

胎児の成長・発達に及ぼすコレステロールと多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の影響に関する研究

帝京大学医学部 小児科学教室 教授 阿部 敏 明
助手 花香 里 子
国立健康・栄養研究所 臨床栄養部 室長 松本 明 世
国立健康・栄養研究所 特別客員研究員 板倉 弘 重

要 約：

胎児、乳幼児期における脳神経系の正常な形成・発達にとって栄養は重要な因子である。発達期におけるドコサヘキサエン酸(DHA)の多量摂取は学習能力向上や網膜発達に影響を与えるなど、その機序の解明は小児栄養の大きな課題である。一方、DHAは脂質代謝調節に影響を与えることが知られている。コレステロールはミエリンを含め、脳神経系の形成に必須な物質であるが、中枢神経系における脂質代謝は血液・脳関門の存在からも他の臓器とは異なる機構で制御されることが予測され、特に成長・発達期における脳のコレステロール代謝系に及ぼすDHAの影響は解明されていない。我々はこれまでに、コレステロールは諸臓器および器官の形成・発達に強く影響することに注目し、コレステロール合成系の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素の発達に伴う発現量の変動を解析し、脳の髄鞘化に伴いその発現量は増加することを示した。また血中リポ蛋白から細胞へのコレステロールの取り込み(供給)量を検討するため、LDL受容体の発現が一定であることを示した。さらに、出生前のコレステロール代謝の変化も解析し、LDL受容体とHMG-CoA還元酵素の発現量を検討した結果、出生以前において脳のHMG-CoA還元酵素発現量の増加を認めた。そこで本年度は、コレステロール代謝の発達に伴う変動を制御する機構あるいは互いに影響を及ぼし合う因子を解明するために、DHAを多量摂取させ発達期における各臓器の脂肪酸組成の変動を解析し、摂取脂肪酸が脳をはじめ組織脂肪酸組成に強く影響することを示した。

目 的：

脂質代謝調節が成長・発達の過程で、脳を含めた様々な臓器形成の発生・分化に関与していることが考えられる。コレステロールは成長・発達に重要な役割をはたしており、生体内におけるその合成系は食事内容(摂取脂質の差異)や摂取量等によって調節されている。神経の発達にコレステロールの合成が重要な働きをしていることはこれまでの研究(1、2)によって明らかとなっており、脳の髄鞘化を含めた成熟に影響することも考えられる。すなわち、諸臓器および器官の形成に関与しており、ひいては脳神経細胞の成長に強く影響を及ぼしている。発達に伴うコレステロール代謝系の調節機構

を解析することにより、形成期に必要なとされるコレステロール供給メカニズムを解明するための糸口をつかむことができると考え、これまでにマウスをモデル動物として、発達に伴うコレステロールの代謝系酵素の発現量を解析した。

一方近年、ある種の脂肪酸が生理活性物質として、ポリペプチドと結合しその活性に関与するなど、新たな役割を示すことが知られ、脂質が互いにその代謝に関与しうることが示唆された。脳神経系及び網膜などに多く存在する多価不飽和脂肪酸(PUFA)のひとつであるドコサヘキサエン酸(DHA)の多量摂取は、学習能力の向上や視力の発達を促進するとされている。DHAはエイコサペンタエン酸(EPA)やアラキドン酸(AA)とともに生理活性をもつ物質であり、様々な食品や調整乳などに添加されてきている。脂肪酸が脳の形成期に必要なコレステロールの代謝系に関与していることが考えられ、DHAがコレステロールの代謝に何らかの影響を与えていることが十分に考えられる。

そこで本年度は、モデル動物としてマウスを使い、妊娠時母胎がDHAを多量摂取した場合による発達段階における脂質代謝への影響を検討するために、組織中の脂肪酸量の変動を解析した。

実験対象と方法：

妊娠マウス(ddY)を受精後から授乳後まで10%の魚油(DHA24%、EPA 7%、AA 3%、リノール酸2%)を混ぜた固形飼料で飼育し、さらに仔マウスは離乳後も母マウスと同様の飼料で飼育した。対照群としてコーン油(DHA、EPA、AAは共に0%、リノール酸47%)を同様にあたえた仔マウスを用いた。仔マウスから経時的(0、5、10、15、20、25日齢)に脳、肝臓を採取し液体窒素中にて直ちに凍結し脂質抽出まで保存した。表1に飼料組成を示した。

表1 飼料組成

成分	
シュクロース (g)	450
カゼイン (g)	200
αコーンスターチ (g)	150
塩化コリン (50%) (m)	4
セルロースパウダー (g)	50
ビタミン混合 (g)	10
ミネラル混合 (g)	35
DL-メチオニン (g)	3
Oil (g)	100

凍結保存しておいた各臓器は凍結乾燥した後、総脂質をBligh-Dyer法により抽出した。

組織中のPUFA含量は凍結乾燥した総脂質に5%塩酸-メタノール混液を加え加熱してトランスメチルエステル化したのち冷却し、メチル化した脂肪酸をヘキサンにて抽出した。ニトリルシリコンを液相とするキャピラリーカラム(HR-SS-10)を装填したガスクロマトフィーで内部標準(Heneicosanoic acid(21:0))をおき、定量した。ガスクロマトグラフィーの分析では窒素をキャリアガスとし、昇温条件160-190℃:3℃/min、190-200℃:1℃/min、200-215℃:1.5℃/minに設定した。飼料に用いたオイルの組成を表2に示した。

表 2

corn oil脂肪酸組成		Fish oil脂肪酸組成	
Fatty Acid	%	Fatty Acid	%
12:0	-	12:0	0.03
14:0	0.04	14:0	2.96
16:0	9.08	16:0	18.21
16:1	0.20	16:1	5.49
18:0	1.91	18:0	4.57
18:1n9	32.57	18:1n9	23.29
18:2n6	46.96	18:2n6	2.49
18:3n-6	0.28	18:3n-6	0.26
18:3n-3	2.49	18:3n-3	0.84
20:0	0.51	20:0	0.34
20:1	0.53	20:1	2.83
20:3n6	-	20:3n6	0.11
20:4n6	0.29	20:4n6	2.70
22:1	-	22:1	0.18
20:5n3	-	20:5n3	7.33
24:0	-	24:0	0.33
22:4n6	-	22:4n6	-
22:5n6	-	22:5n6	1.33
24:1	-	24:1	0.70
22:5n3	-	22:5n3	1.79
22:6n3	-	22:6n3	24.22

結 果：

仔マウスの体重増加は、出生後から飼育期間中の25日齢まで両群間に差は認められなかった。

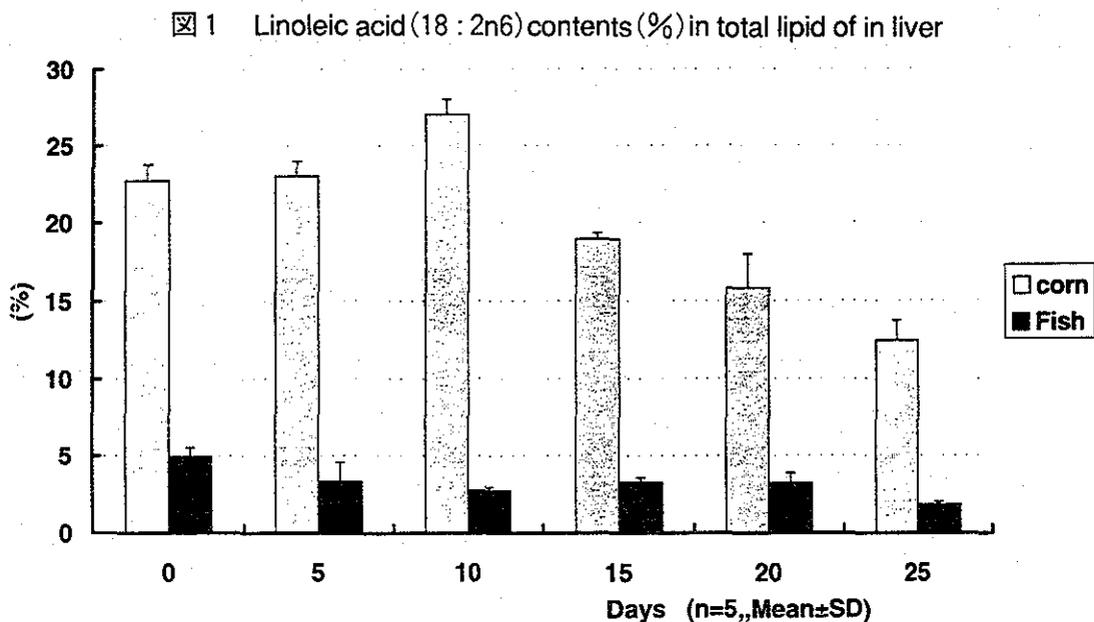
マウスの肝臓における総脂肪酸中のリノール酸含有率の変化を図1に示した。リノール酸を多く含む対照群は、DHA摂取群と比較して、全期間を通して高い値を示した。一般に、肝臓の脂肪酸組成は食餌の脂肪酸組成を反映しているといわれており、母乳中の脂肪酸組成の影響が推測された。脳におけるリノール酸の含有率は、対照群で1.2%、DHA群では0.5%以下と肝臓と比較して1/10程度の低値を示した(図2)。

肝臓における総脂肪酸中のアラキドン酸の含有率は、対照群では0、5日齢の10%から10日齢で7%に減少したが、再び15%以上に増加した。DHA摂取群では、0日齢の5%から漸次増加し、10日齢で対照群が減少したため対照群より高値に転じたが、15日齢で最大に達し、以降減少傾向を示した(図3)。脳におけるアラキドン酸の含有率の変化を図4に示した。対照群では12-15%で、DHA摂取群の7-10%に比べ常に高い値を示した。

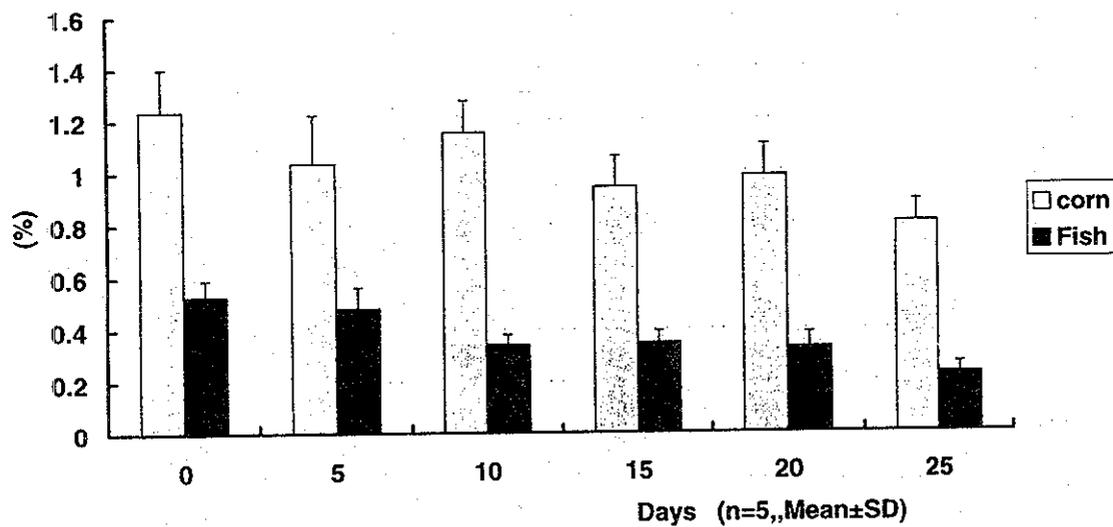
肝臓におけるEPA含有率の変化を図5に示した。DHA摂取群の0日齢で5%のEPA含量を示し、5日齢で1%程度まで減少したが、10日から15日齢にかけて約3%、20日齢以降再び5%以上に増加した。しかしながら、対照群ではほとんど蓄積は認められなかった。図6に脳におけるEPA含有率の変化を示した。DHA摂取群は対照群と比較し、0日齢で10倍以上の含有率を示し、成長に伴って減少した。

図7には肝臓におけるDHA含有率の変化を示した。0日齢でDHA摂取群は対照群の約5倍の含有率(35%)を示し、また全期間とも摂取群でDHA含量率は高値を示したが、成長に伴って減少し、25日齢では22%であった。一方、対照群では全期間とも10%以下で、ほぼ一定の値であった。マウスは20日齢前後で離乳し親と同じ飼料を摂取するようになるので、ここから減少傾向が強くなる原因として母乳が固形飼料より特定の脂肪酸を濃縮しているか、または吸収されやすいからではないかと考察された。

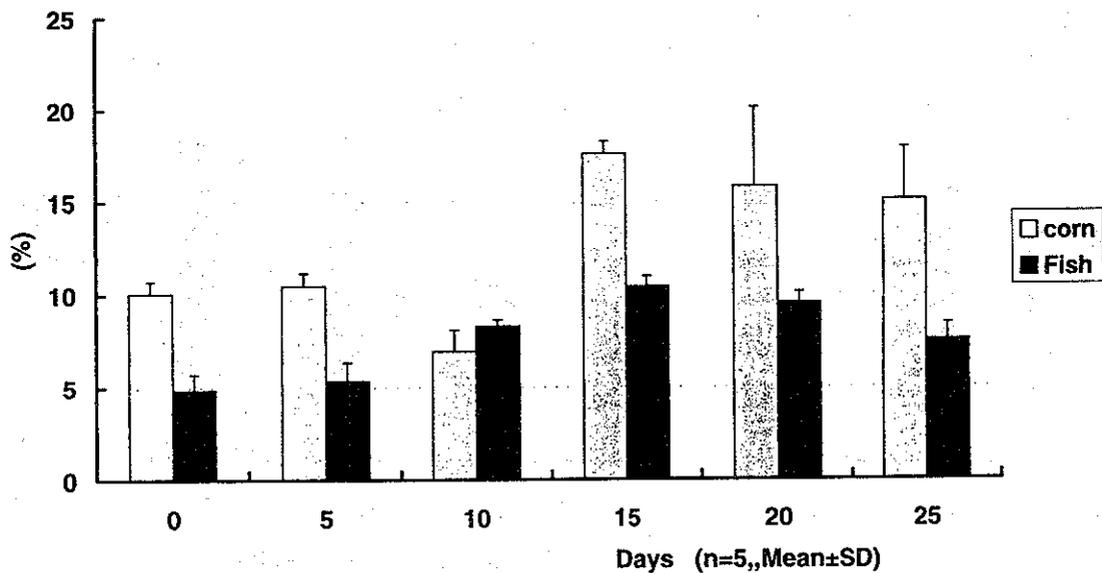
脳神経系細胞膜の構成脂肪酸としてDHAが多量に存在することが知られているが、コーン油で飼育した対象群でも出生直後の0日齢で12%と高含量を示し、成長に伴って増加し15日齢で16%とプラトーに達した(図8)。DHA摂取群では0日齢で18%と対象群の1.5倍の含有率を示し全期間を通して対象群と比較して有意に高い値を示した。しかしながら、脳のDHA含有率に与えるDHA摂取の影響は肝臓に較べて少ないことが示唆され、これは脳細胞膜の構成脂肪酸に占めるDHA含量が通常食の摂取でも多いためであると考えられる。また、成長に伴ってDHA含有率が増加し、対象群より早期の10日齢ではプラトーとなる22%にまで増加した(図8)。



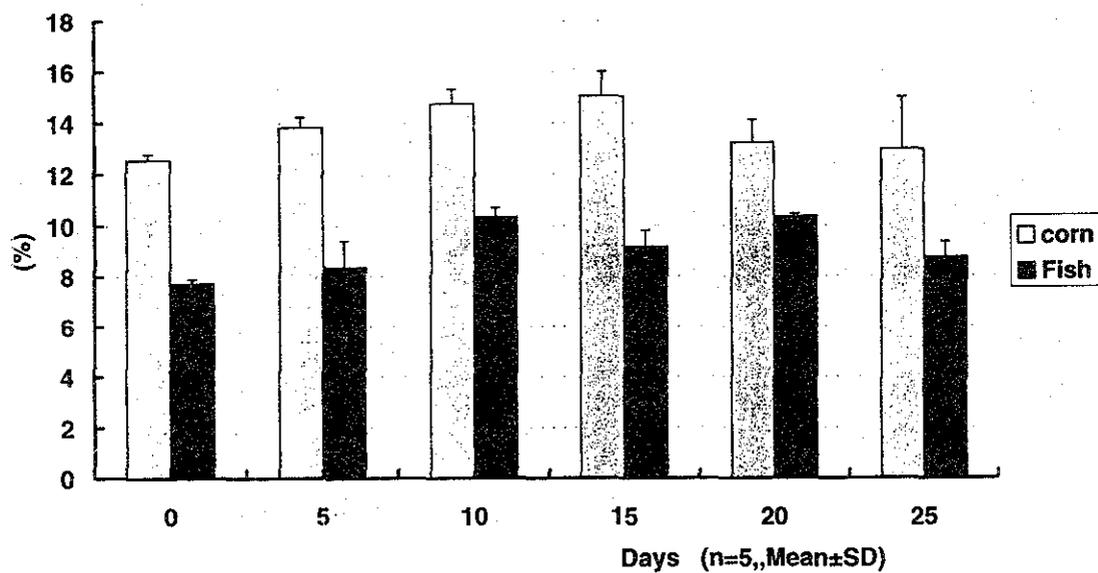
☒ 2 Linoleic acid (18 : 2n6) contents (%) in total lipid of mouse brain



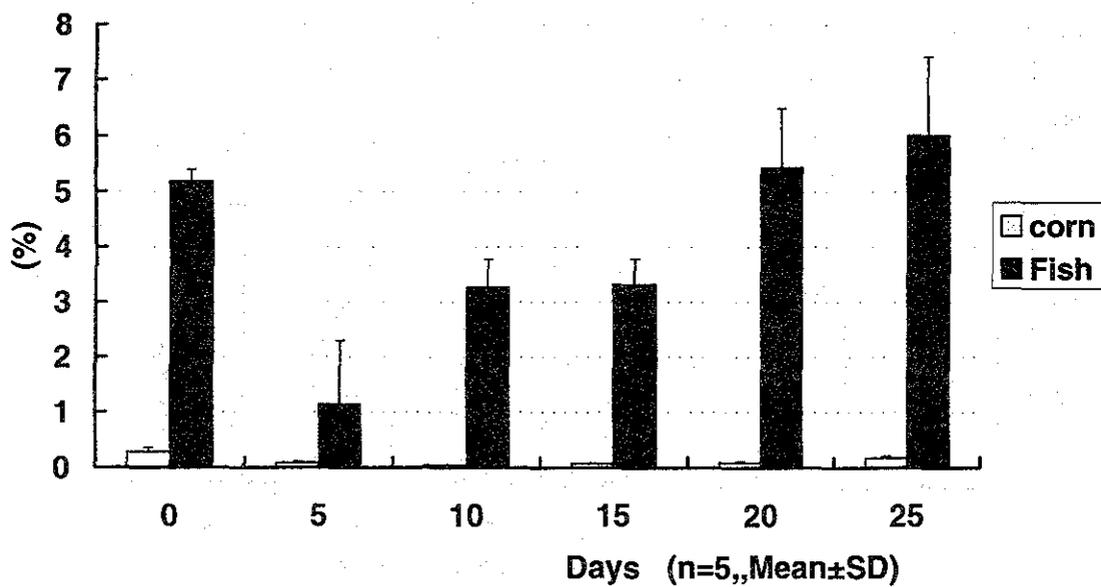
☒ 3 AA (20 : 4n6) contents (%) in total lipid of liver



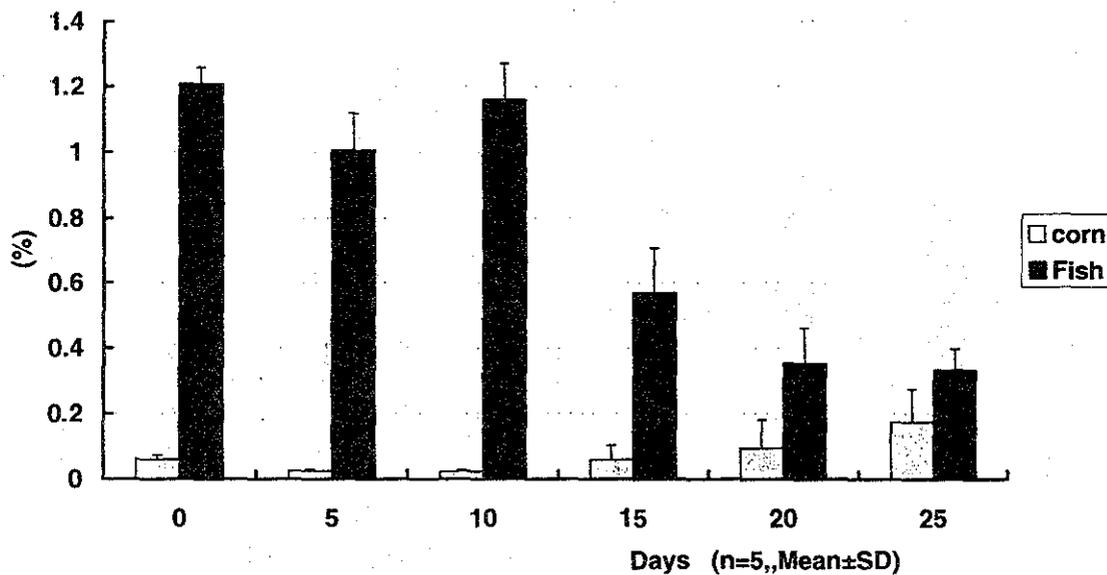
☒ 4 AA(20 : 4n6) contents (%) in total lipid of brain



☒ 5 EPA(20 : 5n3) contents (%) in total lipid of liver



☒ 6 EPA (20 : 5n3) contents (%) in total lipid of brain



☒ 7 DHA (22 : 6n3) contents (%) in total lipid of liver

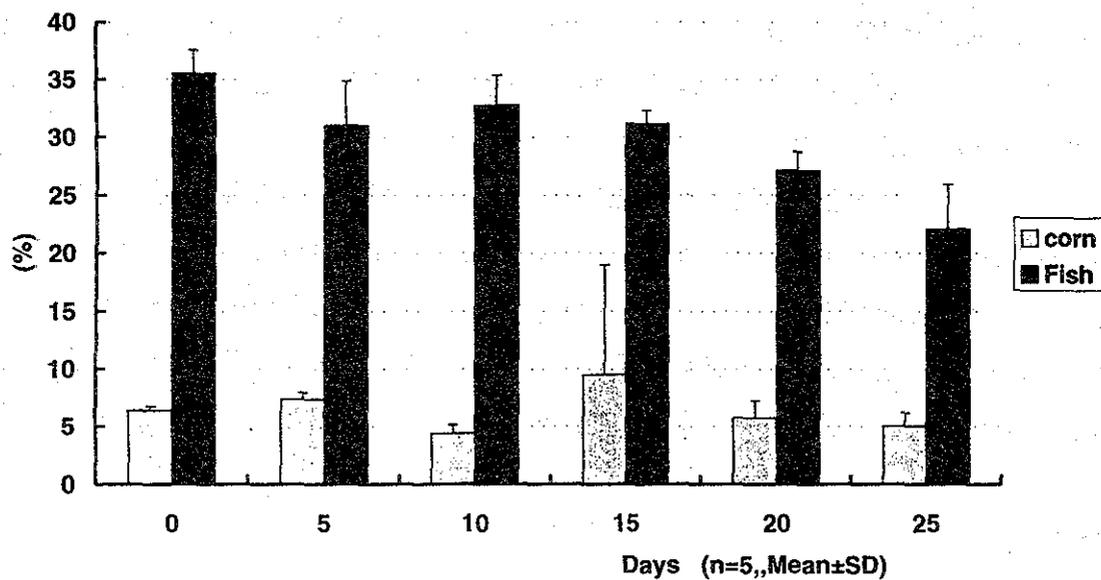
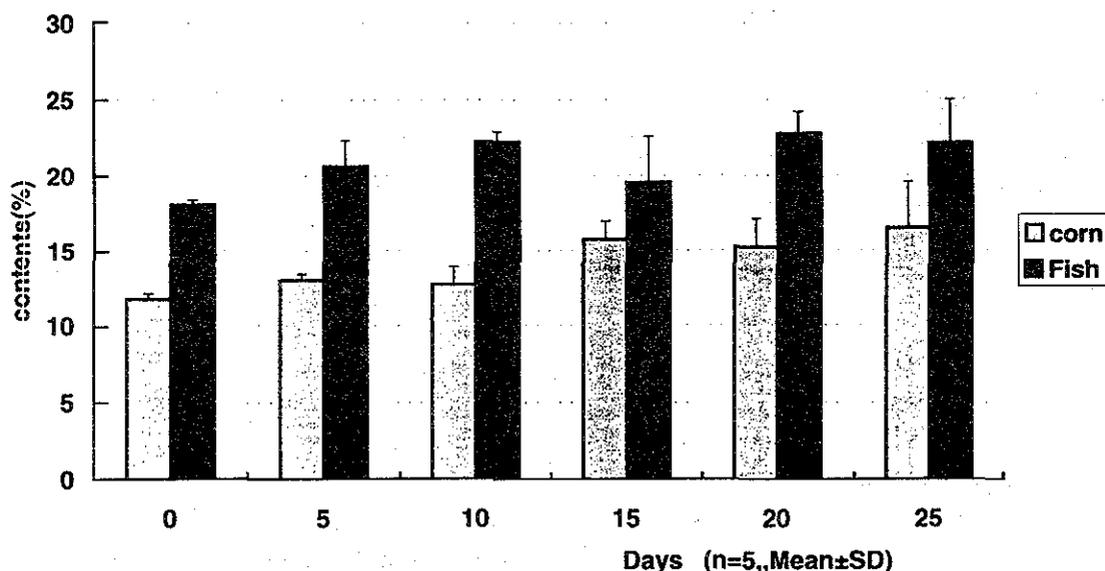


図8 DHA(22:6n3) contents (%) in total lipid of brain



考 察：

多価不飽和脂肪酸であるDHAを摂取させたマウスの発達期における脳及び肝臓の脂肪酸組成の変動を解析した。検討全期間において、DHA摂取の実験群は対照群と比較して脳、肝臓ともDHA含量が有意に高値を示し、摂取脂肪酸が組織脂肪酸組成に強く影響することが認められた。一方、脂肪酸の種類、臓器別にその変動は異なり、ある一定以上摂取し続けてもプラトーに達する脂肪酸と増加または減少を続ける脂肪酸が認められた。

以上のように、組織により摂取脂肪酸の組織脂肪酸含有量に及ぼす影響の程度や各脂肪酸含量の変動に組織特異的な差異が認められ、これは組織・器官には機能発現のため細胞構成に違いがあり、それを維持するための制御機構が働いているためであると考えられる。したがって、摂取脂肪酸の脳をはじめとしてそれぞれの器官形成に及ぼす影響について、コレステロール代謝系遺伝子の発現調節に及ぼす作用の解析も含め、胎児期から、また他の臓器においてもさらなる検討が必要と思われる。

結 論：

昨年度までに、出生前後のLDL受容体とHMG-CoA還元酵素の発現量を解析した。HMG-CoA還元酵素の脳の発現量は-5、5、20日齢で増加が認められた。LDL受容体の発現量が一定で変化が見られないことより、-5日齢での増加は胎仔の脳の発達に伴う細胞増殖の為に膜合成に必要なコレステロールの増加に、また5日齢の増加は髄鞘化に伴うものと考えられる。20日齢の増加はオリゴデンドロサイトの増殖に伴うものと考えられる。胎生期、ミエリン形成期における4-7倍の増加は、オリゴデンドロサイトの増殖によると考えられる3倍の増加量に比べ非常に大きなものであった。この胎生期、

オリゴデンドロサイトの増殖期における増加によって、脳内で代謝的に安定なコレステロールが相当量蓄積されてきており、ミエリン形成期に必要なコレステロールを賄っているために、発現の増加が軽度にとどまっているのではないかと推論される。また、脳では他の臓器と比較しても成熟マウスに対してこれらの時期の増加率が大きいものであった。さらに、出生以前における臍体血中の脂質分析のデータにおいて臍体静脈血と臍体動脈血を比較した場合、コレステロール含量やLDLコレステロールには有意な差は認められなかった。このことはコレステロールの供給が母体の臍帯静脈に依存しているとは考えにくく、胎児自身の合成によりまかなわれている可能性が高いと考察される。脳の形成発達に際し必要とされるコレステロールの胎児期、乳児期における*de novo*合成の重要性がより明らかとなった。また、コレステロール合成系最後の酵素 $\Delta^3,7$ -sterol, Δ^7 -reductaseの障害により引き起こされるSmith-Lemli-Opitz症候群に見られるように、全身の様々な臓器の未成熟による奇形が生じることから、胎児自身によるコレステロールの合成が行われなければならないことが言える。我々のこれまでのコレステロール代謝関連の酵素の変化が示す結果は、胎児期におけるコレステロールの重要性を示し、その供給が脳自身の合成により賄われていることを示した。本年度、コレステロール代謝に関連していると考えられる脂肪酸をターゲットに解析を行った。組織脂肪酸は摂取脂肪酸の種類によって変動し、その臓器に特異的な脂肪酸が増減していた。今後、摂取脂肪酸の相違によるコレステロール代謝系の酵素の変動を解析していく予定である。

参考文献：

- (1) Astemis P Simopouls : Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. Am J Clin Nutu 1991 ; 54 : 438-63.
- (2) Wasantwisut E : Nutrition and development : other micronutrients' effect on growth and cognition. South-east Asian J Trop Med Public Health 1997 ; 28 Suppl 2 : 78-82