

原 著

## ラットにおける<sup>13</sup>C呼気分析を用いた大腸内短鎖脂肪酸の吸収と代謝の評価

若狭麻未\*<sup>1</sup> 三浦紀称嗣\*<sup>2</sup> 宮田富弘\*<sup>3</sup>

### 要 約

本研究では、ラットにおいて、短鎖脂肪酸（SCFAs）の大腸からの吸収や代謝について<sup>13</sup>C呼気分析法を用いて検討した。大腸内に<sup>13</sup>CでラベルされたSCFAsを投与するためにラットに回腸瘻孔を設置した。ラットを一晩絶食させた後、15 μmol～45 μmolの[1-<sup>13</sup>C]酢酸Na, [1-<sup>13</sup>C]プロピオン酸Na, あるいは[1-<sup>13</sup>C]酪酸Naを含む生理食塩水0.2 mlを経口投与あるいは大腸内投与した。呼気は一定間隔で収集し、呼気中<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>を赤外線分光分析装置で測定した。酢酸の経口投与あるいは大腸内投与後、直ちに<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>が増加し、その後徐々に減少した。呼気中<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の最大値（C<sub>max</sub>）は、経口投与と大腸内投与の両方で用量依存的に増加したが、経口投与より大腸投与の方が有意に低値を示した。また、C<sub>max</sub>に到達するまでの時間（T<sub>max</sub>）は、経口投与に比べ大腸内投与で有意に遅延した。酢酸と酪酸に比べプロピオン酸ではC<sub>max</sub>が有意に高値を示し、大腸からの吸収や代謝過程にSCFAs間で大きな違いがあることが示唆された。測定開始日から3週間後までの実験期間において、C<sub>max</sub>にはSCFAs間における差異が認められたが、いずれのSCFAでもC<sub>max</sub>はラットの成長に伴って低下する傾向にあった。本研究の結果は、<sup>13</sup>C呼気分析法が生体位における大腸からのSCFAsの吸収や代謝の評価に有用であることを示している。

### 1. 緒論

短鎖脂肪酸（short chain fatty acids, 以下SCFAs）は、大腸内において腸内細菌による食物繊維の嫌氣的発酵によって生成する。生成したSCFAsは吸収され、大腸上皮細胞のエネルギー源になるとともに、全身のエネルギー基質として利用されるか、糖新生や脂肪合成の基質になる<sup>1,3)</sup>。生成されたSCFAsのうち、大腸から吸収されて宿主のエネルギー源となるのはおもに酢酸、プロピオン酸、酪酸であり、吸収後はさまざまな代謝を経て最終的にはH<sub>2</sub>OとCO<sub>2</sub>になる。

疾病や手術に伴う消化管機能や代謝の異常を調べる方法として<sup>13</sup>Cで標識された標識化合物（以下<sup>13</sup>C標識化合物）を用いた<sup>13</sup>C呼気分析がある。安定同位体を使う<sup>13</sup>C呼気分析法は、呼気を検体として利用できるため非侵襲であり、ヒトに対しても応用が可能であるなどの利点がある。さらに、

<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>存在比の変化を測定する<sup>13</sup>C呼気分析は、呼気を直接測定できるため前処理が不要であり、分析機器も比較的安価であることから、種々の臨床検査に応用されている。例えば、<sup>13</sup>C-尿素呼気試験法がピロリ菌の感染診断法として確立している。この<sup>13</sup>C呼気分析法は、投与した<sup>13</sup>C標識化合物が胃からの排出、小腸からの吸収、代謝、肺からの排泄といういくつかの過程を経て<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>として呼気中に現れ、呼気中<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>比が増加することを利用して<sup>4,5)</sup>。また、<sup>13</sup>C呼気分析法のラットにおける実験系が考案され、薬物の腸管吸収などが調べられている<sup>6,9)</sup>。

SCFAsは大腸から吸収された後、代謝されてCO<sub>2</sub>を生成することから、<sup>13</sup>Cで標識されたSCFAsを用いた<sup>13</sup>C呼気分析法によって、生体位では不明であった大腸からのSCFAsの吸収や代謝などをより生理的に近い状態で調べることが可能であると考

\*1 川崎医療福祉大学大学院 医療技術学研究科 健康科学専攻 \*2 川崎医療福祉大学大学院 医療技術学研究科 臨床栄養学専攻 \*3 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科  
(連絡先) 若狭麻未 〒791-0295 愛媛県東温市志津川 愛媛大学医学部附属病院栄養部  
E-mail: wakasa.asami.hj@ehime-u.ac.jp

えられる。しかしながら、 $^{13}\text{C}$  呼気分析法を SCFAs 研究に応用した研究はほとんどない。本研究では、ラットにおける生体位での SCFAs の大腸からの吸収や代謝を $^{13}\text{C}$  呼気分析法を用いて検討するとともに、この分析方法の有用性を検討することを目的とした。なお、 $^{13}\text{C}$  SCFA の大腸内投与では、回腸瘻孔手術を施したラットを用いた。

## 2. 実験方法

### 2.1 動物実験

本研究で行ったすべての動物実験は、川崎医療福祉大学動物実験委員会の承認（承認番号：14-002, 15-001）を受けて行った。

#### 2.1.1 実験動物、飼育および実験飼料

実験動物は、Wistar 系雄ラット（体重約180～200 g, 日本クレア, 東京）を用いた。飼料には AIN93G に準拠した組成（ $\alpha$ -コーンスターチ 53 %, カゼイン 20 %, スクロース 10 %, 大豆油 7 %, セルロース 5 %, ミネラル混合 4 %, ビタミン混合（酒石酸コリンを含む）1 %）の精製飼料を用いた。飲料水には水道水を与えた。飼料と飲料水は、毎日新鮮なものに取り換え、自由に摂取させた。ラットは、室温  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12時間明暗サイクル（明期：8:00～20:00, 暗期：20:00～8:00）の環境下で、床面と前面がステンレス製メッシュの個別ケージで飼育した。 $^{13}\text{C}$  呼気分析の際は、前日の夕方（17:00）から絶食させた。

#### 2.1.2 回腸瘻孔手術術式（回腸瘻孔ラット作製）

回腸瘻孔手術方法は Sakata らの方法<sup>10)</sup> に準じた（図1）。一晚絶食させたラット（体重約180～200 g, 実験1および2：n=5, 実験3：n=20）に、ペントバルビタールナトリウム（ソムノベンチル：共立製薬株式会社, 東京）を40 mg/kg 体重を腹腔内投与し、麻酔した。剃毛後術野を消毒したのち正中線に沿って腹部を切開した。回盲接合部から頭側約5 cm の位置で回腸を切断した。回腸断端頭側を回盲接合部から約2 cm 頭側回腸に吻合した。腹壁の瘻孔設置部（筋層と皮膚）を円形（5 mm  $\phi$ ）に切開した。回腸断端を腹壁開口部で皮膚と腹壁筋層に縫着した。開口部よりゾンデを挿入し、盲腸内への通過を確認したのち、開腹部を閉鎖した。手術後の感染を防ぐためにマイシリンゾル明治（Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京）0.01 ml を筋肉注射し、一晚絶食とした。

予備実験において、回腸瘻孔よりゾンデを用いて大腸内容物を吸引採取し、盲腸内の pH を pH メーター（HORIBA Scientific, 京都）にて測定した結果、pH  $8.0 \pm 0.1$ であった。また、回腸瘻孔よりゾ

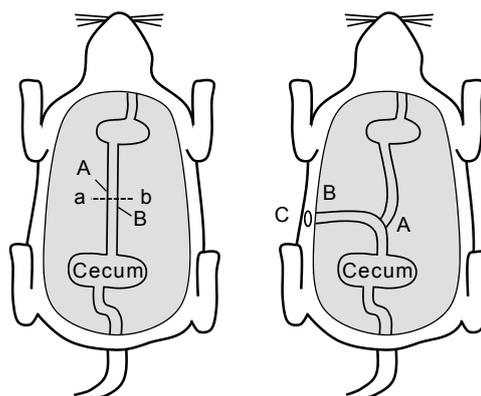


図1 回腸瘻孔手術

回盲接合部から頭側約5 cm の位置（A と B の間）で回腸を切断した。回腸断端頭側 A を回盲接合部から約2 cm 頭側回腸に吻合した。腹壁の瘻孔設置部（筋層と皮膚）を円形（5 mm  $\phi$ ）に切開し、回腸断端 B を腹壁開口部で皮膚と腹壁筋層に縫着した。腹壁開口部（瘻孔）よりゾンデを挿入することで、大腸内へ SCFAs を直接投与できる。

ンデを用いて大腸内にブリリアントブルー（SIGMA CHEMICAL COMPANY, 東京）を投与し、麻酔下で開腹して盲腸への注入を確認した。

#### 2.1.3 $^{13}\text{C}$ 標識化合物

$^{13}\text{C}$  標識化合物（Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA）には、1位の炭素を $^{13}\text{C}$  で標識した[1- $^{13}\text{C}$ , 99 %]酢酸ナトリウム（以下[1- $^{13}\text{C}$ ]酢酸 Na）、[1- $^{13}\text{C}$ , 99 %]プロピオン酸ナトリウム（以下[1- $^{13}\text{C}$ ]プロピオン酸 Na）および[1- $^{13}\text{C}$ , 99 %]酪酸ナトリウム（以下[1- $^{13}\text{C}$ ]酪酸 Na）を用いた。

#### 2.1.4 投与液の調製

大腸内での SCFAs の生理的な範囲内である75 mM となるように、[1- $^{13}\text{C}$ ]酢酸 Na、[1- $^{13}\text{C}$ ]プロピオン酸 Na あるいは[1- $^{13}\text{C}$ ]酪酸 Na を生理食塩水に溶解して調製した。なお、[1- $^{13}\text{C}$ ]酢酸 Na 溶液の pH は7.6、[1- $^{13}\text{C}$ ]プロピオン酸 Na では pH 7.7、[1- $^{13}\text{C}$ ]酪酸 Na では pH 8.0であった。

#### 2.1.5 呼気ガス収集装置の構成および呼気 $\Delta^{13}\text{CO}_2\%$ 測定

呼気ガス収集装置の構成は Uchida らの方法<sup>6)</sup> に準じて、本研究では機器の一部を変更して用いた。ラットの呼気を収集するデシケーター（容量9 L）には、側面に空気吸入口（底面からの高さ12 cm）と呼気ガス吸引口（底面からの高さ4 cm）を設け、デシケーター内部の底面に渦巻き状の呼気ガス吸引チューブをセットした。また、中敷きを底面から高さ6 cm に設置した。デシケーター内では、ラット

は中敷き上におり、排出された呼気中の  $\text{CO}_2$  は中敷きより下部に溜まる。デシケーター内の呼気ガス吸引チューブを、呼気ガス吸引口より外部の吸引ポンプに接続した。吸引速度は110 ml/分に設定した。ポンプによって吸引した呼気ガスは、一定時間毎（投与直後から5分、10分、15分、20分、25分、30分、40分、50分、60分、90分、120分後）におよそ150~200 ml を呼気採取バッグ（呼気採取バッグ20、大塚製薬株式会社、大阪）に収集した。赤外線分光分析装置 POC one（大塚製薬株式会社）を用いて、呼気ガス中の  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  比から、 $^{13}\text{CO}_2$  (%) の変化量（以下  $\Delta^{13}\text{CO}_2\%$ ）を測定した。また、 $\Delta^{13}\text{CO}_2\%$  の最大値を  $C_{\max}$  (%) とし、 $C_{\max}$  に到達した時間を  $T_{\max}$  (min) と示した。なお、基準  $\text{CO}_2$  ガスとして、市販の95%  $\text{O}_2$  /5%  $\text{CO}_2$  標準ガスを用いた。

### 2. 1. 6 $[1-^{13}\text{C}]$ 酢酸 Na の経口投与と大腸内投与の比較（実験1）

$^{13}\text{C}$  呼気分析前に、ラットをデシケーター内で30分間順応させた。健康ラット ( $n=5$ ) に、 $[1-^{13}\text{C}]$  酢酸 Na 溶液をプラスチックゾンデ（ディスポーザブル・フィーディングニードル、先端径：2.4 mm  $\phi$ 、チューブサイズ：1.5  $\phi \times 85$  mm、株式会社アイシス、大阪、以下 ゾンデ）を用いて経口投与した（経口投与群）。回腸造瘻ラット ( $n=5$ ) には、 $[1-^{13}\text{C}]$  酢酸 Na 溶液をゾンデにより造瘻部から大腸内に投与した（大腸投与群）。投与量は15  $\mu\text{mol}/0.2$  ml/体重250 g とした（投与時の体重は、経口投与では  $192 \pm 29$  g、大腸内投与では  $252 \pm 4$  g であった）。投与後、直ちにデシケーター内にラットを戻し、 $^{13}\text{C}$  呼気分析を行った。

### 2. 1. 7 $[1-^{13}\text{C}]$ 酢酸 Na の投与量と $C_{\max}$ の用量依存性（実験2）

投与量が15  $\mu\text{mol}$  ~ 45  $\mu\text{mol}$  となるように、それぞれ0.2 ml、0.4 ml あるいは0.6 ml の  $[1-^{13}\text{C}]$  酢酸 Na 溶液をゾンデによって経口投与あるいは大腸内投与し、実験1と同様にして $^{13}\text{C}$ 呼気分析を行った。なお、盲腸内には酢酸がすでに存在していることから、盲腸内環境への影響を考慮して、投与量は45  $\mu\text{mol}$  を上限とした（投与時の体重は、経口投与では170~280 g、大腸内投与では230~280 g であった）。なお、繰り返し投与する場合は2日以上間隔を空けた。

### 2. 1. 8 $[1-^{13}\text{C}]$ SCFA の大腸内投与後の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ の経時的変化（実験3）

回腸造瘻ラットを各群の平均体重が等しくなるように3群（5匹/群）に分け、それぞれに精製飼料を与えて3週間飼育した。測定は、測定開始時（Week0）から3週間（Week3）まで1週間毎に行い、測定時

間は120分までとした。 $[1-^{13}\text{C}]$  酢酸 Na、 $[1-^{13}\text{C}]$  プロピオン酸 Na または  $[1-^{13}\text{C}]$  酪酸 Na を含む投与液（0.2 ml/体重250 g）を大腸内に投与し、実験1と同様にして $^{13}\text{C}$ 呼気分析を行った。投与時の体重は、 $[1-^{13}\text{C}]$  酢酸 Na 群では200~310 g、 $[1-^{13}\text{C}]$  プロピオン酸 Na 群では180~280 g、 $[1-^{13}\text{C}]$  酪酸 Na 群では220~320 g であった。

### 2. 1. 9 統計処理

結果は平均値  $\pm$  SEM（標準誤差）で示した。なお、 $^{13}\text{C}$  呼気分析の測定結果は体重250 g あたりに換算した値を用いた。各データは、統計処理ソフト SPSS (Ver. 22) を用いて、Mann-Whitney U test（実験1）あるいは一元配置分散分析（ANOVA）後、必要に応じて Tukey-Kramer 法（実験2および3）を用いて平均値を比較した。いずれの統計結果も危険率が5%未満 ( $p < 0.05$ ) を有意とみなした。

## 3. 結果

### 3. 1 術後の体重変化と飼料摂取量

回腸瘻孔手術後は、術後1日目には手術と絶食の影響により体重が減少した。飼料摂取を再開させた2日目よりラットは飼料を摂食し、それに伴い体重が増加した。実験には体重増加量ならびに飼料摂取量が十分に回復した術後7日目以降のラットを用いた（図2-A,B）。

### 3. 2 $[1-^{13}\text{C}]$ 酢酸 Na の経口投与と大腸内投与の比較（実験1）

結果を図3と表1に示した。経口投与において、15  $\mu\text{mol}$  の  $[1-^{13}\text{C}]$  酢酸 Na を投与すると、直ちに呼気中に  $^{13}\text{CO}_2$  が出現して増加し、 $C_{\max}$  に達した後、徐々に低下した。大腸内に15  $\mu\text{mol}$  の  $[1-^{13}\text{C}]$  酢酸 Na を投与しても、直ちに  $^{13}\text{CO}_2$  が出現して増加し、 $C_{\max}$  に達した後、徐々に低下したが、 $C_{\max}$  は経口投与に比べて大腸投与では有意に低値を示した。また、 $C_{\max}$  の到達時間 ( $T_{\max}$ ) は、経口投与の約38分に比べ大腸投与では約50分であり、約12分遅かった。

### 3. 3 $[1-^{13}\text{C}]$ 酢酸 Na の投与量と $C_{\max}$ の用量依存性（実験2）

結果を図4に示した。 $[1-^{13}\text{C}]$  酢酸 Na の投与量を15  $\mu\text{mol}$  ~ 45  $\mu\text{mol}$  まで段階的に変えて測定すると、経口投与あるいは大腸内投与のどちらも投与量に応じて  $C_{\max}$  が増加した。 $C_{\max}$  をプロットすると直線的な用量依存性が確認できた。大腸内投与の  $C_{\max}$  は経口投与の約50~60%であった。

### 3. 4 $[1-^{13}\text{C}]$ SCFA の大腸内投与後の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ の経時的変化（実験3）

結果を図5と図6に示した。大腸内に15  $\mu\text{mol}$  の  $[1-^{13}\text{C}]$  酢酸 Na、 $[1-^{13}\text{C}]$  プロピオン酸 Na または  $[1-$

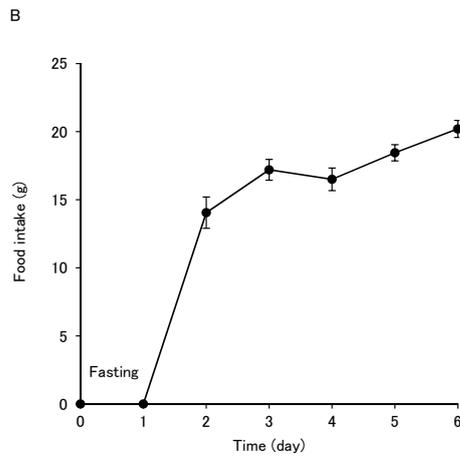
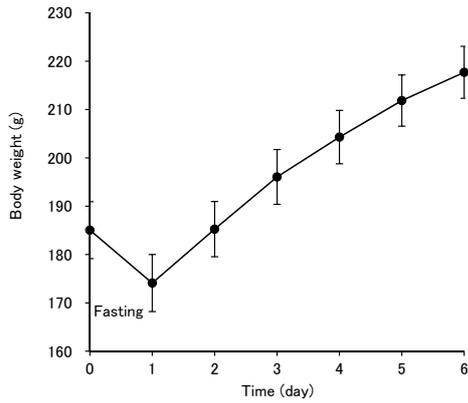


図2 回腸造瘻手術後の体重および飼料摂取量の変化

A : 体重, B : 飼料摂取量  
Means ± SEM (実験 3:n=20) 手術日を 0 日とした。

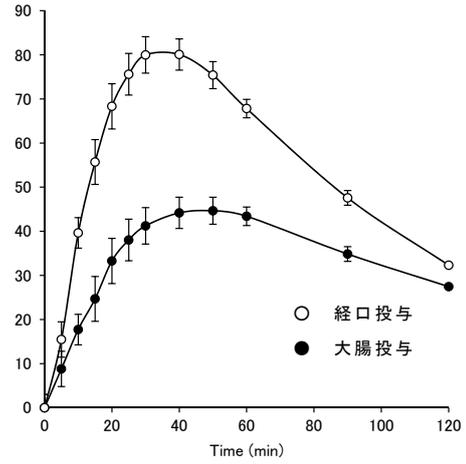


図3 経口投与あるいは大腸内投与した[1-<sup>13</sup>C]酢酸 Na 由来の呼気中 <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> 出現パターン

○ : 経口投与, ● : 大腸投与  
Means ± SEM (n=4~5)

表1 [1-<sup>13</sup>C]酢酸 Na の経口投与あるいは大腸内投与後に出現した呼気中<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の C<sub>max</sub> および T<sub>max</sub>

|       | C <sub>max</sub> (%) | T <sub>max</sub> (min) |
|-------|----------------------|------------------------|
| 経口投与  | 81.2 ± 1.9           | 37.5 ± 2.5             |
| 大腸内投与 | 40.6 ± 5.4*          | 50.0 ± 3.2*            |

Means ± SEM (n=4~5)

\*は, p<0.05で有意差があることを示している。

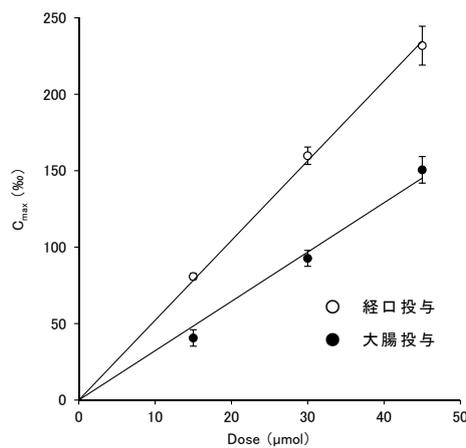


図4 経口投与あるいは大腸内投与した[1-<sup>13</sup>C]酢酸 Na の投与量と C<sub>max</sub> の関係

○ : 経口投与 (y=5.218x, R<sup>2</sup>=0.998),  
● : 大腸投与 (y=3.228x, R<sup>2</sup>=0.982)  
Means ± SEM (n=4~5)

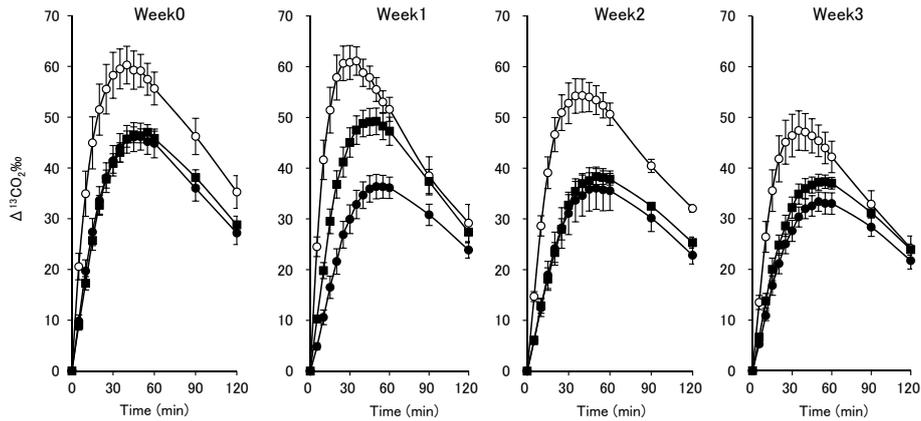


図5 大腸内に投与した[1-<sup>13</sup>C]SCFAの呼気中<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>出現パターンの経時的変化

●：酢酸 Na, ○：プロピオン酸 Na, ■：酪酸 Na

Means ± SEM (n=5 ~ 8)

Week0：測定開始時, Week1：測定開始から1週間目, Week2：測定開始から2週間目, Week3：測定開始から3週間目

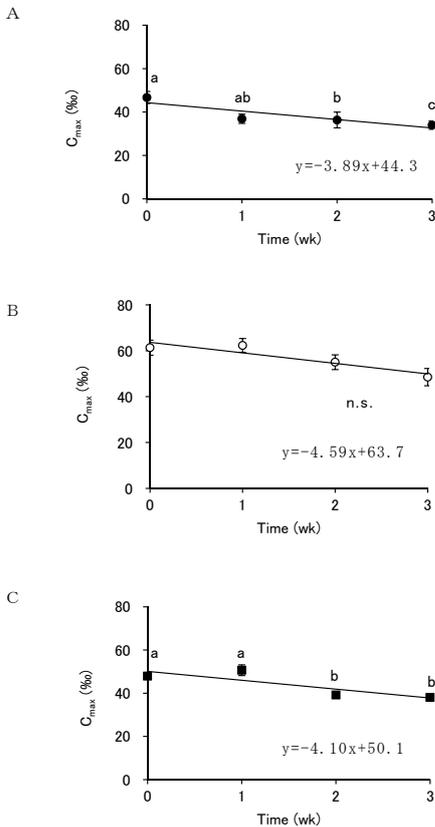


図6 大腸内に投与した[1-<sup>13</sup>C]SCFAのC<sub>max</sub>の経時的変化

A ● 酢酸 Na  $y = -3.89x + 44.3$ ,  $R^2 = 0.791$

B ○ プロピオン酸 Na  $y = -4.59x + 63.7$ ,  $R^2 = 0.852$

C ■ 酪酸 Na  $y = -4.10x + 50.1$ ,  $R^2 = 0.714$

異なるアルファベットは、C<sub>max</sub>において $p < 0.05$ で有意差があることを示している。n.s.はC<sub>max</sub>において有意差がないことを示している。

Means ± SEM (n=5 ~ 8)

<sup>13</sup>C]酪酸 Naを投与すると、いずれも直ちに<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>が出現して増加し、C<sub>max</sub>に達した後、徐々に低下した。Week0において、C<sub>max</sub>は酢酸46.7±2.8%、プロピオン酸61.4±3.3%、酪酸47.9±1.5%であり、酢酸と酪酸に比べてプロピオン酸は有意に高値を示した。また、T<sub>max</sub>は酢酸47.5±2.8 min、プロピオン酸42.0±4.6 minならびに酪酸52.5±2.5 minであり、プロピオン酸で速い傾向にあるものの、有意な差はなかった。Week1のC<sub>max</sub>を比較すると、プロピオン酸>酪酸>酢酸>の順で有意に高くなっていった。Week2およびWeek3ではWeek0と同様の傾向が観察された。酢酸と酪酸のC<sub>max</sub>はWeek0と比較してWeek2以降で有意に低値を示した。一方、プロピオン酸においてはC<sub>max</sub>に低下傾向があるもののWeek0からWeek3のC<sub>max</sub>に有意な差はなかった。

#### 4. 考察

<sup>13</sup>C呼気分析法を応用し、回腸瘻孔から大腸内に<sup>13</sup>Cで標識されたSCFAsを注入し、呼気中への<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の出現により大腸からの吸収や利用を評価することができるかをラットで検討した。

本研究で用いた回腸瘻孔手術(図1)では、瘻孔より投与された試料が生理的な消化物の流れに沿って、大腸内に流入するように消化管を吻合している。ブリリアントブルーを瘻孔より投与したところ、小腸側に逆流することなく盲腸内に投与されていることが確認された(データは示していない)。これにより、<sup>13</sup>C標識化合物を大腸内に投与した後に呼気中出现する<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>を測定することで、大腸内に投与した試料の大腸での吸収や吸収後の代謝を評価する

ことができると考えられる。なお、 $^{13}\text{C}$  呼気分析は  $[^{13}\text{C}]$ SCFA が吸収後に代謝されて  $^{13}\text{CO}_2$  へと変換されることを利用しているため、分解系を測定する分析である。摂食後のように合成系が優位な生理状態下では、吸収された  $[^{13}\text{C}]$ SCFA が脂肪合成などに利用されてしまうため呼気に出現する  $^{13}\text{CO}_2$  は大きく変動すると考えられる。そのため、今回は絶食時での測定とした。

実験1および実験2では、経口投与した場合と大腸内投与した場合を比較した。本研究で用いた  $[^{13}\text{C}]$ 酢酸 Na は、胃内では吸収されず、小腸内に流入して直ちに吸収され、速やかに代謝されて  $^{13}\text{CO}_2$  として呼気中に排泄される。 $[^{13}\text{C}]$ 酢酸 Na を経口投与すると、投与後直ちに呼気中に  $^{13}\text{CO}_2$  が出現し約 38分で  $C_{\max}$  に達し、その後徐々に減少した。経口投与では、 $[^{13}\text{C}]$ 酢酸 Na の投与量と  $C_{\max}$  の関係をプロットすると直線性が得られ、 $[^{13}\text{C}]$ 酢酸 Na 投与量と  $C_{\max}$  との間に用量依存性が観察された。Uchida らによるラットでの  $^{13}\text{C}$  酢酸 Na を用いた呼気ガス分析の研究<sup>11)</sup>において、同様な結果が報告されている。

大腸内投与においては、投与後直ちに呼気中に  $^{13}\text{CO}_2$  が出現したが、 $C_{\max}$  に達するには約50分かかった。また、大腸内投与における  $C_{\max}$  は胃内投与における最大値の約50~60%の値となった。小腸を経由しない大腸内直接投与では、胃内投与に比べて吸収・代謝が緩やかであると考えられる。また、大腸内投与においても  $[^{13}\text{C}]$ 酢酸 Na の投与量と  $C_{\max}$  の関係をプロットすると直線性が得られた。この結果は、大腸内投与においても用量依存性があることを示しており、大腸では SCFAs の大部分が拡散によって吸収されるというこれまでの知見と一致している<sup>12)</sup>。ヒト結腸への SCFAs 還流実験では、90 mM まで直線的に吸収されると報告されている<sup>13)</sup>。ヒト直腸に SCFAs (酢酸・プロピオン酸・酪酸) のカクテルを注入して一定時間内の吸収量を調べた研究では、吸収量と注入溶液の SCFAs 濃度と正の相関が認められ、SCFAs の吸収は単純拡散の割合が大きい可能性が指摘されている<sup>14)</sup>。SCFAs の pKa は 4.8 付近であることから、体内や大腸管腔内の生理的な pH (pH 8 付近) では SCFAs の 98~99% がアニオンで存在する<sup>15)</sup>。非解離型の SCFAs は受動拡散によって吸収される<sup>16)</sup>。本研究で用いた  $[^{13}\text{C}]$ 酢酸 Na 投与液の pH は 7.6 であり、予備実験において盲腸内 pH は  $8.0 \pm 0.1$  であったことから、 $[^{13}\text{C}]$ 酢酸 Na は受動拡散によって吸収されたと考えられる。本実験により、ラットでもヒトと同様の結果が得られたことから、回腸造瘻ラットにおける

大腸内投与モデルはヒトでの SCFAs の大腸内吸収のモデルになると考えられる。

実験3では、大腸内に  $[^{13}\text{C}]$ 酢酸 Na、 $[^{13}\text{C}]$ プロピオン酸 Na あるいは  $[^{13}\text{C}]$ 酪酸 Na を投与した。Week0 において呼気への  $^{13}\text{CO}_2$  の出現パターンが SCFAs 間で異なっており、 $C_{\max}$  は酢酸と酪酸に比べプロピオン酸が有意に高値を示した。Week0 から Week3 までの変化では、酢酸と酪酸では Week0 と比較して Week2 以降で有意に低値を示した。一方、プロピオン酸において、 $C_{\max}$  は Week0 から Week3 まで  $C_{\max}$  に有意な差はなかった。 $^{13}\text{CO}_2$  の出現パターンは SCFAs 間で差異があるものの、すべての  $C_{\max}$  は成長に伴い低下する傾向にあった。大腸に投与された酢酸と酪酸に比べプロピオン酸では、吸収や代謝過程に大きな違いがあることが示唆された。この違いが生じた要因として、SCFAs の吸収機構あるいは吸収後の代謝過程の差異が考えられる。本研究で用いた投与液の pH は、 $[^{13}\text{C}]$ 酢酸 Na では pH 7.6、 $[^{13}\text{C}]$ プロピオン酸 Na では pH 7.7、 $[^{13}\text{C}]$ 酪酸 Na では pH 8.0 であり、これらの SCFAs は大腸内では大部分が解離型であることから、受動拡散によって吸収されたと考えられる。解離型の SCFAs はモルモットの近位部結腸から酢酸、プロピオン酸、酪酸の約 50% が吸収される<sup>17)</sup>。

動物の嫌氣的発酵部位である大腸内には SCFAs が 50~200 mM の間で検出される<sup>18)</sup>。投与液の  $[^{13}\text{C}]$ SCFA 濃度は 75 mM であり、生理的な範囲である。大腸内に存在している SCFAs の割合は酢酸 60~75%、プロピオン酸 15~25%、酪酸 10~15% であり、酢酸が多くを占めている<sup>19)</sup>。大腸内への  $[^{13}\text{C}]$ SCFA 投与量は  $15 \mu\text{mol}$  とわずかであるため、大腸内に存在していた SCFAs によって希釈されたために吸収に差異が生じた可能性もある。SCFAs は大腸から吸収されると上皮細胞でエネルギー源として消費され、残りの大部分が肝臓で代謝され、一部が末梢組織で利用される<sup>20)</sup>。本研究ではラットを絶食させているため、 $^{13}\text{CO}_2$  出現パターンは SCFAs のエネルギーに変換されるまでの差異を反映していると考えられる。

また、大腸から吸収された酢酸や酪酸のエネルギー寄与が成長の影響を受ける可能性が今回の実験で示された。ラットの成長に伴い肝臓の重量も大きくなるので、これらの SCFAs の代謝能力も変化すると考えられる。酪酸については、1週目で高くなり、以後は酢酸と同程度になった。1週目の変化の理由は不明である。プロピオン酸は酢酸や酪酸に比べて、 $C_{\max}$  が有意に高く、 $T_{\max}$  も速い。プロピオン酸は炭素数3の奇数炭素脂肪酸であり、偶数炭素

の酢酸と酪酸とは代謝経路が異なっている。酢酸や酪酸がアセチル-CoA を経て TCA 回路で  $\text{CO}_2$  として処理されるのに対し、プロピオン酸はスクシニル-CoA を経て TCA 回路に入り、糖新生へと向かう。この代謝の違いが関与している可能性がある。

今回の実験では、 $^{13}\text{C}$  呼気分析法を用いて、大腸内に投与した  $[1-^{13}\text{C}]$ SCFA 由来の  $^{13}\text{CO}_2$  を測定することにより、大腸から吸収された SCFAs の代謝を

生体位で検討することが可能であることを示した。その結果、酢酸と酪酸に比べプロピオン酸で大腸からの吸収や代謝に差異があることが明らかになった。しかしながら、 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  存在比を測定する  $^{13}\text{C}$  呼気分析法では定量的な分析ができないというデメリットもある。大腸からの吸収段階と吸収後の代謝段階とで、それぞれの差異を詳細に検討するためには定量的な分析が必要である。

## 文 献

- 1) 原健次：生理活性脂質 短鎖脂肪酸の生化学と応用。幸書房，東京，2000。
- 2) 坂田隆，市川宏文：短鎖脂肪酸の生理活性。日本油化学会誌，**46**(10)，1205-1212，1997。
- 3) 矢島高二：大腸からの短鎖脂肪酸の吸収。Hindgut Club Japns 編，消化管の栄養・生理と腸内細菌，アニマル・メディア社，東京，33-38，2011。
- 4) 中田浩二，川崎成郎，仲吉朋子，羽生信義，柏木秀幸，矢永勝彦： $^{13}\text{C}$  呼気ガス診断の臨床応用—その現状と展望—。RADIOISOTOPES，**56**(10)，629-636，2007。
- 5) 石井敬基：安定同位体呼気試験の消化器疾患診断と治療効果への応用。RADIOISOTOPES，**63**，567-584，2014。
- 6) Uchida M and Shimizu K： $^{13}\text{C}$ -acetic acid is more sensitive than  $^{13}\text{C}$ -octanoic acid for evaluating gastric emptying of liquid enteral nutrient formula by breath test in conscious rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*，**30**(3)，487-489，2007。
- 7) Uchida M and Yoshida-Iwasaki K：Simultaneous measurement of gastric emptying and gastrocecal transit times in conscious rats using a breath test after ingestion of  $[1-^{13}\text{C}]$  acetic acid and lactose-  $[^{13}\text{C}]$  ureide. *Journal of Smooth Muscle Research*，**48**(4)，105-114，2012。
- 8) 内田勝幸，野坂千裕，清水喜美子：ラットを用いた呼気テストによる胃排出機能の評価および Wagner-Nelson 法による解析。Digestion & Absorption，**31**(1)，18-20，2009。
- 9) 内田勝幸，最上おりえ：ペプチドの消化・吸収における加齢の影響：F344 ラット呼気試験による評価。Digestion & Absorption，**30**(2)，35-37，2008。
- 10) Sakata T：Effects of indigestible dietary bulk and short chain fatty acids on the tissue weight and epithelial cell proliferation rate of the digestive tract in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*，**32**(4)，355-362，1986。
- 11) Uchida M, Endo N and Shimizu K：Simple and noninvasive breath test using  $^{13}\text{C}$ -acetic acid to evaluate gastric emptying in conscious rats and its validation by metoclopramide. *Journal of Pharmacological Sciences*，**98**，388-395，2005。
- 12) Engelhardt Wv：Absorption of short-chain fatty acids: mechanisms and regional differences in the large intestine. In Silverman E, *Short-chain fatty acids: metabolism and clinical importance*, Published by Ross Laboratories, Columbus, 60-62, 1991。
- 13) Rupp in H, Bar-Meir S, Serge KH, Wood CM and Schmitt MG：Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology*，**78**，1500-1507，1980。
- 14) Vogt JA and Wolever TMS：Fecal acetate is inversely related to acetate absorption from the human rectum and distal colon. *Journal of Nutrition*，**133**，3145-3148，2003。
- 15) Fukushima M：Chemistry of short-chain fatty acids. In Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T eds, *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids*, Cambridge University Press, Cambridge, 15-34, 1995。
- 16) Engelhardt Wv：Absorption of short-chain fatty acids from the large intestine. In Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T eds, *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids*, Cambridge University Press, Cambridge, 149-170, 1995。
- 17) Engelhardt Wv, Burmese M, Hansen K, Becker G and Rechkemmer G：Effects of amiloride and ouabain on short-chain fatty acids transport in guinea-pig large intestine. *Journal of Physiology*，**460**，455-466，1993。
- 18) Hume ID：Flow dynamics of digesta and clonic fermentation. In Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T eds, *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids*, Cambridge University Press, Cambridge, 119-

132, 1995.

- 19) Bugaunt M : Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **86B**, 439-472, 1987.
- 20) Livesey G and Elia M : Short-chain fatty acids as an energy source in the colon: metabolism and clinical implications. In Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T eds, *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids*, Cambridge University Press, Cambridge, 427-481, 1995.

(平成28年5月18日受理)

## Evaluation for Absorption and Metabolism of Short Chain Fatty Acids in the Large Intestine, Using <sup>13</sup>C-Breath Test in Rats

Asami WAKASA, Kiyoshi MIURA and Tomihiro MIYADA

(Accepted May 18, 2016)

**Key words** : short chain fatty acids, acetate, propionate, <sup>13</sup>C-breath test, stable isotopes

### Abstract

Rats were established an external ileal fistula for administration of <sup>13</sup>C-labeled short chain fatty acids (SCFAs) to the large intestine. Rats received intracecal infusion or oral infusion of 15 μmol of <sup>13</sup>C-acetate. The <sup>13</sup>C breath test was performed. An expired air was collected at appropriate intervals and a concentration of <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> in the air was measured with an infrared analyzer. The expired <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> increased rapidly after the intracecal infusion or the oral infusion of the <sup>13</sup>C-acetate, and then decreased gradually. Maximum concentration (C<sub>max</sub>) of <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> in the expired air was significantly lower in the intracecal infusion than in the oral infusion. The C<sub>max</sub> increased in a dose dependent manner in both the intracecal infusion and the oral infusion. When rats received intracecal infusion of the <sup>13</sup>C-acetate, <sup>13</sup>C-propionate or <sup>13</sup>C-butyrate, the C<sub>max</sub> was significantly higher in the <sup>13</sup>C-propionate than in the others. The C<sub>max</sub> in SCFAs except for propionate tended to decline during the experimental 3 weeks. These results suggest that absorption and post-absorptive metabolism of propionate differ from those of acetate and butyrate in the large intestine. The <sup>13</sup>C breath test may be useful in studies on absorption and metabolisms of SCFAs in the whole body.

Correspondence to : Asami WAKASA

Division of Nutrition, Ehime University Hospital

School of Medicine, Ehime University

Toon, 791-0295, Japan

E-mail : wakasa.asami.hj@ehime-u.ac.jp

(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.26, No.1, 2016 49 – 57)