

以後、行動実験結果が得られたラットについて脂肪酸組成の結果の開示と解析を行った。

### C-3. 血漿の脂肪酸組成への影響

アラキドン酸群はコントロール群にくらべて、アラキドン酸とn-6/n-3比、ならびに脂肪酸不飽和度が有意に増加し、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、エイコサペンタエン酸が有意に低下した (P<0.05) (表3)。

表3血漿脂肪酸組成

	Control 群(n=7)	AA 群(n=8)
PLA(mol%)	24.3±0.5	22.7±0.3*
STA(mol%)	14.2±0.2	14.6±0.3
OLA(mol%)	10.3±0.6	8.6±0.5*
LA(mol%)	18.0±1.0	14.0±0.7*
AA(mol%)	28.6±1.6	36.7±1.3*
EPA(mol%)	0.71±0.1	0.35±0.1*
DPA(mol%)	0.53±0.0	0.44±0.1
DHA(mol%)	1.78±0.2	1.27±0.2
n-6/n-3	15.5±2.4	24.6±2.7*
USI	179.1±3.6	195.8±2.8*

数値は平均値±標準誤差で表している。\*P<0.05

### C-4. 大脳皮質・海馬の脂肪酸組成への影響

アラキドン酸群はコントロール群にくらべて、大脳皮質と海馬ではリノール酸がともに有意に減少した。アラキドン酸は大脳皮質のみ有意に増加した (P<0.05) (表4、5)。海馬ではn-6/n-3比は有意に増加し、DHA/AA比が有意に減少した (表5)。大脳皮質では有意差は認められないものの、海馬と同様に、n-6/n-3比は増加し、DHA/AA比が減少する傾向が認められた (0.05<P<0.1) (表4)。

表4 大脳皮質の脂肪酸組成

	Control 群(n=7)	AA 群(n=8)
PLA(mol%)	26.6±0.47	27.0±0.30
STA(mol%)	27.7±0.29	28.0±0.12
OLA(mol%)	19.0±0.71	18.1±0.51
LA(mol%)	0.80±0.05	0.58±0.05**
AA(mol%)	11.6±0.37	12.7±0.35**
EPA(mol%)	0.07±0.01	0.06±0.00
DPA(mol%)	0.11±0.01	0.09±0.01
C24:0(mol%)	0.41±0.07	0.35±0.05
DHA(mol%)	13.0±0.45	12.5±0.20
C24:1(mol%)	0.70±0.13	0.60±0.07
n-6/n-3	0.94±0.05	1.06±0.04*
DHA/AA	1.13±0.06	0.99±0.04*
USI	146.8±2.1	146.4±0.7

数値は平均値±標準誤差で表している。

\*0.05<P<0.1, \*\*P<0.05

表5 海馬の脂肪酸組成

	Control 群(n=7)	AA 群(n=8)
PLA(mol%)	25.4±0.34	25.3±0.22
STA(mol%)	26.5±0.14	26.4±0.33
OLA(mol%)	20.9±0.46	20.2±0.39
LA(mol%)	0.63±0.04	0.48±0.02**
AA(mol%)	12.8±0.20	13.2±0.18
EPA(mol%)	0.09±0.00	0.08±0.01
DPA(mol%)	0.12±0.01	0.11±0.01
C24:0(mol%)	0.66±0.07	0.67±0.04
DHA(mol%)	11.8±0.20	11.4±0.19
C24:1(mol%)	1.06±0.13	1.08±0.08
n-6/n-3	1.11±0.02	1.18±0.02**
DHA/AA	0.93±0.02	0.86±0.01**
USI	146.5±1.2	145.7±1.0

数値は平均値±標準誤差で表している。\*\*P<0.05

## D. 考察

脳内の代表的なn-6系脂肪酸であるアラキドン酸 (ARA) は総脂肪酸の約10%を占め、少量ではアラキドン酸カスケードを介して生成される生理活性物質が正常な脳機能を営む上では重要な役割を果たしていることがよく知られている。しかしながら、長期的に給与された外因性ARAによる脳機能への影響についてはほとんど未解決のままである。

体重、血液の肝・腎機能指数、ならびに空腹時血糖にはアラキドン酸投与による影響が認められ

なかったことから、13週間の投与により毒性などは認められない事が示唆された。

頓実験で使用したアラキドン酸豊富油と対照基準混合油の脂肪酸組成を比べた場合、アラキドン酸豊富油ではアラキドン酸が40%増加する代わりに、オレイン酸とリノール酸がそれぞれ極端に低下している。摂取する餌中のリノール酸の増加は血中総コレステロールを減らすことが報告されていることから、アラキドン酸投与ラットで観察された血漿の総コレステロールやHDL・LDLコレステロールの増加の原因の一つとして、アラキドン酸豊富飼料中の低リノール酸含有量に起因する事が示唆される。

本研究はまだ中途であり、血漿・脳内の各種生理活性物質とアラキドン酸摂取との関連性について検討は行っていない。高齢ラットでは、アラキドン酸の長期投与により学習・記憶機能には影響が認められなかった。しかし、報酬餌を摂取するために要する時間（摂取所要時間）はアラキドン酸投与により有意に低下した。神経細胞膜に増加したアラキドン酸はリパーゼA<sub>2</sub>により遊離型となり、アラキドン酸カスケード由来各種プロスタノイドが産生される。これらのプロスタノイドが神経細胞の可塑性などに作用する可能性があり、今後の検討が待たれる。

## E. 結論

アラキドン酸投与により、血漿アラキドン酸組成の増加と共に、大脳皮質のアラキドン酸は増加し、海馬のDHA/AA比が低下した。これらの変化は、アラキドン酸投与ラットでの摂取所要時間の短縮に影響を及ぼす可能性があり、今後の検討課題である。

## 謝辞

本研究を遂行するために協力を賜った本研究室の井上隆之助教と本学総合科学研究支援センターの田邊洋子専門技術職員に深く感謝申し上げます。

## G. 研究発表

直接関係した業績はなく、以下には、間接的に関連した内容を掲載する。

### 学術論文

- 1) Yukiko Kagohashi, N Abiru, M Kobayashi, Michio Hashimoto, Osamu Shido, Hiroshi Otani. Maternal dietary n-6/n-3 fatty acid ratio affects type 1 diabetes development in the offspring of NOD mice. *Congenit Anom (Kyoto) (in press)*
- 2) Shuji Gamoh, Michio Hashimoto, Kenichi Yanagimoto, Masanori Katakura, Haque Md Abdul, and Osamu Shido. Krill-derived phospholipids rich in n-3 fatty acid improve spatial memory in adult rats. *Journal of Agricultural Science (in press)*
- 3) Michio Hashimoto, Hossain Md Shahdat. Beneficial effect of docosahexaenoic acid on cognitive decline in Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacological Science, Forum minireview (in press)*
- 4) 橋本道男 多価不飽和脂肪酸と脳機能 *Food Style* 21 14(9), 30-34, 2010.

### 著書

Michio Hashimoto, Hossain Md Shahdat, Masanori Katakura. Docosahexaenoic Acid and Cognitive Dysfunction. In: *Handbook of Behavior, Diet and Nutrition*, Editor: V. R. Preedy, Springer, New York, 2011 (in press)

# 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業） 分担研究報告書

「老若マウスの脳機能に及ぼすアラキドン酸の比較検討」

研究分担者 守口 徹 麻布大学 生命・環境科学部 教授

## 研究要旨

n-3 系脂肪酸欠乏ならびに n-3 系脂肪酸正常飼料で、飼育・繁殖した第 2 世代老齢マウス(52 週齢)を用いて、多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸(ARA)の長期投与による脳機能の影響を検討した。ARA (240mg/kg/day)の 13 週間の投与により、n-3 系脂肪酸欠乏ならびに n-3 系脂肪酸正常マウス共に自発運動の上昇もしくはその傾向が観察された。水迷路試験、高架式十字迷路試験では、各群間に顕差はなかったが、n-3 系脂肪酸欠乏群では、新奇摂食抑制試験で不安傾向が、また、n-3 系脂肪酸欠乏マウスの ARA 投与群では、ロータロッド試験で顕著な運動機能の低下が特徴的に観察された。これらは、ARA 投与における自発運動量の上昇に伴って生じている可能性が高いと考えられた。いずれにしろ、本試験終了後に採取した組織中の脂肪酸組成を行ない、行動試験との関連性を総合的に考察する必要がある。

## A. 研究目的

A-1. n-3 系脂肪酸欠乏 (Def)ならびに n-3 系脂肪酸正常 (Adq)の老若マウスを用いて、記憶学習ならびに情動行動、運動協調性等を評価し、アラキドン酸(ARA)の作用比較を行う。

A-2. 本研究に使用するアラキドン酸油の脂肪酸分析による品質評価と研究分担者への供給 ならびに研究分担者が用いる混合飼料の脂肪酸分析を行う。

## B. 研究方法

### B-1. アラキドン酸の作用比較

本年度は、AIN93Gを基礎飼料とした n-3 系脂肪酸欠乏もしくは n-3 系脂肪酸正常飼料(表 1)で飼育・繁殖した第 2 世代の老齢マウス(52 週齢)を用いて、アラキドン酸の長期投与における行動評価を行なった。評価項目としては、自発運動量、記憶学習として(空間学習、モーリス水迷路試験)ならびに 情動行動(高架式十字迷路試験および

新奇環境摂食抑制試験)、運動協調性(ロータロッド)試験を用いた。

表 1. 特殊飼料(AIN93G)中の脂質と脂肪酸組成 (% of total fatty acids)

材料	n-3 系脂肪酸 欠乏飼料	n-3 系脂肪酸 含有飼料
脂質 (g/100g diet)	7	7
ココナッツ油(硬化)	5.67	5.43
サフラワー油	1.33	1.24
亜麻仁油	-	0.34
脂肪酸組成(%)		
飽和脂肪酸	81.1	77.4
一価不飽和脂肪酸	3.1	4.6
多価不飽和脂肪酸		
総 n-6 系脂肪酸	14.4	14.3
総 n-3 系脂肪酸	0.1	2.6

### B-1-1. アラキドン酸の投与

第 2 世代の n-3 系脂肪酸欠乏ならびに正常マウスの 52 週齢時より、アラキドン酸油を毎日、強制

経口投与した。投与量は、240 mg/kg/day とし、毎週 1 回体重を測定し、その体重に基づいて投与用量を設定した。投与 13 週日以降もアラキドン酸の投与を継続しながら、以下に示す行動学的評価を行なった。行動評価終了後に、血液、肝臓、脳組織等を採集した。これらの組織は、脂肪酸組成を測定するために $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### B-1-2. 自発運動量の測定

自発運動量は、マウスケージ内にワイヤレスホイール(ENV-044, ニューロサイエンス)を入れた装置を用いた。マウスを各ケージに 1 匹ずつ入れ、30 分間のホイール回転数を記録した。

#### B-1-3 モーリス水迷路試験

試験に用いた装置は、高さ 30 cm、直径 100 cm の円形のプラスチック製プールに $90^{\circ}$ 毎離れた等間隔の遊泳開始点を①～③の 3 ケ所設け、遊泳開始点②の対称となる位置に、直径 10 cm の安全地帯となるプラットフォームを設置したものをを用いた。水温は $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ とし、水面の高さも一定に保った。またプール上部にはマウスの遊泳軌跡を記録する装置(Time MWM, 小原医科産業)を備えている。実験中、マウスがプラットフォームの空間的位置を学習するための手掛かりとなるプール周辺の絵や静物の配置は一定とした。実験初日(Day 0)には、遊泳練習として黒色のプラスチック片を上方に持つプラットフォームを水面上 0.5 cm に見えるように設置し、②の始点 1 ケ所からマウスを泳がせ遊泳能力を評価した。この際、90 秒以内にプラットフォームに到達したマウスは、プラットフォーム上で 30 秒間休ませ、プラットフォームにたどり着けなかった個体についても 90 秒で遊泳を中止させプラットフォームに誘導して 30 秒間プラットフォーム上で休ませた。学習試行時(Day 1-6)には、プラットフォームを水面下 0.5 cm に設置し、周辺の風景を手がかりにプラットフォームを探させ、学習能力を評価した。実験は 1 日 3 試行からなり、各試行ではプールの①～③の 3 ケ所全ての始点から無作為の順に選択して行った。プラットフォームに到達したマウスは、プラットフォーム上で 30 秒間休ませた後、ケージに戻し、5 分後に次

の試行を行った。プラットフォームにたどりつくことができなかった個体についても 試行開始後 90 秒で遊泳を中止させプラットフォームに引き上げ 30 秒間休ませた。各試行でのマウスがプラットフォームにたどり着くまでの時間(回避潜時)と遊泳時間ならびに遊泳距離を記録し、3 試行の記録を平均してデータとした。さらに実験最終日(Day 7)には、試験試行としてプラットフォームをプールから取り除いた状態で始点②からマウスを 90 秒間遊泳させ、プラットフォームのあった位置の横切り回数、プラットフォームを設置していた区画①に留まった時間や遊泳距離等を測定して他の区域と比較して学習状態、すなわち学習試行で得られた結果が学習によるものであったかを調べた。

#### B-1-4. 高架式十字迷路試験

試験では、長さ 20 cm、幅 5 cm の 4 本のアームが十字形となった装置を用いた。4 本のアームのうち 1 対のアームには壁(クローズドアーム)を持ち、残りの 1 対は床だけのアーム(オープンアーム)となっている。中央部分にマウスを 2 分間静止させた後の 5 分間の十字形のアーム上での行動をビデオカメラ(HDR-SR1, SONY)で記録した。測定時間のうちにオープンアーム上に上半身(剣状突起)までが進出、滞在した時間を記録した。

#### B-1-5. 新奇環境摂食抑制試験

測定は、オープンフィールド( $50 \times 50 \times 20$  cm)に厚さ約 2 cm の床敷きを敷きつめ、中央部分に飼料を固定した装置を用いた。マウスを一晩絶食させ、翌日、装置の隅にマウスを置き、空腹状態のマウスが中央にある飼料を確認、摂食するまでの行動をビデオカメラ(HDR-SR1, SONY)で記録した。測定項目としては、最初に飼料に接触するまでの時間(接触時間)、飼料に接触した回数(接触回数)、摂食するまでの時間(摂食時間)、評価時間内に摂食できた個体の割合(課題獲得率)を設定した。摂食行動の撮影終了後は、マウスを速やかにホームケージに戻し、空腹状態を確認するため 5 分間の摂餌量を測定した。

#### B-1-6. ロータロッド試験

実験には、ロータロッド(回転踏み車)試験装置(ENV-575M, ニューロサイエンス)を用いた。

回転するローターにマウスを乗せ、ローターの回転加速開始から落下するまでの時間を測定した。ローターの回転数は、5 分間のうちに 4 rpm から 40 rpm まで加速するように設定した。

#### B-1-7. 倫理面への配慮

本研究は、麻布大学動物実験指針第 7 第 1 項の規定に基づき、動物実験等計画を申請、承認(承認番号:100721-3)されたものである。

#### B-2. アラキドン酸油と混合飼料の品質評価

CABIO 社(中国)から入手したアラキドン酸油(Lot. 10050701)とその対照用混合油脂(豚脂:大豆油:ナタネ油 = 2:1:1)の脂肪酸分析を行なうと共に、その結果に基づき、両油脂を加えて作製した混合飼料の脂肪酸分析を行った。

#### B-2-1. 脂肪酸分析方法

試料をねじ付の試験管に入れて希釈した後に抗酸化剤としてブチルヒドロキシトルエンを含むメタノール-ヘキサン溶媒(メタノール:ヘキサン=4:1)と内標(ドコサトリエン酸メチル, C22:3n-3)を加え、塩化アセチルの添加、攪拌の後に、100°Cで 60 分間加熱させて脂質の抽出とメチル化反応を行った。試料の加熱後、試験管を速やかに冷却、炭酸カリウム溶液で試料を中和し、遠心分離して、ヘキサン層を採取し、これを検体としてガスクロマトグラフ分析した。また、各脂肪酸は、炭素数 10 から 24 個、不飽和度 0 から 6 個までの長鎖脂肪酸エステルを混合品を用いて同定した。また、各油脂におけるアラキドン酸、総脂肪酸の含有量を内標(22:3n-3)から算出した。

### C. D. 研究結果と考察

#### C-1. アラキドン酸の作用比較

今年度は、予定していた n-3 系脂肪酸欠乏ならびに正常老齢マウスのアラキドン酸長期投与における作用検討のうち、行動に関する試験を全て終了したが、試験終了後に採取した組織中の脂肪酸組成については、未実施である。各組織中の脂肪酸組成は、行動試験の成績を直接もしくは間接的に裏付けるものであることから、結果の総合的な考察および結論に関しては、それらの

結果が得られた後に行うものとする。

#### C-1-1. アラキドン酸投与期間中の体重変化と所見

第 2 世代の n-3 系脂肪酸欠乏ならびに正常老齢マウス(52 週齢)にアラキドン酸油を 13 週間、強制経口投与(240 mg/kg/day)した際の体重変化において、アラキドン酸の影響と見られる所見は得られなかった。しかし、投与期間中、n-3 系脂肪酸正常アラキドン酸投与群(AA, Adq-ARA)で 14 匹中 2 匹、原因不明の突然死となって脱落した個体があった。さらに、行動試験終了後の組織採取時の解剖所見で、重篤な肝臓腫瘍等が観察された個体は、n-3 系脂肪酸欠乏対照群(DC, Def-Cont)で 13 匹中 3 匹、n-3 系脂肪酸欠乏アラキドン酸投与群(DA, Def-ARA)で 15 匹中 3 匹、n-3 系脂肪酸正常対照群(AC, Adq-Cont)で 13 匹中 3 匹、n-3 系脂肪酸正常アラキドン酸投与群(AA, Adq-ARA)で 12 匹中 1 匹であった。これらの個体については、正確にアラキドン酸の作用を評価できないものと判断し、各群の行動試験成績から除外した。

#### C-1-2. 自発運動量

マウスをワイヤレスホイールの入った個別ケージに入れ、30 分間のホイール回転数を自発運動量として測定した。n-3 Def, n-3 Adq 共に ARA 長期投与の影響と思われる自発運動の増加が観察された(図 1)。

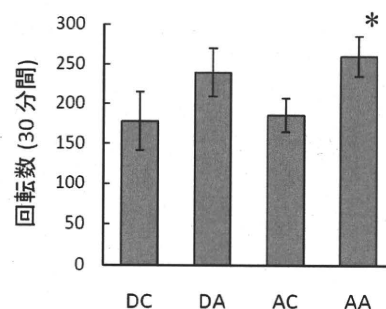


図 1. 自発運動量に対するアラキドン酸油投与の影響

DC, n-3 Def-Cont (n=10); DA, n-3 Def-ARA (n=12); AC, n-3 Adq-Cont (n=10); AA: n-3 Adq-ARA (n=11)を示す。(\*,  $P < 0.05$  vs AC, t-test)

#### C-1-3. モーリス水迷路試験

水迷路試験での学習試行における回避潜時(プラットホームにたどり着くまでの時間)では、各群

間に顕著な差は認められるまでには至らなかった(図 2)が、学習試行終了後の試験試行において、プラットホームのあった領域“0”の横切り回数が、他の領域よりも顕著に多かったのは、n-3 Def-ARA 群とn-3 Adq-Cont群であった。学習試行の回避潜時と試験試行の結果を考慮すると、

n-3 Adq-Cont 群の学習能力は試験試行でも証明されたが、n-3 Def-ARA 群の学習能力は、自発運動の上昇に伴った“見かけ上”の学習能力の改善となる可能性も考えられた。

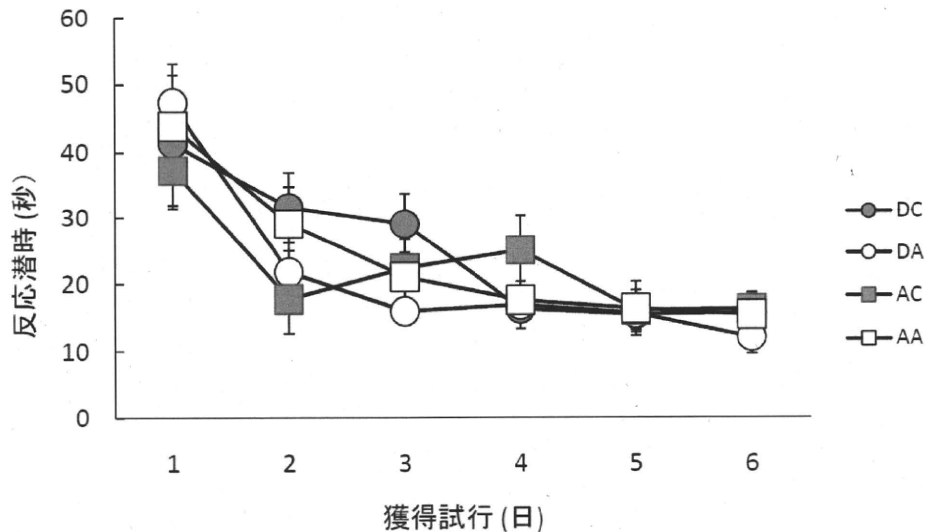


図 2. 水迷路試験の回避潜時におけるアラキドン酸油投与の影響  
群名については、図 1 を参照のこと。

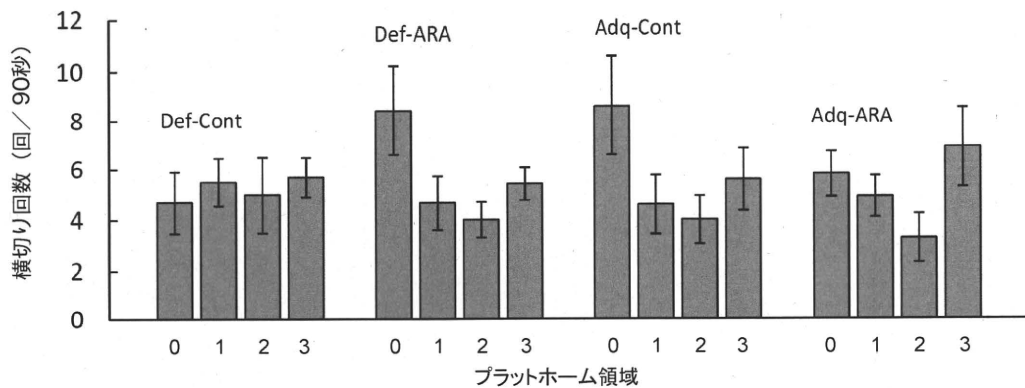
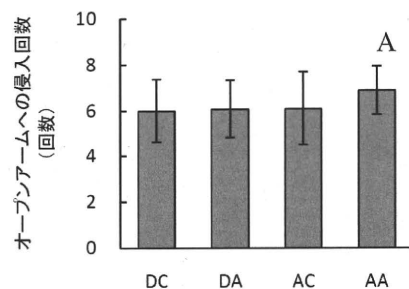


図 3. 水迷路試験の試験試行におけるアラキドン酸油投与の影響

#### C-1-4. 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験は、オープンアームへの侵入回数ならびに滞在時間の低下が、不安状態を呈するものとして評価されている。今回の実験では、オープンアームへの侵入回数で、各群間に著差を認めなかった(図 4A)。オープンアームでの滞在時間では、n-3 Def 群の方が n-3 Adq 群よりも不安の程度が高い傾向にあることが推察されたが、有意差を得るまでには至らなかった。また、ARA 投与により滞在時間の延長傾向が観察され

たが、有意差は認められなかった(図 4B)。



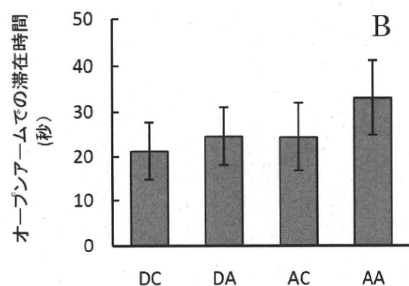


図4. 高架式十字迷路試験におけるアラキドン酸油投与の影響  
図Aは、オープンアームへの侵入回数を、図Bは、オープンアームでの滞在時間を示す。群名については、図1を参照のこと。

#### C-1-5. 新奇環境摂食抑制試験

新奇環境摂食抑制試験も、高架式十字迷路試験同様に不安状態を観察する試験系とされている。一晩絶食後の各マウスが、オープンフィールド内中央の飼料を摂食するまでの時間を図5に示した。有意差を得るまでには至っていないが、この試験でもn-3 Def群は、n-3 Adq群に比べて接触するまでの時間が長い傾向にあり、不安状態がn-3 Adq群よりも高いことが推察された。しかし、n-3 Def群でARA投与されたマウスは、対照混合油投与群よりも短時間で摂食、n-3 Adq群では、ARA投与されたマウスは、対照混合油投与群よりも長い時間で摂食するという、相反する結果が得られた。これは、情動的な意思を越えた自発運動の亢進による影響の可能性が考えられ、今後、詳細な検討が必要と思われた。

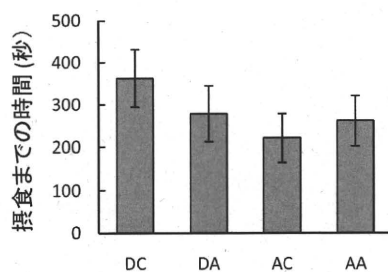


図5. 新奇環境摂食抑制試験におけるアラキドン酸油投与の影響  
群名については、図1を参照のこと。

#### C-1-6. 運動協調性(ロータロッド)試験

小脳にも関わる筋協調性(運動記憶)を評価するロータロッド試験において、n-3 Def-ARA群は、著しい落下時間の短縮を示した(図6)。これは、ARA投与における明らかな筋協調性(運動記憶)低下の可能性が考えられた。しかし、n-3

Adq-ARA群ではそのような変化が観察されなかったことから、脳内の脂肪酸組成等の評価結果を合わせて、今回得られた結果を精査する必要があると考えられた。

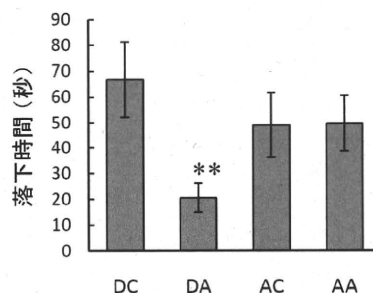


図6. ロータロッド試験におけるアラキドン酸油投与の影響  
群名については、図1を参照のこと。  
(\*\*, P<0.01 vs DC, t-test)

#### C-2. アラキドン酸油と混合飼料の品質評価

##### C-2-1. アラキドン酸油

本研究事業に際して用いたアラキドン酸油は、中国CABIO社から購入により入手したもので、輸入前の品質評価ができなかったことから、入手後直ちに脂肪酸分析を実施した(表2)。CABIO社から入手した分析証明書では、アラキドン酸油のアラキドン酸含有量は、40% (w/w)以上と表記されており、我々の分析結果から算出されたアラキドン酸含有量 $40.4 \pm 0.2\%$  (w/w)でも確認された。また、アラキドン酸油を経口投与する際の対照用混合油(豚脂:大豆油:ナタネ油=2:1:1)についても脂肪酸分析し、対照群にアラキドン酸の影響の無いことを確認した。

##### C-2-2. アラキドン酸油混合飼料

分担研究には、本アラキドン酸油を混合飼料として投与する試験もあることから、アラキドン酸油混合飼料( $\gamma$ 線滅菌前後)の脂肪酸分析を行った。その結果、混合飼料の $\gamma$ 線滅菌前後で、飼料中の高度不飽和脂肪酸の減少は顕著ではなく、混合飼料中のアラキドン酸含有量は飼料100g中、約9mg(対照群)、約130mg(低用量添加群)、約500mg(中用量添加群)、約2000mg(高用量添加群)であった(表3)。

表 2. アラキドン酸油 ならびに 対照用混合油の  
脂肪酸分析結果 (% of total fatty acids)

脂肪酸	アラキドン酸油	対照用混合油
12:0	N D	0.06± 0.001
14:0	0.40± 0.01	0.91± 0.003
16:0	6.95± 0.01	16.12± 0.02
18:0	5.91± 0.02	8.74± 0.01
20:0	0.81± 0.004	0.34± 0.01
22:0	3.21± 0.01	0.22± 0.003
23:0	0.10± 0.01	N D
24:0	9.51± 0.01	0.09± 0.01
Total sat.	26.89± 0.003	26.47± 0.04
14:1	N D	0.14± 0.001
16:1n-7	0.22± 0.001	1.35± 0.01
18:1n-9	5.31± 0.003	39.98± 0.04
18:1n-7	0.27± 0.004	2.54± 0.01
20:1n-9	0.22± 0.001	0.79± 0.04
22:1n-9	0.07± 0.01	N D
24:1	0.37± 0.01	N D
Total mono.	6.46± 0.01	44.79± 0.08
18:2n-6	9.38± 0.01	22.26± 0.03
18:3n-6	2.40± 0.004	0.03± 0.01
20:2n-6	0.47± 0.002	0.20± 0.01
20:3n-6	3.85± 0.01	N D
20:4n-6	45.11± 0.04	0.05± 0.002
22:4n-6	0.31± 0.004	N D
Total n-6FA	61.53± 0.05	22.54± 0.01
18:3n-3	0.06± 0.003	3.84± 0.01
20:5n-3	0.52± 0.002	0.10± 0.001
22:5n-3	N D	N D
22:6n-3	N D	N D
Total n-3FA	0.58± 0.004	3.94± 0.01
アラキドン酸含有量		
(mg/100 µl)	37.5 ± 0.2	0.043 ± 0.002
(mg/100 mg)	40.4 ± 0.2	0.047 ± 0.002
脂肪酸含有量		
(mg/100 µl)	83.2 ± 0.4	82.6 ± 0.2
(mg/100 mg)	89.5 ± 0.4	90.0 ± 0.2

数値は、平均値 ± 標準誤差で示した。(ND: 未検出)

## G. 研究発表

本研究結果が直接関係した業績はないが、間接的に関連した内容を掲載する。

### 学術論文

1. Harauma A, Moriguchi T, Dietary n-3 Fatty Acid Deficiency in Mice Enhances Anxiety Induced by Chronic Mild Stress, *Lipids*, 46(5): 409-16 (2011)
2. Harauma A, Salem N Jr, Moriguchi T, Repletion of n-3 fatty acid deficient dams with alpha-linolenic acid: effects on fetal brain and liver fatty acid composition, *Lipids*, 45(8): 659-68 (2010)



表 3. アラキドン酸混合各飼料の未滅菌と滅菌(γ線)処理後の脂肪酸組成の比較 (% of total fatty acids)

%	CE-2	基礎飼料	対照飼料(赤)	低濃度(緑)	中濃度(青)	高濃度(黒)
	未滅菌	未滅菌	未滅菌 / 滅菌	未滅菌 / 滅菌	未滅菌 / 滅菌	未滅菌 / 滅菌
10:0	0.20	0.10	0.13 / 0.13	0.10 / 0.11	0.11 / 0.11	0.09 / 0.11
12:0	0.00	0.05	0.05 / 0.02	0.05 / 0.05	0.04 / 0.04	0.02 / 0.04
14:0	0.66	0.81	0.77 / 0.78	0.79 / 0.81	0.77 / 0.77	0.63 / 0.64
16:0	15.70	15.71	15.79 / 15.92	15.57 / 15.67	14.98 / 15.02	12.49 / 12.50
18:0	2.11	6.59	5.46 / 5.50	6.52 / 6.57	6.40 / 6.43	5.59 / 5.59
20:0	0.28	0.32	0.31 / 0.31	0.34 / 0.34	0.36 / 0.37	0.50 / 0.50
22:0	0.27	0.24	0.25 / 0.25	0.31 / 0.31	0.51 / 0.50	1.35 / 1.35
23:0	0.08	0.01	ND / ND	0.02 / 0.03	0.02 / 0.02	0.05 / 0.05
24:0	0.23	0.12	0.15 / 0.15	0.33 / 0.32	1.00 / 0.96	3.66 / 3.68
Total Sat.	19.53	23.94	22.92 / 23.06	24.02 / 24.19	24.19 / 24.22	24.37 / 24.45
12:1	ND	ND	ND / ND	ND / ND	ND / ND	ND / ND
14:1	0.00	0.10	0.08 / 0.08	0.10 / 0.09	0.09 / 0.08	0.05 / 0.06
16:1n-7	1.26	1.32	1.31 / 1.32	1.28 / 1.31	1.23 / 1.22	0.91 / 0.94
18:1n-9	19.17	33.53	29.69 / 29.86	32.52 / 32.73	30.44 / 30.59	20.95 / 20.99
18:1n-7	2.04	2.33	2.29 / 2.30	2.30 / 2.31	2.16 / 2.16	1.56 / 1.56
20:1n-9	0.74	0.72	0.72 / 0.73	0.70 / 0.70	0.66 / 0.68	0.55 / 0.54
22:1n-9	0.18	0.08	0.11 / 0.11	0.08 / 0.08	0.08 / 0.06	0.10 / 0.09
24:1	0.26	0.12	0.17 / 0.15	0.14 / 0.12	0.14 / 0.14	0.22 / 0.22
Total mono.	23.65	38.20	34.36 / 34.55	37.12 / 37.35	34.80 / 34.93	24.34 / 24.41
18:2n-6	41.56	28.16	31.89 / 31.58	28.07 / 27.88	27.13 / 26.91	23.83 / 23.73
18:3n-6	0.00	0.00	0.00 / 0.00	0.07 / 0.07	0.22 / 0.22	0.84 / 0.85
20:2n-6	0.11	0.17	0.15 / 0.15	0.17 / 0.17	0.22 / 0.19	0.30 / 0.27
20:3n-6	0.00	0.00	0.00 / 0.00	0.10 / 0.10	0.36 / 0.36	1.39 / 1.40
20:4n-6	0.14	0.08	0.10 / 0.10	1.03 / 0.99	4.04 / 3.95	16.05 / 15.90
22:2n-6	ND	ND	ND / ND	ND / ND	ND / ND	ND / ND
22:4n-6	ND	ND	ND / ND	ND / ND	0.04 / 0.04	0.12 / 0.12
22:5n-6	ND	ND	ND / ND	ND / ND	ND / ND	ND / ND
Total n-6	41.81	28.40	32.14 / 31.82	29.45 / 29.21	32.01 / 31.68	42.53 / 42.26
18:3n-3	3.16	3.69	3.52 / 3.51	3.55 / 3.48	3.36 / 3.31	2.29 / 2.29
20:3n-3	0.00	0.02	0.00 / 0.00	0.02 / 0.01	0.02 / 0.02	0.02 / 0.02
20:5n-3	2.04	0.78	1.14 / 1.07	0.79 / 0.75	0.82 / 0.79	0.91 / 0.91
22:5n-3	0.41	0.16	0.22 / 0.23	0.19 / 0.16	0.16 / 0.14	0.16 / 0.15
22:6n-3	1.59	0.50	0.81 / 0.73	0.54 / 0.46	0.51 / 0.47	0.52 / 0.49
Total n-3	7.20	5.16	5.69 / 5.53	5.09 / 4.87	4.86 / 4.73	3.90 / 3.86
Total fatty acids (µg/mg Diet)	47.20	132.65	89.46 / 86.75	131.11 / 131.96	128.35 / 126.70	126.86 / 126.63
ダイエツト 100g 中のアラキドン酸量 (mg/100 g Diet)	6.60	10.86	8.90 / 8.44	134.56 / 130.20	518.87 / 500.77	2035.91 / 2013.46

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
小林哲幸	求められる、油脂製品の 安全性とリスク評価	ファルマシア	47, (4)	317-321	2011

## **IV. 研究成果の刊行物・別刷**

# 求められる、油脂製品の安全性とリスク評価

小林哲幸  
Tetsuyuki KOBAYASHI  
お茶の水女子大学大学院教授

## 1 はじめに

2009年12月、米国ニューヨーク市が外食産業に対して、トランス脂肪酸を含む食用油の使用を規制すると発表したことが、日本でも大きく報道されたことは記憶に新しい。その後、我が国でもトランス脂肪酸への関心が高まっており、2010年12月末には小売り大手のセブン&アイ・ホールディングスが、トランス脂肪酸を含む商品を原則として売り場に置かない方針を表明した。また2009年9月には、花王が特定保健用食品(トクホ)の食用油「エコナ」の製造販売中止を発表し、その1か月後にはトクホの表示許可の返上を同社が申し出た。油脂製品にかかわるこの2つの大きな出来事は、私たちの健康を支える食の安全と安心を考える上で、いろいろな課題を投げかけた。本稿では、トランス脂肪酸とエコナ油を中心に、我が国における油脂製品にかかわる安全性とリスク評価の現状について考えてみたい。

## 2 トランス脂肪酸

天然に存在する不飽和脂肪酸の多くは、シス型二重結合を含む。これに対し、トランス型二重結合を持つ不飽和脂肪酸の総称がトランス脂肪酸(図1)であり、次のような理由で各種食品に含まれる。工業的に作られる場合として、常温で液体の植物油から固体あるいは半固体の油脂を製造する加工技術である“水素添加”によって、トランス脂肪酸が生成する。その結果、マーガリンやショートニングなどの加工油脂やこれらを原材料に作られたパンやケーキ、ドーナッツなどに含まれることになる。また、サラダ油などの精製植物油では脱臭のための高温処理によりトランス脂肪酸ができることもあるが、一般にごく微量となるように管理されている。油を高温で加熱する調理過程でも、シス型不飽和脂肪酸からトランス型が生成する可能性がある。一方で天然においても、牛や羊などの反芻動物では胃中の微生物の働きによってトランス脂肪酸が作られるため、牛肉・羊肉、牛乳・乳製品にも微量のトランス脂肪酸が含まれる。

近年、欧米を中心に、トランス脂肪酸の安全性が問題視され食品市場への影響が現れてきている。具体的には、世界保健機関(WHO)/国際連合食糧農業機構(FAO)の「食事、栄養および慢性疾患予防に関する合同専門家会合」の報告書(2003年)では、心血管系を健康に保つた

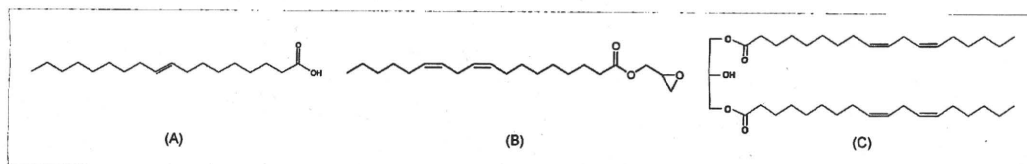


図1 油脂製品で問題となっている主な分子の構造式

(A) エライジン酸(トランス脂肪酸の代表例), (B) グリシドールリノール酸エステル(グリシドール脂肪酸エステルの代表例), (C) 1,3-ジリノレオイルグリセロール(ジアシルグリセロールの代表例).

表1 諸外国におけるトランス脂肪酸の規制(2010年12月現在)

国名	規制の内容
デンマーク	2004年から、国内のすべての食品を対象に、総油脂の2%までとする制限を実施
カナダ	2005年から、栄養成分表示義務化の中で、トランス脂肪酸も対象に指定
米国	2006年から、加工食品中のトランス脂肪酸含有量の表示を義務化
南米諸国 ブラジル、アルゼンチン、パラグアイ、ウルグアイ、チリ	2006年から、トランス脂肪酸を含む栄養成分表示を義務化
韓国	2007年から、栄養成分表示にトランス脂肪酸を追加
台湾	2008年から、栄養成分表示にトランス脂肪酸を追加
香港	2010年から、トランス脂肪酸を含む栄養成分表示を義務化
日本	栄養成分表示は任意(表示義務化を検討中)
EU諸国	栄養成分表示は任意(表示義務化を検討中)
中国	栄養成分表示は任意

めに食事からのトランス脂肪酸の摂取を極めて低く抑えるべきであり、その摂取量を最大でも1日当たりの総エネルギー摂取量の1%未満とするよう勧告している。その後、ヨーロッパ、北米、南米、アジアの諸外国で様々な規制や成分表示の義務化が実行されている(表1)。国際食品規格の作成などを担うコーデックス委員会<sup>※1</sup>でも、「任意または義務的に表示される栄養成分リスト」の1項目として、トランス脂肪酸が取り上げられている。

これに対して我が国の動向はというと、最近になって消費者庁等が中心となり、食品に含まれるトランス脂肪酸の栄養成分表示の義務化へ向けた取組みが活発化してきている。内閣府の食品安全委員会<sup>※2</sup>が公表しているトランス脂肪酸のファクトシート(科学的知見をまとめた概要書)<sup>1)</sup>によると、2010年12月現在、以下のような各省庁の動きがある。

厚生労働省は、「日本人の食事摂取基準(2010年版)」で、「日本人のトランス脂肪酸摂取量(欧米に比較し少ない摂取量)の範囲で疾病罹患のリスクになるかどうかは明らかでない」。しかし、「日本人の中にも欧米人のトランス脂肪酸摂取量に近い人もいる。このため日本でも工業的に生産されるトランス脂肪酸は、すべての年齢層で、少なく摂取することが望まれる」と記述している。<sup>2)</sup> 農林水産省でも、トランス脂肪酸に関する文献調査や国内外の情報の収集・解析を行い、農水省のホームページで「トランス脂肪酸に関する情報」として公表している。<sup>3)</sup>

消費者庁では、2009年12月から関係省庁と連携して、トランス脂肪酸の摂取量や健康への影響等に関する情報収集を行い、栄養成分表示の制度化に向けた具体的な検討に取組んでいる。2010年9月には、トランス脂肪酸に関するファクトシートを公表し、また食品事業者に対し、トランス脂肪酸を含む脂質に関する情報を自主的に開示する取組みを進めるよう要請するため、同年10月には、「トランス脂肪酸の情報開示に関する指針について(案)」を公表してパブリックコメントを募集し、2011年2月には見直すことも前提に指針を公表した。<sup>4)</sup> 食品安全委員会でも、トランス脂肪酸について評価することを決定し、2010年4月から新開発食品専門調査会で評価のための検討が開始された。<sup>5)</sup>

それでは、日本人は実際にどのくらいの量のトランス脂肪酸を食べているのであろうか? 女子大学生<sup>6)</sup>や30~69歳の男女<sup>7)</sup>を対象にした食事栄養調査によると、日本人1日当たりのトランス脂肪酸の摂取量は、平均1.2~1.7g(総エネルギーの0.6~0.8%)であった。ただし成人男

※1 コーデックス委員会、※2 食品安全委員会についての用語解説は、294頁参照。

性の5.7%, 成人女性の24.4%がWHOの勧告値である1%を上回っていた。また、フライドポテトや菓子パン類を多く食べた女子大学生の中には2.8~3.3gと高値を示す場合も見られた。

ここで一番重要なことは、そもそもトランス脂肪酸の有害性(裏を返すと安全性)には、どの程度の科学的根拠があるのかという点である。トランス脂肪酸の摂取を制限しようとする動きが国際的に高まった理由は、トランス脂肪酸の摂取量と冠動脈疾患の発症率の間に正の相関があると、米国での疫学調査に基づいている。トランス脂肪酸の摂取量が多い女性において、心筋梗塞の相対危険度が1.2~1.4程度に高まっているとの報告<sup>9)</sup>がある一方で、欧米9か国での研究<sup>9)</sup>では、貯蔵脂肪中のトランス脂肪酸量と心疾患の間に有意な相関は認められていないなど、トランス脂肪酸が心疾患の原因とする根拠は十分ではない。これについては、2007年に奥山<sup>10)</sup>が本誌において詳しく解説している。最近、日本人の女子大学生を対象にした新たな論文<sup>11)</sup>も発表され、トランス脂肪酸の摂取量の高い人ほど腹囲が大きく、血中の中性脂質やHbA1c値(高血糖指標の1つ)が高い傾向が報告された。その他の追加論文<sup>12)</sup>も報告されているが、現在においてもまだ明確な結論を導き出すには至っていない。果たして本当に食品中のトランス脂肪酸含量表示の義務化が必要なのかどうか、引き続き慎重な科学的検証が必要である。

### 3 ジアシルグリセロールとグリシドール

エコナ油の製造販売が中止された理由は、体内で発がん性物質に変わる恐れのあるグリシドール脂肪酸エステル(図1(B))が一般の油より多く含まれていることが分かったためである。その後、食品安全委員会を中心に検討が継続して行われているが、販売中止から1年以上経った現時点でも、はっきりした結論はまだ出されていない。

トリアシルグリセロールが主成分の通常の食用油と違って、エコナ油はジアシルグリセロール(図1(C))が約80%を占めることを特徴とする。ただし、コーン油やオリーブ油などの食用油にも3~6%程度のジアシルグリセロールが含まれる。ジアシルグリセロールには、血中の中性脂肪の上昇抑制効果や体脂肪低減作用があることから、トクホが認められた。

以前より基礎生化学の分野では、ジアシルグリセロールの一種はプロテインキナーゼC(PKC)を活性化することが知られていた。また、トウダイグサ科の植物から抽出されるフォルボールエステルは、PKCを活性化して発がんプロモーション作用を示すことも広く知られていた。経口摂取したジアシルグリセロールは消化吸收過程を経るため、試験管内や細胞レベルの実験のようにそのまま細胞のPKCに作用するとは考えられないが、ジアシルグリセロールが高濃度含まれる食用油の安全性については、今後も慎重に評価される必要があるとされている。すなわち、エコナ油の安全性評価には2つの観点、高濃度ジアシルグリセロールとグリシドール脂肪酸エステルの両方の発がん性問題がある。

グリシドール脂肪酸エステルは、エコナ油の脱臭工程で生成される。グリシドール脂肪酸エステルそのものに発がん性を示す報告はないが、発がん性があるとされているグリシドールに体内で変化する可能性が指摘されており、現在、この点が検討されている。最近、花王は、グリシドール脂肪酸エステルを大量に与えたラットでは、血中にグリシドールが検出されることを示した。しかしその投与量は人の通常摂取量の4,600倍と多く、また実際の細胞への吸収量も不明であり、まだ評価が難しい。より少量をサルへ与えた場合には、血中にグリシドールは検出されないとの報告も出されているが、ヒトへの有害性・安全性について更に深い検討が必要である。食品安全委員会では、今後、グリシドール脂肪酸エステルおよびグリシドールに関する議論を先行させ、その後、高濃度ジアシルグリセロールを含む食品の安全性についても議

論を行うとしている。<sup>13)</sup>

エコナ問題でも、トクホ制度を巡る多くの課題が浮き彫りになった。安全性に疑問が生じたトクホ製品について、その表示許可を取り消そうにも新たな科学的データが十分にそろわないと取り消せない。取り消し検討の基準すらない。メーカー側の危機管理に基づいた自主性に依存しているのが実情である。消費者庁は、トクホ商品を扱う企業に新しい科学データを収集して報告するしくみなどを整備するなど、トクホの運用改善によりやく力を注ぎ始めた。

#### 4 その他の問題成分

最近、アラキドン酸を豊富に含むサプリメントが市場に出回るようになった。アラキドン酸の摂取量は通常の食事からは限られており、同じ $\omega$ 6系列のリノール酸を摂取して体内で代謝制御を受けながら部分的にアラキドン酸に変換する。アラキドン酸は重要な脂肪酸であり、各種エイコサノイドに変換されるなどして、生殖、成長、脳機能にも深くかかわっている。一方で、 $\omega$ 6系列脂肪酸(主にリノール酸)の過剰摂取は、炎症・アレルギー、がん、心疾患などの各種疾患を促進することが分かってきた。<sup>14)</sup> アラキドン酸を未熟児用粉ミルクに添加することの安全性に関しては、世界的に認められているところである。しかし、成人に多量のアラキドン酸をサプリメントとして補給することの安全性については、検討が不十分である。アラキドン酸の補給が脳機能を向上させるとの動物実験<sup>15)</sup>や臨床試験<sup>16)</sup>の報告があるが、一方で最近の報告によると、アラキドン酸強化食を与えたマウスでは生まれた雌胎仔に高頻度で眼奇形が認められた。<sup>17)</sup> アラキドン酸摂取の安全性について、今後更に慎重な検討が必要であろう。

数種の植物油(カノーラ菜種油、オリーブ油、高オレイン酸紅花油、月見草油、コーン油など)が、脳卒中易発症性高血圧自然発症(SHRSP)ラットの寿命を短縮させることが報告されている。<sup>18)</sup> 植物油を加水分解して遊離脂肪酸画分(植物ステロールを含む)にしたところ、作用は消失あるいは減弱したので、脂肪酸や植物ステロール以外の微量有害成分の存在が推定されているが、いまだ同定はされていない。この因子は腎臓、脾臓、脳、血管などに病変を起し、血小板数を減らす。また多くの遺伝子発現に影響を及ぼし、精巣テストステロンレベルを低下させる。これらの作用の一部は、ブタでも認められている。これらの因子が人の健康に影響を及ぼすかどうかはまだ分かっていないが、今後の更なる解析が待たれる。

油脂には高度不飽和脂肪酸を含むものも多く、空気中の酸素による自動酸化によって生成する脂質過酸化物質の中には有害なものも含まれる。したがって、油脂製品の製造・加工、流通・保管においては、抗酸化物質の添加や製法の工夫、さらには容器や保存法を工夫することにより過酸化を防ぐ努力がなされている。一方で、消費者が家庭や外食産業において、食用油の長期間の使い回しや誤った保管をしないような指導が必要かも知れない。

#### 5 おわりに

食品は単に燃料分子を補給するためだけではなく、その成分中には複雑な生体機能を調節するための重要な物質も多く含まれる。医食同源の言葉が表すように、健康を維持するために食品の果たす割合は大きく、油脂製品においてもそれが当てはまる。食品と医薬品、そしてその中間に位置するトクホなど機能性食品分野が、今、社会的にも注目されている。健康増進に役立つ食品開発の結果として、天然物の場合とは異なって、特定の成分が濃縮されたり特別な加工が施されることになり、人類がいまだ経験していない新たな食環境が生まれている。そこには未知の有害成分が隠れている可能性もあり、安全性に関して常に新しい科学データに基づい



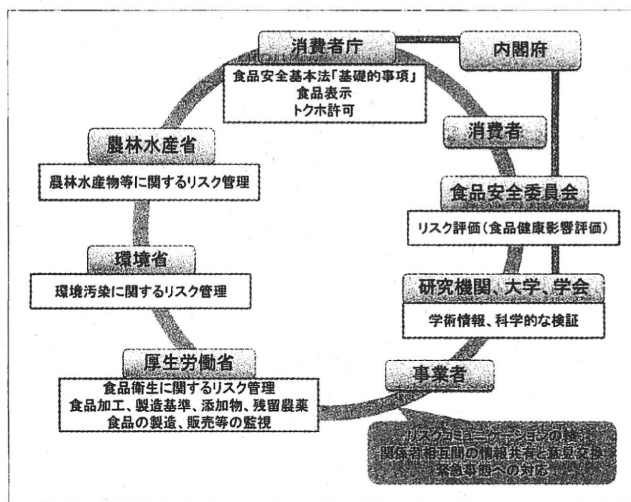


図2 食品の安全にかかわる行政機関と社会との連携

たリスク評価がなされなければならない。そのためには、行政機関、学会、企業、消費者などが協力し合ってリスクコミュニケーションを潤滑に行う必要がある。現在、図2に示すような社会的な連携体制が組まれているが、トランス脂肪酸やエコナ油騒動を見ても、まだ十分に機能しているとは思えない。本当に安全な食品を安心して食べることができ、その結果として世界一の長寿国を維持していけるように、内閣府を中心とした政府や行政機関の指導力に期待したい。安全だけでなく安心するためには情報開示が重要である。幸いなことに、インターネットを介した情報開示は進んでおり、本稿を執筆するに当たっても各省庁のホームページが大いに参考になった。

最後に、医薬品とは違って食品には様々な未知の微量成分も含まれる。よく言われることではあるが、同じ食品ばかりを極端に偏って摂取せずに様々な食材をバランス良く食べることが、食の安全性対策の1つかも知れない。

#### 参考文献

- 1) 消費者庁「トランス脂肪酸」ファクトシート <http://www.fsc.go.jp/sonota/54kai-factsheets-trans.pdf>
- 2) 日本人の食事摂取基準—厚生労働省「日本人の食事摂取基準」策定検討会報告書(2010年版), <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/05/s0529-4.html>
- 3) 農林水産省 トランス脂肪酸に関する情報 [http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/trans\\_fat/](http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/trans_fat/)
- 4) 消費者庁 トランス脂肪酸に関する情報 <http://www.caa.go.jp/foods/index5.html>
- 5) 食品安全委員会「トランス脂肪酸」ファクトシート <http://www.fsc.go.jp/sonota/54kai-factsheets-trans.pdf>
- 6) 川端輝江ほか, 日本栄養食糧学会誌, 61, 161-168(2008).
- 7) Yamada M. et al., *J. Epidemiol.*, 20, 119-127(2010).
- 8) Oh K. et al., *Am. J. Epidemiol.*, 161, 672-679(2005).
- 9) Aro K. et al., *Lancet*, 345, 273-278(1995).
- 10) 奥山治美, *ファルマシア*, 43, 332-336(2007).
- 11) Yamada M. et al., *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 18, 359-371(2009).
- 12) Mozaffarian D. et al., *Eur. J. Clin. Nutr.*, 63, 5-21(2009).
- 13) 食品安全委員会 高濃度にジアシルグリセロールを含む食用油等に関する情報 [http://www.fsc.go.jp/sonota/dag/dag\\_index.html](http://www.fsc.go.jp/sonota/dag/dag_index.html)
- 14) Okuyama H. et al., *Prog. Lipid Res.*, 35, 409-457(1997).
- 15) Maekawa M. et al., *PLoS One*, 4, e5085(2009).
- 16) Ishikura Y. et al., *Neuropsychobiol.*, 60, 73-79(2009).
- 17) Maekawa M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 402, 431-437(2010).
- 18) Tatematsu K. et al., *J. Nutr.*, 134, 1347-1352(2004).

