

# エイコサペンタエン酸 (EPA) およびその自動酸化分解物が *E. coli* の発育に及ぼす影響について

佐二木順子, 高橋 勝弘

## Effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and its Autoxidation Products on the Growth of *Escherichia coli*

Junko SAJIKI and Katsuhiko TAKAHASHI

### Summary

In this study, the influence of eicosapentaenoic acid (EPA) with purity of 91.9% and its autoxidized product (EPA-Ox) with POV3807 prepared by shaking EPA at 37°C for 1 week on the growth of *Escherichia coli* (*E. coli*) was investigated. EPA with a final concentration of  $2.5 \times 10^{-3}$  mM suppressed the growth of *E. coli*, but EPA-Ox did not have inhibitory effect at the same concentration as EPA. EPA-Ox was separated into Fr. 1 (oxidized product) and Fr. 2 (non-oxidized EPA). Fr. 2 had stronger inhibitory effect on the growth of *E. coli* than Fr. 1. The inhibitory effect of Fr. 2 was similar to authentic EPA. Addition of  $\alpha$ -tocopherol inhibits EPA oxidation and finally inhibitory effect of EPA on the growth of *E. coli* did not change.

From the results, it seemed clear that EPA by itself had an inhibitory effect on the growth of *E. coli*.

### はじめに

マウスの致死作用を指標にした現行の下痢性貝毒試験法では、本来、下痢毒物質としてスクリーニングの対象にされているオカダ酸 (OA) やその関連物質のみでなく二枚貝に多く含まれている高級不飽和脂肪酸 (PUFA) もポジティブな結果を示すことが明らかである<sup>1)</sup>。

著者らはPUFAのなかでも魚介類に多く含まれるエイコサペンタエン酸 (EPA) を用い下痢原性を調べた結果、腸管に高濃度のEPAが存在すると下痢を引き起こすが、経口による下痢原性はOAに比べ低いことが明らかであった<sup>2)</sup>。この結果からPUFAとOAの下痢原性の判定は別個になされる必要があると考えられた。

これまでPUFAおよびその酸化物の簡便かつ迅速なバイオアッセイ法として著者らはPUFAのもつヘモグロビン酸化能を指標にした測定法について報告した<sup>3)</sup>。

今回はより精度の高いバイオアッセイ法を開発する目的で、EPAとその自動酸化分解物の *Escherichia coli* (*E. coli*) に及ぼす影響を調べたところ、EPAのほう

がその自動酸化分解物より強い発育阻止作用をもつことが認められたので報告する。

### 実験材料

EPAはすでに報告した<sup>4)</sup> EPAメチルエステルを加水分解し、抗酸化剤として0.2%の $\alpha$ -トコフェロールを添加したものをを用いた。なお、EPAに含まれているEPA以外の不飽和脂肪酸の確認に用いた標準物質は、Sigma社のstearidonic acid (C<sub>18:4</sub>, SDA), arachidonic acid (C<sub>20:4</sub>, AA), docosahexaenoic acid (C<sub>22:6</sub>, DHA) であった。

DL- $\alpha$ -トコフェロールは和光純薬KKのものを用いた。

*E. coli* はNIH J株を使用した。

### 実験方法

#### 1) EPAの自動酸化

1gのEPAを三角フラスコに薄く広げ、37°Cで1週間振とうすることにより自動酸化を行った<sup>5)</sup>。自動酸化後のEPA酸化度 (POV) の確認はヨード滴定法によっ

た。自動酸化終了後、4 ml のメタノールに溶解させたものを試験原液 (EPA-Ox) とし、そのうち 2 ml は薄層クロマト (TLC) 分析に供した。なお、未処理 EPA も EPA-Ox と同濃度になるようメタノールに溶解させたものを試験原液 (EPA) とした。

### 2) TLC による分画

自動酸化終了後の EPA-Ox 0.5 g をあらかじめ 150 °C、2 時間加熱処理した TLC プレート (Silica gel, 0.5mm, Merck) に塗布し、石油エーテル・ジエチルエーテル・酢酸 (74 : 15 : 1) で展開した。ヨウ素により EPA ならびにその酸化物を確認した後、同時に展開した別のプレートの各分画 (Fig. 1 に示した Fr. 1 ならびに 2) のゲルをかき取り、メタノール 50 ml で 2 回抽出した。N<sub>2</sub> ガス下でメタノールをしばした抽出残さを、2 ml のメタノールに溶解し試験原液 (Fr. 1, Fr. 2) とした。TLC プレートからの抽出操作による回収率 (%) は HPLC にて測定した EPA-Ox の未酸化 EPA ピーク面積 (S) に対する EPA-Ox を TLC にて分画抽出した未酸化 EPA の HPLC ピーク面積 (Sf) 比、(Sf)/(S) × 100 により求めた。

### 3) HPLC 分析

すでに報告した方法<sup>9)</sup>により HPLC 分析を行った。それぞれの試験原液をメタノールで 500 倍に希釈し、その 20 μl を HPLC に注入した。HPLC は Shimadzu LC-6 A, 検出器は Shimadzu SPD-6 A, 記録計は Shimadzu C-R 6 A (島津製作所) を用いた。分析条件はカラム : ODS (4.6mm i.d. × 250mm), 移動相 : アセトニトリル・メタノール・水・リン酸 (53 : 20 : 17 : 0.1), 流速 : 1.2 ml/min, 測定波長 : 195nm, 230nm であった。

EPA ならびに EPA-Ox の HPLC によるピーク面積から、未酸化 EPA の量を概算した。

### 4) *E. coli* 生存率に対する影響

*E. coli* (NIHJ 株) を普通ブイオン (日水製薬 KK) にて 37 °C、20 時間前培養した。メタノール濃度 20%, サンプル濃度 0.09 ~ 0.14 mM になるよう PBS (-) にて調整した上記サンプル 1 ml と菌液 1 ml とを混合したものを原液とした。原液調整後直ちに 0.2 ml を 5 ml の普通ブイオンに添加し (サンプル終濃度  $1.25 \sim 2.7 \times 10^{-3}$ , メタノール終濃度 0.77%), 37 °C で培養した。培養後各時間における菌の生育数を Shimadzu Spectronic 21 (660 nm) にて測定した。

## 結果

### 1) EPA の自動酸化による性状の変化

EPA を 37 °C、1 週間インキュベートすることにより自動酸化させた場合、EPA 酸化物 (EPA-Ox) の酸化度 (POV) は 3807 mequiv/Kg であった。一方、EPA の POV は 0 であった。EPA-Ox を TLC にて分画すると未酸化 EPA (Rf = 0.2) 以外の大半が原点にとどまり両者の中間 (Rf = 0.15) に検出される物質はごくわずかであった (Fig. 1)。なお、DL-α-トコフェロールの Rf 値は 0.47 であった。

EPA, EPA-Ox ならびに TLC による Fr. 1, Fr. 2 の HPLC によるスペクトルは Fig. 2 のとおりであった。EPA を 195 nm でモニターした結果、91.9% の EPA 以外の主な不飽和脂肪酸としてステアリン酸 (SDA) が 2.0%, アラキドン酸 (AA) が 4.3% 含まれていることが確認された。HPLC による EPA ならびに EPA-Ox の未酸化 EPA のピーク面積から換算すると EPA の自動酸化による分解率は 46% であった。SDA および AA もそれぞれ 39%, 38% 酸化分解された。なお TLC プレートからの抽出操作による回収率は 78% であった。195 nm でモニターした場合、EPA には SDA より短いリテンションタイムをもつ物質は検出されなかったが、EPA-Ox では多くの物質が検出され、自動酸化により極性の高い物質が生成されていることが明らかであった (Fig. 2)。不飽和脂肪酸の自動酸化生成物のうち共役ジエンを有するものは 230 nm 付近に最

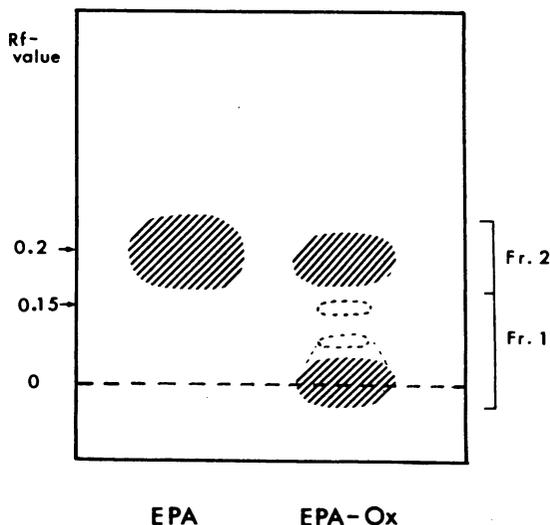


Fig. 1 Thin Layer Chromatograms of EPA and EPA-Ox Prepared with Shaking at 37 °C for 1 Weeks

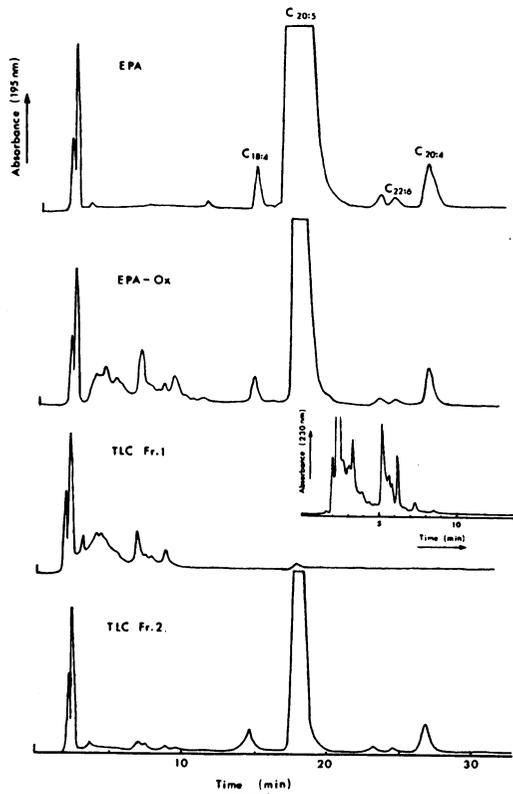


Fig.2 HPLC Chromatograms of EPA, EPA-Ox and Each Fraction Separated from TLC

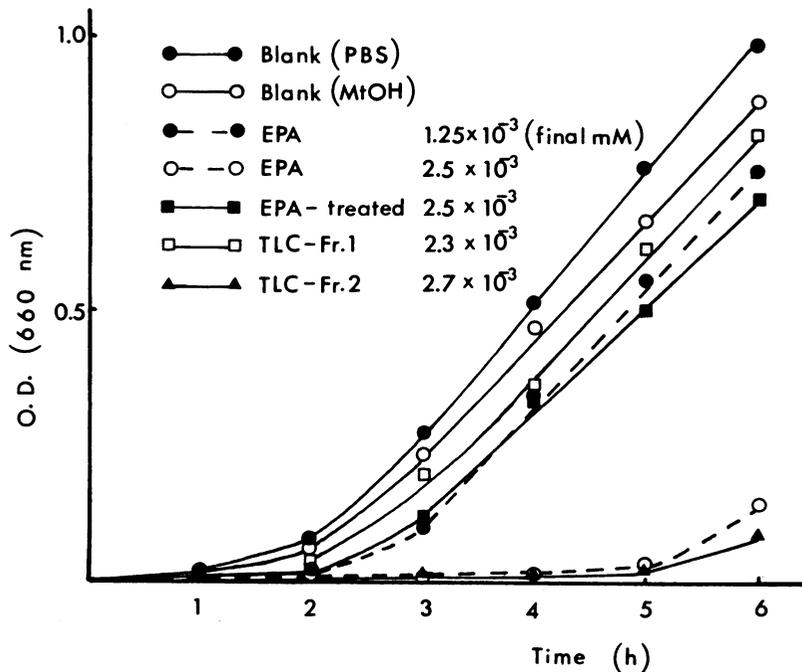


Fig.3 Effects of EPA, EPA-Ox and Each Fraction Separated from TLC on the Growth of *E.Coli*

大吸収をもつことが知られているので195nmでモニターしたものと同一濃度のFr. 1を230nmでモニターすると、2～3分、5～6分付近に多くの物質が確認された (Fig. 2)。

## 2) *E. coli* 発育阻止作用

各サンプルの *E. coli* に及ぼす影響について調べた結果、EPA (最終濃度  $2.5 \times 10^{-3}$  mM) ならびに T L C により分画された Fr. 2 (最終濃度  $2.7 \times 10^{-3}$  mM) は EPA-Ox, Fr. 1 (最終濃度  $2.5 \times 10^{-3}$  mM,  $2.3 \times 10^{-3}$  mM) に比べ強い発育阻止を認めた (Fig. 3)。EPA の  $2.5 \times 10^{-3}$  mM および  $1.67 \times 10^{-3}$  mM にサンプル濃度の5～40%の  $\alpha$ -トコフェロールを添加しても *E. coli* の発育は何ら改善されなかった。なお、本実験に用いたメタノールの *E. coli* 発育抑制は P B S (-) を対照とした場合の5%以内であった。

## 考察

P U F A の毒性についての研究はリノール酸 (L A) に関するもの<sup>7,8)</sup>が多いが、毒性は極性の高いL A 酸化物で強く発揮されることが明らかである。

著者らはこれまで P U F A がオキシヘモグロビンをメトヘモグロビンに変換させ<sup>1)</sup>、その強さはエン数に依存すること、 $\alpha$ -トコフェロールにより抑制されること<sup>9)</sup>を報告してきた。また、この作用はEPAの場合、自動酸化分解により生じたより極性の高い分解物でより強いことが明かであった<sup>9)</sup>。

今回、*E. coli* の発育試験においてEPA酸化物 (EPA-Ox) (Fr. 1) よりむしろEPA、未酸化EPA (Fr. 2) のほうが強い発育阻止を示し、この作用は $\alpha$ -トコフェロールの濃度を著しく高めても改善されなかった事実を考え合わせると、P U F A の *E. coli* に対する発育阻害は上記のヘモグロビン酸化作用とは異なるメカニズムによるものと考えられた。

*E. coli* に対するEPAの発育阻止濃度はすでに報告されている<sup>10)</sup>L A の約1/400以下であったが、このP U F A の種類による差がP U F A のエン数の違いによるものか用いた *E. coli* の感受性の差に基づくものかは不明である。リノール酸 (L A) については、二次産物がL A やそのヒドロペルオキシドにくらべ強く *E. coli* の発育を阻害することが報告されており<sup>10)</sup>今回のEPAの結果はL A の結果と矛盾するものであった。自動酸化によりどのようなEPA酸化分解物が生成されているか不明であるが、n-3脂肪酸であるEPAの生体内酸化物の生理活性作用はn-6脂肪酸であるAAの酸化物に比べ極め

て弱いことが報告されている<sup>11)</sup>。L A はn-6脂肪酸であり *E. coli* へのP U F A 酸化物の脂肪酸の化学構造上の違いがこのような差をもたらしたのかもしれない。

最近、AAやEPAは自動酸化でプロスタグランジン様の物質をも生ずることが明らかになっており<sup>12)</sup> *E. coli* に対する毒性の強さが酸化により生じる生成物の種類により異なる可能性も考えられ、さらに詳細な検討を要するものと考えられた。

## 謝辞

本実験を遂行するにあたり便宜をはかっていただいた当研究所細菌研究室内村真佐子主任研究員に謝意を表します。

## 参考文献

- 1) J.Sajiki and K.Takahashi (1989): The spectrum change of oxyhemoglobin caused by ether extract of bivalves (*Mytilus edulis*), Eisei Kagaku, 35: 414-419.
- 2) J.Sajiki, T.Yamanaka, H.Takahashi, Y.Tsuruoka, K.Mori, K.Takahashi and A.Hayashi, (1993) Jpn.J.Toxicol. Environ.Health, 39: 100-105.
- 3) J.Sajiki and K.Takahashi (1989): A simple method for determination of the unsaturated fatty acids concentration in the fish and shellfish by hemoglobin denaturation, Bull. Publ. Health Lab. Chiba Pref. 13: 9-15.
- 4) T.Hamazaki, M.Urakaze, M.Makuta, A.Ozawa, Y.Soda, H.Tatsumi, S.Yano and A.Kumagai (1987): Intake of different eicosapentaenoic acid-containing lipids and fatty acid pattern of plasma lipids in the rats, Lipids, 22: 994-998.
- 5) 金田尚志, 植田伸夫: 過酸化脂質実験法, 36-37, 医歯薬出版, 東京, 1983.
- 6) 佐二木順子, 高橋勝弘, 浜崎智仁 (1992): エイコサペンタエン酸 (EPA) ならびにその自動酸化生成物のマウス致死ならびにヘモグロビン酸化作用について, 衛生化学, 38: 57-62.
- 7) 金田尚志 (1977): 脂質の食品化学的研究, 栄養と食糧, 30: 71-78.
- 8) 金沢和樹 (1990): リノール酸自動酸化産物の肝毒性の解明, 日本栄養食糧学会誌, 43: 1-15.

- 9) 佐二木順子, 高橋勝弘 (1990) : 不飽和脂肪酸によるメトヘモグロビン生成について, 衛生化学, 36 : 51-55.
- 10) P. T. Gamage, T.Mori and S.Matsushita (1971) : Effects of linoleic acid hydroperoxides and their secondary products on the growth of *Escherichia coli*, Agr. Biol. Chem., 35 : 33-39.
- 11) 鹿取 信, 山本尚三, 佐藤和雄, 阿部圭志, プロスタグランジン最近の研究の進歩, 421, 講談社サイエンティフィック, 東京, 1987.
- 12) T.Nakamura and Y.Hama (1988) : Conjugated carbonyls with a prostaglandin-like structure formed by autoxidation of eicosapentaenoate. Nippon Suisan Gakkaishi 54, 271-275.