

泌乳牛におけるC14標識長鎖脂肪酸の代謝

誌名	栄養生理研究会報
ISSN	02864754
著者	渡辺, 泰邦
巻/号	18巻1号
掲載ページ	p. 47-63
発行年月	1974年

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



泌乳牛における C^{14} 標識長鎖脂肪酸の代謝

信州大学農学部 渡辺泰邦

動物体組織に主としてトリグリセリドとして存在する脂肪酸が、酸化利用を受けるために血中へ蛋白質と結合した遊離型脂肪酸 (NEFA) となって移動する。長鎖脂肪酸の体組織での利用の研究は、各組織特に肝、乳腺等を中心とした *in vitro* での代謝利用に関しては比較的報告が見られるが、*intact* の動物についての長鎖脂肪酸の代謝利用についての知見は限られている。

哺乳動物の血漿 NEFA の濃度は他の脂質分画と比較して低く、このことは血漿 NEFA はその *turn over rate* が速かであることがその一因であることを示している。¹⁾ このことはアルブミン結合させた C^{14} 標識脂肪酸、特にパルミチン酸の血中への注入によって、その *turn over rate* がイヌ^{2,3)}、ラット¹²⁾、またメンヨウにおいて検討され¹⁷⁾、いずれも約2分間程度であることが認められている。ウシについては Blackら⁸⁾ がトリチウム標識パルミチン酸の *turn over time* を検討した結果、1.9分であり、絶食によって2.9分に増加することを報告している。血漿 NEFA とその他の脂質分画との関連について、Westら¹⁷⁾ は C^{14} 標識パルミチン酸をメンヨウ血中へ連続注入して、血漿中の他の脂質分画へのとりこみについて報告している。また瀬戸、Blackら¹³⁾ は揮発性脂肪酸からの血漿各脂質分画への C^{14} のとりこみについて、絶食、グルコース負荷等の条件についても検討を加えている。

本研究は動物体の脂質を構成する脂肪酸のうち、約90%をしめる主要脂肪酸であるパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸およびリノール酸それぞれのウシでの代謝を、 C^{14} 標識脂肪酸を血中へ負荷することによって比較検討することを目的とした。この目的のために、泌乳牛に各 C^{14} 標識脂肪酸をそれぞれ血中へ単一注入して、これら脂肪酸の代謝を標識脂肪酸注入後、Respiratory Pattern Analyser によって呼吸への完全酸化による排出 $C^{14}O_2$ を定量分析して比較検討した。同時に注入 C^{14} の血漿脂質分画へのとりこみを注入後3時間経時的に追跡して、血漿 NEFA とその他の血漿脂質分画との相互関係を比較検討した。この方法によって動物体の脂質を構成する上記四種の脂肪酸のウシにおける代謝について知見について述べたい。先にヤギの脂肪酸の第一胃内代謝と、その吸収量について報告している (15, 16)

実験方法

泌乳牛8頭を使用し、いずれも C^{14} 標識脂肪酸注入の前日に頸静脈カニューレをとりつけた。実験前日夕方まで乾燥、濃厚飼料を給与し、翌朝8時より標識脂肪酸の注入を行なった。使用した標識脂肪酸はパルミチン酸 $1-C^{14}$ および $16-C^{14}$ 、ステアリン酸 $1-C^{14}$ 、オレイン酸 $1-C^{14}$ 、 $10-C^{14}$ およ

び $18-C^{14}$, リノール酸 $18-C^{14}$ である。各実験の標識脂肪酸の注入量および体重 $1Kg$ 当り注入量は第1表に示すようである。いずれもカニューレより約1分間に各約 $1mci$ の脂肪酸 Na 塩を 5% 牛血清アルブミン溶液 10 ないし $20ml$ に溶解し、頸静脈血中に注入した。標識脂肪酸注入直後より Respiratory Pattern Analyser (Carry 3803型) によって呼気中の O_2 , CO_2 およびその C^{14} を連続自動分析し、 C^{14} の呼気への排出を3時間おいて検出した。同時に頸静脈カニューレより経時的に3時間、 10 ないし 15 分間隔で採血した。その血漿総脂質を Folchらの方法によって抽出した。抽出総脂質をシリカゲル薄層クロマト法によって、リン脂質、コレステロール、NEFA、トリグリセリドおよびコレステロールエステルに分離し、薄層板上の各スポットをかきとり、それぞれ適当な溶媒に抽出してその一部を使用して比色定量し、一部はその C^{14} 活性を液体シンチレーションカウンター (Packard Tricarb) によって測定した。Respiratory Pattern Analyser およびシンチレーションカウンターのデーターはいずれも穿孔テープに自記記録し、コンピュータによりデーター処理を行なった。

第1表 C^{14} 標識脂肪酸の注入量および体重当り注入量

Label	Palmitate	Palmitate	Stearate	Oleate	Oleate	Oleate	Linolate
	$16-C^{14}$	$16-C^{14}$	$18-C^{14}$	$18-C^{14}$	$18-C^{14}$	$18-C^{14}$	$18-C^{14}$
Cow No.	452	2175	1490	1490	1490	1490	452
Body Wt. (Kg)	404	557	377	424	469	455	387
Inj. Dose (mci)	0.72	1.05	1.01	1.13	1.81	1.27	1.01
Dose ($\mu ci/Kg$)	1.78	1.89	2.68	2.67	2.79	2.79	2.61

C^{14} 標識脂肪酸注入後の呼気への $C^{14}O_2$ の排出型と排出量

C^{14} 標識脂肪酸注入後 3 時間内の呼気への $C^{14}O_2$ の排出量の変化は第 2 表, および注入 C^{14} 量に対する総排出 C^{14} の割合は第 3 表に示すようである。各注入脂肪酸の完全酸化による $C^{14}O_2$ の呼気への排出型を比較すると, パルミチン酸についてはカルボキシル標識の場合には, 30 分以内の C^{14} 排出がもっとも高く, 60 分以後は減少している。これに対してメチル標識の場合, 30 分以後 60 分までの平均排出量が最高である。60 分以後の C^{14} の排出はカルボキシル標識が急速に減少するのに対し, メチル標識ではその C^{14} 排出量はほぼ同一レベルを保持している。したがって注入 C^{14} 量に対する呼気への排出 C^{14} の割合は, 90 分まではカルボキシル標識がメチル標識より多いが, 90 分以後はメチル標識が多くなっている。ほとんど同様の結果が, オレイン酸のカルボキシルおよびメチル標識を比較した場合にもえられた。オレイン酸の分子中間の二重結合部位である C-10 標識の場合には, 注入後 30 分以内の C^{14} 排出量はメチル標識とほぼ同程度であり, その排出の型は比較的メチル標識に近く, その排出 C^{14} の割合はこの中間値を示しているようである。これらのことより β 酸化の機構から考えて, 血漿 NEFA は体組織にとりこまれてカルボキシル基はメチル基よりも比較的短時間内にアセチル CoA 系を経て完全酸化に至る割合の高いことがうかがわれる。パルミチン酸およびオレイン酸のカルボキシル標識 C^{14} の血漿 NEFA からの turn over は, メチル標識の場合よりも急速である。(第 1, 2 図) またアセチル CoA 系を経てのコレステロールへのとりこみがカルボキシル標識により多く, 一方メチル標識では血漿コレステロールへのとりこみが低く, 血漿トリグリセリドへのとりこみはるかに多い。

ステアリン酸 1- C^{14} からの $C^{14}O_2$ の排出の型をパルミチン酸と比較すると, その排出の型および $C^{14}O_2$ の総排出量はパルミチン酸 1- C^{14} よりも, むしろパルミチン酸 16- C^{14} に近い型がえられた。このようにステアリン酸は $C^{14}O_2$ 排出のピークは 30 分以後にある。ステアリン酸 1- C^{14} は血漿 NEFA の C^{14} の turn over はパルミチン酸 1- C^{14} よりもややおそい。ステアリン酸はパルミチン酸よりも, やや血漿 NEFA の turn over がおそいようである。

不飽和脂肪酸注入時の呼気への排出 $C^{14}O_2$ を比較すると, リノール酸 1- C^{14} の場合 $C^{14}O_2$ の排出は他の脂肪酸と比較してもっとも少なく, 3 時間内の総排出量は他の脂肪酸のほぼ半量である。血漿 NEFA のリノール酸はそのレベルが他の脂肪酸と比較してもっとも少ない。^{4,10)} しかし血漿総脂肪酸としては, 主としてコレステロールエステルおよびリン脂質として多量に存在している。リノール酸 1- C^{14} 注入時の血漿 NEFA の turn over は, リノール酸の体組織へのとりこみが多く, もっとも低い C^{14} 活性で平衡に達している。また $C^{14}O_2$ の排出が少ない上に, 比較的リン脂質へのとりこみが時間とともに増加している事などより, リノール酸の turn over は動物体

全体として他の脂肪酸よりもやや低いことが推定される。このことはリノール酸からのアセチル CoA 系を経てのコレステロールへのとりこみが、比較的少ないことからもうかがわれる。

第2表 C^{14} 標識脂肪酸注入後各30分間の呼気排出 C^{14} の平均値 ($\mu\text{ci}/30\text{min}$)

注入後時間 (分)	Palmitate	Palmitate	Stearate	Oleate	Oleate	Oleate	Linolate
	1- C^{14}	16- C^{14}	1- C^{14}	1- C^{14}	10- C^{14}	18- C^{14}	1- C^{14}
0-30	10.18	7.67	11.03	17.11	11.71	12.99	9.62
30-60	7.40	14.03	16.17	13.43	16.93	22.74	8.53
60-90	5.21	13.55	13.64	9.42	13.52	18.64	6.16
90-120	4.16	12.27	11.25	7.22	10.62	14.46	4.86
120-150	3.43	11.03	9.45	5.82	8.96	12.06	4.09
150-180	2.95	10.11	8.09	4.90	7.70	10.29	3.52

第3表 C^{14} 標識脂肪酸注入量に対する呼気排出 C^{14} の割合 (%)

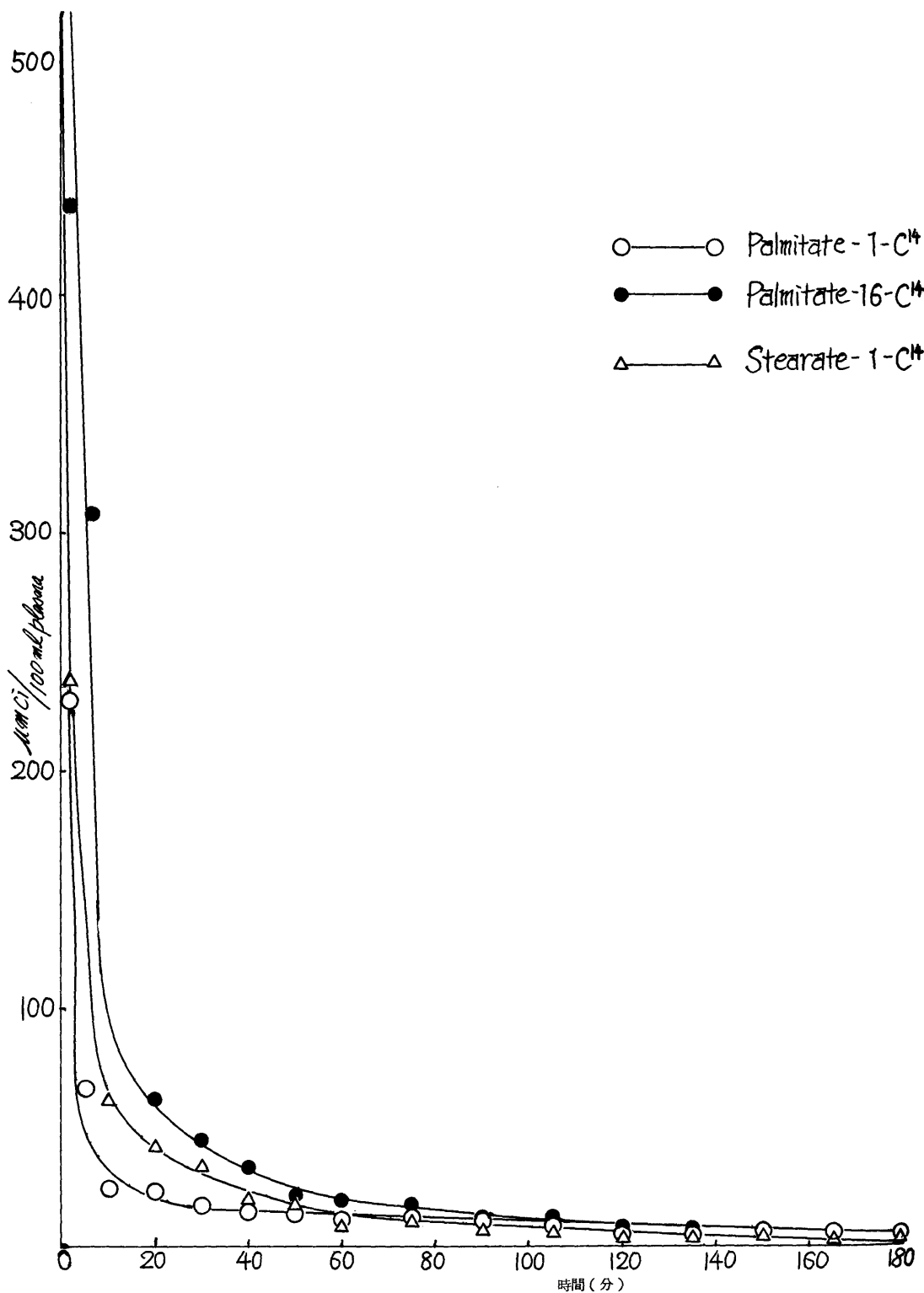
注入後時間 (分)	Palmitate	Palmitate	Stearate	Oleate	Oleate	Oleate	Linolate
	1- C^{14}	16- C^{14}	1- C^{14}	1- C^{14}	10- C^{14}	18- C^{14}	1- C^{14}
30	2.9	1.4	1.6	3.4	1.9	1.8	1.5
60	5.0	3.9	3.9	5.8	4.6	5.0	2.7
90	6.5	6.2	5.9	7.6	6.8	7.5	3.6
120	7.6	8.3	7.5	8.8	8.5	9.5	4.3
150	8.6	10.2	8.8	9.9	9.7	11.1	4.9
180	9.4	11.9	10.0	10.7	10.9	12.6	5.4

血漿 NEFA の turn over

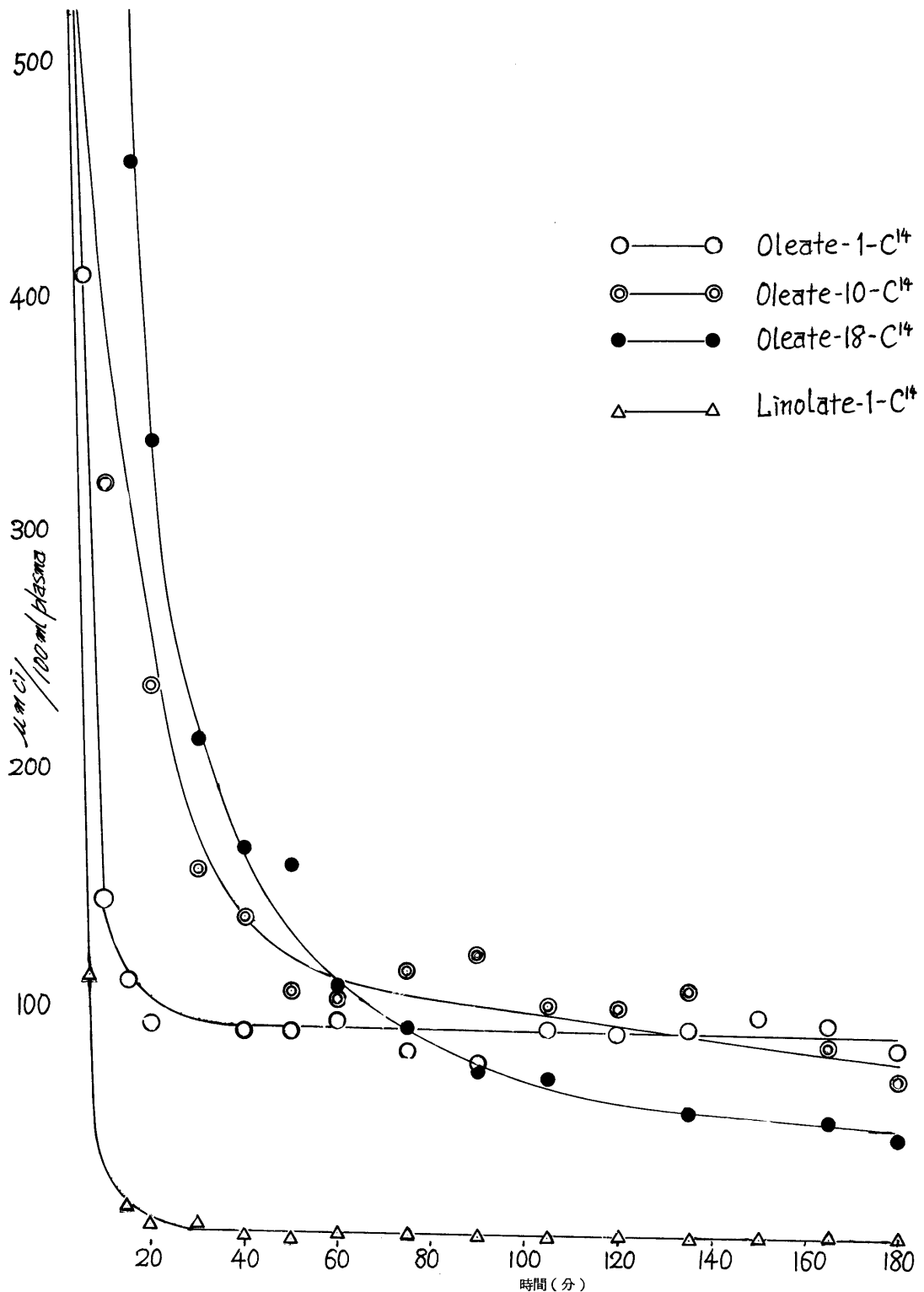
各標識脂肪酸注入後の血漿 NEFA C^{14} の経時的变化は、第 1 図および第 2 図に示すようである。パルミチン酸 $1-C^{14}$ の場合には、注入約 20 分後にはほぼ平衡値に達し、同様の傾向がオレイン酸 $1-C^{14}$ およびリノール酸 $1-C^{14}$ にも認められた。Blackら⁸⁾はトリチウム標識パルミチン酸注入によって、負荷後 20 分でほぼ平衡値に達することを認めている。ステアリン酸 $1-C^{14}$ の場合には、やや平衡に至るのが他の脂肪酸よりおくられている。またパルミチン酸 $16-C^{14}$ およびオレイン酸 $18-C^{14}$ では、いずれもカルボキシル標識よりもその turn over がおそく、またオレイン酸 $10-C^{14}$ ではその中間の turn over を見せている。カルボキシル標識の場合には、体組織での β 酸化によって比較的早く酸化を受ける部分である。したがって体組織において脂肪酸分子のカルボキシル末端は比較的早く脂肪酸分子から離れる。そのために血漿 NEFA 間との平衡に至る時、その C^{14} レベルは比較的低下していることが考えられる。特にオレイン酸の場合、カルボキシル標識において 20 分以後 NEFA の C^{14} 値がほぼ一定であるのに対し、メチル標識においては、3 時間まで徐々に減少の傾向を見せている。このことは完全酸化による呼気排出 $C^{14}O_2$ のパターンと、血漿 NEFA の C^{14} の turn over が一致していることも考慮すべき要因である。ほぼ同様の傾向がパルミチン酸のカルボキシルおよびメチル標識の場合においても見られる。

カルボキシル標識の場合には、 β 酸化によって比較的急速にアセチル CoA となり、これがコレステロール、あるいは他の脂肪酸その他に再合成されて、比較的早く平衡に達すると考えられる。これに対してメチル標識の場合には、比較的 blood triglyceride に多くとりこまれていることより、一旦体組織の脂肪酸プールにとりこまれる C^{14} が多く、これが徐々に NEFA として血中に再放出されて酸化される。そのため徐々に血漿 NEFA の C^{14} が低下するものと考えられる。

血漿 NEFA において平衡に達した後の C^{14} レベルを各脂肪酸について比較すると、オレイン酸がもっとも高く、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸の順となっている。この理由として、血漿 NEFA の脂肪酸組成を体脂肪酸プール全体の構成脂肪酸組成と比較すると、血漿 NEFA にはオレイン酸の比率が高く、パルミチン酸はほぼ同じで、ステアリン酸はやや低く、リノール酸は相当低い。それぞれの脂肪酸プールの構成比率の差も考え合せ、体全体の脂肪酸プールと血漿 NEFA 間に、 C^{14} が平衡した場合に、上記の血漿 NEFA の C^{14} レベルを保持することが考えられる。



第1図 G¹⁴ 標識 パルミチン酸、ステアリン酸注入後3時間の血漿 NEFA の比放射能



第2図 C¹⁴ 標識オレイン酸、リノール酸注入後3時間の血漿 NEFA の比放射能

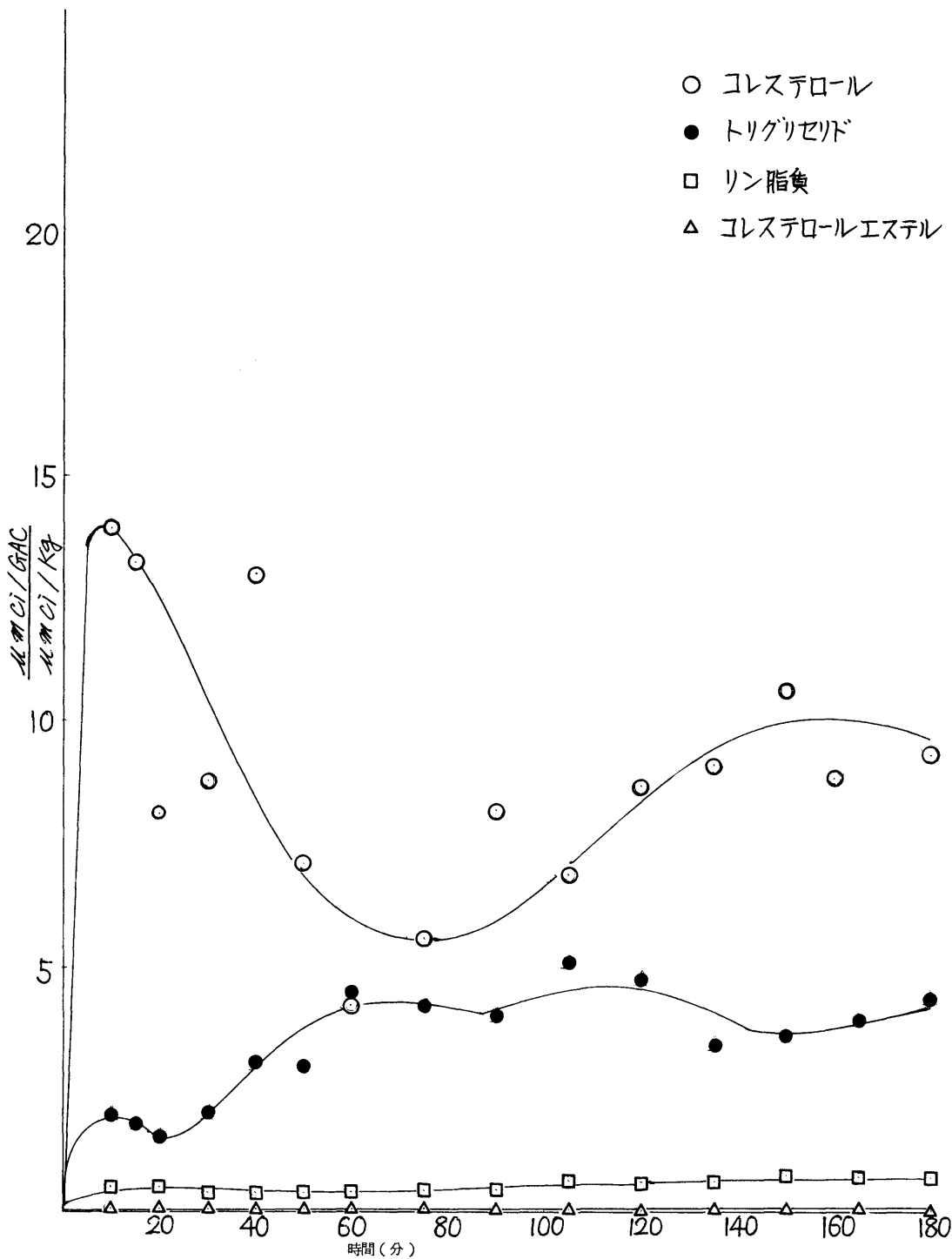
血漿脂質各分画への C^{14} のとりこみ

(1) 血漿トリグリセリドおよびリン脂質へのとりこみ

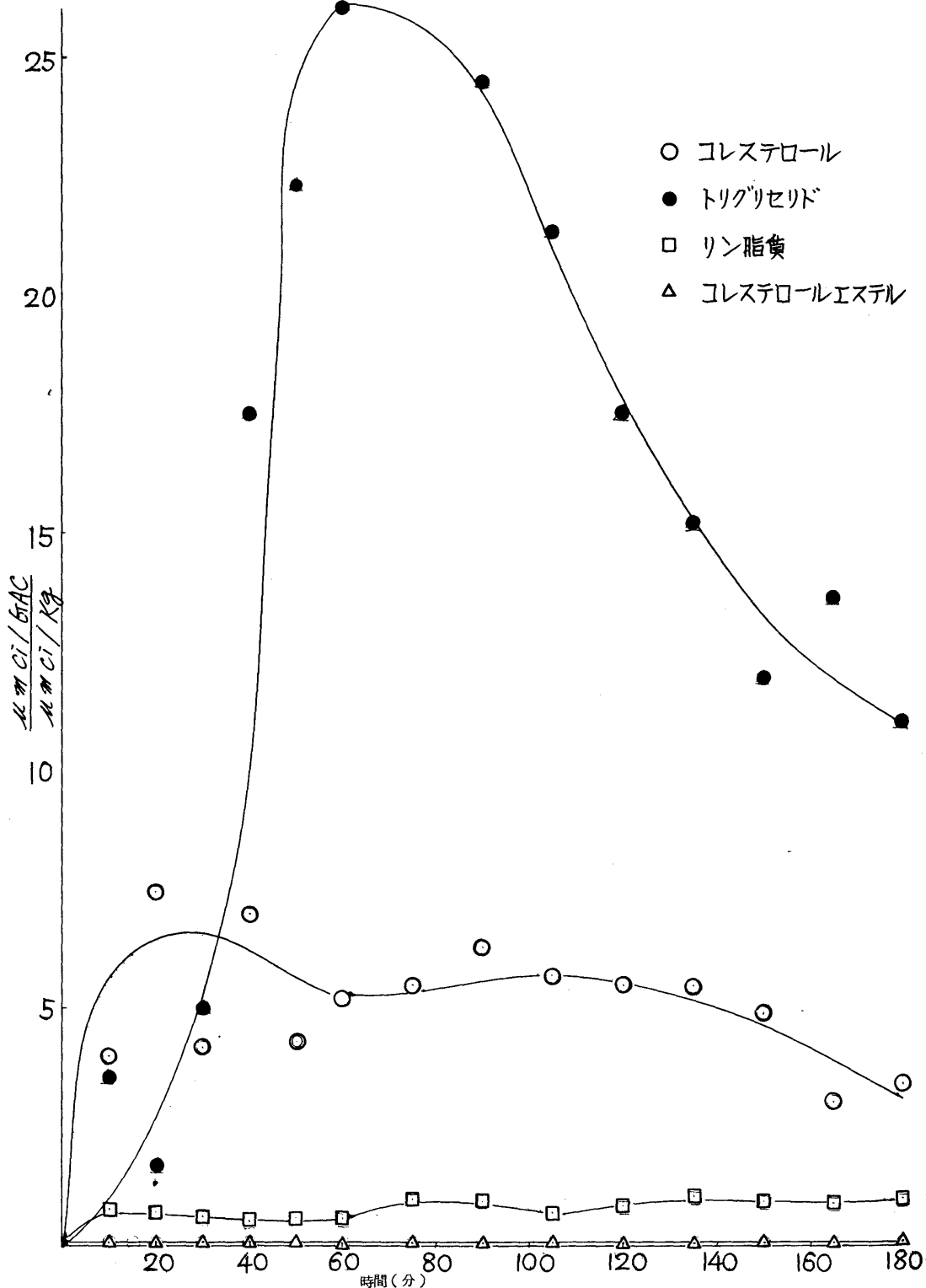
血漿トリグリセリドへの各標識脂肪酸注入後の C^{14} のとりこみを比較すると、パルミチン酸、リノール酸にやや高く、ステアリン酸、オレイン酸にやや低い。体組織のトリグリセリドの脂肪酸組成としては、オレイン酸、ステアリン酸が多く、リノール酸、パルミチン酸は比較的少ない。いずれも体組織のトリグリセリドを構成する脂肪酸と注入標識脂肪酸と平衡した場合、そのトリグリセリド構成脂肪酸による C^{14} の稀釈の程度を示すものと考えられる。オレイン酸およびパルミチン酸のカルボキシル標識とメチル標識を比較すると、いずれもメチル標識の方がカルボキシル標識よりもそのとりこみが多く、 β 酸化に比較的時差のあるメチル標識の方が、比較的トリグリセリドにエステル化されて存在することが考えられる。

血漿リン脂質分画への各カルボキシル標識脂肪酸のとりこみを比較すると、オレイン酸、リノール酸に多く、パルミチン酸、ステアリン酸には比較的少ない。リン脂質はその体構成リン脂質の脂肪酸組成がオレイン酸、リノール酸が比較的少なく、パルミチン酸、ステアリン酸が多い。このことからトリグリセリドの場合と同様に、血漿リン脂質への C^{14} のとりこみも、体組織構成リン脂質脂肪酸による注入標識脂肪酸の稀釈の程度を示すものと考えられる。しかしオレイン酸のリン脂質へのとりこみが比較的高く、またカルボキシル標識よりも、メチル標識の方がとりこみが少ない。すなわちオレイン酸のトリグリセリドへのとりこみの場合とは、逆の結果をえている。このことはリン脂質へは血漿NEFA脂肪酸分子の、直接のエステル化によるとりこみと同時に、 β 酸化によって生成するアセチルCoAからのリン脂質合成が相当関与していることが推定される。メチル標識側がカルボキシル標識よりもとりこみが減少することは、アセチルCoAより合成されるコレステロールにおいても同様の傾向が見られる。しかしパルミチン酸ではややメチル標識の方が、カルボキシル標識よりもリン脂質へのとりこみが多い。パルミチン酸はオレイン酸よりも呼気への $C^{14}O_2$ の排出が下まわっており、比較的リン脂質への直接の脂肪酸分子のとりこみが、オレイン酸よりも多いことが推定される。

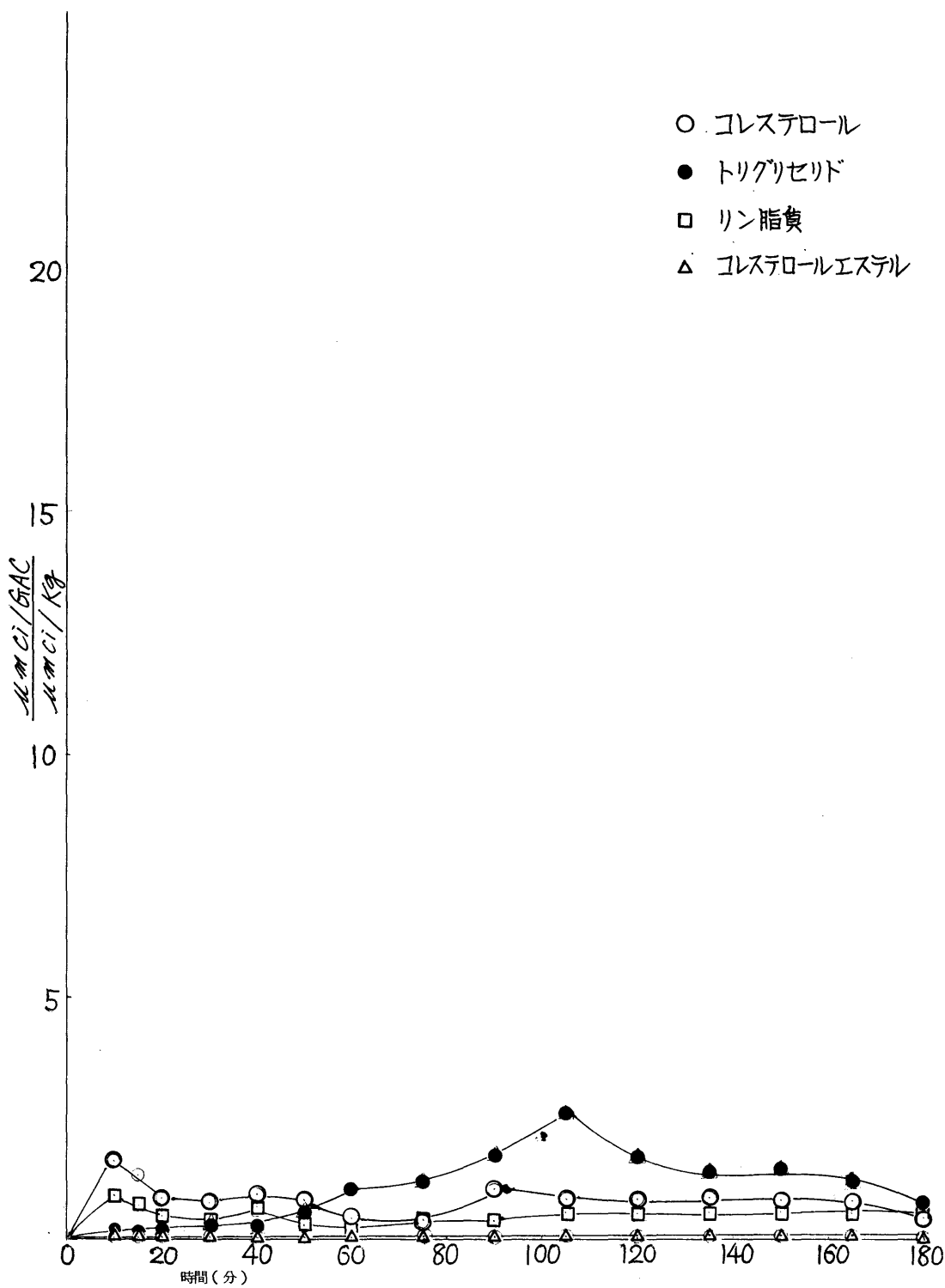
Westら¹⁷⁾はパルミチン酸 $1-C^{14}$ および $U-C^{14}$ の連続注入によって、 $U-C^{14}$ が $1-C^{14}$ よりもトリグリセリドおよびリン脂質へのとりこみが大であることを報告している。またパルミチン酸はオレイン酸よりもレシチンへのとりこみが速いとの報告もある。⁶⁾



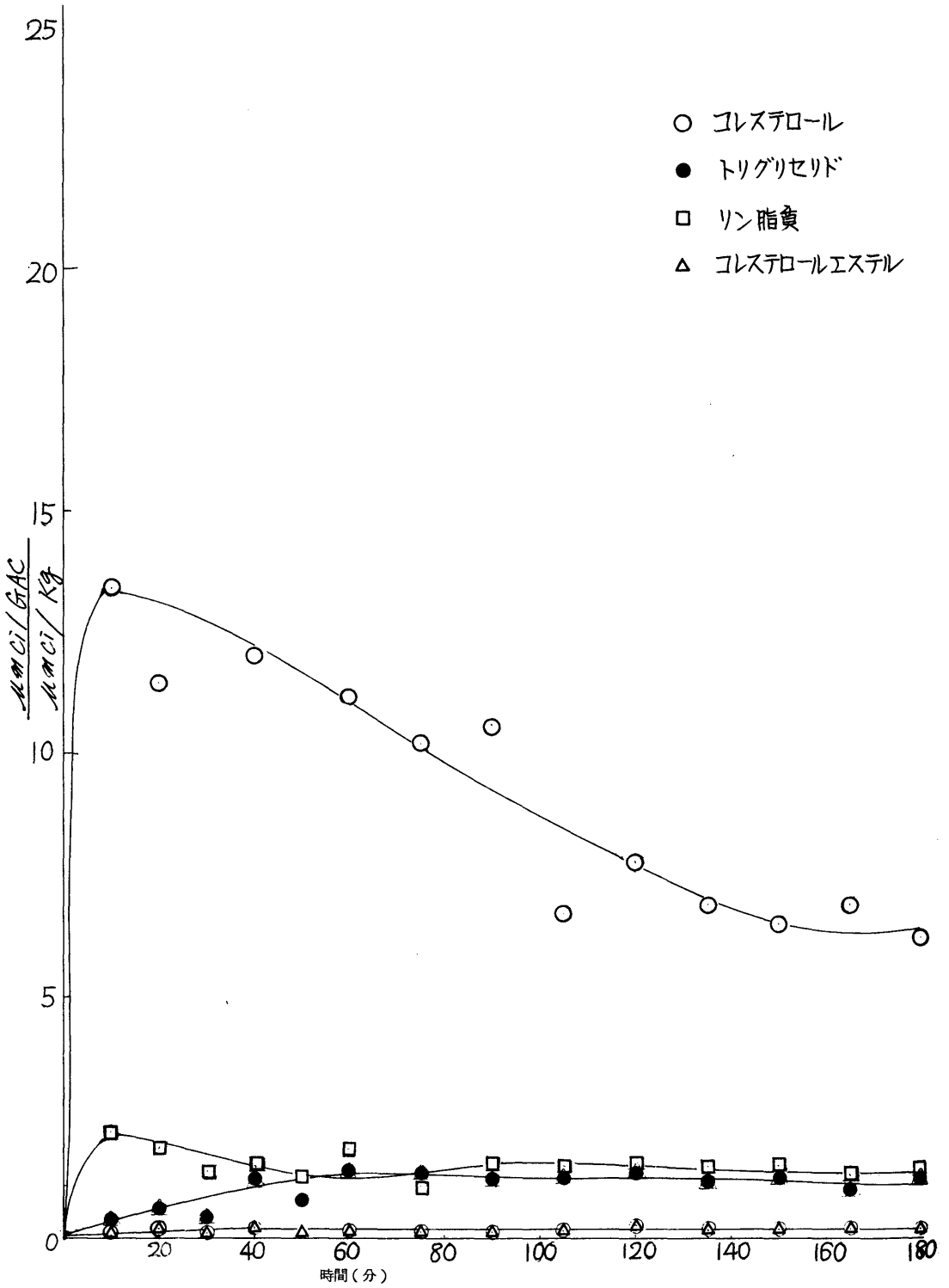
第3図 1-C¹⁴ パルミチン酸注入後3時間の血漿脂質へのC¹⁴のとりこみ



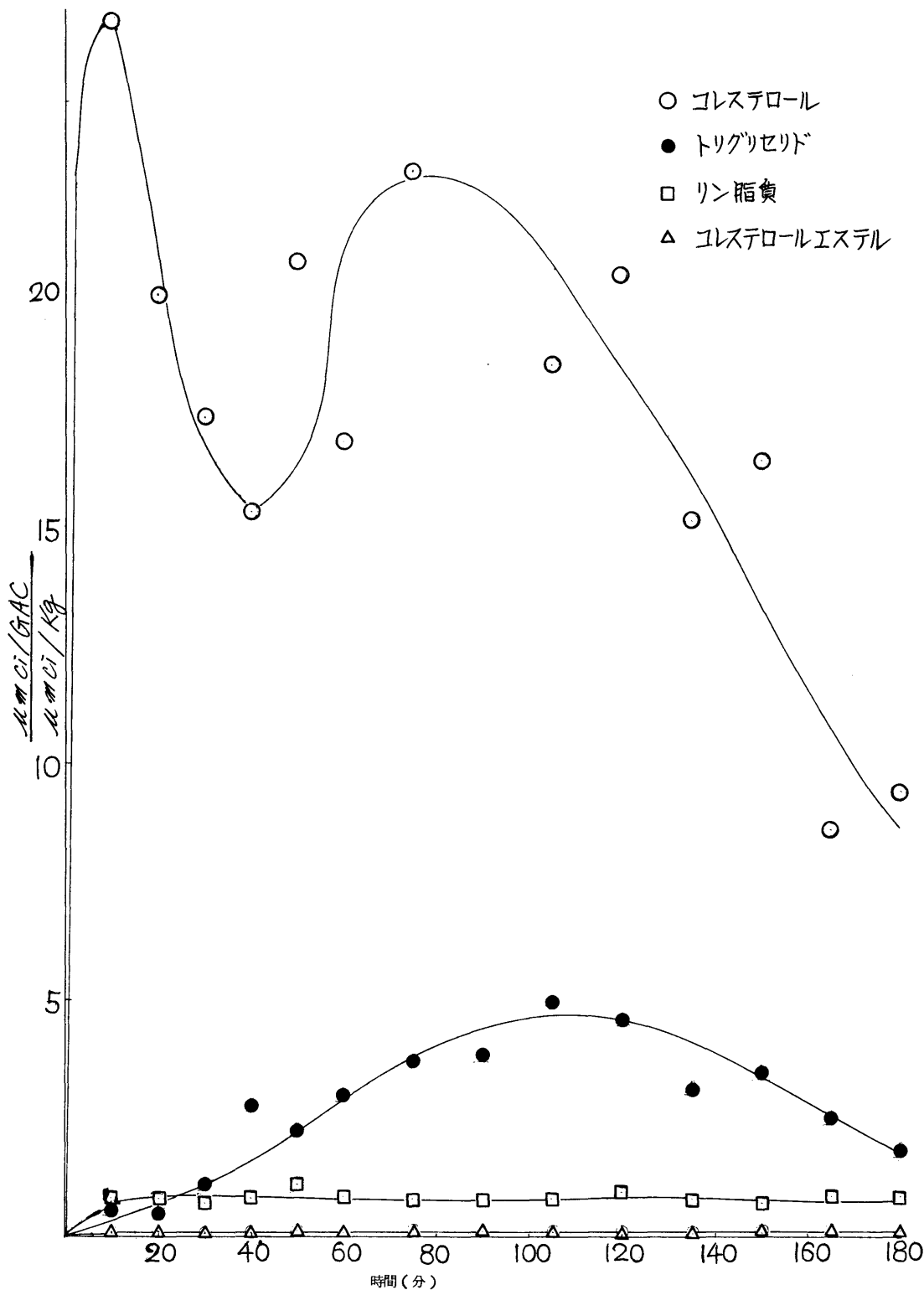
第4図 16-C¹⁴ パルミチン酸注入後3時間の血漿脂質へのC¹⁴のとりこみ



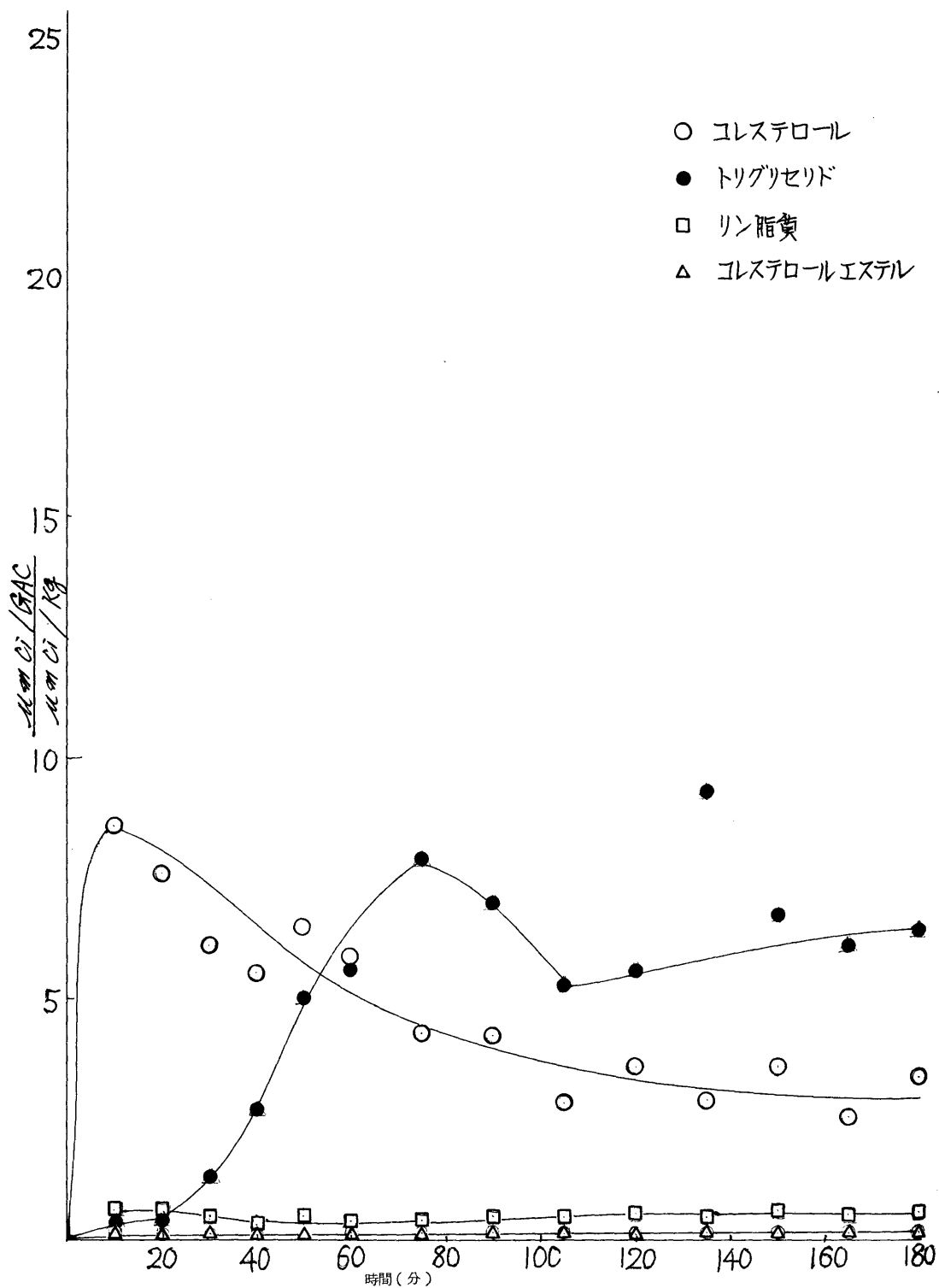
第5図 1-C¹⁴ステアリン酸注入後3時間の血漿脂質へのC¹⁴のとりこみ



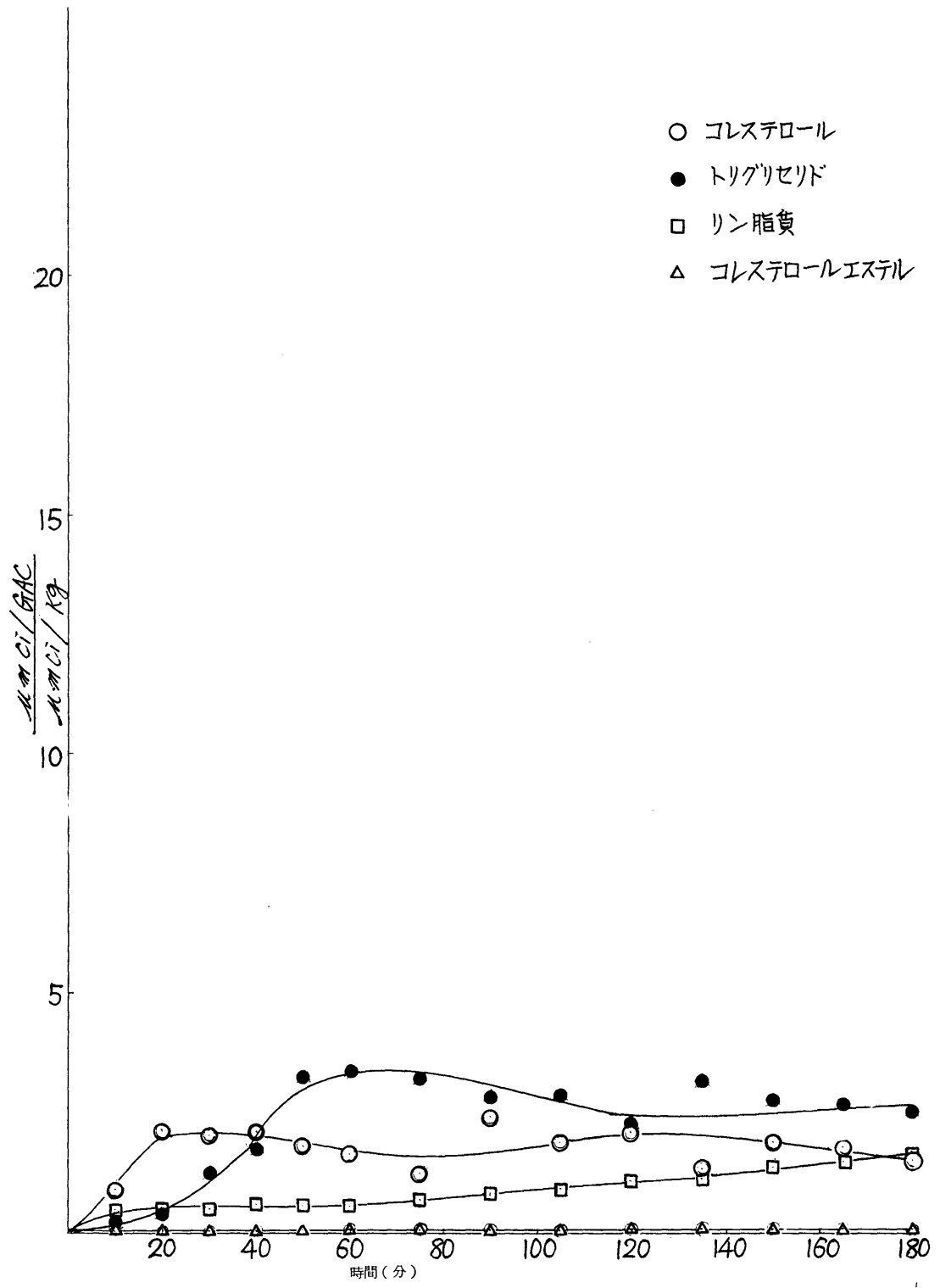
第6図 1- C^{14} オレイン酸注入後3時間の血漿脂質への C^{14} のとりこみ



第 7 図 10-¹⁴C オレイン酸注入後 3 時間の血漿脂質への ¹⁴C のとりこみ



第8図 18-C¹⁴ オレイン酸注入後3時間の血漿脂質へのC¹⁴のとりこみ



第9図 1-c¹⁴ リノール酸注入後3時間の血漿脂質へのc¹⁴ のとりこみ

(2) コレステロールおよびコレステロールエステルへのとりこみ

コレステロールの合成はアセトアセチル CoA 系を経ての合成系によって、主として肝において合成される。脂肪酸の β 酸化によって産生されるアセチル CoA からのコレステロール合成の turn over は、他の脂質分画へのとりこみと比較しても非常に急速であることが認められる。各脂肪酸からの C^{14} のコレステロールへのとりこみを比較すると、オレイン酸からのとりこみをもっとも高く、その標識部位による差異は、オレイン酸 $10-C^{14}$ がもっとも高く、次いで $1-C^{14}$, $18-C^{14}$ となっている。オレイン酸分子中間の $10-C^{14}$ がもっとも高いコレステロールへのとりこみを見せているが、そのピークはいずれも 10 分以内にある。パルミチン酸からコレステロールへのとりこみも、オレイン酸とほぼ同様のレベルであり、その標識部位による差もカルボキシル標識に高くメチル標識に低いとりこみを見せている。ステアリン酸からコレステロールへのとりこみはパルミチン酸と比較して低い。ステアリン酸は血漿 NEFA の turn over がパルミチン酸よりややおそく、また注入後呼気への排出 $C^{14}O_2$ もパルミチン酸よりも少ない。したがってアセチル CoA の生成も比較的ゆるやかであり、そのために急速なコレステロールへの turn over は比較的少ないことが考えられる。ステアリン酸の β 酸化はその産生するパルミチン酸との平衡関係もあって、その酸化の速度はパルミチン酸よりもややおそい事が推定される。リノール酸からコレステロールへの C^{14} のとりこみは、ステアリン酸と比較するとやや高いが、オレイン酸、パルミチン酸よりは明らかに低レベルである。リノール酸の酸化は他の脂肪酸と比較して、その呼気への $C^{14}O_2$ の排出も $1/2$ 程度であり、したがってアセチル CoA からのコレステロールへのとりこみも低いと考えられる。脂肪酸とコレステロール間の turn over は容易にまた急速であることが、イヌ⁵⁾、ラット¹⁴⁾ などで認められている。またメノウにおいてもパルミチン酸から相当量コレステロールへ転移することを Westra¹⁷⁾ が報告している。

脂肪酸からコレステロールへのとりこみが急速かつ多量であるのに比較して、コレステロールエステルへのとりこみはいずれも著明に低い。コレステロールのコレステロールエステルへの turn over はおそいことが報告されている。^{7,8,11)} コレステロールエステルへの C^{14} のとりこみは、各脂肪酸とも低く、コレステロールへの比較的高いとりこみと比較して、その交換は非常におそいことが認められる。血漿コレステロールエステルを構成する脂肪酸として、リノール酸が 70% 程度存在する。リノール酸 $1-C^{14}$ 注入の場合にも、その C^{14} のとりこみは他の脂肪酸とほとんど同レベルであり、そのエステル化の速度もコレステロールと交換と同様に非常にゆるやかであると考えられる。

本研究は 1972 年よりカリフォルニア大学デービスにおいて Dr. A. L. Black の指導のもとに行なわれた。同教授および生理学研究室の方々に深く感謝の意を表す。また有益なご助言をいただいた東北大学農学部、津田恒之教授および横浜市立大学、瀬戸勝男助教授に深く感謝の意を表す。

文 献

- (1) Annison, E.F. *Metabolism and Physiological Significance of Lipids*, (1964) Edited Dawson, R. M. C. p.289
John Wileys.
- (2) Armstrong, D. T., Steele, R., Altszuler, N., Dunn, A., Bishop, J. S. and deBodo, R. C. (1961) *Am. J. Physiol.*, 201,9.
- (3) Bierman, E. L., Schwartz, J. L. and Dole, V. P. (1957) *Am. J. Physiol.*, 191,859.
- (4) Evans, L., S. Patton and R. D. McCarthy (1961) *J. of Dairy Sci.*, 44,475.
- (5) Hagerman, J. S. and R. G. Gould (1951) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 78,829.
- (6) Hanahan, D. J. and R. Blomstrand, (1956) *J. Biol. Chem.*, 222,677.
- (7) 今井陽他 (1967) 脂質の生化学 p.200. 朝倉
- (8) Jackson, H. D., A. L. Black and F. Moller (1968) *J. Dairy Sci.*, 51,1625.
- (9) Lough, A. K. and Garton, G. A. (1957) *Biochem. J.*, 67,345.
- (10) McCarthy, R. D., P. T. Chandler, L. C. Griel, Jr. and G. A. Porter(1968) *J. Dairy Sci.*, 51,392.
- (11) Mead, T. F. 他 (1963) 脂肪酸の代謝 土屋他訳 p.136. 共立全書
- (12) Olivecrona, T.(1962) *Acta Physiol. Scand.*, 54,295.
- (13) Seto, K., H. Negoro ,H. Saito, K. Otsuda, T. Tsuda, C. Franti and A. L. Black (1964)(in press)
- (14) Swell, L., E. C. Trout Jr. and C. R. Treadwell (1958) *J. Biol. Chem.*, 230,631.
- (15) Watanabe, Y., T. Kyuma and H. Murai (1969) *Jap. J. Zootech. Sci.*, 40, 390.
- (16) 渡辺泰邦 (1970) 栄養生理研究会報 14,1.
- (17) West, C. E. and E. F. Annison (1964) *Biochem. J.*, 92,573.