

原 著

フグ肝投与による血清脂質の変動および病理組織学的観察

Change of serum lipid and histopathological observation of the liver in a mouse by a dose of non-toxic pufferfish liver

大貫和恵 柴 真悟 武藤亜矢 野口玉雄

Kazue ONUKI, Shingo SHIBA, Aya MUTOH, Tamao NOGUCHI



東京医療保健大学
TOKYO HEALTHCARE UNIVERSITY

〈原著論文〉

フグ肝投与による血清脂質の変動および病理組織学的観察

Change of serum lipid and histopathological observation of the liver in a mouse by a dose of non-toxic pufferfish liver

大貫和恵¹ 柴 真悟² 武藤垂矢¹ 野口玉雄²

¹東京医療保健大学 医療保健学部 医療栄養学科

²東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科

Kazue ONUKI¹, Shingo SHIBA², Aya MUTOH¹, Tamao NOGUCHI²

Division of Medical Nutrition, Faculty of Healthcare, Tokyo Healthcare University¹

Division of Medical Nutrition, Tokyo Healthcare University Graduate School²

要 旨：人工飼料で陸上養殖された無毒トラフグの肝臓（フグ肝）には、機能性成分DHAやIPAが多量に含まれている。DHAは、血漿や肝臓コレステロールの低下作用が報告されていることから、本研究では、マウスを用いる飼育実験により上記の効果を調べた。フグ肝を与えたマウス（フグ肝投与群）より血液を採取し、血清脂質濃度を測定するとともに、その肝臓をSudanⅢ染色（脂肪染色）して、顕微鏡下でフグ肝を与えないマウス（コントロール群）と比較した。血清総コレステロール（TC）濃度は、フグ肝投与群がコントロール群より低値を示し（ $p < 0.05$ ）、フグ肝には、血清TC濃度の低下作用があることが示された。また、脂肪染色したマウスの肝臓の組織標本より、コントロール群は、びまん性に著明な脂肪陽性である一方、フグ肝投与群は、強拡大で微細な顆粒状脂肪滴の沈着が確認された。フグ肝投与群は、コントロール群より脂肪の沈着が弱かったことが明らかとなった。

キーワード：フグ肝、機能性成分、DHA、コレステロール

Key words：Pufferfish liver, Functional components, Docosahexaenoic acid, Cholesterol

受付：2012年4月6日

受理：2012年9月20日

はじめに

1983年、当時の厚生省は、環境衛生局長通知「フグの衛生確保について」¹⁾により、有毒種、無毒種を含めたすべてのフグの肝臓（以下、フグ肝）を食用として販売することが禁止されている。そのため、現在もなお、費用をかけて廃棄されており、フグ肝の入手が困難なことから、フグ肝の特性研究は、殆ど行われていない。

一方、野口らの研究^{2) 3)}により、テトロドトキシン（TTX）を保有する生物が存在しない環境で養殖されたフグは、毒性を持たないことが明らかとなり、現在では、無毒フグの生産が可能となった。これらの研究により、費用をかけて廃棄してきた無毒のフグ肝が、将来的には安全で栄養価の高い食品として利用されることを期待し、その特性を栄養学的側面に焦点を絞り、

研究を重ねてきた。

当該のフグ肝には、生だけでなく加工品（レトルトパウチ詰、缶詰、ぬか漬け等）にもDHA（Docosahexaenoic acid）やIPA（Icosapentaenoic acid）等の機能性成分が多く含まれており、その嗜好性についても官能評価から高い評価を得ることができた^{4) 5)}。これら成分には、一般的に心血管系疾患の予防効果⁶⁾、視覚機能の向上⁷⁾、老人性認知症の改善⁸⁾、精神安定化作用⁹⁾、脳の発達促進作用、記憶学習の維持向上作用^{10) 11)}が報告されており、機能性成分を多く含むフグ肝にも、これらの効果が期待された。これらの効果のうち脳の記憶学習の維持向上については、前報¹²⁾により明らかにした。

本研究では、フグ肝にそれ以外の機能性成分による効果（心血管系疾患の予防効果）をマウスにフグ肝を摂取させる実験により、摂取後のマウスの血清の脂質

濃度および肝臓組織の変化を検討し、フグ肝の栄養生理学効果を明らかにする。

方 法

1. 試料

(株)萬坊(佐賀県唐津市呼子)の室内水槽で陸上養殖されたトラフグ2年魚より腑分けされた肝臓を試料とした。なお、試料は、食品衛生検査指針・理化学編中のフグ毒検査法¹³⁾に準じて毒性試験をし、毒量が2MU/g未満(無毒)であることを確認後に使用した。

2. 実験動物

2.1 飼育環境

実験動物は、ddY系雄マウス(約20g, 5週令)を数日間予備飼育後、実験に用いた。また、マウスは、フグ肝を含まない飼料を摂取させた群(コントロール群:n=16)とフグ肝を含む飼料を摂取させた群(フグ肝投与群:n=16)の2群に分けて3週間飼育した。

2.2 マウスの飼育環境

マウスは、購入後から実験終了まで室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度50~60%、12時間照明(午前8時~午後8時まで点灯)で常時換気的环境下でプラスチックマウスケージ(サイズ:W245×D175×H125mm)に入れて飼育した。なお、飼料と水は自由摂取とし、摂食量と体重を毎日測定した。

2.3. 飼料配合

マウスの飼料配合は、AIN(American Institute of Nutrition)-93G¹⁴⁾に基づき調製した(Table 1)。なお、本研究では、機能性成分(DHA、IPA等)の効果を検証するため、飼料中の脂質源としてそれら成分が微量であるラード(SIGMA-ALDRICH, 1.3g/100g)¹⁵⁾を使用した。

コントロール群の配合飼料(100gあたり)は、脂質源をラードのみ7g使用し、DHAおよびIPAが0mgにした。一方、フグ肝投与群は、フグ肝6gとラード2.668gを混合して脂質源が7gになるように調整し、DHAが512mg、IPAが394mg含まれている。また、フグ肝には、その他の成分(タンパク質、炭水化物等)も含まれているため、両群の組成が同等になるように配合を調整した。

3. 血清脂質濃度測定

飼育後のマウスに、エーテル麻酔下で全採血した後、屠殺および解剖した。血液を遠心分離して得た血清を用いて脂質濃度を測定した。脂質について、トリグリ

Table1 マウスの飼料配合 (g/100g)

	コントロール 群	フグ肝投与 群
コーンスターチ	52.94860	52.7866
カゼイン	20	19.8140
スクロース	10	10
ラード	7	2.668 ^{*2}
フグ肝	- ^{*1}	6
セルロースパウダー	5	5
ミネラルミックス	3.5	3.5
ビタミンミックス	1	1
L-シスチン	0.3	0.3
重酒石酸コリン	0.25	0.25
第三ブチルヒドロキノン	0.0014	0.0014
合計	100	101.32 ^{*3}

*1 配合無し。

*2 脂質は、合計7g/100gにフグ肝とラードの量を調整した。

*3 フグ肝の水分量(1.32g/6g)を考慮した。

セリド(TG)濃度はGPO・DAOS法、総コレステロール(TC)濃度はコレステロールオキシダーゼ・DAOS法およびHDL-コレステロール(HDL-C)濃度はリントングステン酸・マグネシウム塩沈殿法を用い、それぞれ測定した。測定試薬は、それぞれ和光純薬工業(株)のトリグリセリドE-テストワコー、コレステロールE-テストワコーおよびHDL-コレステロールE-テストワコーを使用した。

なお、比較対照として実験開始のマウス(n=5)の血清脂質濃度も測定した。

4. 病理組織学的観察

肝臓組織は、3.にてマウスの腹部を広く切開し、肝臓を肉眼的に観察後、速やかにマウスごと10%ホルマリン水で十分に固定した。数週間後、マウスの肝臓から小組織片を作製し再固定した後、脱水した。脱水された小組織片をパラフィンで包埋し、厚さ4μmの切片を作製して2種の染色をした。組織全体像をみる基本的な染色としてHematoxyline-Eosin重染色(HE染色)、脂質の蓄積の程度とその沈着様式をみるSudanⅢ染色で行った。なお、SudanⅢ染色では、屠殺時に固定した肝臓の小組織片から凍結切片を作製した後、染色し、組織の脂肪沈着の変化をみた。

なお、比較対照としてフグ肝投与群に含まれているDHA量(592mg/100g)と同量をマウスに投与したDHA投与群も同様に観察した。

5. 統計処理

実験結果は、統計解析ソフト SPSS (ver.11.5) により、平均値 (mean) $\pm$ 標準偏差 (SD) で表し、有意差検定を T 検定にて行った。なお、有意水準を 5% とした。

結果

1. マウスの体重推移および累計飼料摂取量

マウスの累計飼料摂取量は、コントロール群が 218 ± 10 g (n=16)、フグ肝投与群が 215 ± 15 g (n=16) を示し、若干、コントロール群の方が多いが、両群間における有意差は認められなかった。また、体重増加量は、コントロール群が 12 ± 2 g、フグ肝投与群が 12 ± 3 g で、両群間における有意差は認められなかった。

2. 血清脂質濃度

マウスの血清脂質濃度の結果を Fig.1 に示した。

TG 濃度は、コントロール群が 139 ± 51 mg/dl、フグ肝投与群が 152 ± 44 mg/dl を示し、フグ肝投与群が高値を示したが、有意差は認められなかった。TC 濃度は、コントロール群が 163 ± 36 mg/dl、フグ肝投与群が 126 ± 38 mg/dl を示し、フグ肝投与群が有意に低値を示した ($p < 0.01$)。HDL-C 濃度は、コントロール群が 121 ± 24 mg/dl に対して、フグ肝投与群が 93 ± 25 mg/dl を示し、有意差が認められた ($p < 0.01$)。また、TC 濃度中の HDL-C 濃度の割合は、コントロール群およびフグ肝投与群ともに 75% であり、両群間での有意差は認められなかった。

なお、実験開始のマウス (n=5) の血清脂質濃度は、TG 濃度が 135 ± 54 mg/dl、TC 濃度が 142 ± 28 mg/dl、HDL-C 濃度が 76 ± 15 mg/dl、TC 濃度中の HDL-C 濃度の割合が 54% であった。これらの結果を上記と比べると、飼育後のマウスの TG および TC 濃度は、本来、増加する傾向にあるが、フグ肝投与群の TC 濃度のみに上昇することなく、若干減少していた。

3. 肝組織の病理組織学的観察

HE 染色および Sudan III 染色の結果を Fig.2～3 に示した。

HE 染色では、コントロール群が Eosin の染色がやや薄く、強拡大 ($\times 40$) にて、いずれの細胞質内にも無数の小空胞がみられた (Fig.2b)。一方、フグ肝投与群では、主に肝細胞の細胞質内において、中心静脈周囲性に顆粒状の細かい空胞が多数認められた (Fig.3a,b)。両群の細胞質内には、同様の小空胞がみられたが、これは、脂肪滴が抜けてきたものと考えられ、コント

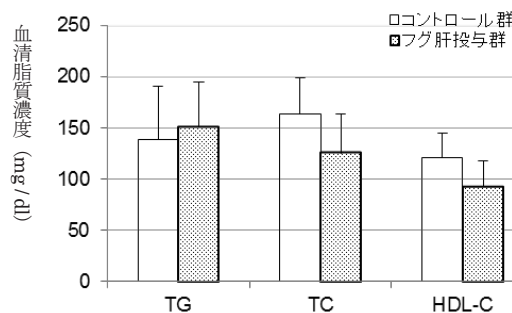
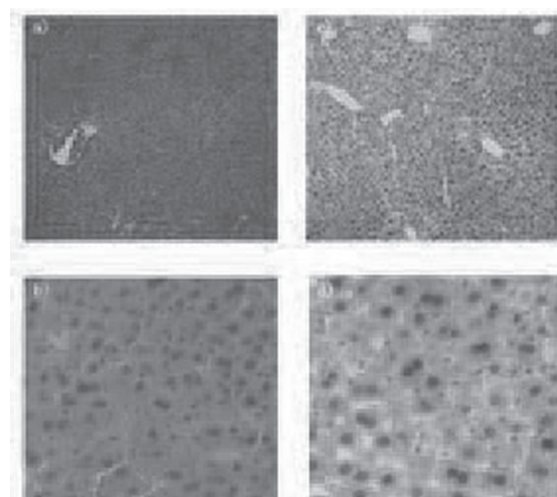
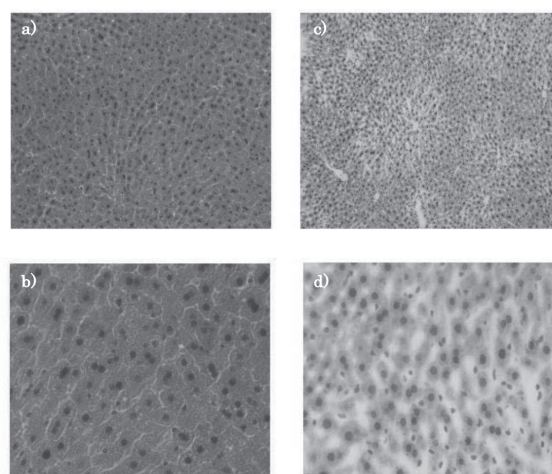


Fig.1 マウスの血清脂質濃度



- a) HE 染色 $\times 10$ 肝正常構築の乱れ、線維の増生などは認められない
 b) HE 染色 $\times 40$ 細胞質内泡沫脂肪沈着を認める
 c) Sudan III 染色 $\times 10$ ビマン性に著しい脂肪沈着を認める
 d) Sudan III 染色 $\times 40$ 沈着脂肪滴の大きさが目立つ
 細胞質内の脂肪の色調の増加を認める

Fig.2 マウスの肝組織の病理組織学的観察 (コントロール群)



- a) HE 染色 $\times 10$ 肝臓の正常構築の乱れを認めない
 b) HE 染色 $\times 40$ 肝細胞における微細な脂肪沈着
 c) Sudan III 染色 $\times 10$ 小葉中心性脂肪沈着
 d) Sudan III 染色 $\times 40$ 肝細胞質内の弱い脂肪沈着

Fig.3 マウスの肝組織の病理組織学的観察 (フグ肝投与群)

ロール群がびまん性に、フグ肝投与群が中心静脈周囲性に無数に存在したことから、両群の脂肪の分布には違いがみられた。

Sudan III染色では、コントロール群の脂肪がびまん性に染色され、脂肪滴の大きさが顆粒状程度であった (Fig.2c)。一方、フグ肝投与群では、肝小葉中心性脂肪沈着がみられ、弱拡大 ($\times 10$) では帯赤色調から淡黄赤色調に斑状の染色性を示した (Fig.3c)。強拡大 ($\times 40$) では、非常に細かい顆粒状脂肪球の沈着がみられた (Fig.3d)。なお、両群の肝臓には、脂肪滴がみられたが、フグ肝投与群がコントロール群よりも微細であることが確認された。

なお、DHA投与群のHE染色は、中心静脈周囲性に顆粒状の空胞が認められ、Sudan III染色は、肝小葉中心性脂肪沈着がみられた。これらの結果は、フグ肝投与群と類似しているが、DHA投与群の方が脂肪の沈着程度が弱かった。

考 察

1. 血清脂質濃度

TG濃度は、両群の数値に違いはみられたものの、有意差が認められなかったことから、フグ肝を摂取したことによるTGの効果を血清結果からは明らかにすることができなかった。他方、TC濃度は、フグ肝投与群がコントロール群より低く、実験開始前より飼育後に減少したことから、フグ肝に含まれるDHA等が血清TC濃度を低下させたと考えられる。

鈴木¹⁶⁾の報告よりIPAには、中性脂肪を減少させ、DHAには、血清コレステロールおよび中性脂肪を減少させる効果が認められている。本研究でもこの報告と同様の結果が得られたことから、フグ肝に含まれるDHAには、体内にコレステロールの蓄積を抑制させる効果があることが示唆された。

2. 肝組織の病理組織学的観察

脂肪沈着について、コントロール群は、びまん性脂肪沈着が著しく、脂肪滴は顆粒状から中脂肪滴であった。一方、フグ肝投与群は、肝小葉中心性脂肪沈着を呈しており、弱拡大 ($\times 10$) にて著しい斑状の脂肪沈着が確認され、沈着している脂肪滴が微細顆粒状であることから、コントロール群と異なっていた。また、フグ肝投与群の脂肪沈着は、同様に実験をしたDHA投与群と比較すると、類似していたが、その程度が弱かった。

以上の結果から、フグ肝投与群はコントロール群に比べて、脂肪沈着の程度が極めて弱く、脂肪が微量で

あることが明らかとなった。鈴木¹⁷⁾や餅ら¹⁸⁾より、魚油の摂取は、肝臓の脂肪を蓄積する抑制効果があると報告されている。本研究では、これらの報告と同様の結果が得られたことから、フグ肝には、肝臓の脂肪を蓄積する抑制効果があることが示唆された。

また、今回の組織学的観察から、フグ肝投与群は、比較対照として用いたDHA投与群と類似した脂肪の沈着様式を呈し、フグ肝を食品として摂取した際にも、内臓脂肪が蓄積しにくいのではないかと考えられる。

結 論

本研究から、フグ肝を摂取することにより、血清TC濃度の上昇抑制作用が得られることが明らかとなった。フグ肝には様々な成分が含まれているため、食品として摂取すれば、そのほかの成分との相乗効果から、サプリメントなどのDHA単体での摂取よりも機能性の効果を図れると推察される。また、フグ肝を食品として摂取すれば、DHA単体と同様に、内臓脂肪沈着による脂質代謝異常を来たす可能性が非常に低いことが示唆され、フグ肝は、機能性成分に富んだ優れた食品であると言える。

以上より、優れた食品であるフグ肝が市場に流通することで、日本のみならず、世界の食文化の発展に大きく貢献することが期待できる。さらに、食品としてのフグ肝は、サプリメントのような単一成分ではなく、様々な成分を含有していることから、それらの相乗効果が期待できる。

謝 辞

本研究をするにあたり、マウスの肝臓組織標本作製および観察でご教授いただいた桐蔭横浜大学 直江史郎教授に心より謝辞を申し上げます。

本研究を進めるにあたり協力した東京医療保健大学大学院生 島田 誠、医療保健学部卒業研究生 (小原 伴美, 小林 なつき, 近藤 豊, 酒井 悠司, 日原 詩織, 皆川 彩)、さらに、試料を快く提供していただいた株式会社萬坊に深謝いたします。

また、本研究の一部は、平成23年度東京医療保健大学医療保健学部医療栄養学科、特別研究費にて行われた。

参考文献

- 1) 厚生省環境衛生局長通知：フグの衛生確保について。環乳第59号，昭和58年12月2日。

- 2) 野口玉雄, 高谷智裕, 荒川 修. 囲い養殖法により養殖されたトラフグの毒性. 食品衛生学雑誌 2004;45(3):146-149.
- 3) 大貫和恵, 野口玉雄, 荒川 修. 開放系循環水槽において養殖されたトラフグ肝臓の無毒確認とその脂質中の機能性成分. 日本食品化学学会誌 2009;16(3):157-162.
- 4) 大貫和恵, 野口玉雄, 荒川 修. 安全なフグ肝加工品の栄養成分と機能性成分. 日本食品化学学会誌 2010;7:6-11.
- 5) Onuki K., Noguchi T. Reconfirmation of non-toxicity of the liver and nutritional function of its lipid, of the pufferfish cultivated for 2 years in 2006 and 2007 respectively, in the open system of circular aquarium. Bulletin of Tokyo Healthcare University 2008;3:15-21.
- 6) Hirai, A., Hamazaki, T., Terano, T., et al. Eicosapentaenoic acid and platelet function in Japanese. Lancet 1980;2:1132-1133.
- 7) Hoffman, DR., Birch, EE., Birch, DG., et al. Impact of early dietary intake and blood lipid composition of long-chain polyunsaturated fatty acids on later visual development. J. Pediatr. Gastroenterol Nutr. 2000;31:540-553.
- 8) Joshi, H., Kaur, N., Jyotibala, C. Evaluation of nootropic effect of argyrea speciosa in mice. J Health Sci. 2007;53:382-388.
- 9) Hamazaki, T., Sawazaki, S., Itomura, M., et al. The effect of docosahexaenoic acid on aggression in young adults. J Clin Invest 1996;97:1129-1134.
- 10) Hashimoto, M., Tanabe Y., Fujii, Y., et al. Mechanism of improvement of spatial cognition with dietary docosahexaenoic acid. Folia pharmacologica japonica 2002; 120:54-56.
- 11) Suzuki H., Lipid (oil). Suzuki H., Wada T., Miura R., Eds. Suisansyokuhineiyougaku, Tokyo, gihodoshuppan 2004;118-187.
- 12) Onuki K., Shiba S., Shimada T., Noguchi T. Effect of Pufferfish liver on the ability of mice in learning and memorizing. 東京医療保健大学紀要 2012;6:1-6.
- 13) 厚生労働省監修. 食品衛生検査指針・理化学編. 東京, 日本食品衛生協会, 2005;661-666.
- 14) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 G purified diets for laboratory rodents, Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. 1993;1939-1951.
- 15) 大貫和恵. 無毒養殖トラフグ肝臓の食用化と食品としての機能性に関する研究. 博士論文, 長崎大学大学院 2010;82.
- 16) Suzuki H., Wada S. Comparison of Docosahexaenoic Acid with Eicosapentaenoic Acid on the Lowering Effect of Endogenous Plasma Cholesterol in Adult Mice. Fisheries Science 1995;61:525-526.
- 17) Suzuki H., Hayakawa S., Tamura S. et al. Effect of Age on the Modification of Rat Plasma Lipids by Fish and Soybean Oil Diets. Biochimica et Biophysica Acta 1985;836:390-393.
- 18) 餅 康樹, 角田伸代, 柴 祥子他. 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. 日本栄養・食糧学会誌 2010;2:69-77.

Abstract : This study aims at elucidation of effective role on the decrease of the lipid and total cholesterol(TC) contents in the serum by a dose of non-toxic pufferfish liver with a lot of functional DHA and IPA by feeding test using a mouse.

The lipid and its TC contents in the serum of the blood of the mouse fed on the liver of pufferfish were determined and the liver was stained with Sudan Ⅲ and its profile was followed by observation under a microscope.

The pufferfish liver feeding group indicated a lower value of the serum TC(<0.05) than that of no pufferfish liver feeding group(control group). The pufferfish liver was shown to play the role of functionality to reduce cholesterol in the serum. In the stained tissue of the liver, the lipid of the control group showed remarkable positivity to diffuse but that of the pufferfish liver feeding group the deposition of a loose granular lipid droplet and weaker stained than the former.

This result also shows functionality of the pufferfish liver feeding group.