

必須脂肪酸の単回投与が記憶・学習機能に与える影響について

栗脇淳一・金森玲奈・森下桃子・鈴木真奈美

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第65号抜刷）

必須脂肪酸の単回投与が記憶・学習機能に与える影響について

Effects of a Single Dose of Essential Fatty Acids on Learning and Memory Function in Rats

栗脇淳一^{1†}・金森玲奈²・森下桃子²・鈴木真奈美¹

キーワード：必須脂肪酸 記憶・学習 T字迷路

序論

不飽和脂肪酸の一種であるn-3系脂肪酸には α -リノレン酸が、n-6系脂肪酸にはリノール酸が含まれる。 α -リノレン酸及びリノール酸はヒトを含めた動物において生命活動を維持する上で必要不可欠な成分であり、どちらも必須脂肪酸 (Essential Fatty Acid: EFA) に分類される¹⁾。

必須脂肪酸は、体内で合成されないため食事から摂取する必要がある栄養成分であり冠動脈疾患^{2)、3)}、脳卒中⁴⁾ など、様々な疾患の予防が期待されるだけでなく、認知機能の改善の可能性も示されている^{5)、6)}。

食物として摂取されたEFAは、体内酵素の働きにより、アラキドン酸やエイコサペンタエン酸などの脂肪酸に変換され、健康の維持・増進に寄与する物質として知られている⁷⁾。例えば、えごま油に多く含まれる α -リノレン酸は体内でエイコサノイドに合成され、これを長期間摂取することにより記憶・認知機能の促進効果があることが知られている⁸⁾。一方、グレープシード油に多く含まれるリノール酸から合成されるアラキドン酸の長期間摂取により、加齢に伴う記憶・学習能力低下を改善することが知られている⁸⁾。

そこで、本研究では長期間の摂取によって脳機能に影響を及ぼすことが報告されているn-3系脂肪酸に分類される α -リノレン酸及び、n-6系脂肪酸に分

類されるリノール酸の単回摂取が脳機能にどのような影響を及ぼすかについて比較・検討を行った。

材料および方法

1. 動物

実験には10週齢雄ラット (329.2±15.9 g, Wistar) 9匹を用いた。動物は個別のケージで飼育し、室温24±2°C、湿度50±10%、12時間の明・暗サイクル (明期; 8時-20時、暗期20時-8時) の条件下で飼育し、飼育期間中の飼料および水の摂取は任意とした。

動物の飼育および動物実験は美作大学・美作大学短期大学部動物実験に関する指針に基づいて行った。

2. 必須脂肪酸投与

一週間の馴化期間の後、ラットを対照群 (紅花油摂取群) (n=3, Cnt群) えごま油摂取群 (n=3, SeO群)、グレープシード油摂取群 (n=3, GSO群) に群分けを行った。すべての動物は搬入の翌日より、1日1回 (12:00~12:15分の間) 体重を測定・記録した。

Cnt群にはn-3系脂肪酸およびn-6系脂肪酸の含有量が少ない、高オレイン酸紅花油 (オレイン酸78.4%、リノール酸13.5%、 α -リノレン酸0.2%、飽和脂肪酸7.2%、その他0.7%) を1.2mL/300g、SeO群にはえごま油 (オレイン酸13.5%、リノール酸15.8%、 α -リノレン酸62.4%、飽和脂肪酸8.1%、その他0.2%) を1.2mL/300g、GSO群にはグレープシ

¹ 美作大学短期大学部栄養学科

² 美作大学生活化学部食物学科

ド油（オレイン酸16.3%、リノール酸72.8%、 α -リノレン酸0.4%、飽和脂肪酸10.1%、その他0.4%）を1.0mL/300gに調整し、経口ゾンデを用いて胃内投与を行った。なお、投与回数は行動実験当日の1回とした。投与量はn-6系脂肪酸の半数致死量である1.5mL/300gの2/3量をもとに決定した^{9)、10)}。

油脂投与後6時間後に肝臓をはじめとする各臓器への取り込みが最大になったという先行研究の報告¹¹⁾から、本実験では各油脂投与6時間後に行動試験を開始した（図1）。

	8:00	9:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	
1グループ目	8:00 油脂投与	通常飼育					行動実験			
2グループ目		9:00 油脂投与	通常飼育				行動実験			
3グループ目			10:00 油脂投与	通常飼育			行動実験			

図1 実験当日のタイムテーブル
各油脂群から1匹ずつ1～3グループに分け行動実験を行った。行動実験は、10分/匹で行い実験間隔は10分間とした。

3. 記憶・学習課題（図2）

行動試験は、簡便性が高くかつ空間認知記憶評価実験の一つであり、自発交替行動試験であるY字迷路試験を用いた^{12)、13)}。Y字迷路には長さ50cm、幅10cm、高さ25cmのY字型をした箱（壁：5mm発泡ポリエチレン板、床：3mm塩化ビニール板）を使用した。また、Y字迷路は実験台（縦45cm、横60cm、高さ78cm）上に設置し、周囲の環境による影響が出ないように配慮した。

Y字迷路試験は、ラットをY字迷路の同一のアームの先端に置き、自由行動を10分間動画撮影後、試験時

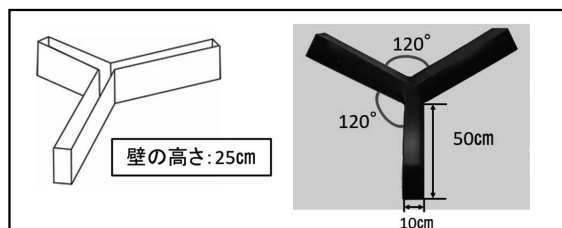


図2 Y字迷路の構造（左）および実際に使用したY字迷路（右）
壁：5mm発泡ポリエチレン板、床：3mm塩化ビニール板。

間に動物が各アームに進入した回数（総アーム進入回数、TN）及び連続して異なる3本のアームに進入した組み合わせの数（交替行動数、AN）を行動試験後、撮影した動画より調べ下記の式より交替行動率（%）を算出し、短期記憶の指標とした。

$$\text{“交替行動率（\%）} = \text{AN} / (\text{TN} - 2) \times 100\text{”}$$

交替行動数とは連続して異なる3本のアームに進入した回数であり、総アーム進入回数とは、ラットが測定時間内に各アームに進入した回数の合計である。

4. 統計解析

データは平均±標準誤差で示し、統計解析には一元配置分散分析（Tukey's test following ANOVA）を用いた。行動試験における交替行動の判定は、実験後に記録した動画を用い2名が個々に行った。交替行動率は、判定を行った2名の交代行動数および総アーム進入回数の平均値を用いて算出し、各油脂摂取における記憶・学習機能への影響について比較・検討した。

結果

Y字迷路試験の結果からCnt群、SeO群（n-3系脂肪酸）、GSO群（n-6系脂肪酸）それぞれの交替行動数（図3）、総アーム進入回数（図4）をカウントし、交替行動率（図5）を算出した。

その後、各群のデータを比較し、油脂投与が脳機能に与える影響について検討を行った。交替行動数、総

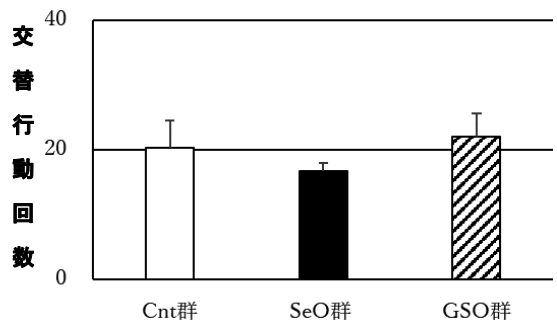


図3 各群における交替行動数（回/10分）の比較
Cnt群（n=3）、SeO群（n=3）、GSO群（n=3）の比較。
縦軸：交替行動回数。横軸：群名。交替行動数：連続して異なる3本のアームに進入した回数。（Tukey's test following ANOVA）

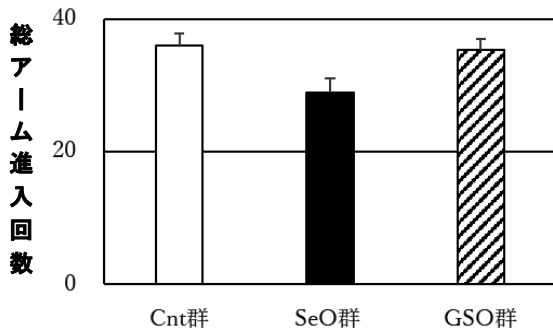


図4 各群における総アーム進入回数(回/10分)の比較
Cnt群 (n=3)、SeO群 (n=3)、GSO群 (n=3) の比較。
縦軸：交替行動回数。横軸：群名。総アーム進入回数：ラットが測定時間内に各アームに進入した回数。
(Tukey's test following ANOVA)

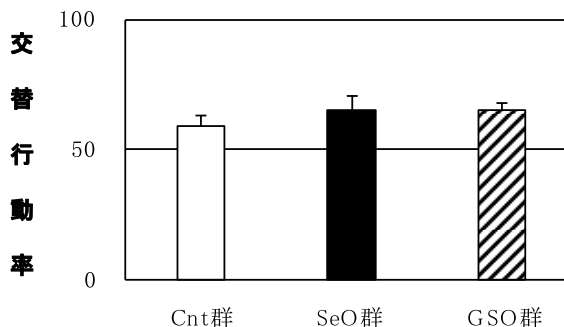


図5 各群における交替行動率の比較
Cnt群 (n=3)、SeO群 (n=3)、GSO群 (n=3) の比較。
縦軸：交替行動率。横軸：群名。(Tukey's test following ANOVA)

アーム進入回数、交替行動率のいずれにおいても、各群の間に有意な差は見られず、えごま油 (n-3系脂肪酸、SeO群) 投与およびグレープシード油 (n-6系脂肪酸、GSO群) 投与による記憶・学習能力効果について確認することはできなかった。しかし、交替行動率においてSeO群およびGSO群はCnt群に比べ高い傾向があった。

考察

本研究では、n-3系脂肪酸およびn-6系脂肪酸の単回投与が対照群よりも記憶・学習能力に影響することを期待したが、有意な差を確認することはできなかった。しかし、Cnt群に比べSeO群およびGSO群に

おいて交替行動率が高く、記憶・学習能力が向上する傾向が見られた。

今回の実験では、油脂の吸収時間等を考慮してCnt群にオレイン酸の含有量の高い紅花油を使用した。一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸は、記憶・学習に影響することが知られているエイコサノイドを生成するn-3系脂肪酸とn-6系脂肪酸が少ないことが知られている^{10)、14)}。これらのことからCnt群への紅花油の使用は妥当であったと考える。

一方、先行研究において雌ラット (母ラット) にn-3系脂肪酸およびn-6系脂肪酸を豊富に含む大豆油 (総カロリー-394kcal/100g、脂質18.2%カロリー中n-3/n-6比=0.13) を含む飼料を2週間摂取させ、交配を行い、分娩に至った後も同種の飼料を摂取させ、乳汁栄養を行った後、離乳完了後の仔ラットにも同種の飼料を摂取させるという2世代 (13週間) に渡った先行研究によると、n-3系脂肪酸およびn-6系脂肪酸の含有割合が低い飼料を摂取した場合よりも記憶・学習能力が優れていたという報告がされている。しかし、通常飼料を摂取させ、交配を行い、分娩に至ったのちも通常飼料を摂取させ乳汁栄養を行った後、離乳完了後の仔ラットにn-3系脂肪酸およびn-6系脂肪酸を豊富に含む大豆油 (総カロリー-394kcal/100g、脂質18.2%カロリー中n-3/n-6比=0.13) を含む飼料を摂取させ、摂取開始60日後に記憶学習試験を行った結果、2世代に渡り飼料を摂取したラットの記憶学習能力に追いついたという報告がある¹⁵⁾。

また、近年、高齢者 (ヒト) が脂肪酸 (DHA 1.7g + EPA 0.4g) を12か月間摂取すると、認知機能が改善する可能性が報告されている¹⁶⁾。これらのことから、長期摂取だけでなく短期摂取でも記憶・学習効果が得られる可能性があることが示唆される。

また、今回の実験では、グレープシード油 (n-6系脂肪酸) の半数致死量の2/3の濃度に合わせて、他の油脂の投与量を調整した。投与する油脂の量について行動異常などの影響があることが懸念されたが、行動実験前後の動物の行動からは今回の投与濃度であるCnt群 (高オレイン酸紅花油群) 1.2ml/300g、SeO群 (n

-3系脂肪酸) 1.2ml/300 g、GSO群 (n-6系脂肪酸) 1.0ml/300 g が健康に対して影響のない濃度であることが示された。

以上の結果より、単回投与でも、ラットの個体数を増やすことや、投与量の検討を再度行うことで記憶・学習能力への効果があるという可能性が示唆された。

まとめ

本研究から必須脂肪酸の記憶・学習機能への影響を確認することはできなかった。しかし、Cnt群と比べSeO群およびGSO群では交替行動率が高く、記憶・学習能力が向上する傾向が見られたことを考慮すると、n-3系脂肪酸およびn-6系脂肪酸の投与方法を見直すことで数週間や数か月といった長期間にわたる投与ではなくより短い投与期間および投与回数でも効果が得られる可能性が示された。

今後は、n-3系脂肪酸およびn-6系脂肪酸のより効果的な投与方法について再検討を行い、同時に投与期間と効果の持続時間(期間)についても検討を行う予定である。

参考文献

- 1) 厚生労働省「日本人の食事摂取基準(2015年版)策定検討会」報告書 各論「脂質」(最終閲覧日: 2019年12月9日) <https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10901000-Kenkoukyoku-Soumuka/0000042631.pdf>
- 2) Sokoła-Wysocka E, Wysocki T, Wagner J, Czyż K, Bodkowski R, Lochyński S, Patkowska-Sokoła B. Polyunsaturated Fatty Acids and Their Potential Therapeutic Role in Cardiovascular System Disorders-A Review. *Nutrients*. 2018 Oct 21; 10 (10) .
- 3) Das UN. Nutritional factors in the prevention and management of coronary artery disease and heart failure. *Nutrition*. 2015 Feb; 31 (2) : 283-91.
- 4) Adili R, Hawley M, Holinstat M. Regulation of platelet function and thrombosis by omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2018 Nov; 139: 10-18.
- 5) Mazereeuw G, Herrmann N, Ma DWL, Hillyer LM, Oh PI, Lanctôt KL. Omega-3/omega-6 fatty acid ratios in different phospholipid classes and depressive symptoms in coronary artery disease patients. *Brain Behav Immun*. 2016 Mar; 53: 54-58.
- 6) 農林水産省「脂質による健康影響」最終閲覧日: 2019年12月9日) http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/trans_fat/t_eikyou/fat_eikyou.html
- 7) 川端輝江「新版 基礎栄養学—栄養素のはたらきを理解するために—」株式会社アイ・ケイコーポレーション. 2015: p98
- 8) 奥山治美「脳を襲う油脂(あぶら)—基礎研究から—」精神雑誌. 2009; 111 (12) : p.1501-1506
- 9) 公益財団法人日本油脂検査協会ホームページ「食用植物油の脂肪酸組成」(最終閲覧日: 2019年12月8日) <http://www.oil-kensa.or.jp/>
- 10) 日本医薬品添加剤協会「サフラワー油」日本医薬品添加物協会ホームページ(最終閲覧日: 2019年12月8日) <http://www.jpec.gr.jp/>
- 11) 大荒田素子、宮沢陽夫、藤本健四郎、金田尚志「ラット肝臓におけるリノール酸メチル自動酸化産物の吸収と代謝」日本栄養・食糧学会誌. 1987; 40 (2) : p.117-121
- 12) 田熊一敏、永井拓、山田清文「学習・記憶行動の評価法」日薬理誌. 2007; 130: p.112-116
- 13) Zoltán Sarnyai, Etienne L. Sibille, Constantine Pavlides, Robert J. Fenster, Bruce S. McEwen, and Miklós Tóth. Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin1A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 Dec; 97

(26) : 14731-14736.

- 14) 原健次「生理活性脂質EPA・DHAの生化学と応用 第7章 脳機能とDHA」幸書房 1996: p.147-166
- 15) 横田明重「ラット胎仔および新生仔の脳における多価不飽和脂肪酸組成と学習能力との関係」日産婦誌. 1993: 45 (1)
- 16) 橋本道男「脳・神経機能維持とn-3系脂肪酸」日薬理誌. 2018; 151: p.27-33

