

高糖質食飼育ラットの脂質代謝におよぼす カルニチンおよびフォルスコリンの影響

辻原 命子・谷 由美子

Effects of Carnitine and Forskolin on Lipid Metabolism in Rats Fed a High Carbohydrate Diet

Nobuko TSUJIHARA and Yumiko TANI

緒 言

長鎖脂肪酸はミトコンドリアのマトリクスで、 β -酸化を受けてエネルギーとして利用されるが、単独ではミトコンドリア膜を通過できず、カルニチンと結合して、アシルカルニチンの形となって初めてミトコンドリア内へ移動する。山川¹⁾、前田ら²⁾は腹膜炎ラットにカルニチンを補充投与することにより、エネルギー代謝が回復したと報告しており、桐山³⁾は敗血症ラットを用いた実験で、脂質非投与群に対し、脂質投与群の予後は不良であるが、カルニチンの併用によってその改善を認めたと報告している。また嶋⁴⁾は、敗血症時における脂肪乳化剤投与は生存率の低下、脂質代謝障害などをもたらすが、カルニチンの併用により改善したことを報告している。これらの報告により、重症感染症時のような侵襲状態ではエネルギー需要が増加するにもかかわらず、脂質利用が低下しており、このような時カルニチン投与により脂質代謝が改善することが認められている。著者らも、成人病誘発性の食事を想定した、高コレステロール・高脂肪食で飼育したラットにカルニチンを投与した場合、脂質代謝の改善効果を認めている⁵⁾。

カルニチンは脂質代謝のみでなく、糖新生やピルビン酸脱水素酵素活性など糖代謝にも影響することが知られているため⁶⁾、本研究で高糖質食で飼育した肥満ラットにカルニチンを投与して長鎖脂肪酸の酸化を促進し、脂肪の蓄積や肥満の抑制など脂質代謝系の改善効果があるかどうか検討した。

また、フォルスコリンはネパール、インド地方に自生するシソ科の植物 *Coleus forskohli* の芋に含まれており⁷⁾、ラットやヒトの脂肪細胞に対して、グルカゴン、ACTH、エピネフリンなどのホルモンと比較して、顕著にcAMP含量を増加させ、リパーゼ作用を亢進し、脂肪を分解する作用のあることが認められている^{8) 9)}。

そこで私たちは、脂肪酸の利用に必須のカルニチンとフォルスコリンを同時に投与した場合の脂質代謝への影響も調べた。

実 験 方 法

1. 動物飼育法

8週齢(体重240~260g)のWistar系雄ラット(日本エスエルシー(株))18匹を用い、対照群、L-カルニチンを添加したカルニチン群、L-カルニチンとフォルスコリンを添加したカルニチン・フォルスコリン群の3群に分け、各群6匹ずつとした。いずれも購入後5日間(株)日本クレアの粉末飼料(CE-2)を投与して予備飼育した後、Table 1に示す高糖質食を4週間投与した。

後半の2週間にカルニチン群にはカルニチン(金剛化学株)を100mg/匹/日添加して与え、カルニチン・フォルスコリン群はカルニチンを100mg/匹/日とフォルスコリンを10mg/匹/日(フォルスコリン3.13%含有物を純アルコールに溶解して50%溶液としてその0.64mlを使用した)添加して飼育した。フォルスコリンは *coleus forskohlii* のアセトン抽出物でタール状のものを使用し、抽出法はFig. 1に示した。飼育は各群個別ケージで行い、飲水(水道水)と飼料は自由摂取とし、室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $60 \pm 5\%$ 、1日12時間採光下(8:00a.m. ~ 8:00p.m. 明所)の空調動物室内で行った。飼育期間中は週2回体重を測定し、飼料摂取量は毎日の残量を投与量より差し引いて算出した。飼育期間最終日に1晩(9:00p.m. ~ 9:30a.m.)絶食させ、エーテル麻酔下で解剖採血し、肝臓および腹腔内脂肪(腎臓、睪丸、副睪丸周囲および壁側脂肪)を摘出して重量を測定し、血清の総コレステロール(以下T-chol)、HDL-コレステロール(以下HDL-chol)、中性脂肪(以下TG)、遊離脂肪酸(以下NEFA)、TBA値、 β -ヒドロキシ酪酸、肝臓のT-chol、総脂質(以下TL)、TG、TBA値、腹腔内脂肪組織のリパーゼ活性について測定した。

2. 血清成分の分析

T-cholおよびHDL-cholは和光純薬工業株のコレステロールEテストワコー(コレステロールオキシターゼ・DAOS法)とHDL-コレステロールワコー(ヘパリン・マンカン結合沈でん法)を用いた。TGは日本商事株のネスコートTGキット(L-グリセロール-3リン酸オキシターゼ・酵素法)、TBA値は内藤ら¹⁰⁾の方法で測定した。NEFAは和光純薬工業株のNEFA-Cテストワコー(ACS・ACOS法)を用いて測定した。 β -ヒドロキシ酪酸は株三和化学研究所のケトンテスト「三和」を用いた。

3. 肝脂質成分の分析

肝組織1gを用い、クロロホルム・メタノール(v/v 2:1)混液で磨砕抽出した後定容とし、試料溶液とした。肝TLは重量法で、肝T-cholはZak-Henly法¹¹⁾で、肝TGは和光純薬工業株のキット試薬TGテストワコー(アセチルアセトン比色法)を用いて測定した。肝TBA値は内藤ら¹⁰⁾の方法により測定した。

Table 1 Composition of the high carbohydrate diet

Ingredient	(%)
Corn starch ¹⁾	71
Casein ¹⁾	15
Soybean oil ²⁾	7
Cellulose ¹⁾	2
Mineral mixture ³⁾	4
Vitamin mixture ¹⁾	1

1) Japan Clea Co. Tokyo

2) Yonevama Reagent Industries Co. Ltd. Osaka

3) This was identical with Harper's mixture (Ref. 21) Oriental Yeast Co. Tokyo

4) Oriental Yeast Co. Tokyo (Ref. 22)

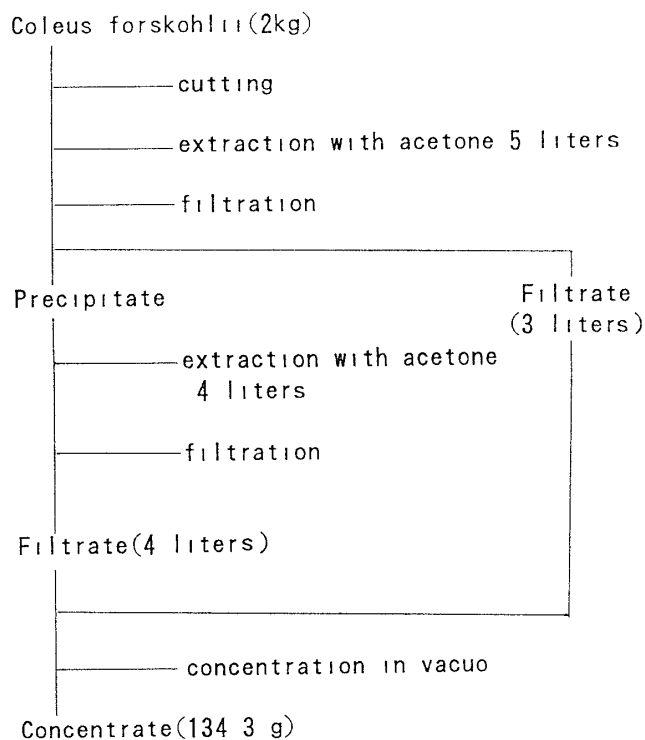


Fig. 1 Preparation of forskolin

4. 脂肪組織のリパーゼ活性の測定

脂肪組織 2 g に 0.025N NH₄OH 3 ml を加えてホモゲナイズし、12,000×g (4℃) で10分間遠心分離後表面の脂肪層を除き、上澄液を酵素液として、人工基質を用いる比濁法¹²⁾により測定した。活性は、脂肪組織 1 g 当たり 1 時間に生成する脂肪酸の μmol で示した。

5. 統計処理

データは Student の *t*-test を用いて群間の有意差 ($p < 0.05$) 検定を行った。

結 果

平均飼料摂取量、体重増加率、体脂肪率および脂肪組織のリパーゼ活性は Table 2 に、血清 T-*chol*, HDL-*chol*, TG, NEFA および β -ヒドロキシ酪酸は Table 3 に、肝 T-*chol*, TBA 値、肝 TL および TG は Table 4 に示した。

カルニチン群は対照群に比べて平均飼料摂取量が減少したため、体重増加率は低下傾向がみられ、体脂肪率は低下した。TG は血清および肝組織において有意に低下し、脂肪組織のリパーゼ活性は有意に増加した。T-*chol* は肝組織で増加した。TBA 値は血清では有意に低下したが肝組織では有意に増加した。NEFA と脂肪酸の β -酸化の指標といわれる β -ヒドロキシ酪酸はいずれも有意に増加し、HDL-*chol* および肝臓 TL は対照群と差がなかった。

カルニチン・フォルスコリン群は対照群に比較して、カルニチン群と同様に平均飼料摂取量が減少したため、体重増加率、体脂肪率が著しく低下し、体重増加率はカルニチン群よりさらに低下した。T-*chol* は血清、肝臓とも他の 2 群より増加し、HDL-*chol* は低下した。TG は血清、

Table 2 Effects of carnitine and forskolin on food intake, body weight gain, adipose tissue rate and lipase activity in rats fed the high carbohydrate diet.

Groups	Food intake ¹⁾	Body weight gain ²⁾	Adipose tissue	
	(g/day)	(%)	(%) ³⁾	Lipase activity ($\mu\text{mol/g/hr}$)
Control	227±0.4	146±2	40±0.2	0.68±0.07
Carnitine	180±0.6 ^a	128±2	24±0.2 ^a	0.92±0.02 ^a
Carnitine and forskolin	176±1.8 ^a	110±1.1 ^{a,b}	10±0.1 ^a	1.02±0.01 ^a

Values are means±SE for six rats

1) Average food intake of the experimental period (4 weeks)

2) Expressed as % of the initial body weight

3) Ratio to the final body weight

a Significantly different at $p < 0.05$ against control group as determined by Student's *t*-test

b Significantly different at $p < 0.05$ against carnitine group as determined by Student's *t*-test

Table 3 Effect of carnitine and forskolin on serum components in rats fed the high carbohydrate diet

Groups	Total cholesterol (mg/dl)	HDL cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	TBA value (nmol/ml)	NEFA (mEq/l)	β -Hydroxybutyric acid ($\mu\text{mol/l}$)
Control	608±3.1	480±2.1	699±2.7	4.2±0.2	0.80±0.05	1395±98
Carnitine	651±2.1	475±1.6	444±4.2 ^a	3.5±0.1 ^a	0.99±0.05 ^a	1894±150 ^a
Carnitine and forskolin	740±1.6 ^{a,b}	414±1.1 ^b	380±4.0 ^a	2.4±0.1 ^b	0.92±0.03	1707±118

Values are means±SE for six rats

a Significantly different at $p < 0.05$ against control group as determined by Student's *t*-test

b Significantly different at $p < 0.05$ against carnitine group as determined by Student's *t*-test

Table 4 Effects of carnitine and forskolin on liver lipids in rats fed the high carbohydrate diet

Groups	Total lipids (g/100g)	Cholesterol (g/100g)	Triglyceride (g/100g)	TBA value (nmol/g)
Control	9.0±0.4	0.65±0.03	5.3±0.4	81.1±1.5
Carnitine	8.3±0.4	0.78±0.03 ^a	4.4±0.3 ^a	103.0±2.4 ^a
Carnitine and forskolin	6.0±0.3 ^{a,b}	1.09±0.05 ^{a,b}	1.5±0.2 ^{a,b}	119.0±9.0 ^{a,b}

Values are means±SE for six rats

a Significantly different at $p < 0.05$ against control group as determined by Student's t-test

b Significantly different at $p < 0.05$ against carnitine group as determined by Student's t-test

肝臓とも対照群よりさらに低下した

TBA値はカルニチン群と同様に対照群に比べて血清では低下し、肝臓では増加し、カルニチン群と比べても同様の結果を示した。肝臓TLは他の2群より低下し、脂肪組織のリパーゼ活性は、カルニチン群と同様に対照群より上昇した

考 察

カルニチンは腎臓、筋肉などの組織でリジン、メチオニンから前駆物質であるフチロベタインまで合成された後、肝臓へ運ばれて水酸化を受けてその生合成が完成する¹³⁾ 他に食事など外因性からも得ることができる。その構造は分子内にカルホキシル基を有する四級アンモニウム塩である。長鎖脂肪酸はミトコンドリアマトリクス内で β -酸化を受けてエネルギー源となるが、単独ではミトコンドリア膜を通過できず、カルニチンと結合しアシルカルニチンの形ではじめてミトコンドリアマトリクス内へ移動することはよく知られている。著者らは、高脂肪食飼育ラットにカルニチンを投与した場合、脂質の酸化亢進や血清および肝臓のトリグリセリドの低下は運動負荷でさらに増幅することを報告した⁵⁾

そこで本研究では、高糖質食で飼育した肥満ラットにカルニチンを投与して脂肪の蓄積や肥満抑制など、脂質代謝系の改善効果があるかどうかを検討した

またフォルスコリンは、最近、膜酵素であるアデニル酸シクラーゼの活性化に関与していることが明らかにされた^{3) 14)} アデニル酸シクラーゼはATPよりcAMPを生成し、cAMP依存性プロテインキナーゼを介してホルモン感受性リパーゼを活性化し、脂肪の分解を促進する酵素である。フォルスコリンは、ラットやヒトの脂肪細胞に対してはグルカゴン、ACTH、エピネフリンなどのホルモンと比較して顕著にcAMPを増加させる作用が認められている^{8) 9)}

そこで著者らは、カルニチンと *Coleus forskohli* よりアセトン抽出したフォルスコリン (純度3.13%) を同時に投与した場合の脂質代謝への影響も検討した

対照群に比べてカルニチン群は平均飼料摂取量が低下したため、体重増加率および体脂肪率は低下し、体重増加率も低下傾向がみられ、体脂肪の蓄積抑制作用が認められたが、これが飼料摂取量の低下によるものか、今後 pair-fed 群を設けて検討する必要がある

血清NEFAはカルニチン群で増加した。血清NEFAの由来については、主に脂肪組織より放出され血中へ移送されるのが考えられるが¹⁵⁾、一部血中TGがリポプロテインリパーゼの作用により分解されたと思われる。従ってリパーゼ活性が上昇し、血中TGおよび体脂肪率が低下していることよりカルニチンによる脂肪の分解促進が推察される

またケトン体は肝臓において脂肪酸が β -酸化されてきたアセチルCoAより生成される。カルニチンの投与により β -酸化の指標である β -ヒドロキシ酪酸の濃度が増加を示し、肝臓

TGが低下していることにより、カルニチンによって脂肪利用が亢進するという報告¹⁾と同様に本実験でもカルニチンが脂質代謝を活性化させたと考えられる。血清TGの低下とリポプロテインリパーゼ活性の亢進の間には相関性のあることが知られており¹⁶⁾カルニチン群の血清TGの低下は脂肪組織のリパーゼ活性の上昇が関与しているものと思われるが、Maebashiら¹⁷⁾も本実験と同様にカルニチンによる血清TGの低下を認めている。すなわちカルニチン群は対照群に比べて体脂肪率、血清および肝臓TGが低下し、脂肪蓄積の抑制が認められた。TBA値は血清では低下し、肝臓では増加して血清から肝臓への移行が考えられる。TBA値は過酸化脂質の量をあらわしているが、過酸化脂質の毒性についてはすでに多くの研究が行われており、老化や成人病、また大腸粘膜細胞において発癌プロモーターとして作用するという説¹⁸⁾もある。高脂肪食においてはカルニチンが血清および肝臓のTBA値を低下させるなど⁵⁾、今回よりカルニチンの効果がより明らかだった。カルニチン・フォルスコリン群では、対照群に比べ血清および肝臓脂質についてカルニチン群と同様の傾向が得られた。また、カルニチン群と比べると、平均飼料摂取量は有意差がないにもかかわらず体重増加率は有意に低下し、体脂肪率も有意差はないが低下していることから、フォルスコリンによるホルモン感受性リパーゼの亢進によって脂肪が効率よく消費されたと考えられる。TGは血清では低下傾向、肝臓で有意に低下し、肝臓TLも低下したことからカルニチンにフォルスコリンを同時に投与することによって脂質代謝がさらに亢進したと思われる。対照群、カルニチン群に比べてT-cholは血清・肝臓とも有意に増加し、血清HDL-cholは有意に低下し、コレステロールについては好ましくない結果となった。既報²⁰⁾の高脂肪食での実験ではフォルスコリンによってHDL-cholは上昇し、肝臓T-cholは低下して、カルニチンによって血清および肝臓T-cholが低下し、コレステロール代謝の改善効果が認められた。しかし本実験では高糖質食で行ったため、コレステロールの合成系およびコレステロールから胆汁酸への代謝系への影響が高脂肪食、高コレステロール食の場合と相違することが推察され、TGへの効果のほうが顕著にみられたものと思われる。

要 約

8週齢Wistar系雄ラットを対照群、カルニチン群、カルニチン・フォルスコリン群に分け、高糖質食で4週間飼育し、最後の2週間にカルニチン(100mg/匹/日)、またはカルニチンおよびフォルスコリン(10mg/匹/日)を投与し、血清および肝臓脂質を測定した

カルニチン群は対照群と比べて平均飼料摂取量、体脂肪率、血清TG、TBA値、肝TGが低下し、NEFA、 β -ヒドロキシ酪酸、脂肪組織のリパーゼ活性は上昇して脂質の酸化亢進による脂肪蓄積抑制がみられた。カルニチン・フォルスコリン群は対照群およびカルニチン群に比べて体重増加率、血清TBA値、肝TL、TGは低下し、体脂肪率および血清TGも低下傾向がみられ、カルニチンとフォルスコリンを同時に投与することによってさらに脂肪の蓄積抑制効果がみられた。コレステロールは血清、肝臓とも上昇し、高脂肪食の場合と相違した。

最後に、試料を提供していただきました松平天然物研究所に感謝致します

文 献

- 1) 山川満：医学のあゆみ，**149**，367 (1989)
- 2) 前田純，山川満，藤田豊樹，三村芳和，西原寛，古屋清一，大原毅，近藤芳夫：日本静脈経腸栄養研究会誌，**1**，56 (1986)
- 3) 桐山正人：十全医会誌，**95**，619 (1986)
- 4) 嶋裕一：外科と代謝・栄養，**23**，45 (1989)

- 5) 辻原命子, 谷由美子: 家政誌, **48**, 5 (1997)
- 6) Siliprandi N, Lisa F D, Pieralisi G, Ripari P, Maccari F, Menabo R, Giamberardino M A and Vecchiet L *Biochem Biophys Acta*, **1034**, 17 (1990)
- 7) 佐野護 蛋白質 核酸 酵素, **28**, 943 (1983)
- 8) Ho, R-J, Shi, O-H *Biochem Biophys Res Comm*, **107**, 157 (1982)
- 9) Burns, T W, Langley, P E, Terry, B E, Beylund D B and Forte, L R *Life Sci*, **31**, 815 (1982)
- 10) 内藤周幸, 山中健 日本老年医学会誌, **15**, 187 (1978)
- 11) 上田英夫 臨床検査法, 398, 杏林書院 (1969)
- 12) 岩井美枝子 リパーゼとその基礎と応用, 56, 幸書房 (1991)
- 13) Tao, R C and Yosimura, N N *JPEN* **4**, 469 (1980)
- 14) Metzger, H and Lindner, E *Drug Research*, **31**, 1248 (1981)
- 15) 原一郎, 細谷憲政, 高橋善弥太, 内藤周幸 臨床脂質化学, 334, 医学書院 (1972)
- 16) Havel R J, Kane J P and Kashyap M L *J Clin Invest*, **52**, 32 (1973)
- 17) Maebashi M, Kawamura N, Sato M, Imamura A and Yoshinaga K *Lancet October*, **14**, 805 (1978)
- 18) 寺尾純二 化学と生物, **30**, 256 (1991)
- 19) 辻原命子, 谷由美子 栄食誌, **46**, 339 (1993)
- 20) 辻原命子, 谷由美子 名古屋女子大学紀要, **41**, 73 (1995)
- 21) Harper, A E *J Nutr*, **68**, 405 (1959)
- 22) Oriental Yeast Company Technical report, 43 (1969)