HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	酸化脂質の魚類脂質代謝に及ぼす影響：II．コイにおける長鎖脂肪酸の吸収および代謝に及ぼす酸化脂質の影響
Author(s)	飯島, 憲章; 座間, 宏一
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 30(1), 84-91
Issue Date	1979-02
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23675
Type	bulletin (article)
File Information	30(1)_P84-91.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大水産彙報
30(1), 84–91. 1979.

酸化脂質の魚類脂質代謝に及ぼす影響
II. コイにおける長鎖脂肪酸の吸収および代謝に及ぼす酸化脂質の影響

飯島憲章*・座間宏一*

Influence of Oxidized Lipids on the Lipid Metabolism in the Fish
II. Absorption and metabolism of palmitic acid-1-^{14}C in carp fed with oxidized lipids

Noriaki IIJIMA* and Kōichi ZAMA*

Abstract

The effect of a long term ingestion of oxidized lipids on lipid absorption and metabolism was investigated in carp.

Four dietary regiments were used: A group (control) fed on a casein-gelatin diet containing purified soybean oil methylester (PSME) and α-tocopherol (I), B group on a diet containing oxidized soybean oil methylester (OSME) and α-tocopherol (II), C group on a diet (I) without α-tocopherol, and D group on a diet (II) without α-tocopherol. Each group was reared for 45 weeks.

The growth rate in carp ingested with OSME (B and D groups) was about one third that of A group (control), after 45 weeks. Moreover, the ratio of organ weight to body weight in B and D groups was higher in contrast with A group (control), but on the other hand, the ratio of muscle to body weight was lower than that of A group (control).

The absorption of palmitic acid-1-^{14}C into the body of B and D groups was significantly lower in comparison with that of A group (control). The incorporation of palmitic acid-1-^{14}C into intestinal phospholipid of B and D groups was higher than that of A group (control), whereas the palmitic acid-1-^{14}C incorporation into intestinal triglyceride of B and D groups was found to be statistically low in comparison with A group (control). In the hepatopancreas, phospholipid of B, C and D groups was high in comparison with A group, but the palmitic acid-1-^{14}C incorporation into triglyceride of B, C and D groups was lower compared with A group.

In conclusion, it can be assumed that a long term ingestion of oxidized lipids causes a reduction in the lipid absorption of the body and influences the triglyceride or phospholipid biosynthesis of the intestine. Finally, it can be assumed that changes of lipid metabolism in the hepatopancreas was similar in B, C and D groups.

緒　　言

酸化脂質あるいはビタミンE欠乏飼料を投与することによってコイでは筋ジストロフィーなどの症状が現われるだけでなく，代謝系にも障害の起る可能性が指摘されている。しかしながら酸化脂質投

* 北海道大学水産学部食品化学第一講座
(*Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

与とビタミンE欠乏飼料投与の場合とではコイ臓器に異なった影響を与える可能性も考えられ，さらにそれらがどの臓器にどの様な代謝異常を及ぼすかに関しても未解決の問題が多く残っている。

すでに著者らはコイ臓器の脂質代謝に及ぼす酸化脂質の影響を明らかにすることを目的とし，コイを対照 (A)，酸化脂質 (B)，ビタミンE欠乏飼料 (C)，酸化脂質-ビタミンE欠乏飼料 (D) 投与の4群に分け，15週間飼育したコイの腸，肝すい臓および筋肉の脂質を分析し，腸ではB, D群，筋肉ではB, C, D群でいずれもトリグリセライドが減少，肝すい臓ではB, C, D群でリン脂質量が増大していることを報告した[1]。15週間の飼育実験の結果では，酸化脂質投与あるいはビタミンE欠乏飼料投与のいずれの場合にもコイ臓器の脂質代謝に異常が起るが，各臓器の体重比には大きな変動はみられず，また背こけ病魚の出現もみられなかった。

本報では，上記A～Dの試験飼料で背こけ病魚が出現するまで飼育を継続したコイにパルミチン酸-1-^{14}C を経口投与し，その吸収および代謝に及ぼすこれらの飼料の影響について検討を行なった。

試料および実験方法

大豆油脂肪酸メチルエステルの調製ならびに酸化エステルの調製

大豆油脂肪酸メチルエステルならびに酸化エステルの調製は前報[1]に準じて行なった。投与エステルの性状は表1，脂肪酸組成は表2に示す。

Table 1. *Property of dietary methylester.*

Dietary oil	IV	POV	COV	n_D^{20}
Methyl ester	129.5	8.0	13.0	1.4590
Oxidized methyl ester	128.0	680.0	198.0	1.4606

Note : Methyl ester was prepared from soybean oil.

Table 2. *Fatty acid composition of dietary methylester* (*weight* %).

Cn : m*	Methyl ester	Oxidized methyl ester
16:0	11.35	11.11
:1	0.29	0.36
18:0	2.69	3.49
:1	22.73	22.30
:2	55.80	54.61
:3	7.14	8.13

Note: HITACHI 063 gas chromatograph; DEGS column (1 m×3 mm i.d.), column temp. 205°C, injection temp. 255°C, N_2 gas flow rate 40 ml/min.

*n; Number of carbon atom m; Number of double bond

飼育試験

前報[1]では体重 30g 前後のコイ幼魚60尾を表 3-1, 3-2 に示す A～D の飼料投与群に分け，飼育を行ない15週目で各群より5尾ずつ任意に取り出し，実験に用いたが，本報では各群の残りのコイをさらに45週まで飼育を継続した。

Table 3-1. *Composition of basal diet (weight %).*

Casein (Vitamin free)	54	DL-Methionine	2
Gelatin	15	L-Tryptophan	1
White dextrin	8	Mineral mix.	4
Cellulose powder	8	Vitamin mix.	1*

* DL-α-tocopherol was eliminated from the formula of Halver et al.

Table 3-2. *Composition of administered methylester and Vitamin E.*

Composition	A group	B group	C group	D group
Basal diet (g)	91.5	91.5	91.5	91.5
Methyl ester (g)	10	—	10	—
Oxidized methyl ester (g)	—	10	—	10
DL-α-tocopherol (mg)	20	20	—	—

標識脂肪酸の調製ならびに経口投与

大豆油脂肪酸メチルエステル 0.1ml につきパルミチン酸-1-^{14}C, 20μCi を溶解し，ゼラチンカプセル No. 5 に封入した。飼育試験終了後，48時間絶食させたコイを各群より任意に取り出し，0.25% MS 222 による麻酔後，ポリエチレンチューブを用いてコイの前腸部にゼラチンカプセルを挿入した。経口投与後供試魚を 10l の水槽（水温 22～24°C）に移し，6時間後に取り出し，尿中の糖を Glucose-Pretest（和光純薬 KK）で検査し，体重，体長を測定した後，さらに血液，臓器を以下の分析に用いた。

腸内容物，血しよう，筋肉および各臓器よりの全脂質の抽出ならびに放射能活性の測定

腸内容物，腸，肝すい臓，筋肉ならびにその他の臓器（浮袋，腎臓，脾臓，頭腎，脂肪組織および生殖巣）よりの全脂質の抽出は Bligh-Dyer 法に準じて行なった。全脂質はクロロホルムで 10ml とし，その 1ml を液シン用バイアルに移し，溶媒除去後トルエン系シンチレーター（1l トルエン中に DPO 5g, POPOP 0.1g を含む）10ml を加え，液体シンチレーションスペクトロメーターによって総放射能活性（TA）を測定した。血液の採取はコイの心臓ならびに背大動脈より行ない，2000rpm, 5分間遠心分離後血しょうを採取した。全脂質は Bragdon 法[2]に準じて抽出し，TA の測定は臓器脂質分析の方法に準じて行なった。

全脂質の薄層クロマトグラフィー（TLC）

腸，肝すい臓ならびに血しよう脂質を二次展開 TLC によって各脂質成分に分離し，2′-7′-ジクロルフルオレセイン噴霧により検出した。すなわち第一次展開溶媒（エーテル）で原点より 3cm まで展開し，リン脂質成分と非リン脂質成分に分離し，さらに第二次展開溶媒（ヘキサン・エーテル・酢酸

85:15:1, V/V) による展開後，リン脂質 (PL)，モノ・ジグリセライド (PG)，遊離脂肪酸 (FFA)，トリグリセライド (TG) 画分を液シン用バイアルにかき取り，乾燥後，Cab-O-Sil (Tixotrophic gel powder, CABOT) 40mg，トルエン系シンチレーター 10m*l* を添加し，各脂質画分の放射能活性を測定した。

実験結果ならびに考察

成長観察

45 週間の飼育期間におけるコイの平均体重増加率を図 1 に示す。各試験群間の増加率の差異は飼育開始後 15 週から明らかとなり，40 週以後では対照のA群ならびにビタミンE欠乏餌料投与のC群はさ

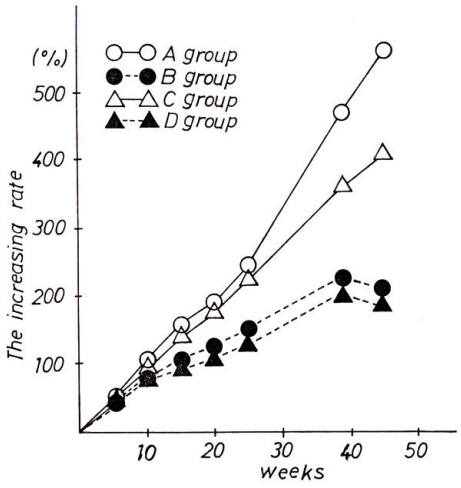

Fig. 1. Growth curve of carp.
The increasing rate: (A-B)/B×100
A; Body weight, B; Initial body weight

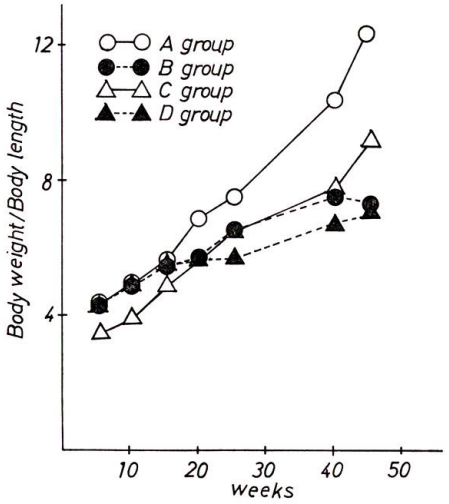

Fig. 2. Changes in body weight/body length ratio in carp.

らに増加するのに対し，酸化脂質投与の B, D 群では減少し，実験終了時 (45 週目) では B, D 群の増加率はA群の約 1/3 であった。

飼育期間中における体重/体長 (BW/BL) 比の変動は図 2 に示すように飼育開始 15 週以後で各試験群間に差がみられ，飼育終了時では，BW/BL 比がA群 (12.7±1.7)，C群 (9.3±2.1)，B群 (7.7±0.6)，D群 (7.0±0.7) となり，対照のA群に比べ B, C, D 群，特に B, D 群では明らかに低い値を示した。

各群の代表的な個体は図 3 に示すように，A群に比べ B, C, D 群のコイは魚体が小さいだけでなく，B, D 群，特にD群のコイは背部筋肉のせっそうが著しいことがみられた。

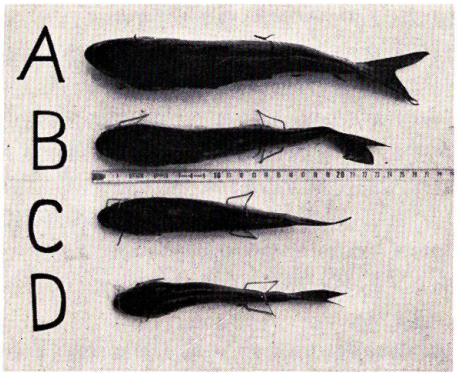

Fig. 3. Carp fed with A, B, C and D diet after 45 weeks.

各群の各種臓器・体重比，糖尿の出現，背こけ病魚の出現率を表4に示す。尿中の糖はB, C, D群で陽性となり，特にD群で強陽性を示した。臓器・体重比はB, D群の腸，肝すい臓，腎臓，脾臓がいずれも増大し，特にD群の腸，肝すい臓はA群の約2倍，脾臓は3倍以上に増大した。逆に筋肉の重量比はB, D群で著しく減少し，特にD群ではA群の約1/2となり，背こけ病魚の出現率ともよく一致している。

以上の結果より，酸化脂質がコイの各種臓器，特に腸，肝すい臓，筋肉の性状・機能に影響を及ぼしていることが考えられる。

Table 4. *Muscle and other organs wet weight percent, glucose in urine, and appearance of muscular dystrophy in carp.*

Organ, (g/100 g B.W.*)	A group (n=5)	B group (n=5)	C group (n=3)	D group (n=5)
Intestine	1.95±0.4	2.56[a)]±0.4	2.80±0.1	3.16[b)]±0.4
Hepatopancreas	1.20±0.4	1.86[a)]±0.5	1.43±0.2	2.43[b)]±0.4
Kidney	0.72±0.1	0.87 ±0.2	0.74±0.2	1.20[b)]±0.2
Spleen	0.23±0.1	0.28 ±0.1	0.22±0.1	0.81[b)]±0.2
Muscle	47.90±1.5	34.40[a)]±9.6	42.32±1.9	27.50[c)]±4.3
Fish showing apparent muscular dystrophy (%)	0	80	67	100
Glucose in urine	−	+	+	++

Mean value±SD
*B.W.: Body weight
a) In comparison with the A group (control), P=<0.1
b) In comparison with the A group (control), P=<0.05
c) In comparison with the A group (control), P=<0.001
n: Number of carp used in the experiment

腸における脂質の吸収および生合成

酸化脂質の各種臓器の性状・機能に及ぼす影響について脂質代謝，特に脂質の吸収および体内分布に関する3面から検討を行なった。

ステアリン酸-1-^{14}C を用いたコイの脂質吸収に関する研究によれば，経口投与後9～12時間で最も吸収が活発であるという結果が得られており[3)]，また著者らはパルミチン酸-1-^{14}C を用いてコイの脂質吸収および血中運搬に関する研究を行ない，同様な結果を得た[4)]。これらの知見より投与後6時間では各臓器中の放射能分布は吸収された ^{14}C 由来のものと考えられるので，本報ではパルミチン酸-1-^{14}C を経口投与後6時間で分析を行なった。

パルミチン酸-1-^{14}C をコイに経口投与後6時間における ^{14}C の魚体内分布を表5に示す。投与したパルミチン酸-1-^{14}C の回収率はいずれの群でも約70%で，各試験群間に有意な差は認められなかった。体内脂質に取り込まれた ^{14}C 量はA群，C群，B群，D群の順に低下し，特にD群の取り込みは著しく低く，A群の約1/2であった。各臓器脂質中の放射能分布をみると，腸ではA, C群間に大きな差はみられないが酸化脂質投与のB, D群では著しい低下が認められた。血しょう，肝すい臓，筋肉およびその他の臓器ではA群に比べてB, C, D群でいずれも取り込みが低く，特にD群では著しく低い値を示した。

腸の各脂質画分における ^{14}C の分布（表6）をみると，酸化脂質投与のB, D群では対照のA群に比べPL中の割合が約2倍に増大しているのに対し，TGでは約10%減少した。前報[1)]においてもB, D群で腸のTG量が著しく減少し，逆にPL量が増大し，今回の結果ともよく一致した。C群で

は TG 中の割合にほとんど差は認められないが，PL では約 1.5 倍増大した。PG では B, C, D 群とも減少する傾向がみられ，FFA ではC群で低下，D群で増大した。

Table 5. *Distribution of radioactivity in plasma, muscle, and other organs of carp 6 hr after palmitic acid-1-^{14}C intubation.*

	A group (n=5)		B group (n=5)		C group (n=3)		D group (n=5)	
	dpm×10^4	(%)[d]	dpm×10^4	(%)[d]	dpm×10^4	(%)[d]	dpm×10^4	(%)[d]
Total	3095		2971		3371		3047	
Intestinal content	1605		1904		2121		2360	
Body	1490		1067[a]		1250		687[b]	
Body	1490	100	1067[a]	71.6	1282	86.0	687[b]	46.1
Intestine	1044	70.1	765[a]	51.3	942	63.2	575[b]	38.6
Plasma*	84	5.6	66	4.4	64	4.3	34[b]	2.3
Hepatopancreas	115	7.7	82	5.5	102	6.8	31[c]	2.1
Muscle	125	8.4	90	6.0	60[b]	4.0	25[c]	1.7
Others**	122	8.2	64	4.3	114	7.7	22[c]	1.5

Recovery of dose: A group (70.3), B group (67.5), C group (76.6), D group (69.3)
* Counted as 3% of body weight
** Adipose tissue, kidney, spleen, gonad, gall bladder and heart
a) In comparison with the A group (control), P=<0.1
b) In comparison with the A group (control), P=<0.05
c) In comparison with the A group (control), P=<0.025
d) Calculated as percentage of body dpm of A group (control) taken as 100% reference point

Table 6. *Distribution of radioactivity in the lipid class of carp intestine 6 hr after palmitic acid-1-^{14}C intubation.* (% *of total dpm*)

Lipid class	A group	B group	C group	D group
Phospholipid	10.2±2.9	22.0[c]±7.6	14.9[a]± 5.0	19.8[c]± 3.9
Partial glyceride	9.9±2.3	7.6 ±3.5	7.4 ± 0.8	7.8 ± 2.2
Free fatty acid	17.1±8.0	17.6 ±9.4	14.8 ± 4.0	24.8 ±16.6
Triglyceride	62.8±4.0	55.3[b]±5.0	62.9 ±12.2	47.6[c]±10.0

a) In comparison with the A group (control), P=<0.1
b) In comparison with the A group (control), P=<0.05
c) In comparison with the A group (control), P=<0.025

以上の結果より，酸化脂質はコイの腸細胞を損傷し，脂質の吸収機構に障害を及ぼし，長鎖脂肪酸の腸への吸収能を低下させ，さらに腸細胞内における脂質生合成能にまで影響を及ぼし，取り込まれた脂肪酸の PL への生合成系の促進，あるいは TG 合成系の阻害を起すものと考えられる。

腸から各組織への脂質の移行

腸に吸収された脂肪酸は TG, PL などに生合成され，リポ蛋白質形成後血液中に出現し，各組織に運ばれていくと考えられている[4)-6)]。

前述（表 5）のように各臓器および血しょうへの取り込みは対照のA群に比べて B, C, D 群，特に

D群では著しい低下がみられた。各臓器への取り込みの低下の原因は腸の脂質吸収能が低下しているためか，または吸収された脂質を循環血液中に放出する機構に障害が起るためとも考えられる。このことをさらに明らかにするために，体内脂質への取り込み量を100とした場合の各臓器脂質中の放射能分布（表7）を検討した。C群における筋肉の場合を除いて，A, B, C 群で各臓器中への取り込みに大きな差異は認められないが，D群では腸への取り込みが増大し，逆に腸以外の臓器への取り込みは低下した。

Table 7. *Distribution of radioactivity in plasma, muscle, and other organs of carp 6 hr after palmitic acid-1-^{14}C intubation.*

	A group (n=5)	B group (n=5)	C group (n=3)	D group (n=5)
Body	100	100	100	100
Intestine	70.1±5.5	71.7±5.1	73.4 ±10.1	83.7[c]±2.9
Plasma	5.6±2.1	6.2±2.4	5.0 ± 3.6	4.9 ±2.4
Hepatopancreas	7.7±2.1	7.7±2.4	8.0 ± 3.6	4.5[b]±1.5
Muscle	8.4±2.0	8.4±1.8	4.7[a]± 2.8	3.6[c]±1.4
Others	8.2±3.0	6.0±3.9	8.9 ± 3.5	3.2[c]±1.7

a) In comparison with the A group (control), P=<0.1
b) In comparison with the A group (control), P=<0.05
c) In comparison with the A group (control), P=<0.025

以上の事から，ビタミンE欠乏の上さらに酸化脂質を含む餌料を投与したコイでは腸への脂質吸収機構のみならず，吸収された脂質の他臓器への運搬機構にも障害が起っているものと考えられる。

次に血しょうの各脂質画分における ^{14}C の分布を表8に示す。TG 中の割合はA群に比べ B, C, D 群でやや減少し，逆に PL, PG, FFA 中の割合は若干増大する傾向がみられた。

肝すい臓の各脂質画分における ^{14}C の分布を表9に示す。B, C, D 群では対照のA群に比べ TG 中の割合が減少し，逆に PL 中の割合が増大した。PG と FFA 中の割合の合計では対照のA群に比べ B, C, D 群でいずれも増大する傾向がみられた。

Table 8. *Distribution of radioactivity in the lipid class of carp blood plasma 6 hr after palmitic acid-1-^{14}C intubation.* (% *of total dpm*)

Lipid class	A group	B group	C group	D group
Phospholipid	2.9±1.9	4.3±3.0	4.4±6.1	6.1±3.6
Partial glyceride	2.9±0.6	4.2±3.3	5.4±2.7	4.8±1.9
Free fatty acid	6.0±3.0	9.1±5.6	7.6±2.8	6.1±3.5
Triglyceride	89.1±4.4	82.2±10.4	82.8±3.9	83.0±6.9

Table 9. *Distribution of radioactivity in the lipid class of carp hepatopancreas 6 hr after palmitic acid-1-^{14}C intubation.* (% *of total dpm*)

Lipid class	A group	B group	C group	D group
Phospholipid	26.1±6.0	36.0[b]±2.8	39.9[b]± 3.3	46.4[b]± 4.0
Partial glyceride	12.5±1.7	8.1 ±2.1	17.1 ±10.0	10.7 ± 5.1
Free fatty acid	9.6±4.6	15.6 ±8.3	6.7 ± 5.0	11.2 ± 6.3
Triglyceride	51.8±8.8	40.3[a]±5.4	35.7[b]± 0.2	31.7[b]±11.4

a) In comparison with the A group (control), P=<0.05
b) In comparison with the A group (control), P=<0.025

このことより，肝すい臓ではビタミンE欠乏飼料投与の場合と酸化脂質投与の場合では互いに類似した脂質代謝異常が起るものと考えられる。

体重増加率，体重/体長比はA群，C群，B群，D群の順に低下しており，脂質の体内への取り込みもそれに比例する関係が認められ，脂質の吸収能と体重増加率および体重/体長比との間に関連性があるものと考えられる。すなわち，腸における脂質吸収能の低下の程度に比例して栄養代謝障害がすすみ，そのことが成長の阻害を惹き起こす原因となっていると考えられる。

さらにコイにおける脂質の吸収ならびに体内分布の面から酸化脂質投与とビタミンE欠乏飼料投与の場合を比較してみると，明らかに両者間ではコイ臓器脂質代謝に異なった影響を及ぼすことが認められる。酸化脂質投与の場合には主として腸に障害が現われ，脂質吸収能の低下，取り込まれた脂肪酸のTG, PLへの生合成系の障害を惹き起こすのに対し，ビタミンE欠乏飼料投与の場合は主として肝すい臓における脂質代謝系に影響を及ぼすものと考えられる。

謝　　辞

本研究にあたり種々有益な御助言，御援助をいただいた食品化学第一講座羽田野六男助教授，高間浩蔵博士に感謝するとともに，コイを分与された本学部七飯養魚施設久保達郎助教授，コイの飼育に際して御協力いただいた発生学遺伝学講座中西照幸氏，精製大豆油を提供された旭油脂KK樋口譲氏に謝意を表します。

文　　献

1) 飯島憲章・座間宏一 (1978). 酸化脂質の魚類脂質代謝に及ぼす影響 I. 酸化脂質投与によるコイ臓器脂質の変動. 北大水産彙報 **23**, 159–169.
2) Bragdon, J.H. (1960). Method for determination of total serum lipid, Lipids and the steroid hormones in clinical medicine. 9, Lippincott. Philadelphia and Montreal.
3) Kayama, M. and Tsuchiya, Y. (1959). Fat metabolism in the fish II. Intestinal absorption and distribution study of oil in the carp, *Cyprinus carpio* LINNE. *Tōhoku J. Agr. Res.* **10**, 229–236.
4) Kayama, M. and Iijima, N. (1976). Studies on lipid transport mechanism in the fish. *Bull. Jap. Soc. Fish.* **42**, 987–996.
5) 舟橋三郎・原　一郎・山川民夫 (1972). 脂質 2, 468 p, 共立出版株式会社. 東京.
6) Robinson, J.H. and Mead, J.F. (1973). Lipid absorption and deposition in rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Canad. J. Biochem.* **51**, 1050–1058.