

# 離乳期ラットにおける $\alpha$ -リノレン酸の DHA 供給源としての有効性に関する研究

木村 ふみ子

東北大学大学院農学研究科機能分子解析学分野 助教

## 緒言

$\alpha$ -リノレン酸は DHA (ドコサヘキサエン酸) と同じ  $\omega$ -3 系列の脂肪酸であり、動物は  $\alpha$ -リノレン酸から DHA を生合成できる (図 1)。申請者らはこれまでのラットを使った研究から、妊娠・授乳期の n-3 系脂肪酸欠乏食での飼育により、母乳と仔ラットの n-3 系脂肪酸が顕著に減少することを確認し、妊娠・授乳期に摂取した  $\alpha$ -リノレン酸が子の DHA 源として有効であることを示した<sup>1), 2)</sup>。しかしヒト、特に成人男性では  $\alpha$ -リノレン酸から DHA への代謝転換が 1% 以下との報告もあり<sup>3), 4)</sup>、有効性が疑問視されている。一方、女性は  $\alpha$ -リノレン酸の 9% は DHA に変換するとの報告もあり<sup>5)</sup>、 $\alpha$ -リノレン酸から DHA への代謝効率は男女間、個体間で異なる可能性がある。

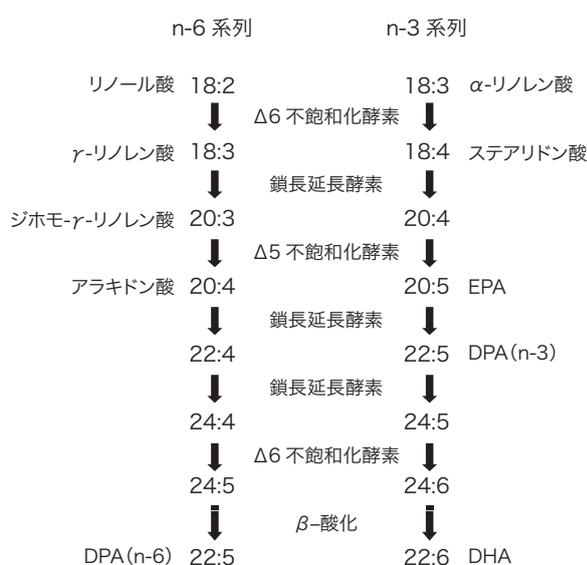
DHA は脳神経系膜の重要な構成成分であり、成熟した個体では欠乏しにくい、成長の著しい胎児・授乳期では要求量が多い。例えば、ヒトでは妊娠後期の胎児から 2 歳頃までは、脳神経系の発達が著しいため DHA の要求量が高いことが知られている<sup>6)</sup>。このうち離乳期は、母乳からの DHA の供給が途絶え、DHA 含量の高い刺身や青魚などの脂身の多い魚介類の摂取量も少ないため、二歳以下の幼児では DHA の供給源としての  $\alpha$ -リノレン酸の重要性が高まると予想される。しかし、乳幼児を対象にした介入試験は倫理上の問題で実施が難しい上、臓器サンプルの採取などができないという問題もある。

そこで、本研究では、肝臓などの組織サンプルの取得が可能なラットを用いた動物実験を行い、 $\alpha$ -リノレン酸から DHA 源として有効かの検証を行う。すなわち、妊娠・授乳期を n-3 系脂肪酸欠乏食または通常の AIN-93G 食<sup>7)</sup> (大豆油を油資源とし  $\alpha$ -リノレン酸の供給量が充足している) で飼育されたラットの仔を使用し、両者を比較することで、n-3 系脂肪酸不足時の  $\alpha$ -リノレン酸摂取の有効性について検証した。

## 実験方法

### 1. 飼料の作成

試験飼料は AIN93G 処方に準じ作成した<sup>7)</sup>。n-3 系脂肪酸欠乏食は、AIN93G 食の油脂源を大豆油からハイリノールサフラワー油と落花生油の混合油に変更したものを使用し、リサーチダイエツト社 (アメリカ合衆国) に作成を依頼した。対照の AIN93G 食は同社の製品を購入した (製品番号: D10012G)。餌の配合を表 1 に示した。紅花油と落花生油の混合比は、同社より提供された油脂サンプルの脂肪酸組成を測定し、多価不飽和脂肪酸含量が大豆油とほぼ等しくなるように決定した。



EPA: エイコサペンタエン酸、DPA: ドコサペンタエン酸  
DHA: ドコサヘキサエン酸

図 1 n-6 系列および n-3 系列多価不飽和脂肪酸の生合成経路

表1 試験飼料の配合割合

	g/ 飼料 1kg	
	n-3 系脂肪酸 欠乏食	大豆油食
カゼイン	200	200
L-シスチン	3	3
コーンスターチ	397	397
マルトデキストリン	132	132
ショ糖	100	100
セルロース	50	50
大豆油	—	70
紅花油	50	—
落花生油	20	—
t-ブチルヒドロキシキノロン	0.014	0.014
ミネラル混合物 (S10022G)	35	35
ビタミン混合物 (V10037)	10	10

## 2. 動物の飼育

妊娠4日目のSD系ラット（日本クレア株式会社、東京）を10匹購入し、購入当日に、1群5匹に体重がほぼ等しくなるように群わけし、一方は対照として大豆油食、他方はn-3系脂肪酸欠乏食で飼育した。仔ラット誕生後、哺乳保育を続け20日齢で離乳し、4週齢まで母ラットと同じ餌で飼育した。4週齢時に、母ラット1匹毎に雄性の仔ラット3匹を選び、0回投与（投与なし）群、1回投与群、3回投与群の3群にわけ、シソ油投与試験を行った。なお、本研究における実験動物の取り扱い、東北大学の動物実験等に関する規定<sup>8)</sup>に従い実施した。

## 3. シソ油の投与

シソ油を15%（w/w）によるよう1%カルボキシメチルセルロース水溶液に分散し、体重1gあたり1.5mgになるよう、胃ゾンデにて経口投与した。シソ油は市販のもの（ $\alpha$ -リノレン酸が総脂質の57.6w%）を使用した。

## 4. 肝臓・血漿の採取

投与群については、解剖・試料採取は投与翌日に行った。解剖前の絶食は12時間とした。断頭により脱血死後、肝臓を採取した。血漿は断頭により集めた血液をヘパリン処理し、4°C、3000rpm、10分の条件で遠心分離して得た。

## 5. 血漿および組織脂肪酸の測定

血漿は内部標準としてヘプタデカン酸を加えた後、肝臓は20%ホモジェナイズに内部標準を加えクロロホル

表2 餌の油および投与油の組成

	n-3 系脂肪酸 欠乏食	大豆油食	シソ油
16:0	7.5	10.0	6.2
18:0	2.6	4.5	1.9
20:0	0.8	0.5	—
22:0	1.1	0.4	—
24:0	0.6	0.1	—
18:1(n-9)	26.2	23.6	20.2
24:1(n-9)	0.1	—	—
18:2(n-6)	57.9	52.3	10.9
18:3(n-3)	0.1	6.5	58.4
Others	2.9	2.0	2.4
飽和脂肪酸	12.7	15.5	8.1
一価不飽和脂肪酸	26.4	23.6	20.2
多価不飽和脂肪酸	58.0	58.8	69.3
n-6 系脂肪酸	57.9	52.3	10.9
n-3 系脂肪酸	0.1	6.5	58.4
n-6/n-3 比	481	8	0.2

ム・メタノールで脂質を抽出後、LepageとRoyらの方法<sup>9)</sup>に従い、塩酸メタノール-ベンゼンを用いた酸性条件下でのメチルエステル化を行い、得られた脂肪酸メチルエステルについてガスクロマトグラフィーで脂肪酸組成および組織中の脂肪酸含量を測定した。

## 6. 統計処理

データは平均±標準偏差で示した。シソ油投与の影響を明らかにするため、n-3系脂肪酸欠乏食群と大豆油食群のそれぞれについてDunnett法にて、0回投与に対し、1回投与または3回投与との比較を行った。

## 結果および考察

大豆油群で出産しないラットがいたため、大豆油群はn=4で試験を行った。血漿（図2）および肝臓（図1）の主なn-3系脂肪酸は $\alpha$ -リノレン酸、EPA（エイコサペンタエン酸）、DPA（ドコサペンタエン酸）（n-3）、DHAであり、既報<sup>1)</sup>で報告したとおり、いずれもn-3系脂肪酸欠乏食群が低い値を示した。n-3系脂肪酸欠乏食群の血漿では、3回のシソ油投与でDHAが投与前より有意に上昇し、肝臓においては1回のシソ油投与で、 $\alpha$ リノレン酸、DPA（n-3）、DHAが投与前より有意に上昇した。したがって、離乳期ラットでは、シソ油由来の $\alpha$ -リノレン酸からDHAが合成されることが示された。一方、大豆油群においてはシソ油投与による血漿・肝臓

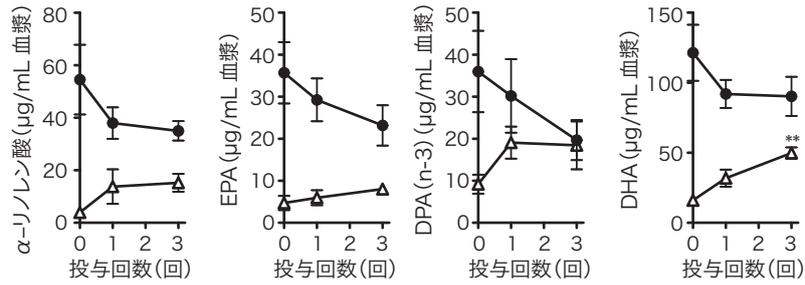


図2 血漿 n-3 系列不飽和脂肪酸含量のシソ油投与による変化

●: 大豆油食群、△: n-3系脂肪酸欠乏食群  
\* 各群の0回投与群に対し有意に異なる。\* P<0.05、\*\* P<0.01、\*\*\* P<0.001

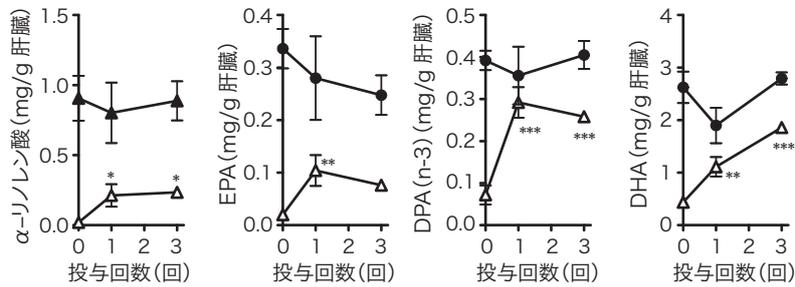


図3 肝臓 n-3 系列不飽和脂肪酸含量のシソ油投与による変化

●: 大豆油食群、△: n-3系脂肪酸欠乏食群  
\* 各群の0回投与群に対し有意に異なる。\* P<0.05、\*\* P<0.01、\*\*\* P<0.001

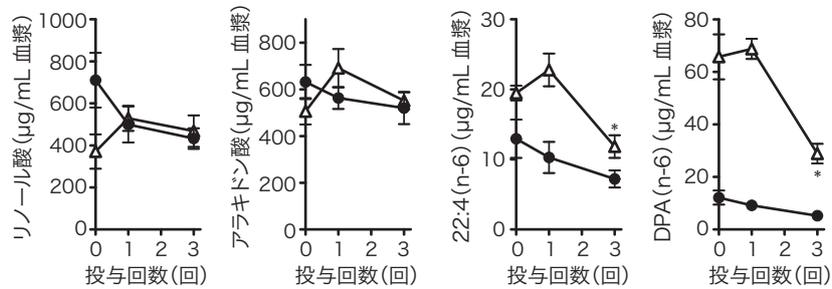


図4 血漿 n-6 系列不飽和脂肪酸含量のシソ油投与による変化

●: 大豆油食群、△: n-3系脂肪酸欠乏食群  
\* 各群の0回投与群に対し有意に異なる。\* P<0.05、\*\* P<0.01、\*\*\* P<0.001

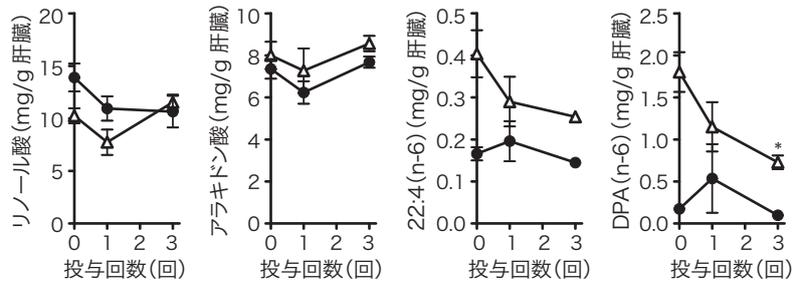


図5 肝臓 n-6 系列不飽和脂肪酸含量のシソ油投与による変化

●: 大豆油食群、△: n-3系脂肪酸欠乏食群  
\* 各群の0回投与群に対し有意に異なる。\* P<0.05、\*\* P<0.01、\*\*\* P<0.001

の n-3 系脂肪酸の変化は観察されなかった。

n-3 系列および n-6 系列脂肪酸は同じ酵素により不飽和化・鎖長延長され (図 1)、n-3 系脂肪酸不足時には DHA に代わり DPA (n-6) が増加する。したがって、DPA (n-6) は n-3 系脂肪酸欠乏の指標となる。n-3 系脂肪酸欠乏食群では、3 回のシソ油投与により、血漿 (図 4) では DPA (n-6) とその前駆体の 22:4 (n-6) が、肝臓 (図 5) では DPA (n-6) が投与前より有意に減少した。一方、大豆油群においてはシソ油投与による血漿・肝臓の n-6 系脂肪酸の変化は観察されなかった。

以上の結果より、妊娠・授乳期に n-3 系脂肪酸欠乏食を摂取したラットの仔は、n-3 系不足の状態に対応するため、不飽和化・鎖長延長反応が n-6 系列から n-3 系列に速やかに切り替わることで、 $\alpha$ -リノレン酸から DHA への代謝転換が効率的に行われることが示唆された。一方、大豆油群では、シソ油摂取による血漿・肝臓の n-3 系脂肪酸の上昇、n-6 系脂肪酸の減少のいずれも観察されず、多価不飽和脂肪酸含量が一定量に維持されることが示唆された。今後、生体内の多価不飽和脂肪酸の恒常性を保つメカニズムの解明を進めていきたい。

## 要 約

n-3 系脂肪酸不足状態の幼若ラットに、 $\alpha$ -リノレン酸含量の高いシソ油を投与し、血漿および肝臓の各脂肪酸含量の推移を測定した。 $\alpha$ -リノレン酸の投与により、n-3

系脂肪酸欠乏食群の n-3 系脂肪酸含量は上昇し、その傾向は DHA、DPA n-3、EPA、 $\alpha$ -リノレン酸の順で顕著だった。また、n-3 系脂肪酸欠乏の指標である DPA (n-6) は n-3 系脂肪酸欠乏食群でシソ油投与により減少した。大豆油群ではシソ油の投与による多価不飽和脂肪酸の変動はみられず、n-3 系脂肪酸欠乏食群では不飽和化・鎖長延長反応が n-6 系列から n-3 系列に切り替わることで、 $\alpha$ -リノレン酸から DHA への代謝転換が効率的に行われたと示唆された。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたりご支援を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Kimura F et al. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72, 608-610, 2008
- 2) Kimura F et al. *Lipids*, 46, 1101-1110, 2011
- 3) Pawlosky RJ et al. *Am J Clin Nutr* 77, 565-572, 2003
- 4) Goyens PL et al. *J Lipid Res* 46, 1474-1483, 2005
- 5) Burdge GC et al. *Br J Nutr* 88, 411-421, 2002
- 6) Innis SM *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 48, S16-S24, 2009
- 7) Reeves PG et al. *J Nutr* 123, 1939-1951, 1993
- 8) 国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定 (東北大学)
- 9) Lepage G and Roy CC. *J Lipid Res*. 27, 114-120, 1986