

秋田農村住民の血清脂肪酸構成

—20系列以上の多価不飽和脂肪酸 (P U F A) について—

沢部光一*	高桑克子*
船木章悦*	若松若子*
柏谷典子*	児島三郎*

I 目的

秋田農村住民の血清脂肪酸構成 (F A構成) を20系列以上の多価不飽和脂肪酸 (P U F A) を中心に、魚介類摂取量と P U F A、ならびに血清脂質分画中の P U F A との関連について検討した。

II 分析方法

対象は、秋田農村男子住民 (主に農業)、年齢30~69歳で、昭和57年 (11月) 50名、昭和58年 (11月) 63名、計113名である。測定に用いた血清は早期空腹時 (空腹時間12時間以上) に採血し、ただちに遠心分離した血清である。

ガスクロマトグラフ (G C) による血清脂肪酸分画法¹⁾ : 血清 0.5 ml を20ml の有栓試験管にとり、内部標準液** 0.5 ml を加える。次に、3% KOH-C₂H₅OH 溶液 2 ml を加え、60~65°C の温浴中で1時間加熱する。冷却後、H₂O 2 ml, NaCl 1 g および石油エーテル15ml を加え攪拌し、不ケン化物を除去する。次に、アルカリ層に6N HCl 1 ml を加え、HCl 酸性とし、エチルエーテル15ml を加え抽出を行なう (1回抽出)。エーテル層を50ml 有栓試験管に移し、H₂O 30ml およびNaCl 1 g を加え、水洗いを行なう。静置後、エーテル層を50ml ビーカーにとり、N₂ 気流中、40~50°C のヒーター上で蒸発乾固する。乾固後、ジアゾメタン-エチルエーテル溶液を内容物に滴下し、メチル化を行なう。得られた粗脂肪酸メチルエステル混合資料をアセトン溶液とし、その1~2 μl をG C に注入する。

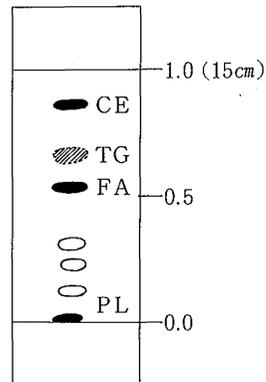
血清脂質分画の操作法²⁾ : 血清 0.5 ~ 1 ml を25ml 有栓試験管にとり、CH₃OH 2 ml を加え、充分攪拌後、CHCl₃ 4 ml を加え攪拌する。次に、NaCl 3 g およびH₂O 20ml 加え水洗いを行なう。

静置し、分離後、CHCl₃ 層を30ml 三角フラスコにとり、

anhyd. Na₂SO₄ 1~2 g を加え脱水する。脱水後、50 ml ビーカーにCHCl₃ 溶液をデカンテーションする。1回 Na₂SO₄ をCHCl₃ で洗浄する。

次に、CHCl₃ を N₂ 気流中、50°C ヒーター上で蒸発乾固し、再びCHCl₃ 1 ml を加える。得られた粗脂質混合資料を、分取薄層クロマトグラフ (preparative TLC) に展開する。

preparative TLC : 蛍光剤入りシリカゲル (Wakogel B-5 F) 0.75 mm のプレートを用い、エチルエーテル-石油エーテル (15 : 85) 溶媒系で、先に得られた粗脂質混合資料の展開を行なう。クロマトグラフは図1に示す。



TLC 展開溶媒 : ジエチルエーテル-石油エーテル (15 : 85)
 Wakogel B-5 F 0.75mm プレート
 CE : コレステロールエステル, TG : 中性脂肪
 FA : 遊離脂肪酸
 PL : リン脂質

図1 血清脂質の薄層クロマトグラム

展開後、UV 検出器により、コレステロール (Cho)、中性脂肪 (TG) およびリン脂質 (PL) の3スポットを10ml 試験管にかき取り、それぞれC₂H₅OH 2 ml で抽出を

* 秋田県衛生科学研究所

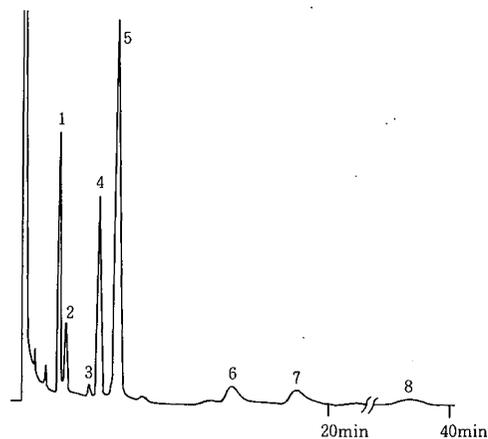
脚注)** マーガリン酸 (ベプタデカン酸C_{17:0}) のGR 試薬を3回以上再結晶し、充分乾燥後30mg/dl C₂H₅OH 溶液に調製する。 (-20°C 保存で半年間安定)

行ない、遠心分離により C_2H_5OH 層をデカンテーションし、3分画の脂質- C_2H_5OH 溶液を得る。

以下の操作法については、前述した血清脂脂肪酸分画法と同じ。但し、内部標準の添加を省く。

ジアゾメタン (CH_2N_2) - エーテル溶液の調製：(1) ニトロソメチル尿素の合成。³⁾ $24\%CH_3NH_2$ 200 g (1.5 mol) に conc HCl 約 155 ml を加え酸性溶液とする。次に、 H_2O を加え総量 500 ml とし、尿素 300 g (5 mol) を加え、1夜放置後、15分以上煮沸を行なう。冷後、 $95\%NaNO_2$ 110 g (1.5 mol) を加える。

別に、2 l ビーカーを用意し、氷 600 g と conc H_2SO_4 100 g を入れ、 $-5^\circ C$ に冷却する。これに、 $NaNO_2$ 溶液を少量づつ攪拌しながら加える（この時、内容物が $0^\circ C$ 以上にならないように注意する）。淡黄色の結晶が気泡と共に析出する。吸引口過し、ニトロソメチル尿素を得る ($4^\circ C$ に保存する)。Ⓢ再結晶および金属類の接触はさける。(2) ジアゾメタンの合成。50 ml ビーカーに 1% KOH 水溶液 5 ml を入れ、エチルエーテル 15~20 ml をそ



- | | |
|----------------------------------|---------------------------------|
| 1. パルミチン酸 ($P \cdot C_{16:0}$) | 2. パルミトオレイン酸 ($C_{16:1}$) |
| 3. ステアリン酸 ($C_{18:0}$) | 4. オレイン酸 ($O \cdot C_{18:1}$) |
| 5. リノール酸 ($L \cdot C_{18:2}$) | 6. アラキドン酸 ($C_{20:4}$) |
| 7. エイコサペンタエン酸 ($C_{20:5}$) | 8. ドコサヘキサエン酸 ($C_{22:6}$) |

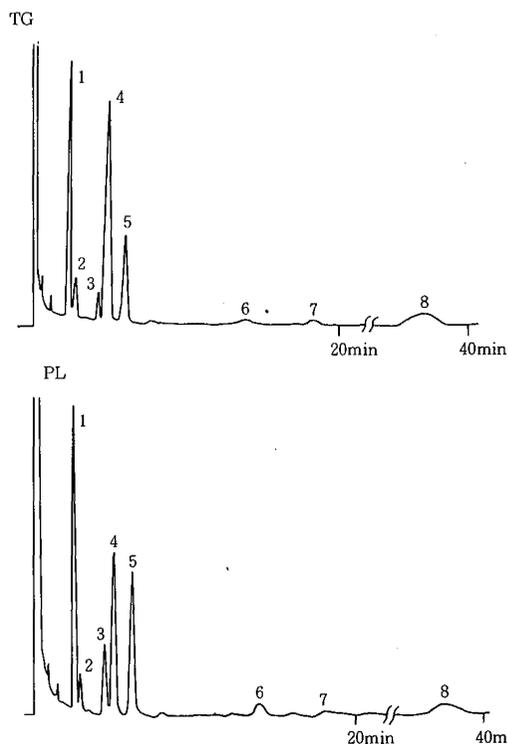
図2 血清Cho, TG およびPL分画のFAクロマトグラム

れに積層させ、 $-10^\circ C$ のフリーザーで10分間冷却する。次に、室温に取り出し、ニトロソメチル尿素少量を加える。この時、結晶から発泡を生じ、エーテル層が黄変し、ジアゾメタンが生成される。この黄色のエーテル溶液を脂肪酸混合資料に滴下し、室温に10分間放置する。黄色が消失したら、さらにジアゾメタン-エーテル溶液を滴下し黄色が消えない程度で、メチル化は完成する。

GCの条件：充てん剤：Diasolid ZF, 80~100mesh (日本クロマト), $3mm\phi \times 2m$ ガラスカラム, カラム温度 $195^\circ C$ (定温)。キャリアーガス： N_2 , 流量 $75ml/min$ 。検出器：FID, 検出器温度 $195^\circ C$ 。注入温度 $195^\circ C$, 注入量 1~2 μl 。装置：日立 663-50形。データ解析：キャノン CX-1 を使用。

GCによる血清脂質分画中の脂肪酸構成の1例を図2に示した。

魚介類摂取量調査：個人面接24時間聞きとり栄養調査を同時に行ない、この調査票より魚介類摂取の項目を抽出し、その摂取状況を調査した。



III 結果と考察

1 年齢階層別の血清FA構成 (表1)

年齢階層別に血清FA構成の平均値をみると、リノール

酸 ($C_{18:2}$) が $mg/dl \cdot \%$ とも30歳代でそれぞれ $108.9 mg/dl$, 29.2% と、他の年齢階層に比べ高い値を示した。また、パルミトオレイン酸 ($C_{16:1}$) は、30歳代でそれぞれ $9.6 mg/dl$, 2.4% と他の年齢階層に比べ最低値を示し同時に他の全てのFA値より低い値を示した。次に、

表1 年齢層別の血清脂肪酸 (F A) 構成

昭和57~58年 (男)

年 齢	30 ~ 39	40 ~ 49	50 ~ 59	60 ~ 69	計
n	17	34	39	23	113
T F A mg/dl	348.7 (124.92)	398.9 (122.25)	399.1 (93.94)	403.2 (117.01)	392.3 (112.51)
C16: 0 "	85.5 (24.97)	92.7 (30.23)	94.1 (23.18)	93.0 (31.51)	92.1 (27.27)
C16: 1 "	9.6 (6.99)	16.6 (8.58)	15.3 (10.90)	17.7 (11.23)	15.3 (10.01)
C18: 0 "	20.5 (5.55)	21.5 (6.77)	22.4 (4.94)	22.9 (7.18)	21.9 (6.08)
C18: 1 "	82.7 (29.23)	92.7 (33.30)	92.0 (33.33)	95.8 (38.10)	91.6 (33.57)
C18: 2 "	108.9 (35.72)	100.6 (33.38)	102.4 (26.81)	99.4 (17.89)	102.2 (28.75)
C20: 4(A) "	23.1 (6.09)	22.9 (8.85)	22.6 (5.00)	22.1 (7.07)	22.7 (6.84)
C20: 5(E) "	18.7 (8.02)	22.8 (10.62)	22.5 (8.42)	22.9 (12.79)	22.1 (10.03)
C22: 6 "	26.9 (13.26)	28.3 (15.81)	27.7 (11.07)	29.5 (18.87)	28.1 (14.52)
C16: 0 %	22.9 (2.74)	23.2 (2.98)	23.6 (2.52)	22.9 (2.83)	23.2 (2.74)
C16: 1 %	2.4 (1.37)	4.1 (1.70)	3.6 (1.66)	4.1 (1.40)	3.7 (1.67)
C18: 0 %	5.6 (0.95)	5.5 (0.91)	5.7 (0.75)	5.7 (0.85)	5.6 (0.85)
C18: 1 %	21.6 (2.39)	23.0 (2.49)	22.7 (3.16)	23.4 (3.76)	22.8 (3.02)
C18: 2 %	29.2 (5.22)	25.6 (6.13)	26.0 (5.24)	25.8 (5.81)	26.3 (5.69)
C20: 4 %	6.3 (1.09)	5.7 (1.20)	5.8 (1.11)	5.6 (1.39)	5.8 (1.20)
C20: 5 %	5.2 (2.08)	5.8 (2.36)	5.8 (2.13)	5.6 (2.60)	5.7 (2.28)
C22: 6 %	6.9 (2.07)	7.1 (1.91)	6.9 (1.63)	6.9 (2.54)	6.9 (1.97)
E / A	0.86 (0.410)	1.02 (0.349)	1.00 (0.382)	1.02 (0.497)	0.99 (0.402)

平均値 (標準偏差)

20系列以上のP U F A構成の平均値をみると、各年齢層ともドコサヘキサエン酸 (C_{22:6}) がmg/dl, %とも高い値を示した (全年齢: 28.1 mg/dl, 6.9%)。アラキドン酸 (C_{20:4}) とエイコサペンタエン酸 (C_{20:5}) は、30歳代でC_{20:4}がC_{20:5}よりmg/dl・%とも、高い値を示したが、40~69歳では各年齢層とも同程度の値を示した (全年齢: C_{20:4}が22.7 mg/dl, 5.8%, C_{20:5}が22.1 mg/dl, 5.7%)。

2 魚介類摂取量と血清F A構成の比較 (表2)

魚介類の1日摂取量を100 g/日未満 (平均37 g/日)、100 g/日~200 g/日未満 (平均139 g/日) および200 g/日 (平均238 g/日) 以上の3群に区分し、血清F A構成を比較した。魚介類摂取量100 g/日未満群に比べ200 g/日以上群の血清C_{20:5}がmg/dl, %とも有意に高値を示した (p<0.05)。しかし、血清C_{22:6}については有意な差はみられなかった。魚介類摂取量100 g/日未満群に比べ、100 g/日~200 g/日未満群の血清C_{20:5}およびC_{22:6}値が高い値を示したが、有意水準には至らなかった。我々は、この栄養調査と並行して、普段の魚介類摂取状況をアンケート形式により聞きとり、それによる、1日の魚介類推定摂取量を計算した。その結果100 g/日未満 (平均37 g/日) 群はアンケートによ

る摂取量の平均が67 g/日、100 g/日~200 g/日未満 (平均139 g/日) 群はアンケートが91 g/日と、両群のアンケートによる魚介類摂取量の平均値が比較的接近しており、そのため、血清C_{20:5}、C_{22:6}に有意な差が現れなかったとも考えられる。一方、魚介の種類や、含油量の違い、さらに魚介油のF A構成の違いが血清F A構成に影響を与えることが考えられ、今後の詳細な検討を必要とする。

3 血清脂質分画中のF A構成比率 (表3)

我々は既に、血清Cho, T GおよびP L分画のC_{16:0}%~C_{18:2}%について、その挙動を詳細に報告した。⁴⁾ここではさらにP U F Aについて調査した。その結果、Cho分画は、C_{20:4}が高く (8.2%)、C_{22:6}が低い値 (1.2%) を示した。T G分画は、C_{22:6}が高く (5.3%)、C_{20:4}とC_{20:5}が同じ比率 (2.5%) を示した。またP L分画はC_{20:4}とC_{22:6}がほぼ同じ比率 (それぞれ7.2%, 7.4%) を示し、C_{20:5}が低比率 (4.2%) を示した。E/A (C_{20:5}/C_{20:4}) 比は、T G分画が高く (1.08)、P L分画が低い比 (0.62) を示した。これらの結果から、血清F A中に占めるP U F Aの割合はP L分画とCho分画が高く、ChoとP LがP U F Aとなんらかの関連を示唆すると思われる成績が得られた。

表2 魚介類摂取量別の血清F A構成の比較
昭和57~58年 30~69歳(男)

魚介摂取量	魚<100g/日	100g/日<魚<200g/日	200g/日<=魚
n	52	46	15
TFA mg/dl	377.6(112.52)	409.3(118.12)	390.8(92.47)
C16:0 %	89.0(26.58)	96.1(29.12)	90.6(23.70)
C16:1 %	14.6(10.90)	16.7(9.98)	13.3(6.09)
C18:0 %	21.1(5.38)	23.0(6.87)	21.6(5.68)
C18:1 %	89.3(33.40)	96.3(36.65)	85.1(22.32)
C18:2 %	103.2(23.73)	101.5(33.94)	100.9(29.18)
C20:4 ^(A) %	22.4(6.57)	22.4(7.12)	24.4(7.10)
C20:5 ^(E) %	19.9(8.45)	23.0(10.44)	26.9 [*] (12.27)
C22:6 %	26.9(14.39)	29.6(15.86)	27.9(10.55)
C16:0 %	23.0(2.63)	23.6(2.96)	23.2(2.46)
C16:1 %	3.6(1.69)	3.9(1.73)	3.4(1.46)
C18:0 %	5.5(0.70)	5.7(0.98)	5.6(0.90)
C18:1 %	22.7(2.79)	23.1(3.35)	21.7(2.59)
C18:2 %	27.3(5.29)	25.3(6.26)	26.0(4.94)
C20:4 %	5.9(1.18)	5.5(1.19)	6.3(1.14)
C20:5 %	5.3(1.85)	5.7(2.58)	6.8(2.37)
C22:6 %	6.8(1.96)	7.1(2.14)	7.0(1.42)
E / A	0.92(0.396)	1.04(0.403)	1.10(0.396)
魚介類g/日	a) 37	139	238
アンケートによる魚介類g/日	b) 67	91	138

a) 24時間聞きとりによる摂取量 平均値(標準偏差)
b) アンケート調査による1日の推定摂取量
* P<0.05

表3 血清脂質分画中の脂肪酸構成比率(%)
昭和58年、30~59歳 n=63

	Cho分画	TG分画	PL分画
C16:0 %	12.5(1.84)	26.0(5.98)	25.3(3.21)
C16:1	4.2(1.56)	5.6(2.14)	2.0(1.04)
C18:0	0.5(0.36)	3.2(1.37)	9.3(1.83)
C18:1	21.1(3.42)	36.7(5.14)	25.2(3.91)
C18:2	45.1(7.92)	18.2(5.11)	19.5(4.80)
C20:4 ^(A)	8.2(2.51)	2.5(2.07)	7.2(2.36)
C22:5 ^(E)	7.1(3.11)	2.5(2.36)	4.2(2.60)
C22:6	1.2(0.80)	5.3(3.10)	7.3(2.93)
E / A	0.94(0.510)	1.08(0.790)	0.62(0.402)

平均値(標準偏差)

4 魚介類摂取量と血清脂質分画中のP U F Aの相関係数(表4)

Cho, TG, PL 3分画および総F A中のC_{20:4}は、いずれも魚介類摂取量と相関はみられなかった。

C_{20:5}は, Cho, PL両分画および総F Aと魚介類摂取量の間に正の相関がみられ, またC_{22:6}は, PL分画のみに正の相関を示した。

このように, 魚油摂取により取り込まれるP U F Aは各脂質に異なった分配を示していることが観察された。

表4 魚介類摂取量と血清脂質分画中の多価不飽和脂肪酸(P U F A)の相関係数
昭和58年=30~69歳(男) n=63

	C20:4	C20:5	C22:6
Cho分画(%)	-0.027	0.325 ^{**}	0.109
TG分画(%)	0.099	0.212	0.197
PL分画(%)	-0.085	0.273 [*]	0.338 ^{**}
総F A(mg/dl)	0.059	0.243 ^{**}	0.073

血清脂質中のCho, TG, PL分画(%)および総F A(mg/dl)のC_{20:4}, C_{20:5}, C_{22:6}値と個々の魚介類摂取量(g/日)との相関係数を示す。* P<0.05 **P<0.01

5 魚介類摂取別血清脂質分画中のP U F A(図3)

被検者63例の魚介類摂取量の平均値105g/日を105g/日未満群34例と105g/日以上群29例の2群に区分し, 血清脂質3分画中のP U F Aを比較した。この結果, C_{20:4}%は, 脂質3分画とも2群間に差がみられなかった。C_{20:5}%はCho分画のみが魚介類摂取量105g/日未満群に比べ, 105g/日以上群が有意に高く(p<0.05) C_{22:6}%は, PL分画のみが上記と同じく, 105g/日以上群に有意な高値を示した(p<0.01)。

IV まとめ

以上の結果をまとめると,

(1)年齢階層別の血清F A中のP U F A(C_{20:4}, C_{20:5}, C_{22:6})構成を比較すると, 各年齢階層ともC_{22:6}(mg/dl・%)が最高値を示した。また, C_{20:4}, C_{20:5}についてはmg/dl, %ともほとんど差がみられなかった。

(2)魚介類摂取量200g/日以上群は, 100g/日未満群に比べ血清C_{20:5}のみがmg/dl, %とも有意に高値を示した。

(3)魚介類摂取量と血清脂質分画中のP U F Aとの相関関係をみると, Cho, PL分画中のC_{20:5}%, およびPL分画中のC_{22:6}%と魚介類摂取量の間にそれぞれ正の相関がみられた。

(4)魚介類摂取量の多い群(≧105g/日)は, 少ない群(<105g/日)に比べ, Cho分画中のC_{20:5}%およびPL分画のC_{22:6}%が有意に高値を示した。

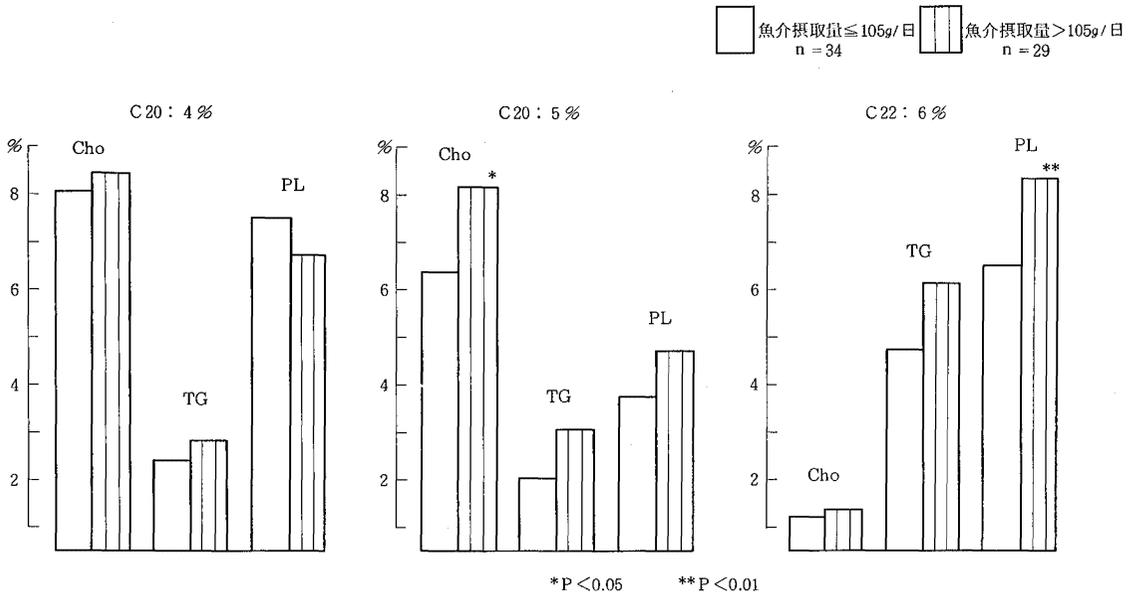


図3 魚介類摂取量別・血清脂質分画中のPUFA
昭和58年 30~59歳(男)

稿を終るにあたり、地域調査にご協力いただきました南秋田
郡井川町役場保健衛生課の職員各位に深く感謝いたします。
本論文の要旨は第43回日本公衆衛生学会総会で発表した。

文 献

- 1) 荒木峻, 他: ガスクロマトグラフィー, 第6集, 化学の領域増刊65号, 南江堂, 1964
- 2) 石川正幸, 他: 薄層クロマトグラフィー, 基礎と応用, 改訂第3版, 南山堂, 1968
- 3) 奥村重雄, 実験有機化学 I, 共立全書58, 共立出版, 1956
- 4) 沢部光一, 他: 秋田農村住民の血圧値分類による血清脂肪酸構成の比較検討(第2報), 血清脂質分画中の脂肪酸構成, 日本公衛誌, 32, 173~180, 1985