

機関番号：20104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700759

研究課題名（和文）神経系のなりたちにおける胎生期脂質栄養の役割

研究課題名（英文）Role of fatty acid for brain development during fetal period.

研究代表者

山本 達朗（YAMAMOTO TATUROU）

名寄市立大学・保健福祉学部・講師

研究者番号：90379389

研究成果の概要（和文）：n-3系多価不飽和脂肪酸は、脳で重要な役割を果たしている。本研究では、n-3系多価不飽和脂肪酸を欠乏した状態の母胎から出生した仔の脳発達について、神経活動において重要なグリア細胞の発達に焦点を絞って研究を行った。その結果、大脳皮質において、グリア細胞であるアストロサイトの密度低下や、オリゴデンドロサイトの髄鞘形成遅延が観察された。これらの所見は、脳発達における適切な脂質栄養摂取の重要性を示している。

研究成果の概要（英文）：n-3 PUFAs plays an important role in brain. To understand the effect of maternal intake of n-3 PUFAs against postnatal macroglia development in the brain of P0, P7 and P14. We performed several morphological studies of the cerebral cortices in these pups. Our data suggest that appropriate intake of n-3 PUFAs is important for postnatal glial development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：n-3系多価不飽和脂肪酸、脂質栄養、生後脳発達、大脳皮質、グリア細胞

## 1. 研究開始当初の背景

三大栄養素の一つである脂質の摂取は、身体活動のためのエネルギー源の供給以外に、体内で合成される脂肪酸のもととなる必須脂肪酸の供給という重要な役割を有する。脂質を構成する脂肪酸の摂取量は、摂取する個人の生活環境に依存している部分が大きく、その影響によって変動を受けやすいことが指摘されている。近年、日本における食生活の欧米型への変化は、脂質を構成しているn-3系多価不飽和脂肪酸（n-3 PUFAs）の摂取

を減少させており、この変化によって生活習慣病などのような身体への影響が懸念されている。n-3 PUFAsは、その代謝産物であるドコサヘキサエン酸が、脳神経系活動に深く関わっていることが示されており、脂質栄養の脳神経活動における役割が注目されている。これまで、n-3 PUFAs欠乏に関する研究は、神経細胞が中心に行われており、神経細胞の移動遅延や、胎生期海馬の層構築以上などが報告されている。しかしながら、脳神経系を神経細胞とともに構成しているグリ

ア細胞と n-3 PUFAs の関係については詳細な研究が乏しかった。このような背景から、本研究では、出生前後から出生後にかけて発生・発達を遂げるグリア細胞であるアストロサイトやオリゴデンドロサイトの n-3 PUFAs との関係性について詳細に検討を行った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「脳神経系の発達を栄養学的観点から研究し、母胎から供給される胎生期脂質栄養が胎児脳神経系発達における神経細胞産生およびその成熟過程に果たす役割について解明し、母胎だけではなく胎児の QOL 向上を目指した栄養学的知見を提供すること」である。本申請課題を遂行することは、母胎の栄養摂取に依存した胎児の脂質栄養を中心とした栄養学的変化と胎児脳の脂肪酸組成および脳構造・脳機能の発達との関わりについて新たな知見を与えるだけでなく、母胎が妊娠期に摂取すべき適切な脂質栄養摂取基準の方向性を示すことができる。

## 3. 研究の方法

### (1) n-3 PUFAs 欠乏ラットの作成

n-3 PUFAs 欠乏飼料の作成については、Coti Bertrand P *et al.* (2006)を参考とした粉餌を調製する。粉餌に用いる脂質は、水素添加硬化ココナツ油とヒマワリ油とし、n-6/n-3 比を調整することにより n-3 PUFAs が欠乏状態の飼料を作成する。作成した粉餌飼料を 8 週齢の SD 系雌ラットに 2 週間給餌し、その後雄ラットと型通り交配を行う。プラグ確認日を胎生 0.5 日目とし、体重管理などを行いながら、母胎成長率に異常がないように注意し、解析に適した日齢にて薬剤の投与などの処置を行う。その後、適切な日数の経過後に脳組織の採取を行う。脳組織については用途に合わせて採取し、形態学的解析用または分子生物学的解析用とする。

### (2) 新生仔脊髄を用いた脂肪酸解析

脳組織採取時に採取した脊髄をカッターで細かくしたのち、クロロホルム:メタノール (1:1) 液を入れ、ホモジナイザーを用いて粉碎した。その後、遠心分離 (10000 rpm、10 min、4°C) を行い、沈殿を吸引しないように細心の注意を払いながら上清を採取し、ねじ口試験管に移した後、窒素ガス流動下で乾固した。その後、メチル化剤として BF<sub>3</sub>-methanol をねじ口試験管内に 500  $\mu$ l 入れ、100°C で 5 分間加熱し、脂肪酸のメチル化を行った。再び N<sub>2</sub> 流動化で乾固後、ヘキサン 100  $\mu$ l にて溶解し、そのうち 1  $\mu$ l をガスクロマトグラフィーに注入し、分析を行った。

### (3) 生後各段階の脳組織の免疫組織化学

脳組織を採取後にパラフィンに抱埋し、4  $\mu$ m 厚の薄切切片を作成した。切片をスライドガラスを染色カゴに入れ、キシレンにて脱パラフィン処理後、下降アルコール系列にて水和し、蒸留水で 2 回洗浄 (5 分) した。98°C に加温した 0.01 M クエン酸緩衝液の入った染色ツボに入れ、浸漬し、抗原賦活化温浴処理を 40 分間行った。その後、染色ツボを常温に戻し、4°C の PBS に 10 分間浸漬した。PBS で 5 分間洗浄 (2 回) し、イムノエッジペン (フナコシ) で脳組織標本の外周を囲み、0.1% PBS-T/1% BSA でブロッキング (1 時間) した。一次抗体 (GFAP; 1:1000, MOBP; 1:1000, MBP; 1:5) を 1 時間浸した後、4°C にて一晚反応させた。1 次抗体反応後、PBS で 5 分間洗浄し、ビオチン化二次抗体もしくは蛍光二次抗体を塗布した。発色確認後、封入剤で封入し直ちに倒立顕微鏡もしくは蛍光顕微鏡を用いて観察を行った (接眼レンズ 10×23、対物レンズ 10 倍または 20 倍)。観察部位は、Axio Cam MRc5 で撮影し、記録した。

### (4) 統計解析

体重、摂食量および脂肪酸組成の統計解析は、Student's t-test を用い、有意水準を  $p < 0.05$  とした。統計解析には SAS JMP ソフトウェア (SAS Institute Japan 株式会社) を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) n-3 PUFAs 欠乏食摂食により母胎および出生仔の成長は影響されない。

摂食する飼料の違いによって母胎の成長に差が生じないことを確認するために、摂食開始より妊娠までの 2 週間と妊娠確認から出産までの約 3 週間の体重変化を両群間で比較した。その結果、両群の母胎の体重は、摂食開始時は 150 g 程度であるが、2 週間の飼料摂食によって約 200 g まで成長した。この間の成長に関して両群間に有意な差は認められなかった。妊娠確認から出産までの約 3 週間では、210 g 程度から 320-340 g まで成長した。この間の成長に関して両群間に有意な差は認められなかった。

飼料組成の違いによる摂食量への影響を確認するために、妊娠前および妊娠後の両期間における母胎の摂食量を比較した。DEF 食群の母胎の摂食量は、摂食開始から妊娠確認までの 2 週間において、Cont 群に比べて多い傾向が見られるが、両群間に有意な差は認められなかった。妊娠確認より出産までの約 3 週間では、妊娠初期から妊娠 15 日目まで摂食量は両群とも増加しているが、15 日目以降では両群とも摂食量が減少した。この期間における摂食量において両群間に有意な差は認められなかった。

飼料組成の違いが、母胎を介して栄養供給を受ける出生仔の成長に与える影響を確認するために、脳組織採取日齢（生後0日目、7日目、14日目）における出生仔の体重を比較した。各試験飼料摂取母胎より生まれた仔の体重は、新生仔から生後14日目まで、同様の成長を示し、各測定日における体重について両群間に有意な差は認められな

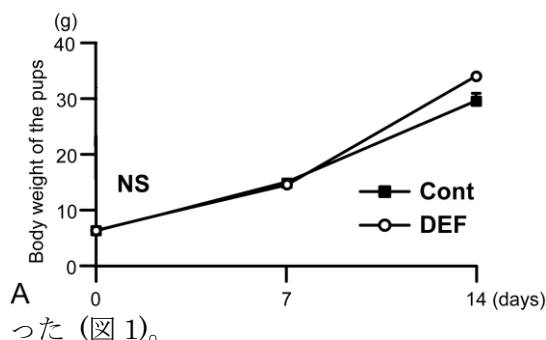


図1: 出生後14日間の体重変化。n-3 PUFAs 欠乏食摂取母胎から出生した仔の成長は、正常接触母胎群の仔の成長と同じ成長パターンを示す。

(2) n-3 PUFAs 欠乏食摂取は出生仔の脊髄のDHA含有率を有意に低下させる。

n-3 PUFAs 欠乏食摂取による脳内脂肪酸比率の変動を観察するために、出生仔からの脳組織採取時に脊髄を採取し、脊髄の脂肪酸組成を解析した。結果として、n-3 PUFAs 欠乏食摂取母胎より出生し、その母胎を介した授乳によって成長した出生仔は、Cont 食摂取母胎より出生した仔に比べて出生直後（生後0日目）より脳内のDHA比率が50%以上低下しており、有意な差を認めた。このような脳内DHA比率の低下は、生後14日目まで継続していた。また生後7日目において、ステアリン酸、アラキドン酸にも有意差がみられたが、他の日齢においては、他の脂肪酸の比率に有意な差を認めなかった（図2）。

(3) n-3 PUFAs 欠乏は生後アストロサイトの発生および成熟に影響を与える。

脳の生後発達時のグリア細胞の発生および成熟におけるn-3 PUFAsの役割を明らかにするために、最初に生後0日目、7日目、14日目の脳組織に対して抗GFAP抗体を用いた免疫染色を行った。DEF食群の生後0日目の脳においては、大脳皮質深層部のGFAP陽性細胞が散在している様子が観察された。また生後7日目の脳では、Cont食群は、大脳皮質深層に存在するGFAP陽性細胞が、各細胞からいくつもの突起をのびし、隣接する細胞と交叉してい

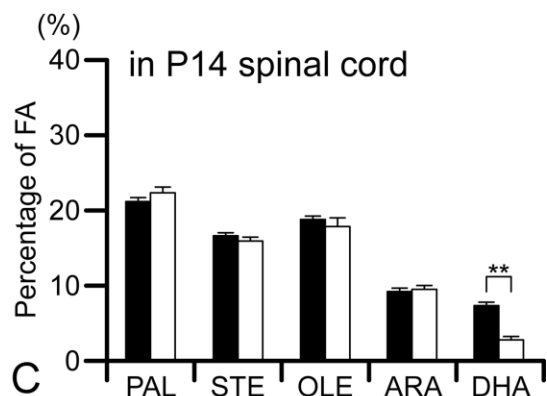
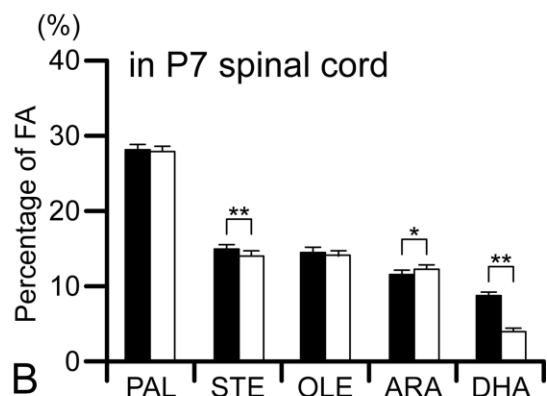
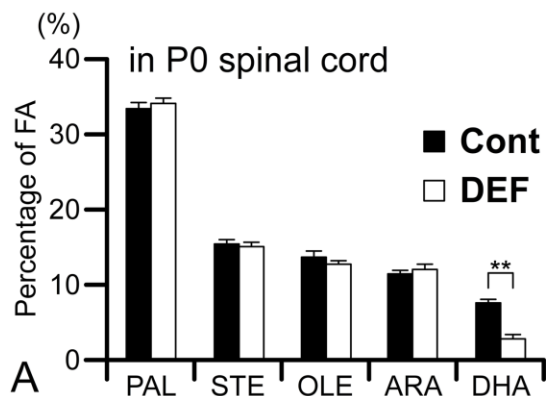


図2: 生後0日目、7日目、14日目の脊髄内脂肪酸の比率。DHAの含有比率が有意に低下している。

た。また表層にもいくつかのGFAP陽性細胞が存在していた。これに対して、DEF食群の脳は、GFAP陽性細胞の分布パターンはCont食群と変わらないが、全体的にGFAP陽性細胞の数が少なく、突起の複雑性も乏しかった。生後14日目の脳では、Cont食群は、深層のGFAP陽性細胞と突起によって生後7日目に比べてより層状に発現が局限していた。また、表層におけるGFAP陽性細胞数も多くなり、さらに大脳皮質の中間層に皮質中および血管周囲などに多数のGFAP陽性繊維が観察された。これに対して、生後14日目のDEF食群では、大脳皮質深層におけるGFAP陽性細胞数

は明らかに少なく、Cont 食群のような層状の発現パターンを示していなかった。また、大脳皮質中間層における GFAP 陽性細胞数および繊維が、Cont 食群に比べてかなり少なかった (図 3)。

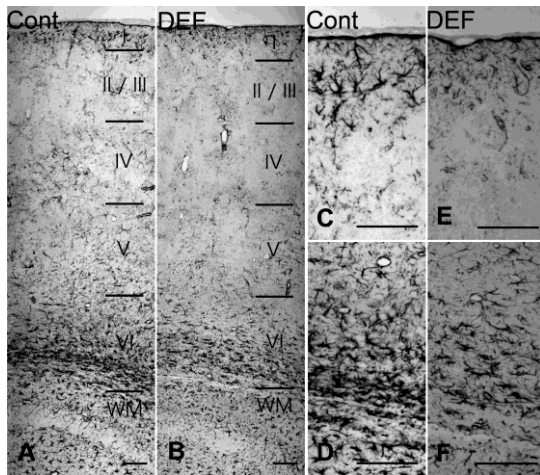


図 3: 生後 14 日目の大脳皮質におけるアストロサイトの分布 GFAP 陽性のアストロサイトの分布密度が、正常食摂食軍医比ベ欠乏食摂食群で低下している。

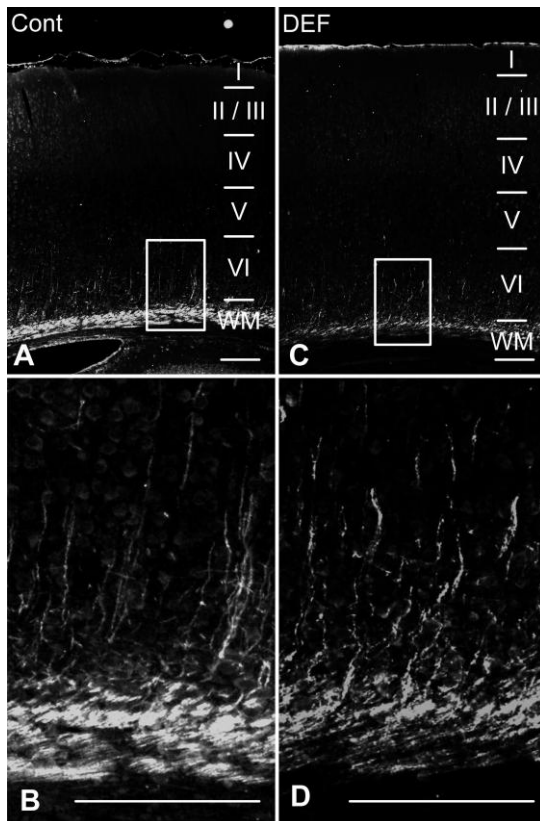


図 4: 生後 14 日目の髄鞘構築パターンの比較。欠乏食摂食群の髄鞘構築は正常食摂食群の髄鞘構築に比べて脆弱であり。髄鞘構築の進度も正常食摂食群にくらべて遅れて

いる。

#### (4) n-3 PUFAs 欠乏における髄鞘形成の遅延

生後 7 日目および 14 日目のオリゴデンドロサイトの分布に差が見られたことから、オリゴデンドロサイトの成熟により生じる髄鞘の形成にも差が生じていることが考えられたため、抗 MBP 抗体を用いた蛍光免疫染色法を行い、両群間の髄鞘形成パターンを比較した。その結果、Cont 食群では生後 7 日目より大脳皮質の白質に髄鞘形成が確認されるが、DEF 食群では確認できなかった。また、生後 14 日目では、Cont 食群では大脳皮質の白質における髄鞘化がより進んでいた。しかし、DEF 食群では、白質の髄鞘化は起きているが、Cont 食群に比べて MBP の発現が乏しかった (図 4)。

これらの成果をまとめた論文については現在投稿中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

Tatsuro Yamamoto, Ayako Okuyama-Yamamoto, Ayuko Moriuchi, Hiroki Tanabe, Naomichi Nishimura, Maternal dietary n-3 PUFAs affects development of glial cells in the infant brain, 第 116 回日本解剖学会総会 (順天堂大学/東京) (2011 年 3 月 30 日) (P3-173)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 達朗 (YAMAMOTO TATSURO)  
名寄市立大学・保健福祉学部・講師  
研究者番号：90379389

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：