加齢ラットにおける組織トリグリセライドの量的, 質的变化

岩 垣 丞 恒* 小 林 啓 三** 原 田 邦 彦**
山 田 学** 酒 井 敏 夫**

QUANTITATIVE AND QUALITATIVE STUDIES ON TISSUE TRIGLYCERIDE IN AGING OF RATS

SUKETSUNE IWAGAKI, KEIZO KOBAYASHI, KUNIHICO HARADA,
MANABU YAMADA AND TOSHIO SAKAI

ABSTRACT

Triglyceride contents of liver, heart muscle and skeletal muscles (rectus femoris, tibiariis anterior, soleus, plantaris and extensor digitorum longus) were determined on 1, 3.5, 14, 18 and 21 months-old rats, and especially on 14 and 21 months-old rats composition of triglyceride fatty acids was analyzed and interrelation of these triglyceride contents with aging of rats was studied quantitatively and qualitatively. Following results were obtained:

1) Changes in liver and muscular triglyceride contents appeared on 14 months-old rats and were significant increase at 21 months-old rats.

2) Liver triglyceride content significantly decreased at 21 months-old rats ($p < 0.05$).

3) Triglyceride contents of tibiariis anterior and extensor digitorum longus muscles were mostly unchangeable through the aging of rats.

4) But triglyceride contents of soleus, rectus femoris and plantaris muscles in 21 months-old rats significantly increased ($p < 0.05$) and the individual difference was great.

5) In composition of triglyceride fatty acids, increase of C_{18} , C_{18-1} , C_{18-2} and C_{18-3} was observed in epididymal adipose tissue, soleus and rectus femoris muscle on 21 months-old rats, but in extensor digitorum longus and tibiariis anterior muscles.

From these results, changes of tissue triglyceride contents with aging of rats are different in each tissue and increase of triglyceride content is present with qualitative changes in composition of triglyceride fatty acids, increase of long chain and unsaturated fatty acids, and organic specificity, which is related to the functional changes with aging of rats is considered.

(J. Physical Fitness Japan 1980, 29 : 110~116)

緒 言

脂質代謝における主たるエネルギー源は脂肪組織の triglyceride である。他の組織に遊離脂肪酸を動員し、これらの組織との相互的代謝機構が成立している。しかし、加齢現象では、脂肪組織の増加のみならず、血清、肝臓、骨格筋等にも triglyceride の増加が認められるようになる³⁾。

この現象は単なるエネルギー源としての増加とは考えにくい。Harriman⁶⁾は骨格筋脂質の多量の蓄積は病的変化の指標となりうるとさえ述べ、生理機能との関連を考えさせられる。しかし、このような現象は各組織との相互的関連によるものか、あるいはそれぞれの組織に特異的に認められる現象であるかは十分解明されていない。本実験はこの点に着目し、加齢に伴う triglyceride の変化

* 東海大学体育学部運動生理

Department of Physical Recreation, School of Physical Education
Tokai University.

** 東京慈恵会医科大学第二生理学教室

Department of Physiology, The Jikei University School of Medicine.

を量的並びに質的にとらえ、副睾丸脂肪組織、血清、心筋、骨格筋、肝臓 triglyceride の相互的關係について検討した。

実験方法

実験動物には生後 1, 3.5, 14, 18, 21 ケ月齢のウィスター系雄性ラットを用いた。これらのラットを 18~24 時間の絶食後、断頭、脱血し、心臓、肝臓、骨格筋（大腿直筋、前脛骨筋、長指伸筋、足底筋、ヒラメ筋）を摘出し、4°C 以下の Krebs-Ringer 液中で臍、結合組織、脂肪組織を十分に切除した。各組織を適当な大きさに切り、ガーゼで十分に水分を取り除き torsion balance で湿重量を計量した後、クロロホルム：メタノール混合液（2:1, v/v）に入れ、Folch たち⁸⁾の方法にしたがって脂質を抽出した。これらの脂質を薄層クロマトグラフィー（展開剤：ヘプタン：石油エーテル：ジエチルエーテル：酢酸、60:20:20:1 v/v/v/v）で分離し、1%ヨウ素-クロロホルム溶液を噴霧し、各脂質分画の位置を確認した後、それぞれの脂質をかきとり、Kabara & Chen の方法⁹⁾を用いて triglyceride を定量した。

脂肪酸構成は、14及び21ケ月齢ラットについて検索した。同様の絶食条件下でペントバルビタールで麻酔後、開胸し、右心室から採血し、直ちに副睾丸脂肪組織と前述と同様の組織を摘出し、同様の手技を用いて triglyceride と遊離脂肪酸 (FFA) を抽出した。これらの脂質を Stoffel たち¹⁴⁾の方法に従って methylation し、ガスクロマトグラフィー (FID-163, 日立製作所製) で分析した。測定条件は温度190°C, キャリヤガスは窒素 (流速: 25 ml/min), 空気 1.5kg/cm², 水素 25ml/min である。カラムには 20% diethylene-glycol-succinate, chromosorb W AW (80-100 mesh) を充填したガラスカラム (3 m×3φ) を用いた。

実験結果

各月齢ラットの心筋並びに肝臓 triglyceride 含有量を図 1 に示した。各月齢ラットの心筋 triglyceride は 1~2 µg/mg の範囲にあり、そのばらつきは少ない。肝臓 triglyceride は 1, 3.5, 14 ケ月齢ラットともに 8~12µg/mg の範囲にあ

Fig. 1 Changes of triglyceride contents in liver and heart muscle with aging of rats. Each value is presented by mean±S.D.

Fig. 2 Changes of muscular triglyceride contents with aging of rats. Upper figure; skeletal muscles which showed dominant increase of the triglyceride, lower figure; skeletal muscles which were unchangeable through aging of rats.

ったが、そのばらつきが大きく、統計学的有意差はなかった。しかし、21 ケ月齢ラットの肝臓 triglyceride は著しく低下し、統計学的に有意であった ($P<0.05$)。

各月齢ラットの骨格筋 triglyceride 含有量を図 2 に示した。骨格筋 triglyceride には各月齢ではほとんど変動のない筋肉（前脛骨筋、長指伸筋）と 14あるいは 21 ケ月齢で著しい増加を示した筋肉（大腿直筋、ヒラメ筋、足底筋）とが認められ、21ケ月齢ラットでは、これらの増加は統計学的に有意であった ($P<0.05$)。triglyceride の増加が認められた筋では 18ケ月齢の値を参考にする、その増加は 14ケ月齢あたりから生じてくると考えられる。しかし、量的にかなりばらつきが大きく、個体差も同時期に生じていることを示唆し

Fig. 3 Composition of free fatty acids in epididymal adipose tissue and serum. Upper figure; 14 months-old rat, lower figure; 21 months-old rat.

ている。

14並びに21ヶ月齢ラットの副睪丸脂肪組織と血清との遊離脂肪酸分画を図3に示した。各月齢ラットの副睪丸脂肪組織ではC₁₄, C₁₆, C₁₈₋₁, C₁₈₋₂, C₁₈₋₃が顕著に認められ, 各月齢間で遊離脂肪酸分画に差は認められなかった。血清遊離脂肪酸分画は副睪丸脂肪組織の遊離脂肪酸分画と類似し, 14ヶ月齢と21ヶ月齢ラットとの間には質的差は認められなかった。これらの結果は副睪丸脂肪組織から遊離する脂肪酸分画に加齢による変動はなく, 血清遊離脂肪酸分画に直接的に関連している事を示している。

しかし, 14ヶ月齢並びに21ヶ月齢ラットの副睪丸脂肪の triglyceride 構成脂肪酸では明らかな差異が認められた(図4)。14ヶ月齢ラットの triglyceride 構成脂肪酸に対し, 21ヶ月齢ラットではC₁₀, C₁₂が低下し, 逆にC₁₈, C₁₈₋₁, C₁₈₋₂, C₁₈₋₃が著しく多くなっている。したがって, 図3及び図4の結果から, 副睪丸脂肪組織の triglyceride 構成脂肪酸に加齢変動が生じているにもかかわらず, 脂肪組織並びに血清遊離脂肪酸分画にはその影響が生じていないことがわかる。

Fig. 4 Composition of triglyceride fatty acids in epididymal adipose tissue. Upper figure; 14 months-old rat, lower figure; 21 months-old rat.

Fig. 5 Composition of triglyceride fatty acids in liver and serum. Upper figure ; 14 months-old rat, lower figure ; 21 months-old rat.

Fig. 6 Composition of triglyceride fatty acids in soleus and rectus femoris muscles. Upper figure ; 14 months-old rat, lower figure ; 21 months-old rat.

肝臓並びに血清 triglyceride の構成脂肪酸分画を図5に示した。14ヶ月齢ラットでは肝臓並びに血清 triglyceride の構成脂肪酸は類似し、血清 triglyceride が肝臓で合成される lipoprotein に由来することを示している。しかし、21ヶ月齢ラ

ットではこれらの構成脂肪酸分画で特にC₁₆の低下が認められた。

triglyceride の増加が認められなかった前脛骨筋並びに長指伸筋について、その triglyceride 構成脂肪酸分画を図6に示した。前脛骨筋では各月

Fig. 7 Composition of triglyceride fatty acids in soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles. Upper figure ; 14 months-old rat, lower figure ; 21 months-old rat,

齢ラットの間に差はほとんど認められなかった。長指伸筋ではその構成脂肪酸分画でC₁₄の低下, C₁₆の増加が認められたが, C₁₈, C₁₈₋₁, C₁₈₋₂等には変動が認められない。

Triglycerideの増加が著しく認められたヒラメ筋, 大腿直筋について, そのtriglyceride構成脂肪酸分画を図7に示した。14ヶ月齢ラットに比べ, 21ヶ月齢ラットではその分画上にC₁₆, C₁₈, C₁₈₋₁の増加が認められ, 図6の結果とは明かに異っていた。図2, 6, 7の結果から加齢による骨格筋Triglycerideの増加の背景には単に量的な変化ばかりではなく, 質的にも異っていることがわかる。

実験成績に対する考察

組織triglycerideは細胞間隙, 細胞膜, 細胞内のtriglycerideの総和である。細胞間隙でのtriglycerideの増減は血液中lipoprotein並びにchylomicroneの特性からみても考えにくいので, その大部分は細胞膜並びに細胞内のtriglycerideがこの変動に関係している。

佐藤¹²⁾はガマ骨格筋細胞膜構成脂質のうち15~20%がtriglycerideであると報告している。Peter & Fiehn¹¹⁾はラットの赤筋並びに白筋について細胞膜, 筋小胞体, ミトコンドリアの構成脂質を

比較し, 細胞膜に最も多くの中性脂質が存在していると述べている。また, Nagai たち¹⁰⁾は生後1~21ヶ月齢ラットの心筋では組織中総 phospholipidsの増加に組織中triglycerideの増加が伴うことを示した。これらの報告から細胞膜triglycerideも組織中triglycerideの変動に関連していることが考えられる。

しかし, 運動⁹⁾やニコチン酸投与²⁾による組織triglycerideの減少, corn oil⁷⁾やethanol投与¹⁾で観察される組織triglycerideの増加などは短時間で生じ, これらの変動には細胞内triglycerideが最も大きな役割をもっていると考えられる。Hayashida & Schmalbruch は⁷⁾ラットにcorn oilを与え2時間後にmitochondriaの多い筋線維(Type C)で細胞内の脂肪滴の直径が20%増大したと報告し, 速かにtriglycerideとしてester化されている事を示した。また, Harriman は⁶⁾ヒト骨格筋細胞の脂肪滴は正常な場合, 直径が0.5 μm 以下でその数も少ないが, 病的な状態では直径が1.5 μm にも増加し, その後も多くなるという。Stein & Stein¹³⁾はラットの心臓灌流液にoleic acid-³Hを加え, ラジオオートグラフによる分析を行なった結果, 灌流初期には筋小胞体, mitochondriaにradio activityが認められるが, その後は脂肪滴中に多くなるというester化の機

構を報告した。これらの報告は細胞内 triglyceride の変動を 中心的に 考えてもよい 事を 示唆している。

14ヶ月齢と21ヶ月齢ラットを比較すると、組織 triglyceride の変動には、著しい増加を示した筋（ヒラメ筋、大腿直筋、足底筋）、全く変化のなかった筋（前脛骨筋、長指伸筋、心筋）、減少した肝臓が認められた。これらの結果は老化における triglyceride 含有量の増加はそれぞれの組織によって異なり、全ての臓器、組織に統一的に認められる現象ではない事を示している。Triglyceride の増加が認められた組織では、Dixon⁴⁾ の考え方を参考にするとそれらの細胞内で micellar fatt から globular fatt への変化が考えられ、“deposition” からいわゆる “accumulation” への移行も考えられる。本実験結果（図2）はこの量が著しく、21ヶ月齢ラットのこれらの筋では特にその triglyceride 構成脂肪酸分画に C₁₆, C₁₈₋₁, C₁₈₋₂ の増加があり、質的にも異ってくることを示した。この “accumulation” の背景には phospholipids 並びに cholesterol と酵素活性との関連性が弱まる事が考えられる。一方、Stein & Stein¹³⁾ は oleic acid-³H を用いて筋小胞体 triglyceride と mitochondria triglyceride との比を経時的に観察し、5分間に3.5から1.5へ減少すると報告した。このような質的变化は筋小胞体との関連にある事を示す。この質的变化の現象は副睾丸脂肪組織にも認められ、14と21ヶ月齢ラットを比較すると21ヶ月齢ラットではC₁₆, C₁₈, C₁₈₋₁ C₁₈₋₂, C₁₈₋₃に増加があった（図4）。しかし、血清並びに副睾丸脂肪組織の遊離脂肪酸分画にはこれらの分画の増加が認められない（図3）。この事柄も前述の脂肪滴における構成変化とを支持する結果であろう。

しかし、同じ骨格筋でも 1, 3.5, 14, 21 ヶ月齢を通じて全く triglyceride 含有量に変動のない筋（前脛骨筋、長指伸筋）もあり、これらの筋では triglyceride 構成脂肪酸分画にも変化がなかった。

骨格筋 triglyceride 含有量並びにその構成脂肪酸分画の違いには、赤筋並びに白筋による差も考えられるが、明確に区別できるわけではなく、また lipoprotein lipase 活性¹⁵⁾ の差異を考慮すると考えにくい結果である。したがって、これらの変

化はむしろ老齢化に伴う筋の機能低下に関連しているように思われる。

肝臓 triglyceride は21ヶ月齢ラットで有意の低下が認められ、Carlson たち⁸⁾ の結果とは異なっている。この差異はラットの月齢差によると考えられる。本実験において、その構成脂肪酸分画はC₁₆の低下が著しく、血清 triglyceride の構成脂肪酸分画にも同様のパターンが得られた。これらの結果は肝臓での lipoprotein 合成に質的な変化が生じている事を示し、肝臓 triglyceride の減少も老齢化に伴う機能低下であると考えられる。この現象は血清 lipoprotein 中の triglyceride 構成脂肪酸分画に出現しているので、その分画変動が老齢化を推察する1つの指標となり得ることを示す。

摘 要

加齢ラットにおける triglyceride の増加を、心筋、肝臓、血清、骨格筋（大腿直筋、前脛骨筋、長指伸筋、足底筋、ヒラメ筋）、副睾丸脂肪組織について量的並びに質的に検討し、相互関係を追究した。

1) 各組織の triglyceride 含有量の変動はおおよそ14ヶ月齢以後のラットに認められた。

2) 心筋、前脛骨筋、長指伸筋の triglyceride 含有量は 1, 3.5, 14, 21 ヶ月齢ラットではほとんど変動が認められなかった。

3) 肝臓 triglyceride は21ヶ月齢ラットで著しく低下し、統計学的有意差（ $P < 0.05$ ）が認められた。

4) 大腿直筋、足底筋、ヒラメ筋の triglyceride 含有量は14ヶ月齢あたりから徐々に増加し、21ヶ月齢ラットでは統計学的に有意（ $P < 0.05$ ）な増加となった。

5) 14ヶ月齢並びに21ヶ月齢ラットの各組織の triglyceride 構成脂肪酸分画を比較すると、21ヶ月齢ラットではC₁₆, C₁₈₋₁, C₁₈₋₂ の増加が認められ、血清中遊離脂肪酸分画への反映は認められなかった。また、triglyceride 含有量の増加が認められた骨格筋（大腿直筋、ヒラメ筋）でも同様の変化が認められた。

以上の結果から、加齢ラットにおける triglyceride の変動はそれぞれの組織により異なり、

triglyceride の増減が著しい組織ではその構成脂肪酸にも質的な差が生じることが示唆された。

(受付 昭和55年2月6日)

文 献

- 1) Baraona, E. and Lieber, C.S. (1979) : Effects of ethanol on lipid metabolism. *J. Lipid Res.* **20**, 289-315.
- 2) Carlson, L.A., Fröberg, S.O. and Nye, E.R. (1966) : Acute effects of nicotinic acid on plasma, liver, heart muscle lipids. *Acta Med. Scand.* **180**, 571-579.
- 3) Carlson, L.A., Fröberg, S.O. and Nye, E.R. (1968) : Effect of age on blood and tissue lipid levels in the male rats. *Gerontologia* **14**, 65-79.
- 4) Dixon, K.C. (1958) : Fatty deposition : A disorder of the cell. *Q.J. Exp. Physiol.* **43**, 139-159.
- 5) Folch, J.R., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H. (1957) : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- 6) Harriman, D.G.F. (1973) : The fine structure of intramuscular lipids in skeletal muscle. In : *Basic Research in Myology*, I. Ed. by Kakulas. Amsterdam. Excerpta Medica, 177-182.
- 7) Hayashida, Y. und Schmalbruch, H. (1972) : Zur Grobe der Fettpartikle in mitochondrienreichen skelett muskel fasern de Ratte in Abhaging-keit von der Nahrungsaufnahme. *Z. Zellforsch.* **127**, 374-381.
- 8) Issektz, B.Jr., Miller, H.I., Paule, P. and Rodahl, K. (1964) : Source of fat oxidation in exercising dogs. *Am. J. Physiol.* **207**, 814-817.
- 9) Kabara, J.J. and Chen, J.S. (1976) : Microdetermination of lipid classes after thin-layer chromatography. *Analyt. Chem.* **48**, 814-817.
- 10) Nagai, T., Kobayashi, K., Harada, K., Iwagaki, S. and Sakai, T. (1979) : Change in lipid composition in developing myocardial muscle. *Jikeikai Med. J.* **26**, 201-207.
- 11) Peter, J.B. and Fiehn, W. (1973) : Muscle lipids : Composition of muscle composed predominantly of one fibre type and of subcellular fractions. In : *Basic Research in Myology*. I. Ed. by B.A. Kakulas. Amsterdam, Excerpta Medica, 183-189.
- 12) 佐藤恒久(1970) : ガマ骨格筋細胞膜の 2, 3 の酵素活性とその局在性に関する考察. *日本生理学雑誌* 32巻 317-328.
- 13) Stein, O. and Stein, Y. (1968) : Lipid synthesis, intracellular transport and storage. III. Electron microscopic radioautographic study of the rat heart perfused with tritiated oleic acid. *J. Cell. Biol.* **36**, 63-77.
- 14) Stoffel, W., Chu, F. and Ahrens, E.H.Jr. (1959) : Analysis of long-chain fatty acid by gas-liquid chromatography. *Analyt. Chem.* **31**, 307-308.
- 15) Tan, M.H., Sata, T. and Havel, R.J. (1977) : The significance of lipoprotein lipase in rat skeletal muscles. *J. Lipid Res.* **18**, 363-370.