

## 研究資料

# ルーメン液ならびに血漿中の共役リノール酸を含む 多価不飽和脂肪酸分析手法と分析結果

米内 美晴<sup>\*1)</sup>・嶺野 英子<sup>\*1)</sup>

**抄 録**：機能性を有する共役リノール酸や多価不飽和脂肪酸の牛肉中含量の増加のためには、これら脂肪酸の体内移行の概要（飼料、ルーメン液、血液、畜肉での含量）を明らかにすることが必要であるが、ルーメン液や血液は脂質含量が少なく公定法であっても二重結合を有する不安定な構造の脂肪酸の測定に問題が生じる。そこでルーメン液と血液サンプルを対象に上記のような脂肪酸を安定して測定できる手法を確立したので研究資料として示した。また本手法を用いて脂肪酸組成の異なる飼料給与時の牛ルーメン液と血漿中の脂肪酸濃度を測定解析した。その結果ルーメン液中脂肪酸濃度は個体差より給与飼料の影響で変化する一方で、血漿中濃度は飼料の影響を一部（リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸）で示しながらも個体による差が大きい傾向にあることを示した。また、血漿中共役リノール酸濃度はルーメン液中トランスバクセン酸濃度と正の相関関係（ $R^2=0.85$ ,  $p<0.01$ ）を示し、ルーメンでのトランスバクセン酸増加が最終産物のCLA濃度増加に関与しているという産生カスケードに従った結果も示された。これらの実測結果についても参考値として示す。

**キーワード**：共役リノール酸（CLA）、リノール酸、トランスバクセン酸、多価不飽和脂肪酸（PUFA）、ルーメン液、血液、大豆ホールクロップサイレージ

**Research Note - Analysis of conjugated linoleic acid and long-chain polyunsaturated fatty acids in rumen fluid and plasma, and results of basic analysis.:** Miharuru YONAI<sup>\*1)</sup> and Eiko TOUNO<sup>\*1)</sup>

**Abstract** : Potential health benefits have been associated with dietary consumption of conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids; therefore, enhancement of CLA concentrations in meat and milk has become an important objective in animal nutrition research. In order to increase the content of conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids in beef, it is necessary to clarify the mechanism of internalization of these fatty acids (content in feed, rumen fluid, blood, and meat). However, it is difficult to measure fatty acids with unstable structure (presence of a conjugated double bond) via normal analytical methods; in addition, lipid content in rumen fluid and blood is generally low. In this study, we developed an analytical method to determine fatty acid concentrations in rumen fluid and blood of beef cattle, demonstrated the variation in fatty acid concentrations owing to the different feeds used, and discussed the relationship between fatty acid concentrations in rumen liquid and blood as a reference data source. In particular, we observed that C18: 2n6c and C18: 1n7t, which were not synthesized in vivo, shifted from the rumen fluid to the plasma in a concentration-dependent manner. Moreover, when cattle were fed the soybean whole crop silage diet, the C18:1n7t concentration in rumen fluid increased with an increase in CLA concentration in the plasma.

**Key Words** : Conjugated linoleic acid (CLA), Linoleic acid, trans Vaccenic fatty acid, Polyunsaturated fatty acids (PUFA), rumen fluid, plasma

\* 1) 農研機構東北農業研究センター (Tohoku Agricultural Research Center, NARO, Morioka, Iwate 020-0198, Japan) 2018年6月29日受付、2018年10月1日受理

## I 緒 言

反芻家畜由来の畜産物に特有な脂肪酸である共役リノール酸 (Conjugated linoleic acid : CLA) は、動物実験において発がん抑制作用、心疾患減少、体脂肪減少など多様な効果を有する (McGuire・McGuire, 2000, Zhang *et al.* 2010, Yang *et al.* 2015, Kim *et al.* 2016) 等の報告がされてきた。ヒトについてもCLAに富む食品の摂取が心疾患に関与するLDL-コレステロールを低下させる (Derakhshande-Rishehri *et al.* 2014) 効果が報告され、機能性成分として注目されている。

これらの報告に加えて、CLAの基質となる $\omega$ -6脂肪酸、および発がん抑制、心疾患リスク低減、抗うつなどの種々の作用が示唆される $\omega$ -3脂肪酸 (斎藤 2001) 等の長鎖不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids : PUFA) について、それらの含量を増加させることが今後の畜産物生産戦略のひとつとして積極的に提案されている (Olmedilla-Alonso *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2010, Scollan *et al.* 2014)。食品と健康の関係について消費者の関心の高い我が国においても、生産物中脂肪酸含量の調節に関わる技術開発は将来有益なものとなる可能性がある。

これらの畜産物中含量増加に関する報告として、たとえばCLAの場合では植物油脂や牧草摂取が牛乳中CLA濃度を増加させることが知られている (Stanton *et al.* 1996)。このように血液中に現れる脂質が直接移行する牛乳中脂肪酸の組成調節は比較的实现可能性が大きい、長期間にわたる飼料給与の結果である牛肉ではCLAをはじめ特定の脂肪酸含量を積極的に増加させる飼料の種類または飼料給与法についての情報はまだ少なく、欧米では今後の研究開発が期待されている (Raes *et al.* 2004)。一方国内では、大豆をはじめとして東北各地域の営農事情に適合する高栄養自給飼料開発が進められており輸入配合飼料の代替利用推進が謀られようとしている。それら新規飼料給与により生産される畜産物が従来の輸入飼料によって生産される畜産物と比較してどのような脂肪酸組成となるか検証することで付加価値が確認される可能性も想定される。

反芻動物ではルーメン発酵により飼料の脂肪酸は組成を変更されて吸収される。飼料からルーメン液、血液、畜産物 (乳・肉) への脂肪酸の移行過程

解析は、畜産物中脂肪酸に対する給与飼料の影響を明らかにする上で必要である。しかし、乳 (トリアシルグリセロール3.5g/100g)、肉 (和牛肉でトリアシルグリセロール7.8-53.4g/100g) (文部科学省 2015) のように脂肪含量の多いサンプルと異なり、血液 (100~230mg/100mL) (農林水産省1997) と、血液よりさらに低濃度であることが推察されるルーメン液の脂肪酸測定は容易ではないためにその解析を行った報告は少ない。本稿ではルーメン酸と呼ばれるCLAを含む長鎖不飽和脂肪酸の分析手法を検討した結果を示した。またこの方法を用いて新規飼料である大豆ホールクロップサイレージと対照の粗飼料の給与によるルーメン液および血液中脂肪酸濃度への飼料給与の影響の有無を調査した結果を資料として示す。

本資料に関わる実験では技術支援センター業務第2科試験家畜管理班の諸氏に協力を頂いた。また試験に用いた飼料提供ならびに試験遂行については魚住 順、河本英憲、内野 宙、出口 新氏らに協力ならびに助言を頂いた。感謝の意を表する。

## II 材料および方法

### 1 ガスクロマトグラフィー (GC) によるルーメン液と血液中の脂肪酸測定

#### 1) 試薬

脂質抽出とメチルエステル化およびGC測定で使用した試薬は以下のものを使用した。水酸化カリウム (試薬特級)、塩化ナトリウム (医薬品試験用)、エタノール (インフィニティピュア)、メタノール (高速液体クロマトグラフ用)、クロロホルム (高速液体クロマトグラフ用)、石油エーテル (試薬特級)、トルエン (高速液体クロマトグラフ用)、ヘキササン (インフィニティピュア)、酢酸 (精密分析用)。以上はすべて富士フィルム-和光純薬製品を使用した。2,2-dimethoxypropane (reagent grade, 98%) および (Trimethylsilyl) diazomethane solution (2.0M in hexanes) はSIGMA-ALDRICH社の製品を用いた。溶液として調整する試薬の濃度は実験手順に記載した。

内部標準としてC21:0 (Methyl heneicosanoic Acid, analytical standard ; SIGMA-ALDRICH社) を使用した。

内部標準法の検量線の作成では脂肪酸メチルエステル混合標品としてGLC463 (C4:0~C24:1混合;

Nu Chek Prep社製)、CLAメチルエステル標品として (Methyl ester of CLA 9-cis, 11-trans; Matreya社) を使用した。

## 2) 血液・ルーメン液採材と前処理

血液は頸静脈からヘパリンNa添加真空採血管を用いて採取した後、直ちに氷冷して採血後30分以内に冷却遠心機により4℃、1700×g、20分間遠心分離した。分取した血漿は前処理時まで-30℃で保存した。ルーメン液はフィステル装着牛からフィステルを介して約100mLを直接吸引採取した。ただちに氷冷した後にメッシュ径53μmのナイロンバッグろ過で植物残渣を除去し分析時まで-30℃で保存した。

ルーメン液については、微生物体に含まれる脂肪酸も消化吸収されるものとして、脂質抽出直前処理として微生物を破碎した。破碎はM.M.Or-Rashid *et al.* (2007) の方法に従って行った。すなわち、流水中で急速解凍したルーメン液6mLを15mLプラスチック蓋付遠沈管に秤量し、ジルコニアボール3gを加えて3分間振とうし、5分静置後に再度3分間振とうした。振とう直後の上清を脂質の抽出に直ちに供した。

## 3) 脂肪酸抽出とメチルエステル化

脂質抽出はBligh・Dyer (1959) の方法に準じて行った。メチルエステル化はAldai *et al.* (2006) の方法を選択し液状サンプルに適するよう修正を加えた。修正した変法は以下の手順とした。

- ① 血漿からの脂質抽出は12mLテフロン蓋付ガラス試験管を使用しルーメン液は20mLテフロン蓋付ガラス遠沈管を使用する。
- ② 血漿2mL (ルーメン液4mL) にクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 6mL (ルーメン液の場合12mL) を添加する。5分攪拌後に10分間室温静置してクロロホルム2mL (ルーメン液の場合4mL) を添加する。
- ③ 5分攪拌後、蒸留水2mL (ルーメン液の場合4mL) を添加し再び5分攪拌する。
- ④ 4℃、1700×g、15分遠心分離後に上層 (水分層) を吸引除去し、次に最下層 (クロロホルム層) をフタ付き10mLガラス試験管に採取し、窒素気流下40℃で乾固させる。
- ⑤ 直ちに5M水酸化カリウムメタノール・蒸留水 (50:50, v/v) 溶液3mLと内部標準C21:0を10mg/mL含むメタノール・トルエン (1:1,

v/v) 溶液10μLを添加する。

- ⑥ 試験管に窒素ガスを吹き込み蓋をして5分振とうし、60℃40分間ウォーターバスあるいはドライバスで加熱する。
- ⑦ 0.5% 塩化ナトリウム水溶液4mLと石油エーテル2mLを添加し、20℃、800×g、5分遠心分離を行い、上層を吸引除去する。
- ⑧ 酢酸1.5mL、石油エーテル2mLを添加し、15分攪拌後に、20℃、800×g、5分遠心分離後に、上層 (エーテル層) を10mL蓋付ガラス試験管に採取する。再び石油エーテル2mLを添加し、攪拌と遠心分離を繰り返してエーテル層を先の試験管に再度採取する。
- ⑨ 採取したエーテル層に2,2-dimethoxypropane 100μLを添加し、2分間攪拌後に窒素気流下40℃で乾固させる。
- ⑩ メタノール:トルエン (2:1, v/v) 1mLを添加し5分振とうする。次に2M TMS-DMヘキサン溶液を150μL加えて、40℃で10分間反応させ窒素気流下40℃で乾固させた後にヘキサン1mLを添加し、7℃、2000×g、5分遠心分離した上清をGCバイアルにとりGC測定に供する。

## 4) 使用機器と分析条件の決定

東北農業研究センターの機能評価実験棟共有機GC-2010Plus (島津製作所) に脂肪酸分析に適したカラムであるSP-2560 (100 m x 0.25 mm I.D. 0.20 mm, Spelco) を装着した場合での最適条件を検討した。キャリアーガス、空気、メイクアップガスとしてヘリウム (G1グレード)、純空気 (G1グレード)、窒素 (G1グレード) を使用した。水素ガスは水素ガス発生装置 (堀場エステック製) を使用した。データ処理ソフトはGC solution (島津製作所) を用いた。

ピーク分離に最適なGC条件を決定するために、既報 (Pestana *et al.* 2012、Alves・Bessa. 2009) を含む異なる条件の昇温分析について脂肪酸メチルエステル52種を含む標品 (GLC463; Nu Chek Prep社) の分離条件を比較した。

## 2 異なる飼料給与時のルーメン液・血漿中脂肪酸含量の比較

### 1) 供試牛と給与飼料

家畜試験は、東北農業研究センター動物実験等実施要領に基づいて実施した。給与試験は黒毛和種フィステル装着牛3頭を用いる3×3ラテン方画法によ

表1 昇温プログラム

Program No.	start temp (°C)	hold time (min)	rate (°C/min)	temp (°C)	hold time (min)	rate (°C/min)	temp (°C)	hold time (min)	rate (°C/min)	final temp (°C)	hold time (min)	total time (min)	memo
1	100	1	50	150	20	1	190	5	1	200	60	137	C19:1-C18:2n6 不分離 C20:1n9c-C18:3n3c 不分離 C20:5n3-C24:0 不分離
2	100	15	10	150	5	1	158	30	1	200	65	170	C19:1-C18:2n6 不分離 C20:1n9c-C18:3n3c 不分離 C22:1n9-C20:3n3 不分離
3	45	4	13	175	27	4				240	15	72.25	

注. Program の出典は以下の通り。No.1; Pestana et al. (2012)、No.2; Alves・Bessa (2009)、No.3; 本報告で改善したプログラム。

り行った。各14日間ずつ異なる飼料（大豆ホールクロップサイレージ、オーチャード低水分サイレージまたはアルファルファ）を1日2回、9:00と18:00に給与し、最終2日間に9:00の給与直前0時間と給与後3、6、9時間後のルーメン液および血液を採取した。各飼料給与量は維持に要するTDN量を充足する量を個体別に給与した。なお、ラテン方法を採用するため3種の飼料による実験を実施したが本報告では脂肪酸含量に大きな違いが存在する大豆ホールクロップサイレージとオーチャード低水分サイレージ給与時のルーメン液ならびに血漿中脂肪酸濃度について測定した。給与飼料の脂肪酸含量はSukhija・Palmquist (1988)の方法に従い実施した。

## 2) 統計解析

得られた脂肪酸濃度について農林水産情報研究センターが提供しているSAS Add-In 6.1 for Microsoft Officeを用いて解析を行った。飼料間の平均値の差の検定ではt検定を、個体間の差の検定では一元配置の分散分析で個体差の有無を確認したうえでTukeyの方法による多重比較を行った。ルーメン液と血漿の脂肪酸濃度を比較するために回帰分析を行った。

## Ⅲ 結果と考察

### 1 脂肪酸分析法修正

GCによる脂肪酸測定公定法としてAOAC official method 996.06やAOAC official method Ce 1b-89が選択されることが多いが、これらの方法はいずれも前処理である脂肪酸のメチルエステル化を酸性触媒で実施するとしている。しかし、共役二重結合を含むCLAや複数の二重結合を含む長鎖脂肪酸は酸性触媒で変異しやすいため (Chen 2007)、回避する

ためトリメチルシリルジアゾメタン (TMS-DM) を触媒とすることが提案 (Kramer et al. 1995) されており、同触媒を用いたAldai et al. (2006) の筋肉内脂肪分析方法を液体サンプルで利用できるように以下のように修正して実施した。

ルーメン液と血液では脂質含量が異なるため、脂質抽出過程について試料量と試薬量を変更して抽出処理を行った。

血漿中脂質含量の推定値から測定に必要なサンプル量を1 mLまたは2 mLとして試行し2 mLを選択した。ルーメン液は脂質含量が不明であったため、1 mLから段階的に増量してサンプル量を決定した。ルーメン液の脂質抽出段階でサンプル量、試薬量ともに血漿の2倍量で脂質抽出を実施して測定が可能であった。

### 2 GC条件の検討

実際に検討した昇温条件は16種類であったがその中で比較すべき3条件について表1に示した。

既報 (Pestana et al. 2012, Alves・Bessa 2009) (表1のNo.1, 2) の昇温条件で分離できないピークが複数存在するため昇温プログラムを見直し、トランスバクセン酸、リノール酸、CLA、内部標準のC21:0ならびに $\alpha$ -リノレイン酸、アラキドン酸などn-3系ならびにn-6系の筋肉中に含まれる多価不飽和脂肪酸が分離される温度条件を試行した結果、今回使用したGCとカラムにおいて炭素数14以上の脂肪酸メチルエステルのピーク分離が得られた条件はNo.3 (表1)、すなわち開始温度45°C (保持4分)、175°Cまで昇温13°C/分 (保持27分)、240°Cまで4°C/分 (保持15分)、注入口250°C、FID 260°C、キャリアガス (He) の線速度一定の条件であった。サンプル注入量は1  $\mu$ L、スプリット比10:1とした。



表2 血漿・ルーメン液サンプルの再現性

脂肪酸 略称	血漿			ルーメン液		
	mean μg/ml	SD μg/ml	CV %	mean μg/ml	SD μg/ml	CV %
C12:0				0.6	0.0	7.7
C13:0				0.3	0.0	4.3
C14:0	1.9	0.1	5.0	2.4	0.1	3.3
C15:0	2.3	0.1	3.4	2.9	0.1	3.0
C16:0	43.0	1.0	2.3	51.9	2.0	3.8
C16:1	6.8	0.1	2.2			
C17:0	2.9	0.1	3.0	2.0	0.1	4.1
C18:0	70.3	0.8	1.1	178.3	6.7	3.7
C18:1n7t	3.2	0.1	1.9	13.9	0.6	4.5
C18:1n9c	35.9	0.9	2.6	11.8	0.3	2.9
C18:1n7c	5.7	0.1	1.3	1.7	0.2	10.0
C18:2n6c	73.3	2.6	3.5	5.7	0.2	4.0
C18:3n3c	7.8	0.6	7.2	1.1	0.1	4.7
CLAc9,t11	1.3	0.0	2.6	1.8	0.1	4.9
C20:2	0.7	0.0	2.2			
C22:0	0.5	0.0	2.5	1.3	0.0	3.1
C20:3n6	6.0	0.1	2.4			
C20:4n6	9.9	0.6	5.8			
C24:0	1.0	0.0	0.2			
C20:5n3	2.7	0.2	7.6	1.8	0.0	2.2
C22:4n6	1.3	0.1	4.3			
C22:5n3	5.3	0.1	1.6			
全CV平均			3.1			4.4

#### 4 脂肪酸組成の異なる飼料給与時のルーメン液と血漿中脂肪酸含量の実測参考値

##### 1) 給与飼料の脂肪酸組成

大豆ホールクロップサイレージ（以下Soyと略）とオーチャードグラス低水分サイレージ（以下Orと略）の脂肪酸含量測定結果により、Soyはパルミチン酸(以下C16:0)、オレイン酸(以下C18:1n9c)、リノール酸（以下C18:2n6c）含量が多くα-リノレン酸（以下C18:3n3c）は同等であることを確認した(図1)。総脂肪酸含量はSoy乾物が21.3mg/g、Or乾物は5.0mg/gであった。

##### 2) ルーメン液、血漿中脂肪酸濃度と飼料

供試牛3頭から採材したサンプル全体の総平均(n=24; 4回/日×2日×3頭)をSoyとOrで比較した。ルーメン液中脂肪酸濃度合計はOr給与時218±25μg/mL、Soy給与時434±99μg/mLで、Soy給与時はOr給与時よりも高濃度(p<0.01)を示した。同様に血漿では1402±330μg/mL、1704±445μg/mLを示した。

上記平均値についてルーメン液総脂肪酸濃度のばらつきは大きいがお飼料間で有意差が認められた。すなわちSoy給与時のルーメン液総脂肪酸濃度上昇は飲水量等に影響されず起こっていたことが観察された。

図2においてルーメン液中総脂肪酸および3種の脂肪酸濃度の経時的推移を資料性を考慮して個別かつ3頭平均の図として示した。経時的推移はSoy給与時に個体毎、脂肪酸毎に異なる傾向を示した。

血漿において上記の飼料による異なる傾向は不明瞭となった。図3に血漿中総脂肪酸および脂肪酸3種濃度の経時的推移を示した。血漿において各濃度の個体差が顕著となった一方、経時変化は小さく各濃度は一定していた。このことから実験計画上、血液採材時刻を限定する必要性は小さいものと考えられる。

ルーメン液と血漿の脂肪酸濃度の関連性を吸収による時間差を考慮して検討した。ルーメン液採取時刻と血漿採取時刻の時間差を0時間、3時間、6時間、9時間の組み合わせでルーメン液脂肪酸に対する血漿中脂肪酸の回帰分析を行い、それらの決定係数を示した(表3)。分析した4種の脂肪酸の中でSoy給与時のC18:2n6c、C18:3n3cにおいて6時間、9時間の組み合わせで決定係数が有意水準(p<0.05)となった。Or給与時のルーメン液と血漿

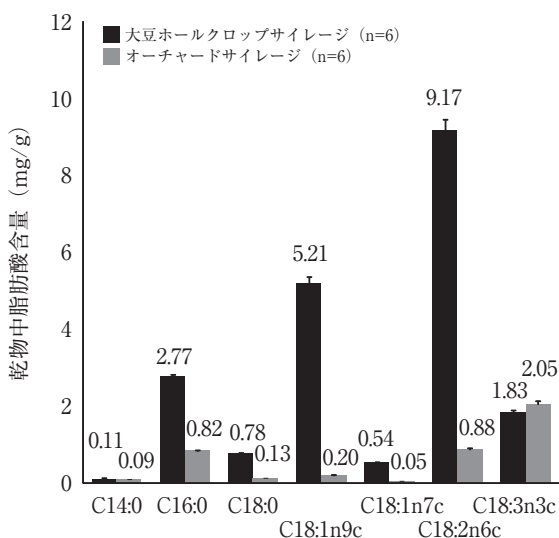


図1 給与飼料の主要脂肪酸含量

#### 3 本手法による測定値の再現性

血漿およびルーメン液のそれぞれについて内部標準法による脂肪酸含量測定値の再現性を確認した。各脂肪酸測定値の変動係数はおおむね5%以下となった(表2)。

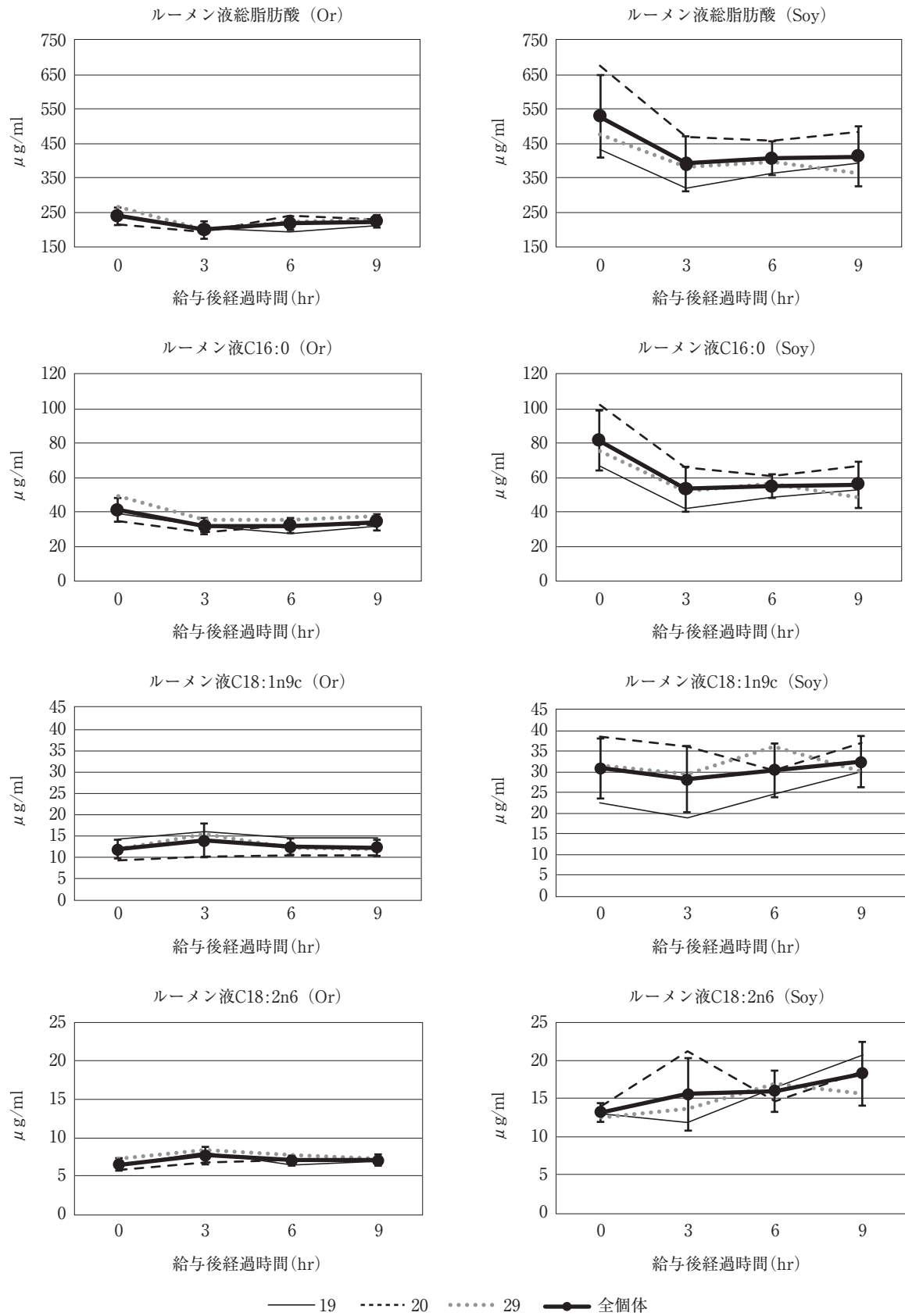


図2 ルーメン液中脂肪酸濃度の個体別経時変化 (参考資料、飼料毎に表示)  
Or: オーチャード低水分サイレージ給与、Soy: 大豆ホールクロップサイレージ給与

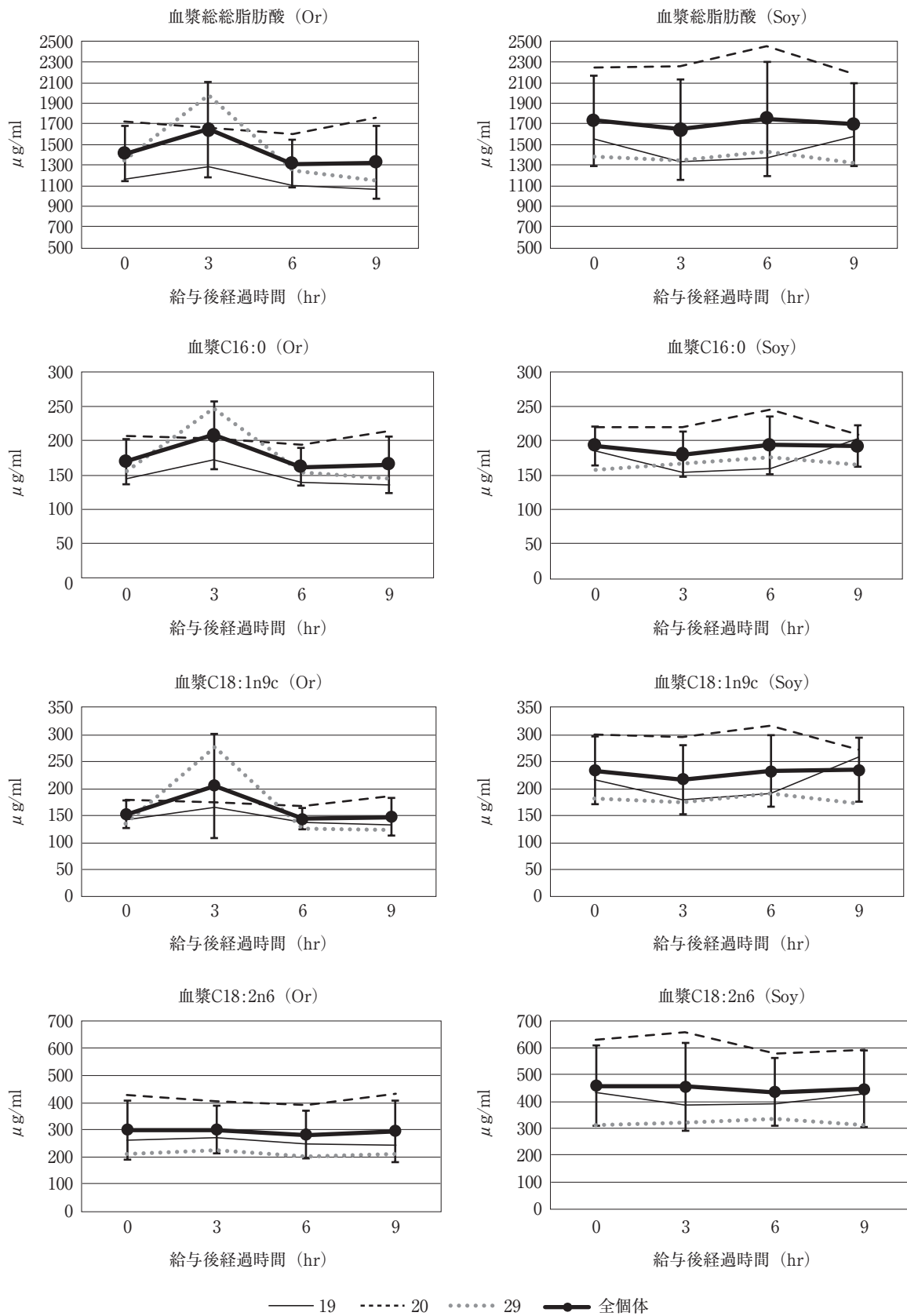


図3 血漿中脂肪酸濃度の個別経時変化 (参考資料、飼料毎に表示)

Or：オーチャード低水分サイレージ給与、Soy：大豆ホールクロップサイレージ給与

表3 Soy 給与時におけるルーメン液・血漿中脂肪酸濃度の時間差別関連性

時間差 <sup>1)</sup>	採取サンプルの組み合わせ <sup>2)</sup>	n	決定係数(R <sup>2</sup> ) <sup>3)</sup>			
			C16:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3c
同時 (0時間)	0-0, 3-3, 6-6, 9-9	24	0.15	0.16	0.11	0.04
3時間	0-3, 3-6, 6-9	18	0.12	0.16	0.13	0.07
6時間	0-6, 3-9	12	0.18	0.14	0.42*	0.11
9時間	0-9	6	0.03	0.001	0.37	0.73*

\*有意差あり (p&lt;0.05)

1) ルーメン液採取とその後の血液採取の時間差

2) 飼料給与からサンプリングまでの時間。ルーメン液採取 (h) - 血液採取 (h) で表示

3) 各時間差におけるルーメン液脂肪酸に対する血漿中脂肪酸の回帰分析結果

表4 ルーメン液、血漿中の脂肪酸合計ならびに各脂肪酸平均濃度

サンプル	個体	飼料	平均 ± SD (μg/mL) (n=8; 採材2回/日 × 2日)					同一個体での飼料による脂肪酸濃度の有意差検定結果	
			脂肪酸合計	C16:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3c		
ルーメン液	19	Or	211.2 ± 18.1	32.6 ± 5.0 a	14.9 ± 1.1 b	7.0 ± 0.8	9.0 ± 1.3 a	脂肪酸合計、C16:0、C18:1n9c、C18:2n6c、C18:3n3c (p<0.01)	
		Soy	377.6 ± 46.5 a	52.4 ± 10.3 a	24.1 ± 4.8 a	15.5 ± 4.4	5.8 ± 0.9		
	20	Or	219.4 ± 26.3	32.1 ± 4.1 a	10.1 ± 0.7 a	6.6 ± 0.6	9.4 ± 1.8 ab		
		Soy	520.4 ± 106.8 b	73.9 ± 19.2 b	35.6 ± 3.8 b	17.1 ± 3.5	6.1 ± 1.3		
	29	Or	229.1 ± 31.6	39.5 ± 7.0 b	12.9 ± 2.7 b	7.6 ± 1.0	11.0 ± 1.4 b		脂肪酸合計 (p<0.05)
		Soy	404.8 ± 73.5 a	58.1 ± 14.1 ab	31.9 ± 6.0 b	14.7 ± 3.3	5.6 ± 1.1		
血漿	19	Or	1153.2 ± 98.9 a	147.7 ± 17.7 a	145.0 ± 14.6	256.7 ± 14.0 a	128.6 ± 5.9 a	脂肪酸合計、C18:1n9c (P<0.05)、C18:2n6c、C18:3n3c (p<0.01)	
		Soy	1459.3 ± 121.3 a	175.4 ± 23.9 a	212.0 ± 38.7 a	411.3 ± 39.9 a	85.2 ± 9.1 a		
	20	Or	1686.8 ± 140.6 b	205.0 ± 17.3 b	177.4 ± 19.3	414.7 ± 40.6 b	172.7 ± 14.4 b		
		Soy	2284.7 ± 218.0 b	223.7 ± 27.7 b	297.4 ± 41.7 b	614.7 ± 89.0 b	95.5 ± 12.3 a		
	29	Or	1430.1 ± 455.2 ab	175.8 ± 54.7 ab	164.9 ± 96.7	211.0 ± 22.8 c	151.2 ± 16.9 c		C18:2n6c、C18:3n3c (p<0.01)
		Soy	1368.0 ± 73.2 a	170.5 ± 8.3 a	180.6 ± 9.4 a	320.2 ± 15.8 c	63.7 ± 3.7 b		

各項目で飼料毎に個体差を多重検定 (Tukey 法) により比較した。

a,b,c: 異符号間で有意差あり (p&lt;0.05)

の組み合わせからは関連性は見いだされなかった。このことがSoyとOrの消化性の違いに起因するかどうかについては引き続き検討する必要がある。

## 3) ルーメン液脂肪酸濃度の個体差

脂肪酸合計、C16:0、C18:1n9c、C18:2n6c、C18:3n3cについて、各飼料給与時の個体別平均 (n=8; 採材4回/日 × 2日) を示し、飼料毎に各脂肪酸の個体による濃度差と、同一個体での飼料間の濃度差を示した (表4)。ルーメン液においてOr給与時ではC16:0、C18:1n9c、C18:3n3c濃度で個体間に有意差が観察された (p<0.05)。一方Soy給与時は脂肪酸合計、C16:0、C18:1n9c濃度で個体間に有意差が観察された (p<0.05)。Soyのみ個体差が認められた脂肪酸合計とOrのみ個体差が認められたC18:3n3c濃度は飼料毎に消化の個体差の

影響が現れたものと考えられた。またC18:2n6cはどちらの飼料においても個体差が観察されない結果となった。

同一個体での飼料による比較において、No.19は全脂肪酸項目で飼料間に濃度差を観察し、No.20はC18:3n3cを除いた項目、No.29はC16:0を除く項目で有意差を観察した。このことから脂肪酸合計、C16:0、C18:1n9c、C18:2n6cはSoy給与により高濃度となり、C18:3n3cはOr給与によって濃度が増加したことが確認された。C18:3n3cは2種の飼料含有量が同等 (図1) であり、個体による消化性の違いが現れた可能性が推察された。

## 4) 血漿中脂肪酸濃度の個体差

血漿について同様にまとめ表4に示した。各飼料毎に比較するとOr給与時のC18:1n9cを除いて全項



目で個体間に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。C18:2n6cはOr、Soy給与時共に個体間で相互に有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。必須脂肪酸であるため消化や吸収における差を反映しやすいと考えられた。どの脂肪酸濃度でもルーメン液に比較して血漿中の個体差は拡大した。

同一個体の比較ではNo.19と20でC16:0を除く全項目で飼料による濃度差 ( $p < 0.05$ ) を観察した。No.29ではC18:2n6c、C18:3n3cで飼料による有意差 ( $p < 0.05$ ) を観察した。C18:2n6cはSoy給与時、C18:3n3cはOr給与時にどの個体でも濃度が上昇した。一方、C16:0は全牛で飼料による差が認められなかった。No.29は他の2頭と異なる傾向を示し、飼料の影響が血漿に現れにくい個体であったと考えられた。血漿中脂肪酸は代謝の影響を受け変動するが、飼料を調節した飼養試験下では一定の比較が可能と想定される。本試験でも飼料給与を体重に応じた飼料計算による計量給与で実施したが、No.20の脂肪酸濃度は他の2個体に比較して高濃度となり、No.29はSoy給与時の脂肪酸濃度上昇が不明瞭だった。個体の代謝特徴は除外が困難であるため、濃度

比較においては個体毎の正常値に対する相対濃度を使用するなどの解析手法を取り入れることなども検討課題となると考えられた。

ルーメン微生物による水素添加によって不飽和脂肪酸の80%以上が減少するとした報告 (Polan *et al.* 1964) もあり、血漿においてC18:1n9c、C18:2n6c、C18:3n3cの飼料間差は確認できない可能性も想定されたが、今回は血漿においても飼料間の有意差が保たれた。

#### 5) ルーメン液と血漿中CLA関連脂肪酸の濃度比較

ルーメンから血中への脂肪酸の移行例としてCLA産生過程脂肪酸のルーメン液・血漿中濃度を各飼料毎に比較した。CLAの基質であるC18:2n6c、中間産物のトランスバクセン酸 (以下C18:1n7t) およびCLAのルーメン液と血漿中濃度を飼料毎に平均して図4に示した。

値はOr、Soy給与後9時間に採材した試料 ( $n=6$ : 3頭×2日) を二重測定して得た平均濃度を用いた。C18:2n6cとC18:1n7tはルーメン液、血漿共にSoy給与時濃度が有意に高かった (C18:2n6c、

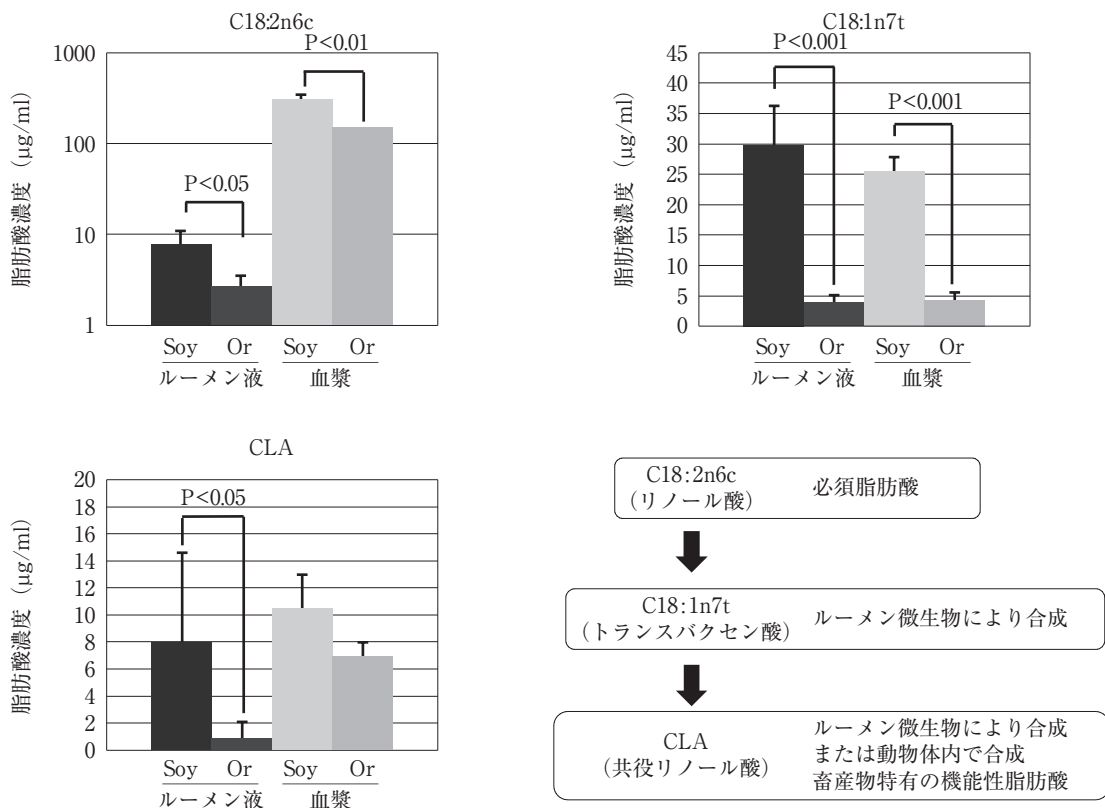


図4 C18:2n6c、C18:1n7t、CLAのルーメン液と血漿中濃度 (給与飼料による比較)

$p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ; C18:1n7t,  $p < 0.001$ )。CLA濃度もSoy給与時に高濃度となる傾向を示した。

C18:2n6c, C18:1n7t, CLAの各々についてルーメン液に対する血漿中の濃度の回帰分析を実施した。決定係数は順に $R^2=0.14$ ,  $0.85$  ( $p < 0.01$ )、 $0.02$ であり、C18:1n7tのルーメン液と血漿の濃度の関連性がきわめて大きいことが示された。

ルーメン液中C18:1n7tと血漿中CLAについても決定係数は有意 ( $R^2=0.67$ ;  $p < 0.01$ ) で関連性が高いと考えられた。ルーメン液中C18:1n7tは体内でCLA合成に用いられること (Bauman *et al.* 1996) が報告されており、大豆ホールクロップサイレージのようにルーメン液中でのC18:1n7t濃度が上昇する飼料給与では畜産物中CLA濃度も高められる可能性がある。ただし、本実験では飼料給与が単体であり、通常の混合飼料給与時での結果について今後検討する必要がある。

Doreau *et al.* (2011) は、消費者が求める脂肪酸を畜産物中で増加させることは飼料の種類や飼料添加物でコントロール可能であると述べている。最終産物中に特定の脂肪酸を増加させる飼料選択と給与技術を確認するために本手法を用いた脂肪酸の吸収過程解析は有用と考えられた。今回示したC18:1n7tあるいはCLAの関連性などが、様々な飼料給与でどのように変化するか本手法を用いて解析することで、新たな給与技術の開発に役立てることが望まれる。

## 摘 要

本資料においてはルーメン液および血漿中のCLA等を含む長鎖脂肪酸濃度測定に適した分析手法を示すことを第1の目的とした。さらに黒毛和種フィステル装着牛に異なる粗飼料 (大豆ホールクロップサイレージ、オーチャードグラスサイレージ) を給与し採取したルーメン液、血液を本手法で分析することで安定的に脂肪酸を定量できることも示した。次に得られた測定値について一部を解析し参考資料として示した。この定量結果より、体内合成されない脂肪酸であるC18:2n6cとC18:1n7tはルーメン液から血漿へ濃度依存的に移行していることが確認された。大豆ホールクロップサイレージ給与中はルーメン液中C18:1n7t濃度が上昇すると同時に血中CLA濃度も上昇することを確認した。

## 引用文献

- 1) AOAC International. Official Methods of Analysis, 17<sup>th</sup> ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 996.06, 2001.
- 2) American Oil Chemists' Society. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 5th ed. AOCS, Champaign, IL, USA, Official Method Ce1b-89.  
<https://aocs.personifycloud.com/PersonifyEbusiness/Store/ProductDetails?productId=111772>
- 3) Aldai N.; Osoro K.; Barrón L.J.R.; Nájera A.I. 2006. Gas-liquid chromatographic method for analysing complex mixtures of fatty acids including conjugated linoleic acids (cis9trans11 and trans10cis12 isomers) and long-chain (n-3 or n-6) polyunsaturated fatty acids Application to the intramuscular fat of beef meat. *Journal of Chromatography A*, 1110 : 133-139
- 4) Alves S.P.; Bessa R.J.B. 2009. Comparison of two gas-liquid chromatograph columns for the analysis of fatty acids in ruminant meat. *Journal of Chromatography A*. 1216 : 5130-5139.
- 5) Bauman D.E.; Corl B.A.; Peterson D.G. 1996. The Biology of Conjugated Linoleic Acids in Ruminants. (Jean-Louis Sebedio, William W. Christie, Richard Adlof. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Volume 2.) Champaign, IL, USA. A Publication of AOCS Press. : 146-163.
- 6) Bligh E.G. and Dyer W.J. 1959. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37 (8) : 911-917.
- 7) Chen J.; Cao Y.; Gao H.; Yang L.; Chen Z.Y. 2007. Isomerization of conjugated linolenic acids during methylation. *Chemistry and Physics of Lipids*. 150 : 136-142.
- 8) Derakhshande-Rishehri S.M.; Mansourian M.; Kelishadi R.; Heidari-Beni M. 2014. Association of foods enriched in conjugated linoleic acid (CLA) and CLA supplements with lipid profile

- in human studies: a systematic review and meta-analysis. *Public Health Nutrition*. 18 : 2041-2054.
- 9) Doreau M.; Bauchart D.; Chilliard Y. 2011. Enhancing fatty acid composition of milk and meat through animal feeding. *Animal Production Science*. 51 : 19-29.
- 10) Kim J.H.; Kim Y.; Kim Y.J.; Y.Park. 2016. Conjugated linoleic acid: Potencial Health Benefits as a Functional Food Ingredient. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*. 7 : 221-244.
- 11) Kramer J.K.G.; Fellner V.; Dugan M.E.R.; Sauer F.D.; Mossoba M.M.; Yurawecz M.P. 1997. Evaluating Acid and Base Catalysts in the Methylation of Milk and Rumen Fatty Acids with Special Emphasis on Conjugated Dienes and Total trans Fatty Acids. *Lipids* 32 : 1219-1228.
- 12) Lepage G. and Roy C.C. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res*. 27 : 114-120.
- 13) McGuire M.A. and McGuire M.K. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) : A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *J.Anim.Sci*.77 E-Suppl : 1-8.
- 14) 文部科学省科学技術・学術審議会 資源調査分科会報告. 2015. 日本食品標準成分表2015年版(七訂).  
[http://www.mext.go.jp/a\\_menu/syokuhinseibun/1365295.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/1365295.htm)
- 15) 農林水産省経済局. 1997. 臨床病理検査要領. p156.
- 16) Olmedilla-Alonso B.; Jiménez-Colmenero F.; Sánchez-Muniz F.J. 2013. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Science*. 95 : 919-930.
- 17) Pestana J.M.; Costa A.S.H.; Alfaia C.M.; Costa P.; Martins S.V.; Alves S.P. ; Bessa R.J.B.; Prates J.A.M. 2012. Lipid composition and nutritional quality of intramuscular fat in Charneca-PDO beef. *Eur Food Res Technol*. 234 : 187-196.
- 18) Polan C.E.; McNell J.J.; Tove S.B. 1964. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *J.Bacteriol*. 88 : 1056-1064.
- 19) Sukhija P.S. and Palmquist D.L. 1988. Rapid Method for Determination of Total Fatty Acid Content and Composition of Feedstuffs and Feces. *J. Agric. Food Chem*. 36 : 1202-1206.
- 20) Raes K.; De Smet S.; Demeyer D. 2004. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Animal Feed Science and Technology* 113 : 199-221.
- 21) 斎藤衛郎. 2001. n-3系多価不飽和脂肪酸の生理的有効性と栄養学的側面からみた安全性評価. *栄養学雑誌*. 59 : 1-18.
- 22) Scollan N.D.; Dannenberger D.; Nuernberg K.; Richardson I.; MacKintosh S.; Hocquette J.F.; Moloney A.P. 2014. Enhancing the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Science*. 97 : 384-394.
- 23) Stanton C.; Murphy J.; McGratha M.; Devery J.R. 1996. Animal Feeding Strategies for Conjugated Linoleic Acid Enrichment of Milk. (Jean-Louis Sebedio, William W. Christie, Richard Adlof. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Volume 2.) Champaign, IL. USA. A Publication of AOCS Press. p129-139.
- 24) Yang B.; Chen H.; Stanton C.; Ross R.P.; Zhang H.; Chen Y.Q.; Chen W. 2015. Review of the roles of conjugated Linoleic acid in health and disease. *J.Functional Foods*. 15 : 314-325.
- 25) Zhang W.; Xiao S.; Samaraweera H.; Lee E.J.; Ahn D.U. 2010. Improving functional value of meat products. *Meat Science*. 86 : 15-31.

