

## ラットの被過酸化性における性差(第1報)

— 各組織ミトコンドリアおよびミクロソームの脂肪酸組成 —

村上 亜由美, 内田 三香子

松浦 寿喜, 市川 富夫

(武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

### Sex Difference of Sensitivity to Peroxidation in Rats. I

#### Fatty Acid Compositions of Mitochondrial and Microsomal Lipids in Tissue.

Ayumi Murakami, Mikako Uchida, Toshiki Matsuura, Tomio Ichikawa

*Department of Food Science and Nutrition,*

*School of Human Environmental Sciences,*

*Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan.*

In order to know sex difference of sensitivity to peroxidation, we studied the analysis of fatty acid compositions of tissue mitochondrial(Mt) and microsomal(Ms) lipids in rats.

Male and female SD rats (4weeks-old) have been given the standard diet MF(Oriental Yeast CO., LTD) for 3weeks.

It has been suggested on the base of fatty acid compositions that female was more sensitive to peroxidation than male in liver Mt, liver Ms and heart Mt, and male was more sensitive to peroxidation than female in lungs Ms. Though sex difference of sensitivity to peroxidation on the base of fatty acid compositions has not been cleared in kidney Mt and kidney Ms.

Sex difference of fatty acid compositions was not observed in heart Ms and lungs Mt.

### 結 言

生体内過酸化脂質の生成が様々な疾病と関連していることが知られている。

生体内の過酸化脂質は主として、多価不飽和脂肪酸が多量に含まれている細胞膜のリン脂質で生成される。生体の細胞顆粒画分の中で、脂質含量が最も高いのはミクロソーム(Ms)で、次いでミトコンドリア(Mt)であり、多価不飽和脂肪酸の含量も高く、脂質の過酸化がよく起こるといわれている<sup>1)</sup>。

細胞内に生成された過酸化脂質は、細胞膜を破壊したり、酵素タンパクを変性させて、組織の局所に急性

の障害を与えるが、組織によってうける障害の影響や、活性酸素やフリーラジカルなど酸化ストレスに対する反応に違いのあることが知られている。そして、過酸化脂質生成系、分解系ともに性差がみられる。

このように、生体内過酸化脂質生成による障害を考えると、性別や組織の脂肪酸組成は重要な要素である。また、過酸化脂質生成と関連した組織障害について性差のあることが予想される。

本研究では、肝臓、腎臓、心臓、および肺のMt, Msにおける脂質の脂肪酸組成、特に、過酸化の基質となる多価不飽和脂肪酸の割合について調べ、被過酸化性の性差について検討した。

## 実験方法

### 1. 飼料

オリエンタル酵母 KK 製の標準試料 MF を与えた。飼料中の脂肪酸組成は table 1. の通りであった。飼料と水は自由摂取とした。

### 2. 実験動物および飼育方法

SD 種ラット, 4 週齢の雄 6 匹, 雌 6 匹を日本クレーン KK より購入した。

飼育槽の温度は  $23 \pm 1.0^\circ\text{C}$ , 湿度は  $55 \pm 7\%$ , 明暗サイクルは 12 時間(明期 8:00am~8:00pm)とし, 3 週間飼育した。

ネンブータル麻酔下で, 腹部大動脈より脱血し, 肝臓, 腎臓, 心臓, 肺を摘出した。臓器は, 実験に用いるまで  $-20^\circ\text{C}$  で冷凍保存した。

### 3. Mt および Ms の調整<sup>2)</sup>

操作中の脂質の酸化をできるだけ防ぐために, 試料を水で常に低温に保ちながら処理した。

臓器 1g 当たり 9ml のホモジナイズ液(0.25M ショ糖溶液:3mM トリシュー塩酸緩衝液(pH 7.4):0.1mMEDTA, 1:1:1)を加え, Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーですりつぶした。

ホモジネートを 700g で 10 分間遠心し, 上清をさらに, 7000g で 10 分間遠心した。沈殿は Mt 画分とし, その上清をさらに, 105,000g で 60 分間遠心した沈殿を Ms 画分とした。

Table 1. Fatty acid composition of dietary lipid.

Fatty acid	%
14:0	0.6±0.0
16:0	15.5±0.2
16:1(n-7)	1.0±0.0
18:0	2.4±0.0
18:1(n-9), (n-7)	22.5±0.1
18:2(n-6)	47.0±0.3
18:3(n-3)	4.3±0.1
Unknown1	1.8±0.0
Unknown2	0.9±0.1
20:5(n-3)	2.1±0.1
22:6(n-3)	1.9±0.0

Values are means±S.D.

### 4. 脂肪酸分析

ホモジナイズしたときと同様に, 氷で低温を保ちながら処理した。

Folch 法<sup>3)</sup>で脂質抽出し, 塩酸メタノール法<sup>4)</sup>でメチルエステル化した後, ガスクロマトグラフィー(GC)を用いた。

GC 装置は, SHIMADZU GC-14B, 記録装置は, SHIMADZU C-R6A を用いた。カラムは, キャピラリーカラム HR-SS-10 0.32mm×50m(信和化工 KK 製), キャリアガスは窒素, 検出器は FID を用いた。分析温度は, カラム槽温度  $150 \sim 220^\circ\text{C}$  ( $3^\circ\text{C}/\text{min}$ ), 気化室温度, 検出器温度とも  $250^\circ\text{C}$  とした。

脂質抽出時において, 抗酸化剤として 0.5M BHT エタノール溶液を添加<sup>5)</sup>し, 同様の操作を行ったところ, 有意差は認められず, 本操作中における脂質の酸化は無視できる程度であることを確認した。

### 5. 統計処理

各脂肪酸の雌雄の比較については, F 検定により等分散と判定されたとき T 検定を, 等分散でないときは Mann-Whitney 検定を行った。

## 結果と考察

### 1. 雄, 雌ラット肝臓の Mt, Ms の脂肪酸組成

Mt と Ms は同様の傾向を示した。(table 2.)

パルミチン酸(16:0)は雄で, ステアリン酸(18:0)は雌で有意に高かった。

オレイン酸(18:1), リノール酸(18:2)は雄で有意に高かったが, アラキドン酸(20:4)は雌で有意に高かった。18:2 は, 生体内では生合成できず食物に依存しているが, 20:4 は生体内では 18:2 より  $\Delta 6$  不飽和化, 炭素鎖長の延長,  $\Delta 5$  不飽和化によりつくられる。今回の実験では, 雌雄とも同じ試料を与えており, 摂取した脂肪酸組成に違いはなかったにもかかわらず, Mt, Ms ともに性差がみられたことより, 18:2 から 20:4 になる不飽和化, 炭素鎖長延長酵素活性は, 雌の方で高いことが示唆された。

飽和脂肪酸の割合は, 雌で有意に高く, 一価不飽和脂肪酸の割合は雄で有意に高かった。

多価不飽和脂肪酸の割合には有意差がなかったが, 不飽和指数は雌で高かった。各メチルエステルの誘導期からみた相対酸化速度は, (18:1):(18:2):リノレン酸(18:3 n-3):(EPA (20:5 n-3), DHA(22:6 n-3))では, 1:8:22:39 であるという報告<sup>6)</sup>や, 2 重結合には含まれたメチレン基の数が, 1, 2, 3, 4, 5 個の不飽和

Table 2. Fatty acid composition of liver mitochondrial and microsomal lipid.

(%)

Fatty acid	Mitochondria		Microsome	
	Male	Female	Male	Female
16:0	21.9±0.9	15.2±1.3**	21.6±0.9	15.0±1.5**
18:0	16.2±1.5	27.9±1.0**	17.6±0.9	28.3±1.1**
18:1 (n-9)	7.4±2.1	4.6±0.2**	6.0±0.8	4.7±0.2*
18:1 (n-7)	5.6±0.7	2.1±0.2**	5.6±0.8	2.0±0.1**
18:2 (n-6)	21.6±1.4	16.4±0.4**	19.7±1.5	14.8±0.8**
20:4 (n-6)	18.2±1.4	23.2±1.7**	19.7±1.2	24.0±1.7**
22:6 (n-3)	9.3±1.7	10.2±0.4	9.8±1.5	10.8±1.1
Saturated	38.0±1.4	43.1±1.0**	39.2±1.2	43.8±0.8**
Monounsaturated	12.9±2.7	6.7±0.4**	11.6±1.5	6.6±0.3**
Polyunsaturated	49.4±1.2	50.1±1.2	49.6±0.4	49.6±0.7
P/S ratio <sup>a</sup>	1.3±0.0	1.2±0.1**	1.3±0.1	1.1±0.0**
Double bond index <sup>b</sup>	1.8±0.1	2.0±0.0*	1.9±0.1	2.0±0.0*

Values are means±S.D. of 6 rats.

\*\* p<0.01 vs.male \*p<0.05 vs.male

a P/S ratio:polyunsaturated/saturated ratio

b Double bond index: $\Sigma(\% \times (\text{the number of double bond})/100)$

Table 3. Fatty acid composition of kidney mitochondrial and microsomal lipid.

(%)

Fatty acid	Mitochondria		Microsome	
	Male	Female	Male	Female
16:0	22.3±0.7	22.7±0.5	23.3±0.8	23.9±0.6
18:0	18.2±0.3	19.2±0.5**	19.1±0.5	20.3±0.4**
18:1 (n-7, n-9)	9.6±0.3	10.4±0.4**	8.9±0.5	10.2±0.2**
18:2 (n-6)	20.5±0.9	18.0±0.6**	17.9±0.3	16.1±0.9**
20:4 (n-6)	26.0±0.7	25.6±0.7	26.3±1.2	25.2±0.8
22:6 (n-3)	3.5±0.1	4.2±0.2**	3.4±0.3	4.0±0.1**
Saturated	40.6±1.3	41.8±0.4	42.8±0.7	44.2±0.4**
Monounsaturated	9.6±0.3	10.4±0.4**	8.9±0.5	10.3±0.3**
Polyunsaturated	49.8±0.2	47.8±0.5**	48.2±0.5	45.5±0.5**
P/S ratio <sup>a</sup>	1.2±0.1	1.1±0.0*	1.1±0.1	1.0±0.2*
Double bond index <sup>b</sup>	1.7±0.0	1.7±0.0	1.7±0.1	1.6±0.2

Values are means±S.D. of 6 rats.

\*\* p<0.01 vs.male \*p<0.05 vs.male

a P/S ratio:polyunsaturated/saturated ratio

b Double bond index: $\Sigma(\% \times (\text{the number of double bond})/100)$

**Table 4.** Fatty acid composition of heart mitochondrial and microsomal lipid.

(%)

Fatty acid	Mitochondria		Microsome	
	Male	Female	Male	Female
16:0	19.3±1.9	18.7±0.7	19.6±2.6	19.6±1.6
18:0	17.9±1.7	17.8±2.1	18.7±1.9	19.1±2.4
18:1 (n-7, n-9)	16.9±1.9	18.7±2.3	15.3±1.9	17.8±2.5
18:2 (n-6)	30.6±2.0	27.7±2.1*	29.2±2.6	26.4±2.4
20:4 (n-6)	9.3±1.6	9.9±1.5	10.5±1.8	10.3±1.8
22:6 (n-3)	5.5±1.8	7.3±1.3	6.2±1.7	6.9±1.7
Saturated	37.8±1.3	36.5±1.8	38.8±2.9	38.6±1.8
Monounsaturated	16.9±1.9	18.7±2.3	15.3±1.9	17.8±2.5
Polyunsaturated	45.4±1.9	44.9±1.3	45.9±3.6	43.6±1.4
P/S ratio <sup>a</sup>	1.2±0.1	1.2±0.1	1.2±0.2	1.1±0.1
Double bond index <sup>b</sup>	1.5±0.1	1.6±0.1	1.5±0.1	1.5±0.1

Values are means±S.D. of 6 rats.

\*\* p&lt;0.01 vs.male \*p&lt;0.05 vs.male

a P/S ratio:polyunsaturated/saturated ratio

b Double bond index: $\Sigma((\%) \times (\text{the number of double bond})/100)$ **Table 5.** Fatty acid composition of lungs mitochondrial and microsomal lipid.

(%)

Fatty acid	Mitochondria		Microsome	
	Male	Female	Male	Female
16:0	39.3±2.9	39.1±3.5	45.3±1.5	48.3±2.3*
18:0	13.1±1.7	13.7±1.9	15.6±0.3	17.6±1.5*
18:1 (n-7, n-9)	22.8±1.2	23.2±1.0	19.4±1.1	19.4±0.8
18:2 (n-6)	18.9±3.2	17.5±1.0	12.2±0.6	9.6±0.8**
20:4 (n-6)	4.7±1.2	5.2±1.2	6.0±1.4	3.9±1.5
22:6 (n-3)	1.3±0.3	1.4±0.2	1.5±0.4	1.1±0.3
Saturated	52.4±4.6	52.8±4.7	60.8±1.4	65.9±2.1**
Monounsaturated	22.8±1.2	23.2±1.0	19.4±1.1	19.4±0.8
Polyunsaturated	24.8±4.1	24.0±3.8	19.8±2.4	14.7±2.4**
P/S ratio <sup>a</sup>	0.5±0.1	0.5±0.1	0.3±0.0	0.2±0.0**
Double bond index <sup>b</sup>	0.9±0.1	0.9±0.1	0.8±0.1	0.6±0.1*

Values are means±S.D. of 6 rats.

\*\* p&lt;0.01 vs.male \*p&lt;0.05 vs.male

a P/S ratio:polyunsaturated/saturated ratio

b Double bond index: $\Sigma((\%) \times (\text{the number of double bond})/100)$

脂肪酸の相対酸化速度は、1, 2, 4, 6, 8であるという報告<sup>7)</sup>より、脂肪酸組成の点からは、Mt, Msとも不飽和指数および20:4や22:6の割合の高い雌の方が酸化されやすいと予想される。

## 2. 雄, 雌ラット腎臓のMt, Msの脂肪酸組成

MtとMsは同様の傾向を示した。(table 3.)

18:0, 18:1は雌で有意に高く, 18:2は雄で有意に高く, 20:4は雄で高い傾向があった。22:6は雌で有意に高かった。

多価不飽和脂肪酸の割合は, 雄で有意に高かったが, 不飽和指数には有意差がなかったのは, 雌の脂肪酸組成は22:6の割合が高かったためであろう。

脂肪酸組成の点からは, Mt, Msとも, 雌雄どちらが酸化されやすいか判断できなかった。

## 3. 雄, 雌ラット心臓のMt, Msの脂肪酸組成

Mtでは, 18:2のみ有意差があり雄が高かった。(table 4.)

22:6と不飽和指数は, 雌が高い傾向がみられ, 脂肪酸組成の点からは, 雌の方が酸化されやすい可能性があった。

Msには, 有意な性差は認められなかった。

## 4. 雄, 雌ラット肺のMt, Msの脂肪酸組成

Mtには, 有意な性差は認められなかった。(table 5.)

Msでは, 16:0, 18:0は雌で有意に高く, 18:2は有意に雄で高かった。

飽和脂肪酸の割合は雌で有意に高く, 多価不飽和脂肪酸の割合と不飽和指数は雄で有意に高かった。肺は, 常に外界からの刺激を受けており, 一つの防御機構として, 他の臓器と比較して飽和脂肪酸<sup>8)</sup>, 特に16:0のしめる割合が高く<sup>9)</sup>, 脂質の過酸化は起こりにくいのではないかといわれているが, 今回の結果でも雌雄およびMt, Msとも16:0の割合が高く, 不飽和指数も他の臓器と比較して低かった。

しかし, 雌雄を比較すると, 脂肪酸組成の点からは, Msでは雄の方が酸化されやすいと予想される。

4週齢のSD種, 雄, 雌ラットを標準飼料MF(オリエンタル酵母KK製)で3週間飼育した後, 組織を摘出し実験に用いた。

肝臓Mt, 肝臓Ms, 心臓Mtにおいては雌で, 肺Msにおいては雄で, 脂肪酸の不飽和指数が高く, 被過酸化性も高いことが推察された。腎臓Mt, 腎臓Msにおいては, 脂肪酸組成からはどちらが酸化されやすいか判断できなかった。心臓Ms, 肺Mtにおいては, 脂肪酸組成に性差は認められなかった。

## 文 献

- 1) 五十嵐 脩編集, ビタミンE - 基礎と臨床一, 医歯薬出版, 東京, pp116-117 (1985)
- 2) 泉 美治, 中川 八郎, 三輪谷 俊夫 共編, 生物化学実験のてびき 1 生物試料調製法, 化学同人, 京都, pp61-63 (1985)
- 3) Folch, J., Jees, M. and Stanley, G. H. S., J. Biol. Chem., 226, 497-509 (1957)
- 4) 日本生化学会編, 生化学実験講座 3 脂質の化学, 東京化学同人, 東京, p198 (1974)
- 5) 浅野 一郎, 松下 雪郎, 栄食誌, 37, 273-276 (1984)
- 6) 太田 静行, 食の科学, 91, 49-54 (1985)
- 7) Witting, L. A. and Horwitt, M. K., J. Nutr., 82, 19-25 (1964)
- 8) 八木 國夫, 五島 雄一郎, 過酸化脂質と疾患, 医学書院, 東京, p184 (1981)
- 9) 大野 公吉, 下条 貞, 代謝, 11, 1868-1585, (1974)

## 要 旨

ラット各組織ミトコンドリア(Mt)およびミクロソーム(Ms)における脂質の被過酸化性の性差について検討するため, 過酸化の基盤となる脂肪酸組成について調べた。