

氏 名(本籍) かな 金 ぎわ 澤 あや 文 こ 子

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 5 1 8 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 7 年 3 月 9 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

学 位 論 文 題 目 新 生 仔 期 に お け る 多 価 不 飽 和 脂 肪 酸 代 謝
の 特 徴 と ド コ サ ヘ キ サ エ ン 酸 代 謝 の 特 異
性

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 藤 本 健 四 郎
教 授 目 黒 熙
教 授 古 川 勇 次

論文内容要旨

序論

ドコサヘキサエン酸 (DHA, 22:6n-3) は、広範囲の動物の脳や網膜の膜脂質に高濃度に含まれ、長期間n-3系脂肪酸を摂取しなかった場合にはDHA濃度の減少と神経機能の異常が認められることから、その必須性が示唆されている。動物はアラキドン酸 (20:4n-6) とDHAに代表されるn-6系とn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) を合成するため、前駆体であるリノール酸 (18:2n-6)、 α -リノレン酸 (18:3n-3) を食餌から摂取する必要がある。PUFA合成能は臓器や発達期の年齢によって変化すると考えられる。本研究では、大脳皮質の発達が著しい霊長類の例として幼若期と成熟期のマカク属サル、あるいはラットを使用し、大脳皮質および脂質合成の主要器官である肝臓の脂質組成の変化を明らかにし、n-3系脂肪酸、特にDHAの代謝機構の解明を試み、適切な乳児栄養について脂質の面から考察した。

第1章 マカク属サルの大脳灰白質と肝臓の成長に伴う脂質組成の変化およびn-3系PUFA合成

第1節 マカク属サルの大脳灰白質と肝臓の成長に伴う脂質組成の変化

2種のマカク属サル、カニクイザル (*Macaca fascicularis*) とニホンザル (*Macaca fuscata fuscata*) の大脳灰白質の脂質組成を調べた結果、胎生120日からの脳の成長に伴う脂質組成と脂肪酸組成の著しい変化を認めた。3歳以上では成熟動物と同様の値を示し、大きな変動はなかった。大脳皮質では、幼若動物より3歳以上の動物でコレステロール/脂質態リン比は有意に高く、ホスファチジルコリン/ホスファチジルエタノールアミン (PC/PE) 比は有意に低かった (Table 1)。リン脂質の構成脂肪酸濃度では、22:6n-3濃度は幼若動物より成熟動物で有意に高い値を示したが、20:4n-6をはじめとするn-6系PUFAは幼若動物の方が3歳以上の動物より有意に高かった (Table 2)。肝臓では、22:6n-3濃度に変化を認めず、20:4n-4濃度は3歳以上の動物で有意に低かった (Table 3)。これらの結果は、大脳皮質の発達に伴い、22:6n-3が特異的に蓄積することを示している。

第2節 ニホンザルの乳脂DHA濃度

動物の乳汁の組成は母体の食餌内容の影響を受けるが、新生仔にとっての必須栄養素を含んでいると考えられ、特に初乳の栄養的意義は大きい。海洋動物を除く多くの動物の乳脂は比較的高濃度の20:4n-6を含むが、22:6n-3は痕跡程度認められるか、まったく検出しないかのいずれかである。ニホンザル初乳の脂質濃度、クラス組成、総脂肪酸中の22:6n-3濃度

Table 1
The lipid compositions of cerebral cortices of macaque monkeys^a

	E120-140 (n=3)	Newborn (n=5)	4-mo (n=1)	1-yr (n=1)	≥3-yr (n=7)
	(mg/g of wet tissue)				
Cholesterol	4.01 ± 0.70 ^b	5.33 ± 0.59 ^c	5.78	7.01	9.76 ± 2.44 ^d
Lipid-P	0.80 ± 0.12 ^b	1.02 ± 0.12 ^c	1.13	1.45	1.37 ± 0.32 ^c
	(wt/wt)				
C/lipid-P	5.03 ± 0.41 ^b	5.25 ± 0.18 ^b	5.10	4.83	7.12 ± 0.46 ^c
PC/PE	1.17 ± 0.10 ^b	1.11 ± 0.05 ^b	0.86	0.71	0.71 ± 0.09 ^c

^a Values are expressed as means ± SD when more than 3 animals were included.
^b, ^c and ^d Values with different superscript letters are significantly different (p<0.05).

Table 2
The fatty acid composition of phospholipids in cerebral cortices of macaque monkeys^a.

Fatty acid	E120-140 (n=3)	Newborn (n=5)	4-mo (n=1)	1-yr (n=1)	≥3-yr (n=7)
	(wt%)				
16:0	28.2 ± 1.2 ^c	27.1 ± 1.4 ^c	22.5	25.0	22.7 ± 0.7 ^d
18:0	17.7 ± 0.3 ^c	19.3 ± 0.8 ^d	22.0	22.2	21.4 ± 0.8 ^c
18:1	14.5 ± 0.4 ^c	15.4 ± 0.8 ^c	16.7	16.2	19.2 ± 1.0 ^d
20:3n-6	1.4 ± 0.1 ^c	1.2 ± 0.1 ^c	1.3	1.0	1.0 ± 0.2 ^d
20:4n-6	9.3 ± 0.3 ^c	9.2 ± 0.4 ^c	10.4	9.8	6.5 ± 0.4 ^d
20:5n-3	1.2 ± 0.1 ^c	1.1 ± 0.2 ^c	0.3	0.2	0.3 ± 0.1 ^d
22:4n-6	4.0 ± 0.2 ^c	4.8 ± 0.2 ^d	5.3	5.6	3.8 ± 0.5 ^c
22:5n-6	1.2 ± 0.1 ^c	1.1 ± 0.2 ^c	0.9	0.7	0.7 ± 0.2 ^d
22:5n-3	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5	0.4	0.4 ± 0.1
22:6n-3	10.2 ± 0.6 ^c	12.2 ± 0.9 ^c	13.9	15.0	18.8 ± 1.5 ^d
Σn-3	11.9 ± 0.6 ^c	12.2 ± 0.9 ^c	14.7	15.6	19.5 ± 1.6 ^d
Σn-6	15.8 ± 0.1 ^c	16.2 ± 0.5 ^c	18.0	17.1	11.8 ± 0.8 ^d
n-3/n-6	0.75 ± 0.04 ^c	0.75 ± 0.05 ^c	0.82	0.91	1.66 ± 0.22 ^d
UI ^b	147.3 ± 3.5 ^c	152.1 ± 6.5 ^c	175.5	177.6	182.6 ± 6.9 ^d

^a Values are expressed as means ± SD when more than 3 animals were included.
^b UI, Unsaturation index = Σ the number of double bonds × the percent of the fatty acids with that number of double bonds.
^c, ^d and ^e Values with different superscript letters are significantly different (p<0.05)

Table 3
The fatty acid composition of phospholipids in livers of macaque monkeys^a.

Fatty acid	Newborn (n=6)	≥3-yr (n=8)
	(wt%)	
16:0	23.3 ± 2.2	18.4 ± 1.5 **
18:0	19.5 ± 1.4	23.1 ± 1.8 **
18:1	7.5 ± 0.9	8.4 ± 1.0
18:2n-6	16.4 ± 3.0	24.3 ± 1.3 **
20:3n-6	2.2 ± 0.7	0.9 ± 0.2 **
20:4n-6	13.4 ± 1.3	7.9 ± 1.0 **
20:5n-3	1.0 ± 0.4	2.7 ± 0.8 **
22:4n-6	0.2 ± 0.04	0.1 ± 0.04 **
22:5n-6	0.14 ± 0.03	0.06 ± 0.03 **
22:5n-3	0.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2 **
22:6n-3	11.5 ± 1.7	10.0 ± 1.3

^a Values are expressed as means ± SD.
** p<0.01.

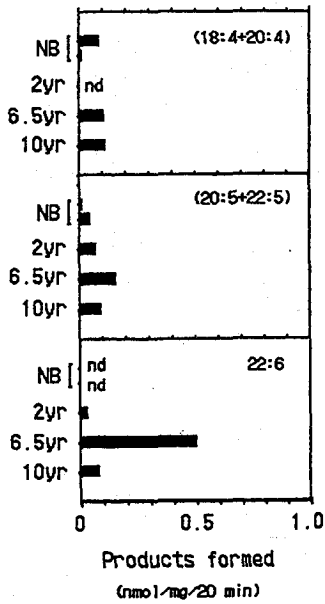


Fig. 1 PUFA synthesis from 18:3n-3 *in vitro* by cerebral cortical microsomes of Japanese monkeys.

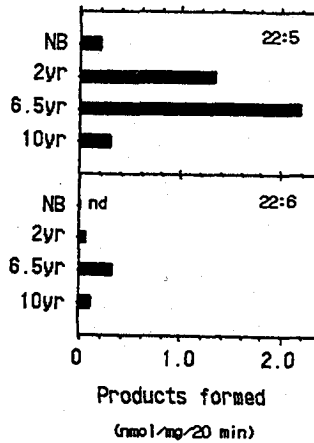


Fig. 2 PUFA synthesis from 20:5n-3 *in vitro* by cerebral cortical microsomes of Japanese monkeys.

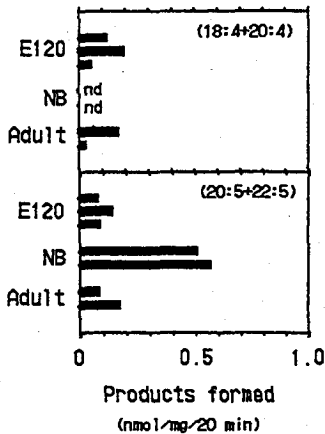


Fig. 3 PUFA synthesis from 18:3n-3 *in vitro* by liver microsomes of crab-eating monkeys.

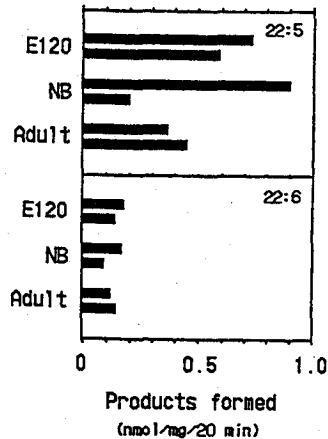


Fig. 4 PUFA synthesis from 20:5n-3 *in vitro* by liver microsomes of crab-eating monkeys.

(2.2%)は、ヒトの初乳に極めて類似しており、新生仔期のヒトPUFA代謝のモデルとしてニホンザルが適していることが示唆された。

第3節 ニホンザル大脳灰白質ミクロソーム画分によるn-3系PUFA合成

ヒト胎児は、n-3系脂肪酸を、前駆脂肪酸である18:3n-3よりはむしろ22:6n-3として母体から得ているが、乳児の場合には前駆脂肪酸を摂取するだけで充分なのかあまり明確でない。本節では、ニホンザル新生仔の大脳皮質ミクロソームでのn-3系PUFA誘導活性を成熟動物の場合と比較した。新生仔(2例)、2歳、6.5歳、10歳(各1例)のニホンザルの大脳皮質からミクロソームを調製し、[1-¹⁴C]18:3n-3または[1-¹⁴C]20:5n-3と反応させ、HPLCで分画したPUFA画分の放射活性を測定したところ、22:6n-3をはじめとするn-3系PUFA誘導活性は2~10歳の動物より新生仔で低かった(Fig. 1, 2)。

第4節 カニクイザル肝臓ミクロソーム画分によるn-3系PUFA合成

肝臓は脂質合成の重要な場であり、肝臓で合成される脂肪酸の一部分あるいは大部分が発達期の脳に供給されると考えられる。本節で、カニクイザル胎生120日(3)、新生仔(2)、成熟動物(2)の肝臓ミクロソームを[1-¹⁴C]18:3n-3または[1-¹⁴C]20:5n-3と反応させた結果、新生仔で18:3n-3からのペンタエン酸誘導が速やかであり、 Δ 5不飽和化反応の亢進が示唆されたが(Fig. 3)、20:5n-3からの22:6n-3生成に差はなかった(Fig. 4)。

小括

マカク属サルの大脳皮質リン脂質中の22:6n-3濃度は、成長に伴って増加し、3歳までに成熟動物のレベルに達していた。鎖長伸長および不飽和化によるn-3系PUFA合成能が大脳皮質では新生仔で劣ることを示した。また、肝臓では、新生仔でペンタエン酸誘導が速やかであり、 Δ 5不飽和化反応の亢進が示唆された。

第2章 発達期ラットの大脳皮質における脂質代謝の亢進

第1節 発達期ラットの脳と肝臓でのPUFA活性化

脂肪酸はアシルCoAシンターゼによって活性型となり、 β -酸化、鎖長伸長、不飽和化、アシル基転移などの各反応の基質となる。そこで、成長に伴うPUFA代謝活性の変動について調べるため、新生仔期、授乳期、離乳後の幼若ラット、成熟ラットの全脳および肝臓ホモジ

ネットのアシルCoAシンセターゼ活性を $[1-^{14}\text{C}]$ PUFAを基質として測定し、授乳期にPUFA活性化が亢進していることを認めた。

第2節 発達期ラットの大脳皮質での多価不飽和脂肪酸の活性化とCoA、ATP依存型アシルトランスフェラーゼ活性の変動

本節では、PUFAに富む大脳灰白質部分でのPUFA活性化とリン脂質再構成に関するCoA、ATP依存型アシル基転移反応について検討した。新生仔期、授乳期、離乳後の幼若ラット、成熟ラットの大脳皮質ホモジネートを使用し、 $[1-^{14}\text{C}]$ PUFAを基質とした時のアシルCoA生成量と、 $20:4n-6\text{CoA}$ とリゾリン脂質またはCoAとATP共存下で $22:6n-3$ とリゾリン脂質を基質とし、CoA、ATP依存型アシル基転移活性を測定した。アシルCoAシンセターゼ活性は、授乳期に最大となり、成熟期に著しく減少した (Table 4)。また、 $20:4n-6\text{CoA}$: リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性は新生仔で最も高く、次第に減少した (Table 5)。 $22:6n-3$ をアシル供与体とした場合も同様であった (Fig. 5)。

第3節 発達期ラットの大脳皮質でのジアシルグリセロールキナーゼ活性の変動

ジアシルグリセロールキナーゼは、ジグリセリド (DG) からホスファチジン酸を合成し、グリセロ脂質de novo合成の制御とホスファチジルイノシトール (PI) 代謝回転に関するが、コリン含有脂質の代謝、アシル基転移反応への関与も示唆されている。本節では、新生仔期、授乳期、離乳後の幼若ラット、成熟ラットの大脳皮質ホモジネートを1,2-ジオレインまたは1-ステアロイル-2-アラキドノイル-*sn*-グリセロールと $[\gamma-^{32}\text{P}]$ ATPを反応させ、ホスファチジン酸の生成量を測定した。1,2-ジオレインを基質とした場合、新生仔で最大を示し、次第に減少したが、PIから産生する分子種の代表的なものである1-ステアロイル-2-アラキドノイル-*sn*-グリセロールを基質とした場合には発達期による活性の変動を認めなかった (Table 6)。

小括

大脳皮質でのPUFA活性化の変動は全脳で見た場合より顕著であり、脳の発達期に相当する授乳期に特に活発であった大脳皮質でのPUFAの利用が、成熟期にはかなり低下していることが示唆された。また、PUFAを含むリン脂質分子種の形成に関するアシルCoA : リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性は、新生仔で最も高く、成長とともに徐々に低下し、30日齢で成熟ラットと同様の値を示した。ジオレインを基質とした時のホスファチジン酸生成においても同様の変化を認めた。ラットの大脳皮質におけるリン脂質合成系は出生前後に最も

Table 4

Activations of n-3 and n-6 fatty acids by cerebral cortical homogenates of rats during postnatal development^a.

Fatty acid	0-d	10-d	30-d	16-w	26-w
	(nmol/min/mg of protein)				
18:2n-2	3.44 ± 0.31 ^b	5.08 ± 1.08 ^c	4.21 ± 0.65 ^b	1.72 ± 0.24 ^d	1.61 ± 0.23 ^d
18:3n-6	3.16 ± 0.16 ^b	4.96 ± 0.98 ^c	3.53 ± 0.54 ^b	1.48 ± 0.23 ^d	1.40 ± 0.17 ^d
20:4n-6	3.11 ± 0.42 ^b	5.60 ± 0.78 ^c	3.16 ± 0.55 ^b	1.41 ± 0.27 ^d	1.06 ± 0.20 ^d
20:5n-3	3.73 ± 0.28 ^b	6.14 ± 1.09 ^c	4.10 ± 0.58 ^b	1.85 ± 0.34 ^d	1.44 ± 0.25 ^d
22:6n-3	2.11 ± 0.15 ^b	3.85 ± 0.74 ^c	2.46 ± 0.35 ^b	1.21 ± 0.27 ^d	1.11 ± 0.16 ^d

^a Values were represented by means ± SD of 5 litters or 5 rats.

^b, ^c and ^d Values with different superscript letters are significantly different.

Table 5

Incorporation of arachidonyl CoA into phospholipid when arachidonyl CoA and lysophosphoglyceride were incubated with cerebral cortical homogenates of rats during postnatal development^a.

Acyl acceptor	0-d	10-d	30-d	16-w	26-w
	(nmol/min/mg of protein)				
LPC(1-acyl)	2.05 ± 0.17 ^b	1.96 ± 0.21 ^b	1.64 ± 0.17 ^c	1.32 ± 0.15 ^d	1.40 ± 0.16 ^d
LPE(1-alkenyl)	0.19 ± 0.03 ^b	0.16 ± 0.02 ^b	0.15 ± 0.02 ^c	0.16 ± 0.01 ^c	0.16 ± 0.01 ^c
	(pmol/min/mg of protein)				
LPE(1-acyl)	5.57 ± 0.65 ^b	4.52 ± 0.26 ^b	3.85 ± 0.83 ^c	3.49 ± 1.14 ^c	3.48 ± 1.00 ^c

^a Values were represented by means ± SD of 5 litters or 5 rats.

^b, ^c and ^d Values with different superscript letters are significantly different.

Table 6

Phosphorylation of diacylglycerol by cerebral cortical homogenates of rats during postnatal development^a.

Diacylglycerol	0-d	10-d	30-d	16-w	26-w
	(nmol/min/mg of protein)				
1, 2-di-18:1	2.67 ± 0.34 ^b	2.34 ± 0.26 ^b	2.15 ± 0.28 ^b	1.81 ± 0.44 ^c	1.78 ± 0.21 ^c
1-18:0-2-20:4	1.62 ± 0.27	1.56 ± 0.16	1.65 ± 0.11	1.45 ± 0.44	1.39 ± 0.41

^a Values were represented by means ± SD of 5 litters or 5 rats.

^b, ^c and ^d Values with different superscript letters are significantly different.

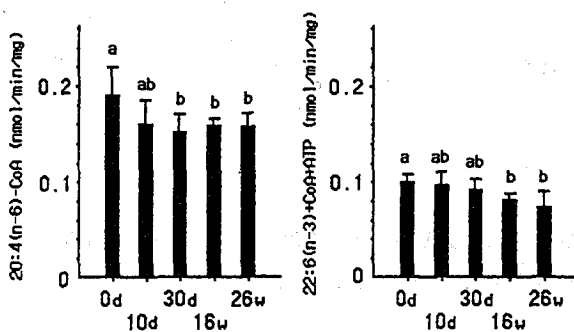


Fig. 5 Incorporations of 20:4n-6 and 22:6n-3 into 1-alkenylglycero-3-phosphoethanolamine by cerebral cortical homogenates.

The left and right panels present the result of incubation of 20:4n-6-CoA, LPE (1-alkenyl) and homogenate protein, and the result of incubation of 22:6n-3, CoA, ATP, Mg²⁺ and homogenates protein, respectively. Each bar represents mean ± SD of 5 litters or 5 rats. Bars with different superscript letters are significantly different (p < 0.05).

亢進し、脳重量の増加が落ち着く30日齢には成熟動物のレベルまで低下すると思われた。しかし、プロテinkinナーゼCの活性化に関与する1-ステアロイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロールを基質とした時のホスファチジン酸生成量には有意な変化を認めず、生理活性に関与するリン脂質代謝系の年齢による変動は小さいと思われた。以上の結果は、脳が発達する時期に長鎖PUFAが十分供給されることの重要性を示唆した。

第3章 ラット乳仔へのDHA強化栄養が肝臓および大脳皮質脂質組成に与える影響

乳仔にn-3系脂肪酸として、18:3または22:6を与えた場合、大脳皮質への22:6n-3の蓄積に差が生じるかを本節で検討した。大豆油を含む試験試料で飼育したラットを交配させて仔ラットを得、引き続き大豆油食で維持した場合と出産当日からDHAエチルエステル添加食に切り替えた場合とで肝臓と大脳皮質の脂質組成および22:6n-3濃度を比較した。仔ラットの胃から採取した乳の22:6n-3濃度は、大豆油食群では初乳で最大値を示した後に次第に減少したが、DHA食群の乳では次第に増加し、飼料の影響が示された (Table 7)。また、生後10日まで、貯蔵脂質である肝臓トリグリセリド濃度は減少し、リン脂質濃度は増加した (Table 8)。肝臓トリグリセリドとリン脂質中の22:6n-3濃度は、両食餌群とも5日齢で最大値を示し (Fig. 6)、肝臓重量および脂質含量が増加するに従い減少した。食餌群の比較ではDHA食群で高い値を示した。大脳皮質リン脂質中の22:6n-3濃度は成長に伴って増加し、両食餌群とも成熟ラットでの値が最も高く、乳仔期には大豆油食群よりDHA食群が高値を示したが、成熟ラットでの差はわずかであった (Fig. 6)。

小括

食餌性DHAの肝臓および大脳皮質脂質への影響は乳仔において最も顕著であった。肝臓への22:6n-3の蓄積は離乳後も明らかだが、成熟した大脳皮質への影響は小さいことが示された。

第4章 ラット肝臓におけるDHA代謝の特異性

第1節 乳仔肝臓でのDHA合成能

新生仔から30日齢の仔ラットの肝臓ミクロソームによる20:5n-3からの22:6n-3合成能は、生後10日から30日に対して新生仔が有意に低い値を示した (Table 9)。

第2節 食餌性n-3/n-6比の肝臓でのDHA合成への影響

n-3/n-6比の異なる油脂 (PS群、0.01; PPS群、0.39; PP群、2.70) を含む試験食で3群のラットを4週間飼育した。肝臓ミクロソーム脂質の22:6n-3濃度はPP群で最大だったが、ミクロソームによる20:5n-3からの22:6n-3合成能に食餌性n-3/n-6比の影響を認めなかった (Fig. 7)。

第3節 糖尿病ラットの肝臓および赤血球脂質におけるC20多価不飽和脂肪酸濃度の減少とDHA濃度への影響

脂肪酸不飽和化酵素はインスリン依存型であり、I型糖尿病で血中の20:4n-6濃度減少が認められるが、22:6n-3濃度への影響は明確でない。そこで、n-3/n-6比の異なる油脂

Table 7
Fatty acid compositions of rat milk fat obtained from stomach contents of pups^a.

	0-day		5-days		10-days		P value		
	soya		soya	DHA	soya	DHA	age	diet	age×diet
	(wt%)								
10:0	1.8 ± 0.7	6.7 ± 1.1	7.6 ± 1.3	4.6 ± 1.6	7.7 ± 1.8	<0.01**	<0.01**	0.03*	
12:0	0.8 ± 0.2	6.0 ± 1.2	6.4 ± 0.8	4.6 ± 1.8	6.8 ± 0.9	<0.01**	0.03*	0.04*	
14:0	1.1 ± 0.1	6.2 ± 1.3	6.3 ± 0.8	5.2 ± 0.5	7.0 ± 1.2	<0.01**	0.03*	0.03*	
16:0	20.3 ± 1.0	17.9 ± 2.0	16.9 ± 2.5	19.3 ± 2.3	16.0 ± 3.0	<0.01**	0.08	0.24	
18:0	3.6 ± 0.1	3.3 ± 0.3	2.9 ± 0.5	3.2 ± 0.4	2.7 ± 0.4	<0.01**	0.02*	0.23	
18:1	28.3 ± 0.9	21.1 ± 2.7	21.5 ± 0.9	23.4 ± 3.2	22.1 ± 1.4	<0.01**	0.67	0.57	
18:2n-6	22.9 ± 0.4	24.3 ± 1.2	22.5 ± 1.6	26.6 ± 1.6	22.3 ± 1.6	0.02*	<0.01**	<0.01**	
18:3n-3	2.0 ± 0.4	2.1 ± 0.5	1.8 ± 0.3	2.6 ± 0.5	2.0 ± 0.3	0.08	0.06	0.29	
20:3n-6	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1	<0.01**	0.92	0.91	
20:4n-6	5.5 ± 0.2	2.4 ± 0.3	2.3 ± 0.4	1.9 ± 0.4	1.5 ± 0.3	<0.01**	0.15	0.31	
20:5n-3	0.8 ± 0.05	0.5 ± 0.12	0.5 ± 0.13	0.4 ± 0.11	0.5 ± 0.30	<0.01**	0.47	0.70	
22:4n-6	1.4 ± 0.1	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	<0.01**	0.30	0.70	
22:5n-3	0.8 ± 0.01	0.5 ± 0.12	0.6 ± 0.03	0.4 ± 0.09	0.5 ± 0.09	<0.01**	<0.01**	0.11	
22:6n-3	1.2 ± 0.1	0.6 ± 0.2	2.2 ± 0.5	0.4 ± 0.1	3.0 ± 0.9	0.03*	<0.01**	<0.01**	

^a, Values are represented by means ± SD of 5 litters.

^b, Statistical significance are expressed as * (p<0.05) and ** (p<0.01).

Table 8
Lipid compositions of livers of rats during postnatal development^a.

	0-days		5-days		10-days		20-
	soya		soya	DHA	soya	DHA	soya
	(mg/g of						
Triglyceride	14.30 ± 4.22	14.25 ± 2.70	13.88 ± 2.34	6.15 ± 2.27	4.47 ± 0.62	13.91 ± 1.91	
cholesterol	2.05 ± 0.54	2.49 ± 0.38	2.21 ± 0.46	2.70 ± 0.31	2.11 ± 0.41	2.81 ± 0.16	
lipid-P	0.70 ± 0.09	0.97 ± 0.05	0.95 ± 0.13	1.18 ± 0.03	1.13 ± 0.22	1.07 ± 0.04	

^a, Values are represented by means ± SD of 5 litters or 5 rats.

^b, Statistical significance are expressed as * (p<0.05) and ** (p<0.01).

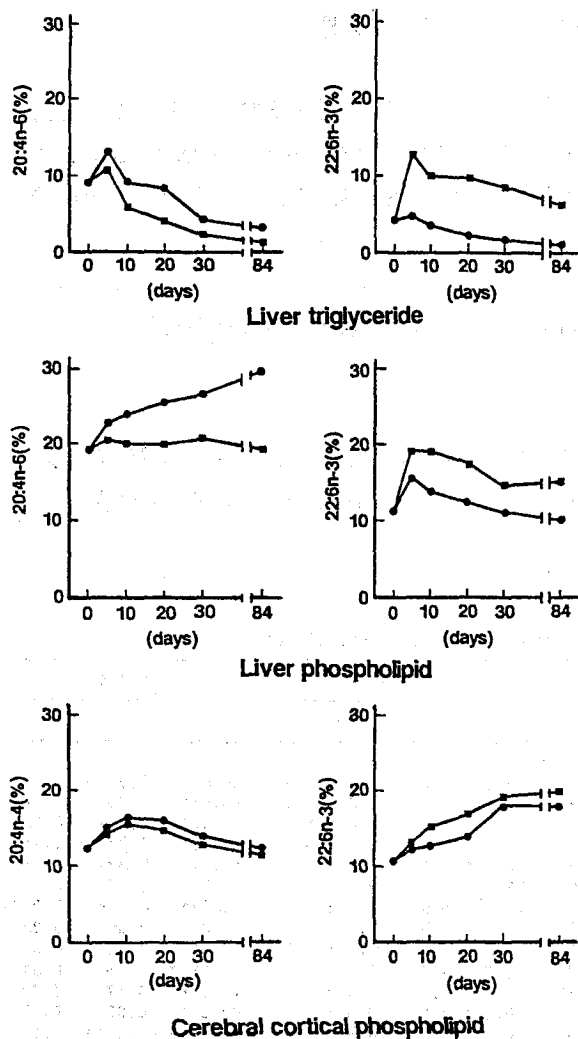


Fig. 6 20:4n-3 and 22:6n-3 levels in liver triglyceride, liver phospholipid, and cerebral cortical phospholipid of rats fed different fats during postnatal development.

The upper, middle, and lower panels in left present 20:4n-6 levels in liver triglyceride, liver phospholipid, and cerebral cortical phospholipid, respectively. The upper, middle, and lower panels in right present 22:6n-3 levels in liver triglyceride, liver phospholipid, and cerebral cortical phospholipid, respectively. Each point represent mean of 5 litters or 5 rats. ●, soya group; ■, DHA group.

days	30-days		12-weeks			P value ^a		
	DHA	soya	DHA	soya	DHA	age	diet	age×diet
wet tissue)								
	8.77 ± 1.42	11.77 ± 4.37	8.05 ± 0.93	13.37 ± 2.74	11.91 ± 1.26	<0.01**	0.02*	0.45
	2.34 ± 0.47	2.79 ± 0.20	2.17 ± 0.50	2.53 ± 0.22	2.36 ± 0.26	0.08	<0.01**	0.44
	1.14 ± 0.23	1.13 ± 0.09	1.05 ± 0.11	1.17 ± 0.02	1.12 ± 0.15	<0.01**	0.54	0.79

Table 9
Products formed from 20:5n-3 in vitro by liver microsomes of rats during postnatal development^a.

Product	0-d	5-d	10-d	20-d	30-d
22:5n-3	4.47 ± 1.71 ^{b,c}	(nmol/mg of protein/incubation) 4.22 ± 0.84 ^b	4.31 ± 1.98 ^{b,c}	4.10 ± 1.20 ^b	2.61 ± 0.06 ^c
22:6n-3	66.8 ± 11.1 ^b	(pmol/mg of protein/incubation) 92.7 ± 29.7 ^{b,c}	117.1 ± 15.4 ^c	135.7 ± 34.5 ^c	122.0 ± 37.3 ^c

^a Values are expressed as means ± SD of 5 litters.

^b and ^c Values with different superscript letters are significantly different (p<0.05).

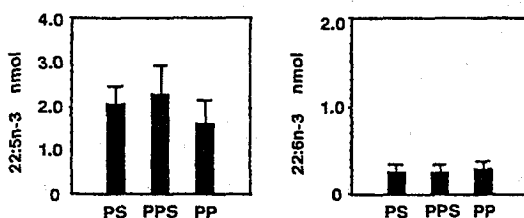


Fig. 7 The effect of dietary n-3/n-6 ratio on 22:5n-3 and 22:6n-3 formed from 20:5n-3 by rat liver microsomes.

The dietary n-3/n-6 ratios of groups are shown in Table 4-2. Each bar represents the mean ± SD of 6 rats.

Table 10
Fatty acid composition (wt%) of liver phospholipids in control and diabetic rats.

Fatty acids	SAF		PER		F value		
	Control	Diabetic	Control	Diabetic	A	B	A × B
	%	%	%	%			
16:0	18.9 ± 0.4	18.2 ± 1.3	22.6 ± 1.7	19.7 ± 1.9	10.7**	22.1**	4.1
18:0	25.8 ± 1.9	27.0 ± 2.7	25.9 ± 1.6	24.0 ± 2.1	3.8	3.5	0.2
18:1	8.6 ± 1.5	7.1 ± 2.1	9.1 ± 1.5	8.7 ± 1.4	2.3	3.1	0.8
18:2n-6	8.7 ± 1.2	12.8 ± 2.3	8.4 ± 1.1	13.4 ± 1.8	54.3**	0.1	0.5
20:4n-6	30.3 ± 1.4	26.7 ± 2.7	10.9 ± 0.9	12.1 ± 1.0	3.2	713.3**	15.0*
20:5n-3	TR	TR	10.1 ± 0.9	7.9 ± 1.6	9.6**	672.8**	9.6**
22:4n-6	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2	TR	TR	0.3	158.0**	0.3
22:5n-6	2.0 ± 0.6	2.0 ± 0.9	TR	TR	3.0	58.2**	3.0
22:5n-3	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	2.5 ± 0.5	1.9 ± 0.4	6.8*	278.8**	5.4*
22:6n-3	2.4 ± 0.5	3.2 ± 1.6	6.8 ± 1.9	5.5 ± 1.6	0.2	37.2**	3.4
20:4/18:2	3.47 ± 0.46	2.16 ± 0.58	1.31 ± 0.28	1.03 ± 0.28	24.7**	107.1**	10.3**
n-3/n-6 ^b	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.04	0.98 ± 0.06	0.61 ± 0.09	43.8**	655.6**	52.3**
UI ^c	175.3 ± 4.3	169.5 ± 9.8	176.0 ± 10.8	165.0 ± 7.4	9.6**	0.1	0.2

^a Values are means ± SD of 7 rats. F values were determined by the two-way ANOVA for the effects of diabetes (A), diet (B), and diabetes × diet (A × B) interaction. Statistical significances are expressed as * (p<0.05) and ** (p<0.01). TR, trace amount less than 0.1%.

^b Σ n-3 PUFA (20:5 + 22:5 + 22:6) / Σ n-6 PUFA (18:2 + 20:4 + 22:4 + 22:5).

^c UI, Unsaturation index was calculated by multiplying the number of double bonds by the percent composition of fatty acid and summing values.

Table 11
Activations of n-3 and n-6 fatty acids by liver homogenates of rats fed different fats^a.

Fatty acid	safflower	soya	DHA
	(nmol/min/mg of protein)		
18:2n-6	86.1 ± 13.9 ^b	100.4 ± 10.8 ^b	129.6 ± 22.0 ^c
18:3n-3	88.3 ± 11.6 ^b	106.7 ± 15.8 ^c	134.1 ± 20.9 ^c
20:4n-6	48.5 ± 6.1 ^b	64.6 ± 7.4 ^c	74.9 ± 13.5 ^c
20:5n-3	44.8 ± 4.3 ^b	57.7 ± 3.7 ^c	69.7 ± 10.4 ^d
22:6n-3	16.6 ± 4.7	19.9 ± 3.5	17.7 ± 2.2

^a Values are expressed as means ± SD of 6 rats.

^b, ^c and ^d Values with different superscript letters are significantly different (p<0.05).

(SAF群、0.01; PER群、2.92)を含む試験試料を健常な対照ラットとストレプトゾトシン誘発性糖尿病ラットに4週間与え、肝臓リン脂質と赤血球脂質のPUFA濃度を比較した。SAF群では、従来の知見通り肝臓リン脂質の20:4n-6の減少を認めたが、PER群では20:4n-6濃度は変化せず、20:5n-3濃度の減少を認めた (table 10)。両食餌群で、対照と糖尿病ラットの肝臓リン脂質22:6n-3濃度に有意な変化を認めなかった。赤血球脂質の22:6n-3濃度変化もわずかだった。

第4節 食餌性DHAによるC18およびC20多価不飽和脂肪酸活性化の亢進とDHA活性化への影響

食餌の内容により肝臓脂質中の22:6n-3濃度は増加するが、その増加には限度がある。そこで、過剰に摂取された22:6n-3がどのように代謝されるかを考察するために、本節では活性化に与える影響を調べた。サフラワー油、大豆油、DHAエチルエステル添加油を含む試験食で12週齢まで飼育したラットの肝臓ホモジネートを使用し、放射標識されたPUFAを基質とした時のアシルCoAの生成量を測定した。C18、C20PUFAの活性化はDHA食群で亢進したが、22:6n-3の場合は変化しなかった (table 11)。

小括

ラット肝臓での20:5n-3からの22:6n-3誘導活性が、新生仔期から離乳後の幼若期にかけて徐々に増加することを認めた。肝臓ミクロソームの22:6n-3濃度が最大に達した状態においても、22:6n-3合成の抑制は認められなかった。脂肪酸の鎖長伸長と不飽和化はインスリン依存型反応であるが、糖尿病ラットの肝臓での22:6n-3濃度の減少を認めなかった。また、

DHAエチルエステルの摂取によってC18およびC20PUFAの活性化亢進が誘導されたが、22:6n-3CoA生成には変化がなく、22:6n-3の β -酸化は亢進しないのか、グリセロ脂質合成の場への供給が抑制されている可能性が示唆された。

総括

マカク属サル新生仔の脳皮質でのPUFA合成能は低く、肝臓では $\Delta 5$ 不飽和化反応が亢進していることを認めた。また、CoA、ATP依存型アシルトランスフェラーゼおよびジオレインを基質とした時のジアシルグリセロールキナーゼ活性が新生仔期に高く、次第に減少することから、ラットの脳皮質でのリン脂質合成系が最も活発なのは乳仔期の前半であると考えられた。アシルCoAシンターゼ活性の変動から、脳皮質におけるPUFA利用が乳仔、幼仔期に活発であると思われた。また、脳皮質の脂肪酸組成改変という意味では、DHAの積極的摂取は乳仔期の始めには効果的であったが、生後30日以後は大豆油食群との差が小さく、離乳以後も継続的に摂取する意味は小さいと思われた。肝臓でのDHA合成および活性化が食餌性脂質の影響を受けにくいこと、インスリン欠乏状態である糖尿病ラットの肝臓のDHAが他のPUFAより減少しにくいことから、DHAを保持する何らかの機構が存在すると考えられる。従って、膜脂質のDHAを維持するという狭い意味では、成熟動物の場合には、特にn-3系長鎖PUFAを積極的に摂取する必要は少ないと言える。

論文審査の要旨

n-3系多価不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸は、高等動物では脳神経系の膜に高濃度に局在しており、その濃度は極めて効率よく恒常性が保たれているが、極度のn-3系脂肪酸欠乏の際には神経機能の異常が観察され、これらの組織の機能維持に必須な成分と考えられている。ドコサヘキサエン酸は、同じn-3系の α -リノレン酸から生体内で誘導されるが、この活性は、発達や老化などとともに変化することが示唆されているが詳細は不明である。本研究は、脳の発達期に当たることから、ドコサヘキサエン酸の要求性がとくに高い新生仔期における多価不飽和脂肪酸代謝について検討したものである。

第1章においては、*Macaca* 属サルルの発達に伴う大脳皮質および肝臓の脂肪酸組成と多価不飽和酸生合成活性の変動を調べ、胎仔および新生仔ではアラキドン酸(20:4n-6)含量が高く、脳の発達に伴ってドコサヘキサエン酸が増加することを認めた。また、脳における長鎖多価不飽和脂肪酸誘導活性は新生仔では成長した個体より著しく低く、一方、母乳にこれら長鎖不飽和脂肪酸が含まれ、母親から供給されていることを明らかにした。

第2章においては、発達期ラットの大脳皮質における多価不飽和脂肪酸代謝に関連する酵素活性から評価し、とくに新生仔においてはリン脂質合成系の代謝が亢進していることを見出した。このことは、新生仔に十分な長鎖多価不飽和脂肪酸を供給することの重要性を示唆している。

第3章においては、ラットを用いて食餌性ドコサヘキサエン酸が大脳皮質および肝臓のドコサヘキサエン酸濃度の与える影響を検討し、授乳期に与えたドコサヘキサエン酸は脳への蓄積を促進するが、成熟した動物ではリノレン酸投与と変わらないことを明らかにした。

第4章においては、ラットを用いてドコサヘキサエン酸と他の多価不飽和脂肪酸代謝を比較し、ドコサヘキサエン酸代謝は食餌脂肪酸、インスリンレベルなどの因子の影響を受けにくいことを認めた。

このように、本研究は発達に伴うドコサヘキサエン酸代謝の変化を検討し、脳の発達期に当たる乳仔期における栄養成分としてのドコサヘキサエン酸の意義を明らかにしたもので、乳児期における脂肪酸栄養について大きな示唆をあたえるものとして、著者は博士(農学)の学位を授与されるに十分な資格があると判定した。