アロキサン糖尿および四塩化炭素障害ラットの 副睪丸脂肪組織におけるリノール酸および γ -リノレン酸の変換について

三好 康夫*

《要約》 Alloxan 糖尿 (以下Ⅱ群), 四塩化炭素障害 (以下Ⅲ群), および alloxan 糖尿に四塩化炭素障害を合併した rat (以下Ⅳ群) を作成し, その副睪丸脂肪組織における linoleic acid および γ -linolenic acid のエステル化および他脂酸, 特に arachidonic acid への変換について比較検討した.

各群の rat からとり出した副睪丸脂肪組織を $1\text{-}^{14}\text{C}$ linoleic acid および $1\text{-}^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid を含む Krebs bicarbonate buffer c 300mg % glucose の中で 37°C , 2時間 incubate した. 脂質を抽出したのち thin layer chromatography にて phospholipid (PL) と triglyceride (TG) を分離しおのおのヘエステル化した標識脂酸の絶対量を測定した. PL と TG への脂酸はさらに gas chromatography によって分離し, 個々の脂酸への変換率をしらべた. ^{14}C の計測には liquid scintillation spectrometer を用いた.

両標識脂酸と incubate した場合, PL および TG への標識脂酸のエステル化の絶対量は両分画ともコントロール群 (以下Ⅰ群) に比較してⅡ, Ⅳ群において平均値で50%, あるいはそれ以上の低下をみた. また, 一般に PL に比し TG へのエステル化が強く障害される傾向があった. しかし, Ⅰ群とⅢ群の間にはほとんど差がなかった. $1\text{-}^{14}\text{C}$ linoleic acid と incubate した場合, PL にエステル化された全標識脂酸のうち 20 : 4 の占める割合は1%前後であり各群間で著明な差はなかった. しかし, 20 : 3 における比率はⅡ, Ⅳ群で増加する傾向があった. また, 病態Ⅲ群ではⅠ群に比し18 : 3 の比率は低下し, 逆に, 18 : 3 ~ 20 : 3 での比率は増加していた. TG 分画では約90%が18 : 2にとどまり, 変換脂酸の比率はわずかであった. $1\text{-}^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid と incubate した場合, PL 分画においては約70%が18 : 2にとどまり残りが他の脂酸へ分布していた. 20 : 4 への分布値はⅠ群で平均12%, Ⅱ群7%, Ⅲ群4%, Ⅳ群7%であるのに反して, 20 : 3 ではⅠ群5%, Ⅱ群9%, Ⅲ群7%, Ⅳ群9%と両脂酸で鏡面像を呈した. TG 分画では約80%が18 : 2にとどまり, 変換脂酸の比率は少なく, 各群の間にもほとんど差がなかった.

以上の成績は両病態時の脂肪組織における必須脂酸の代謝異常を反映しており, 特に, arachidonic acid の生成が強く障害されていると考えられた.

I. 緒 言

linoleic acid, arachidonic acid 等の高級不飽和脂酸は単なる組織細胞の構成々物としてよりはむしろ細胞の正常な機能を維持する脂質として, また最近では Prostaglandin の前駆物質としても注目されており, その生理学的意義についても次第にその重要性が解明されつつある. 一方, 高等動物におけるこれら ω 6 系高級不飽和脂酸の母体は主として食事に含まれる linoleic acid であり, すでにMeadらにより解明されたごとく, 生体内で desaturation および elongation をうけて, すなわち γ -linolenic acid および homo- γ -linolenic acid を経て arachidonic acid に変

換されると考えられている. さらに, これら脂酸の変換は alloxan 糖尿病^{1)~3)}, 肝障害時等^{4)~7)} に強く障害されると言われ, また食事条件その他による代謝調節についても多くの報告^{8)~14)} がみられる. 著者¹⁵⁾ もすでに人の血液細胞を用いて糖尿病および肝硬変患者における linoleic acid の変換異常について報告した. また, 近年脂質代謝における脂肪組織の重要性が明白化したところから, 著者は rat 脂肪組織を用いて linoleic acid およびその不飽和化物質である γ -linolenic acid の代謝を alloxan 糖尿病および四塩化炭素障害時において比較検討することは意義のあることと考えて以下の実験を行なった.

II. 実験方法

体重 200~300g の Sprague-Dowley 系雄性 rat を4群に分け, 以下のごとく処置して実験に用いた.

* Y. Miyoshi 岡山大学第1内科

受付 :

本論文の要旨は第12回日本老年医学会総会において発表した.

1) コントロール群(以下Ⅰ群と略す):

実験3日前に体重100gあたり0.5mlの流動パラフィンを腹腔内に注入した。

2) アロキサン糖尿群(以下Ⅱ群と略す):

体重1kgあたり150mgのalloxan monohydrateを腹腔内に注入し、3～4日後に尿糖が陽性であることを確かめた後、1日2～4単位のlente insulinを皮下注射し、約2週間飼育後、実験3日前に1)と同量の流動パラフィンを腹腔内へ注入した。

3) 四塩化炭素障害群(以下Ⅲ群と略す):

実験3日前に20%四塩化炭素流動パラフィン溶液を体重100gあたり0.5mlの割合で腹腔内へ注入した。

4) アロキサン糖尿、四塩化炭素障害合併群(以下Ⅳ群と略す):

2)と同様に作成したalloxan糖尿ratに3)と同じ処置を行なった。

全実験期間を通じてOriental固型飼料と水を自由に摂取させたが、屠殺時におけるratの条件については表1に示した。使用ratは各群6匹とした。実験に際してはratの頭部を強打し、頸動脈から脱血、ただちに副睾丸脂肪組織の周辺部から100mg程度の2片の組織片を切りとり、生理的食塩水で洗ったのち、それぞれを300mg/dlのglucoseを含むKrebs-bicarbonate buffer (pH 7.4) 2mlの中で10%牛血清アルブミン(Armour社製, bovine albumin, Fraction V)にsuspendした1μCiの $1\text{-}^{14}\text{C}$ linoleic acid (sp. act. 57.0mCi/mM)または3μCiの $1\text{-}^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid (sp. act. 20.0mCi/mM)とともに95% O_2 +5% CO_2 の気相中で、37°C、2時間incubateした。incubation終了後、chloroform-methanol (2:1) 液中で脂肪組織を充分すりつぶした後、Folchらの方法¹⁶⁾により脂質を抽出し、水洗した。つづいてthin layer chromatographyにより分画し、phospholipid (以下PLと略す)とtriglyceride (以下TGと略す)をそれぞれmethanolとethyl-etherにて抽出し、各々をBjörntorpの方法¹⁷⁾に準じて2時間けん化した。その後栗井らの方法¹⁸⁾に準じて不けん化脂質を除去し、塩酸添加後脂酸を抽出した。抽出脂酸はさらに水洗後一部を計測用vialにとり、残りはMetcalf & Schmitz¹⁹⁾の方法でメチル化し、gas chromatographyによって個々の脂酸に分画し、それぞれの分画をsilicone処理したfilterに採取してliquid scintillation spectrometer

Table 1. Summaries of experimental animals

Rats	Body Weight (g)	Dietary* Intakes	Blood (mg	Sugar %)	Serum Jaundice	Serum GPT
Control (I)	1	240	20.0	116	—	77
	2	250	20.0	130	—	142
	3	278	13.1	126	—	93
	4	248	13.9	134	—	145
	5	242	13.3	133	—	131
	6	248	13.3	137	—	149
Alloxan (II)	7	230	20.0	276	—	147
	8	242	20.0	370	—	121
	9	190	5.0	153	—	75
	10	230	14.8	205	—	71
	11	240	14.0	230	—	84
	12	250	15.0	451	—	124
CCl ₄ (III)	13	290	17.8	134	—	760
	14	250	4.2	123	+	870
	15	296	7.3	121	—	2670
	16	244	10.0	139	—	615
	17	256	6.1	97	+	1170
	18	290	5.0	108	—	191
Alloxan+CCl ₄ (IV)	19	204	14.8	276	—	197
	20	230	0	99	+	1500 ↑
	21	254	7.3	118	—	1090
	22	240	11.5	169	+	819
	23	266	0	268	+	1300
	24	158	5.8	380	+	1450

* The amount (g) taken in the 1st and 2nd days before sacrifice.

によりそれらの放射能を測定した。なお、個々の脂酸の同定は既知標準脂酸の保持時間から判定した。

III. 実験成績

1. PLおよびTGにエステル化された標識脂酸の絶対量について

1) $1\text{-}^{14}\text{C}$ linoleic acid と incubate した場合:

$1\text{-}^{14}\text{C}$ linoleic acid に由来する標識脂酸の絶対量を ^{14}C の脂肪組織単位湿重量あたりの1分間の崩壊数 (dpm/mg tissue) についてみると、表2aに示すごとく、PL分画においてはⅠ群 538 ± 114 (M±SE) に対し、Ⅲ群は 403 ± 133 と軽度の減少しか認めなかったのに反し、Ⅱ群とⅣ群ではそれぞれ 293 ± 79 , 237 ± 53 とⅠ群に比し、平均値において約50%の低下が認められた。一方、TG分画においてもPL分画と同様、Ⅰ群 $2,493 \pm 374$ 、Ⅱ群 996 ± 156 、Ⅲ群 $1,959 \pm 379$ 、Ⅳ群 614 ± 160 とⅠ群に比し、Ⅱ、Ⅳ群では50%以上のエステル化の低下が認められた。したがって、やはりⅢ群での低下は軽度すぎなかった。また、平

均値の TG/PL 比では I 群 4.63 に比し, II, III, IV 群においてはそれぞれ 3.40, 4.86, 2.59 であり, これが低値を示す II, IV 両群では PL 分画に比し, TG へのエステル化の低下がより著明であることが確かめられた.

2) $1\text{-}^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid と incubate した場合:

$1\text{-}^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid に由来する標識脂酸の絶対量も表 2b に示すごとく linoleic acid の場合とほぼ同様の傾向を示し, PL 分画においては I 群 $1,170 \pm 224$, II 群 615 ± 69 , III 群 $1,131 \pm 161$, IV 群 542 ± 143 であり, II, IV 群では I 群に比しそれぞれ 50% 程度に減少していた. しかし, III 群では低下が認められなかった. 一方, TG 分画でも I 群 $4,863 \pm 534$ に比し, II 群 $2,142 \pm 232$, III 群 $4,359 \pm 722$, IV 群 $2,337 \pm 669$ と II, IV 群において 50% 以上の減少がみられた. しかしこの場合も III 群における低下は軽度であった. また, 平均値の TG/PL 比では I 群 4.16 に対し, II 群 3.48, III 群 3.85, IV 群 4.32 と II 群における TG へのエステル化のより著明な低下が認められた.

2. PL および TG にエステル化された個々の標識脂酸の%分布について

1) $1\text{-}^{14}\text{C}$ linoleic acid と incubate した場合:

PL および TG にエステル化された各標識脂酸の%分布値をみると, 表 3a, b に示すように PL 分画では平均値において 62~70% が 18:2 にとどまり, 18:3 はほぼ 5~8% を占め, 20:3 や 20:4 の占める比率は 3% 以下と低比率であった. また保持時間が 18:3~20:3 の脂酸群では 7~13%, 20:4 以上の長鎖脂酸群では 12~15% を占め, 18:2 以下の脂酸群にも 2% 以下の比率で分布した. 一方 TG 分画では平均値で 86~92% が 18:2 にとどまり, 逆に他の脂酸および脂酸群では PL 分画に比し低比率であった.

つぎに PL 分画標識脂酸の%分布値を対象各群間で比較すると, 表 3a に示すごとく, もとの脂酸 18:2 は I, III 群に比し, II, IV 群で低下傾向がみられ, 変換されたもののうち 18:3 では I 群 $8.19 \pm 0.91\%$ に比し, II 群 $6.70 \pm 1.22\%$, III 群 $4.97 \pm 0.71\%$, IV 群 $5.98 \pm 0.64\%$ と低下し, 特に III 群は有意の低下であった. また 20:3 では I 群 $1.68 \pm 0.28\%$ に比し, II 群では $3.16 \pm 0.67\%$ と有意に高く, IV 群も $2.35 \pm 0.52\%$ と増加傾向を認めた. 一方,

Table 2a. Absolute incorporation (dpm/mg tissue) of labeled fatty acids derived from $1\text{-}^{14}\text{C}$ linoleic acid in PL and TG fractions (M $\pm$ SE) () = Percentage of group I

	Control (I)	Alloxan (II)	CCl ₄ (III)	Alloxan+CCl ₄ (IV)
PL	538 ± 114 (100.0)	293 ± 79 (54.5)	403 ± 133 (74.9)	237 ± 53 P-1<0.05 (44.1)
TG	$2,493 \pm 374$ (100.0)	996 ± 156 P-1<0.01 P-3<0.05 (40.0)	$1,959 \pm 379$ (78.6)	614 ± 160 P-1<0.01 P-3<0.01 (24.6)
TG/PL	4.63	3.40	4.86	2.59

P-1: Comparison with group I

P-3: Comparison with group III

Table 2b. Absolute incorporation (dpm/mg tissue) of labeled fatty acids derived from $1\text{-}^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid in PL and TG fractions (M $\pm$ SE) () = Percentage of group I

	Control (I)	Alloxan (II)	CCl ₄ (III)	Alloxan+CCl ₄ (IV)
PL	$1,170 \pm 224$ (100.0)	615 ± 69 P-1<0.05 P-3<0.02 (52.6)	$1,131 \pm 161$ (96.7)	542 ± 143 P-3<0.05 (46.3)
TG	$4,863 \pm 534$ (100.0)	$2,142 \pm 232$ P-1<0.01 P-3<0.02 (44.0)	$4,359 \pm 722$ (89.6)	$2,337 \pm 669$ P-1<0.02 (48.1)
TG/PL	4.16	3.48	3.85	4.32

P-1: Comparison with group I

P-3: Comparison with group III

20:4 では I 群 $1.29 \pm 0.20\%$ に比し, III 群 $0.60 \pm 0.08\%$ と有意の低下をみたが他の 2 群には変化が認められなかった. さらに 18:3 から 20:3 の間に分布する脂酸群では I 群 $7.56 \pm 1.36\%$ に対し, 他の 3 群は増加傾向を示し, 特に IV 群では $12.62 \pm 1.85\%$ と有意の高値を示した. しかし保持時間 20:4 以上や 18:2 以下の脂酸群には各群間に差異は認められなかった.

つぎに TG 分画標識脂酸の%分布値を対象各群間で比較すると, 表 3b にみるごとく約 90% が 18:2 にとどまり, 約 10% が他の脂酸に変換されたにすぎなかった. そのためほとんどの脂酸では対象 4 群間に有意差がみられなかったが, 18:3 では I 群 $4.68 \pm 0.37\%$ に比し, II 群 $2.83 \pm 0.46\%$, III 群 $2.56 \pm 0.43\%$, IV 群 $3.06 \pm 0.53\%$ と何れも有意の低下を示した.

2) $1\text{-}^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid と incubate した場合:

Table 3a. Percentage of recovered cpm in discrete fatty acids derived from 1-¹⁴C linoleic acid in PL (M±SE)

	<18:2	18:2	18:3	18:3-20:3	20:3	20:4	20:4<
Control (I)	1.73±0.07	66.87±2.85	8.19±0.91	7.56±1.36	1.68±0.28	1.29±0.20	12.68±1.45
Alloxan (II)	1.52±0.17	62.32±1.61	6.70±1.22	10.44±1.16	3.16±0.67	1.38±0.24	14.47±1.47
CCl ₄ (III)	1.81±0.32	69.87±2.05	4.97±0.71	9.73±1.18	1.80±0.42	0.60±0.08	12.02±1.34
Alloxan + CCl ₄ (IV)	1.40±0.10	62.44±2.97	5.98±0.64	12.62±1.85	2.35±0.52	1.41±0.20	13.57±1.11

P-1: Comparison with group I

P-2: " II

P-3: " III

P-4: " IV

Table 3b. Percentage of recovered cpm in discrete fatty acids derived from 1-¹⁴C linoleic acid in TG (M±SE)

	<18:2	18:2	18:3	18:3-20:3	20:3	20:4	20:4<
Control (I)	0.91±0.23	88.66±0.32	4.68±0.37	1.50±0.34	0.28±0.05	0.16±0.08	3.99±0.20
Alloxan (II)	0.55±0.11	89.21±1.22	2.83±0.46	1.22±0.37	0.12±0.06	0.05±0.03	5.84±0.94
CCl ₄ (III)	0.49±0.15	91.87±1.01	2.56±0.43	1.04±0.26	0.26±0.13	0.06±0.03	3.85±0.74
Alloxan + CCl ₄ (IV)	0.52±0.12	86.94±2.05	3.06±0.53	1.30±0.22	0.19±0.07	0.31±0.20	7.69±1.73

P-1: Comparison with group I

P-3: " III

PL, TG にエステル化された標識脂酸の% 分布値は表 4 a, b に示すごとく, その平均値でみると, PL 分画ではもとの 18:3 が 65~72% を占め, 変換脂酸の 20:3 はほぼ 5~9%, 20:4 は 4~13%, また保持時間 18:3 から 20:3 の間の脂酸群はほぼ 4~6%, 20:4 以上の群は 8~11% を占め, 18:3 以下の脂酸群にも 2.5% 以下の比率に分布した. 一方 TG 分画の場合は 79~82% と多くの部分が 18:3 にとどまり, 逆に他の変換脂酸や脂酸群では保持時間 18:3 以下の 2~4% と 18:3~20:3 の 5~7% の 2 つの脂酸群を除き一般に 1) の場合と同様 PL 分画での分布値に比して低比率であった.

つぎに PL 分画標識脂酸の% 分布値を対象各群間で比較すると, 表 4 a に示すごとく, 18:3 はいずれも 70% 程度で各群間に有意差がみられなかったが, 20:3 では I 群

4.94±0.90% に比し, II 群 9.07±1.05%, III 群 7.12±0.89%, IV 群 8.88±0.68% といずれも増加を示し, 特に II, IV 群での増加は有意であった. これに反し, 20:4 では I 群 13.01±1.83% に対し, II 群 6.69±0.28%, III 群 4.22±0.82%, IV 群 6.96±1.22% といずれも有意の低下を示し, III 群の低下は II 群に対しても有意であった. また 18:3~20:3 の脂酸群では, I 群 4.32±0.70% に比し, III 群 6.49±0.61% と有意の増加を認めたが他の 2 群に有意差は認められなかった. 一方, 保持時間 18:3 以下および 20:4 以上の脂酸群でも I 群に比して有意の変化はみられなかった.

ついで TG 分画標識脂酸の対象各群間の% 分布値の比較では, 表 4 b に示すように各群とも約 80% が 18:3 に

とどまっており、変換脂酸の比率は PL 分画のそれに比して低く、しかも各脂酸において対象各群間に有意差は認められなかった。

IV. 総括ならびに考案

著者はすでに糖尿病および肝硬変患者の血液細胞を stearic acid および linoleic acid と共に incubate しこれら両疾患に類似した脂酸代謝上の異常がみられることを報告した¹⁵⁾が、今回はさらに脂肪組織における linoleic acid と γ -linolenic acid の変換とそのエステル化を、特にそれらの arachidonic acid への変換を中心として、実験方法の項で述べた4群の rat について比較しようと試みた。

rat 脂肪組織を ^{14}C 標識脂酸と incubate した場合、単位組織重量あたりにエステル化された標識脂酸量は当然のことながら PL に比して TG にはるかに多く認められた。

$1\text{-}^{14}\text{C}$ linoleic acid と incubate した場合、4群間における比較では PL, TG 分画ともに I, III 群に比して II, IV 群でエステル化が著明に抑制されていた。さらに、PL および TG 分画中における個々の標識脂酸の分布は 18:2 にとどまるものが PL 脂酸では約 65%, TG では約 90% を占め、その他が、表3のごとく広い分布を示した。すなわち、エステル化の特異性としては TG では 18:2 がそのほとんどを占め、他の脂酸は少量であったのに反し、PL では保持時間 18:3 以上の脂酸も比較的多くエステル化されていた。つぎに対象各群間における比較では、PL, TG とも I 群に比し、II, IV 群では 18:3 の分布値が低下傾向を示し、さらに、PL 分画においては 20:3 の分布値が II, IV 群において逆に高値を示し、また 18:3~20:3 の脂酸群でも II, III, IV 群では I 群に比しやや高値であることが注目された。

つぎに、 $1\text{-}^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid と incubate した場合、その PL, TG へのエステル化は linoleic acid の場合と同様に、I, III 群に比して II, IV 群では強く障害されていた。一方、PL および TG 分画における各標識脂酸のエステル化の特異性については表4に示すごとく、18:3にとどま

Table 4a. Percentage of recovered cpm in discrete fatty acids derived from $1\text{-}^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid in PL ($\text{M}\pm\text{SE}$)

	<18:3	18:3	18:3-20:3	20:3	20:4	20:4<
Control (I)	1.75 $\pm$ 0.16	68.03 $\pm$ 3.19	4.32 $\pm$ 0.70	4.94 $\pm$ 0.90	13.01 $\pm$ 1.83	10.48 $\pm$ 1.36
Alloxan (II)	2.13 $\pm$ 0.58	65.30 $\pm$ 3.51	5.77 $\pm$ 0.73	9.07 $\pm$ 1.05 P-1<0.01	6.69 $\pm$ 0.28 P-1<0.01	11.10 $\pm$ 1.42
CCl ₄ (III)	2.44 $\pm$ 0.28	71.63 $\pm$ 1.19	6.49 $\pm$ 0.61 P-1<0.05	7.12 $\pm$ 0.89	4.22 $\pm$ 0.82 P-1<0.001 P-2<0.05	7.89 $\pm$ 0.53 P-2<0.05
Alloxan + CCl ₄ (IV)	1.79 $\pm$ 0.38	70.16 $\pm$ 2.65	3.95 $\pm$ 0.48 P-3<0.02	8.88 $\pm$ 0.68 F-1<0.01	6.96 $\pm$ 1.22 P-1<0.05	8.20 $\pm$ 1.41

P-1: Comparison with group I

P-2: " II

P-3: " III

Table 4b. Percentage of recovered cpm in discrete fatty acids derived from $1\text{-}^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid in TG ($\text{M}\pm\text{SE}$)

	<18:3	18:3	18:3-20:4	20:3	20:4	20:4<
Control (I)	2.96 $\pm$ 0.55	82.00 $\pm$ 0.77	6.10 $\pm$ 0.38	4.19 $\pm$ 0.35	1.04 $\pm$ 0.22	3.72 $\pm$ 0.36
Alloxan (II)	2.91 $\pm$ 0.33	79.54 $\pm$ 2.10	6.27 $\pm$ 0.62	4.07 $\pm$ 1.01	1.10 $\pm$ 0.27	5.96 $\pm$ 0.90
CCl ₄ (III)	2.23 $\pm$ 0.31	81.81 $\pm$ 1.24	6.32 $\pm$ 0.37	3.15 $\pm$ 0.27	0.92 $\pm$ 0.21	5.57 $\pm$ 1.16
Alloxan + CCl ₄ (IV)	3.53 $\pm$ 1.16	81.21 $\pm$ 2.44	5.31 $\pm$ 0.62	4.51 $\pm$ 0.88	1.21 $\pm$ 0.27	4.24 $\pm$ 0.78

るものが PL 分画で約 70%, TG 分画では約 80% を占め、残りが他の変換脂酸であった。また、PL 分画において 20:3, 20:4 および 20:4<の分布値が TG 分画に比し高値をとることが注目された。また、各群間における比較では、TG 分画では4群間に著明な差はみられなかったが、PL 分画においては 20:3 の分布値がコントロール群に比し病態各群で高値を示し、特に II, IV 群で著明であった。これに反し、20:4 では I 群に比し II, III, IV 群における%分布値は有意の低下を示した。

II, IV 群における脂酸のエステル化の低下は、一部 lipolysis の亢進による組織内 FFA pool の増大による影響を無視出来ないため、これらの成績がただちに PL および TG の合成低下を反映しているとは考えられない。しかし、alloxan 糖尿病のように insulin が絶対的に欠乏した状態においては当然組織での α -glycerophosphate や ATP の生成は低下しているとみられ、特に脂肪組織における脂酸のエステル化がこれらに依存することからも、うえの成績は脂肪組織における脂質合成の低下の影響と思われる。一

方, III群においてはそのエステル化の面でI群との間にはほとんど差がみられなかった. 四塩化炭素の脂肪組織におよぼす影響については明らかではないが, 四塩化炭素による肝障害は電顕的にはまず rough endoplasmic reticulum に現われると言われており²⁰⁾, 一方, lecithin や TG 合成の最終段階は microsome で行なわれている²¹⁾ことから, 肝における同様の変化が脂肪組織でもおこるとすれば, III群においても当然 PL および TG の合成は低下すると考えられる. しかし, 急性および慢性四塩化炭素障害 rat 脂肪組織の解糖系酵素活性はほとんど変化をうけていないという成績²²⁾, さらに, Solodokowski らによると²³⁾, 慢性四塩化炭素障害 rat 脂肪組織における $1\text{-}^{14}\text{C}$ ethanol の脂酸および非ケン化脂質へのとりこみはかえって亢進しているという成績からみて, 四塩化炭素によっては脂肪組織の脂質合成はそれほど障害されないことも予想され, このことはIII群でエステル化の障害が軽度でしかなかった著者の成績とも一致する. しかし, 今回の実験が四塩化炭素投与後 72 時間という比較的時間の経過した時点で行なわれたことなどさらに検討を要するが, 後に述べる多価不飽和脂酸の合成は明らかに障害されていると考え合せ, 興味ある成績である.

必須脂酸の変換については Mead らによってほぼ明らかにされ, さらに Marcel ら¹²⁾ も述べているごとく rat 肝における linoleic acid から arachidonic acid に至る経路は主として $18:2\omega6 \rightarrow 18:3\omega6 \rightarrow 20:3\omega6 \rightarrow 20:4\omega6$ であり, 一部 $18:2\omega6 \rightarrow 20:2\omega6 \rightarrow 20:3\omega6 \rightarrow 20:4\omega6$ も認められ, その割合は rat の状態によりある程度変化することが知られている. ところで, 今回の実験における変換脂酸の%分布値の意味については, 先の論文で述べたごとく¹⁵⁾, 種々の反応の平衡の上に表現された値であり, 必ずしも各段階の変換速度を表現するとは考えにくい, かかる値の変化は薬物処理群における何らかの脂酸の変換異常を反映したものと考えられる. 今回の実験では, linoleic acid, γ -linolenic acid の場合とも TG 脂酸の各群間における差異が PL 脂酸におけるほど明白ではなかったが, $1\text{-}^{14}\text{C}$ linoleic acid と incubate した場合 PL の脂酸においては, $18:3$ の分布比は II, III, IV 群で低下傾向にあり, 特に III 群に著明で, $18:3 \sim 20:3$ の脂酸群では逆に I 群に比し増加傾向を認めた. また, $20:3$ の分布比は II, IV 群で高い傾向がみられ, $20:4$ では III 群で特に低下していた. 一方, $1\text{-}^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid と incubate した場合の PL 分画では $20:3$ および $20:4$ における変化がさらに著明になった. linoleic acid の場合に $18:3$ と $18:3 \sim 20:3$ の分布比がコントロール群と病態群で逆になったことは, Marcel らの fat free diet 投与 rat microsome における成績¹²⁾に鑑み, linoleic acid の desaturation が抑制された結果 $18:2\omega6 \rightarrow 20:2\omega6$ の反応が増加

した結果とも考えられる. 同様に, γ -linolenic acid の場合に $20:3$ と $20:4$ の%分布値が同じような鏡面像を呈したことは, $20:3\omega6$ の desaturation が抑制された結果と考えられる. さて, これら病態時における主として肝での $\omega6$ 系脂酸の代謝に関しては, 多くの報告がある, すなわち, Friedman ら¹⁾ は alloxan 糖尿 rat 肝における in vivo の成績で $18:2\omega6$ から $20:4\omega6$ への変換の低下を報告し, Mercuri ら²⁾ も同じ alloxan 糖尿 rat 肝 microsome を用いた in vitro の実験で $18:2\omega6$ から $18:3\omega6$ への変換の低下と insulin による回復を指摘し, さらに Brenner ら³⁾ はこの insulin による不飽和化反応の回復が actinomycin D によって阻止されることを報告している. 一方, 肝障害においても, ethionine 脂肝 rat を用いた実験で ^{14}C 標識 linoleic acid の γ -linolenic acid, あるいは arachidonic acid への変換は著明に障害されていること⁴⁾⁵⁾, また, 肝硬変症患者では血漿 arachidonic acid 構成比の低下がみられ linoleic acid の投与によっても回復しないこと⁷⁾ が確かめられている. そのほか $\omega6$ 系脂酸の変換に関与する因子として, 食事条件⁸⁾⁹⁾, 下垂体ホルモン¹⁰⁾ 同時に存在する他の脂酸¹¹⁾, ATP¹³⁾, aging 等¹⁴⁾ が報告されている. このように脂酸の代謝調節機構は複雑であるため, 今回脂肪組織においてみられた $\omega6$ 系脂酸の変換異常の発現機序については明らかではないが, 従来の肝, その他の組織での報告にみられたのと類似した異常が alloxan 糖尿, さらに四塩化炭素障害時の脂肪組織においてもみられたことは興味あることと思われた.

さて, γ -linolenic acid は必須脂酸の代謝経路の上で linoleic acid より arachidonic acid に一段階近いというだけでなく, Marcel ら¹²⁾ による必須脂酸の変換速度を検討した成績では $18:2\omega6 \rightarrow 18:3\omega6$ に比して, $18:3\omega6 \rightarrow 20:3\omega6$ への変換速度がきわめて早いことを認めており, 当然 linoleic acid に比較して γ -linolenic acid の方が容易に arachidonic acid へ変換されることが予想される. しかし, 今回の成績から考えて alloxan 糖尿のみならず四塩化炭素障害 rat 脂肪組織における linoleic acid および γ -linolenic acid からの arachidonic acid の生成はともに強く障害されているとみられ, このことは γ -linolenic acid を餌として投与した四塩化炭素障害 rat 肝において arachidonic acid の量的変化を検討した小川の成績⁶⁾とも一致していた.

V. 結論

alloxan 糖尿, 四塩化炭素障害およびその両者による同時障害 rat を作成し, その副辜丸脂肪組織における in vitro での linoleic acid および γ -linolenic acid の変換とそれらの燐脂質ならびに中性脂肪へのエステル化について比較検討し以下の成績が得られた.

1. $1-^{14}\text{C}$ linoleic acid あるいは $1-^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid からの磷脂質 (PL) および中性脂肪 (TG) への標識脂酸のエステル化の絶対量は、両分画ともコントロール群に比し alloxan 糖尿群および alloxan 糖尿、四塩化炭素障害合併群において平均値で約 50% あるいはそれ以上の低下をみたが、四塩化炭素障害のみの群ではコントロール群との間にほとんど差は認められなかった。また一般に PL に比し TG へのエステル化が強く障害される傾向があった。

2. 脂肪組織を $1-^{14}\text{C}$ linoleic acid と incubate した場合、PL にエステル化された全標識脂酸のうち 20: 4 の占める割合は非常に少なく、コントロール、alloxan 糖尿、四塩化炭素障害合併群ともに 1.3~1.4% で、四塩化炭素障害のみの群では 0.6% と低下していた。これに反し、20: 3 の比率は alloxan 糖尿および alloxan、四塩化炭素障害合併群で増加する傾向にあり、これらの群における 20: 3 の desaturation の障害が示唆された。その他、病態 3 群では 18: 3~20: 3 の脂酸群の占める比率は増加する傾向を認めた。TG 分画では約 90% が 18: 2 にとどまり、エステル化された変換脂酸はわずかであった。

3. $1-^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid と incubate した場合、PL 分画において各群とも約 70% が 18: 3 にとどまり、残りが他の脂酸に変換されていたが、20: 4 の占める分布比はコントロール群で 12%, alloxan 糖尿群で 6.7%, 四塩化炭素障害群で 4.2%, alloxan 糖尿、四塩化炭素障害合併群で 7.0% とコントロール群に比し病態群で有意に低下していた。逆に、20: 3 においてはコントロール群に比し増加傾向を示し、特に alloxan 糖尿群で著明であった。すなわちこの場合にもやはり 20: 3 の desaturation の障害が示唆される成績であった。一方、TG 分画においては、18: 3 の分布比が約 80% を占め変換脂酸の比率は少なく、各群の間にもほとんど差が認められなかった。

ご教示、ご校閲をいただいた小坂淳夫教授に深く感謝する。また直接ご指導いただいた岡山大学山吹隆寛助教授ならびに熊本大学医学部第 3 内科教室高野俊男講師に深謝する。

§ 文 献

- 1) Friedman, N. et al.: Synthesis of arachidonic acid from linoleic acid in vivo in diabetic rats, *Israel J. Med. Sci.* **2**:677, 1966.
- 2) Mercuri, O. et al.: Depression of microsomal desaturation of linoleic to γ -linolenic acid in the alloxan diabetic rat, *Biochim. Biophys. Acta* **116**:409, 1966.
- 3) Brenner, R.R. et al.: Effect of arachidonic acid in the alloxan diabetic rat, *Am. J. Physiol.* **215**:

63, 1968.

- 4) 深沢俊男, 高橋善弥太: 肝傷害における脂酸動態について(第 2 編) 一傷害肝でのアラキドン酸生成一, *肝臓* **9**:485, 1968.
- 5) Lyman, R.L. et al.: Inhibition of desaturation of stearic acid in livers of rats fed ethionine, *Lipids* **5**: 585, 1970.
- 6) 小川智之: 肝傷害時の脂質代謝に関する研究 (第 2 編) 四塩化炭素障害ラット肝におけるリノール酸および γ -リノレン酸のアラキドン酸生成効果および脂肪肝抑制作用について, *岡山医誌*, **83**:103, 1967.
- 7) 平山和之: 各種肝疾患における血清磷脂質について, *日消誌*, **64**:187, 1967.
- 8) Nerva, I. et al.: Effect of diet on linoleic acid desaturation and on some enzymes of carbohydrate metabolism, *J. Lipid Res.* **11**:96, 1970.
- 9) Peluffo, R.O. et al. The activating effect of dietary protein and on linoleic acid desaturation, *Lipids* **7**:363, 1972.
- 10) 中村真己: 脂酸の代謝, *代謝* **7**:150, 1970.
- 11) Brenner, R.R.: Reciprocal interactions in the desaturation of linoleic acid into γ -linolenic acid and eicosa-11, 14-trienoic into arachidonic, *Lipids* **4**:621, 1969.
- 12) Marcel, Y.L. et al.: The preferred metabolic pathway from linoleic acid to arachidonic acid in vitro, *Biochim. Biophys. Acta* **164**:25, 1968.
- 13) Brenner, R.R. & Catala, A.: Effect of ATP on the microsomal desaturation of unsaturated fatty acids, *Lipids* **6**:873, 1971.
- 14) Brenner, R.R.: The desaturation step in the animal biosynthesis of unsaturated fatty acids, *Lipids* **6**: 567, 1971.
- 15) 三好康夫: 糖尿病患者の全血における長鎖脂酸の変換について一肝硬変症患者との異同を中心として一, *日老医誌*, **10**:332, 1973.
- 16) Folch, J. et al.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* **226**:497, 1957.
- 17) Björntorp, P.: Polyunsaturated fatty acids in man. Serum, cutaneous and subcutaneous levels in individuals with normal and elevated serum lipids, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **12**: (Suppl. 52):1, 1960.
- 18) 栗井弘二: 糖尿病の脂肪酸代謝異常一その研究法, 病型による差異および異常発生機序の考察一, *綜合臨床* **17**:549, 1968.

- 19) Metcalfe, L. D. & Schmitz, A. A.: The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis, *Anal. Chem.* **33**:363, 1961.
- 20) Smucker, E. A. et al.: An intracellular defect in protein synthesis induced by carbon tetrachloride, *J. Exp. Med.* **116**:55, 1962.
- 21) Willgram, G. F. & Kennedy, E. P.: Intracellular distribution of some enzymes catalyzing reactions in the biosynthesis of complex lipids, *J. Biol. Chem.* **238**:2615, 1963.
- 22) 田中昭 : 未発表.
- 23) Solodokowski, W. et al.: Ethanol metabolism in adipose tissue from rats chronically exposed to CCl_4 in vitro oxidation to CO_2 and incorporation into fatty acids and insaponifiable fraction, *Med. exp.* **18**:331, 1968.

Abstract

Studies on the conversion of linoleic acid and γ -linolenic acid in adipose tissue from rats treated with alloxan or carbon tetrachloride

Yasuo Miyoshi*

Conversion of $1\text{-}^{14}\text{C}$ linoleic acid and $1\text{-}^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid, and their esterification into phospholipids and triglycerides, were determined in adipose tissue in vitro by using epididymal fat pad from 4 groups of rats, normal, alloxan diabetic, CCl_4 treated, and both alloxan and CCl_4 treated rats. The results were discussed in special reference to conversion of these labeled fatty acids to arachidonic acid. The results were as follows.

1) The esterification of labeled fatty acids derived from $1\text{-}^{14}\text{C}$ linoleic acid and $1\text{-}^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid to phospholipids and triglycerides showed decrease by more than 50% in the groups of rats treated with alloxan or both alloxan and CCl_4 as compared with normal rats. However, no significant difference was found between normal group and CCl_4 treated group. It was also found in those rats treated with alloxan or both alloxan and CCl_4 that the decrease in esterification of fatty acids is stronger in triglycerides than in phospholipids.

2) When fat pad was incubated with $1\text{-}^{14}\text{C}$ linoleic acid, the percentage of recovered cpm in 20 : 4 in phospholipids was found to be very low, showing 1.3—1.4% in the groups of normal, alloxan diabetic and both alloxan and CCl_4 treated rats, and particular low value of 0.6% was found in the group of CCl_4 treated rats. On the

contrary, the percentage of recovered cpm in 20 : 3 showed increase in 2 groups of rats treated with alloxan and both alloxan and CCl_4 . And this results might suggest the disturbed desaturatuon of 20 : 3 in adipose tissue of these rats. While, the percentage of recovered cpm in 18 : 3 showed some decrease in 3 groups of rats treated with alloxan, CCl_4 , and both alloxan and CCl_4 . Conversely, the percentage distribution of 18 : 3—20 : 3 showed increase in the same 3 groups. On the other hand, in triglycerides fraction the percentage of recovered cpm in 18 : 2 occupied approximately 90% and percentage distribution of other fatty acids showed very low value.

3) When adipose tissue was incubated with $1\text{-}^{14}\text{C}$ γ -linolenic acid the percentage of recovered cpm in 18 : 3 showed approximately 70% in phospholipid fraction of all groups of rats and the rest of the labeled fatty acids distributed in wide range. The percentage of recovered cpm in 20 : 4 was found to be 12% in normal group, 6.7% in alloxan treated group, 4.2% in CCl_4 treated group, respectively. The decrease found in 3 pathologic groups was significant as compared to normal group.

On the contrary, the recovered cpm in 20 : 3 showed increase in these 3 pathologic groups, particularly in 2 groups treated with alloxan and both alloxan and CCl_4 . It is considerable from this results that the desaturation of 20 : 3 is disturbed in this case too in alloxan

* The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School, Okayama (Director: Prof. Kiyowo Kosaka)

groups. On the other hand, the percentage distribution of original 18:3 in triglycerides fraction occupied approximately 80%, so that the percentage of other labeled fatty acids were low in every 4 groups, moreo-

ver, no special difference was found in the percentage distribution of individual fatty acid among 4 groups of rats.