

胎児の成長・発達に及ぼすコレステロールと多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の影響に関する研究

帝京大学医学部小児科学教室 教授 阿部 敏 明

帝京大学医学部小児科教室 助手 花 香 里 子

国立健康・栄養研究所臨床栄養部 室長 松 本 明 世

国立健康・栄養研究所 特別客員研究員 板 倉 弘 重

要 約

日本人の初乳、母体血・臍体血における脂肪酸組成の検討を行った。分娩時の母親より得た初乳、36検体と、2種類の育児用調整乳の脂肪酸組成を分析した。母体血と臍体血は85組の脂肪酸組成を分析し、相関性を検討した。総脂肪酸、16:1、18:2、20:4、22:6に相関性があり、16:0、18:0、18:1には相関性は認められなかった。

次に、出生前からのコレステロールの代謝を合成系の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素、細胞にコレステロールを供給する役割をもつLDLレセプターのmRNAの発現量をマウスの脳、肝臓、腎臓を用いて解析した。

その結果、HMG-CoA還元酵素の出生前、オリゴデンドロサイトの増殖時およびミエリン形成期における脳での発現量の増加が認められた。肝臓、腎臓では細胞増殖時による変動を認めたのみであった。また、LDLレセプターのmRNAの発現量に大きな変動は認められなかった。

目 的

胎児および乳幼児の正常な成長・発達のために脂質は重要な役割を担っている。これらの脂質のうち脂肪酸は胎児期に胎盤で合成されるかまたは母体から供給されるものである。新生児期にはPUFA (n-3系、n-6系) が脳の正常発達に必須な成分であり、出生時の脂肪酸の蓄積がその後の発達にも大きく影響を及ぼしてくる。胎児への栄養補給は胎盤を通して母体から供給されるので、母体の健康栄養状態はそのまま胎児へと反映していくと考えられる。また、乳幼児へはミルク (母乳、調整乳、牛乳等) によって供給されるが、母乳以外の調整乳や牛乳の場合はその成分内容が問題となってくる。

そこで、分娩時における人の臍体血、母体血、および調整乳、母乳中の脂肪酸組成の定量を行った。

また、コレステロールも成長・発達に重要な役割をはたしており、生体内におけるその合成系は食事内容 (摂取脂質の差異) や摂取量等によって調節されている。神経の発達にコレステロールの合成が重要な働きをしていることはこれまでの研究 (1、2) によって明らかとなっており、脳の髄鞘化を含めた成熟に影響することも考えられる。胎児期から乳幼児期そして小児期へと成長していく発達段階でのコレステロールの代謝を1. コレステロールの合成系における律速酵素の一つであるHMG-CoA還元酵素、2. 細胞にコレステロールを供給する役割をもつLDLレセプターのmRNAの発現量をマウスの

脳、肝臓、腎臓を用いて解析した。

対象と試料

(1)

初乳は36例の分娩後の母親から承諾後入手し、 -40°C で凍結保存した。この母親から出生した児の男女比は8:11であった。在胎週数は37~40週、平均37.7週であった。平均出生体重は $2,970 \pm 430\text{g}$ であった。

同じく承諾を得たうえで、85組の母体血と臍体血を採取した。それぞれ母体血は分娩中に正中動脈血より約30ml、臍体血は児娩出後、臍体結紮以前に臍体静脈より約20ml採取した。得られた血液は全てEDTA入りのスピッツに移し換え、遠心分離した後血漿成分を -40°C で凍結保存した。

調整乳は新生児期から利用できるものと、生後6カ月からのフォローアップミルクについて分析を行った。

(2)

マウスはddYを使用した。在胎日数16日の妊娠マウスより胎児を取り出し、その脳、肝臓、腎臓の各臓器を摘出し液体窒素にて凍結後、Total RNA抽出まで -80°C で保存した。同じく出生後の発達段階をおって0、5、10、15、20、25日齢のマウスおよび、コントロールとして成熟マウスの脳、肝臓、腎臓の各臓器を摘出し同様に凍結保存した。

リボプローブは、マウスHMG-CoA還元酵素と、マウスLDLレセプターを使用した。いずれもマウスcDNA配列により、鋳型を作製し、非特異的バンドの最も少ないものを用いた。対照として、ハウスキーパー遺伝子である、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を使用した。

方 法

(1)

血漿0.4mlを2時間凍結乾燥した後、5%塩酸メタノール2.5mlを加え、 85°C で2時間加熱し、メチル化を行った。再蒸留水2.5mlとヘキサン5.0mlを加え振とうした後、3,000rpm、10分間遠心分離した。窒素ガスで濃縮乾固後クロロフォルム・ヘキサン(1:1)、 $50\mu\text{l}$ に溶解し、脂肪酸メチルエステルを得た。定量分析のために脂肪酸の分析は、予めGCMSにより脂肪酸の同定を行い、内部標準としてC21:0を用いた。分析は島津15Aガスクロマトグラフィーを用いた。カラムはHSS1-PM50を充填したキャピラリーカラム(0.25mm×50m)を使用した。脂肪酸の分析は、カラム温度 260°C 、昇温プログラム(初期温度 160°C から 190°C 、 $3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 190°C から 200°C 、 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 200°C から 215°C 、 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、ホールデンタイム、20分)で行った。

(2)

マウスからのRNA抽出

凍結保存後の脳、肝臓、腎臓の各臓器は、Total RNAはIsogen kit (ニッポンジーン製) を用いて抽出した。出生以前の試料は同腹仔の臓器をプールして抽出した。いずれも、エタノール：二炭酸ジエチル (Diethyl Pyrocarbonate, DEPC) 処理再蒸留水 (1:1) に溶解し、 -80°C にて分析まで保存した。

リボプローブ作成

それぞれのプローブは表1に示したとおりの配列である。

使用するフラグメントはマウス肝臓RNAから、Gene Amp RNA PCR kit (Perkin-Elmer社) を用いてそれぞれ増幅した。

これらをベクターであるpCR-II (Invitrogen製) に組込んだ。

Table 1. Summary of primer pairs used of make cDNA as a template of riboprobe preparation.

Probe	Primer	size(nt)
HMG-CoA reductase	Forward 5'- ⁶³⁸ AAGATCTTCAAGGAACGTGC ⁶⁵⁷ -3'	312
	Backward 5'- ⁹⁴⁹ AACTGTAGCTCACATCTGTG ⁹³⁰ -3'	
LDL receptor	Forward 5'- ⁷³ ACTCAGGCAGCAGGAACGAG ⁹³ -3'	221
	Backward 5'- ²⁷⁵ GTCATTTTCACAGTCTACCT ²⁹⁴ -3'	
GAPDH	Forward 5'- ⁵⁵¹ AGAACATCATCCCTGCATCC ⁵⁷⁰ -3'	307
	Backward 5'- ⁹⁵⁷ TTGTCATTGAGAGCAATGCC ⁹³⁸ -3'	

HMG-CoA reductase; Helmberg.(1990). (7)

LDL receptor; Hoffer.(1994). (8)

GAPDH; Sabath.(1990). (9)

ベクターに挿入した配列はダイデオキシ末端標識法でシークエンスの確認を行った (SQ 3000 DNA sequencer (日立))。

リボプローブはin vitro transcription assayを用い、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTPにより標識化を行い、DNase Iで処理したのち精製した (Riboprobe Gemini II kit (Promega社))。

RNaseプロテクションアッセイ

RNaseプロテクションアッセイはRPA II kit (Ambion) を用いて行った。Total RNA量は各々5 μ gを使用した。これらのRNAを [α - 32 P] UTPにより標識化したリボプローブとハイブリダイズさせる反応を、マウスHMG-CoA還元酵素は42°C、マウスLDLレセプターとGAPDHは50°Cで、オーバーナイトで行った。ハイブリダイズしていないシングルRNAを、RNase AとRNase T1で処理した。エタノール沈殿後、色素の入ったローディングバッファーに溶解し、95°C、3分間加熱処理した。4%のポリアクリルアミド変成ゲルによる電気泳動で分離し、ゲル乾燥後、イメージングプレートに露光させた。mRNAに相当するバンドをBAS-2000(フジフィルム)を用いてphotostimulated luminescence (PSL) で評価した。データはすべてGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を対照として補正を行った。

結 果

(1)

初乳と調整乳の脂肪酸組成

初乳の脂肪酸と調整乳の脂肪酸の結果を表2に示した。初乳中ではオレイン酸 (18:1 n-9) が最も多く、パルミチン酸 (16:0) とリノール酸 (18:2 n-6) がこれに続いた。ドコサヘキサエン酸 (22:6 n-3) は総脂肪酸の約1%を占めた。調整乳A、Bにおいてはオレイン酸が最も多く、パルミチン酸 (12:0) がこれに続いた。ドコサヘキサエン酸は調整乳Aで約0.2%、調整乳Bで約0.3%であった。初乳に比べ調整乳では、ラウリン酸など中鎖脂肪酸が過剰に多く、DHAなどの長鎖高度不飽和脂肪酸が不足していた。

母体血と臍体血の脂肪酸組成と相関性

母体血と臍体血の脂肪酸組成を分析し、ピアソンの積率相関係数よりこれらの相関性を調べた。

(表3、4)

母体血の脂肪酸総量は $5.05 \pm 1.22 \text{ mg/ml}$ であるのに対し、臍体血では $1.24 \pm 0.42 \text{ mg/ml}$ ($n=85$) と低く、両者間には有意な相関性 ($p < 0.05$) も認められた。主な構成脂肪酸のうち、パルミトレイン酸 ($p < 0.05$)、リノール酸 ($p < 0.05$)、アラキドン酸 ($p < 0.05$)、ドコサヘキサエン酸 ($p < 0.05$) には母体血と臍体血でそれぞれ相関が認められたが、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸では相関性は認められなかった。

Table 2. The Percentage Composition of Fatty Acids in Colostrum of Japanese and Infant Formulas (Mean \pm SD)

Fatty Acid	Colostrum n=36	Infant Formulas	
		* A	B
10:0	0.81 \pm 0.65	1.81 \pm 0.32	1.04 \pm 0.40
12:0	5.55 \pm 4.30	21.77 \pm 6.61	15.64 \pm 4.88
14:0	6.84 \pm 2.11	7.74 \pm 1.78	5.30 \pm 1.22
16:0	22.11 \pm 2.92	19.96 \pm 1.67	22.31 \pm 1.42
16:1	2.84 \pm 0.74	0.26 \pm 0.02	0.28 \pm 0.07
18:0	4.78 \pm 1.18	4.26 \pm 0.35	3.86 \pm 0.46
18:1 n9	34.10 \pm 3.28	26.62 \pm 4.20	30.54 \pm 3.34
18:2 n6	14.29 \pm 2.38	15.03 \pm 2.12	17.98 \pm 1.08
18:3 n3	1.48 \pm 0.41	1.71 \pm 0.18	1.97 \pm 0.05
20:0	0.41 \pm 0.41	0.25 \pm 0.09	0.26 \pm 0.06
20:1	1.11 \pm 0.39	0.12 \pm 0.11	0.20 \pm 0.06
20:3 n6	0.55 \pm 0.14	-	-
20:4 n6	0.84 \pm 0.16	-	-
22:1	0.10 \pm 0.03	-	-
20:5 n3	0.24 \pm 0.18	-	-
24:0	0.31 \pm 0.12	-	-
24:1	0.39 \pm 0.27	-	-
22:5 n3	0.47 \pm 0.16	-	-
22:6 n3	1.11 \pm 0.54	0.20 \pm 0.04	0.33 \pm 0.05
Total short	92.79 \pm 17.96	99.17 \pm 17.25	98.93 \pm 12.91
Total long	5.51 \pm 2.40	0.57 \pm 0.24	0.79 \pm 0.17

* A : Sample code for infant formula designed for neonates;

B : for babies older than 6 months old.

Table 3. Correlations of Fatty Acid Profiles (Concentration) in Maternal and Fetal Plasma

Lipid Profile	Maternal Blood	Cord Blood	rs*	p
Total Fatty Acids (μ g/ μ l)	5.05 \pm 1.22	1.24 \pm 0.42	0.2189	<0.05
Palmitic Acid(μ g/ μ l)	1.37 \pm 0.39	0.35 \pm 0.11	0.2003	n.s.
Palmitoleic Acid(μ g/ μ l)	0.15 \pm 0.07	0.05 \pm 0.02	0.2469	<0.05
Stearic Acid(μ g/ μ l)	0.24 \pm 0.05	0.12 \pm 0.04	0.1011	n.s.
Oleic Acid(μ g/ μ l)	1.21 \pm 0.37	0.24 \pm 0.23	0.0922	n.s.
Linoleic Acid(μ g/ μ l)	1.30 \pm 0.28	0.14 \pm 0.05	0.2624	<0.05
Arachidonic Acid(μ g/ μ l)	0.20 \pm 0.06	0.12 \pm 0.05	0.2997	<0.05
Docosahexaenoic Acid(μ g/ μ l)	0.15 \pm 0.05	0.05 \pm 0.02	0.5227	<0.05

*rs:Pearson's correlation coefficient by ranks

n=85

n.s.: not significant

Table 4. The Percentage Composition of Fatty Acid in Cord Blood, Maternal Blood of Japanese (Mean \pm SD)

Fatty Acid	Cord Blood	Maternal Blood
12:0	0.15 \pm 0.29	0.10 \pm 0.08
14:0	0.86 \pm 0.26	1.14 \pm 0.33
16:0	29.69 \pm 2.09	27.67 \pm 2.01
16:1	3.76 \pm 0.90	3.00 \pm 0.89
18:0	10.25 \pm 0.82	5.03 \pm 2.29
18:1 n9	18.78 \pm 2.39	23.88 \pm 2.37
18:2 n6	12.39 \pm 1.47	26.25 \pm 2.84
18:3 n3	0.24 \pm 0.10	0.85 \pm 0.15
20:0	0.57 \pm 0.10	0.32 \pm 0.06
20:1	0.10 \pm 0.04	0.23 \pm 0.07
20:3 n6	2.92 \pm 0.44	1.14 \pm 0.27
20:4 n6	10.72 \pm 1.84	4.05 \pm 0.75
22:1	0.75 \pm 0.13	0.40 \pm 0.07
20:5 n3	0.65 \pm 0.34	0.77 \pm 0.43
24:0	0.38 \pm 0.21	0.13 \pm 0.04
22:4 n6	0.73 \pm 0.19	0.28 \pm 0.06
22:5 n6	0.38 \pm 0.22	0.13 \pm 0.05
24:1	1.32 \pm 0.54	0.80 \pm 0.17
22:5 n3	0.39 \pm 0.25	0.36 \pm 0.09
22:6 n3	4.30 \pm 1.68	2.93 \pm 0.82
Total n-3	5.58 \pm 2.38	4.91 \pm 1.49
Total n-6	27.13 \pm 4.16	31.85 \pm 3.97
Total satur	41.90 \pm 3.77	34.38 \pm 4.80
Total unsatur	57.41 \pm 10.54	65.07 \pm 9.03
Total mono	24.71 \pm 4.00	28.31 \pm 3.57
Total poly	32.71 \pm 6.53	36.76 \pm 5.46
Total short	76.12 \pm 8.32	87.92 \pm 10.96
Total long	23.19 \pm 5.99	11.53 \pm 2.87

n=85

(2)

出生前後のLDL受容体とHMG-CoA還元酵素の発現量の解析は、成熟マウスを基準としてGAPDHを対照として用い、比率 (PSL) を補正し検討した。出生前5日 (妊娠16日齢) の検体は同腹の胎仔のマウスの各々の臓器をプールして用い、n=3で行った。残りの日齢はこれまでと同様に個体毎でn=8で行った。脳におけるHMG-CoA還元酵素の発現量は-5日齢と5日齢で約6~7倍の増加が認められ、また0日齢および20日齢で約3倍の増加が認められた (図1)。肝臓では-5日齢は0日齢より高く、その後は徐々に増加して25日齢でピークとなった (図2)。腎臓ではやはり-5日齢は0日齢より発現量が高く、15日齢で少し減少が認められた (図3)。LDLレセプターのmRNAレベルは成長に

伴う特に大きな変動は認められなかったが、脳と肝臓における-5日齢は0日齢より発現量が大きく、コントロールにくらべほぼ同値またはわずかに低値であったが、腎臓では、コントロールと比較しほぼ同じ値またはわずかに高値であった(図4)。

Fig.1 HMG Co-A reductase mRNA level in mouse brain

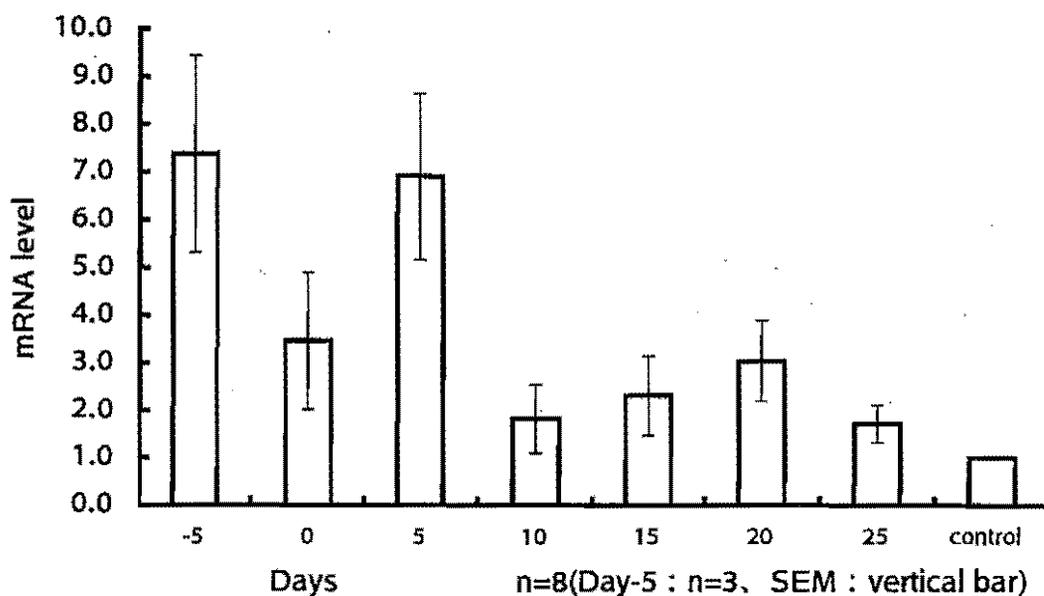


Fig.2 HMG Co-A reductase mRNA level in mouse liver

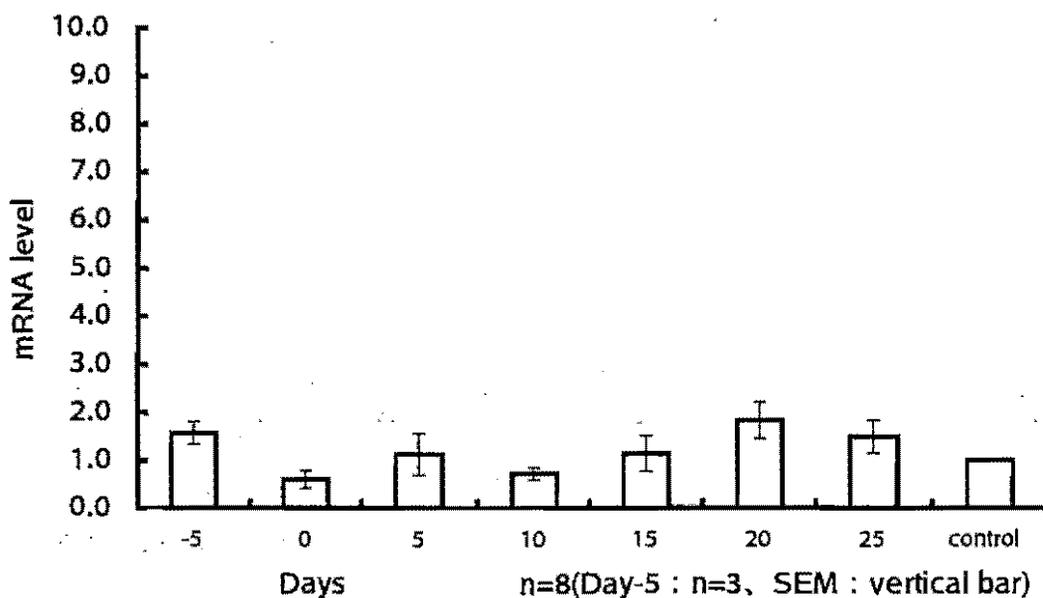


Fig.3 HMG Co-A reductase mRNA level in mouse kidney

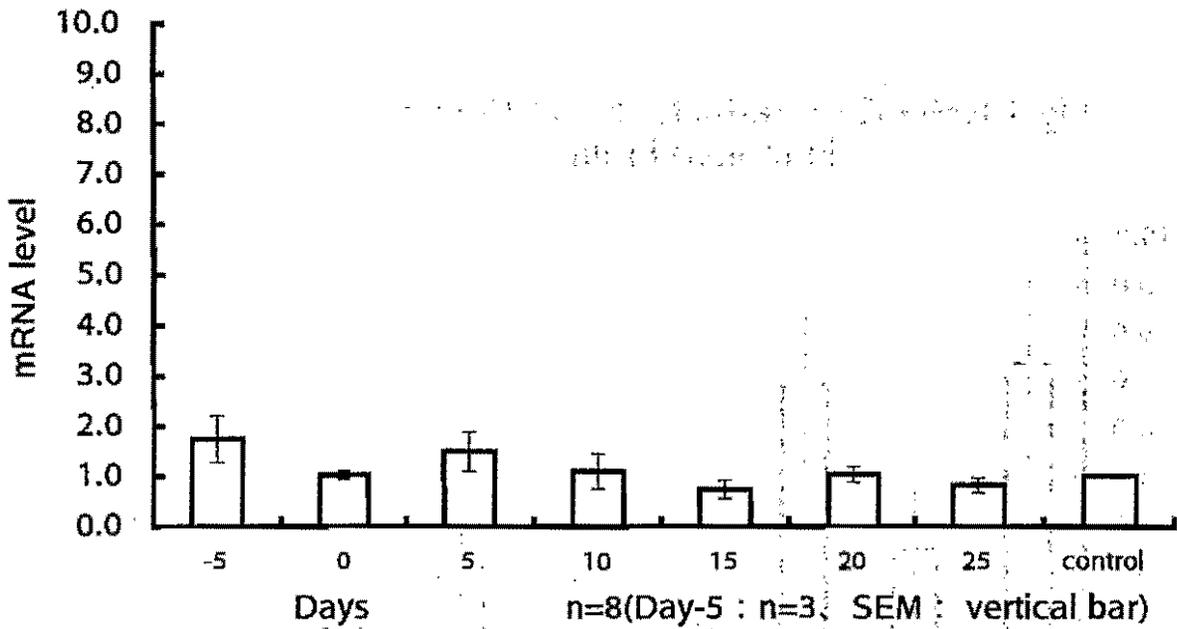
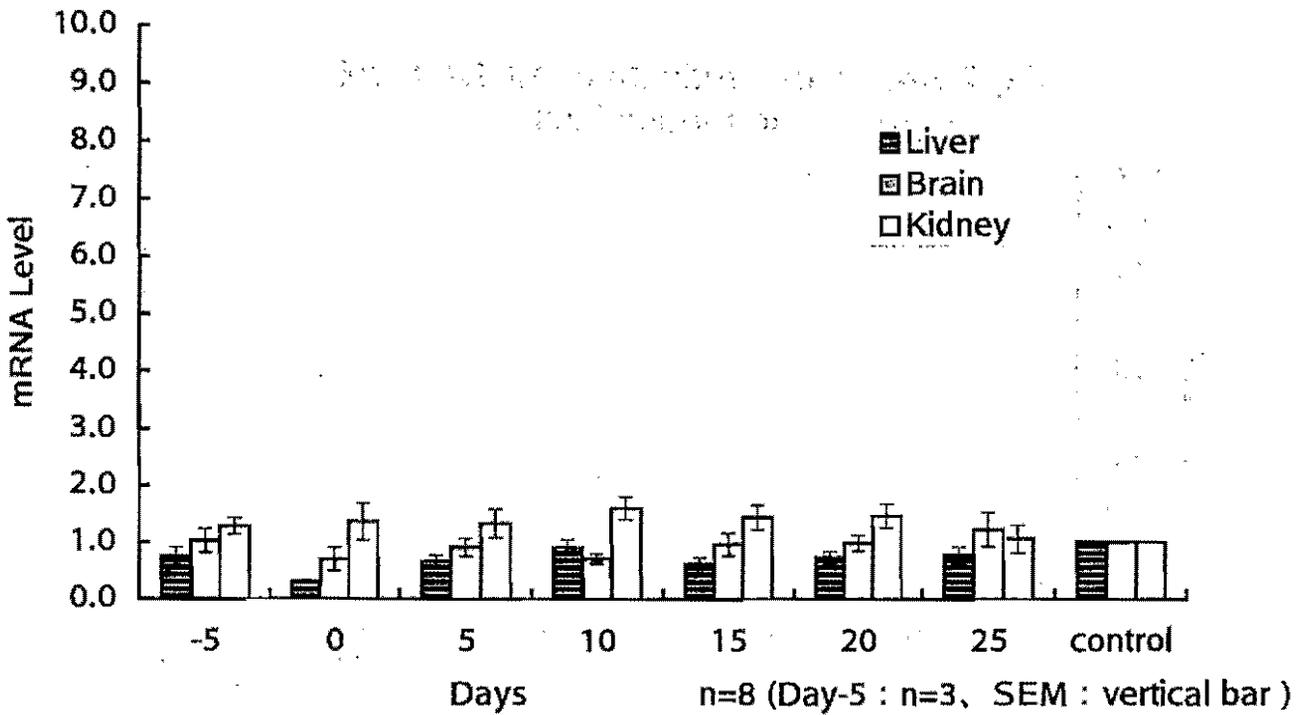


Fig.4 LDL receptor mRNA Level in Mouse



考 察

(1)

ヒトや動物の必須脂肪酸は、リノール酸 (18:2 n-6) および α -リノレン酸 (18:3 n-3) を中心に、それぞれn-6系列およびn-3系列の脂肪酸がある。前者はヒトの成長や皮膚の水分浸透調節、およびアラキドン酸の代謝産物であるエイコサノイド (プロスタグランジン I_2 (PGL $_2$)、トロンボキサン A_2 (TXA $_2$) など) の生理作用のために必須であると、また後者はエイコサノイド (プロスタグランジン I_3 (PGL $_3$)、トロンボキサン A_3 (TXA $_3$) など) や、脳や網膜の発達や機能に有効であると考えられている。必須脂肪酸はヒトや動物の体内では合成されないので、食餌によってリノール酸や α -リノレン酸等の必須脂肪酸は摂取されなければならない。

胎児や乳幼児においても、その成長のためには多くの脂質が必要で、成長に必要な脂肪酸をそれぞれ胎児は胎盤を通じて母体より、乳幼児は母乳や調整乳によって獲得しているものと考えられる。表2に示す通り、母体血と臍体血の間には、主要な必須脂肪酸の含有量に相関性が認められることより、胎児に必要な栄養素としての必須脂肪酸は、母体をとおして供給されることが示唆される。また母体血や母乳中の必須脂肪酸の含有量も食餌の影響を受けて変化するものであり (3、4)、妊娠中および授乳期間中に母体がこれら必須脂肪酸を十分に摂取することも重要であると考えられる。同様に調整乳の脂質成分はそれを摂取する乳幼児の脂質含有量に変動を及ぼしその成長に大きく関与していくことが考えられる。しかしながら、現時点では、成人はもとより胎児、乳幼児にとってその成長・発達に必要な脂肪酸の量や組成 (n-6/n-3比) などは明らかとなっていない (5)。近年、 α -リノレン酸やその代謝経路上のエイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) が生理活性物質として注目を浴びるようになってきており、n-6系列だけでなく、n-3系列の必須脂肪酸の重要性も示唆されてきている。

出生直後における臍体血中の脂質分析のデータにおいて臍体静脈血と臍体動脈血を比較した場合、コレステロール含量やLDLコレステロールには有意な差は認められなかった (データ未表示)。このことはコレステロールの供給が母体の臍体静脈に依存しているとは考えにくく、胎児自身の合成によりまかなわれている可能性が高いと考察される。

(2)

HMG-CoA還元酵素の脳の発現量は-5、0、5、20日齢で増加が認められた。0日齢での増加は、SEMの値が示すように個体差が生じているので、確実な増加であると判断できかねる。LDL受容体の発現量が一定で変化が見られないことより、-5日齢での増加は胎仔の脳の発達に伴う細胞増殖時に合成されるコレステロールによるものと考えられる。5日齢での増加はオリゴデンドロサイトの増殖に伴うものと考えられる。20日齢の増加は髄鞘化に伴うものと考えられる。胎生期、オリゴデンドロサイトの増殖による約7倍の増加量を、ミエリン形成期における3倍の増加量を示すものであった。また、他の臓器と比較してもコントロール群に対して増加量が大きく脳の形成発達に際し必要とされ

るコレステロールの胎児期、乳児期における重要性が明示された。

コレステロールも成長・発達に重要な役割をはたしており、生体内におけるその合成系は食事内容（摂取脂質の差異）や摂取量等によって調節が行われている。神経の発達にコレステロールの合成が重要な働きをしていることはこれまでの研究によって明らかとなっており、脳の髄鞘化を含めた成熟に影響することも考えられる。ステロイド、胆汁酸など、側鎖の系ではドリコール、ユビキノンフェルネシル化蛋白などの前駆体でもある。これらの前駆体は生体の成長・発達に重要な役割を果たしている（1、2）。成人にとってコレステロール過剰摂取等が動脈硬化の成因であると言われているが、成長・発達期にある胎児、乳幼児にとっては欠くことのできない脂質成分である。Smith-Lemli-Opitz症候群は、様々な臓器や器官の発達不良による奇形を引き起こす先天性の奇形症候群であるが、コレステロール合成系の最後の酵素の障害により、胎児期におけるコレステロールの不足が原因と考えられている（6）。コレステロール代謝の研究は肝臓を中心に精力的に行なわれている。しかし、他の脂質代謝との関連性を含め、特に脳の発達の段階をおって経時的に解析が行われた研究は時間と労力を要するために殆ど見られない。

今回は出生前の発現量も検討を行い、HMG-CoA還元酵素及びLDLレセプターはともに出生前における発現量の増加が認められた。出生後、HMG-CoA還元酵素は発達・成長にともない変化しているが、LDLレセプターは発達に伴う変化は認められなかった。この結果はコレステロールが細胞内部での需要に伴い合成されているように考察された。特に脳においては、細胞の増殖と髄鞘形成のための発現量の増加が認められた。

胎児期から乳幼児期そして小児期へと成長していく発達段階でのコレステロールの代謝を検討した。コレステロール代謝の発達に伴う変動を制御する機構、または互いに影響を及ぼし合う因子がどのようなものか解析を続けて行く予定である。今後、摂取脂肪酸の差異によるコレステロールの代謝の変動を検討する予定であり、脳に局在しているPUFA（n-3系、n-6系）であるDHAやEPAを摂取させ、コレステロールの代謝系の成長・発達に伴う変動を検討していきたい。摂取されたPUFA（n-3系、n-6系）と相互に関連しあって代謝が行われている可能性が考えられ、脂肪酸とコレステロールの関連性を明らかにしていきたい。

文献

- (1) M.S. Brown and J.L. Goldstein.
J. Lipid Res.1980 21:505-517.
- (2) J.L.Goldstein and M.S. Brown,
Nature.1990 343:425-430.
- (3) Connor,W. E., Richard Lowensohn and Lauren Hatcher
Lipids,1996 31: S183-S187.
- (4) Z.-Y. Chen, G. Pelletier, R. Hollywood and W. M/N.
Ratnayake. Lipids, 1995, 30: 15-21.
- (5) Espgan Committee on Nutrition : P. J. Aggett.
Acta. Pediatr. Scand.,1991 80: 887-896.
- (6) G. S. Tint, M. Irons, E. R. Elias, A. K. Batta, R. Frieden,
T. S. Chen and G. Salen. N. Engl. J. Med. 1994 330: 107-113. :
- (7) A. Helmberg, R. Fassler, S. Geley, K.Johere, G.Kroemer,
G. Bock and R. Kofler. J. Immunol. 1990,145:4332-4337.
- (8) M.J. Hoffer, M. M. van Eck, F. Petrij, A. van der Zee, E.
de Wit, D. Meijer, G. Grosveld, L. M. Havekes, M. H. Hofker and
R.R. Frants. 1993 191-3: 880-886.
- (9) D. E. Sabath, H. E.Broome, and M. B Prystowsky.
1990 Gene 91, 185-191.