報　文

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.64, No.12, pp.1835～1841, 1990]

In vivo における [1-^{14}C]-酢酸の白ネズミ脂質成分への取り込みに及ぼす運動負荷の影響†

福田亘博，日高敏郎，菅野道廣*
（宮崎大学農学部生物資源利用学科，*九州大学農学部食糧化学工学科）

平成2年6月28日受理

Effect of Exercise on Incorporation of [1-^{14}C]-Acetate into Rat Lipids *in vivo*

Nobuhiro FUKUDA, Toshiro HIDAKA and Michihiro SUGANO*
Laboratory of Food Science and Nutrition, Department of Biological Resource Science, Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki 889-21
** Laboratory of Nutrition Chemistry, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812*

The mechanism for the reduction of serum lipids was studied in rats subjected to treadmill exercise for 14 days. Lipogenesis was tested at 30, 60 and 180 min after an intraperitoneal injection of [1-^{14}C]-acetate. The exercise group in comparison with either the *ad libitum* or paired-feeding sedentary groups showed a significant reduction in serum triglyceride and cholesterol concentration at 60 and 180 min after injection of the isotope, although no significant difference could be observed at 30 min. Exercise had no effect on hepatic lipid concentration at any time during the observation period. The rate of [1-^{14}C]-acetate incorporation into hepatic total fatty acids, triglyceride and phospholipid in exercised rats compared to the sedentary rats was consistently lower at the three tested times after injection of the isotope. However, the time course of the radioactive decay in these lipid fractions was comparable among the three groups. The incorporation of [1-^{14}C]-acetate into hepatic digitonin precipitable sterols (DPS) tended to increase at 30 min after injection of the isotope, and the rate of disappearance of [^{14}C]-DPS appeared to be higher in the exercised rats. Although there was no difference in the incorporation of [1-^{14}C]-acetate into serum total fatty acids at 30 min after injection of isotope, the time course of radioactive decay showed a higher turnover rate in the fractions of the exercised rats. Exercise did not cause any change in the rate of incorporation into DPS or the time course of the decay compared to the sedentary controls. These results suggest that the increased turnover rate of serum lipids, rather than changes in hepatic lipogenesis, could be largely responsible for the exercise-induced serum lipid reduction in rats.
(Received June 28, 1990)

緒　　言

さきに，4-^{14}C-CHOL を腹腔内あるいは経口投与した実験から，運動負荷は白ネズミ血清-肝臓系での CHOL 代謝回転を亢進させ，さらに糞中への CHOL および胆汁酸の排泄を増加させることを明らかにし，これら一連の代謝変動が運動負荷による血清 CHOL 濃度の低下の

† 本報告は「白ネズミの血漿および肝臓脂質成分におよぼす運動負荷の影響」（第6報）に当たる．
次の略号を用いた．TG：トリグリセリド，CHOL：コレステロール，DPS：digitonin precipitable sterols

要因となることを明らかにした[1,2]．これらの結果は，運動負荷がリポタンパク質の代謝回転を亢進させていることを示唆している．

運動負荷のリポタンパク質に及ぼす影響は，一般に極低密度リポタンパク質（VLDL）で認められ，VLDL の主成分である TG 濃度は顕著に低下する[3~6]．一方，VLDL-TG の主な給源は肝臓および小腸であるが，摂食時を除けばその濃度調節に対して前者の影響が大である．したがって，運動負荷による VLDL-TG 濃度の低下は，肝臓内での脂肪酸あるいは TG 合成の変化，さらには血清での代謝回転の変化により引き起こされていると考えられる．すなわち，運動負荷による血清 TG 濃度低下の機序は，末梢組織におけるリポタンパク質リパーゼ活性の増加[1,7,8]以外に，肝臓における脂質合成および脂質の血中への搬出などの要因が関与していると考えられる．

本研究では，[1-^{14}C]-酢酸を腹腔内に投与し，ラベルの血清および肝臓脂質画分への取り込みを指標として運動負荷時における脂質代謝の様相を調べた．

実　験　方　法

1. 試薬　[1-^{14}C]-酢酸ナトリウム(59.1 mCi/mmole)は Radiochemical Centre, Amersham, England より購入した．

2. 実験動物および運動負荷の方法　ウィスター系雄白ネズミ（九動，熊本），初体重 150 g 前後を用いた．運動負荷および摂食法は前報に準じて行った[1,2]．すなわち，運動負荷群には最初の 7 日間 11 m/min，次の 7 日間 16 m/min のトレッドミル走を午後 1 時から毎日 1 時間負荷した．粉末市販固形飼料（オリエンタル酵母工業，Type NMF）を用い，運動負荷群は自由摂食法で，安静群は自由摂食および運動負荷群と同摂食量の paired-feeding の 2 群を設けた．

3. [1-^{14}C]-酢酸の投与法　最終走行の翌日，午前 9 時に摂食を中止させ，動物（午前 10 時）はエーテルで軽く麻酔し，体重 100 g 当り 7.5 μCi の ^{14}C-酢酸を含む 0.2 ml の生理食塩水を腹腔内へ注射した．投与後，経時的に 30，60，180 分後に断頭屠殺し，肝臓は直ちに氷冷した生理食塩水で洗った後，液体窒素中で凍結させた．断頭から凍結まですべて 2 分以内で行った．血液は氷冷後遠心分離し，血清を得た．

4. 薄層クロマトグラフィー（TLC）による脂質成分の分画[9]　脂質画分の TLC による分画はシリカゲル G プレート（Merck）を用いて行った．展開溶媒は石油エーテル：エチルエーテル：酢酸，82：18：1 (v/v/v) を用い，ヨード蒸気下で各脂質成分を同定し，直接バイヤルにかきとった．

5. 放射能活性の測定法　脂肪酸，DPS および TLC により分画した各脂質成分の放射能活性の測定は，トルエンシンチレーター（2.5-di-phenyl-oxazole 2 g, 1.4-bis-2-(5-phenyl-oxazolyl) benzene 50 mg をトルエン 1 l に溶解）10 ml を加え，液体シンチレーションカウンター（Beckman LS 250）で放射能活性を測定した．DPS 中の放射能活性は，DPS を Sperry & Webb[10] 法により純化した後，1 ml のメタノールに溶解し，トルエンシンチレーター 10 ml を加え，測定した．クエンチングの補正は外部標準線源法により行った．

6. 脂質成分の分析法　血清および肝臓の脂質は，Folch らの方法[11]により抽出，純化した後，一定容の石油エーテルに溶解した．この抽出液について，CHOL は Sperry & Webb 法[10]，TG は Fletcher 法[12]によりそれぞれ定量した．

7. 統計処理法　結果はすべて一元分散分析を行い，Snedecor らの方法で有意差の検定を行った[13]．

実　験　結　果

1. 血清脂質

運動負荷により摂食量および体重増加量は，前報[1]と同様に自由摂食安静群に比べ有意に低下したが，運動負荷群と同量摂取させた paired-feeding 安静群との間では体重増加量は同じであった（結果は省略）．

血清および肝臓の脂質濃度を Table 1 に示す．血清 TG および CHOL 濃度は，^{14}C-酢酸投与 30 分後では各群間で差異は認められなかった．一方，30～180 分後での血清脂質濃度の経時的変化を見た場合，自由摂食安静群では TG および CHOL 濃度には，この期間中変化は認められなかった．paired-feeding 安静群では，TG 濃度は 180 分後で 30 分後の値に比べ低下する傾向にあったが，CHOL 濃度には経時的変化はなかった．一方，運動負荷群では TG 濃度は経時的に低下する傾向にあり，180 分後で 30 分後に比べその差は有意（$p<0.01$）であった．さらに，両安静群に比べ 60 分あるいは 180 分後で，TG 濃度の有意な低下が観察された．CHOL 濃度も経時的に減少する傾向にあり，paired-feeding 安静群の

Table 1. The Concentration of Serum and Liver Lipids

Groups	Time after ^{14}C-acetate injection (min)	Serum		Liver		
		Triglyceride (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)	Weight (g/100g B. W.)	Triglyceride (mg/g)	Cholesterol (mg/g)
Ad libitum	30	111.3± 8.7	79.1±3.2	4.5±0.1	14.4±0.8	2.5±0.1
	60	99.9±14.9	83.2±9.2	4.7±0.2	13.4±1.0	2.5±0.1
	180	128.2±15.6**	75.6±3.9	4.7±0.1	12.8±0.1	2.3±0.1
Sedentary pair-feeding	30	105.4±15.5	71.9±6.2	4.5±0.1	11.9±0.4	2.1±0.1
	60	112.1± 4.5*	79.0±5.5	4.8±0.1	12.6±0.5	2.2±0.1
	180	72.7± 3.8*	80.4±5.6*	4.5±0.1	12.3±0.8	1.9±0.1
Exercise	30	101.5±12.2	72.9±5.0	4.6±0.1	11.2±0.4	2.3±0.1
	60	67.2±12.4	66.5±3.0	4.6±0.2	13.1±0.8	2.4±0.2
	180	54.9± 4.5[a)]	65.5±2.9	4.3±0.1	12.8±0.7	2.4±0.2

Mean±SE of 5 rats. *,** Significantly different from the corresponding exercise group at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively. [a)] Difference between 30 min and 180 min in the exercise group was significant at $p<0.01$.

180 分後での CHOL 値に対して有意に低下した.

肝臓脂質濃度および肝重量に及ぼす運動負荷の影響はいずれの時点においても認められず，また経時的変化も観察されなかった.

2. 肝臓脂質への 1-^{14}C-酢酸の取り込み

^{14}C-酢酸の肝臓総脂肪酸および DPS への取り込みを

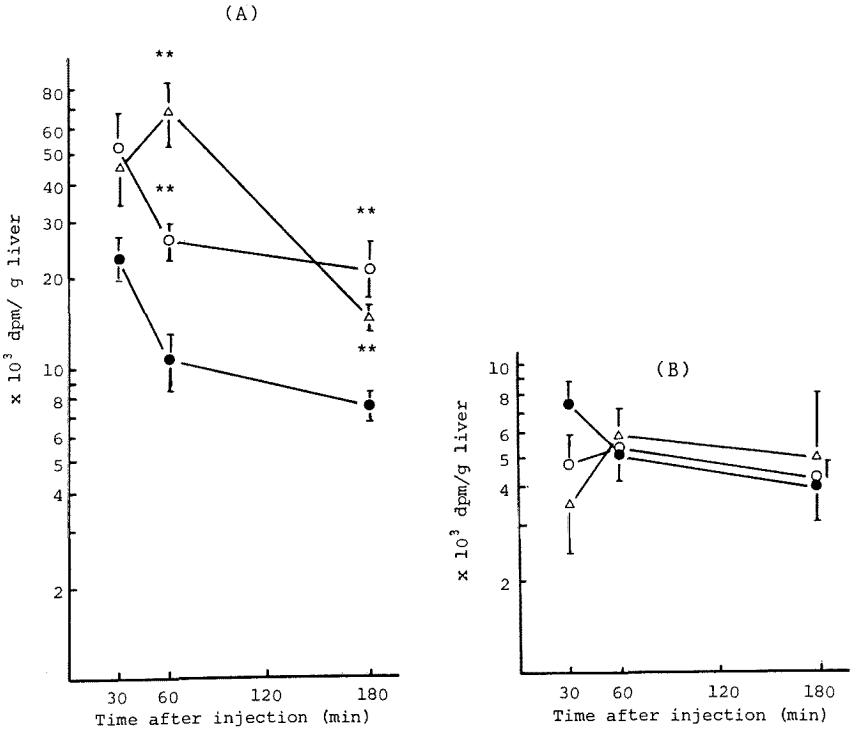


Fig. 1. Time Course of the Incorporation of Intraperitoneally Injected [1-^{14}C]-Acetate into Liver Total Fatty Acids (A) and Digitonin Precipitable Sterols (B). Each point represents mean±SE of 5 rats. ** Significantly different from the exercise group at $p<0.01$. -○-, *ad libitum* sedentary group; -△-, paired-feeding sedentary group; -●-, exercise group.

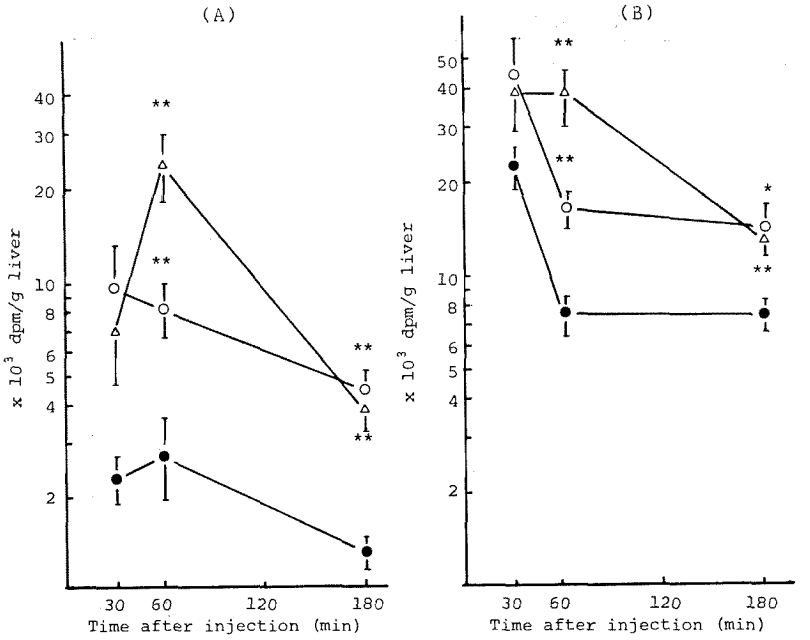


Fig. 2. Time Course of the Incorporation of 1-^{14}-Acetate into Liver Triglyceride (A) and Phospholipid (B). Each point represents mean±SE of 5 rats. *,** Significantly different from the exercise group at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively. -○-, *ad libitum* sedentary group ; -△-, paired-feeding sedentary group ; -●-, exercise group.

それぞれ Fig. 1 A および 1 B に示す．総脂肪酸への取り込み（Fig. 1 A）は，いずれの時点においても運動負荷群で両安静群に比べ低く，60 分および 180 分後でその差は有意であった．しかし，投与 30 分後から 180 分後までにおける放射能活性の経時的減衰率は，運動負荷群と両安静群との間に差はなかった．

DPS への ^{14}C-酢酸の取り込み（Fig. 1 B）は，投与 30 分後で運動負荷群が最も高い値を示し，それ以降経時的に減少し，減衰率は 30 分後に比べ 180 分後において 40 %であった．一方，両安静群ではこのような経時的な取り込み減少は事実上観察されなかった．

肝臓の TG およびリン脂質への ^{14}C-酢酸の取り込みを Fig. 2 A および 2 B に示す．両脂質画分への ^{14}C-酢酸の取り込みは，いずれの時点においても運動負荷群で両安静群に比べ低い値を示し，60 分あるいは 180 分後でその差は有意であった．しかし，投与 30 分後から 180 分後までにおける放射能活性の減衰率には，各群間で有意な差は観察されなかった．

3. 血清脂質への 1-^{14}C-酢酸の取り込み

Fig. 3 A に示すように，^{14}C-酢酸の血清総脂肪酸への取り込みには投与 30 分後において各群間で差異は認められなかったが，60 分あるいは 180 分後では運動負荷群で両安静群に比べ有意に低値を示した．放射能活性の減衰率は運動負荷群の 180 分後では 30 分後に比べ 60 % で，他 2 群に比べその差は有意（$p<0.01$）であった．一方，両安静群では 30 分あるいは 60 分後と 180 分後における ^{14}C-酢酸の取り込みはほぼ同値であった．^{14}C-酢酸の DPS への取り込み（Fig. 3 B）は投与 30 分後では運動負荷群で両安静群に比べ高い傾向にあったが，60 分後では最も低い値を示した．一方，180 分後では各群間で差異は認められなかった．

考　　察

血清脂質濃度には ^{14}C-酢酸投与 30 分後において各群間で差は認められなかった．粉末市販固形飼料を摂取させた白ネズミに本実験と同一の運動を負荷し，断頭屠殺（午前 10 時）した条件下で，血清脂質濃度は両安静群に比べ運動負荷群でいずれも低下が観察[1,2]されたが，本実験では必ずしもそのような低下効果は観察されなかった．このような結果が得られた理由は明らかでないが，経時的にみた場合 60 分あるいは 180 分後では両安静群に比べ，運動負荷群で TG および CHOL 濃度は明らか

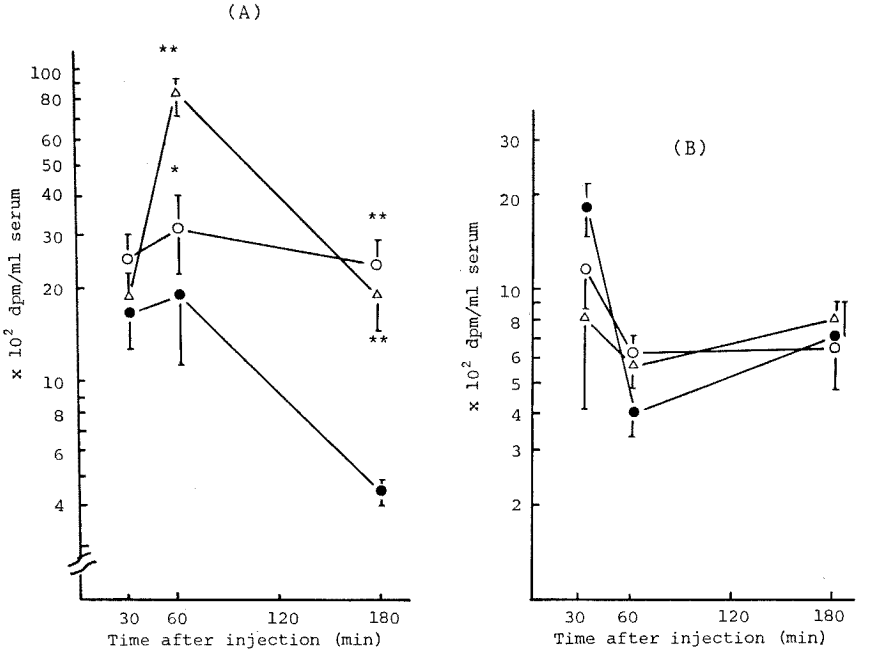


Fig. 3. Time Course of the Incorporation of Intraperitoneally Injected [1-^{14}C]-Acetate into Serum Total Fatty Acids (A) and Digitonin Precipitable Sterols (B). Each point represents mean±SE of 5 rats. *,** Significantly diffent from the exercise group at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively. -○-, *ad libitum* sedentary group; -△-, paired-feeding sendentary group; -●-, exercise group.

に低下した (Table 1). 本実験における動物の処理法から判断して，絶食の影響はきわめて少ないと考えられる．一方，Kantor ら[8]，Annuzzi ら[14]は外因性 TG の血清からの除去は運動により増加することを報告している．著者らも 4-^{14}C-CHOL を経口あるいは腹腔内投与し，血清での比活性の変化から CHOL の代謝回転は運動により亢進することを見出している[2]．したがって，運動負荷による TG および CHOL 濃度の経時的低下は，肝臓脂質濃度に差がないことから，血清での脂質成分の代謝亢進により引き起こされていると考えられた．

Landriscina らは ^{14}C-酢酸を腹腔内投与した場合，肝臓ミトコンドリアおよびミクロソーム脂質への取り込みは 30 分以内に最高に達し，その後経時的に取り込み量は減少することを報告している[15]．したがって，^{14}C-酢酸投与後 30 分以内での肝臓における取り込みは，主に脂質合成を反映しており，これより以後，たとえば 180 分後での放射能活性は脂質成分の肝臓から血清への搬出あるいは末梢での利用を反映していると考えられる．すなわち，血清あるいは肝臓での 30～180 分後での放射能活性の変化は各脂質成分の代謝回転の指標として用いることができると考えられる．

^{14}C-酢酸の肝臓脂質画分への取り込みは，運動負荷群および両安静群において投与 30 分あるいは 60 分後で最も高い値を示し，以後経時的に減少し (Fig. 1, 2 および 3)，Landriscina の実験結果[15]と一致した．この結果は ^{14}C-酢酸が速やかに肝臓の脂質に取り込まれていることを示している．^{14}C-酢酸の取り込みは 30 分後において，総脂肪酸，TG およびリン脂質でいずれも運動負荷群で低い値を示す傾向にあった．このような結果は，運動負荷が肝臓におけるこれら脂質画分の合成を抑制している可能性を示唆するものと考えられる．^{14}C-酢酸を用い，運動負荷による脂質代謝について検討した報告はきわめて少ないようである．Simko らは，24 週間遊泳させた白ネズミに ^{14}C-酢酸を腹腔内投与し，60 分後において肝臓総脂肪酸への取り込みを調べ，有意な低下を観察している[16]．一方，Aleksandrow らは，トレッドミル走を 5 週間負荷した白ネズミに ^{14}C-酢酸を腹腔内投与し，投与 4 時間後に肝臓総脂肪酸への取り込みを調べているが，逆にその取り込みは有意に増加することを観察している[17]．しかし，この結果は，前述の

Landstriscina らの報告[15]から判断して，必ずしも脂肪酸合成の結果を反映していない可能性がある．一方，雌ハムスターに 35 日間自由走行させ，脂肪酸合成の指標として酢酸より信頼性の高いと考えられている ^3H_2O を腹腔内投与した実験では，運動負荷は脂肪酸合成を有意に増加させることが報告されている[18]．このように，脂質合成への影響は用いた動物の種類，運動の種類，期間あるいはラベル投与後の測定時間などが異なるため，比較がむつかしいが，本実験条件下では運動負荷は脂肪酸，TG あるいはリン脂質の合成を低下させると考えられた．この点についてはさらに詳細な実験が必要であろう．

血清および肝臓での脂質の代謝回転を各画分への ^{14}C-酢酸の 30～180 分における減衰率を指標として評価した場合，肝臓の総脂肪酸，TG およびリン脂質画分では各群間で差異は観察されず（Fig. 1 A，2 A，および 2 B），これらの脂質画分の代謝速度はそれぞれほぼ同程度であると判断された．一方，血清における総脂肪酸への取り込みは投与 30 分後では各群間で差異はないが，30～180 分後での経時的減衰率は運動負荷群で明らかに大であった（Fig. 3 A）．この結果は，血清脂質濃度の運動負荷による経時的変化（Table 1）とよく一致した．肝臓からの脂質分泌への影響はトレッドミル走，自由走行あるいは遊泳などの運動を負荷したラットについて肝臓灌流法あるいは Triton WR 1339 処理により調べられているが，脂質分泌は安静群に比べ低下するか，あるいは差異がないことが報告されている[19~22]．したがって，本実験における血清 TG あるいはリン脂質濃度の運動負荷による低下は，肝臓におけるこれら画分の合成低下に基づく脂質分泌の減少より，むしろ血清画分における代謝回転の亢進による影響が大であると考えられた．

以上のように，運動負荷による血清 TG 濃度低下の機序は，血清での脂質濃度と標識化合物の脂肪酸への経時的取り込みの減少から判断して，おそらくは心筋および末梢組織でのリポタンパク質リパーゼ活性の増加を介し惹起される血清でのリポタンパク質の代謝亢進によるものと考えられた．

一方，TG 代謝に及ぼす影響とは異なり，運動負荷は ^{14}C-酢酸の肝臓 CHOL への取り込みを増加させる傾向にあった．肝臓 CHOL 合成の律速酵素である 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 活性およびメバロン酸の DPS への取り込みは運動負荷により増加することから[1]，肝臓における CHOL の de novo 合成は運動負荷により増加することがさらに追認された．また，肝臓における ^{14}C-酢酸の DPS への取り込みの経時的変化（Fig. 1 B）から判断して，肝臓での CHOL の代謝回転も血清でのそれ[2]と同様に促進されることが明らかであり，血清-肝臓における CHOL の代謝回転に及ぼす運動負荷の影響がさらに明確になった．

要　　約

運動負荷による血清脂質濃度低下の機序を明らかにするため，[1-^{14}C]-酢酸を腹腔内投与し，ラベルの脂質画分への取り込みを運動負荷と自由摂食あるいは paired-feeding 安静群のラットと比較した．

血清の TG および CHOL 濃度は，^{14}C-酢酸投与 30 分後では運動負荷群で両安静群に比べ差はなかったが，60 分および 180 分後では顕著に低下した．一方，肝臓重量およびその脂質濃度に及ぼす運動負荷の影響は観察されなかった．

[1-^{14}C]-酢酸の肝臓総脂肪酸，TG およびリン脂質画分への取り込みは，脂質合成を反映すると考えられるラベル投与 30 分後において運動負荷により減少する傾向にあった．30～180 分における経時的減衰率から，これらの脂質画分の代謝回転に及ぼす運動負荷の影響は必ずしも明確でなかった．肝臓 DPS への取り込みはラベル投与 30 分後では運動負荷群で最も大きく，運動負荷による肝臓での CHOL 合成の促進が追認された．さらに，ラベルの減衰率から肝臓における CHOL の代謝回転の亢進も示唆された．

^{14}C-酢酸の血清総脂肪酸への取り込みに対する運動負荷の影響は，投与 30 分後では明確でなかったが，経時的減衰率から判断して代謝回転を亢進させることが示唆された．一方，血清 DPS への取り込みに及ぼす運動負荷の影響は明確でなかった．

以上の結果から，運動負荷による血清脂質濃度低下の機序は，血清画分でのリポタンパク質の代謝回転の亢進により引き起こされる可能性が大きい．

（1）N. Fukuda, T. Ide, Y. Kida, K. Takamine and M. Sugano: *Nutr. Metab.*, **23**, 256 (1979).
（2）N. Fukuda, Y. Tsuge and M. Sugano: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 131 (1979).
（3）R. J. Motatt and T. B. Gilliam: *Artery*, **6**, 1 (1979).

(4) P. D. Wood, R. B. Terry and W. L. Haskell : *Fed. Proc.*, **44**, 358 (1985).
(5) R. E. Shepherd, J. L. Durstine and R. A. Davis : *Atherosclerosis*, **57**, 107 (1985).
(6) A. Wirth, C. Diehm, W. Hanel, J. Welt and I. Vogel : *Atherosclerosis*, **54**, 263 (1985).
(7) J. Borensztajn, M. S. Roul, S. P. Babirak, J. A. Mcgarr and L. B. Oscai : *Am. J. Physiol.*, **229**, 394 (1975).
(8) M. A. Kantor, E. M. Cullinane, P. N. Herbert and P. D. Thompson : *Metabolism*, **33**, 454 (1984).
(9) N. Fukuda, M. J. Azain and J. A. Ontko : *J. Biol. Chem.*, **257**, 14066 (1982).
(10) W. M. Sperry and M. Webb : *J. Biol. Chem.*, **187**, 97 (1950).
(11) J. Folch, M. Lees and G. H. Sloane-Stanley : *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
(12) M. J. Fletcher : *Clin. Chim. Acta*, **22**, 393 (1968).
(13) G. W. Snedecor and W. G. Cochran : "Statistical Methods," 6th edition, Iowa State Unversity Press, Ames, Iowa, 1967, p. 258.
(14) G. Annuzzi, E. Jansson, L. Kaijser, L. Holmquist and L. A. Carlson : *Metabolism*, **36**, 438 (1987).
(15) C. Landriscina and E. Marra : *Life Sci.*, **13**, 1373 (1973).
(16) V. Simko, R. Nemec and E. Ginter : *Experimentia*, **26**, 749 (1970).
(17) D. Aleksandrow, T. Klopotowski and Z. Smietanska : *J. Atheroscler. Res.*, **4**, 351 (1964).
(18) A. C. Tsai, R. Rosenberg and K. T. Borer : *Am. J. Clin. Nutr.*, **35**, 943 (1982).
(19) C. Simonelli and P. Eaton : *Am. J. Physiol.* **234**, E 221 (1978).
(20) I. Zavaroni, Y. I. Chen, C. E. Mondon and G. M. Reaven : *Metabolism*, **30**, 476 (1981).
(21) D. J. Mela and P. M. Kris-Etherton : *Metabolism*, **33**, 916 (1984).
(22) J. D. Seelbach and P. M. Kris-Etherton : *Atherosclerosis*, **57**, 53 (1985).