中鎖脂肪酸の腸管吸収にかんする実験的研究 特に吸収時の腸粘膜内再エステル化について

京都府立医科大学第三内科学教室（指導 増田 正典教授）

馬 場 忠 雄

REESTERIFICATION OF MEDIUM CHAIN TRIGLYCERIDES IN MUCOSAL CELLS DURING THEIR INTESTINAL ABSORPTION.

Tadao BAMBA

Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural

University of Medicine, Kyoto, Japan.

(Director: Professor Masasuke Masuda)

概要 近年、脂肪の消化吸収と腸粘膜代謝にかんする研究の進歩により脂肪吸収障害の病態生理が明らかになつて、吸収不良症候群の治療に新しい脂肪源として中鎖脂肪が注目されてきた。ところが中鎖脂肪の腸管吸収の様相およびその際の腸粘膜代謝の基礎的研究、とくに中鎖脂肪の長鎖脂肪へのエステル化の機構についてはまだ解明されていない。著者はラットのeverted sacを標識オクタノイン酸とともにincubateしてその腸粘膜代謝を検討した。incubateしたのち腸粘膜より脂質を抽出してカラムクロマトグラフィーにて各分画に分け、そのトリグリセリド分画をラジオガスクロマトグラフィーにて分析した。標識オクタノイン酸はトリグリセリド分画にオクタノイン酸のままで長鎖脂肪酸グリセリドとエステル化して存在した。またこのトリグリセリドの腓リパーゼによる水解でオクタノイン酸はグリセロールの1, 3部分の両方あるいはそのどちらかにエステル化されていると推定した。

I. 緒 言

脂肪はそれを構成する炭素原子の数により腸管吸収の様式を異にすることは、Bloom¹⁾やBorgström²⁾により明らかにされた。最近、さらに中鎖脂肪(MCT: C₈₋₁₀)と長鎖脂肪(LCT: C₁₄・or more)の腸管内での消化や腸粘膜および体内での代謝や循環についての差がいろいろと解明されてきた³⁾⁴⁾。一般に食事中にふくまれるLCTは消化管内でリパーゼの作用を受けモノグリセリド

(MG)および脂肪酸(FFA)に分解され、両者はさらに胆汁酸と結合してミセルを形成し、腸粘膜細胞にとりこまれ、そこで再びトリグリセリド(TG)に合成され、カイロミクロンとなつて胸管リンパを通つて運搬される。

MCTはLCTの場合と異なりその吸収に腓リパーゼや胆汁の存在をそれほど必須とせず、腸管腔内で水解されてFFAとして腸粘膜細胞に吸収され、また一部はMCTのまま吸収され粘膜内リパーゼで水解され、いずれにしてもほとんどFFAとして門脈血中に吸収される⁵⁾。

このようなMCTの特徴によりMCTが吸収不良症候群と総称される疾患群、とくにβリポプロ

〔昭和45年7月9日受稿〕

（本論文の要旨は第9回日本ファイトーブ会議および第7回日本臨床代謝学会シンポジウムで発表した）

テイン欠乏症や腸粘膜リンパ路に障害のある場合、あるいはまた胆汁や胆汁の欠乏する場合において新しい脂肪源として注目されている⁶⁾。

ところでMCTの腸管吸収の詳細や、とりわけその際の腸粘膜代謝については未解決の問題がいくつか残されている。この方面の研究者が現在最も関心をもっているのは、吸収されたMCTが腸粘膜内でエステル化をうけるかということである。この点にかんしては、MCTがわずかではあるが、腸粘膜内で一部LCT分画に存在するとの報告もあり⁷⁾、著者らもこのことを確認しすでにその一部を発表した⁸⁾。しかし、腸粘膜内で中鎖脂肪酸がLCTにとりこまれる機構にかんしては明らかでない。MCTにC₂-fragmentがついてelongationするのであるが、MCTが一度代謝されて再び合成されるのであるか、あるいはMCTがそのままの形で長鎖脂肪酸グリセリドの一部にとりこまれるのであるか、の三つの場合が考えられる。

著者は従来より脂肪の吸収について研究を進めて来たが、今回MCTがその吸収に際してLCTにとりこまれる機構を明らかにする目的をもって、ラットを用い、in vitroのeverted sac法、in vivoの結紮腸管法および十二指腸内投与法によつて、MCTの腸管吸収実験をおこない、その腸粘膜の脂質分析をおこなつた。腸粘膜より抽出した脂肪をケイ酸カラムクロマトグラフィー(SCC)で各分画に分け、そのTG分画をガスクロマトグラフィー(GLC)とラジオガスクロマトグラフィー(RGLC)とで分析した。さらにこのTG分画を腓リパーゼで水解して中鎖脂肪酸のエステル化しているLCTのグリセロールの位置を推定した。

II. 実験材料および実験方法

1. 実験動物およびeverted sacの作製

動物はWistar系雄ラットで体重120～150gのものを使用し、実験前24時間空腹とした。脂肪酸の前投与によるglycerol-1, 3-¹⁴CのTG分画へのとりこみの実験では、24時間空腹としたラットに

everted sac作製の1時間前に各脂肪酸を0.5mlずつ開腹して十二指腸内に投与した。everted sacの作製法は腹部正中切開により開腹して、小腸上部の腸管でWilson & Wiseman⁹⁾の方法に準じた。

1個のeverted sacは3～5cmとした。incubateしたのちeverted sacを氷冷の生食水で2～3回洗ったのち腸粘膜を剝離して、直ちに湿重量を秤量し、Folch液とともに海砂でホモゲナイズした。麻酔にはエーテルをもちいた。

2. 使用した¹⁴C標識化合物および試薬

Glycerol-1, 3-¹⁴C (Amersham, England製), sodium octanoate-1-¹⁴C (Amersham, England製), palmitate-1-¹⁴C (Amersham England製), trioctanoin-1-¹⁴C (New England Nuclear Corp. 製), tripalmitin-1-¹⁴C (Amersham, England製). 各標識化合物はcarrierとともに薄層クロマトグラフィーにて展開したが放射活性は90～95%であつた。なお使用した試薬はすべて特級であつた。

3. 試料からの脂肪抽出

脂肪抽出はFolch & Lees¹⁰⁾の方法でおこなつた。sodium octanoate-1-¹⁴Cは抽出時1規定の塩酸を加えてpH=3.0以下の条件でおこなつた。クロロホルム層の蒸発乾固はロータリーエバポレーターで室温でおこなつた。

4. 抽出脂質の分析

抽出した脂質はAmberlite IRA-400 OH typeでFFAをとりのぞき¹¹⁾、次いでシリカゲル(関東化学製100～200mesh)にてSCCを行ないステロールエステル(Chol. E), TG, ジグリセリド(DG), MG, 燐脂質(PL)の各分画に分けた¹²⁾。シリカゲル薄層クロマトグラフィー(TLC)はTLCプレート(Merck製と東京化成製20×20cm)を使用した。展開溶媒はn-ヘキサン57, ジメチルエーテル41, 氷酢酸2, (v/v/v)を用いて、0.01規定苛性ソーダに0.4%BTBをとかした溶液を噴霧してアンモニア蒸気で各脂質を検出した。この展開溶媒でMCTとLCTとは異なつたRf値を与える(Fig. 2.) TG分画を腓リパーゼで水解してMCTのエステル化している位置

を決定した実験では展開溶媒はジメチルエーテル55, クロロホルム5, n-ヘキサン40, 氷酢酸0.2, (v/v/v) とした. GLCは硫酸メタノール法にて脂肪酸のメチル化をおこない日立化学製K53形ガスクロマトグラフィーにて水素炎検出装置を付属させDEGS 10%クロモソルブWAW, 2mでキャリアガスは窒素で60~200°C, 10°C/minの昇温を使用した. RGLCはヤナコG8形ガスクロマトグラフィーに水素炎検出装置とラジオデテクター1型を付属させカラムはLAC-2R-446 25%クロモソルブWAW, 2.1mでキャリアガスはヘリウムとし100°Cでおこなった.

5. ^{14}C 放射活性の測定

抽出した脂肪はwheaton vial中にいれ乾固したのち, PPO-ジメチルPOPOP-トルエン10mlを加えてPackard社製Tricarb液体シンチレーションスペクトロメーターで測定した. なおクエンチングはAES ratio法にて補正した.

6. incubation mediaの調製

Incubation mediaを調製するにあたって, TG分画へのとりこみに対するincubation mediaの組成の影響を検討した.

1) グルコースおよびグリセロールの影響

Krebs Ringer bicarbonate buffer (KRB) (pH=7.4) 5 mlにglycerol-1,3- ^{14}C 1.25 μCi をいれてグルコース5mgあるいはグリセロール60 μg を加えたときの影響を1時間incubateして検討した.

2) CoAおよびATPの影響

2%ウシ血清アルブミン (Fraction V powder: Armour製) 加KRB buffer (pH=7.4) 5 mlにsodium octanoate-1- ^{14}C 2 μCi とオクタノイン酸9 μmole とグリセロール60 μg とを加えてできたmediumにCoA (Coenzyme A Grade I, Sigma製) とATP (ATP $\cdot$ 2Na Sigma Grade, Sigma製) をそれぞれ 10^{-4}M (終濃度) いれたときの影響を1時間incubateして検討した.

3) FFA: アルブミンmole比= $\bar{v}$ の影響

Medium中のFFAはアルブミンサスペンションにより均一化したが, アルブミン濃度を2%と

してmedium中のFFA濃度による影響を検討した. 2%ウシ血清アルブミン加KRB buffer (pH=7.4) 5 mlに対して $\bar{v}=0.5$ すなわち0.75 μmole , $\bar{v}=1.5$ すなわち2.5 μmole および $\bar{v}=5.5$ すなわち9 μmole のオクタノイン酸をそれぞれ添加し, そのおののにsodium octanoate-1- ^{14}C 2 μCi とグリセロール60 μg とATP 10^{-4}M およびCoA 10^{-4}M とを加えてincubateした.

7. オクタノイン酸 (MCFA) とオレイン酸 (LCFA) の前投与によるglycerol-1, 3- ^{14}C のTG分画へのとりこみの実験

1時間前にMCFAとLCFAを前投与したラットでeverted sacを作製し, KRB buffer (pH=7.4) 5 mlにglycerol-1, 3- ^{14}C 1.25 μCi とグリセロール60 μg とCoA 10^{-4}M , ATP 10^{-4}M とを加えて1時間incubateした.

8. palmitate-1- ^{14}C , trioctanoin-1- ^{14}C , tripalmitin-1- ^{14}C の腸粘膜へのとりこみの実験

パルミチン酸の腸粘膜へのとりこみは2%ウシ血清アルブミン加KRB buffer (pH=7.4) 5 mlにpalmitate-1- ^{14}C 1 μCi とパルミチン酸ソーダ9 μmole とグリセロール60 μg とCoA 10^{-4}M , ATP 10^{-4}M とを加えてincubateした. トリオクタノインの腸粘膜へのとりこみは10%ウシ血清アルブミン加KRB buffer (pH=7.4) 5 mlにtrioctanoin-1- ^{14}C 0.125 μCi とtrioctanoin 45 μmole とを加えて1時間incubateした. トリパルミチンの腸粘膜へのとりこみは10%ウシ血清アルブミン加KRB buffer (pH=7.4) 5 mlにtripalmitin-1- ^{14}C 0.1 μCi とtripalmitin 45 μmole とを加えて1時間incubateした.

9. 腸粘膜より抽出された標識オクタノイン酸をふくむTGの腓リパーゼによる水解の実験

標識オクタノイン酸をふくむTG 50mgに0.08M Tris buffer (pH=8.0) 4 mlと腓リパーゼ (Type II, Sigma製) 4 mgとタウロコール酸ナトリウム80mgと0.09M CaCl_2 とを加えて10分および30分間incubateした. またtrioctanoin-1- ^{14}C 50mgの水解も同じ条件で行なった. なお腓リパーゼをいれない

で30分間incubateしたものを対照とした。

10. incubationの条件

Incubationは25ml三角フラスコにそれぞれのmediumをいれeverted sacを3個いれて O_2 -95%, CO_2 -5%, 37°CのもとでDubnoffのmetabolic shakerでincubateした。各実験条件ごとに4個のフラスコによつて重複実験を行ない、その平均値を用いた。incubationの時間は5分、30分および60分とした。

11. 結紮腸管の実験

ラットの腹部を正中切開して、小腸上部腸管を約15cmの長さでその両端を結紮した。この結紮腸管に2%ウシ血清アルブミン加KRB buffer (pH = 7.4) 5 mlにsodium octanoate-1- ^{14}C 2 μCi とオクタノイン酸 9 $\mu mole$ とグリセロール60 μg とを加えたtest mealを注入して、同時にその領域の腸間膜静脈にいたカテーテルから静脈血を採取した。約10分間で失血状態となり、直ちに屠殺した。腸内容は生食水で3回洗い腸管壁と分け、吸収率および腸管残存率を算定した。また同時に腸粘膜内脂質分析を行なった。

12. 十二指腸内投与の実験

Test mealとしてsodium octanoate-1- ^{14}C 4 μCi とオクタノイン酸 0.5mlを少量のTween80とともに混和し、腹部を正中切開して十二指腸内に投与した。1時間後屠殺して腸内容は生食水で3回洗い腸管壁と分けた。吸収率および腸管残存率を算定して、腸粘膜について脂質分析をおこなった。

III. 実験成績

1. 腸粘膜とTG分画へのとりこみに対する incubation mediaの組成およびcofactorの影響

1) グルコースおよびグリセロールの影響 (Table 1 a).

Glycerol-1, 3- ^{14}C のTG分画へのとりこみはcarrierのグリセロールをいれないと非常に低下した。またグリセロールとグルコースを同時に加えてもグリセロールのみの場合よりも減少した。

2) CoAおよびATPの影響 (Table 1 b)

Table 1. Effect of composition of incubation media on the incorporation into triglyceride.

Substrates		$\mu g/wet\ weight$
glucose	5 mg	6.72
glycerol	(-)	
glucose	(-)	19.80
glycerol	60 μg	
glucose	5 mg	13.56
glycerol	60 μg	

Cofactors		$\mu g/wet\ weight$
CoA	> (+)	2.13
ATP	> (+)	
CoA	> (-)	2.08
ATP	> (-)

Fig. 1-a) Effect of $\bar{v}$ on the incorporation of sodium octanoate-1- ^{14}C into lipids of rat intestinal mucosa after incubation.

Fig. 1-b) Effect of $\bar{v}$ on the incorporation of sodium octanoate-1- ^{14}C into triglycerides of rat in testinal mucosa after incubation.

Sodium octanoate-1- ^{14}C の腸粘膜へのとりこみはCoAとATPをいれた方がいれない方より多いが、大きな差はなかつた。

3) FFA:アルブミンmole比= $\bar{v}$ の影響

Fig. 2. Thin-layer chromatography analysis of lipids after incubation of intestinal everted sacs of rats, prefed medium and long chain fatty acids, with glycerol-1,3-¹⁴C.

アルブミン濃度は2%に一定してmedium中のFFAの濃度を $\bar{v}=0.5$, $\bar{v}=1.5$, $\bar{v}=5.5$ と増加するにつれて腸粘膜へのsodium octanoate-1-¹⁴Cのとりこみは増加した (Fig. 1 a). 腸粘膜の脂質分析ではTG分画へのとりこみは逆にmedium中のFFAの濃度が増す程減少した (Fig. 1 b).

4) Incubationの時間の影響

Sodium octanoate-1-¹⁴Cは5分間のincubationによってすでに60分間incubationの30~50%が腸粘膜にuptakeされていた (Fig. 1 a). 腸粘膜の脂質分析の結果でも5分間でかなりの量がTG分画にとりこまれて、短時間でも十分エステル化されることをしめた (Fig. 1 b).

以上1)~4)の結果より、以後の実験はすべてmediumはKRB buffer (pH=7.4) にグリセロール60μgと10⁻⁴MのCoAとATPとを加えてFFA濃度は $\bar{v}=5.5$ とした。

Table 2. Distribution of radioactivity in lipid fractions in vitro and in vivo on silicic acid column chromatography.

1. everted sacs

incubation time	remaining in mucosa (μM/g)	distribution of radioactivity (%)								recovery (%)
		Sterolester	TG	Sterol	DG	MG	PL	FFA		
5'	1.00	0.4	206	0.3	0.4	0.7	0.4	77.1		33.3
30'	1.65	1.0	356	0.5	0.9	0.7	0.7	60.4		31.9
60'	1.79	0.6	409	0.5	0.9	0.4	4.4	56.1		42.4

2. tied loop

10' after administration	0.55	3.7	158	33	75	54	4.6	59.6		36.2
--------------------------	------	-----	-----	----	----	----	-----	------	--	------

3. in vivo

60' after administration	350	1.7	4.1	33	56	88	57	70.9		52.5
--------------------------	-----	-----	-----	----	----	----	----	------	--	------

2. Glycerol-1, 3-¹⁴CのMCFAおよびLCFAの前投与によるラットのeverted sacでのTG分画へのとりこみ (Fig. 2).

Glycerol-1, 3-¹⁴Cの腸粘膜脂質へのとりこみは脂肪酸を投与していないものでは20μg/gと低く, MCFAを前投与したものが一番多くとりこまれた。それぞれの腸粘膜より脂質を抽出してTLCで展開し、その放射活性をみると、3群の間にはglycerol-1, 3-¹⁴CのTG分画へのとりこみには差はみとめられなかつた。

3. Sodium octanoate-1-¹⁴Cの腸粘膜へのとりこみとその脂質分析 (Table 2)

Table 2はFig. 1の $\bar{v}=5.5$ のときの腸粘膜へのとりこみと脂質分析をくわしく表わしたものである。sodium octanoate-1-¹⁴Cは60分間のincubationで1.79μM粘膜中に存在し、これはmedium中にいれたFFAに対して10%に相当する。腸粘膜の脂質をSCCで各分画に分けると大部分がFFAとTG分画にあつた。incubationの時間とともにTG分画が増加した。なお回収率は32~42%であつた。

4. Sodium octanoate-1-¹⁴CのTG分画へのとりこみの機構についての検討

標識オクタノイン酸を上記の実験条件においてeverted sacとともに60分間incubateしたのち腸粘膜より脂質を抽出してSCCにてえたTG分画をTLCで展開すると、そのRf値はLCTに一致した値をしめた。このTLCにおける放射活

Fig. 3. Thin-layer chromatography and radioactivity analyses of labelled triglyceride fraction after silicic acid column chromatography.

性の分布もLCTに一致したRf値をしめすところにのみみとめた。MCTのRf値をしめす部分にはスポットもみとめられず、また放射活性もなかった (Fig. 3)。したがってSCCでえられたTG分画はLCTであり、この分子内にsodium octanoate-1-¹⁴Cがくみこまれていることが強く推定された。

そこでこのTG分画を昇温GLCで分析するとC₈に一致してピークがみとめられた。RGLCでもC₈に一致して放射活性がみとめられ、それ以外の部分には放射活性はなかった (Fig. 4)。したがってC₈のままでLCT分子の一部にくみこまれていることが明らかとなった。

5. LCT中にくみこまれたsodium octanoate-1-¹⁴Cのグリセロールの位置の決定 (Table 3)。

Sodium octanoate-1-¹⁴CのくみこまれたLCTを胰リパーゼにより水解すると、MGにはほとん

Fig. 4. Gas and radio-gas chromatography analyses of labelled triglyceride fraction after silicic acid column chromatography.

Table 3. Hydrolysis of sodium octanoate-1-¹⁴C labelled long chain triglycerides by pancreatic lipase.

labelled TG	mg	lipase	incubation time	distribution(%) of labelled lipids in total d.p.m. on TLC				
				TG	FFA	DG 1,2-	DG 3-	MG
trioctanoin-1- ¹⁴ C	50	(-)		94.9	3.4	1.2	0.3	0.2
	◇	(+)	10'	64.5	26.1	7.2	1.4	0.8
	◇	(+)	30'	41.4	42.9	5.9	3.2	6.7
LCTG labelled with sodium octanoate-1- ¹⁴ C	50	(-)		90.1	4.2	4.0	1.2	0.5
	◇	(+)	10'	54.6	30.1	10.0	4.3	1.0
	◇	(+)	30'	33.3	50.1	10.5	5.0	1.0

ど放射活性はみとめられなかった。DGでは1, 2 DGが1, 3 DGより放射活性は高かったが、これは試料を多量に展開したためFFAと1, 2 DGとの分離が不十分であつたと考えられる。対

Fig. 5. a) Effect of time on the incorporation of palmitate-1-¹⁴C into lipids of rat intestinal mucosa after incubation.

Fig. 5. b) Effect of time on the incorporation of palmitate-1-¹⁴C into triglyceride fractions.

Table 4. Silicic acid column chromatography analyses of lipids of mucosa and serosal fluid after incubation of rat intestinal everted sacs with various labelled lipids.

labelled lipids.	remaining in mucosa (μM/g)	lipid of mucosa	remaining in serosal fluid (mμM/ml/g)	lipid of serosal fluid	recovery (%)
		FFA TG		FFA TG	
octanoate-1- ¹⁴ C	1.79	56.1 40.9	214	91.8 8.0	42.4
palmitate-1- ¹⁴ C	1.69	44.8 45.5	19	85.4 20.6	37.3
trioctanoate-1- ¹⁴ C	0.48	2.7 90.3	347	10.6 80.4	24.3
tripalmitin-1- ¹⁴ C	0.29	2.5 85.2	9	57.7 40.3	17.1

照としたtrioctanoate-1-¹⁴Cの水解でもほとんど同じ傾向をしめた。

6. palmitate-1-¹⁴Cの腸粘膜へのとりこみとその脂質分析 (Fig. 5)。

Palmitate-1-¹⁴Cの腸粘膜へのとりこみはsodium octanoate-1-¹⁴Cとあまり大きな違いはなく、TG分画へのとりこみもほとんど同じ傾向をしめ

し、とくにエステル化されやすい結果をしめさなかつた。回収率は37.3%であつた。

7. trioctanoate-1-¹⁴Cとtripalmitin-1-¹⁴Cの腸粘膜へのとりこみ (Table 4)。

トリオクタノイン、トリパルミチンとも回収率は悪かつたが、腸粘膜へのとりこみはそれぞれオクタノイン酸、パルミチン酸より低かつた。また腸粘膜の脂質分析では両者ともほとんどTG分画にあり、serosal fluidにもTG分画が多かつた。

8. 結紮腸管および十二指腸内投与実験でのオクタノイン酸の吸収と腸粘膜の脂質分析 (Table 2)。

結紮腸管では腸間膜静脈からの採血により約10分間で失血状態となつたが、血中に56.2%が吸収され、腸内容には41.5%残存した。十二指腸内投与実験では投与1時間後屠殺したが腸管より47.4%が吸収され、腸内容には48.7%が残存した。腸粘膜にはそれぞれ投与量の11.5%、3.7%があつた。その脂質分析はeverted sacの実験とは異なつて標識オクタノイン酸のTG分画へのとりこみは15.8%、4.1%と順に少なくなつてゐる。なおこのTG分画もLC分画に一致したRf値をしめた。

IV. 考 案

腸管吸収の実験にWilson & Wisemanにより一つのモデル実験としてeverted sac法が工夫されて以来、各種物質の腸管吸収にかんする研究は著しく進歩した。著者はeverted sac法によりオクタノイン酸の腸管吸収について種々研究をすすめ、腸粘膜脂質を分析し、とくに吸収時における上皮細胞内エステル化の様相を検討した。

予備実験として腸粘膜のTG分画へのincubation mediaの組成およびcofactorにかんする条件を検討した。glycerol-1, 3-¹⁴CのTG分画へのとりこみはTable 1にしめすごとくcarrierのグリセロールをいれないとTG分画へのとりこみは少ない。これはグリセロールの添加によつてグリセロールよりα-グリセロリン酸を介してTGを合成する、いわゆるKennedy経路が促進されたためと考

えられる。またグリセロールと同時にグルコースを加えるとグリセロールのみとくらべて減少しているが、これはグリセロールから α -グリセロリン酸を経てのTG合成¹³⁾に対してグルコースからグリセロリン酸への経路が競合するためである。

次いでcofactorすなわちCoAとATPのsodium octanoate-1-¹⁴Cの腸粘膜へのとりこみの影響について検討した。多くのeverted sacの実験ではCoAもATPもいれていないが、著者はこの両方を検討した。CoAとATPを加えた方がsodium octanoate-1-¹⁴Cの腸粘膜へのとりこみは多くみられたが、大きな差はなかつた。

Sodium octanoate-1-¹⁴Cの腸粘膜へのとりこみとそのエステル化がincubation medium中のオクタノイン酸の濃度によってどう影響されるか検討した。medium中のアルブミン濃度を2%と一定にしてオクタノイン酸を $\bar{v}$ = 0.5, 1.5, 5.5と増すと粘膜への総とりこみは多くなるが、TG分画へのとりこみは逆に低下した。これはsodium octanoate-1-¹⁴Cの放射活性がcarrier lipidで希釈されたためであると考えられる。

Incubationの時間の差による腸粘膜のとりこみの状態をみると、5分間ですでにかなりの量が吸収され、エステル化していた。これは吸収とそれに続く腸粘膜代謝は非常に短時間でおこなわれることをしめた。

著者は以上の予備的検討からえられた、とりこみの最適の条件により以下の実験をおこなった。すなわち、すべてのmediumにはグリセロール60 μ gとCoAとATPとをそれぞれ終濃度で 10^{-4} Mになるようにいれて、脂肪とアルブミンによるサスペンションはFFA:アルブミンのmole比 $\bar{v}$ が5.5になる割合で加えた。

なお、glycerol-1,3-¹⁴CのTG分画へのとりこみがエステル化されるFFAによりどのように影響されるか比較するため、無投与、MCF A前投与、LCFA前投与の各群のラットよりeverted sacを作製し検討した。glycerol-1,3-¹⁴Cの腸粘膜脂質へのとりこみは無投与群では少なく、MCF A前

投与群で多かつた。TLCによる脂質分析では3群の間には差はみとめられなかつた。したがって総TG分画へのglycerol-1,3-¹⁴CはMCF A前投与群で一番多い。これはMCF AがCoA thioestersにactivateされにくいとの報告¹⁴⁾と矛盾しているが、著者はsodium octanoate-1-¹⁴Cの実験でこれをたしかめた。

さて、以上の実験によってsodium octanoate-1-¹⁴Cの腸管吸収の詳細、ことに吸収時における腸粘膜エステル化について検討した。MCTはLCTと異なつた吸収様式をしめすことは以前より知られている。一般にMCTの吸収はintraluminal lipolysisによつてMCF Aの形、あるいは一部の学説ではMCTのままはいつたのちmucosal lipolysisによつてMCF Aとなり、いずれにしてもMCF Aは腸上皮細胞内でMCTに再合成されることなくMCF Aの形で腸間膜静脈にはいつてゆくとされている⁵⁾。ところがGreenbergerら⁷⁾はMCT投与時に腸粘膜でMCTが一部LCTになることをみとめた。著者ら⁸⁾も同様のことを報告してきた。Leeら¹⁵⁾もペラルゴン酸(C_9)と同時にLCTを投与すると胸管リンパ中に3倍もペラルゴン酸がはこばれることを明らかにした。しかし、MCTのLCTへのとりこみの機構についてはいろいろと論議しているが明らかでない。すなわち、MCF Aの一部がいつた C_2 -fragmentに分解されて再びLCTに合成されたものか、あるいはMCF Aに C_2 -fragmentがついてelongationしたものか、またMCF Aのままで長鎖脂肪酸グリセリドにエステル化したものか決定されていない。

著者はオクタノイン酸のLCTへのとりこみをラットのeverted sacを標識オクタノイン酸とともにincubateして明らかにした。

1時間incubateしたのち脂肪を抽出して、SCCでTG分画をとりだして、このTG分画をTLCで展開した。このTG分画はLCTと同じRf値をしめた。また放射活性もこの部分のみに存在してオクタノイン酸の長鎖トリグリセリド分画(L

CTG) へのとりこみをしめた。

このLCTG分画をGLCとRGLCによつて分析した結果C₈の部分にのみピークがみられC₈のままでのくみこみをしめた。すなわちオクタノイン酸がそのままの形で粘膜中の長鎖脂酸グリセリドの一部にくみこまれLCTGを合成し、これがTLC上でLCTと同じR_f値をしめしたと考えられる。Greenbergerらも同じように腸粘膜をRGLCにて分析してC₂-fragmentより再合成されてLCTになることをしめしているが、彼らは腸粘膜の脂質を各分画に分けずに脂質全部を分析してTG分画だけの脂酸について行なっていない。Reeveら¹⁶⁾もMCF A前投与のラットのjejunal sliceをacetate-1-¹⁴CとともにincubateしてMCF AにC₂-fragmentが次々とelongationしてLCTにとりこまれると報告している。しかし、著者の実験ではC₁₀₋₁₆にはRGLCで放射活性がみとめられなかつたことより否定できる。

Furman¹⁷⁾はMCT投与の患者血清のカイロマイクロンTG合成はC₈またはC₁₀のモノグリセリドに内因性脂肪がエステル化したものと考えているが、著者の腸粘膜でのMCF AのLCTへのくみこみの機構、すなわちC₈のままで長鎖脂酸グリセリドとエステル化するという実験結果はFurmanおよびLeeらの説をさらに押しすすめ実証したものである。

次いで結紮腸管と十二指腸内投与実験でオクタノイン酸のLCTへのくみこみの状態を検討した。結紮腸管と十二指腸内投与の実験における腸粘膜の脂質をSCCで分析するとFFAが59.6%, 70.9%とそれぞれ増加した。TG分画へのとりこみはeverted sacの実験では40.9%であつたにかかわらず、結紮腸管の実験で3.7%, 十二指腸内投与実験で1.7%と非常に低下している。しかし、このTG分画もTLC上ではLCTと同じR_f値をしめした。したがつて結紮腸管や十二指腸内投与実験でもeverted sacの実験で実証されたのと同じ機構で長鎖脂酸グリセリドの一部にオクタノイン酸のままでエステル化していると考えられ

る。ただLCTG分画へのとりこみがeverted sacの実験にくらべて結紮腸管、十二指腸内投与実験の順に著明に低下しているのは、吸収されたFFAが粘膜内にとどまることなく、次々と門脈血中にはこびさられるためであろう。しかし、オクタノイン酸が長鎖脂酸グリセリドとエステル化することは、血液循環が悪くなつたときとか、LCTと同時に投与されたときには、かなりのMCF Aがエステル化されて胸管リンパにはこばれると考えられる。

オクタノイン酸がグリセロールのどの位置にエステル化しているかを検討するため、問題のLCTGを腓リパーゼにより水解した。従来より脂肪のエステル化しているグリセロールの位置の決定に腓リパーゼが用いられている¹⁸⁾¹⁹⁾。これは腓リパーゼがグリセロールの1, 3部分を特異的に水解することを利用したものである。オクタノイン酸のくみこまれたLCTG分画を腓リパーゼで水解するとMGにはほとんど放射活性はなかつた。したがつてグリセロールの1, 3部分のどちらかにエステル化しているものと推定される。ただ対照としておこなつたtrioctanoin-1-¹⁴Cの水解でもMGには放射活性はなかつた。MCTでは分子内のisomerizationがおこりやすいとの報告²⁰⁾がある点を考慮しなければならない。

Palmitate-1-¹⁴Cの吸収と腸粘膜脂質分析でもオクタイノン酸とほとんど同じ傾向をしめしている。とくにパルミチン酸の方がエステル化されやすい結果はでなかつた。トリオクタノインやトリパルミチンはTGのまま腸粘膜内に吸収される結果をしめした。Playoustら⁵⁾もトリオクタノインのまま吸収されmucosal lipaseによつて分解されると報告しているが、著者の実験によるとserosal fluidの脂質分析でもオクタノイン酸は少なくトリオクタノインとして輸送されることをしめした。

V. 結 論

中鎖脂肪の腸管吸収、とくにその際の腸粘膜細胞内における中鎖脂酸の長鎖脂肪分子中へのくみこみについて、ラットを用い、in vitroのeverted

sac法, in vivoの結紮腸管ならびに十二指腸内投与実験によつて研究した。

1) グリセロールのトリグリセリドへのとりこみはグルコースによりおさえられる。

2) everted sacでの実験にはCoA, ATPをいれた方が腸粘膜内へのとりこみはよい。

3) グリセロールのトリグリセリドへのとりこみは脂肪酸を前投与した方がよくとりこまれる。

4) 腸粘膜は短時間でもかなりの中鎖および長鎖脂肪酸の吸収と腸粘膜でのエステル化をおこなう。

5) オクタノイン酸は腸粘膜において長鎖脂肪にとりこまれるが、その機構はオクタノイン酸のままで長鎖脂肪酸グリセリドの一部にくみこまれる。

6) オクタノイン酸は長鎖脂肪のグリセロールの1, 3部分の両方あるいはいずれかにエステル化される

7) 結紮腸管および十二指腸内投与実験でもオクタノイン酸は長鎖脂肪分画にとりこまれていたが、everted sac法の実験にくらべて非常に少なかった。

文 献

- 1) Bloom, B., Chaikoff, I.L. and Reinhardt, W. O.: Intestinal lymph as pathway for transport of absorbed fatty acids of different chain lengths. *Amer. J. Physiol.*, 166: 451—455, 1951. —2) Borgström, B.: Transport of ^{14}C -decanoic acid in porta and inferior vena cava blood during absorption in the rat. *Acta Physiol. Scandinav.*, 34: 71—74, 1955. —3) Greenberger, N.J., Rodgers, J.B. and Isselbacher, K.J.: Absorption of medium and long chain triglycerides.; Factors influencing their hydrolysis and transport. *J. Clin. Invest.*, 45: 217—227, 1966. —4) Hashim, S.A.: Medium chain triglycerides—Clinical and metabolic aspect. *Amer. Diet. Ass.*, 51: 221—227, 1967. —5) Playoust, M.R. and Isselbacher, K. J.: Studies on the intestinal absorption and intramucosal lipolysis of a medium chain triglyceride. *J. Clin. Invest.*, 43: 878—885, 1964. —6) Isselbacher, K.J.: Biochemical aspect of fat absorption. *Gastroenterol.*, 50: 78—82, 1966. —7) Greenberger, N.J., Franks, J.J. and Isselbach-

- er, K.J.: Metabolism of $1\text{-}^{14}\text{C}$ octanoic and $1\text{-}^{14}\text{C}$ palmitic acid by rat intestinal slices. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 120: 468—472, 1965. —8) 増田正典, 細田四郎, 十倉保宜, 吉田譲, 加嶋敬, 馬場忠雄, 中島一益, 松井喜彦: 中鎖脂肪と長鎖脂肪の腸管吸収の比較, 第9回日本アイソトープ会議報文集, 430—432, 1969. —9) Wilson, T.H. and Wiseman, G.: The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J. Physiol.*, 123: 116—125, 1954. —10) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H.: a simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497—509, 1957. —11) Borgström, B.: Investigation on lipid separation method. Separation of cholesterol esters, glycerides and free fatty acids. *Acta Physiol. Scandinav.*, 25: 111—119, 1952. —12) Hirsch, J. and Ahrens, E.H.: The separation of complex lipide mixtures by the use of silicic acid chromatography. *J. Biol. Chem.*, 233: 311—320, 1958. —13) Kennedy, E.P.: Synthesis of phosphatides in isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 201: 399—412, 1953. —14) Senior, J.R. and Isselbacher, K.J.: Activation of long-chain fatty acids by rat gut mucosa. *Biochim. Biophys. Acta*, 44: 399—400, 1960. —15) Lee, D.S., Hashim, S.A. and Van Itallie, T.B.: Effect of long chain triglyceride on chylous transport of medium chain fatty acids. *Amer. J. Physiol.*, 214: 294—297, 1968. —16) Reeve, J. and Franks, J.J.: Fatty acid synthesis by jejunal slices from rat fed medium and long chain triglycerides. *Amer. J. Physiol.*, 214: 1425—1428, 1968. —17) Furman, R. H., Howard, R.P., Brusco, O. J. and Alanpovic, P.: Effect of medium chain length triglyceride (MCT) on serum lipids and lipoproteins in familial hyperchylomicronemia (dietary fat-induced lipemia) and dietary carbohydrate accentuated lipemia. *J. Lab. clin. Med.*, 66: 912—926, 1965. —18) Mattson, F.H. and Volpenheim, R.A.: The use of pancreatic lipase for determining the distribution of fatty acids in partial and complete glycerides. *J. Lipid. Res.*, 2: 58—62, 1961. —19) Rosenbloom, A.A. and Elsbach, P.: Triglyceride formation and hydrolysis by toad bladder epithelium. *J. Lipid. Res.* 10: 406—410, 1969. —20) Entressangles, B., Savary, P., Constantin, M.J. et Desnuelle, P.: Comportement in vitro et in vivo des chaines courtes situées en position interne dans les triglycérides. *Biochem. Biophys. Acta*, 84: 140—148, 1964.