

ラット副腎および血清コレステロールエステルの 脂肪酸構成におよぼす温連浴の影響

妹尾敏伸・原田英雄

岡山大学温泉研究所温泉内科学部門

御船政明・森永寛

岡山大学医学部附属病院三朝分院内科

(1984年1月9日受付)

緒言

温泉水浴は副腎機能にも影響を及ぼし、生体反応の面で重要な役割を演じているが、これは温泉水浴のストレスラーとしての作用だけでなく、温泉成分などの総合作用の結果であると考えられている(八田 1966)。

ところでヒト、ラット、モルモット、ウサギなどの副腎は、ウシ、ヒツジと異なり副腎重量の2—6%もの高濃度のコレステロールを含有するが、総コレステロールの80—90%はコレステロールエステルとして存在し、構成脂肪酸としては高級不飽和脂肪酸を多く含む(GOODMAN 1965)。そしてこの構成脂肪酸はある種のホルモン(GRANT 1962; 宮地 1976)、薬物(宮地 1976)、食餌(OSTWALD et al, 1964)などによりそれぞれ特有な変動パターンを示す。

温泉水浴により副腎コレステロールエステルの脂肪酸構成がどのような変動を示すかは、温泉水浴の副腎への影響を検討する上で興味ある問題であるが、これまでに検討された報告はみあたらない。本研究では温泉水、水道水連浴により副腎に特有な高級不飽和脂肪酸のコレステロールエステルがどのような変動を示すかを、正常ラットおよび実験的に作製した高コレステロール血症ラットを用いて検討し、併せて血清コレステロールエステルについても検討した。

対象および方法

1. 実験動物

5週齢のWistar系雄ラットを用い、室温約22°Cの飼育室で飼料(日本クレア, CA-1)と水道水とを自由に与え10日間飼育後実験を開始した。温泉水連浴1週間群および4週間群、水道水連浴1週間群および4週間群、非入浴1週間群および4週間群の計6群についてそれぞれ5匹を用意した。なお、高コレステロール血症ラ

ットは4週齢のWistar系雄ラットを、固型飼料にコレステロール1.0%とコール酸0.3%とを添加して2ヶ月間飼育して作製し実験に供した。この場合は、温泉水連浴群、水道水連浴群、非入浴群それぞれにつき5匹を用意した。

2. 動物の処置法

入浴は既報通り(妹尾 1981)、三朝温泉水(含食塩、重曹、放射能泉)または水道水を用いて、1日1回、40°Cで10分間、正常ラットに対しては1週間と4週間、高コレステロール血症ラットに対しては3週間の温連浴を行なった。最後の入浴の翌日、9:00—11:00の間に速やかに断頭して血液を採取した後、直ちに開腹して両側副腎を摘出、周囲の脂肪および結合組織を除去し分析に供した。

3. 脂質の測定

a) 抽出: FOLCH et al., (1956)の方法に準じてクロロホルム:メタノール(2:1)を用いて、副腎と血清より脂質を抽出した。

b) コレステロール量の測定: ZAK et al., (1954)の方法により総コレステロール量と遊離コレステロール量を測定し、その差でコレステロールエステル(以下CEと略)量を求めた。

4. 構成脂肪酸

Kieselgel 60 PF₂₅₄ (Merck)の薄層プレートを用いて石油エーテル:エーテル:酢酸(80:20:1)で展開した後、CEを分取し、Morrison et al (1964)の方法によりメチル化後、Advance DS 5%のカラムを使用してガスクロマトグラフィーにより分析した。各脂肪酸ピーク面積をプランメーターにより算出し、クロマトグラム上の総脂肪酸に対する百分率で示した。

Table 1 The changes in adrenal gland weight (mg)

	Normal rats		Hyper-cholesteremic rats
	1-week	4-weeks	3-weeks
Non-treated controls	33.3±3.3	42.9±3.3	48.6±2.6
City water bathing group	33.6±2.7	46.6±10.1	51.6±4.5
Hot spring bathing group	33.4±2.0	43.7±3.1	51.5±5.6

Values are means±SD

Table 2 Effects of serial bathing on the cholesterol ester levels of the rat adrenal glands

	Normal rats		Hyper-cholesteremic rats
	1-week	4-weeks	3-weeks
Non-treated controls	2.25±0.14	1.90±0.55	3.49±0.54
City water bathing group	2.62±0.58	1.83±0.31	4.30±0.92
Hot spring bathing group	2.04±0.36	1.79±0.30	3.90±0.99

Mean values expressed in mg/100mg wet tissue ±SD

Table 3 Effects of four weeks serial bathing on fatty acid composition of adrenal cholesterol ester of rats^a

Fatty acid	16:0 ^b	16:1	18:0	18:1	18:2	20:4	22:4
Non-treated controls	7.7 ±0.3	1.6 ±0.3	2.0 ±0.3	11.2 ±0.9	4.9 ±0.4	14.0 ±1.6	10.1 ±1.4
City water bathing group	7.6 ±0.5	1.5 ±0.2	2.3 ±0.3	11.0 ±0.4	5.5 ±0.4	15.6 ±0.8	10.8 ±0.5
Hot spring bathing group	7.9 ±0.4	1.6 ±0.2	2.3 ±0.1	12.3 ±1.2	6.2 ±0.4	14.4 ±0.9	8.6 ±1.0

^aValues are percentages of total fatty acids measured. They represent means±SD.

^bThe first figure represents the number of carbon atoms and the second figure the number of double bond.

*: $p < 0.02$, **: $p < 0.001$

推計的処理には student t 検定を用い、5%以下を有意水準とした。

結 果

1. 副腎重量に及ぼす温連浴の影響

Table 1 に示す如く正常ラット、高コレステロール血症ラット共に連浴群は対照非入浴群に比較して増加する傾向にあったが、推計学的に有意差は認めなかった ($p > 0.1$)。

2. 副腎 CE 量に及ぼす温連浴の影響

Table 2 に示す如く正常ラット温泉水連浴群では水道水連浴群および対照非入浴群に比較して減少する傾向にあり、また高コレステロール血症ラット温泉水連浴群、水道水連浴群では非入浴群に比し、逆に増加する傾

向にあったがいずれも有意差は認めなかった ($p > 0.1$)。

3. 副腎 CE の脂肪酸構成に及ぼす温連浴の影響

ラット副腎 CE の主な構成脂肪酸は既に明らかのように、パルミチン酸 (16:0)、オレイン酸 (18:1)、アラキドン酸 (20:4)、ドコサテトラエン酸 (22:4) などであった。

正常ラットの温泉水、水道水連浴 1 週間群では対照非入浴群に比較してほとんど変化は認められなかったが、表 3 に示す如く温泉水連浴 4 週間群でリノール酸 (18:2) の比率が対照非入浴群に比較して有意に増加した ($p < 0.001$)。一方、水道水連浴 4 週間群においては有意差は認めなかった ($0.05 < p < 0.06$)。温泉水連浴 4 週間群と水道水連浴 4 週間群との間には有意差 ($p < 0.02$) を認めた。高コレステロール血症ラットの副腎

CE の脂肪酸構成は正常ラットのそれに比較してパルミトレン酸 (16:1), オレイン酸 (18:1) の比率の有意な増加 ($p < 0.01$) とアラキドン酸 (20:4) の有意な減少 ($p < 0.01$) とが認められた (Table 4). このようなラットを用いて3週間の温連浴を行なうと, Table 5 に示す如く正常ラットの場合と同様に18:2の比率が対照非入浴群に比較して, 温泉水連浴群で有意に増加した ($p < 0.01$). 一方水道水連浴群では有意差は認められなかった ($0.06 < p < 0.07$).

4. 血清 CE 量に及ぼす温連浴の影響

Table 6 に示す如く正常ラットでは対照非入浴に比較して, 1週間の温泉水連浴群で有意に増加し ($p < 0.03$), 4週間では有意に減少した ($p < 0.03$). 一方, 1, 4週間の水道水連浴群では著明な変化は認められなかった ($p > 0.1$). また1週間の温泉水連浴群で, 水道水連浴群に比較して有意の増加 ($p < 0.03$) を示したが4週間では有意差は認められなかった ($0.08 < p < 0.09$).

高コレステロール血症ラットでは対照非入浴群に比較して, 温連浴により減少する傾向にあったが, 温泉水連浴群, 水道水連浴群ともに有意差は示さなかった ($p > 0.1$).

5. 血清 CE の脂肪酸構成に及ぼす温連浴の影響

正常ラットでは温連浴による脂肪酸構成の変動はほとんど認められなかった.

高コレステロール血症ラットの脂肪酸構成は, 正常ラットのそれに比較して16:0, 16:1, 18:1の比率の増加 (それぞれ $0.02 < p < 0.03$, $p < 0.01$, $p < 0.01$) と18:2, 20:4の比率の減少 (それぞれ $0.02 < p < 0.03$, $p < 0.001$) とが認められた (Table 7). このようなラ

ットを用いて3週間の温連浴を行なうと, Table 8 に示す如く対照非入浴群に比較して, 16:0, 18:0の飽和脂肪酸の比率はほとんど変化は認められなかったが, 16:1, 18:2, 20:4のモノ不飽和脂肪酸及びリノール酸系脂肪酸において, コレステロール飼養により比率の増加したものは減少し, 逆に減少したものは増加する傾向にあり, 特に温泉水連浴群でそのような傾向が認められた (それぞれ $p < 0.02$, $p < 0.06$, $p > 0.1$).

Table 4 Fatty acid composition of cholesterol ester of adrenal glands of rats fed on cholesterol diet for two months^a

Fatty acid	Control	Experiment
16:0 ^b	7.4±0.3	7.7±0.6
16:1	1.6±0.1	3.1±0.5**
18:0	2.0±0.1	1.7±0.4
18:1	10.7±0.7	14.3±1.9*
18:2	5.2±0.5	5.9±1.2
20:4	14.8±1.3	11.5±1.5*
22:4	11.1±1.3	10.1±1.0

^aValues are percentages of total fatty acids measured. They represent means±SD.

^bThe first figure represents the number of carbon atoms and the second figure the number of double bond.

*: $p < 0.01$ **: $p < 0.001$, respectively vs control.

Table 5 Effects of three weeks serial bathing on fatty acid composition of adrenal cholesterol ester of hypercholesteremic rats^a

Fatty acid	16:0 ^b	16:1	18:0	18:1	18:2	20:4	22:4
Non-treated controls	7.5 ±0.4	3.3 ±0.4	1.4 ±0.3	14.2 ±0.5	5.3 ±0.3	10.8 ±0.8	11.0 ±1.6
City water bathing group	8.8 ±1.2	3.2 ±0.6	1.4 ±0.2	15.5 ±1.4	6.1 ±0.7	9.5 ±1.3	9.9 ±2.0
Hot spring bathing group	8.2 ±1.4	3.2 ±0.8	1.3 ±0.2	14.8 ±0.9	6.0 ±0.3	10.4 ±0.8	11.3 ±1.2

^aValues are percentages of total fatty acids measured. They represent means±SD.

^bThe first figure represents the number of carbon atoms and the second figure the number of double bond.

*: $p < 0.01$,

Table 6 Effects of serial bathing on the serum cholesterol ester levels in rats

	Normal rats		Hypercholesteremic rats
	1-week	4-weeks	3-weeks
Non-treated controls	77.0±3.5	91.8±14.3	172.5±20.5
City water bathing group	74.2±10.6	83.2±8.9	154.6±12.9
Hot spring bathing group	88.0±5.5	74.8±5.8	154.0±15.2

Values are means±SD. (mg/dl) *: p<0.03

Table 7 Fatty acid composition of cholesterol ester of serum of rats fed on cholesterol diet for two months^a

Fatty acid	Control	Experiment
16:0 ^b	10.5±1.0	13.4±1.6*
16:1	3.3±0.4	13.8±3.0**
18:0	0.7±0.1	0.7±0.1
18:1	13.0±0.6	33.0±1.1**
18:2	31.2±2.2	24.8±1.2*
20:4	33.2±1.4	5.7±1.3**

^aValues are percentages of total fatty acids measured. They represent means±SD.

^bThe first figure represents the number of carbon atoms and the second figure the number of double bond.

*, **: p<0.03, p<0.01, respectively vs control.

Table 8 Effects of three weeks serial bathing on fatty acid composition of serum cholesterol ester of hypercholesteremic rats^a

Fatty acid	16:0 ^b	16:1	18:0	18:1	18:2	20:4
Non-treated controls	12.0 ±1.4	16.8 ±2.1	0.5 ±0.1	35.2 ±1.3	22.8 ±1.4	4.9 ±0.9
City water bathing group	12.4 ±0.3	11.8 ±2.0	0.7 ±0.1	38.0 ±1.0	26.9 ±1.5	4.8 ±0.8
Hot spring bathing group	12.2 ±1.1	12.8 ±0.8	0.6 ±0.1	35.4 ±1.8	25.5 ±1.5	6.0 ±0.6

^aValues are percentages of total fatty acids measured. They represent means±SD.

^bThe first figure represents the number of carbon atoms and the second figure the number of double bond.

*, **: p<0.05, **: P<0.01

考 察

副腎 CE の脂肪酸構成はある種のホルモン、薬物、食餌などによって変動するが、変動パターンはそれぞれ異なっている。GRANT (1962) によれば ACTH 投与により副腎の脂肪酸構成の変動は顕著ではないが、18:2 が減少し、20:4 は増加するという。しかし宮地 (1976) はラットに ACTH を投与したさいに 20:4 の比率が特異的に減少したことを報告している。また、ラットの下垂体摘出やステロイドの合成を阻害する aminoglutethimide 投与では飽和およびモノ不飽和脂肪酸が増加し、さらに前者では 20:4 の減少、後者では 22:4 の減少がおこることを認めている。コレステロール投与でも特にモノ不飽和脂肪酸の比率の増加と 20:4 の比率の減少が認められた (Table 4)。

ラットでの温連浴の影響は正常ラットの場合、4 週間の温泉水連浴群で水道水連浴群、対照非入浴群に比較して 18:2 の比率が有意に増加した。また高コレステロール血症ラットでも温泉水連浴群の 18:2 の比率が対照非入浴群に比較して有意に増加したが、水道水連浴群については対照非入浴群との間に有意差を認めなかった。この場合、18:2 の比率は温泉水連浴群、水道水連浴群ともにほとんど同じであったが、前者の測定値の分散が小さいために対照非入浴群との間に有意差が認められた。測定値の分散が小さくなる現象は温泉水浴、冷浴、運動トレーニングなどでしばしば認められる (辻 1981)。このような温泉水連浴群と水道水連浴群、対照非入浴群との差異は温泉の固有成分による可能性を示唆する。その機序は明らかでないが、リノール酸系脂肪酸の代謝の抑制などが考えられる。

血清 CE の脂肪酸構成への温連浴の影響は正常ラットでは、血清 CE 値が温泉水連浴により有意に変動するときも脂肪酸構成への影響はほとんど認められなかった。これは血清コレステロール量と血清脂質の脂肪酸構成との関連を検討した SWELL et al (1962) の実験結果からも推測されるように血清 CE の脂肪酸構成の恒常性の強さによると思われる。しかしながら高コレステロール血症という病的な状態では、温連浴により一部の脂肪酸において著明な変化が認められ、増加していた 16:1 の比率は減少し、減少していた 18:2、20:4 の比率は増加するという正常化傾向が、特に温泉水連浴群で認められた。また血清コレステロール値は森永ら (1956)、松本 (1958) の報告と同様に減少する傾向を示した。ところで動脈硬化の内、特に粥状硬化の発生と高コレステロール血症との関連が古くから指摘されている。一方動脈硬化に対して 18:2 は予防効果があるとされており、例

えば高コレステロール血症や動脈硬化の患者では血漿の 18:2 と 20:4 の比率が低下しているが、そのさいに 18:2 を投与すると 18:2 の低下が是正されるだけでなく、その他の脂肪酸の異状、たとえば増加していた 16:0、16:1、18:1 の比率も低下して正常になり、さらにコレステロール値も低下してくることが認められている (高橋 1967)。このようなことから温泉水連浴は動脈硬化の予防、治療効果を有することが示唆される。

以上のごとく副腎と血清 CE の脂肪酸構成は、温連浴に対してそれぞれ異なった反応性を示すことが判明した。温泉水連浴による副腎 CE の 18:2 の変動は、入浴というストレスに対する非特異的の反応として、下垂体-副腎系が刺激されたことも大きな要因であると考えられるが、温泉水連浴と水道水連浴とで若干の差異を生じたことから、さらに温泉固有の生体作用による可能性が示唆される。

血清 CE の脂肪酸構成は、温連浴に対して正常と高コレステロール血症という病的状態とではその反応性が異なり、さらに特に温泉水連浴により高コレステロール血症ラットの脂肪酸構成が、正常ラットのそれに近づく傾向が示されたことは温泉水連浴の正常化作用として認識される。

結 語

正常ラットと実験的に作製した高コレステロール血症ラットを用いて副腎および血清コレステロールエステル (CE) の脂肪酸構成に及ぼす温連浴の影響を検討した。入浴は三朝温泉水または水道水を用いて、1 日 1 回、40°C、10 分間、正常ラットについては 1 週間と 4 週間、高コレステロール血症ラットについては 3 週間の連浴を行なった。

副腎 CE 量は正常ラット、高コレステロール血症ラット共に温泉水、水道水連浴により著明な変化は認められなかったが、CE の脂肪酸構成では正常ラットの 4 週間の温泉水連浴群で対照非入浴群に比較して 18:2 の比率が有意に増加した。一方水道水浴群では対照非入浴群に比較して有意差は認められなかった。温泉水浴群と水道水浴群との間に有意差が認められた。高コレステロール血症ラットでも 3 週間の温泉水連浴群で 18:2 の比率が対照非入浴群に比較して有意に増加した。一方水道水浴群では対照非入浴群に比較して有意差は認められず、また温泉水連浴群と水道水連浴群との間にも有意差は認められなかった。

血清 CE 量は正常ラット、高コレステロール血症ラット共に、3~4 週間の温泉水、水道水連浴により減少傾向を示した。血清 CE の脂肪酸構成は、正常ラットでは

温泉水、水道水連浴による影響はほとんど認められなかった。高コレステロール血症ラットの脂肪酸構成は正常ラットに比較して16:1と18:1の比率が増加しており、また18:2と20:4の比率が低下していた。このような高コレステロール血症ラットに、3週間の温泉水、水道水連浴を行なうと、特に温泉水連浴群で16:1, 18:2, 20:4の比率が正常ラットに近づく傾向が示された。

文 献

- DAILEY, R.E., SWELL, L., FIELD, H., Jr., and TREADWELL, C.R. (1960) Adrenal cholesterol ester fatty acid composition of different species, *Proc. Soc. Exp. Biol and Med.*, **105**, 4-6.
- FOLCH, J., LEES, M., and STANLEY, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- GOODMAN, D.S. (1965) Cholesterol ester metabolism, *Physiol. Rev.*, **45**, 747-839.
- GRANT, J.K. (1962) Studies on the biogenesis of the adrenal steroids, *Brit. med. Bull.*, **18**, 99-105.
- 松本欣之 (1958) 三朝温泉入浴の高コレステロール血症及び動脈硬化症に及ぼす影響. 岡大温研報, **23**, 23-37.
- 宮地幸隆 (1976) ラット副腎脂質に関する研究, 日内分泌会誌, **52**, 973-982.
- 森永 寛 (1956) 31年度文部省総合研究報告集録 (医学及び薬学編)
- MORRISON, W. R. and SMITH, L. M. (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol, *J. Lipid Res.*, **5**, 600-608.
- OSTWALD, R., SHANNON, A., MILJANICH, P. and LYMAN, R. L. (1964) Adrenal lipids of cholesterol fed guinea pigs and rats, *J. Nutr.*, **82**, 443-451.
- 妹尾敏伸 (1981) 温泉連浴の生体に及ぼす影響 1, 血漿代謝物質の変動. 岡大温研報, **51**, 49-52.
- SWELL, L., SCHOOLS, P.E. Jr, and TREADWELL, C.R. (1962) Correlation of diet and serum lipid fatty acid composition, *Proc. Soc. Exp. Biol and Med.*, **109**, 682-685.
- 高橋善弥太 (1967) 必須脂肪酸の臨床. 最新医学, **22**, 1637-1649.
- 辻 秀男 (1981) 適応療法としての温泉療養の臨床医学的意義. **45**, 747-839.
- 八田 秋 (1966) 温泉はどうして効くか. 金原出版. 東京, 51-60.
- ZAK, B., DICKENMAN, R.C., WHITE, E.G., et al. (1954) Rapid estimation of free and total cholesterol, *Amer. J. Clin. Pathol.*, **24**, 1307-1315.

EFFECTS OF SERIAL BATHING ON FATTY ACID COMPOSITION OF ADRENAL AND SERUM CHOLESTEROL ESTER IN RATS

Toshinobu SENO, and Hideo HARADA

Institute for thermal Spring Research, Okayama University

Masaaki MIFUNE, and Hiroshi MORINAGA

Division of Medicine, Misasa Branch Hospital, Okayama University Medical School

Abstract The effects of serial bathing (10 minutes bathing in a city water or hot spring in Misasa, 40°C, once daily for 1-4 weeks) on fatty acid composition of cholesterol ester of the adrenal glands and serum was studied in both normal and hypercholesteremic rats.

Although the adrenal cholesterol ester levels were relatively unaffected in rats treated with serial bathing as well as non-treated rats, the proportion of 18:2 was increased in rats treated with hot spring bathing for 3-4 weeks.

The serum cholesterol ester levels in both normal and hypercholesteremic rats tended to decrease after serial bathing for 3-4 weeks compared with non-treated rats. The fatty acid composition of serum cholesterol ester in normal rats was unaffected. The composition in hypercholesteremic rats showed an increase in the proportion of 16:1 and 18:1 and a decrease of 18:2 and 20:4 compared with normal rats.

When those of hypercholesteremic rats were treated with serial bathing for 3 weeks, particularly with hot spring bathing, the proportion of 16:1, 18:2 and 20:4 showed a tendency to approach that in normal rats.

The findings indicate that serial hot spring bathing for 3-4 weeks, unlike city water bathing, exerts an influence on the fatty acid composition of cholesterol ester of the rat adrenal glands and it also improves the fatty acid composition of serum cholesterol ester of hypercholesteremic rats.