

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究

所 属 独立行政法人国立健康・栄養研究所
食品機能研究部
研究者 斎藤 衛郎

分担研究者

- (1) 独立行政法人国立健康・栄養研究所 食品機能研究部 永田純一
(2) 日清製油(株)研究所 笠井通雄

要 旨

肥満・体脂肪蓄積に抑制的に働く新規構造油脂の開発を行なうため、n-3系脂肪酸の脂肪蓄積に関するスクリーニングを行い、EPAとDHAの有効性を確認した。現在脂肪酸の位置を特定した構造油脂を合成しており、純度70%でDHA-C8-C8とEPA-C8-C8の合成が終了した。

1. 研究目的

肥満は、その他の生活習慣病である心疾患・高血圧・糖尿病の誘発因子となり、生活習慣病の中でも鍵となる疾病である。従って、その予防および改善は、QOLの向上のために非常に重要である。肥満の形成は、日常の食習慣に大きく影響を受けるため、食事内容、特に摂取される脂質の質と量あるいは摂取バランスの不適切さが主要な病因となりうることでこれまでの研究で明らかになっている。

本研究の主な目的は、脂質摂取のバランスを考慮した肥満予防および改善効果を有する生理機能を持つ高度不飽和脂肪酸の効率的な供給と構造特異性を生かした体脂肪蓄積抑制に優れた新規油脂の開発およびその生理的有効性の評価である。これまで肥満と食用油脂の関連性に関する多くの報告がなされているが、効率的な吸収と代謝性に優れた油脂は、必ずしも見いだされていない。そこで今回エステル交換技術を用いて位置特異性と吸収代謝特性を考慮した新規構造油脂をデザインし、体脂肪蓄積および肥満に対し抑制的に働く構造油脂の創出を試みた。これらの油脂は、生活習慣病のリスクファクターとなりうる脂質を効率よく利用することにより肥満の抑制を介して生活習慣病の改善をもたらすことが期待される。

本年度の研究は、肥満・体脂肪蓄積に対し予防および改善効果を有する新規構造油脂の開発および評価を行なうため、n-3系脂肪酸（ α -リノレン酸（ α -LN）、エイコサペンタエン酸（EPA）およびドコサヘキサエン酸（DHA））に焦点を当て、これら脂肪酸の抗肥満作用あるいは体脂肪蓄積抑制効果と脂質レベルに及ぼす影響を調べた。実験はn-6系脂肪酸（リノール酸（LA））を対照に *in vivo* および *in vitro* における各脂肪酸の影響の評価検討を行い、新規構造油脂合成に用いる脂肪酸をスクリーニングし、新規構造油脂のデザインおよび合成を試みた。

2. 研究方法

In vivo の実験は、4週令の雄SD系ラットに各脂肪酸をエネルギー比約8%レベルで含むAIN-76に基づいて作成された飼料を約1ヶ月間自由摂食させ、体脂肪蓄積および摂取した脂肪酸の影響を調べた。実験期間終了後は、一夜絶食を行い、心採血によって犠死せしめ、分析に必要な血液、肝臓および睾丸周辺脂肪組織を採取した。血清総コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセリドおよびリン脂質濃度を市販酵素試薬にて測定を行った。また摘出した各臓器の脂質画分をクロロホルム-メタノール混液により抽出を行い、それぞれの臓器に取り込まれる脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにて分析した。

In vitro の実験は、8週齢の雄 Wistar 系ラット副辜丸脂肪組織より調製した脂肪前駆細胞を用いて脂肪蓄積に及ぼす各脂肪酸の影響を調べた。採取した脂肪組織はコラゲナーゼを含む Krebs-Ringer 液で処理し、脂肪前駆細胞を調製した。前駆細胞はアスコルビン酸を含む DMEM 培地で培養し、その後 100 μ M の各脂肪酸および成長因子を含む培地で 48 時間インキュベーションした。さらに 1 週間インスリンを含む DMEM 培地で培養を行った。細胞内 TG 濃度は、細胞を破碎し、市販酵素試薬を用いて測定した。蓄積された脂質は Folch らの方法により抽出し脂肪酸組成を GLC により分析した。また、培地中のアディポサイトカイン（レプチン、IL-6 および TNF- α ）量は市販 ELISA kit を用いて測定した。

新規構造油脂は、EPA および DHA を 1, 3-位特異的リパーゼによってトリカプリルグリセリドに酵素転換を行い、中鎖脂肪酸と EPA および DHA をトリグリセリド構造内に含む新規構造油脂の合成を試みた。合成目標油脂は、① DHA-C8-C8、② C8-DHA-C8、③ EPA-C8-C8 および④ C8-EPA-C8 の 4 種類とした。酵素転換後、未反応の脂肪酸およびトリカプリルトリグリセリドを除去し、溶剤を分別後、溶剤留去およびろ過を行い目的構造油脂の回収を行なった。

3. 研究成果

In vivo の実験では、体重増加量に食餌の影響は認められなかった。肝臓重量は DHA 摂取群で、副辜丸脂肪組織および腎周囲の脂肪組織重量は EPA, DHA および等量混合群で有意に低い値 ($p < 0.05$) を示した。血清脂質濃度は、LA $>$ α -LN $>$ EPA \geq 等量混合 $>$ DHA の順に低下する傾向が確認され、EPA、等量混合および DHA 群は他の群と比較して有意な低下を示すものもあった。また、血清、肝臓、副辜丸および腎周囲の脂肪酸組成は食餌に含まれる脂肪酸組成を反映したものであった。

In vitro における研究では、細胞内への経時的な TG の蓄積は、 α -LN 群が顕著な蓄積傾向を示した。一方、DHA 群ではほとんど細胞内蓄積を示さなかった。n-3 系脂肪酸では α -LN $>$ EPA $>$ DHA の順で蓄積量が低下した。培地中へのレプチン産生量は LA $>$ α -LN $>$ EPA $>$ DHA の順で低下した。n-3 系脂肪酸群はいずれも低値を示したが、有意な差を認めなかった。IL-6 産生量はレプチンと同様の傾向を示したが、EPA および DHA 群で有意に低い値を示した。

新規構造油脂の合成は、これまでに① DHA-C8-C8 および③ EPA-C8-C8 の構造油脂 2 種類の合成を完了した。① DHA-C8-DHA タイプの構造油脂合成は、エステル交換反応により約 70% 合成された。またこれらの構造油脂の 2 位には約 90% の C8 が位置するトリグリセリドであることが確認されたが、DHA-C8-C8 タイプも約 12% 含まれていた。③ EPA-C8-C8 の構造油脂も①タイプと同様約 70% の合成率であった。この構造油脂の 2 位には約 97% の C8 が位置するトリグリセリドであることが確認されたが、EPA-C8-EPA タイプの構造油脂の比率が 23% を占めた。

4. 考 察

In vivo の実験より、各 n-3 系脂肪酸の相対的な生理活性の比較および評価から EPA および DHA 前駆体としての α -LN の供給は、脂質代謝改善および脂肪蓄積抑制に関して効果が弱いこと、また鎖長の伸長に伴いより効果的に脂質代謝の改善と脂肪蓄積抑制に作用することが明らかとなった。従って体脂肪蓄積抑制的に作用させるには α -LN を有する構造より EPA あるいは DHA を任意の位置に配した構造がより効果的な生理作用を発揮すると予測される。

In vitro における実験からも各 n-3 系脂肪酸の添加に伴う細胞内脂肪蓄積とアディポサイトカインの産生を観察したが、細胞内脂質蓄積には DHA が抑制的に作用することを観察した。また、アディポサイトカインの産生にも EPA および DHA は効果的に作用し、抗肥満に強く作用する可能性が示唆された。

これらの実験結果から、脂質代謝改善および脂肪蓄積抑制効果が期待される EPA と DHA の 2 種類の脂肪酸と中鎖脂肪酸を組合せた新規構造油脂をデザインした。中鎖脂肪酸は、長鎖脂肪酸と異なる吸収および代謝を受け、ケトン体として抹消組織のエネルギー源として利用されることから、EPA あるいは DHA と競合的に作用するのではなく、異なる作用機序が生体内で成り立つと考えられる。したがって中鎖脂肪酸は、EPA および DHA の効果にネガティブに作用する脂肪酸とは考えにくく、合成面からの利点も多いためこれらの脂肪酸を組合せた構造油脂が合成されること

となった。

これまでのところ脂肪酸スクリーニングの結果より、グリセロール骨格の1あるいは3位にEPAあるいはDHAが結合した構造油脂と2位にEPAあるいはDHAが結合し、その他の位置に中鎖脂肪酸が占める4タイプの構造油脂をデザインし合成を行なっているところである。次年度はこれらの構造油脂が全て合成される予定であり、当該油脂の位置特異的な生理活性に関する研究が可能となる。

5. まとめ

本年度は、新規構造油脂の合成に用いる脂肪酸を *in vitro* の実験系と *in vivo* の実験系を用いてスクリーニングを行い、EPA あるいは DHA が脂肪蓄積に抑制的に作用することを確認した。これら脂肪酸と中鎖脂肪酸を組合せた構造油脂をデザインし、現在合成を行なっているところである。これまでに1あるいは3位にEPAあるいはDHAを配した構造油脂300gを合成し、2位にEPAあるいはDHAを配した構造油脂の合成について検討を行なっているところである。次年度は、これらの構造油脂を用いた位置特異性が脂質代謝や体脂肪蓄積に *in vivo* の実験系においてどのような影響を及ぼすのか検討を行なう予定である。

6. 研究発表

なし

7. 知的所有権の取得状況

- | | | |
|----|--------|----|
| 1) | 特許取得 | なし |
| 2) | 実用新案登録 | なし |
| 3) | その他 | なし |

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社