, KINAMATICA, Inc., Littau/Lucerne, Switzerland) にて組織を速やかに粉碎し、タンパクを変性させた。TRIzol Reagent の 3 分の 1 容のクロロホルムを加えて混合、遠

心分離後に水層を回収した。この水層に 2 分の 1 容のイソプロパノールを加えて混合、遠心分離し、白色沈殿物を得た。沈殿物を 70%エタノールで洗浄後、風乾させた後 diethyl procarbonate (DEPC) 処理滅菌水に溶解した。Total RNA 濃度を分光光度計にて 260 nm で測定した後、RNeasy kit (QIAGEN, Germany) にて精製後、DEPC 処理滅菌水にて 0.1~0.5 µg/µl に調製した。さらに、total RNA の確認のため、65°Cで 10 分間熱処理し、RNA の構造をほぐした後、エチジウムブロマイド溶液を加えた 1%アガロースゲルにて 100V、20 分間泳動した。紫外線照射下にてポラロイドカメラで撮影し、total RNA の 18S、28S の量が各群にて同程度であることを確認した。

Quantitative real-time RT-PCR は、0.08-1.5 µg の total RNA を QurantiTect SYBR Green RT-PCR kit (QIAGEN, Germany) と各遺伝子のプライマーを用いて、iCycler iQ (Bio-Rad laboratory, Inc., Tokyo, Japan) および ABI Prism 7000 thermal cycler (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) にて行った。

脂肪酸代謝に関わる炭素鎖長伸長化酵素の fatty acid elongase 6 ; Elovl6 と不飽和化酵素の stearyl-CoA desaturase 1 ; SCD1 の遺伝子発現量を測定した。各遺伝子のプライマー配列は Table 13 に示す。

各群における肝臓および WAT の遺伝子発現量は、SBO 群の肝臓中の遺伝子発現量に対する比率で表した。

Table 13. PCR primers

Gene		Sequence
Elovl6	Forward	5'-CCCGAACTAGGTGACACGAT-3'
	Reverse	5'-CCAGCGACCATGTCTTTGTA-3'
SCD1	Forward	5'-CCTCCGGAATGAACGAGAG-3'
	Reverse	5'-CAGGACGGATGTCTTCTTCCA-3'

10. 統計処理

実験データは、全て平均値±標準誤差 (Mean±SE) で示した。統計処理は、Statview 5.0 (SAS Institute Inc.) を用い、一元配置分散分析 (ANOVA) にて行い、多群間の有意差検定は Fisher's protected least significant difference (PLSD) test により解析した。

必須脂肪酸補足実験における 2 群間の有意差検定は Student's t test により行った。

$P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

第 2 章 水素添加魚油を用いた魚油含有不飽和脂肪酸の役割に関する検討：脂肪細胞の分化に及ぼす影響

1. 実験動物および飼育条件

第 1 章と同様のマウスおよび飼育条件にて行った。

2. 食餌組成

第 1 章と同様の食餌組成で行った。

3. WAT における組織学的検討

WAT を採材後、ホルマリン／リン酸緩衝液にて固定した。組織を成形した後、新しいホルマリン／リン酸緩衝液にて再度固定し、流水洗浄後、自動固定包埋装置（サクラロータリー, RH-12DM-II, サクラファインテックジャパン株式会社）にて 70%エタノールからキシレンまで脱パラフィンの操作を行い、パラフィンに置換した。ティッシュテック（Tissue-Tek TEC™, TEC-P-DC-JO, サクラファインテックジャパン株式会社）およびティッシュテックプラスクライオ・コンソール（TEC-P-CC-JO, サクラファインテックジャパン株式会社）にてパラフィンブロックを作成し、APS コート済みのスライドガラスに 10 μm のパラフィン切片を切り出し、ヘマトキシリン・エオシン (hematoxylin and eosin ; H&E) 染色にて細胞核、細胞質を染色した。70%エタノールからキシレンまでの脱水操作を行い、封入した。H&E 染色の組織像は、光学顕微鏡（BX51TF, オリンパス光学工業株式会社）および DP controller（オリンパス工業株式会社）にて撮影した。

WAT の異なる 2 方向から作成した H&E 染色切片画像を用い、イメージアナライザー（Image J, Wayne Rasband, NIH）にて脂肪細胞の面積測定を行った。各マウスにおいて、100 個以上の脂肪細胞面積を解析した。

4. RNA 抽出および RT-PCR による遺伝子発現量の測定

第 1 章と同様の WAT から抽出および精製した total RNA を用いて RT-PCR を行った。

糖・脂質代謝およびインスリン感受性に関わる PPAR γ 、PPAR α 、GLUT4 の遺伝子発現量を WAT において測定した。各遺伝子のプライマーを Table 14 に示す。

各遺伝子発現量は、SBO 群の WAT における遺伝子発現量との比率で表した。

Table 14. PCR primers

Gene		Sequence
PPAR α	Forward	5'-GTGGCTGCTATAATTTGCTGTG-3'
	Reverse	5'-GAAGGTGTCATCTGGATGGTT-3'
PPAR γ	Forward	5'-ATGCCAAAAATATCCCTGGTTTC-3'
	Reverse	5'-GGAGGCCAGCATGGTGTAGA-3'
GLUT4	Forward	5'-TCATTGTCGGCATGGGTTT-3'
	Reverse	5'-CGGCAAATAGAAGGAAGACGTA-3'

5. 統計処理

実験データは、全て平均値±標準誤差 (Mean±SE) で示した。統計処理は、Statview 5.0 (SAS Institute Inc.) を用い、ANOVA にて行い、多群間の有意差検定は PLSD test により解析した。

$P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

第 3 章 糖・脂質代謝に作用するパルミトオレイン酸 (C16:1) の改善作用に関する 検討

1. 実験動物および飼育条件

実験動物には、6 週齢の C57BL/6J 雌性マウス（日本クレア株式会社）を用いた。動物飼育室は、温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、明暗サイクル 12 時間（明期 7:00~19:00）の環境とした。動物実験における実験動物の取り扱い、城西大学動物実験規定に従って行った。マウスに、固形飼料 (MF, オリエンタル酵母工業株式会社) および水を自由に摂取させ、1 週間馴化を行った。その後、体重測定を行い、各群 5 匹ずつケージに分けた。まず、食餌馴化期を 10 週間設けた。食餌は毎日新しいものを摂取させ、1 週間に 1 回体重測定を行った。食餌馴化期の食餌摂取開始後 6 週目に食餌摂取量の測定を行い、10 週目に糖・脂質代謝の指標として 4 時間絶食下の血糖値、血漿インスリン濃度を測定、HOMA-IR を算出、血漿 TG および TC 濃度を測定した。その後、12 週目までを実験食期として 2 週間、実験食を摂取させ、同時に EPA あるいはパルミトオレイン酸を経口摂取させた。11 週目に実験期における食餌摂取量の測定を行った。12 週間飼育後、4 時間絶食させ、ソムノペンチル (6 mg/ml/10 g 体重, 共立製薬株式会社) の腹腔内投与による麻酔下で、ヘパリン処理したシリンジを用いて、腹大静脈より採血した。肝臓、WAT、腓腹筋を採取し、血液からは $9100 \times \text{g}$ 、 4°C で、10 分間遠心分離後、血漿を得た。分析時まで、各組織は液体窒素に浸漬後に -80°C 、血漿は -30°C で凍結保存した。

2. 食餌組成

食餌は、AIN-93G を基本とし、脂質エネルギー比 40% に設定した。脂質エネルギー比増加による摂取量減少を考慮し、糖質と脂質以外の成分が AIN-93G と同量摂取できるように栄養素密度を上げた。また、本実験では餌の乾燥固形化を行っていないため、乾燥固形化の際に成型を助ける α -スターチの重量分を β -スターチに置き換えた。食餌は 1 ヶ月毎に調製し

た粉餌に適量の超純水を加え、固形状にしてラップに包み、マウスに与えるまで餌の酸化を防ぐために -30°C にて保存した。

食餌馴化期における実験群は、1) 魚油食群 (FO, $n = 5$)、2) ラード食群 (Lard diet ; Lard, $n = 15$) とし、10 週間、各食餌を自由摂取させ、Lard 食による糖・脂質代謝異常を誘導した。

10 週間後、FO 群と比較して Lard 群において糖・脂質代謝異常が誘導されているかを確認した後、Lard 食群を 5 匹ずつ、3 群に分け (Lard 群、Lard + EPA 群、Lard + C16:1 群)、実験期として 2 週間飼育した。Lard + EPA および Lard + C16:1 群には、Lard 食を自由摂取させることに加え、それぞれ EPA あるいは パルミトオレイン酸 20 mg を経口摂取させた。これらは、形状を保持しやすいようにラード 10 mg を加えて合計 30 mg とし、ミクロスパーテルにのせてマウスに食べさせた。パルミトオレイン酸 20 mg は、第 1 章における FO 群の食餌摂取量の結果から、マウス 1 匹あたりの 1 日のパルミトオレイン酸摂取量から算出した値であり、魚油食を摂取した場合と同量のパルミトオレイン酸を摂取したことになる。比較として EPA も同量の 20 mg に設定した。対照となる FO および Lard 群には、30 mg の ラードを食べさせた。マウスに経口摂取食させた理由は、生理的経路から摂取させたいためである。EPA およびパルミトオレイン酸は、毎朝 10:00 に摂取させた。パルミトオレイン酸摂取量は以下の①～③ の計算式に基づき算出した。

① 魚油食のエネルギー摂取量 (kcal/day/5 mice) \times 0.4 (脂質エネルギー比 40%) \div 9.21

(kcal/g ; 油脂のエネルギー換算係数) = 1 日当たりの油脂摂取量 (g) / 5 mice

② ① \times 0.042 (魚油中のパルミトオレイン酸含有比率 : 4.2%) = 1 日当たりのパルミトオレイン酸摂取量 (g) / 5 mice

③ ② \div 5 = マウス 1 匹あたりの 1 日のパルミトオレイン酸摂取量 (g)

実験食餌組成を Table 15 に示す。魚油の脂肪酸組成はガスクロマトグラフィーにて、ラードの脂肪酸組成は日本食品標準成分表を参考にした。油脂の特徴については第 3 章

Table 7 に示した。

Table 15. Dietary composition

	FO or Lard	Lard + EPA	Lard + C16:1
	(g / kg diet)	(g / kg diet)	(g / kg diet)
β -starch	389.5	389.5	389.5
Casein	231.2	231.2	231.2
Sucrose	77.9	77.9	77.9
Dietary oil	188.0	188.0	188.0
Cellose	57.8	57.8	57.8
AIN-93 vitamin mix (VX) (added choline bitartrate)	11.6	11.6	11.6
AIN-93 mineral mix (MX)	40.5	40.5	40.5
L-cysitn	3.5	3.5	3.5
<i>t</i> -butylhydroquinone	0.038	0.038	0.038
Total energy		4299.0 kcal/kg	
Carbohydrate		39% on a calorie basis	
fat		40% on a calorie basis	
Protein		21% on a calorie basis	
Oral administration of fatty acid	30 mg Lard	20 mg EPA + 10 mg Lard	20 mg C16:1 + 10 mg Lard

魚油原料には、サンオメガ DHA23（日油株式会社より提供）を使用した。ラード、精製飼料のカゼイン、スクロース、 β -スターチ、AIN-93 ビタミン混合及び AIN-93G ミネラル混合、セルロースパウダーは、オリエンタル酵母工業株式会社、L-シスチン、*t*-ブチルヒド

ロキノン は和光純薬工業株式会社より購入した。EPA (purity 90+) は Larodan Fine Chemicals (Malmö, Sweden) より、パルミトオレイン酸 (purity 99%) は MP Biomedicals, LLC (Solon, OH, USA) より購入した。

3. 食餌摂食量の測定、エネルギー摂取量の算出

飼育期間の 6 週目 (食餌馴化期) および 11 週目 (実験期) に、3 日間連続で食餌摂食量を測定し、エネルギー摂取量を算出した。

食餌摂食量の測定は第 1 章と同様の方法で行った。

エネルギー摂取量は、1 日の摂食量を各食餌のエネルギー量 (kcal) に乗じて算出した。3 日間の平均値を求め、標準誤差を算出した。

4. 空腹時血糖値、血漿インスリン、アディポネクチン濃度および血漿中脂質 (TG、TC、NEFA) 濃度の測定、HOMA-IR の算出

第 1 章と同様の方法で、これらの血中パラメータを測定および算出した。

5. 肝臓および腓腹筋中の脂質 (総脂質、TG、TC、NEFA) 量の測定

第 1 章と同様の方法で、肝臓中総脂質、TG、TC、NEFA 量を測定した。

リン脂質 (phospholipid ; PL) 量は、PL C-テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。

セラミド (ceramid) およびジアシルグリセロール (diacylglycerol ; DAG) は、薄層クロマトグラフィーを用いて展開後、10%硫酸銅 / 8%リン酸溶液を噴霧して 150°C で 30 分間焼いた。得られたセラミドおよび DAG のスポットを Image Master 1D Elite ver.3.00 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) にて解析して求めた。

6. WAT における組織学的検討

第 2 章と同様の方法で WAT の H&E 染色を行った。

7. 統計処理

実験データは、全て平均値±標準誤差 (Mean±SE) で示した。統計処理は、Statview 5.0 (SAS Institute Inc.) を用い、ANOVA にて行い、多群間の有意差検定は PLSD test により解析した。

食餌馴化期における 2 群間の有意差検定は Student's t test により行った。

$P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

引用文献

- [1] 平成 22 年 人口動態統計 厚生労働省.
- [2] 平成 20 年 国民健康・栄養調査 厚生労働省.
- [3] 農林水産省水産庁：我が国と世界の水産物需給 平成 19 年 6 月 (2007) 農林水産省水産庁, 東京.
- [4] Yamori, Y., Food factors for atherosclerosis prevention : Asian perspective derived from analyses of worldwide dietary biomarkers., *Exp. Clin. Cardiol.*, 11, 94-98 (2006).
- [5] Dyerberg, J., Bang, H.O., Hjorne, N., Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos., *Am. J. Clin. Nutr.*, 28, 958-966 (1975).
- [6] Dyerberg, J., Bang, HO., Stoffersen, E., Moncada, S., Vane, JR., Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?, *Lancet*, 15, 117-110 (1978).
- [7] Nair, SS., Leitch, JW., Falconer, J., Garg, ML., Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action., *J Nutr.*, 127, 383-393 (1997).
- [8] Ramel, A., Martínéz, A., Kiely, M., Morais, G., Bandarra, NM., Thorsdottir, I., Beneficial effects of long-chain n-3 fatty acids included in an energy-restricted diet on insulin resistance in overweight and obese European young adults., *Diabetologia*, 51, 1261-1268 (2008).
- [9] Myhrstad, MC., Retterstøl, K., Telle-Hansen, VH., Ottestad, I., Halvorsen, B., Holven, KB., Ulven, SM., Effect of marine n-3 fatty acids on circulating inflammatory markers in healthy subjects and subjects with cardiovascular risk factors., *Inflamm Res.* 60, 309-319 (2011).
- [10] Hashimoto, M., Hossain, S., Neuroprotective and ameliorative actions of polyunsaturated fatty acids against neuronal diseases: beneficial effect of docosahexaenoic acid on cognitive decline in Alzheimer's disease., *Pharmacol Sci.*, 116, 150-162 (2011).
- [11] Takahashi, M., Tsuboyama-Kasaoka, N., Nakatani, T., Ishii, M., Tsutsumi, S., Aburatani, H. and Ezaki, O., Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPARalpha activation and ROS production., *Am. J. Physiol.* 282, G338-348 (2002).

- [12] Nakatani, T., Kim, HJ., Kaburagi, Y., Yasuda, K. and Ezaki, O., 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.*, 44, 369-379 (2003).
- [13] Nakatani, T., Tsuboyama-Kasaoka, N., Takahashi, M., Miura, S. and Ezaki, O., Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes., *J. Biol. Chem.*, 277, 9562-9569 (2002).
- [14] Nakatani, T., Katsumata, A., Miura, S., Kamei, Y. and Ezaki, O., Effects of fish oil feeding and fasting on LXRE in the SREBP-1c promoter in mouse liver., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1736, 77-86 (2005).
- [15] Kim, HJ., Takahashi, M. and Ezaki, O., 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, 25892-25898 (1999).
- [16] Hong, DD., Takahashi, Y., Kushiro, M., and Ide, T., Divergent effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid ethyl esters, and fish oil on hepatic fatty acid oxidation in the rat., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1635, 29-36 (2003).
- [17] Arai, T., Kim, HJ., Chiba, H. and Matsumoto, A., Anti-obesity effect of fish oil and fish oil-fenofibrate combination in female KK mice., *J. Atheroscler. Thromb.*, 16, 674-683 (2009).
- [18] Saraswathi, V., Morrow, JD., and Hasty, AH., Dietary fish oil exerts hypolipidemic effects in lean and insulin sensitizing effects in obese LDLR^{-/-} mice., *J. Nutr.*, 139, 2380-2386 (2009).
- [19] Higuchi, T., Shirai, N. and Suzuki, H., Reduction in plasma glucose after lipid changes in mice fed fish oil, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid diets., *Ann. Nutr. Metab.*, 50, 147-154 (2006).
- [20] Shiba, S., Tsunoda, N., Ito, K., Wakutsu, M., Muraki, E., Sonoda, M., Tam, PS., Fujiwara, Y., Ikemoto, S., Kasono, K., Unsaturated fatty acids in fish oil play a role in adequate fat distribution to plasma, liver and white adipose tissue., *J. Health Sci.*, 57, 341-349 (2011).

- [21] Shiba, S., Tsunoda, N., Wakutsu, M., Muraki, E., Sonoda, M., Tam, PS., Fujiwara, Y., Ikemoto, S., Kasono, K., Regulation of Lipid Metabolism by Palmitoleate and Eicosapentaenoic Acid (EPA) in Mice Fed a High-Fat Diet., *Bosci Biotechnol Biochem.*, 75, 2401-2403 (2011).
- [22] Morgado, N., Galleguillos, A., Sanhueza, J., Garrido, A., Neito, S., Valenzuela, A., Effect of the degree of hydrogenation of dietary fish oil on the trans fatty acid content and enzymatic activity of rat hepatic microsomes., *Lipids*, 33, 669-673 (1998).
- [23] Morgado, N., Sanhueza, J., Neito, S., Valenzuela, A., Effect of the degree of hydrogenation of fish oil on the enzymatic activity and on the fatty acid composition of hepatic microsomes from young and aged rats., *Ann. Nutri. Metabo.*, 47, 124-131 (2003).
- [24] Granlund, L., Larsen, L.N., Christiansen, E.N., Pedersen, J.I., Absorption of very-long-chain saturated fatty acids in totally hydrogenated fish oil., *Br. J. Nutr.*, 84, 681-688 (2000).
- [25] Angulo P., Non alcoholic fatty liver disease., *N Engl J Med.*, 346, 1221-1231 (2002).
- [26] Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J.R., Wiest, M.M., Watkins, S.M., Hotamisligil, G.S., Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism., *Cell*, 134, 933-944 (2008).
- [27] Shapiro, H., Tehilla, M., Attal-Singer, J., Bruck, R., Luzzatti, R. and Singer, P., The therapeutic potential of long-chain omega-3 fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease., *Clin. Nutr.*, 30, 6-19 (2011).
- [28] Demonty, I., Deshaies, Y., Lamarche, B. and Jacques, H., Cod protein lowers the hepatic triglyceride secretion rate in rats., *J. Nutr.*, 133, 1398-1402 (2003).
- [29] Granlund, L., Larsen, LN., Christiansen, EN. and Pedersen, JI., Absorption of very-long-chain saturated fatty acids in totally hydrogenated fish oil., *Br. J. Nutr.*, 84, 681-688 (2000).
- [30] Tsunoda, N., Ikemoto, S., Takahashi, M., Maruyama, K., Watanabe, H., Goto, N. and Ezaki O., High-monounsaturated fat diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice., *Metabolism*, 47, 724-730 (1998).

- [31] Perona, JS., Avella, M., Botham, KM. and Ruiz-Gutierrez, V., Differential modulation of hepatic very low-density lipoprotein secretion by triacylglycerol-rich lipoproteins derived from different oleic-acid rich dietary oils., *Br. J. Nutr.*, 99, 29-36 (2008).
- [32] Hiraoka-Yamamoto, J., Ikeda, K., Negishi, H., Mori, M., Hirose, A., Sawada, S., Onobayashi, Y., Kitamori, K., Kitano, S., Tashiro, M., Miki, T. and Yamori, Y. Serum lipid effects of a monounsaturated (palmitoleic) fatty acid-rich diet based on macadamia nuts in healthy, young Japanese women., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 31 Suppl 2, S37-S38 (2004).
- [33] Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Kato, T., Atsumi, A., Yamamoto, T., Inoue, N., Ishikawa, M., Okada, S., Ishigaki, N., Iwasaki, H., Iwasaki, Y., Karasawa, T., Kumadaki, S., Matsui, T., Sekiya, M., Ohashi, K., Hasty, AH., Nakagawa, Y., Takahashi, A., Suzuki, H., Yatoh, S., Sone, H., Toyoshima, H., Osuga, J. and Yamada, N., Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance., *Nat. Med.*, 13, 1193-1202 (2007).
- [34] Paniagua, JA., de la Sacristana AG, Sánchez, E., Romero, I., Vidal-Puig, A., Berral, FJ., Escribano, A., Moyano, MJ., Pérez-Martínez, P., López-Miranda, J. and Pérez-Jiménez, F., A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects., *J. Am. Coll. Nutr.*, 26, 434-444 (2007).
- [35] Vessby, B., Unsitupa, M., Hermansen, K., Riccardi, G., Rivellese, AA., Tapsell, LC., Näslén, C., Berglund, L., Louheranta, A., Rasmussen, BM., Calvert, GD., Maffetone, A., Pedersen, E., Gustafsson, IB. and Storlien, LH., Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study., *Diabetologia*, 44, 312-319 (2001).
- [36] Tsuchida, A., Yamauchi, T., Takekawa, S., Hada, Y., Ito, Y., Maki, T., Kadowaki, T., Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination., *Diabetes*, 54, 3358-3370 (2005).

- [37] Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Murakami, K., Motojima, K., Komeda, K., Ide, T., Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Miki, H., Tsuchida, A., Akanuma, Y., Nagai, R., Kimura, S., Kadowaki, T., The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance., *J Biol Chem*, 276, 41245-41254 (2001).
- [38] 生活習慣病と PPARs (ライフサイエンス出版).
- [39] Saravanan, N., Haseeb, A., Ehtesham, NZ., Ghafoorunissa., Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue., *Eur J Endocrinol.*, 153, 159-165 (2005).
- [40] Griel, AE., Cao, Y., Bagshaw, DD., Cifelli, AM., Holub, B., and Kris-Etherton, PM., A macadamia nut-rich diet reduces total and LDL-cholesterol in mildly hypercholesterolemic men and women., *J. Nutr.*, 138, 761-7 (2008).
- [41] Curb, JD., Wergowske, G., Dobbs, JC., Abbott, RD., and Huang, B., Serum lipid effects of a high-monounsaturated fat diet based on macadamia nuts., *Arch. Intern. Med.*, 160, 1154-1158 (2000).
- [42] Matthan, NR., Dillard, A., Lecker, JL., Ip, B., and Lichtenstein, AH., Effects of dietary palmitoleic acid on plasma lipoprotein profile and aortic cholesterol accumulation are similar to those of other unsaturated fatty acids in the F1B golden Syrian hamster., *J. Nutr.*, 139, 215-221 (2009).
- [43] Higuchi, T., Shirai, N., and Suzuki, H., Reduction in plasma glucose after lipid changes in mice fed fish oil, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid diets., *Ann. Nutr. Metab.*, 50, 147-154 (2006).
- [44] Higuchi, T., Shirai, N., Saito, M., Suzuki, H., and Kagawa, Y., Levels of plasma insulin, leptin and adiponectin, and activities of key enzymes in carbohydrate metabolism in skeletal muscle and liver in fasted ICR mice fed dietary n-3 polyunsaturated fatty acids., *J. Nutr. Biochem.*, 19, 577-586 (2008).

- [45] Otto, DA., Baltzell, JK., and Wooten, JT., Reduction in triacylglycerol levels by fish oil correlates with free fatty acid levels in ad libitum fed rats., *Lipids*, 27, 1013-7 (1992).
- [46] Sasagawa, T., Ishii, K., Hasuda, K., Kubota, M., Ota, Y., and Okita, M., The effect of dietary polyunsaturated fatty acid on insulin sensitivity and lipid metabolism in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats., *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 64, 181-187 (2001).
- [47] Levy, JR., Clore, JN., and Stevens, W., Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids decrease hepatic triglycerides in Fischer 344 rats., *Hepatology*, 39, 608-616 (2004).
- [48] Pérez-Echarri, N., Pérez-Matute, P., Marcos-Gómez, B., Marti, A., Martínez, JA., and Moreno-Aliaga, MJ., Down-regulation in muscle and liver lipogenic genes: EPA ethyl ester treatment in lean and overweight (high-fat-fed) rats., *J. Nutr. Biochem.*, 20, 705-714 (2009).
- [49] Nagle, CA., Klett, EL., and Coleman, RA., Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance., *J. Lipid Res.*, 50, S74-S79 (2009).
- [50] Wendel, AA., Li, LO., Li, Y., Cline, GW., Shulman, GI., and Coleman, RA., Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 deficiency in ob/ob mice diminishes hepatic steatosis but does not protect against insulin resistance or obesity., *Diabetes*, 59, 1321-1329 (2010).
- [51] Saha, AK., Kurowski, TG., Colca, JR., and Ruderman, NB., Lipid abnormalities in tissues of the KK^{AY} mouse: effects of pioglitazone on malonyl-CoA and diacylglycerol., *Am. J. Physiol.*, 267, E95-E101 (1994).
- [52] Mantzaris, MD., Tsianos, EV., Galaris, D., Interruption of triacylglycerol synthesis in the endoplasmic reticulum is the initiating event for saturated fatty acid-induced lipotoxicity in liver cells., *FEBS J.*, 278, 519-530 (2011).
- [53] Puri, P., Baillie, RA., Wiest, MM., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., Sargeant, C., Contos, MJ., and Sanyal, AJ., A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease., *Hepatology*, 46, 1081-1090 (2007).

- [54] Puri, P., Wiest, MM., Cheung, O., Mirshahi, F., Sargeant, C., Min, HK., Contos, MJ., Sterling, RK., Fuchs, M., Zhou, H., Watkins, SM., and Sanyal, AJ., The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis., *Hepatology*, 50, 1827-1838 (2009).
- [55] Bligh, EG., and Dyer, WJ., A rapid method of total lipid extraction and purification., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917 (1959).
- [56] Folh, J., Lees, M. and Sloane, Stanley, GH., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues., *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509 (1957).
- [57] Fujiyama-Fujiwara, Y., Ohmori, C. and Igarashi, O., Metabolism of gamma-linolenic acid in primary cultures of rat hepatocytes and in Hep G2 cells., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 35, 597-611 (1989).