正・負荷重及びアロキサン投与のこいの脂質, 特にワックス・エステルに及ぼす影響

鹿山 光・万倉三正・池田 康行

広島大学水畜産学部 (広島県福山市緑町 2-17)

Effects of Plus and Minus Loads and Alloxan induced Diabetes on the Wax Ester of Carp Lipids

Mitsu KAYAMA, Mitsumasa MANKURA, and Yasuyuki IKEDA

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima
University (2-17 Midori-machi, Fukuyama-shi, Hiroshima-ken)

Carp of about 10 g weight were grouped and treated as follows, 1) removing swimbladder, 2) loading with lead belt, 3) stressed with laparotomy and vinyl belt, 4) loading with float, and 5) unloaded control. They were fed the diets supplemented with 1-hexadecanol, palmitic acid, and hexadecyl palmitate for 10, 20, and 30 d. The concentration ratio of wax esters (WE) to triglycerides (TG) were increased significantly in the plus loaded group and decreased in the minus loaded group in comparison to the stress and control groups. In either case the tendencies of ratios were $1 > 2 > 3 = 5 > 4$ with a few exceptions in the case of palmitic acid supplement.

The diabetic carps induced with alloxan donation were characterized by the liberation of free fatty acids and by the significant increase of WE against the reciprocal decrease of TG comparing to the controls. The higher incorporation of $[1-^{14}\text{C}]$ acetic acid into WE in the swimbladderectomized carp and that of $[1-^{14}\text{C}]$ 1-hexadecanol in the hepatopancreas homogenate of diabetic carp were observed, respectively. The relationship of the two lipid classes, namely WE and TG, seems to be regulated by the hydrostatic conditions concerning the buoyancy and through the metabolism of the ester counterparts of fatty acids.

1 緒 言

海産動物におけるワックス・エステル (WE) の分布に関し、前報までに魚卵とくにばら卵¹⁾、相模・駿河湾産のマイクロネクトン魚類²⁾及びマイクロネクトンえび類³⁾、甲殻類プランクトン⁴⁾の脂質について報告するとともに、これら動物プランクトン、マイクロネクトン及び海洋微生物による WE の生合成⁵⁾についても報告してきた。これらの研究結果はエネルギー代謝における WE の重要性⁶⁾を示すだけでなく、比重の小さい WE (比重、約 0.86)⁷⁾を生体中に保有することは海洋動物にとって合目的であることを示唆するものである。すなわち、WE は生態的に海洋動物の生息水温、生息深度、垂直移動等に関係し、また機能的に浮力獲得、エネルギー源、断熱効果等の役割を果たしていると考えられる。

本研究はこいに対して正・負の荷重を加え、WE 含量と浮力獲得の関係を吟味するとともに、こいに対しアロ

キサンを投与した場合の糖代謝異常条件下における脂質、とくに WE 含量に及ぼす影響を検討した。さらに、それら条件下での ^{14}C 標識アセタート及び 1-ヘキサデカノールの WE への取り込み、飼料中に添加したパルミチン酸、ヘキサデカノール、パルミチン酸ヘキサデシルの WE 含量へ与える影響等をあわせて検討したので報告する。

2 実験と結果

2.1 正・負荷重のこい脂質に及ぼす影響

実験魚として体重約 10~14 g のこい *Cyprinus carpio* を用い、エタノール、ジエチルエーテルでそれぞれ還流脱脂した配合飼料 (養鯉育成用ペレット No. 5, 日本配合飼料株式会社) を基本飼料とし、これにパルミチン酸ヘキサデシル、1-ヘキサデカノール及びパルミチン酸をそれぞれ 5% 添加した三区に分けて飼育した。各飼育区とも (1) 浮袋の摘出手術、(2) 体重の 5% の鉛荷重、(3)

Table-1 Carp grouping, biological measurement and lipid content.

Group		10-d feeding			20-d feeding		
Addition to basal diet	Treatment	Standard body length* (cm)	Body weight* (g)	Lipid content** (%)	Standard body length* (cm)	Body weight* (g)	Lipid content** (%)
Hexadecyl palmitate	1 Removal of swimbladder	11.0 (10.4)	11.3 (11.0)	5.9	9.3 (9.0)	17.2 (16.5)	3.0
	2 Load	8.5 (8.3)	12.0 (12.0)	1.9	8.0 (8.0)	13.0 (12.0)	1.4
	3 Stress	7.8 (7.5)	9.0 (9.0)	1.4	7.7 (7.5)	8.5 (8.0)	1.3
	4 Float	7.3 (7.3)	7.1 (7.0)	1.6	7.7 (7.5)	7.3 (7.0)	1.5
	5 Control	7.5 (7.3)	9.1 (8.9)	2.6	7.5 (7.0)	8.9 (7.0)	2.0
1-Hexadecanol	1 Removal of swimbladder	9.9 (9.8)	18.8 (18.0)	3.0	10.0 (9.8)	18.5 (17.0)	3.0
	2 Load	7.5 (7.3)	7.5 (7.0)	2.8	8.5 (8.0)	11.0 (10.0)	2.1
	3 Stress	9.0 (8.5)	12.0 (12.0)	1.6	8.2 (8.1)	11.3 (10.0)	2.4
	4 Float	7.2 (7.0)	9.4 (9.0)	2.0	8.0 (7.7)	9.2 (7.0)	1.9
	5 Control	8.3 (8.0)	13.0 (12.3)	2.0	8.5 (8.0)	12.3 (9.0)	1.6
Palmitic acid	1 Removal of swimbladder	8.2 (8.0)	11.5 (11.0)	2.0	9.0 (8.5)	12.5 (11.0)	2.4
	2 Load	7.5 (7.5)	8.0 (7.7)	1.7	7.3 (7.3)	7.4 (7.0)	1.4
	3 Stress	7.0 (7.0)	7.0 (7.0)	1.6	8.0 (7.5)	8.0 (8.0)	1.4
	4 Float	7.5 (7.5)	9.0 (9.0)	2.3	7.6 (7.6)	6.4 (6.0)	1.5
	5 Control	7.3 (7.6)	8.3 (7.1)	1.8	8.8 (8.5)	13.5 (12.0)	1.4

* Initial data of biological measurements are shown in parentheses.

** Wet weight basis.

Table-2 Effects of plus and minus loads on the lipid class composition of carp fed on diets supplemented with hexadecyl palmitate, 1-hexadecanol and palmitic acid.

Addition to basal diet	Feeding day	Code of treatment*	Lipid class in per cent			Ratio (WE/TG) × 100
			WE (SE)	TG	Others	
Hexadecyl palmitate	10	1	6.4	33.9	59.7	18.8
		2	3.5	42.2	54.3	8.3
		3	1.8	62.9	35.3	2.9
		4	1.3	47.6	51.1	2.8
		5	1.8	48.2	50.0	3.7
	20	1	13.7	33.6	52.7	40.7
		2	4.8	51.6	43.6	9.3
		3	1.8	73.5	24.7	2.4
		4	0.9	57.8	41.3	1.6
		5	1.4	64.3	34.3	2.1
	30	1	15.0	30.5	54.5	49.2
		2	5.5	50.0	44.5	11.0
		3	4.0	65.0	31.0	6.2
		4	3.0	73.5	23.5	4.1
		5	4.0	64.2	31.8	6.2
1-Hexadecanol	10	1	7.5	29.5	63.0	25.4
		2	6.2	61.3	32.5	10.1
		3	1.3	66.8	31.9	1.9
		4	0.9	66.3	32.8	1.4
		5	1.1	51.7	47.2	2.1
	20	1	10.0	34.1	55.9	29.3
		2	2.0	60.0	38.0	3.3

Palmitic acid	20	3	0.7	66.8	32.5	1.1
		4	1.2	67.4	31.4	1.7
		5	1.2	70.2	28.6	1.7
	30	1	12.0	35.0	53.0	34.3
		2	6.0	36.0	58.0	16.7
		3	2.6	50.0	47.4	5.2
		4	2.0	60.5	37.5	3.3
		5	2.8	56.0	41.2	5.0
	10	1	6.3	21.9	71.8	28.8
		2	5.4	38.8	55.8	14.0
		3	1.3	33.8	64.9	3.8
		4	0.4	56.1	43.5	0.7
		5	0.8	54.7	44.5	1.5
	20	1	4.0	67.4	28.6	5.9
		2	3.6	53.2	43.2	6.8
		3	1.0	60.8	38.2	1.5
		4	1.0	71.1	27.9	1.4
		5	0.7	82.3	17.0	0.8
	30	1	6.0	50.0	44.0	12.0
		2	4.4	50.5	45.1	8.7
		3	1.4	60.7	37.9	2.3
		4	1.0	70.0	29.0	1.4
		5	1.4	62.0	36.6	2.3

* 1, Removal of swimbladder; 2, Load; 3, Stress; 4, Float; 5, Control. Abbreviations: SE, sterol esters; WE, wax esters; TG, triglycerides; Others, free fatty acids+free fatty alcohols+free sterols+partial glycerides+phospholipids.

ストレス、(4) 体重の5%の浮き等の処理を施し、さらに無処理の(5)対照を設け、20℃の恒温水そう中で10、20、30 dの飼育実験を行った。こいの浮袋の摘出は、0.01% MS 222 (三共株式会社)による麻酔後、開腹して行い、直ちに手術用絹糸で縫合し、消毒して完了した。水そうにもどすと、魚は頭部を斜め上方に向けて、底面から浮き上がろうとする行動を示した。魚体重の5%に相当する正荷重の負荷は、Malinsら⁸⁾の方法に準じて脇腹に鉛板を巻きつけて行われた。それらは浮袋摘出魚によく似た行動を示した。魚体重の5%に相当する負荷重は、発ぼうスチロールをビニル製のひもでしばり、その一端を脇腹に巻きつけることによって行われた。これらの魚は頭部を斜め下方に向け、浮力に逆らって泳ぐような行動を示した。一方、開腹後縫合して脇腹へのビニル装着は、魚体への正・負荷重の添加という刺激、ストレスの影響を検討するため行ったが、その游泳行動は無処理の対照魚と比較して特に変化はなかった。また、飼育に際しては1 d 当たり魚体重の4%に相当するそれぞれの飼料を朝夕の2回に分けて与え、試験尾数は各飼育区当たり105尾ずつ(すなわち、各処理区7尾ずつ)とした。

各処理区の10及び20 d後の成長、脂質含量の平均値をTable-1に示す。パルミチン酸ヘキサデシルを投与した区においては、実験終了時の魚体重の増加率は飼料の種類とか正・負荷重等の処理法の違いによって有意な差はみられず、個体差程度であった。1-ヘキサデカノール、パルミチン酸を投与した区においても、パルミチン酸ヘキサデシル投与の場合と同じく処理法の違いによる有意な差はみられなかった。

次に、これら試験魚の脂質の組成について検討した結果をTable-2に示す。全魚体中からの脂質の抽出は、Bligh及びDyerの方法⁹⁾に準拠して行い、各脂質クラスはジエチルエーテル-石油エーテル-氷酢酸(12.5:87.5:1, vol/vol/vol)で薄層クロマトグラフで展開後、重クロム酸カリウム飽和70%硫酸を噴霧し、110~120℃で焦化後デンシトメーター (Ozumor Densitometer, 明日香工業株式会社, Model 82)によって測定した。パルミチン酸ヘキサデシル、1-ヘキサデカノールを投与した区においてWEの組成比は各処理区とも飼育期間が10、20、30 dと長くなるにしたがい増加する傾向を示した。正の荷重として浮袋摘出、鉛装着の処理を施した区においてはトリアシルグリセリン (トリグリセリド, TG)の組成比が対照と比較して減少し、WEの増加する傾向が認められた。負の荷重としての発ぼうスチロールを装着したこいにおけるWE含量は、対照に比べ幾らか減少した傾向を示し、ストレスだけを与えたものでは対照のものとはほとんど変わらなかった。したがって、TGに対するWEの比率、(WE/TG)×100、を比較するとい

ずれの区においても、浮袋摘出>鉛荷重>ストレス=無処理(対照)>浮きの順に減少する傾向を示した。

各飼料区で10 d飼育後の浮袋摘出魚の脂質をTLCで展開後、2'-7'-ジクロロフルオレセインをプレートに噴霧し、紫外線下にWE部分を検出してはぎ取り、得られたWEを前報⁹⁾に記載した方法に準じてガスクロマトグラフによって分析した。その結果をTable-3に示す。いずれの区においてもC₃₂が最も多く、パルミチン

Table-3 Composition of wax ester separated from the lipids of carp fed on different supplements for 10 d.

Wax ester (Carbon chain-length)	Diets supplemented with		
	Hexadecyl palmitate	1-Hexa- decanol	Palmitic acid
30	6.1	Tr.	Tr.
31	14.5	19.8	10.3
32	50.4	42.3	47.9
34	29.0	37.9	41.8
36	Tr.	—	—

酸ヘキサデシル投飼区で50.4%、1-ヘキサデカノール投飼区で42.3%、パルミチン酸投飼区で47.9%であった。次いでC₃₄が多く、またC₃₁という奇数炭素数のものも認められた。

浮袋摘出魚と対照魚におけるWEの合成速度を比較検討するため、体重約10 gのこいの浮袋を摘出し、7 d脱脂飼料で飼育した後、[1-¹⁴C]酢酸ナトリウム(250 μCi)を腹こう内に注入し、6 h後こいから全脂質を抽出してTLCで分離後、前報⁹⁾の方法に準じて放射能のWE中への取り込みを測定した。その結果、Table-4に示されるように[1-¹⁴C]酢酸ナトリウムのWEへの

Table-4 Incorporation of [1-¹⁴C] acetic acid into wax ester and other lipid classes by swimbladderectomized and controlled carp.

Treatment	Radioactivity incorporated into various lipid classes (%)		
	WE	TG	PL
Removal of swimbladder	24.9	42.2	32.9
Control	20.8	57.1	22.1

Abbreviations: WE, wax esters; TG, triglycerides; PL, phospholipids.

取り込みは、浮袋摘出魚で24.9%、対照で20.8%、同じくリン脂質(PL)へはそれぞれ32.9%、22.1%であり、無処理の対照魚よりも浮袋摘出魚の方がWE合成割合の高いことをみた。

2.2 アロキサン投与のこい脂質に与える影響

TG, WE合成の関係を検討するため、別報¹⁰⁾で述べた方法に準拠して背大動脈カニューレーションを施した体重約1 kgのこいの背大動脈中へ1 mlの生理食塩水に

溶解した 250 mg のアロキサン (和光純薬工業株式会社) を注入し、20°C の恒温水そう中で 10 d 飼育後、各組織の脂質クラス組成をみた。血中グルコースは O-TB キット (片山化学工業株式会社) を用いて定量した。アロキサン注入後、対照に比べて血糖値は約 20 mg/dl 上昇し、糖尿病の症状を示した。Table-5 に示されるように、アロキサン糖尿病においては対照と比較して遊離脂肪酸 (FFA) が肝、すい臓、筋肉また腸などの組織において組成比として上昇した値を示した。WE の組成比も腸において増加がみられたが、他の組織においては変化がみられず、TG, PL 等への影響もみられなかった。

Table-5 Lipid class composition of various tissues of alloxan induced diabetic and controlled carp.

Specimen	Tissue	Lipid class in per cent			
		WE (DAGE & SE)	TG	FFA	Others
Diabetic carp	Hepatopancreas	16.9	30.8	17.7	34.6
	White muscle	7.6	41.8	18.5	32.1
	Intestine	18.8	35.1	18.1	28.0
	Plasma	36.3	13.6	6.4	43.7
Control	Hepatopancreas	17.4	46.8	1.7	34.1
	White muscle	9.7	46.8	3.2	40.3
	Intestine	2.4	34.4	2.4	60.8
	Plasma	40.7	28.3	8.4	22.6

Abbreviations: WE, wax esters; DAGE, diacyl glyceryl ethers; SE, sterol esters; TG, triglycerides; FFA, free fatty acids; Others, free fatty alcohols+free sterols+partial glycerides+phospholipids.

さらに、体重約 500 g のこいに 5% 1-ヘキサデカノールを添加した飼料を 3 週間与えた後、0.5 ml の生理食塩水に溶解した 125 mg のアロキサンを腹こう内に注射し、さらに 1 週間後、肝すい臓、筋肉、血しょうの脂質クラスをみた結果を Table-6 に示す。アロキサン注射により血糖値は前実験と同じく約 20 mg/dl 上昇した。肝すい臓、筋肉中の WE は糖尿病においてはそれぞれ 9.1,

Table-6 Lipid class composition of hepatopancreas, muscle and plasma of alloxan induced diabetic and controlled carp.

Tissue	Specimen	Lipid class in per cent.		
		WE (SE)	TG	Others
Hepato-pancreas	Diabetic carp	9.1	79.9	11.0
	Control	5.0	87.5	7.5
Muscle	Diabetic carp	7.9	70.4	21.7
	Control	4.3	76.7	19.0
Plasma	Diabetic carp	43.7	40.3	16.0
	Control	34.2	30.2	35.6

Abbreviations are as for Table-2.

7.9%, 対照ではそれぞれ 5.0, 4.3% を示し、組成比として糖尿病の方が約 2 倍弱増加していた。一方、TG は両組織において対照の方がやや多くみられた。血しょう脂質については WE (コレステロール・エステルを主成分として含む) は糖尿、対照魚においてそれぞれ 43.7, 34.2% の値を示し、筋肉、肝すい臓における場合と同じ様な傾向を示した。

糖尿病における WE 合成活性をみるため、上記と同様な処理を施したこいの肝すい臓ホモジネートによる [1-¹⁴C] 1-ヘキサデカノールの WE 中への取り込みをみた。すなわち、氷冷下で取り出した肝すい臓に 2 倍量の 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) を加えてホモジナイズ後、約 10,000×g で 10 min 遠心分離し、その上澄み液 3 ml に [1-¹⁴C] 1-ヘキサデカノール (1 μCi), Triton X-100 (5.0 mg) を添加し、30°C で 90 min インキュベートした。2 倍量のクロロホルム-メタノール混液 (2:1) 添加によって反応停止後、脂質を抽出して放射能を測定した。その結果は Table-7 に示されるように、糖尿病においては対照と比較して約 2 倍の WE 合成活性がみられ、FFA 画分においても放射能が認められた。

Table-7 Incorporation of [1-¹⁴C] 1-hexadecanol into wax ester by hepatopancreas homogenate of diabetic and controlled carp.

Specimen	Distribution of radioactivity (%)		
	WE	FFA	FAL
Diabetic carp	26.3	5.2	68.5
Control	12.9	8.1	79.0

Abbreviations are as for Table-5 except for FAL, fatty alcohols.

3 考 察

Lee ら^{11), 12)} は WE を多量に含有している動物プランクトン、*Euchaeta norvegica*, などを飢餓状態において、WE と TG 含量の経日的変化を観察し、生体中の脂質含量の低下にともなって WE と TG がともに減少する傾向をみた。このことは多くの陸上ほ乳動物と異なり、海産かい脚類等の海洋生物が TG のみならず WE をもエネルギー源として利用していることを示している。また Malins ら⁹⁾ はあぶらつのだめ *Squalus acanthias* に体重の約 4% の鉛錘を装着し 50 h 飼育後、肝臓中のジアシルグリセリルエーテル (DAGE) と TG 含量の変化を対照と比較して、DAGE の割合、DAGE/TG が大きく増加したことから、これを鉛装着という正の荷重に対する浮力獲得のための適応とみた。

こいを用いた本実験において一般に正荷重、とくに浮袋摘出区で脂質含量の増加がみられたこと、飼育日数が長くなるにともない組成比として WE が増加し TG が減少したこと、また逆に負荷重を加えた区では対照と比

較して WE が減少したこと、浮袋摘出魚において WE 合成速度が増加していることなどは、いずれもこれらの魚類において WE が浮力獲得のために積極的に合成され、その機能を果たしていることを強く示唆するものであろう。はだかいわしの浮袋と魚体比重の関係¹³⁾が論じられているように、浮袋摘出魚において WE が増加する結果を得たことは大変興味深い。また、WE の増加ないしは減少にともなって TG の減少あるいは増加がみられたことは、両者の間に相補的關係^{9), 12)}が存在していると理解される。こい肝すい臓ホモジネートを用いた *in vitro* の研究 (未発表) において長鎖アルコールの存在下に TG から WE へのアシル基転移反応の起こることが認められており、両者の関係を示しているものと思われる。

一般に、アロキサン投与はすい臓ランゲルハンス氏島の β 細胞を破壊してインシュリンの生成を阻害し、糖尿病をひき起こすことになる。ほ乳動物が糖尿病状態になると肝臓、筋肉、脂肪組織等においてインシュリンが不足してブドウ糖の解糖作用が抑えられ α -グリセロリン酸の生成が少なくなり、その結果として TG 合成量も減少する。本実験でのアロキサン投与による糖尿ごいにおいて、TG 合成量が減少したことはこれと同様な機作が働いたことを裏づけている。一方、WE の組成比は TG の減少に伴って増加しており、WE と TG の相補的關係において TG が減少すると、それを代償するような合目的な機作が作動し、 α -グリセロリン酸が減少する過程において WE 合成が促進され、魚体中の WE が増加するであろうと推察される。糖尿ごいの各組織における FFA の増加は、糖代謝異常の条件下におけるエネルギー確保のため、貯蔵脂質である TG が分解し、FFA の動員が活発になっていることを示している。このような糖尿ごいに WE 合成の際 FFA の対化合物となるヘキサデカノールを投与した場合、WE が増加したことは、こいにおける WE 合成の律速因子の一つが長鎖アルコールの生成にあることを示している。

Sargent ら¹⁴⁾はかい脚類の *Euchaeta norvegica* のホモジネートを用い、長鎖アルコールの存在下で TG の合成が著しく阻害されるのに対し、WE 合成が促進されることをみており、長鎖アルコールが TG 合成の際に要求されるアシルアクセプターと競合する可能性を指摘している。こい肝すい臓における TG 合成酵素と WE 合成酵素が同一なものかどうかについては、なお今後の検討を要するが、かい脚類においてアミノ酸、グルコース、脂肪酸等からの WE 合成が嫌氣的条件下で活発になることから、細胞内における NADH/NAD 比の増大と WE 合成系との関係についても論じており¹⁵⁾、本研究の結果はかい脚類同様にこいにおいても嫌氣的条件下¹²⁾では TG 合成よりも WE 合成が優先している可能性を示すものと理解される。 (昭和 53 年 5 月 24 日受理)

文 献

- 1) 鹿山 光・堀井郁夫・池田康行, 油化学, **23**, 290 (1974)
- 2) 鹿山 光・池田康行, 油化学, **24**, 435 (1975)
- 3) 鹿山 光・中川平介, 油化学, **24**, 441 (1975)
- 4) 鹿山 光・池田康行・小牧勇蔵, 油化学, **25**, 329 (1976)
- 5) 鹿山 光・池田康行・万倉三正, 油化学, **26**, 398 (1977)
- 6) R.F. Lee, *Mar. Biol.*, **9**, 99 (1971)
- 7) R.W. Lewis, *Lipids*, **5**, 151 (1970)
- 8) D.C. Malins, A. Barone, *Science*, **167**, 79 (1970)
- 9) E.G. Bligh, W.J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911 (1959)
- 10) M. Kayama, N. Iijima, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **42**, 987 (1976)
- 11) R.F. Lee, *Comp. Biochem. Physiol.*, **52B**, 265 (1975)
- 12) R.F. Lee, J.C. Nevenzel, A.G. Lewis, *Lipids*, **9**, 891 (1974)
- 13) J.L. Butler, W.G. Pearcy, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **29**, 1145 (1972)
- 14) J.R. Sargent, R.R. Gatten, R. McIntosh, *Comp. Biochem. Physiol.*, **47B**, 217 (1974)
- 15) J.R. Sargent, R.F. Lee, J.C. Nevenzel, "Chem. Biochem. Nat. Waxes" (P.E. Kolattukudy, ed.) Elsevier, Amsterdam. (1976) p. 49