

<総説>

アラキドン酸補給の安全性に関する研究 — アラキドン酸長期投与が脳機能に及ぼす影響 —

守口 徹¹⁾、橋本 道男²⁾

1) 麻布大学 生命・環境科学部 食品生命科学科 食品栄養学研究室

2) 島根大学 医学部 生理学講座 環境生理学

1) 〒252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71、Phone & Fax: 042-850-2499

e-mail: moriguchi@azabu-u.ac.jp; 2) 〒693-8501 島根県出雲市塩冶町 89-1

キーワード: アラキドン酸、慢性投与、脳機能、げっ歯類

Effects of chronic supplementation of arachidonic acid on the brain function in rodents

Toru Moriguchi¹⁾, Michio Hashimoto²⁾

1) Laboratory of Food and Nutritional Science, Department of Food and Life Science, School of Life and Environmental Science, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Chuo, Sagamihara, Kanagawa 252-5201, Japan.

2) Department of Environmental Physiology, Shimane University Faculty of Medicine Enyacho 89-1, Izumo, Shimane 693-8501, Japan.

Summary

Arachidonic acid (20:4n-6, ARA), which is one of the n-6 essential fatty acids, has been accumulated about 10% of the total fatty acids in a rodent brain. We investigated the effects in the brain function after chronic supplementation of ARA. The chronic supplementation of ARA increased motor activity, and reduced the total time which is the time until taking the diet, in the radial maze test as the spatial cognitive function test, although ARA did not indicate severe toxicity. A decrease in brain function was also observed in the rota-rod test as the motor coordination test. In the fatty acid composition of brain, we detected the increase of the total n-6 fatty acids and the decrease of DHA as the n-3 fatty acid in the ARA supplementation group, but there were no differences in saturated and

monounsaturated fatty acids. This change of the n-3 Def group was more remarkable than that of the n-3 Adq group. Therefore, the chronic supplementation of ARA should be careful because there is a risk of deterioration of brain function based on the enhancement in n-3 fatty acids deficiency.

Key words : Arachidonic acid, Chronic supplementation, Brain function, Rodents.

1. はじめに

脳内の代表的な n-6 系脂肪酸のひとつであるアラキドン酸 (22:4n-6、ARA) は、総脂肪酸の約 10%を占めている。ARA は、シクロオキシゲナーゼや 5-リポキシゲナーゼなどの酵素を介してプロスタグランジン E2、トロンボキサン A2 やロイコトリエン B4、C4 などに代謝される。これらの生理活性物質が適量であれば正常な脳機能を営む上で重要な役割を果たしていることがよく知られている。しかし、長期的に補給された ARA による脳機能への影響については、ほとんど報告されていない。そこで、今回は、ラット、マウスに ARA を長期経口摂取させた後の、脳機能への影響の検証結果を紹介し、ARA 長期補給の影響を考えてみたい。

2. アラキドン酸長期投与後の行動学的評価 (老齢ラット・マウス)

実験には、すべて中国 (CABIO 社) から入手したアラキドン酸 (ARA) 油を用いた。

ARA 油の投与量は、240 mg/kg/day とし、対照群には、通常、日本人が食事で摂取する油脂の比率を、豚脂、大豆油、ナタネ油で調整した混合油 (豚脂 : 大豆油 : ナタネ油 = 2 : 1 : 1) を ARA 群と脂肪酸量が等量になるよう投与した (Table 1)。

ラットの検討では、魚粉抜き固形飼料で飼育・継代した老齢 21 ヶ月齢 Wistar 系雄ラットに ARA 油もしくは対照油を 13 週間経口投与した。脳の認知機能として空間認知機能の評価法のひとつである 8 走路放射状迷路法を用いた。各試料の投与開始 6 週間後から給餌制限 (平均体重の 77.4%) を行い、2 週間の馴化期間後に 8 走路放射状迷路装置のうちの 4 走路に報酬餌を置き、餌獲得まで最大 10 分間 (6 trials/block) の行動を観察した。評価項目としては、摂取所要時間 (Total Time)、参照記憶エラー (Reference

Table 1 Fatty acid composition of evaluated oils (% of total fatty acids)

Fatty acids	Control oil	ARA oil
Total sat.	26.47 ± 0.04	26.89 ± 0.003
Total mono.	44.79 ± 0.08	6.46 ± 0.01
18:2n-6	22.26 ± 0.03	9.38 ± 0.01
18:3n-6	0.03 ± 0.01	2.40 ± 0.004
20:2n-6	0.20 ± 0.01	0.47 ± 0.002
20:3n-6	ND	3.85 ± 0.01
20:4n-6	0.05 ± 0.002	45.11 ± 0.04
Total n-6 FA	22.54 ± 0.01	61.53 ± 0.05
18:3n-3	3.84 ± 0.01	0.06 ± 0.003
20:5n-3	0.10 ± 0.001	0.52 ± 0.002
Total n-3 FA	3.94 ± 0.01	0.58 ± 0.004
ARA conc. (mg/100 µl)	0.043 ± 0.002	37.5 ± 0.2
Fatty acid conc. (mg/100 µl)	82.6 ± 0.2	83.2 ± 0.4

(Mean ± SEM, ND: not detected)

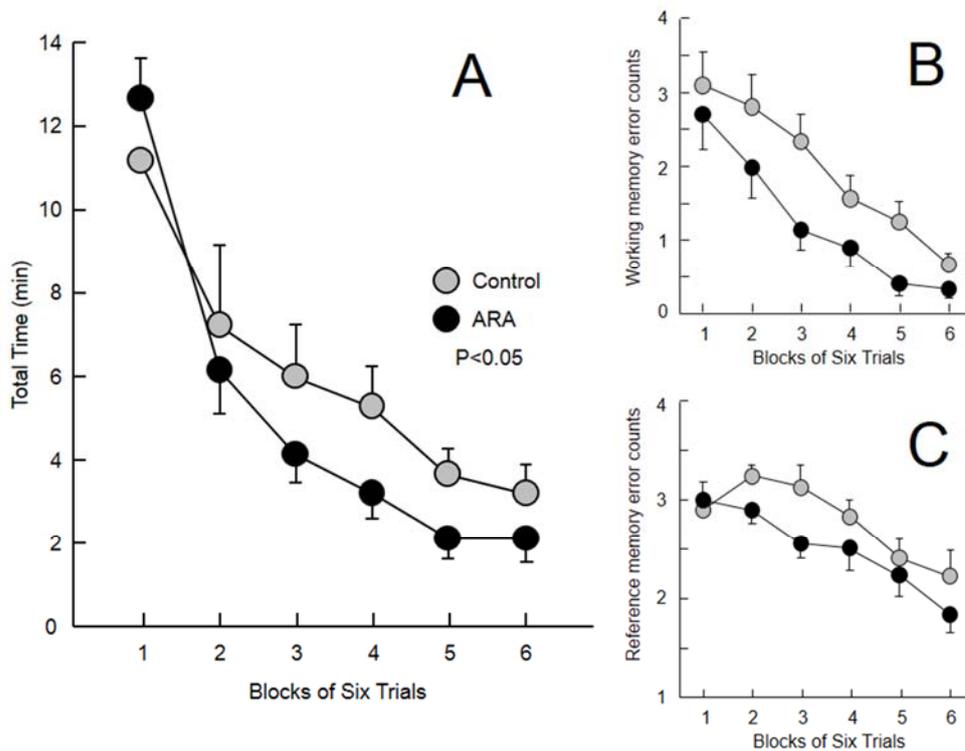


Fig. 1. Influence of the chronic supplementation of ARA oil on radial maze test in aged rats. Three panels show the total time (A), the working memory error counts (B) and the reference memory error counts (C), respectively. Each value represents as mean \pm SEM.

Memory Error) ならびに作業記憶エラー (Working Memory Error) があり、参照記憶エラーは長期記憶の、作業記憶エラーは短期記憶の指標として評価した。その結果、給餌制限による体重変化では群間に差はなかったものの、ARA 投与群では対照群に比べて摂取所要時間が有意に低値を示した (Fig.1A, $p < 0.05$)。しかし、参照記憶 (Fig.1B) と作業記憶 (Fig.1C) には共に両群間に有意差は認められなかった (Fig. 1)。一方、マウスを用いた検討では、AIN93G を基礎飼料として、脂質をココナツ硬化油と紅花油で調整した n-3 系脂肪酸欠乏 (n-3 Def) 飼料、さらに亜麻仁油を加えた n-3 系脂肪酸正常 (n-3 Adq) 飼料で飼育・繁殖した老齢 (52 週齢) を用い、ARA 油と対照油を前述と同量で毎日経口投与し、13 週間後に自発運動量と運動協調性を評価した。自発運動量は、ワイヤレスホイールの 30 分間の回転数を記録した。運動協調性試験には、ロータロッド (回転踏み車) 試験装置を用い、定速度の歩行練習を行なった翌日、4 rpm から 40 rpm まで加速する条件でロータから落下するまでの時間を測定した。老齢マウスでは、13 週間の ARA 油投与による体重の変化は観察されなかった。しかし、自発運動量において、n-3 Def、n-3 Adq 共に ARA 長

期投与の影響と思われる増加が観察された (Fig. 2A)。運動協調性試験では、n-3 Def-ARA 群のみに顕著な落下時間の短縮 ($P<0.01$) を示したが、n-3 Adq-ARA 群ではそのような変化が観察されなかった (Fig. 2B)。

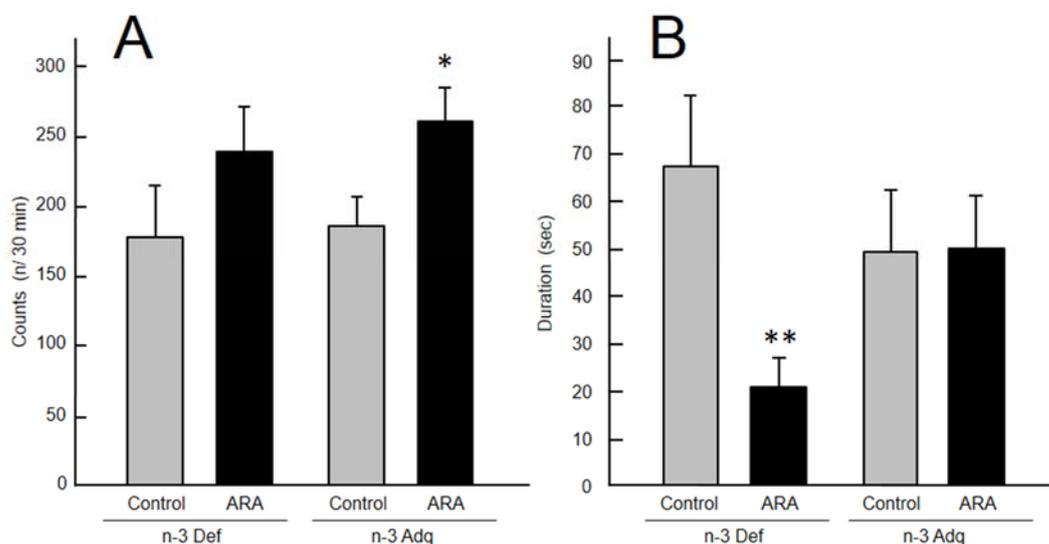


Fig. 2. Influence of the chronic supplementation of ARA oil on the motor activity and rota-rod test in the n-3 deficient (B) and the n-3 adequate (A) mice. Each value represents as mean \pm SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Control in each diet group.

老齢ラットの 8 走路放射状迷路試験では、ARA の長期投与により、報酬餌を摂取するために要する時間 (摂取所要時間) は有意に低下しており、脳機能の改善効果としての結果が得られているように見られる。しかし、n-3 Def ならびに n-3 Adq 飼料で飼育した老齢マウスの自発運動量試験で得られた結果では、共に ARA 投与により自発運動量の顕著な上昇とその傾向が認められている。さらに老齢マウスでは、ARA 投与により運動協調性試験においても歩行時間の有意な短縮もしくはその傾向が認められたことから、ARA の長期補給は、運動量の上昇効果は有するものの、運動機能を司る小脳機能 (運動記憶) を低下させる何らかの影響を与えていることが考えられた。これらのことは、老齢ラットの放射状迷路試験で観察された結果が ARA 投与による脳機能改善効果ではなく、自発運動量の上昇による見かけ上の効果である可能性が考えられた。

3. アラキドン酸長期投与後の脳内脂肪酸組成変化 (老齢ラット・マウス)

老齢マウス、ラット共に行動試験終了後、血液と脳組織の脂肪酸組成を測定した。紙面の関係上、血漿中の脂肪酸組成の変化は文章に留めるが、老齢マウスにおいて、対照群では、

飽和脂肪酸には著しい変化はなかったが、対照油中に特に多く含まれている一価不飽和脂肪酸のオレイン酸 (18:1n-9) の含有量が上昇していた。一方、ARA 群では、ARA とそれよりも長鎖の n-6 系脂肪酸のアドレン酸 (22:4n-6)、ドコサペンタエン酸 (22:5n-6、DPA n-6) が有意に上昇し、n-3 系脂肪酸のドコサヘキサエン酸 (22:6n-3、DHA) の有意な低下が観察されている。脳組織においては、飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸の著しい増減は観察されなかったが、多価不飽和脂肪酸の変化では、炭素数 20 までの n-6 系脂肪酸であるリノール酸 (18:2n-6) やジホモ- γ -リノレン酸 (20:3n-6) の有意な減少、ARA とそれよりも長鎖の n-6 系脂肪酸のアドレン酸 (22:4n-6)、DPA n-6 が顕著に上昇していた。また、血液と同様に DHA の有意な減少も確認された (Table 2)。老齢ラットの脳内脂肪酸変化もマウスの変化と大同小異で

あった。血漿中の脂肪酸組成では、投与液の脂肪酸組成に影響を受け、対照群では、飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸が上昇し、ARA 投与群では、ARA よりも炭素鎖の長い n-6 系脂肪酸が増加することは当然であるが、ARA 投与により、ARA までの n-6 系脂肪酸と n-3 系脂肪酸が有意に減少した

ことは特記すべき点である。これらの脂肪酸の増減は、n-3 Def マウスの方が n-3 Adq マウスよりも著しく、これに伴って、n-6/n-3 や ARA/DHA 比も有意に上昇している (Table 2)。n-6/n-3 と ARA/DHA 比の上昇は、n-3 系脂肪酸の欠乏状態を示唆するものであるが、これまで、n-3 系脂肪酸欠乏動物は、自発運動量の上昇¹⁾と共に空間認識能力の低下¹⁻⁴⁾、不安レベルの上昇^{5, 6)}等を呈することが報告されている。これらを考慮すると今回観察された ARA の長期投与による自発運動量の上昇は、脳内 ARA を中心とした n-6 系脂肪酸の上昇に加え、DHA の低下によって、n-3 系脂肪酸欠乏状態が亢進して生じたものと考えられた。

Table 2 Fatty acid composition of brain after chronic supplementation of ARA oil (% of total fatty acids)

Fatty acids	n-3 Def		n-3 Adq	
	Control (n=10)	ARA (n=12)	Control (n=10)	ARA (n=11)
Total sat.	42.27 ± 0.07	42.58 ± 0.10	42.22 ± 0.10	42.31 ± 0.10
Total mono.	27.18 ± 0.13	26.48 ± 0.17	27.45 ± 0.13	26.92 ± 0.16
18:2n6	0.30 ± 0.01	0.24 ± 0.01**	0.37 ± 0.02**	0.27 ± 0.01**
20:2n6	0.08 ± 0.002	0.07 ± 0.002**	0.09 ± 0.004	0.07 ± 0.002**
20:3n6	0.26 ± 0.02	0.17 ± 0.01**	0.35 ± 0.03*	0.20 ± 0.01**
20:4n6	7.96 ± 0.04	8.34 ± 0.07**	7.43 ± 0.06**	7.96 ± 0.06**
22:4n6	3.02 ± 0.03	3.45 ± 0.03**	2.47 ± 0.03**	2.82 ± 0.04**
22:5n6	2.82 ± 0.14	4.20 ± 0.14**	0.29 ± 0.02**	0.55 ± 0.02**
Total n-6 FA	14.53 ± 0.16	16.53 ± 0.13**	11.08 ± 0.08**	11.97 ± 0.08**
22:5n3	0.06 ± 0.004	0.06 ± 0.003	0.14 ± 0.004**	0.12 ± 0.003**
22:6n3	10.13 ± 0.15	8.51 ± 0.12**	13.39 ± 0.05**	13.01 ± 0.08**
Total n-3 FA	10.18 ± 0.15	8.57 ± 0.13**	13.53 ± 0.05**	13.13 ± 0.08
n-6/n-3	1.43 ± 0.04	1.93 ± 0.03**	0.82 ± 0.01**	0.91 ± 0.01**
ARA/DHA	0.79 ± 0.01	0.98 ± 0.01**	0.56 ± 0.004**	0.61 ± 0.004**
Total FA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	44.91 ± 1.31	43.03 ± 0.28	42.51 ± 0.45	42.80 ± 0.47

*P<0.05, **P<0.01 vs Control in same diet group, *P<0.05, **P<0.01 vs n-3 Def in same oil group (Mean ± SEM)

4. アラキドン酸長期投与後の血液生化学的評価と骨格筋の過酸化脂質量（老齢ラット）

ラットの実験において行動試験終了後、血液生化学一般検査を行った。結果には示さないが ARA 投与により、総コレステロールの増加傾向が観察され、また、HDL、LDL コレステロールの有意な増加が認められている ($P < 0.05$)。しかし、その他の測定項目である AST、ALT、 γ -GTP、アルブミン、中性脂肪、血液尿素窒素、クレアチニン、ならびに空腹時血糖については、ARA 投与の影響は観察されなかった。ARA 長期投与によるラット、マウスの体重変化に差異の無かったことや、老齢ラットの血液の血液生化学的評価結果から、ARA には、重篤な毒性などは認められていない。

一方、実験終了後に採取した下腿骨格筋を筆者らの方法⁷⁾により測定し、得られた過酸化脂質量 (LPO) と

活性酸素種 (ROS)

では、速筋の ROS

が増加し、遅筋 LPO

の上昇が認められ

た (Table 3)。自発

運動量などの上昇

は、酸化ストレスが

増大することから、

この下腿骨格筋の酸化ストレスの増大は、老齢マウスで観察された ARA 投与に起因したものであるかもしれない。

Table 3 Lipid peroxide and reactive oxygen species of skeletal muscle in aged rats after chronic supplementation of ARA oil

	Slow twitch muscle		Fast twitch muscle	
	Control (n=6)	ARA (n=6)	Control (n=6)	ARA (n=6)
LPO (nmol/mg protein)	1.37 ± 0.21	2.83 ± 0.57**	3.44 ± 0.84	3.99 ± 0.19
ROS (nmol/min·mg protein)	3.88 ± 0.49	4.52 ± 1.52	2.84 ± 0.71	5.86 ± 0.68**

* $P < 0.10$, ** $P < 0.05$ vs Control (Mean ± SEM)

5. アラキドン酸投与による自発運動量の変化（成熟マウス）

前述した老齢マウスの試験と同様に、n-3 Def 飼料と n-3 Adq 飼料で飼育・繁殖した成熟マウス（16 週齢）を用いて ARA 油と対照油を経口投与した。投与開始から経日的に 1 週間、以降、経週的に 6 週間目まで自発運動量を測定した。n-3 Def マウスにおいて、対照群の自発運動量は、投与開始から 1 週間目までは、ARA 群よりもやや高値を示したが、その後、測定の日齢による自発運動量の低下が観察された。ARA 群では、日齢による低下は観察されず、引き続き緩やかに上昇し続け、投与 3 週間以降では有意な上昇を示した

(Fig. 3)。一方、n-3 Adq マウスでは、投与期間を通じて ARA 投与による自発運動量の影響は認められなかった。このことは、ARA 投与による自発運動の上昇は、比較的早期に発現することを示している。

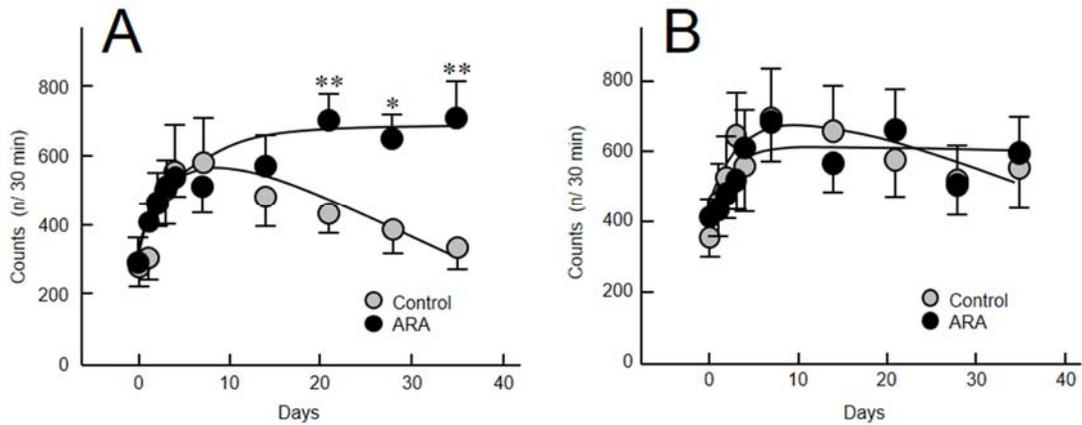


Fig. 3. The change of time course of the chronic supplementation ARA oil on motor activity in the n-3 deficient (A) and the n-3 adequate (B) mice. Each value represents as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control in n-3 Def group.

6. おわりに

今回、ラット、マウスを用いて、長期的に補給された外因性 ARA による脳機能への影響について検討した結果を紹介した。ARA 油の長期間の投与は、脳内の ARA を含む n-6 系脂肪酸量の上昇のみならず、DHA の減少を引き起こし、n-3 系脂肪酸欠乏状態を亢進させて、自発運動量を顕著に上昇させ、行動試験結果に影響を与えたと考えられた。また、n-3 系脂肪酸欠乏状態の亢進は、脳機能の低下をもたらすことから注意する必要があると考えられた。今後、脳機能への影響を詳細に検証するためにも、神経細胞膜に増加した ARA 由来の各種エイコサノイドと神経細胞の可塑性などに対する作用の検討が待たれるところである。

7. 謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金、食品の安全確保推進研究事業のアラキドン酸補給の安全性に関する研究(H22-食品-一般-002)の支援を受けて行ったものである。

8. 参考文献

1. Moriguchi T., Greiner R.S., Salem N. Jr. Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J. Neurochem.* 75: 2563-2573, 2000.
2. Gamoh S., Hashimoto M., Hossain S., Masumura S. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28: 266-270, 2001.

3. Moriguchi T. and Salem N. Jr. Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance. *J. Neurochem.* 87: 297-309, 2003.
4. Gamoh S., Hashimoto M., Sugioka K., Shahdat Hossain M., Hata N., Misawa Y., Masumura S. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience.* 93: 237-241, 1999.
5. Fedorova I. and Salem N. Jr. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 75, 271-289, 2006.
6. Harauma A. and Moriguchi T. Dietary n-3 fatty acid deficiency in mice enhances anxiety induced by chronic mild stress. *Lipids.* 46, 409-416, 2011.
7. Hashimoto M., Hossain S., Shimada T., Sugioka K., Yamasaki H., Fujii Y., Ishibashi Y., Oka J-I. and Shido O. Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J Neurochem.* 81: 1084-1091, 2002.