

低酸素換気ラットにおける左室および脳実質の脂肪酸構成および過酸化脂質の変化

岡 達二郎^{1, 2)}, 糸井 利幸¹⁾, 濱岡 建城¹⁾京都府立医科大学大学院医学研究科発達循環病態学¹⁾
現 アルバータ大学小児科²⁾

Key words :

hypoxia, myocardium, brain, fatty acids, lipid peroxidation

Change in Membranous Lipid Composition Accelerates Lipid Peroxidation in Young Rat Hearts and Brains Subjected to Two Weeks of Hypoxia Followed by Hyperoxia

Tatsujiro Oka,^{1, 2)} Toshiyuki Itoi,¹⁾ and Kenji Hamaoka¹⁾¹⁾Department of Pediatric Cardiology and Nephrology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan,²⁾Department of Pediatrics, Cardiovascular Research Group, Heritage Medical Research Center, University of Alberta, Canada

Background: Postoperative cerebral dysfunction is a serious complication of pediatric cardiac surgery. The aim of this study was to create a rat hypoxia model and to examine fatty acid composition and lipid peroxidation in the brain from the viewpoint of the importance of perioperative cerebroprotection.

Methods: Four-week-old male rats were exposed to hypoxic conditions (Hypoxia) for 14 days (FiO₂ = 0.1) and then to hyperoxic conditions (+ O₂) for 3 hours (FiO₂ = 1.0). We had the following four groups: 1) Normoxia: FiO₂ 0.21 for two weeks, 2) Hypoxia: FiO₂ 0.1 for two weeks, 3) Normoxia + O₂: three-hour hyperoxia after 1), 4) Hypoxia + O₂: Three-hour hyperoxia was initiated after 2). The fatty acid compositions were separated using thin-layer chromatography and were analyzed using gas chromatography mass spectrometry. We measured malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation product.

Results: The concentration of linoleic acid was lower and that of docosahexaenoic acid was increased in the hypoxic heart compared with the control heart. However, no change in fatty acid concentration was found between hypoxic and control brains. MDA was significantly increased in Hypoxia + O₂ in the heart. Otherwise, MDA in the brain was unchanged between hypoxic rats and control rats.

Conclusions: Cerebral fatty acid composition and lipid peroxidation were unchanged in the hypoxic rat.

要 旨

背景: チアノーゼ性先天性心疾患の周術期脳保護を想定し、低酸素モデルラットを用いて脳内脂肪酸構成および過酸化脂質生成を心筋と比較検討した。

方法: 4週齢ラットを4群すなわち、Normoxia群(2週間FiO₂ 0.21)、Hypoxia群(2週間FiO₂ 0.1)、Normoxia + O₂群(2週間FiO₂ 0.21後3時間高酸素)、Hypoxia + O₂群(2週間FiO₂ 0.1後3時間高酸素)に分けて比較した。脂肪酸分析は総脂質、リン脂質2分画を、過酸化脂質はmalondialdehydeを測定した。

結果: 左室ではHypoxia群でリノール酸が低下し、より不飽和度の高いドコサヘキサエン酸が増加したが、脳実質では脂肪酸構成に4群間の差を認めなかった。過酸化脂質を示すmalondialdehydeは、左室ではHypoxia + O₂群が高値であったが、脳実質では差を認めなかった。

結論: ラット脳の脂肪酸構成、過酸化脂質生成は低酸素換気および急性高濃度酸素投与で変化を認めなかった。

はじめに

チアノーゼ性先天性心疾患に対する手術成績はこの四半世紀の間に飛躍的に向上した。そして進歩した手術技術により低年齢時での手術が行われるようになってきた。

しかし、非チアノーゼ性心疾患と比較して、チアノーゼ性心疾患患者の術後の回復期間の遅延、より多くの合併症の出現が起こるとされる報告もみられる^{1, 2)}。一方、手術技術および機器の進歩に伴う治療成績の改善が進んだ現在、術後の神経学的予後や、虚

平成19年2月5日受付
平成19年6月25日受理別刷請求先: 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上る梶井町465
京都府立医科大学大学院医学研究科発達循環病態学 糸井 利幸

血再灌流に伴う脳障害の有無に焦点が当てられ、心筋保護のみならず乳幼児の脳保護にも関心が向けられるようになってきた³⁻⁷⁾。

開心手術時のフリーラジカル発生に伴う脂質過酸化は、心臓を含め生体内組織に傷害を生じる重要な要素とされている⁸⁻¹⁰⁾。チアノーゼ性心疾患患者の場合、術前血中 PO₂ が 35mmHg 以上であるのが、術中人工心肺装置から送血される供給血液の酸素濃度は 200mmHg 以上になる。組織が高酸素にさらされる際にフリーラジカルが発生する。生体内では細胞膜上に多量の脂肪酸をリン脂質という形で含有しており、二重結合を 2 つ以上もつ多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid : PUFA) が傷害されて過酸化脂質を生じる。これまで慢性低酸素状態にさらされたチアノーゼ性心疾患モデルの脂肪酸構成変化や脂質過酸化の変化について検討した報告はあるが、低酸素後高酸素の暴露を試みた報告はない。低酸素環境の心筋組織では不飽和度の高い PUFA の比率が増加することが報告されている¹¹⁾。チアノーゼの有無による開心術後の心機能回復の違いを過酸化の点から考察すると、チアノーゼ群が非チアノーゼ群に比べ不飽和度の高い細胞膜脂肪酸構成をしているゆえに、高酸素暴露により過酸化が亢進して組織傷害が亢進するという仮説が考えられる。しかしチアノーゼ性心疾患のような低酸素環境にある中枢神経組織における脂肪酸構成変化および低酸素後高酸素暴露時の過酸化の変化についてはほとんどわかっていない。

今回われわれは周術期の脳保護の観点から、低酸素ラットモデルの脳における脂肪酸構成および過酸化脂質生成について心筋と比較検討したので報告する。

方 法

1. 低酸素換気ラット作成

Sprague-Dawley rat の 4 週齢、雄を用いた。水、餌に関しては制限なしとし、12 時間サイクル照明で飼育した。圧縮空気と窒素を混合する低酸素チャンバーを作成、チャンバー内を低酸素 (FiO₂ = 0.1) 状態とし 14 日間管理した (Hypoxia 群, n = 6)¹²⁾。チャンバー内の酸素濃度は、定時酸素モニターにて確認した。週に 2 回、餌、水の交換にチャンバーをごく短時間開放した。酸素暴露は、14 日間の低酸素管理後に 3 時間高酸素暴露 (FiO₂ = 1.0) を行った (Hypoxia + O₂ 群, n = 6)。対照は、圧縮空気のみ (FiO₂ = 0.21) で管理した (Normoxia 群, n = 6)、対照群に対しても酸素暴露群を作成した (Normoxia + O₂ 群, n = 6)。体重測定した後心臓および脳実質を摘出した。心臓は右室自由壁を除

外し、脳実質は間脳および小脳を除外したものとした。取り出した両臓器は重量測定後、すみやかに液体窒素にて凍結、種々の測定まで -80°C にて保存した。

2. 脂肪酸測定

両臓器より Blight-Dyer 法にて総脂質を抽出した¹³⁾。メタノール：クロロホルム：水 (2 : 1 : 0.8, v/v/v) にて攪拌、さらにクロロホルム：水 (1 : 1, v/v) を加え遠心、2 層に分離後、下層を窒素ガスにて乾燥析出した。総脂質、および小沢らの方法¹⁴⁾ を用いて薄層クロマトグラフィにより分離した主要リン脂質であるホスファチジルコリン (phosphatidylcholine : PC) およびホスファチジルエタノラミン (phosphatidylethanolamine : PE) に対し、単純脂質 12 種：飽和脂肪酸 (saturated fatty acid : SFA) 5 種 [ミリスチン酸 (C14 : 0, 炭素数 : 不飽和数を示す)、パルミチン酸 (C16 : 0)、ステアリン酸 (C18 : 0)、エイコサン酸 (C20 : 0)、ドコサン酸 (C22 : 0)]、一価不飽和脂肪酸 (monounsaturated fatty acid : MUFA) 2 種 [パルミトイル酸 (C16 : 1)、オレイン酸 (C18 : 1)]、PUFA 5 種 [リノール酸 (C18 : 2)、アラキドン酸 (C20 : 4)、エイコサペンタエン酸 (C20 : 5)、ドコサペンタエン酸 (C22 : 5)、ドコサヘキサエン酸 (C22 : 6, docosahexaenoic acid : DHA)] をガスクロマトグラフィ質量分析計にて測定した [使用機器 : gas chromatography (GC-17A) mass spectrometer (QP-5000) (Shimadzu), 使用カラム : DB23]。総脂肪酸の 1% 以下であった C14 : 0, C20 : 0, C22 : 0, C16 : 1, C20 : 5 は検出量が少なく検討から除外した。内標準はヘプタデカン酸 (C17 : 0) を使用した。

3. 過酸化脂質生成物測定

過酸化脂質として過酸化脂質生成物 (malondialdehyde : MDA) を Ohkawa 変法にて測定した¹⁵⁾。スクリュウキャップ付きの 5ml 容量のバイレックス試験管に 0.2ml のマイクロソーム懸濁液、0.65ml の混合溶液 [0.2ml の 52% ドデシル硫酸ナトリウム、0.05ml の 0.8% ブチル化ヒドロキシルトルエン氷酢酸溶液、1.5ml の 0.8% TBA 溶液および 0.15ml の 20% 酢酸緩衝液 (pH 3.5)、および 1.7ml の水からなる混合液] を加えた。混合液を 4°C 60 分放置した後、100°C 60 分反応させ、反応液に 1.0ml の 1-ブタノール、ピリジン混合液 (15 : 1, v/v) を加えて遠心し、上層の可視部吸収スペクトルを 532nm に一致したピークで測定した。

4. 統計処理

すべての値を mean ± S.D. で表記した。2 群間および 2 群間の比率の検討は Student's t-test にて行い p < 0.05 の場合を有意差ありとした。4 群間の検討は一元

Table 1 Effects of chronic hypoxia on physical characteristics of juvenile rats

	Normoxia	Hypoxia	p
Body weight (g)	194.3 ± 6.6	139.5 ± 4.6	< 0.01
Brain weight (mg)	173.0 ± 5.8	161.8 ± 5.3	0.08
Heart weight (mg)	464.7 ± 26.4	319.6 ± 20.8	< 0.01
Brain/Body (mg/g)	0.90 ± 0.04	1.16 ± 0.04	< 0.01
Heart/Body (mg/g)	2.39 ± 0.08	2.29 ± 0.11	0.11

配置分散分析による解析の結果, $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした. 有意差を認めた場合には Scheffe's F test にて群間の差を求めた.

結 果

1. 身体学的変化 (Table 1)

Hypoxia 群の体重と心重量は Normoxia 群に比較して有意に低値であったが, 脳実質重量に差を認めなかった. そのため心重量体重比は 2 群間で差はなかったが, Hypoxia 群の脳実質重量体重比は Normoxia 群と比べ有意に高値であった.

2. 脂肪酸構成 (Fig. 1, Fig. 2)

通常酸素濃度で管理した 6 週齢雄ラットの脳実質, 左室心筋, 血清からそれぞれ抽出した総脂質の脂肪酸構成を Fig. 1 に示す. 2 重結合を 2 つ以上含む PUFA の合計は, 心筋では約 63% で, リノール酸, アラキドン酸, DHA が多く含まれ, 脳実質では約 35% で, リノール酸が約 2% であった. 血清では, PUFA の合計は約 52% で DHA が約 2% であった. このように臓器間で大きく脂肪酸構成が異なることが示された.

脳実質から抽出した総脂質のうち構成率 1% 以上の脂肪酸は 6 種で, Normoxia 群と Hypoxia 群の間でそれぞれ差を認めなかった. すなわち, リノール酸については Normoxia 群 vs Hypoxia 群 = $1.1 \pm 0.1\%$ vs $1.5 \pm 0.3\%$ ($p = 0.051$), アラキドン酸については $16.6 \pm 1.2\%$ vs $16.5 \pm 2.1\%$ ($p = 0.95$), DHA については $17.8 \pm 1.8\%$ vs $20.4 \pm 3.7\%$ ($p = 0.24$) であった. PE, PC においても, 脂肪酸の構成率に差を認めなかった (Fig. 2A). 左室心筋から抽出した総脂質のうち, 率 1% 以上の脂肪酸は 7 種で, リノール酸は Hypoxia 群が Normoxia 群に比べ有意に低値で (20.6 vs 15.7% , $p < 0.05$), DHA は Hypoxia 群が Normoxia 群に比べ有意に高値であった (15.7 vs 24.7% , $p < 0.05$). PE でも同様の変化を認めたが, PC では DHA の含有量が約 5% と低く, 有意差も認めなかった (Fig. 2B).

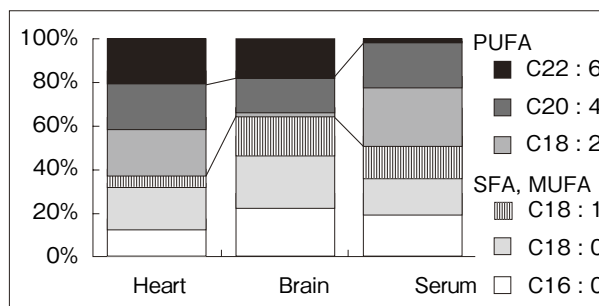


Fig. 1 Fatty acid composition in the heart (left), brain (middle), and serum (right) of 6-week-old rats. In the hearts, saturated fatty acids (SFA) (palmitic acid + stearic acid) account for 31%, monounsaturated fatty acid (MUFA) (oleic acid) accounts for 5%, and polyunsaturated fatty acids (PUFA) (linoleic acid, arachidonic acid, and docosahexaenoic acid) account for 63%. Compared with heart, brain has a lesser concentration of linoleic acid (1.1%), and that of serum is less than that of docosahexaenoic acid (1.8%). C16 : 0 palmitic acid, C18 : 0 stearic acid, C18 : 1 oleic acid, C18 : 2 linoleic acid, C20 : 4 arachidonic acid, C22 : 6 docosahexaenoic acid

3. 過酸化脂質生成物 (MDA) (Fig. 3)

脳実質では, 4 群間で差を認めなかった [Normoxia : Hypoxia : Normoxia + O₂ : Hypoxia + O₂ = 5.1 ± 1.0 : 5.0 ± 1.4 : 5.1 ± 0.4 : 5.1 ± 1.0 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ タンパク), $p = 0.99$] (Fig. 3A). 左室での MDA の検討では, Normoxia 群と Hypoxia 群との間で有意差を認めなかったが, Hypoxia + O₂ 群は Normoxia 群と比較して有意に高値であった [Normoxia : Hypoxia : Normoxia + O₂ : Hypoxia + O₂ = 2.0 ± 0.8 : 1.8 ± 0.8 : 2.3 ± 0.7 : 4.7 ± 0.9 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ タンパク), $p < 0.01$] (Fig. 3B).

考 察

2 週間の低酸素環境に対するラットの心筋および脳実質脂肪酸構成の変化と過酸化脂質の変化を検討した. その結果, 低酸素暴露の影響により, 心筋組織では既出の報告同様¹¹⁾, リノール酸が減少し, より不飽和度の高い DHA が増加した. 一方, 脳実質では心臓で確認されたような変化が認められなかった. Normoxia 群の脳実質脂肪酸構成は, これまでの報告と同様の結果であった^{16, 17)}, 神経活動は, 脂肪酸, 特にリン脂質に深くかかわっている. 低酸素状態の心臓で増加した DHA は, 神経細胞膜構成においても重要な脂質である. DHA を含めた脂肪酸の構成変化は, 酵素活性や記憶能力の物理化学的な機能変化に関与するとされる¹⁸⁻²¹⁾. 低酸素状態におかれた脳実質の脂肪酸構成に変化がなかったことは, 中枢神経系の活動を安定させるという生存に最も重要な制御が働いたと考えられる.

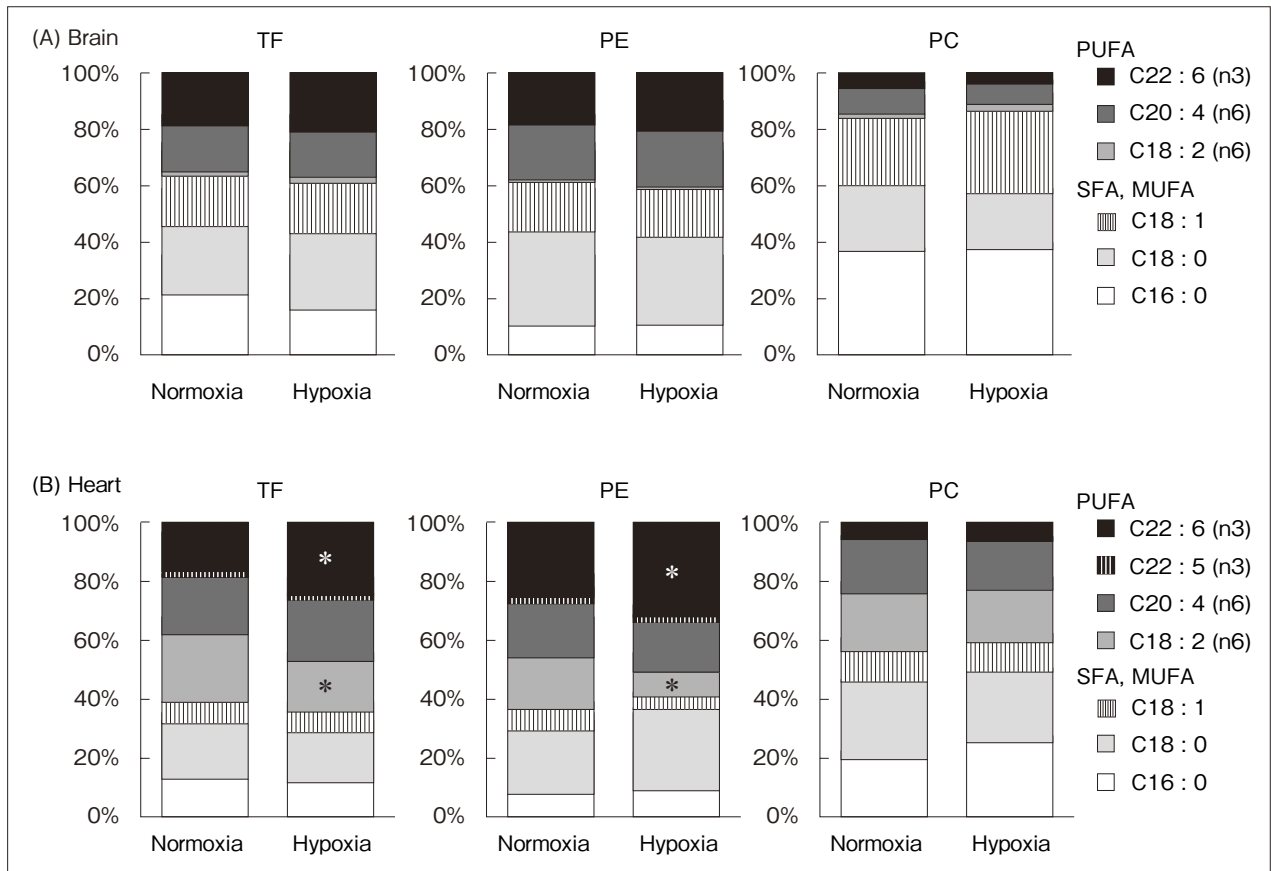


Fig. 2 Main fatty acid composition of total phospholipids (left) and of individual phospholipid species (PE middle, PC right) in brains (A) and hearts (B) of rats exposed to hypoxia. *: $p < 0.05$ vs. corresponding normoxic organs.

TF: total fatty acids, PE: phosphatidylethanolamine, PC: phosphatidylcholine, PUFA: polyunsaturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid, SFA: saturated fatty acid, C16 : 0 palmitic acid, C16 : 1 palmitoleic acid, C18 : 0 stearic acid, C18 : 1

体内に含まれる脂肪酸は、多くがリン脂質という形で細胞膜に存在するが、過酸化を受けないSFA（パルミチン酸、ステアリン酸）、MUFA（オレイン酸）、そして過酸化を受けるPUFAに大別される。PUFAでは二重結合が2つのリノール酸、4つのアラキドン酸、そして6つのDHAが主要な成分である。さらにPUFAは構造形式からn-3系とn-6系に分けられる。哺乳類は、PUFAを体内でつくることができず、食餌から得る必要がある。n-3系のDHAは同じn-3系の α リノレン酸から、n-6系のアラキドン酸は同様にn-6系のリノール酸から生成される。生成されたリン脂質はその脂肪酸構成を固定するのではなく、phospholipaseによってグリセロール基より切り離され、acyltransferaseによって新たな脂肪酸がエステル結合される。したがってリン脂質脂肪酸構成は環境によって絶えず変化する動的なものと考えられている。

低酸素負荷による脳の脂肪酸構成変化に関してBruderらの報告がある²²⁾。彼らは7日間低酸素に暴露した

ラットから得た脳、肝臓、そして胃の脂肪酸構成を検討し、肝臓と胃の脂肪酸においてPUFAが増加したのに対し、脳では変化がないことを報告した。低酸素状態以外でも、カテコラミン投与²³⁾や高DHA食餌にて、肝臓や心臓での脂肪酸構成でDHA含有量が増えることが報告されるが、脳においては他の臓器に比べ脂肪酸構成の変動が少ないとされる。Kuboらは、DHA投与による臓器内脂肪酸および過酸化脂質の検討を行っており、肝臓や腎臓に比べ、脳ではDHAの変化が少なく、脳における過酸化脂質の充進もみられなかったと報告している²⁴⁾。脳においてはさまざまな負荷に対して脂肪酸構成を定常状態に維持するように働いていると考えられる。

今回の検討で特筆すべき点は、低酸素後高酸素暴露後の脳における過酸化脂質変化の検討を脳組織の脂肪酸測定とともに行ったことである。調べたかぎりでは同様の検討はこれまでに見当たらなかった。過酸化脂質の生成が充進しなかった結果より、脳実質では高酸

素にさらされても神経細胞膜の傷害が進まず細胞の損傷が亢進しないことが推測される。これに対し、心筋では低酸素後の高酸素暴露により有意に過酸化が亢進したことから、本研究では直接的な心筋傷害の検討は行っていないが、低酸素後高酸素暴露の環境における心筋では過酸化による何らかの組織傷害が惹起されている可能性が考えられた。低酸素後高酸素暴露が2つの臓器に与えた違いを考える際、脂肪酸構成変化の有無が重要と考えられる。心筋では二重結合が2つのリノール酸から6つのDHAへとより過酸化されやすい構成に変化し、過酸化脂質産生亢進の要因と推定された。これに対し、構成の変化がなかった脳実質では、過酸化生成にも変化がみられなかった。過酸化という点から脳における安定性が心臓よりも高いことが示唆された。

生体内では活性酸素 (reactive oxygen species : ROS) が発生し、生体に酸化的ストレスを与えている。ROSの発生する部位はミトコンドリアの電子伝達系、肝ミクロソームの薬物代謝系、好中球、マクロファージ、虚血再灌流時の細胞である。生成した活性種は生体成分を攻撃して傷害を与えるが、なかでもタンパクやDNAへの傷害は、酵素成分を攻撃して遺伝子傷害につながり、生体に決定的な損傷を与えることが明らかになっている。この活性酸素に最も攻撃を受けやすいのはPUFAを含む細胞膜やリポタンパク質である。生体内PUFAの過酸化が生じて、ラジカル除去剤 (ビタミンE, superoxide dismutase) などが十分にあるとすみやかに消去される。われわれおよび他施設の研究にて、低酸素状態での心筋では superoxide dismutase 活性が低下することが確認されている (投稿中)。つまり過酸化除去の面からみて、チアノーゼ性心疾患患者においてはROSから傷害を受けやすい傾向があるといえる。しかし、脂質過酸化が亢進するかは、ROS発生、脂質の構成状況、過酸化除去要素のすべてが関連しており、今回の検討から臓器によって異なることが示唆された。

心臓手術後の中枢神経系異常に関して数多くの報告がなされている³⁻⁷⁾。発生頻度としては、6~20%と幅があるが、特に人工心肺使用下の心臓手術では少なからず脳機能への何らかの影響があると考えられる。Bellingerらは、手術後の異常として、精神運動発達評価の低下が低速心肺バイパスよりも完全循環遮断でみられること、完全循環遮断の時間が長いほど傷害が多いことなどが挙げられるとしている⁴⁾。しかしTrittenweinらは先天性心疾患の術後脳傷害の有無に関して、動脈血酸素飽和度、脳内酸素飽和度ともに差を認めず、脳傷害の早期診断には、複雑心疾患、低年齢、術中高乳

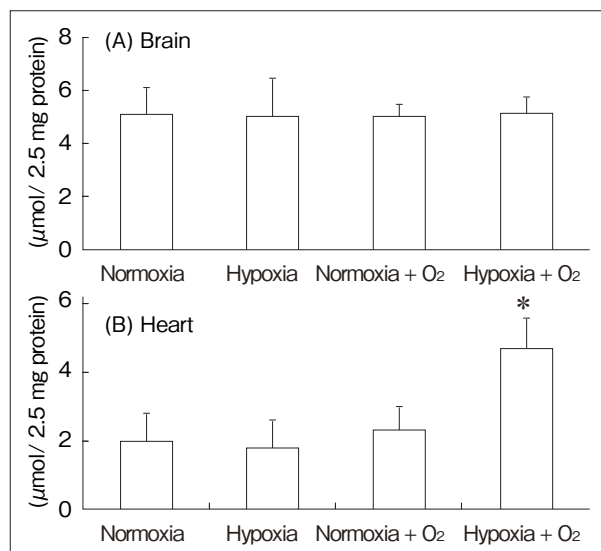


Fig. 3 Lipid peroxidation measured as malondialdehyde (MDA) content in brains (A) and hearts (B) after 2 weeks of hypoxia (10% of oxygen) and 3 hours hyperoxia (100% of oxygen). Values are expressed as (mol per 2.5 mg protein. *: $p < 0.05$ vs. corresponding normoxic organs. All values are represented as mean (standard deviation (S.D.), $n = 6$ for each group.

酸値、そして acidosis が重要とした³⁾。低酸素後高酸素暴露に伴う脳の脂質過酸化の程度が正常酸素濃度群のそれと変わらないというわれわれの結果は、Trittenweinらの臨床報告と矛盾しないものである。本研究により、過酸化脂質発生の視点では、術前の低酸素の有無や術後の急激な酸素濃度の変動が術後の中枢神経傷害発症に関与している可能性は低いことが示唆された。

結 語

4週ラットに対し2週間低酸素環境にすることにより、心筋脂肪酸構成はより不飽和度の高い変化と高酸素暴露に伴う脂質過酸化の亢進を認めたが、脳実質では脂肪酸構成変化を認めず、心臓でみられた高酸素暴露による脂質過酸化の亢進も脳実質では変化しなかった。

【参考文献】

- 1) del Nido PJ, Mickle DA, Wilson GJ, et al: Evidence of myocardial free radical injury during elective repair of tetralogy of Fallot. *Circulation* 1987; **76**: V174-179
- 2) Najm HK, Wallen WJ, Belanger MP, et al: Does the degree of cyanosis affect myocardial adenosine triphosphate levels and function in children undergoing surgical procedures for congenital heart disease? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; **119**: 515-524
- 3) Trittenwein G, Nardi A, Pansi H, et al: Early postop-

- erative prediction of cerebral damage after pediatric cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2003; **76**: 576-580
- 4) Bellinger DC, Wypij D, Kuban KC, et al: Developmental and neurological status of children at 4 years of age after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1999; **100**: 526-532
 - 5) Kinney HC, Panigrahy A, Newburger JW, et al: Hypoxic-ischemic brain injury in infants with congenital heart disease dying after cardiac surgery. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005; **110**: 563-578
 - 6) Hayashida M, Kin N, Tomioka T, et al: Cerebral ischaemia during cardiac surgery in children detected by combined monitoring of BIS and near-infrared spectroscopy. *Br J Anaesth* 2004; **92**: 662-669
 - 7) Bellinger DC, Jonas RA, Rappaport LA, et al: Developmental and neurologic status of children after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass. *N Engl J Med* 1995; **332**: 549-555
 - 8) Teoh KH, Mickle DA, Weisel RD, et al: Effect of oxygen tension and cardiovascular operations on the myocardial antioxidant enzyme activities in patients with tetralogy of Fallot and aorta-coronary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; **104**: 159-164
 - 9) Julicher RH, Tjiburg LB, Sterrenberg L, et al: Decreased defence against free radicals in rat heart during normal reperfusion after hypoxic, ischemic and calcium-free perfusion. *Life Sci* 1984; **35**: 1281-1288
 - 10) Guarnieri C, Flamigni F, Calderera CM: Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart. *J Mol Cell Cardiol* 1980; **12**: 797-808
 - 11) Jezkova J, Novakova O, Kolar F, et al: Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium. *Mol Cell Biochem* 2002; **232**: 49-56
 - 12) Corno AF, Milano G, Morel S, et al: Hypoxia: Unique myocardial morphology? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; **127**: 1301-1308
 - 13) Bligh EG, Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; **37**: 911-917
 - 14) 小沢昭夫, 神保裕江, 高橋治美, ほか: 薄層クロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィーを用いたヒト血小板リン脂質亜分画の高級脂肪酸の定量. *分析化学* 1985; **34**: 707-711
 - 15) Ando K, Beppu M, Kikugawa K: Evidence for accumulation of lipid hydroperoxides during the aging of human red blood cells in the circulation. *Biol Pharm Bull* 1995; **18**: 659-663
 - 16) Levant B, Ozias MK, Carlson SE: Diet (n-3) polyunsaturated fatty acid content and parity interact to alter maternal rat brain phospholipid fatty acid composition. *J Nutr* 2006; **136**: 2236-2242
 - 17) Xiao Y, Huang Y, Chen ZY: Distribution, depletion and recovery of docosahexaenoic acid are region-specific in rat brain. *Br J Nutr* 2005; **94**: 544-550
 - 18) Bourre JM, Francois M, Youyou A, et al: The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J Nutr* 1989; **119**: 1880-1892
 - 19) Yamamoto N, Hashimoto A, Takemoto Y, et al: Effect of the dietary alpha-linolenate/linoleate balance on lipid compositions and learning ability of rats. II. Discrimination process, extinction process, and glycolipid compositions. *J Lipid Res* 1988; **29**: 1013-1021
 - 20) Yamamoto N, Saitoh M, Moriuchi A, et al: Effect of dietary alpha-linolenate/linoleate balance on brain lipid compositions and learning ability of rats. *J Lipid Res* 1987; **28**: 144-151
 - 21) Carlson SE, Neuringer M: Polyunsaturated fatty acid status and neurodevelopment: A summary and critical analysis of the literature. *Lipids* 1999; **34**: 171-178
 - 22) Bruder ED, Lee PC, Raff H: Lipid and fatty acid profiles in the brain, liver, and stomach contents of neonatal rats: Effects of hypoxia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; **288**: E314-320
 - 23) Emilsson A, Gudbjarnason S: Reversible alterations in fatty acid profile of glycerophospholipids in rat heart muscle induced by repeated norepinephrine administration. *Biochim Biophys Acta* 1983; **750**: 1-6
 - 24) Kubo K, Saito M, Tadokoro T, et al: Changes in susceptibility of tissues to lipid peroxidation after ingestion of various levels of docosahexaenoic acid and vitamin E. *Br J Nutr* 1997; **78**: 655-669