

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究 (C) 一般

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22500777

研究課題名 (和文) マウスの授乳・成長期における多価不飽和脂肪酸の役割に関する研究

研究課題名 (英文) A study on the role of polyunsaturated fatty acids during the murine lactation and the growth.

研究代表者

守口 徹 (MORIGUCHI TORU)

麻布大学・生命・環境科学部・教授

研究者番号：10512006

研究成果の概要 (和文)：多価不飽和脂肪酸(PUFA)を調節した特殊飼料や人工乳で脂質代謝酵素である $\Delta 6$ 不飽和化酵素欠損マウスを飼育し、体重変化や組織内脂肪酸組成を測定した。体重変化において、成熟齢では PUFA の違いによる差異は観察されなかったが、乳仔期、若齢期では、PUFA の体重増加に対する影響は明らかであった。脂肪酸組成では全ての個体において、アラキドン酸やドコサヘキサエン酸の低下が認められ、その機能性について検討する必要があると考えられた。

研究成果の概要 (英文)： The aim of this experiment is the measurement of the dietary fatty acid composition in $\Delta 6$ desaturase knockout mice. D6D-null mice were fed n-3 adequate diet for 10 weeks from a young or adult age. Also we investigated the influence of fatty acid composition by n-3 Adq milk in the newborn pups using artificial rearing technique. In the change of weight, we detected the significant decrease of body weight in young age and newborn lactation period, although there was no change in the adult age. Moreover, Arachidonic acid and docosahexaenoic acid significantly decreased in D6D Null mice. We think that there is a need to consider more about the function of these fatty acids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活、多価不飽和脂肪酸、マウス、脳機能

1. 研究開始当初の背景

ヒトと動物の授乳・成長期においてドコサヘキサエン酸(DHA)に代表される n-3 系脂肪酸は、多価不飽和脂肪酸の重要な栄養素の一部として認知されているものの、適切に摂取されておらず、乳児用粉ミルク等には必須までには至っていない。n-6 系脂肪酸であるア

ラキドン酸(ARA)についても、エイコサノイド類先駆体としての役割は検討されているが、生命の初期段階の ARA の供給不足や過剰摂取による影響は、まだよくわかっていない。

動物モデルにおいて、これら DHA や ARA など多価不飽和脂肪酸の授乳・成長期での役割を検証するためには、DHA や ARA など、個々の脂肪酸を欠乏させた飼料を与えることに

なるが、母獣乳に含まれる脂肪酸を制御できないため、数世代の飼育・繁殖が必要になる。n-3 系脂肪酸の α -リノレン酸(ALA)や、n-6 系脂肪酸のリノール酸(LA)は、生体内の同一酵素($\Delta 6$ 不飽和化酵素)でエイコサペンタエン酸(EPA), DHAやARAに代謝されるため、飼料中にALAやLAが含まれていると生体内代謝によりDHAやARAが産生されてしまう。また、飼料からALAやLAを除くと、ANAやLAのみならずDHAやARAなど同系列の脂肪酸全てが欠乏してしまうので、目的の脂肪酸の機能的評価は困難である。

研究代表者らは、これまで母獣乳からの脂肪酸摂取を避けて、マウス・ラットの出生の早期から各種脂肪酸を調節した人工乳を用いて飼育する確立している。n-3 系脂肪酸欠乏人工乳を用いた飼育では、一世代で n-3 系脂肪酸欠乏状態に基づいた脳機能の低下を呈し、脳形成期における n-3 系脂肪酸摂取の重要性を示した。また、米国イリノイ学の中村准教授は、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素欠損(D6D KO)マウスの作製に成功し、生体内での n-3 系ならびに n-6 系脂肪酸代謝を制御することが可能となった。この D6D KO マウスを用いて、各脂肪酸を調節した人工乳による人工飼育を行い、成長過程における各脂肪酸の機能性を評価しようとした。

2. 研究の目的

本研究は、各種多価不飽和脂肪酸を調節した特殊飼料や人工乳で D6D KO マウスを飼育して体重変化と脳を含む各組織の脂肪酸組成を測定しとの相関性を検証し、必須脂肪酸の役割を明確にする。

3. 研究の方法

本研究は、以下の手順に従って実施した。

- ① 本研究の外国人研究協力者(エジプト)の招へい。
- ② D6D KO マウスの輸入と飼育・繁殖によるコロニーの確保。
- ③ 人工乳を作製方法の確立。
- ④ 対照動物(C57BL/6J マウス)の人工飼育法の確立。
- ⑤ 脳機能評価法の確立。
 - ① 基礎運動能力(自発運動量)
 - ② うつ・不安(高架式十字迷路試験)
 - ③ 運動協調性(ロータロッド試験)
- ⑥ 種々臓器の脂肪酸組成測定法の確立。

当初、ほとんどすべての項目は順調に実施できたが、D6D KO マウスの輸入遅延と妊娠出産時の母獣死亡により繁殖に著しく時間を要し

た。さらに、外国人招へい研究者の来日後に発生した母国の騒乱、東北大地震とそれ以降の余震、原子力発電所事故等に起因した体調不良により、滞在期間を短縮して帰国したことなど、研究計画の修正が必要となった。そこで、本研究は以下の課題を実施した。

- (1) D6D KO マウス(若齢, 成熟齢)の飼料による各組織中の酸組成変化。

D6D KO マウスの飼育・繁殖中に得られた雄性マウス(Null typeとWild type)の若齢個体(4 週齢, Young), 成熟個体(24 週齢, Adult)にリノール酸と α リノレン酸のみを含有する飼料(n-3 Adq)ならびにリノール酸と α -リノレン酸にアラキドン酸, エイコサペンタエン酸とドコサヘキサエン酸が含まれる通常飼料(Normal)をそれぞれ 10 週間与え、体重変化を測定した(図 1)。また、各飼料の脂肪酸組成を表 1 に示した。各飼料を与えてから 10 週間後に各個体から 23 組織部位(血液(血漿, 赤血球), 脳(半脳, 海馬, 線条体, 皮質, 小脳, 嗅球, 視床下部), 網膜, 涙腺, マイボーム腺, 皮膚, 胸腺, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 膵臓, 精巣, 精巣上体, 前立腺)を採取し、脂肪酸組成を測定した。

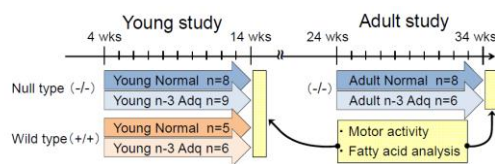


図 1 実験計画

表 1 各飼料の脂肪酸組成 (% of total fatty acid)

	Normal	n-3 Adq
Total Sat.	19.57	74.31
Total Mono.	28.16	5.63
LA	42.02	15.86
ARA	0.13	ND
DPAn-6	ND	ND
Total n-6	42.27	15.86
ALA	3.18	2.84
EPA	1.49	ND
DHA	1.32	ND
Total n-3	6.25	2.84

- (2) D6D KO マウスの人工飼育による各組織中の脂肪酸組成変化の検討。

D6D KO マウスの繁殖によって得られた雄性マウス(Null typeとWild type)を誕生 48 時間以内に母獣から引き離し、リノール酸と α -リノレン酸のみを含有する人工乳(n-3 Adq milk)もしくはリノール酸と α リノレン酸にアラキドン酸を加えた人工乳(n-3 Adq + ARA milk)で人工飼育(AR)した。各人工乳の脂肪酸組成を表 2 に示す。飼育期間中の体重変化を測定し、各個体の 10

週齢時に各組織(23 組織部位; 血液(血漿, 赤血球), 脳(半脳, 海馬, 線条体, 皮質, 小脳, 嗅球, 視床下部), 網膜, 涙腺, マイボーム腺, 皮膚, 胸腺, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 膵臓, 精巣, 精巣上体, 前立腺)の脂肪酸組成を測定した。

表 2 各人工乳の脂質と脂肪酸組成 (% of total fatty acid)

		n-3 Adq milk	n-3 Adq + ARA milk
Fatty acids (% of Total FA)	Total Sat.	43.92	43.61
	Total Mono.	28.13	28.22
	18:2n-6	16.98	15.94
	18:3n-6	ND	0.08
	20:3n-6	ND	0.11
	20:4n-6	ND	1.24
	Total n-6 FAs	16.98	17.37
	18:3n-3	3.88	3.89
	20:5n-3	ND	0.03
	Total n-3 FAs	3.88	3.92
Total fatty acid (µg/mg)		141.1	122.3
Fat source (g/100g milk)	Palm oil	8.25	8.25
	Coconut oil	2.5	2.5
	MCT oil	1.25	1.25
	Soybean oil	2.75	2.75
	Linseed oil	0.75	0.75
	Corn oil	0.5	none
	ARASCO	none	0.5

4. 研究成果

(1) D6D KO マウス(若齢, 成熟齢)の飼料による各組織中の酸組成変化。

各群の体重変化において, 成熟群では, その影響は認められなかったが, 若齢群では, D6D 欠損により, 体重増加の明らかな抑制が観察された(図 2)。

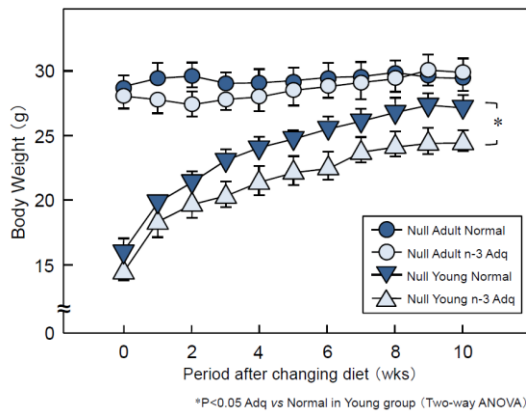


図 2 D6D KO マウスの飼料交換後の体重変化

血液(血漿と赤血球)の n-6 系と n-3 系の脂肪酸量は, Null Normal 群の Adult, Young 群間共に Wild 群と比較して同等もしくはやや低値であり, n-6 系, n-3 系の各脂肪酸組成の大きな変化はなかった。しかし, Null Normal 群に対して Null n-3 Adq 群では, 若齢, 成熟群の全ての脂肪酸で顕著な減少が認められた。特に n-3 系脂肪酸グループの減少量は大きく, その程度は,

Adult 群よりも Young 群で顕著であった。さらに, Null n-3 Adq 群には, $\Delta 5$ 不飽和化酵素により代謝されたとみられる脂肪酸 20:3 ($\Delta 7, 11, 14$), 20:4 ($\Delta 7, 11, 14, 17$), 22:4 ($\Delta 9, 13, 16, 19$) が著しく上昇していることが分かった。一方, 脳組織では, Null の Young, Adult の Normal, n-3 Adq 両群の総 n-6 系脂肪酸が, Wild Normal, n-3 Adq 群よりも低値を示しながらも Normal, n-3 Adq 群間に大きな差異は観察されなかった。しかし, ARA 量は, Young 群の方が Adult 群よりも高値を示していた。総 n-3 系脂肪酸は, そのほとんどが DHA であり, Normal 群の DHA 濃度に対して n-3 Adq 群で顕著な減少が認められた。この変化は, 血液と同様に Adult 群よりも Young 群で大きいことが分かった(図 3)。

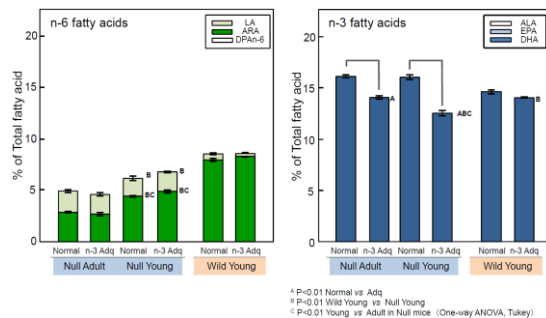


図 3 D6D KO マウスの脳組織中の n-3 系, n-6 系脂肪酸の組成変化

その他の組織の脂肪酸組成については, 現在解析中であり, 解析終了後, まとめて報告文化の予定である。

(2) D6D KO マウスの人工飼育による各組織中の脂肪酸組成変化の検討。

D6D KO マウスの繁殖によって得られた雄性マウス(Null type と Wild type)を人工乳(n-3 Adq milk もしくは n-3 Adq + ARA milk)で人工飼育(AR)した際の体重変化(集計終了分)を図 4 に示した。

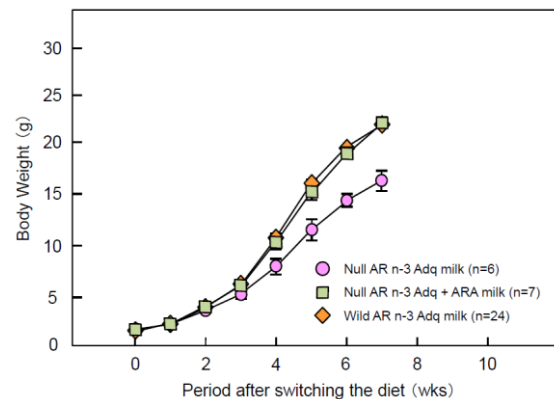


図 4 D6D KO マウスの 2 日齢からの人工飼育における体重変化

正常動物(Wild AR n-3 Adq milk)と比較して、n-3 Adq milk で飼育した Null AR n-3 Adq milk 群は、明らかな低体重を示したのに対して、アラキドン酸を加えた人工乳で飼育した Null AR n-3 Adq + ARA milk 群の体重は、正常動物とほぼ同程度の体重増加を示し、授乳期におけるアラキドン酸の重要性が確認された(図 4)。

今回の一連の検討から、生体内の多価不飽和脂肪酸は、一部のn-6系脂肪酸とn-3系脂肪酸のバランスでその恒常性が保たれているが、Null n-3 Adq 群は、D6D 欠損のために、それらの脂肪酸を産生することができず、恒常性に破綻を来しており、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素による脂肪酸の代謝が亢進していることが分かった。また、Adult と Young 両群の比較において、脳内 ARA を除いた全ての多価不飽和脂肪酸で Young 群の蓄積量が少なかったことから、成長段階では各脂肪酸の程度の差こそあるものの、需要度もしくは代謝速度が Adult 群よりも高いものと推察された。

本実験は、人工飼育実験も含め、まだ継続中、解析中であり、今後、ドコサヘキサエン酸等の脂肪酸を添加した人工乳を用いて、同様の検討を行い、各脂肪酸の必須性に関する検討を継続する必要があると考えられる。

5. 研究組織

(1) 研究代表者

守口 徹(MORIGUCHI TORU)
麻布大学・生命・環境科学部・教授
研究者番号:10512006

(2) 連携研究者, 研究協力者

干場 純治(HOSHIBA JUNJI)
岡山大学・研究支援センター・助教

中村 学(NAKAMURA MANABU)
イリノイ大学・人間栄養・食品科学部・准教授

ナハダ・フセイン(NAHED M HUSSEIN)
国立アインシャムス大学・准教授