

原 著

ラット唾液腺リン脂質の加齢変動に
およぼすビタミンD過剰投与の影響

長門 孝次 宮田 左京 小野 繁

岩手医科大学医学部生化学講座* (主任: 小野 繁教授)

〔受付: 1980年12月3日〕

抄録: 加齢と唾液腺機能とは密接な関連のあることが知られているが、膜の主要構成成分であるリン脂質の代謝におよぼすビタミンDの影響については、ほとんど報告がない。そこで著者らは、ビタミンD過剰投与により、若年期、老年期の唾液腺リン脂質にどのような変化が起るかについて検討した。生後3か月、12か月のSprague-Dowley系雄性ラットにErgocalciferol 64万 I. U. を30日間にわたり投与した。そして耳下腺、顎下腺のリン脂質をTLCにより分画し、phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC)の各分画のリン量を比色定量した。また各分画の構成脂肪酸の構成率をガスクロマトグラフィーにより測定した。耳下腺では、生後12か月のビタミンD過剰投与群のPE分画は対照群に比較して脂質リン量が増加し、脂肪酸構成率では、リノール酸、アラキドン酸の増加、パルミトオレイン酸の減少が認められた。顎下腺では、脂質リン量は生後3か月、12か月の両群とも減少が認められ、脂肪酸構成率では、生後3か月群のPC分画で、オレイン酸、リノール酸の減少が認められた。唾液腺リン脂質代謝におよぼすビタミンD過剰投与の影響はそれぞれ異なり、耳下腺では老年期のphosphatidylethanolamine代謝に対し促進的に、一方、顎下腺では若年期のphosphatidylcholineに阻害的な影響を与えることが明らかになった。

緒 言

唾液腺の加齢に伴う脂質代謝の変化についての研究は少なく、Pritchard¹⁾ならびにBurzynski²⁾はラット顎下腺のリン脂質リン量の加齢変動を報告し、長門³⁾はラット耳下腺のリン脂質構成脂肪酸について検討し、リノール酸、アラキドン酸が加齢に伴い減少したと報告しているにすぎない。

一方、ビタミンDは特に腸管、腎および骨に作用して、カルシウム、リンの代謝平衡を維持していることはよく知られており、ビタミンD過剰投与により、ラット小腸からのカルシウム

ならびにリンの吸収は促進されるとHarison⁴⁾らが報告している。また、ビタミンD投与時の臨床的観察では高カルシウム血症が著明であり、血管、心臓、骨などに異所性石灰沈着の起こることが知られている。さらに、ビタミンD投与の脂質代謝におよぼす影響について、Goodman⁵⁾らはビタミンD過剰投与により、ニワトリの小腸絨毛膜のリン脂質の不飽和脂肪酸の増加を報告し、Rasmussen⁶⁾らは同様にビタミンDで処理したニワトリの小腸刷子縁膜のphosphatidylcholine分画のリノール酸、アラキドン酸が増加したと報告している。

一般に唾液腺は加齢に伴い分泌能の低下をき

Effects of excess administration of vitamin D on the changes in aging of phospholipids of rat salivary glands

Koji NAGATO, Sakyō MIYATA and Shigeru ONO

(Department of Biochemistry, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka 020)

*岩手県盛岡市内丸19-1 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 6 : 18-24, 1981

たし、膜の主要構成成分であるリン脂質の代謝も低下すると考えられている。そこで著者らはラットを用い、唾液腺を若年と老年に別けて、ビタミンD過剰投与がリン脂質の加齢変化にどのような影響をおよぼすかについて検討した。

実験材料と方法

Sprague-Dawley 系雄性ラットを生後3か月と12か月の2群に分け、各々8匹づつに Ergocalciferol (エーザイ製) を30日間にわたり、計 640,000 I.U. を腹腔内投与した。水および飼料 (オリエンタル固型MF) は自由に与えた。

実験方法

1) 脂質の抽出

ラットを断頭し、耳下腺と顎下腺をすばやく摘出し、湿重量を計測した。両腺をクロロホルム (C) : メタノール (M) = 2 : 1 v/v [C : M (2 : 1)] の溶液中でホモジナイズし、これを C : M (2 : 1) 溶液で20倍容に調整して濾過し、その濾液10ml に水 2 ml を加え、混和後、2,400 rpm 20分間遠心分離した。上層を

除去し同様の操作を計3回行った。その後、下層のクロロホルム層を N₂ ガス下で減圧乾固した。

2) 薄層クロマトグラフィーによる脂質の分離精製

上記試料を一定量の C : M (2 : 1) 溶液で再抽出し、TLC plate にアプリーケートした。TLC plate は Wakogel B-O を 0.5mm の厚さに塗布し、120°C、3時間活性化したものを用いた。TLC は2次元展開した。一次元はクロロホルム、メタノール、アンモニア水 (65 : 25 : 5)、2次元はクロロホルム、アセトン、メタノール、酢酸、水 (5 : 2 : 1 : 1 : 0.5) を展開溶媒として用いた。Plate は乾燥後ヨードにて発色させ、分画のスポットをすばやく採取した⁸⁾。リン脂質分画は Fig. 1 のごとく分離した。すなわち、phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), sphingomyeline と lysophosphatidylethanolamine (Sph + LPE) である。TLC は同一試料につき2枚同時に展開し、各々リン定量と脂肪酸分析に用いた。

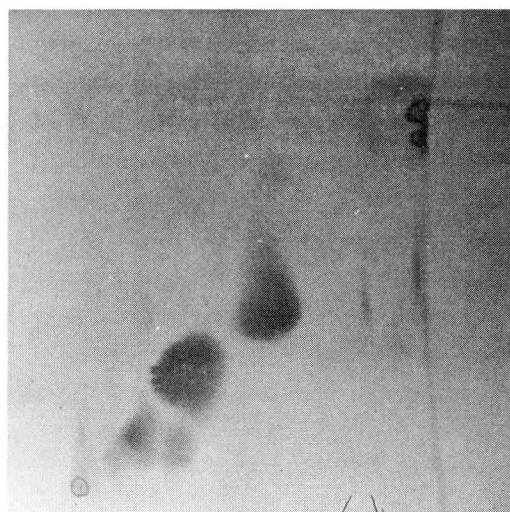
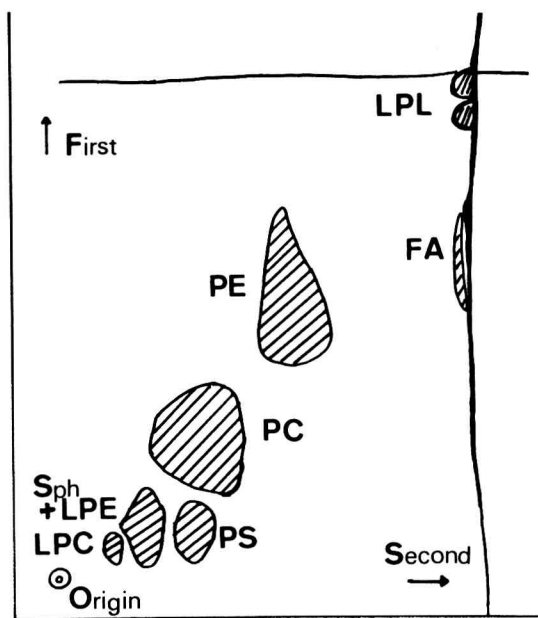


Fig. 1. Map of spots obtained by TLC.

3) 脂質リン量の定量

リン脂質分画をマイクロケルダールフラスコ中にて70%過塩素酸で加熱分解し、モリブデン酸アンモニウム 1.0ml とアスコルビン酸 1.0ml を加え加温発色し、820nm で比色定量した⁹⁾。

4) ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸分析

TLC plate のリン脂質各分画をキャップ付容器に採取し、14% v/w BF₃-Methanol complex 2 ml を加え、N₂ 封入後、100°C、30分間加温して、脂肪酸メチルエステル化を行った¹⁰⁾。放冷後、ヘキサン10 ml を加え、ヘキサン層のみをN₂ ガス下で減圧濃縮し、これをガスクロマトグラフィーにより分離し、面積法によりC12: 0からC24: 1まで16個のピーク面積を100%として構成率を計算した。

5) 血漿 Ca の定量

血漿0.05 ml にオルトクレゾールフタレイコンプレキソ 0.5ml を加え 570nm で比色定量した¹¹⁾。

実験結果

1) ラット体重

対照に比較して、生後3か月の投与群では411gで6.4%の減少、生後12か月の投与群では523gで5.1%の体重減少が認められた。

2) 血漿中のCa量 (mEq/l ± S.E.)

生後3か月の場合では投与群5.73 ± 0.21, 対照群5.96 ± 0.35, 生後12か月の場合では投与群5.15 ± 0.27, 対照群5.13 ± 0.15で、ビタミンD投与両群の血漿Ca濃度は有意に高値を示した。

3) 耳下腺と顎下腺のリン脂質分画の単位腺湿重量当りの脂質リン量 (Fig. 2, 3)

耳下腺のPE分画では生後12か月の投与群で対照群に比し増加が認められた。PC分画では3, 12か月両群ともに変化はみられなかった。

顎下腺のPE, PC分画では3, 12か月の両群に減少が認められた。

4) 耳下腺のリン脂質構成脂肪酸百分率のビタミンD投与による変化 (Table 1, 2)

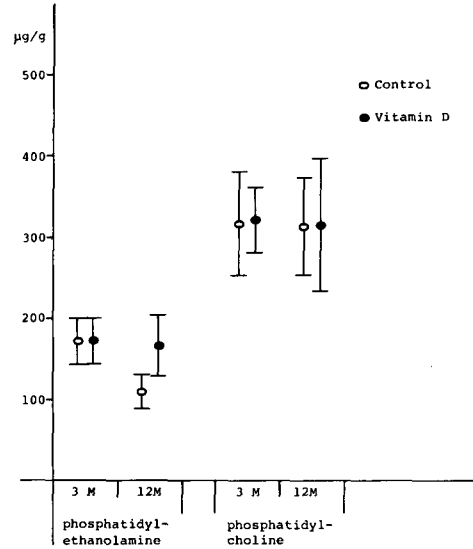


Fig. 2 Changes in lipid phosphorus levels of rat parotid glands.

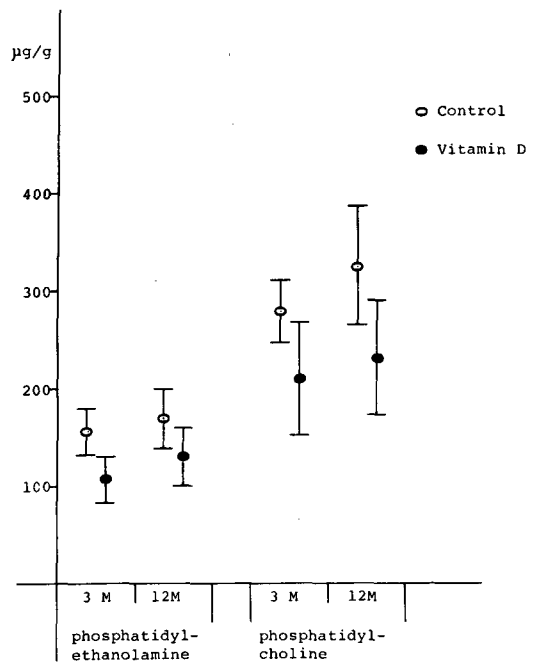


Fig. 3 Changes in lipid phosphorus levels of rat submandibular glands.

生後3か月の投与群ではPE, PCの脂肪酸比率にほとんど変化はみられなかった。生後12か月の投与群のPEではパルミチン酸(16:

Table 1 Fatty acid compositions of phosphatidylethanolamine in rat parotid glands. (%)

	3 Months		12 Months	
	Control	Vitamin D	Control	Vitamin D
16 : 0	17.14 ± 3.16	15.12 ± 3.49	7.14 ± 1.73	11.49 ± 2.71*
16 : 1	2.25 ± 0.59	2.51 ± 0.64	22.03 ± 3.68	10.55 ± 5.36*
18 : 0	19.63 ± 1.54	21.15 ± 2.56	20.60 ± 2.26	20.47 ± 4.45
18 : 1	13.72 ± 1.66	11.44 ± 2.53	16.36 ± 3.46	16.88 ± 3.14
18 : 2	8.25 ± 1.99	8.47 ± 1.19	1.25 ± 0.57	5.24 ± 1.96*
20 : 4	18.36 ± 6.20	18.17 ± 5.41	2.26 ± 1.04	8.86 ± 4.07*
20 : 5	8.02 ± 4.64	12.71 ± 5.30	27.62 ± 3.75	17.48 ± 6.38*

means ± S. E. * : P<0.05

Table 2 Fatty acid compositions of phosphatidylcholine in rat parotid glands. (%)

	3 Months		12 Months	
	Control	Vitamin D	Control	Vitamin D
16 : 0	54.27 ± 3.69	53.42 ± 4.27	29.14 ± 2.61	43.49 ± 7.55*
16 : 1	2.44 ± 0.87	2.64 ± 0.97	21.51 ± 3.63	16.93 ± 5.81
18 : 0	9.08 ± 1.14	9.18 ± 1.39	14.68 ± 2.48	12.93 ± 3.08
18 : 1	8.42 ± 0.99	7.20 ± 1.39	16.77 ± 1.56	12.18 ± 3.06*
18 : 2	8.08 ± 1.76	7.83 ± 1.78	2.94 ± 1.09	3.40 ± 1.67
20 : 4	8.35 ± 2.33	8.26 ± 3.32	2.30 ± 0.60	2.84 ± 1.39
20 : 5	2.52 ± 1.09	3.32 ± 1.12	7.96 ± 1.34	10.12 ± 6.01

means ± S. E. * : P<0.05

0), リノール酸 (C18:2), アラキドン酸 (C20:4) の増加, パルミトオレイン酸 (C16:1) の減少が認められた。(Table 1)。

生後12か月の投与群のPCではパルミチン酸の増加, オレイン酸 (C18:1) の減少が認められた (Table 2)。

5) 顎下腺のリン脂質構成脂肪酸百分率のビタミンD投与による変化 (Table 3, 4)

PE分画ではビタミンD投与による変化は3, 12か月両群ともにみられなかった。PC分画では投与3か月群においてのみパルミチン酸の増加, オレイン酸, リノール酸の減少が認められた。

考 察

唾液腺の膜主要構成々分であるリン脂質は, 加齢に伴い種々の特徴的な変化をきたすことが

知られている。本研究により, ビタミンD過剰投与は耳下腺では老年期, 顎下腺では若年期のリン脂質分画に影響を及ぼすことが明らかになった。ラット耳下腺のビタミンD過剰投与群と対照群を比較すると, 生後3か月ではリン脂質の単位腺湿重量当りのリン量および構成脂肪酸比率に変動は認められなかったが, 生後12か月の投与群ではPE分画の単位腺湿重量当りのリン量の増加が認められた。さらに構成脂肪酸比率ではPE構成脂肪酸のパルミチン酸, リノール酸, アラキドン酸が増加し, 逆にパルミトオレイン酸が減少した。また, PC分画ではパルミチン酸が増加し, オレイン酸の減少が認められた。

ビタミンD過剰投与によるリン脂質代謝についての報告をみると, Thompsonら¹²⁾はビタミンDがラット小腸粘膜のリン脂質に作用し,

Table 3 Fatty acid compositions of phosphatidylethanoamine in rat submandibular glands. (%)

	3 Months		12 Months	
	Control	Vitamin D	Control	Vitamin D
16 : 0	14.93 ± 3.58	11.19 ± 2.20	10.98 ± 1.61	9.65 ± 1.78
16 : 1	0.97 ± 0.32	1.00 ± 0.18	0.91 ± 0.16	0.76 ± 0.29
18 : 0	22.32 ± 3.36	20.33 ± 3.65	18.06 ± 1.62	17.37 ± 1.47
18 : 1	19.64 ± 2.35	17.03 ± 1.87	16.58 ± 1.33	18.93 ± 2.69
18 : 2	14.62 ± 2.07	17.04 ± 2.47	18.03 ± 2.05	18.45 ± 2.55
20 : 4	20.71 ± 5.22	22.87 ± 4.75	22.47 ± 3.06	23.36 ± 4.36
20 : 5	3.14 ± 1.75	3.79 ± 0.63	5.70 ± 2.32	4.04 ± 3.34

means ± S. E.

Table 4 Fatty acid compositions of phosphatidylcholine in rat submandibular glands. (%)

	3 Months		12 Months	
	Control	Vitamin D	Control	Vitamin D
16 : 0	44.61 ± 3.84	50.90 ± 3.98*	46.70 ± 3.71	44.03 ± 4.95
16 : 1	0.87 ± 0.20	0.69 ± 0.17	0.75 ± 0.30	0.59 ± 0.20
18 : 0	11.51 ± 1.80	10.89 ± 2.22	9.68 ± 0.95	10.40 ± 1.14
18 : 1	10.17 ± 1.40	8.02 ± 1.45	8.96 ± 0.89	9.78 ± 1.43
18 : 2	17.23 ± 1.65	12.83 ± 1.62*	17.70 ± 2.00	15.74 ± 3.66
20 : 4	10.60 ± 2.33	9.12 ± 2.35	7.83 ± 2.39	7.96 ± 3.44
20 : 5	1.23 ± 0.53	1.98 ± 0.42	2.32 ± 0.86	2.48 ± 1.85

means ± S. E. * : P < 0.05

リン酸塩のリン取込みを3倍程度増加させたが、脂質リン量の総量は変化しなかったと述べている。Hosoyaら¹³⁾は、ビタミンDがラット肝のミトコンドリアの phosphatidylethanolamine へのリン取り込みを促進させたが、phosphatidylcholine には影響が認められなかったと述べている。Goodmanら⁵⁾は、ビタミンDを投与したニワトリの小腸絨毛膜ではリン脂質リン量が増加したと報告している。これらの報告は、本実験の生後12か月のラットにビタミンD過剰投与した群のPE分画の脂質リン量の増加と一致している。

一方、ビタミンDがリン脂質の構成脂肪酸に与える影響について、Rasmussenら⁶⁾はビタミンDで処理したニワトリの小腸刷子縁膜の phosphatidylcholine 分画ではリノール酸、アラキドン酸が増加し、C22:0、その他の高

度飽和脂肪酸が減少したが、phosphatidylethanolamine 分画ではほとんど変化は認められなかったと述べている。本実験では、生後12か月のビタミンD投与群の phosphatidylethanolamine 分画でリノール酸、アラキドン酸の増加が認められたが、phosphatidylcholine 分画ではほとんど変化せず、むしろ、諸家の報告と逆の傾向を示した。

ラット耳下腺の加齢に伴うリン脂質の構成脂肪酸の変動について、長門⁷⁾は phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine 両分画において生後3か月以降加齢に伴い、パルミチン酸、リノール酸、アラキドン酸が減少し、パルミトオレイン酸、オレイン酸が増加したと報告している。本実験の生後12か月のビタミンD過剰投与群の phosphatidylethanolamine 分画の構成脂肪酸変動は、長門の報告と比較する

と反対の結果を示しており、ビタミンDの過剰投与が加齢に伴う耳下腺のリン脂質の正常分布に与える影響が大であることは興味深い。Andrew¹⁴⁾は生後300日以降のラット耳下腺では40%以上の脂肪変性が認められたと記載している。これらのことから、ビタミンDは脂肪変性を伴う老齢ラット耳下腺の phosphatidylethanolamine に特異的に作用して、必須脂肪酸の代謝と膜透過性の低下を回復することを示唆している。

ラット顎下腺のビタミンD過剰投与群と対照群を比較すると、リン脂質の単位腺湿重量当りのリン量は生後3, 12か月両群の phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine 両分画に減少が認められた。本研究の顎下腺リン量の変化は耳下腺とは異なり、Goodmanら⁵⁾のビタミンD投与実験でのリン脂質リン量が増加した報告と反対の結果を示した。Thompsonら¹²⁾はビタミンDが小腸粘膜のリン脂質へのリン取り込みを促進するが、腎では取り込みは少量であり、肝ではリン取り込みを促進しなかったと報告している。また、Freundら¹³⁾はラット顎下腺は耳下腺に比較して Calcium-binding proteins の活性は低く、ビタミンDが臓器別に異った影響を与えることを示唆しており、顎下腺ではビタミンDはむしろ、リン脂質代謝を低下させると思われる。

本実験の構成脂肪酸比率では、生後3か月のビタミンD過剰投与群の phosphatidylcholine 分画で、パルミチン酸の増加、オレイン酸、リノール酸の減少が認められた。Rasmussenら⁶⁾の実験では phosphatidylcholine の脂肪酸のうち、リノール酸、アラキドン酸が増加したと報告している。また Alam¹⁰⁾は、cornoil 投与による必須脂肪酸の過剰投与実験において、ラット顎下腺のリン脂質の脂肪酸で、モノ不飽和脂肪酸が減少し、リノール酸、アラキドン酸が増加したと報告しているが、興味あることは、本実験で得た顎下腺のリノール酸の結果と

反対の傾向を示したことであった。成長期の顎下腺では、ビタミンDの過剰投与により phosphatidylcholine の代謝が阻害的な影響を受けるものと思われる。

結 論

耳下腺と顎下腺のリン脂質代謝の加齢変動におよぼすビタミンD過剰投与の影響を知るために、生後3か月と12か月の Sprague-Dowley 系雄性ラットに、Ergocalciferol を30日間におわり、64万 I.U. を腹腔内投与し、両唾液腺の脂質リン量と構成脂肪酸の分析を行なった。

- 1) 血漿 Ca は生後3か月、12か月両群とも対照群に比較して有意に増加した。
- 2) 単位腺湿重量当りの脂質リン量は、耳下腺では生後12か月の PE 分画で増加、顎下腺では生後3か月、12か月の PE, PC 分画で減少した。
- 3) 耳下腺の PE 分画の構成脂肪酸は生後12か月に C16: 0, C18: 2, C20: 4 の増加, C16: 1 の減少が認められた。
- 4) 耳下腺の PC 分画の構成脂肪酸は生後12か月に C16: 0 の増加, C18: 1 の減少が認められた。
- 5) 顎下腺の PC 分画の構成脂肪酸は生後3か月に C16: 0 の増加, C18: 1, C18: 2 の減少が認められた。

以上の成績より、ビタミンD過剰投与は、耳下腺では老年期の phosphatidylethanolamine、顎下腺では若年期の phosphatidylcholine にそれぞれ異った影響を与えることが示唆された。

稿を終るにあたり終始ご指導、ご校閲を戴いた恩師、岩手医科大学副学長 小原喜重郎先生に深甚なる謝意を表します。

なお、本論文の要旨は、日本ビタミン学会第31回大会で発表した。

Abstract : In order to know the effects of excess administration of vitamin D on parotid glands and submandibular glands of rats, changes in phospholipid compositions were investigated using the 3 and 12-month rats. In parotid glands of the 12-month rats, lipid phosphorus per unit wet weight of glandular tissue increased, and the proportions of palmitic, linoleic and arachidonic acids increased markedly, however, those of palmitoleic and oleic acids decreased in phosphatidylethanolamine fractions. On the other hand, in submandibular glands, phosphorus per unit wet weight of glandular tissue of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine fractions decreased both 3 months to 12 months of age. The proportions of palmitic acid increased but oleic and linoleic acids decreased in phosphatidylcholine fraction of submandibular glands of the 3-month rats. Thus, it seems evident that there are differences in effects of vitamin D on parotid and submandibular glands of rats in young or old age, respectively.

文 献

- 1) Prichard, E. T. : Investigation of lipids and lipid metabolism in submandibular salivary gland of the rats. *Arch. oral. Biol.* 12 : 1445-1456, 1967.
- 2) Burzynski, N. J. : phospholipid content and aging in the submandibular salivary gland. *J. Dent. Res.* 50 : 164, 1971.
- 3) 長門孝次 : 加齢に伴うラット唾液腺におけるリン脂質の変動, 岩手医誌, 32 : 365-379, 1980.
- 4) Harrison, H. E. and Harrison, H. C. : Intestinal transport of phosphate : action of vitamin D, calcium, and potassium. *Am. J. Physiol.* 201 : 1007-1012, 1961.
- 5) Goodman, D. B. P., Haussler, M. R. and Rasmussen, H. : Vitamin D₃ induced alteration of microvillar membrane lipid composition. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46 : 80-86, 1972.
- 6) Rasmussen, H., Max, E. E. and Goodman, D. B. P. : The effect of 1 α -OH-D₃ treatment on the structure and function of chick intestine brush border membrane. In *Vitamin D : Biochemical, Chemical and Clinical Aspects to Calcium Metabolism.* ed. by Norman, A. W. et al., pp. 913-925, 1977.
- 7) Folch, J. Lees, M and Sloanestanley, G. H. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 : 497-509, 1957.
- 8) Rouser, G., Simon, G. and Kritchevsky, G. : Species variations in phospholipid class distribution of organs. *Lipids* 4 : 599-614, 1969.
- 9) Rouser, G., Siakotos, A. N. and Fleischer, S. : Quantitative analysis of phospholipids by thinlayer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1 : 85-86, 1966.
- 10) Morison, W. R. and Smith. L. M. : Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5 : 600-608, 1964.
- 11) Gitelman, H. J. : An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal. Biochem.* 18 : 521-531, 1967.
- 12) Thompson, V. W. and Deluca, H. F. : Vitamin D and phospholipid metaeolism. *J. Biol. Chem.* 239 : 984-989, 1964.
- 13) Hosoya, N., Fujimori, A. and Watanabe, T. : The action of vitamin D on the incorporation of P³² into phospholipids. *J. Biochem.* 56 : 613-615, 1964.
- 14) Andrew, W. : Age changes in the parotid glands of wistar institute rats with special reference to the occurrence of oncocytes in senility. *Amer. J. Anat.* 85 : 157-197, 1949b.
- 15) Freund, T. S., Volpe, J. and Witkowski, A. : Vitamin D-dependent salivary calcium-binding proteins. In *Calcium-Binding Proteins and Calcium Function.* ed. by Wasserman, R. H., et al. Elsevier, North-Holland, pp. 357-360, 1978.
- 16) Alam, S. Q. and Alam, B. S. : Effect of feeding a choline-deficient diet on submandibular salivary gland lipids of rats. *Arch. oral Biol.* 20 : 531-535, 1975.