「白色レグホン幼雛肝における Lipid の経時的変化」

岡山大学医学部微生物学教室

赤 塚 和 也·高 津 智 子 金 政 泰 弘·俵 寿 太 郎

[昭和49年4月20日受稿]

緒 論

家鶏に関する脂質の研究は古くから多くの研究者によってなされている。これらの多くは卵、鶏胚のある時期、幼雛あるひは成鶏の肝、筋肉等の各種臓器組織の脂質組成を検討したものである。しかし経時的にしかも単純脂質、複合脂質又細分画脂質全般にわたって連続変化を追求したものはその報告が少ない。

Frederick 等"はフラン中の胎児組織と卵黄内脂質との関連的変化を観察している。Feldman"は同様,鶏胚肝の中性脂質の分析を行ってhatch 直前はcholesterol esters が著しく蓄積することを述べている。Sgoutas"及び Nakamura"等はヒョコ肝の細分画脂質の構成脂肪酸の変化を経時的及び飼料変換下で観察を行なっている。又 Moore"及び Noble"等は鶏胚の正常発育時とビタミンB12欠乏,発育時の肝を比較している。

著者等は白色レグホン系鶏の幼雛の hatch 直後から1日,2日,4日,7日及び18日の時期を選んで肝をとり出し、中性脂質、リン脂質及びそれらの細分画脂質の定性及び定量分析を行って、発育過程との関連について考察を加えた。

実験材料及び実験方法

I. 総脂質抽出

白色レグホン雄雛を hatch 直後から幼雛用固形飼料(丸紅幼雛用)を用いて飼育した. hatch 直後,1日令,2日令,4日令,7日令及び18日令の幼雛を各15羽宛エーテル麻酔により殺し,よく失血せしめてからすみやかに肝をとり出した.得られた肝は,冷生理的食塩水で洗滌後,凍結乾燥して分析実験に供した.

乾燥肝は細挫して、約20倍量の CHCl₃-MeOH

(2:1, V/V) を加え,室温にてマグネチックスターラーで攪拌しながら抽出を行った。約4時間後 沪過により抽出液を分離し,更に CHCl,→MeOHの 同容量を加え室温で一液再抽出を行う。同様の方法を さらに37℃で一夜抽出を重ねる"。全抽出液は合せて フラッシュエバポレーターで乾燥に至るまで濃縮し, Folch 静置法[®] による分配透析によって精製し総脂 質(total lipid)を得た。

Ⅱ. 中性脂質及びリン脂質分画

抽出精製した total lipidを Van Beer のゴム膜透透析法⁹ によって中性脂質 (neutral lipid) 及びリン脂質 (phospholipid) に分画した。すなわち total lipid の約500 mg を benzene-petroleum ether (1:9, V/V) に20 mg/ml になるように溶解し、洗滌したコンドーム膜に入れて10容量の同溶媒に対して冷室にて48時間透析した。外液に neutral lipid 内液に phospholipid と分画されるので、それぞれ蒸発乾固する。

Ⅲ. 薄層クロマトグラフィ(TLC) による細分画及 び定量法

Neutral lipid は Silica gel G-TLCプレートを用い,n-hexan-aceton-acetic acid(89:11:3, V/V) 溶媒で一次元展開を行った。それぞれ標準物質のRf と比較又は Liebermann—Bruchard 反応等で各スポットの同定を行った。全スポット同時発色のためには20%H₂SO₄ 液を噴霧し,120℃2~3時間加熱した。このプレートを Atago Densito-Master Ozumor-8にて測定し,各スポットの百分率を算出した。

Phospholipid もやはり Silica gel G-TLC プレートを用い,一次元展開の場合は CHCl₃—MeOH-H₂O(70:25:4,V/V) にて展開し,Nynhidrin 法,Dragendorff 法及び Dittmer 法にて発色又は標準物質とRfを比較して同定を行った¹⁰:二次元展開の場

合は上記同溶媒にて一次元を行い、更に CHCl₃-Me-OH-7N NH₄OH (60:35:5, V/V) にて二次元展開を行った。 沃素蒸気にて各スポットを確認した上で搔きとり、 Allen 法の Kates による変法¹¹¹でリン定量を行って各成分の百分率を算出した.

Ⅳ. 脂肪酸のガスクロマトグラフィ (GLC)

Neutral lipid 及び phospholipid の10mgを用い 封管塩酸メタノール法にて interesterification を 行った. 得られた脂肪酸メチルエステルは日立ガス クロマトグラフK53 (水素焰検出管, 2 mの10% polydiethylene glycol succinate on diasolid Lカラ ム, カラム温度193℃, キャリアーガスはN₂で30ml/ min)にて分析し? 三角面積法で各成分の百分率を算 出した. 又不飽和脂肪酸度は Kates & Baxter の計 算式を採用した¹²¹.

実 験 成 績

1. 肝重量及び総脂質について

Hatch 直後, 1日目, 2日目, 4日目, 7日目及び18日目と経時的にヒョコの体重と総肝重量(湿重量)との関係を計測し, Table Iに示した. hatch後1時的にヒョコの重量は減少するが肝重量は減少することなく漸次増加する. ヒョコの体重に対する肝重量の割合は7日令までは増加しているが18日令

はその割合が減少していた.

これら各時期の肝をCHCl₃-MeOHで抽出して得た total lipid 及びそれを分画して得た neutral lipid 及び phospholipid の計測値を百分率で示したのが Table IIである. total lipid は hatch 後徐々に減少している. 又 neutral lipid と phospholipid の占める割合を検討した場合, hatch 直後, 90%もあった neutral lipid が18日目になると37.7%に減少し,逆に phospholipid は10%のものが62.3%と数倍に増加し,その比率は全く逆転する結果を得た.なお一定量の肝当りの neutral lipid 及び phospholipid の絶対量の推移をFig. 1. に示した. すなわち neutral lipid は日を経るにしたがって急激な減少を示したが, phospholipid は急激な変化を示すことなく漸増した.

Ⅱ. 中性脂質の構成成分について

Neutral lipid の分析及び同定は一次元 Silica gel G-TLCによった. neutral lipid の主要成分は cholesterol esters, cholesterol 及び glycerides (mono, di 及び triglycerides) であった. これら 各成分の neutral lipid 中で占める割合の経時変化 は Table III に示した. cholesterol esters は hatch 直後,約50%以上占めており,7日令までは著変はなかったが18日令で急に減少し25%となった. cho-

TABLE I AVERAGE WEIGHT OF CHICKEN AND THOSE LIVERS AT VARIOUS STAGES OF GROWTH

Age of chicken (days)	0	1	2	4	7	18
Chicken weight (g)	47. 59	43. 1	44. 25	44.8	60.5	128.3
Liver wet weight (g)	1.04	1. 15	1. 09	1.42	2.09	3. 13
Percentage of liver (%)	2, 19	2.68	2, 46	3. 17	3.46	2.44

TABLE []
THE PERCENTAGE OF TOTAL LIPID, NEUTRAL LIPID AND PHOSPHOLIPID OF LIVER AT VARIOUS STAGES OF GROWTH

Age	Liver dry	Total lipid	Neutral lipid	Phospholipid	
Age	weight (mg)	% in the dry matter	% in th	% in the total lipid	
0	360. 0	37. 4	90. 0	10. 0	
1	360. 0	38. 5	83. 3	16. 7	
2	406. 6	32. 6	83. 2	16.8	
4	486. 6	32. 3	83. 9	16. 1	
7	673. 3	27. 2	78.9	21, 1	
18	946. 6	12. 9	37.7	62.3	

TABLE

COMPOSITION OF NEUTRAL LIPID OF CHICKEN LIVER AT DIFFERENT STAGES OF MATURITY

Results are expressed as percentage in the neutral lipid.

Age (days)	0	1 1	2	4	7	18
Cholesterol esters	59. 8	64. 7	62. 4	51. 6	51, 0	25. 3
Cholesterol	29. 2	24, 9	23. 8	24.7	19.3	17. 4
Monoglycerides	3.4	3. 1	4.6	5.4	6.8	10. 5
Diglycerides	7.6	7.3	9. 2	8. 3	10. 1	25. 2
Triglycerides	trace	trace	trace	11, 5	12. 9	18. 0
Free fatty acid	trace	trace	trace	trace	trace	3. 5

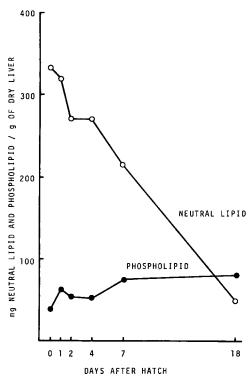


Fig. 1. Contents of neutral lipid and phospholipid in liver as function of maturity

lesterol は hatch 直後, 29.2%占めていたものが 除々に減少し, 18日令では17.4%になった. glycerides に関しては上記の cholesterol esters 及び cholesterol とは逆に日を経るに従って増加した.

これら各成分の一定肝重量当りの絶対量の経時変化をFig. 2にまとめた、肝組織内の neutral lipidはFig, 1で示したように、成長するに従って蓄積量が極端に減少する。それを反影して殆どの成分に減少傾向があるが、特に cholesterol esters 及び ch-

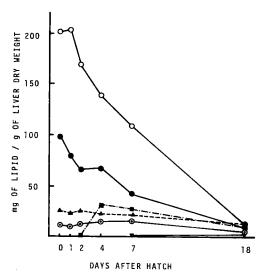


Fig. 2. Quantitative distribution of the neutral lipid classes of chicken liver at different stages of maturity

Abbreviation:

Cholesterol esters
Cholesterol
Tri glycerides
Diglycerides
Monoglycerides
Free fatty acid

olesterol は極端な減少を示す. しかし monoglycerides 及び diglycerides は僅かに減少するのみで 約半量となる. 又 triglycerides のみは hatch 直後 は全く認められなかったものが、4~7日令頃一時 的に増量しその後やゝ減少した.

Ⅲ. リン脂質の構成成分について

Phospholipid の構成成分は一次元及び二次元 Silica gel G-TLC で展開し,同定を行った. その結

TABLE IV
COMPOSITION OF PHOSPHOLIPID OF CHICKEN LIVER AT DIFFERENT
STAGES OF MATURITY

Results	are	expressed	as	percentage	in	the	phospholipid.

Age(days)	0	1	2	4	7	18
Phosphatidylcholine	40. 9	43. 5	44.2	44. 1	32. 6	24. 2
Phosphatidyl- ethanolamine	28. 6	26. 1	26. 2	27.3	26.7	33.7
Cardiolipin Phosphatidylserine	8. 9	7. 2	5. 0	6. 6	7. 2	22. 2
plus phosphatidyl- inositol	13. 4	13. 7	14.3	13. 9	17.5	11. 5
Unknown	8.3	9. 5	10. 3	8. 1	16. 2	8. 4

果,肝臓に含まれる phospholipid は phosphatidylcholin, phosphatidylethanolamine, cardiolipin phosphatidylserin, phosphatidylinositol及び未知物質(sphingomyelin 及びlyso 体と考える成績を得ている)であった。これら各成分の経時変化を全リン脂質中に占める割合で観察したのがTable IVである。phosphatidylcholin は hatch 直後では最も多い比率を占める成分であるが日を追って減少を示した。又phosphatidylethanolamine は各日令において20~30%を占め,その変動はあまり大きくなかった。cerdiolipin は hatch 直後8.9%のものがほとんど変動はなかったが,18日令では急激に増加し22.2%になった。

これら各リン脂質成分の一定肝重量当りの絶対量の変動として Fig. 3 にまとめた. phospholipid は Fig. 1 で分かる如く著明な変化がなく,やゝ増加していた. したがってこれら細分画成分も全体的にやや増加する程度であった. 注目されるのは cardiolipin が hatch 直後に比べ18日令では数倍になり, phosphatidylethanolamine は2.5倍程度に増加するのを認めた.

Ⅳ. 中性脂質及びリン脂質の構成脂肪酸組成

Neutral lipid の構成脂肪酸組成(trace 量のものは除く)は C 14:0(myristic acid), C 16:0(palmitic acid), C 16:1(palmitoleic acid), C 18:0(stearic acid), C 18:1(oleic acid), C 18:2(linoleic acid)及び C 20:4(arachidonic acid)より成り,これらの各成分の neutral lipid 中で占める割合の経時的変化は Table V に示した.全経過を通じ量の多いものはC 18:1であった.このC 18:1は hatch 直後から数日内は50~60%を占めて極端に多いが7日令から急に減少し,18

日令では29.3%となった。これに反してC16:0は C18:1にとって代わり7日令から急増し,20%以上に達した。又,18日令ではC14:0,C18:0及びC18:2も増加している成績を得た。

これら脂肪酸成分の中で不飽和脂肪酸の占める割合を Kates & Baxter の方法¹²⁾で検討したところ,4日令までは1.0 前後で殆んど変動はなかったがそれ以後は徐々に低下する傾向を見た.

Phospholipid の構成脂肪酸組成 (Table VI) も C14:0 (myristic acid), C16:0 (palmitic acid), C16:1 (palmitoleic acid), C18:0 (stearic acid), C18:1 (oleic acid), C18:2 (linoleic acid) 及びC20:4 (arachidonic acid) と neutral lipid のそれと全く同じであった。ただしその組成比は非常に異なり日令の若いころの主成分はC16:0, C18:0及びC18:2でそれぞれ約

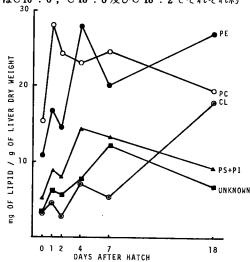


Fig. 3. Quantitative distribution of the phospholipid classes of chicken liver at different stages of maturity.

TABLE V
FATTY ACID COMPOSITION OF THE NEUTRAL LIPID ISOLATED FROM
THE CHICKEN LIVER AT VARIOUS STAGES OF GROWTH

			Days afte	r hatch		
Acid	0	1	2	4	7	18
14:0	16.8	11.0	14.6	6. 9	6. 3	15. 0
16:0	6. 2	4.7	5. 1	8.9	25. 5	22.3
16:1	2, 3	2.2	2.3	2.9	8. 3	3.8
18:0	4.8	3.5	3. 6	7.0	6.5	10.5
18: 1	55. 2	66.8	62. 1	58.8	44. 2	29. 3
18: 2	11.9	10.2	10.7	11.8	5. 4	16. 6
20:4	2.8	1.6	1.6	3.7	3. 8	2. 5
*△/ mole	1. 04	1. 02	0. 99	1. 15	0. 94	0. 86

Data are expressed as percentages of the total acids.

TABLE VI
FATTY ACID COMPOSITION OF THE PHOSPHOLIPID ISOLATED FROM
THE CHICKEN LIVER AT VARIOUS STAGES OF GROWTH

A . 1			Days aft	er hatch		
Acid	0	1	22	4	7	18
14:0	3. 8	2. 6	2. 3	2.4	2.4	4. 1
16:0	23. 6	21. 1	22.7	20.9	45.0	49.0
16: 1	0. 7	0.7	1.0	1. 9	5.8	1.6
18:0	23. 7	17.6	15.7	12.5	21.7	29.7
18: 1	9. 2	9. 9	7. 9	11.6	16.8	9.6
18: 2	21. 2	25.3	26. 2	30.5	5, 1	6.1
20:4	17. 3	22. 3	23.6	19.7	3. 2	trace
* △∕mole	1.91	2. 40	2. 50	2.32	0.58	0. 23

Data are expressed as percentages of the total acids.

20数%を占めていた。このうちC16:0は4日令をすぎてから急激に増加し,18日令では2倍の49%に達した。C18:0は1日令~4日令の間に僅かに減少するのを認めた。C18:2はC16:0とは反対の傾向を示し,4日令以後極端に減少し約5%となった。hatch 直後の幼雛においてC20:4が20%前後存在する事は neutral lipid におけるそれとは大いに異なる特徴であった。しかしC20:4は7日令以後はほとんど認められない程度に減少した。

不飽和脂肪酸度を検討したところ,C 18:2及び C 20:4 の推移が大きく影響して, $1\sim4$ 日令では 2.0以上の高値を示したが,その後急激な低下を示して18日令では0.23となり不飼和脂肪酸は極めて少なくなった.

考 察

すでに緒論で述べた如く家鶏雛の発育段階における職器脂質の変動を細分画成分についてまで広く観察した例は殆んど見当らない。著者はこの点について hatch 後から18日間に亘る正常雛の肝について検討し、今後色々の変化、例えば飼料変換や病原微生物接種時の変化検討の場合の予備的資料に供したい考えで実験を行ったものである。

そもそも家鶏における研究報告では、胎児の時期におけるものはその例が多い^{1,2,5,6,13}) 例えば孵卵が進むにつれて胎児肝に phosphatidylcholin や phosphatidylethanolamine が増加し、triglyceridesは trace 量であるのに反して cholesterol esters が

^{*} Calculated thus: \triangle mole=1 x(% monoene/100) + 2 x(% diene/100) + 4 x(% tetraene/100)

^{*} Calculated thus: \triangle mole = 1 x(% monoene/100) + 2 x(% diene/100) + 4 x(% tetraene/100)

著明に蓄積して来る報告215161131等がある.

我々の行った実験成績で hatch 直後の肝における total lipid 量は30数%と非常に多いが、これらは過去の Noble や Moore の報告がと非常によく一致してれが発育につれて減少して行く.

neutral lipid 及び phospholipid への分画実験の結果から見てその大部分は neutral lipid よりなるものであり、neutral lipid が発育につれて急激に減少して行くことが分った。すなわち hatch 時には卵黄その他からの由来の脂質を栄養源として臓器にたくわえるもので『、減少はこれの消費によるものであろう。これに反して細胞構成成分であるリン脂質系は著変なく僅かに増加するのみである。

Neutral lipid の細分画成分中最も多いのは cholesterol esters であり hatch 直後は50%以上存在しているがこれは Wood¹³¹の報告でも卵黄の neutral lipid 中 cholesterol esters は90%以上を占め、これが hatch 直後の臓器にそのまゝ反影されているとする報告とよく一致する. この cholesterol esters が急激な減少を見せることは多くの報告とよく一致するが^{21,13}; cholesterol が著者等の実験では減少傾向をたどる成績を得て、Wood²¹の報告と異るのは飼料の違いによるものと考えられる. triglycerides は hatch 直後に全く認められない(卵黄も1%以下含有するのみである)が2日令頃から増加し始め一時期多くなってその後減少して一定量に落着くが、これは新しい環境に順応するため一時的に増加し、順応した後に減少するためと考えられる?

Phospholipid の分画ではその成分としては Sgoutas²¹ の報告とよく一致するものであるが,その長期の経日変動については報告に接し得ないので比較出来なかった. 要するに phospholipid は細胞においては細胞膜及びミトコンドリア膜の主要成分であるため発育にともなって組成的にも大きな変動を示さないのが当然と考えられる. ただミトコンドリア膜にのみ存する cardiolipin が hatch 直後から徐々に増加し始め,18日令で数倍にも達するのは,細胞の分化,発育にともなうミトコンドリアの増生によるものと考えられる.

肝脂質の脂肪酸分析の報告は非常に多く, neutral lipid 及び phospholipid 又はそれらの細分成分に分画して, それぞれの構成脂肪酸については Noble! Sgoutas や Nakamura 等の報告がある. これらの内,成鶏肝についての報告と比較した場合, neutral lipid, phospholipid共に構成脂肪酸の種及び組成が

大まかなところが似かよっている成績を得た.ただ し年令や飼料が異るので特に組成が異るのは当然と 云える.

Neutral lipid のfatty acid 組成で、Nakamura*等が卵黄のそれを分析しC14:0が0.4%,C16:0が28.3%,C16:1が4.2%,C18:0が7.4%,C18:1が52.6%,C18:2が3.3%及びC18:3が3.8%と云う成績を報告しているがC14:0が異るのみで他の組成の傾向は hatch 直後のものとよく似ている。

Phospholipid における fatty acid 組成でやはり Nakamura⁴等が卵黄について報告している.

C14:0が0.5%, C16:0が40.1%, C16:1が1.8%, C18:0が20.7%, C18:1が32.6%, 及びC18:2が4.7%と我々の分析した hatch 直後のものは更にその傾向がよく類似している. 一方これらfatty acid 組成の発育にともなう変化としては Noble⁶等が鶏胎で行っている観察で,発生初期の肝は卵黄の組成影響をまともに受けているが, 発生が進むについて不飼和脂肪酸が少しづつ減少することを報告している. 著者等の hatch 後の発育にともなう変化を追跡した場合やはり不飽和脂肪酸が減少して行くが, この点興味ある問題と云える.

結 論

白色レグホン系鶏の幼雛の hatch 直後から1日, 2日,4日,7日及び18日令の時期を選んで肝をと り出し、中性脂質(neutral lipid),リン脂質(phospholipid)及びそれらの細分画脂質の定性及び定量分析を行って、発育過程との関連について考察を加えた。

- 1. hatch 後1時的にヒョコの重量は減少するが肝重量は漸次増加する. 総脂質 (total lipid) は neutral lipid 及び phospholipid であり, neutral lipid は日を経るに従って急激な減少を示したが, phospholipid は急激な変化を示すことなく漸増した.

 2. neutral lipid の主要成分は cholesterol esters, cholesterol 及び glycerides (mono, di 及び triglycerides) であり cholesterol esters 及び cholesterol は hatch 後数日たってから急に減少した. glycerides は cholesterol esters 及び cholesterol とは逆に日を経るに従い増加した.
- 3. phospholipid は phosphatidylcholin, phosphatidylethanolamine, cardiolipin, phosphatidylserine, phosphatidylinositol 及び未知物質であ

- り、これらは著明な変化がなくやゝ増加の傾向を示した。 但し、cardiolipin のみが18日令では hatch 直後の数倍になることを認めた。
- 4. neutral lipid の構成脂肪酸組成の検討で,全経 過を通じて比較的多いのはC18:1 (oleic acid) であるが発育が進むと減少する. 逆にC16:0 (palmitic acid) 及びC18:0 (stearic acid) の飽和脂肪酸は日を経るに従い増加の傾向を示した.

5. phospholipid の脂肪酸組成はneutral lipid のそれと全く同様であったが,組成比は hatch 直後でC16:0, C18:0及びC20:4 (arachidonic acid)の3種のものが主成分であった。その内発育にともなってC16:0が倍増した。又 hatch 直後の幼雛においてC20:4が多く存在することは neutral lipidとは大いに異なる特徴であった。

文 献

- 1) Frederick, I., Myron, T.B. and Harold, H. W.: Arch. Biochem. Biophys., 56, 290, 1955.
- 2) Feldman, G. L. and Granthan, C. K.: Poultry Sci., 43, 150, 1964.
- 3) Sgoutas, D.: Can. J. Biochem., 44, 763, 1966.
- 4) Nakamura, T., Takahashi, T., Umeda, I. and Kawai, S.: Bull. Fac. Agr. Gifu Univ., 24, 271, 1968.
- 5) Moore, J. H., and Doran, B. M. : Biochem. J., 84, 506, 1962.
- 6) Noble, R. C., and Noble, J. H. : Biochem. J., 95, 144, 1965.
- 7) Kanemasa, Y., Akamatsu, Y. and Nojima, S.: Biochim. Biophys. Acta, 144, 382, 1967.
- 8) Folch, J., Asocoli, I. M. Lees, Mesth, J. A. and Le Baron, F. N. : J. Biol. Chem., 191, 833, 1951.
- 9) 野島庄七,永井克孝共著:"脂質"朝倉書店,東京,68,1969.
- 10) Kanemasa, Y., Yoshioka, T. and Hayashi, H.: Biochim. Biophys. Acta, 280, 444, 1972.
- 11) Folch, J. and Sloane Stanley, G. H. : J. Biol. Chem., 226, 497, 1957.
- 12) Nishi, K., Ichikawa, H., Tomochika, K., Okabe, A. and Kanemasa, Y.: Acta Med. Okayama, 27, 73, 1973.
- 13) Randall, W.: Lipids, 7, 596, 1972.

Alteration of the Lipid Composition in the White Leghorn Chicken Liver at Various Stages of Growth

By

Kazuya AKATSUKA, Tieko TAKATSU, Yasuhiro KANEMASA and Jutaro TAWARA

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

The effects of growth on the lipid composition of liver from the white leghorn were studied. The studies were designed to determine liver dry weight, per cent total lipid, per cent neutral lipid, per cent phospholipid, neutral lipid class composition, phospholipid class composition and fatty acid composition at 0, 1, 2, 4, 7 and 18 days after hatch.

- 1. Neutral lipid content abruptly decreased but phospholipid slightly increased with ages after hatch.
- 2. Neutral lipid was fractionated further into cholesterol esters, cholesterol and mono-, di and triglycerides. The chicken just after hatch showed considerably high levels of cholesterol esters and cholesterol which decreased dramatically with growth, while it showed low level of glycerides which increased slightly.
- 3. Phospholipid was composed of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, cardiolipin, phosphatidylserine and phosphatidylinositol. Cardiolipin and phosphatidylethanolamine increased along with growth while hardly and difference could be seen in the composition of phosphatidylcholine, phosphatidylserine and phosphatidylinositol.
- 4. The principal fatty acids of neutral lipid as well as of phospholipid were myristic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic and arachidonic acids. The unsaturation degree of fatty acids constituting both lipids were found to be decreased with growth. The greater part of the decrease in unsaturation degree of neutral lipid could be accounted for by the decrease in oleic and the increase in palmitic acid.

The decrease in unsaturation of phospholipid was mainly due to the decrease in arachidonic acid.