

氏 名 (本籍) すな がわ かつ のり
砂 川 勝 徳

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 244 号

学位授与年月日 昭和 58 年 3 月 10 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 低温環境下におけるめん羊の血液酢酸
およびパルミチン酸代謝の量的考察

論文審査委員 (主 査)

教授 津田 恒之 教授 堀口 雅昭

教授 木村 修一

論文内容要旨

反芻家畜は第一胃という特異な消化吸収過程を有するため、エネルギー消費量の約70%をVFA(低級脂肪酸)に依存している。その中でも酢酸が主な熱源であり、かつ長鎖脂肪酸(FFA)の主なソースとしてエネルギー代謝の中心的な位置にあることはよく理解されている。

ところが反芻家畜であっても、体利用されるエネルギー素材の種類や相対的量は栄養生理的狀態によって大きく変異することが知られつつある。常温環境下で給餌反芻家畜の全熱生産量の一部分はグルコースおよび糖原性物質の燃焼により賄われているが、低温環境になると、その量が増加することが知られている。しかし、それにしても全熱生産量の21.2%だけがそれらの物質の燃焼によると説明されているにすぎない。

本研究は、給餌めん羊の熱生産に寄与する物質のうち酢酸およびパルミチン酸を選び、常温および低温環境下における両者の量的代謝像を明確にすることを試みたものである。

I 低温環境下における酢酸代謝の動態

給餌反芻家畜における主要な熱源が酢酸であり、かつ低温環境下では体温恒常性維持のために熱生産量が増加することから、その際酢酸の代謝像にどのような変化が生ずるかを知らうとした。

(1) 血液酢酸の定量法の検討

本研究の遂行にあたって、血中酢酸の定量を頻繁に行う必要があったが、従来の方法では大量の血液を要し、血中VFAをすべて酢酸として計算し、さらに測定に長時間を要するなどの欠点が見られた。よって、先ずMcCloskey が果実汁の酸味測定に用いた酵素法の導入を試み、培養時間、標準線の直線性と再現性、反応に関係する酢酸とNADHの定量的関係、血液からの回収率を検討した。

その結果、酵素液と酢酸水溶液との反応は60分間の培養で完了することが明らかとなった。また培養終了後、最終吸光度を読むまで、反応液の入った試験管を氷冷することにより再現性を原法より大きく高め得ることがわかった。さらに、本操作において酢酸とNADHの反応が定量的に進んでいること、血液からの回収率が $109.8 \pm 10.5\%$ ($n = 10$)であることを確認した(第二章第一節)。

(2) 常温および低温環境下における酢酸代謝

酢酸の動的代謝像をみるためには炭素をラベルした酢酸を用いる同位体希釈法が最良と考えられたので、 $1, 2\text{-}^{14}\text{C}$ -酢酸ナトリウムの頸静脈内連続注入法により常温および低温

環境下において血液酢酸代謝の動態を調べた。

その結果、常温→低温環境において、血液酢酸の代謝回転速度には有意な変化はなかった。酸化率（酢酸の代謝量中、完全酸化された量の割合）は有意に増加したが、酸化寄与率（全CO₂生産量中に占める酢酸由来のCO₂の割合）は減少した。動物の全熱生産量は有意に増加したが、酢酸の酸化に由来する熱量は変化なく、全熱生産量に占める酢酸由来熱量の割合は有意に減少した（表1）。低温環境において酢酸の代謝回転速度と酢酸由来熱量

表1 常温および低温環境下における酢酸代謝の動態

環境温度	体重	代謝回転速度	酸化率	酸化寄与率	全熱生産量	酢酸由来の熱量	
						mg/min/kg ^{0.75}	%
℃	kg	mg/min/kg ^{0.75}	%	%	kcal/hr/kg ^{0.75}	kcal/hr/kg ^{0.75}	%
20	362 ±33	7.75±1.46	52.6±10.7	22.3±2.6	3.69±0.39	0.84±0.15	22.9 ±4.6
0	37.1 ±2.4	6.97±1.56	64.5*±10.2	15.0**±4.7	7.90**±2.42	0.92±0.10	13.1** ±5.5

値は動物6頭から得られた9例の平均値±標準偏差。*、**は20℃との間にそれぞれ5%水準および1%水準で有意差があることを示す。

$$\text{代謝回転速度 (mg/min/kg}^{0.75}\text{)} = \frac{1, 2\text{-}^{14}\text{C 酢酸の注入速度 (m}\mu\text{Ci/min)} \times 60}{\text{血液酢酸比放射能 (m}\mu\text{Ci/mg.C)} \times 24}$$

$$\text{全熱生産量 (kcal/hr/kg}^{0.75}\text{)} = 3.866 \times \text{O}_2\text{消費量 (l/hr)} + 1.200 \times \text{CO}_2\text{生成量 (l/hr)} - 0.518 \text{CH}_4\text{(g/hr)} - 1.431 \text{N(g/hr)}$$

$$\text{酸化寄与率 (\%)} = \frac{\text{呼気CO}_2\text{比放射能 (m}\mu\text{Ci/mg.C)}}{\text{血液酢酸比放射能 (m}\mu\text{Ci/mg.C)}} \times 100$$

$$\text{酸化率 (\%)} = \frac{\text{CO}_2\text{生成量 (ml/hr)} \times \text{酸化寄与率 (\%)}}{\text{代謝回転速度 (mmole/hr)} \times 448 \text{ (ml)}} \times 100$$

$$\text{酢酸由来熱量 (kcal/hr/kg}^{0.75}\text{)} = \text{代謝回転速度 (mole/hr)} \times \text{酸化率 (\%)} \times 209.4 \text{ (kcal/mole)}$$

とは有意な正の相関関係にあったが、酢酸の代謝回転速度と全熱生産量とは有意な負の相関関係にあった（図1, 2）。

本実験の結果から、常、低温両環境下において給餌めん羊の血液酢酸の代謝回転速度は変化する

ることなく、熱生産量の増加に対して、血液酢酸の貢献度が低下していることが判明した（第二章第二節）。

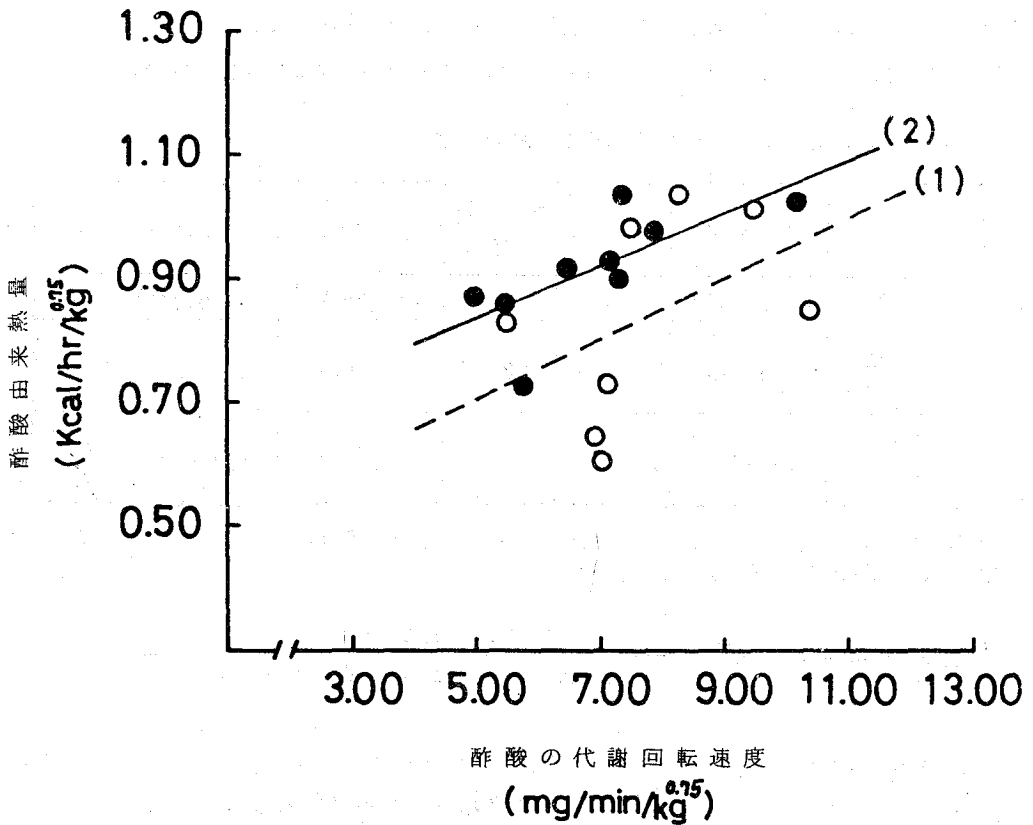


図1 常温(○)および低温(●)環境における酢酸の代謝回転速度と酢酸由来熱量との間の相関関係

(1) $Y = 0.461 + 0.049X, r = 0.46$

(2) $Y = 0.603 + 0.045X, r = 0.74^* (S_b = 0.016; *P < 0.05)$

X = 酢酸の代謝回転速度, Y = 酢酸由来熱量

*はXとYの間に5%の水準で有意の相関があることを示す。

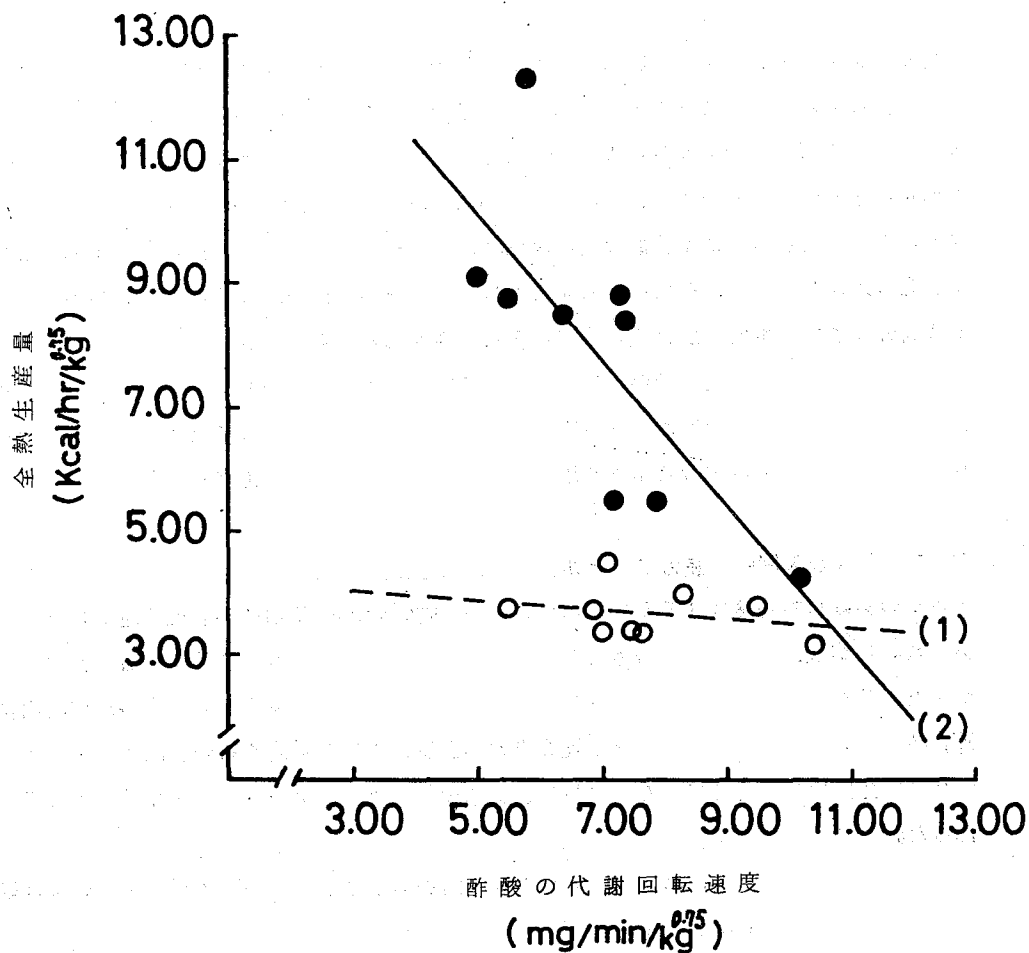


図2 常温(○)および低温(●)環境における酢酸の代謝回転速度と全熱生産量との間の相関関係

(1) $Y = 4.224 - 0.069X$, $r = -0.26$

(2) $Y = 16.065 - 1.172X$, $r = -0.76^*$ ($S_b = 0.374$, $P < 0.05$)

X = 酢酸の代謝回転速度

Y = 全熱生産量

*はXとYの間に5%水準で有意の相関があることを示す。

II 低温環境下における外因性および内因性酢酸の動態

前章の結果から、常温および低温環境間で血液酢酸の代謝回転速度は変わらず、かつ酢酸由来熱量にも差がないことを知った。一方、絶食めん羊に基礎代謝量の $\frac{1}{2}$ に相当する酢酸カルシウムを第一胃内に連続注入した際、低温環境において血液酢酸の代謝回転速度が常温環境のときに比べて増加し、その増加が内因性酢酸の生成速度の増加によるとの報告がある。このことから、常温、低温両環境間において給餌めん羊の血液酢酸の代謝回転速度に有意な差がなくても、それを構成する外因性（吸収性）酢酸の流入速度および内因性（代謝性）酢酸の生成速度は変化している可能性があると考えられた。

そこで、本章では常温、低温環境下における給餌めん羊の血液酢酸の代謝回転速度に占める外因性酢酸の流入速度および内因性酢酸の生成速度の割合を知るために、門脈および腸間膜静脈カテーテル装着めん羊を用いて外因性、内因性酢酸の動態を調べた。

(1) 門脈および腸間膜静脈カテーテル装着、維持技術の開発

本章の実験目的を達成するためには門脈からの血液採取可能な期間が最低3週間は必要であった。しかし、これまで報告されてきた門脈カテーテルの装着維持技術は確実性に乏しかった。そこで本節ではカテーテルの材質、洗浄法、内容積、カテーテル先端の肝門内位置、結紮糸の種類およびヘパリン生理食塩水の濃度について検討を行い、門脈カテーテルの装着維持技術の改善を試みた。同時に、腸間膜静脈カテーテルの装着維持技術の改良も行った。

その結果、4ヶ月以上にわたって使用できる門脈および腸間膜静脈カテーテルの装着維持技術が確立できた（第三章第一節）。

(2) 常温および低温環境下における外因性、内因性酢酸の動態

門脈および腸間膜静脈カテーテル装着めん羊を用い、常温、低温環境下において血液酢酸の代謝回転速度、外因性酢酸の流入速度および内因性酢酸の生成速度を測定した。

その結果、常温→低温環境において、血液酢酸の代謝回転速度は有意に変化することなく、外因性酢酸の流入速度は減少の、内因性酢酸の生成速度は増加の傾向にあった。また門脈へ血液を流入させる諸臓器（Portal viscera）による酢酸の取り込み速度は減少する傾向にあった。しかし、常温、低温両環境においてそれらの値間に有意差はなかった（表2）。

本実験の結果から、常温および低温両環境下において給餌めん羊の血液酢酸の代謝回転速度に占める外因性および内因性酢酸の割合には変化がないことが明らかとなった（第三

章第二節)。

表2 常温および低温環境下における外因性・内因性酢酸の動態

環境温度	体重	代謝回転速度	流入速度		代謝回転速度に占める割合		Portal Visceraの取り込み
			外因性	内因性	外因性	内因性	
℃	kg	mg/min/kg ^{0.75}	mg/min/kg ^{0.75}	mg/min/kg ^{0.75}	%	%	mg/min/kg ^{0.75}
20	433 ±29	561±210	453±118	108±100	80.7 ±36.7	19.3 ±10.0	15.9±0.62
0	433 ±29	593±054	432±086	161±133	72.8 ±20.4	27.2 ±20.5	1.18±0.31

値は動物4頭の平均値±標準偏差。

流入速度

$$\text{外因性酢酸 (mg/min/kg}^{0.75}\text{)} = (\text{門脈血液濃度 (mg/ml)} - \text{動脈血液濃度 (mg/ml)}) \times \text{門脈血流量 (ml/min)}$$

生成速度

$$\text{内因性酢酸 (mg/min/kg}^{0.75}\text{)} = \text{代謝回転速度 (mg/min)} - \text{外因性酢酸の流入速度 (mg/min)}$$

Portal viscera の

$$\text{取り込み速度 (mg/min/kg}^{0.75}\text{)} = \text{動脈血液酢酸濃度 (mg/ml)} \times \text{門脈血流量 (ml/min)} \times$$

$$\frac{\text{動脈血液酢酸放射能} - \text{門脈血液酢酸放射能}}{\text{動脈血液酢酸放射能 (mCi/ml)}}$$

III 低温環境下におけるパルミチン酸代謝の動態

低温環境において血液酢酸の酸化率は常温環境のときと比べて有意に増加したが、一方、外因性酢酸の流入速度および内因性酢酸の生成速度が大きく変化しなかったため、血液酢酸の代謝回転速度は有意に異なることはなかった。その結果低温環境における血液酢酸由来熱量は常温環境のときと比べて増加の傾向にあったが、有意ではなかった。このことから、全熱生産量の増加に血液酢酸の寄与はほとんどないことが明らかとなり、酢酸以外の物質が寄与しているであろうと考えられた。

そこで、本章では低温環境で血漿遊離脂肪酸濃度が顕著に増加することから、遊離脂肪酸の中のパルミチン酸をとり上げ、その動的代謝像を調べた。

(1) 常温および低温環境下におけるパルミチン酸の1-Cの代謝

本節では低温環境下における血漿パルミチン酸の全熱生産量および血液酢酸に対する寄与率を知るため、常温、低温環境において1-¹⁴C-パルミチン酸を用いた同位体希釈法による実験を行いパルミチン酸の1-Cの動的代謝像を調べた。

その結果、常温→低温環境において、血漿パルミチン酸の1-Cの代謝回転速度は4倍に増加し、1-Cの酸化率は14倍、1-Cの酸化寄与率は26倍、1-C由来熱量は46倍、それが全熱生産量に占める割合は6倍、1-Cの酢酸への寄与率は30倍と、それぞれすべてが増加した(表3)。

表3. 常温および低温環境下におけるパルミチン酸の1-Cの代謝の動態

環境温度	体重	1-Cの代謝回転速度	1-Cの酸化率	1-Cの酸化寄与率	全熱生産量	1-C由来の熱量		1-Cの酢酸への寄与率
						kcal/hr/kg ^{0.75}	%	
℃	kg	mg/min/kg ^{0.75}	%	%	kcal/hr/kg ^{0.75}	kcal/hr/kg ^{0.75}	%	%
20	428 ±22	0.010 ±0.009	3.3 ±1.3	0.006 ±0.005	3.06 ±1.01	0.0004 ±0.0003	0.04 ±0.05	0.002 ±0.001
0	42.8 ±2.2	0.039* ±0.007	45.1* ±16.8	0.156** ±0.032	7.66** ±2.63	0.0184* ±0.0065	0.24* ±0.08	0.059* ±0.027

値は動物4頭の平均値±標準偏差。*、**は20℃との間にそれぞれ5%水準および1%水準で有意差があることを示す。パラメーターの計算法は表1に準ずる。

$$1-Cの酢酸への寄与率(\%) = \frac{\text{血漿酢酸比放射能}(\text{m}\mu\text{Ci}/\text{mg}\cdot\text{C})}{\text{血漿パルミチン酸の1-Cの比放射能}(\text{m}\mu\text{Ci}/\text{mg}\cdot\text{C})} \times 100$$

本実験の結果から、低温環境における血漿パルミチン酸の1-Cの代謝は常温環境のときと比べて顕著に増加し、全熱生産量および血液酢酸への寄与率が増加していることが明らかとなった(第四章第一節)。

(2) in vitro における肝臓のパルミチン酸代謝

第四章第一節では低温環境下におけるめん羊の血漿パルミチン酸の1-Cの血液酢酸への寄与率が常温環境のときと比べて顕著に増加した。しかし第三章第二節では常温、低温

環境において内因性酢酸の生成速度に有意差がなかった。このことからパルミチン酸の1-Cと他部位のCでは酢酸への寄与率が異なっているのではないかと考えられた。

そこで、本節では常温、低温環境下においためん羊の肝切片を用い、パルミチン酸の1位の炭素および全体の炭素の代謝の相違を明らかにすることを試みた。等しい放射エネルギーを有する1-¹⁴CおよびU-¹⁴C-パルミチン酸を用い、常温および低温環境下におけるパルミチン酸の1-¹⁴CおよびU-¹⁴Cの酢酸への寄与率、¹⁴CO₂生成量を検索した。

その結果、常温および低温環境においてパルミチン酸のU-¹⁴Cの酢酸への寄与率は1-¹⁴Cの寄与率のそれぞれ1848倍、1378倍と理論値(16倍)に近い値であった(表4)。一方、1-¹⁴C-パルミチン酸からの¹⁴CO₂生成量はU-¹⁴C-パルミチン酸からの¹⁴CO₂生成量のそれぞれ183倍、155倍であった(表5)。

表4 常温および低温環境下においためん羊の肝切片のパルミチン酸代謝

	環境温度(°C)	酢酸への寄与率(%)
1- ¹⁴ C-パルミチン酸	20	1.41 ± 0.87
	0	2.77 ± 0.45 *
U- ¹⁴ C-パルミチン酸	20	26.05 ± 14.24
	0	38.18 ± 11.48

値は動物4頭の平均値±標準偏差。*は20°Cとの間に5%水準で有意差があることを示す。

表5 常温および低温環境下においためん羊の肝切片のパルミチン酸代謝

	環境温度(°C)	パルミチン酸消費量 (mμCi/3h/2g.wet tissue)	¹⁴ CO ₂ 生成量 (mμCi/3h/2g.wet tissue)
1- ¹⁴ C-パルミチン酸	20	1849.06 ± 51.33	223.51 ± 72.90
	0	1838.82 ± 84.72	259.60 ± 36.17
U- ¹⁴ C-パルミチン酸	20	1780.56 ± 92.38	122.40 ± 42.42
	0	1789.46 ± 90.36	167.87 ± 19.47 **

値は動物4頭の平均値±標準偏差。**は20°Cとの間に1%水準で有意差があることを示す。

本節の結果から、肝切片におけるパルミチン酸の代謝のうち、酢酸生成についてはパルミチン酸のすべての炭素がほぼ等しく寄与し、CO₂生成についてはパルミチン酸のカルボキシル基の

由来の酢酸生成

炭素がメチル基の炭素よりCO₂へ酸化されやすいけれども、メチル基の炭素もある程度はCO₂へ酸化されていることが証明された(第四章第二節)。

訂正された。

(3) 常温および低温環境下におけるパルミチン酸代謝

肝切片における¹⁻¹⁴CおよびU-¹⁴C-パルミチン酸代謝の相違が体全体にも当てはまると仮定し、常温および低温環境下における体全体のパルミチン酸代謝のパラメーターの算出を試みた。

その結果、常温→低温環境において、血漿パルミチン酸の代謝回転速度は4倍に増加し、酸化率は15倍、酸化寄与率は30倍、パルミチン酸由来の熱量は62倍、それが全熱生産量に占める割合は27倍、パルミチン酸由来酢酸の割合は20倍と、それぞれすべてが増加した(表6)。

表6 常温および低温環境下におけるパルミチン酸代謝の動態

環境温度	体重	代謝回転速度	酸化率	酸化寄与率	熱生産量	パルミチン酸由来の熱量		酢酸への寄与率
℃	kg	mg/min/kg ^{0.75}	%	%	kcal/hr/kg ^{0.75}	kcal/hr/kg ^{0.75}	%	%
20	428	0.22	2.0	0.054	3.06	0.0023	0.07	0.034
0	428	0.84 *	30.8 *	1.609 **	7.66 **	0.1430 *	1.93 *	0.938 *

値は動物4頭の平均値である。*、**は20℃との間にそれぞれ5%水準および1%水準で有意差があることを示す。

$$\text{パルミチン酸の代謝回転速度}(\text{mg}/\text{min}/\text{kg}^{0.75}) = \frac{1-^{14}\text{C-パルミチン酸の注入速度}(\text{m}\mu\text{Ci}/\text{min})}{\text{血漿パルミチン酸の1-Cの比放射能}(\text{m}\mu\text{Ci}/\text{mg.C})} \times \frac{256}{12}$$

$$\text{パルミチン酸の酸化寄与率}(\%) = \frac{\text{呼気CO}_2 \text{比放射能}(\text{m}\mu\text{Ci}/\text{mg.C}) \times K}{\text{血漿パルミチン酸の1-Cの比放射能}(\text{m}\mu\text{Ci}/\text{mg.C}) \times \frac{1}{16}} \times 100$$

$$K = \frac{1}{1.83} \text{ (20℃のとき)}, \frac{1}{1.55} \text{ (0℃のとき)}$$

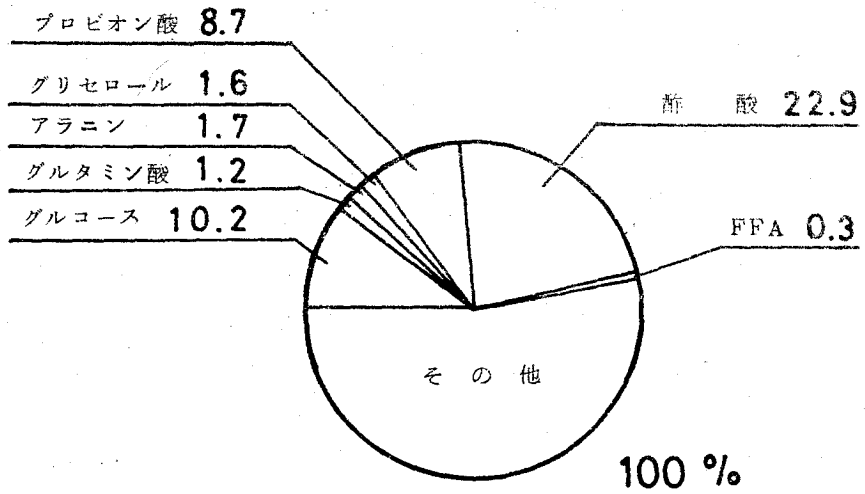
$$\text{パルミチン酸の酢酸への寄与率}(\%) = \text{血漿パルミチン酸の1-Cの酢酸への寄与率}(\%) \times 16$$

本節の結果より、低温環境下においては常温下におけると同量給餌のめん羊で、パルミチン酸の動員および代謝が著しく亢進し、全熱生産量への貢献度が大きくなっていることが明らかとなった。また低温環境下における血漿パルミチン酸の酢酸への寄与率は顕著に増加したが、内因性酢酸の生成量に影響しない程度の量であることが示唆された（第四章第三節）。

以上、本研究において、低温環境下における全熱生産量の増加に対して血液酢酸は寄与せず、血漿パルミチン酸の寄与率は増加することが明らかとなった。酢酸およびFFAに由来する熱量の全熱生産量に占める割合を概算すると、ほぼ21.1%となった。さらにパルミチン酸が血漿酢酸を介して酸化される量はきわめて小さいことが明らかとなった。

第二章第二節、第三章第三節およびグルコースと糖原性物質について研究した藤田らの実験結果を合せて、常温および低温環境下における給餌めん羊の全熱生産量に占める各物質の寄与割合を図3に示した。その結果、常温、低温各環境下で各物質の寄与割合の総和はそれぞれ46.6%、42.3%であることが明らかとなった。残りの不明の部分には酪酸、B-ヒドロキシン酪酸、乳酸、未実験のアミノ酸等の寄与も考えられ、さらに血液の分析からは得られない脂肪、グリコーゲン、蛋白質の酸化による寄与も含まれると思われる。不明部分の解明に関しては、今後の研究が必要である。

20°C



0°C

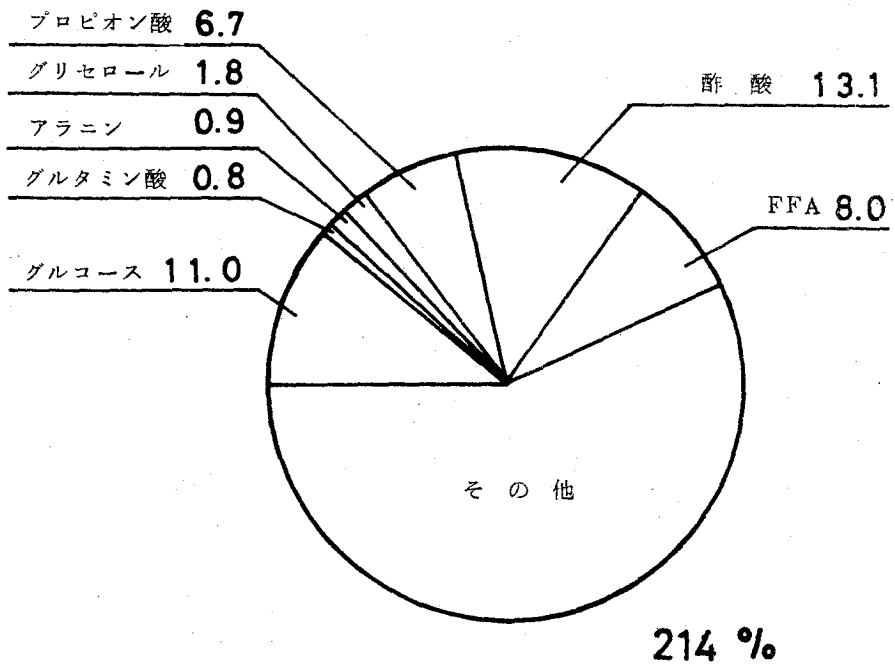


図3. 常温および低温環境下の全熱生産量に占める各種物質由来の割合

審 査 結 果 の 要 旨

反すう家畜は第一胃発酵の結果生ずる揮発性脂肪酸を主要なエネルギー源としているが、中でも酢酸は中心的位置を占めている。反すう家畜が低温環境にさらされると体温維持のために熱生産量を増加させる。この場合、いかなる物質の燃焼により増加量がまかなわれるかは充分明らかでない。著者はこの点に着目し、低温環境下における酢酸の代謝動態につき解明を試みた。更に、同じくエネルギー源となる長鎖脂肪酸のうち、パルミチン酸を選びその代謝像についても合わせて検討を加えた。

まず、本研究の遂行にあたっては血液酢酸の定量を頻繁に行う必要があったが従来の方法では大量の血液を要するなど不適當であったので新たに酵素法の導入を試みこれに成功した。

めん羊を低温環境（0℃）下におき、その第4日目に一般生理諸元の測定のほか、1, 2-¹⁴C 酢酸ナトリウムを頸静脈内に連続定速注入し、同位元素希釈法による血液酢酸代謝のパラメーターを算出した。得られた成績を常温環境（20℃）下におけるものと比較した。その結果、酢酸の代謝回転速度は両環境下で変化はなく、酸化率は低温下で僅かに増加するものの、全熱生産量が約2倍以上に増加するので、酢酸の酸化に由来する熱量の割合はむしろ低温下で減少した。

常・低両温度環境下で血中酢酸の代謝回転速度は変らなかつたが、血中酢酸の構成要因、すなわち内因性（代謝性）および外因性（吸収性）酢酸の割合は変化している可能性があった。この割合を知る目的で、まず長期間採血可能な門脈カテーテルの装着技術の開発を試みこれに成功した。この技法を用い内因性酢酸の生成速度および外因性酢酸の吸収速度を測定した結果、常・低両温度下で相違はみられなかつた。低温環境下で酢酸の代謝量が増加しないことから、全熱生産量の増加には、他物質、特に長鎖脂肪酸の関与が考えられた。この中でパルミチン酸を選び、その1-¹⁴C 標識物を用いて同位元素希釈法を行った結果、パルミチン酸代謝のすべてのパラメーターが低温環境下で著しく増加することを知った。しかし、用いた化合物が1-¹⁴C 標識物であったのでU-¹⁴C 標識物で肝切片を用いて *in vitro* 試験を行った結果、同様の成績を得た。これらの成果から本実験条件下では長鎖脂肪酸の代謝量は約27倍程度に増加することを推算した。

以上の結果は反すう家畜の環境生理学に大きな知見を与えたのみならず、飼育管理面へも著しく貢献した。よって審査員一同、農学博士の学位を授与するに値すると判定した。