

<平成22年度助成>

## 安定同位体トレーサーを利用した 動物における脂肪酸の体内動態解析

芝原 章

(大阪府立大学総合リハビリテーション学類栄養療法学専攻)

### 1. はじめに

高度不飽和脂肪酸(PUFA)の栄養特性や機能性については、EPA(イコサペンタエン酸、20:5(5, 8, 11, 14, 17)、以下この二重結合位置のものをEPAとする)やDHA(ドコサヘキサエン酸、22:6(4, 7, 10, 13, 16, 19)、以下この二重結合位置のものをDHAとする)などが注目され、ヒトに及ぼす影響に関する重要な知見が集積されつつある。これらの研究には疫学的な解析研究とともに、食餌に由来する、消化・吸収された各脂肪酸それぞれの代謝速度や、臓器への移行・蓄積など、その体内動態を解析する必要がある、従来では放射性同位体標識脂肪酸が汎用されてきた。しかし現在では、特別な研究室や特殊な事例を除いて、法的規制や実験施設上の制約から安定同位体標識脂肪酸の利用に限られている。

過去、安定同位体標識脂肪酸の合成法については膨大な報告があり種々の総説<sup>1-5)</sup>にまとめられてきた。筆者が注目したのは野田ら<sup>6-7)</sup>によって報告された[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]脂肪酸の合成法である。これを利用して脂肪酸鎖の2, 2位を重水素で標識した[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]パルミトレイン酸(cis-9-ヘキサデセン酸)を化学合成し、これをトレーサーとして高等植物では未確立であったcis-バクセン酸(cis-11-オクタデセン酸)の生合成経路(パルミトレイン酸からの炭素鎖延長経路)を実証<sup>8)</sup>した。さらにcis-バクセン酸の11位の二重結合が9位に移動してオレイン酸が生成し、またこのオレイン酸の9位の二重結合が11位に移動してcis-バ

クセン酸が生成するという、生体酵素系が関与する二重結合の相互変換反応に基づく全く新しい異性化経路の発見<sup>9-10)</sup>に至った。こういった植物を対象とする場合の粗酵素系の実験では、使用する標識体の量はミリグラム単位で充分であったが、動物における食餌に基づく脂肪酸の栄養特性や機能性を追求する実験には、グラム単位での標識体の調製が必要であり、野田ら<sup>6-7)</sup>の方法では大量調製に不向きであった。また同法では200℃で96時間の加熱を要するため、PUFAの標識化は不可能であった。その後約20年間、標識体合成法を模索し続けた結果、混餌経口投与に充分な量(10グラム単位)をそれも飽和脂肪酸からEPAやDHAまでも含むPUFAの標識体を合成する手法を確立した(投稿準備中)。

[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]脂肪酸をトレーサーとする利点は、安定同位体(<sup>13</sup>Cや<sup>2</sup>H)でユニフォーム・ラベルした脂肪酸に比べて同位体効果が小さく実際の生体内動態を的確に追跡できることである。また1サイクルでもβ-酸化を受ければα, β-脱水素の段階で標識は消失するので、もはやトレーサーとしての機能は発揮することができない。1サイクルのβ-酸化で生成したアセチル-CoAには重水素が1個存在するが、これを再利用した脂肪酸の生成の確率はゼロに等しい。このように[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]脂肪酸をトレーサーとして利用すれば、投与したトレーサーそのものの体内動態を、他の要因を排除して、直接追跡することができるので、これが最大の利点となる。本研究は、動物における脂肪酸の体内動態を解析する手始めとし

て企画し、食餌に含まれる [2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHA ならびに [2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]EPA がマウスの脳脂質にどの程度取り込まれるかどうかを主目的に調査したもので、他の臓器との比較データも加えて報告する。

## 2. 実験方法

### 2-1. マウスの飼育

体重17-19gのICR系雄性マウス4週齢を用いた。実験食は、無脂肪AIN-93M標準飼料(大豆油無添加)に[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHAエチルが食餌中4%となるように混合し、これを4週間自由摂食させた(DHA投与群)。同様に[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]EPAエチルを含む実験食を4週間自由摂食させた(EPA投与群)。

### 2-2. 臓器の摘出と脂質の抽出、ならびに脂肪酸メチルの調製

DHA投与群、EPA投与群、コントロール群のマウス(各群5匹、その中から3匹)を、ネブター麻酔下で冷却生理食塩水約20mLを用いて心臓灌流法により脱血し、脳、心臓、肝臓、腎臓を摘出した。各臓器からFolchら<sup>11)</sup>の方法で総脂質を抽出し、ヘキサン/エーテル/酢酸(70/30/1)を展開溶媒とする薄層クロマトグラフィーで複合脂質画分を分取した。次に5%塩酸/メタノールを加えて98℃で一晩加熱し、メタノリシスにより生成した脂肪酸メチルを回収した。次に無水硫酸ナトリウムとエクストレルートを充填したミニカラムで脱水し、さらにシリカゲルを充填したミニカラムで精製してガスクロマトグラフィー(GC)とガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー(GC-MS)用の検体とした。

### 2-3. GCとGC-MS

脂肪酸組成を測定するキャピラリーGCは、機種、SHIMADZU GC-2010型(水素炎イオン化検出器付);カラム、BPX90(100m×0.25mm i.d., 0.25μm df);カラム温度、120℃(2min hold)-3℃/min-260℃(37min hold);キャリアガス、水素(流速、20.0cm/sec);注入方法、スプリッ

ト方式(スプリット比、1/20)で行った。

GC-MSは、GC部、SHIMADZU GC-2010型;MS部、SHIMADZU GCMS-QP2010型;データ処理装置、SHIMADZU GCMS solution;カラム、BPX90(100m×0.25mm i.d., 0.25μm df);カラム温度、120℃(2min hold)-2℃/min-250℃;キャリアガス、ヘリウム(流速、20.0cm/sec);注入方法、スプリット方式(スプリット比、1/20)、気化室温度、250℃;イオン源温度、200℃;インターフェース温度、250℃;イオン化電圧、70eV;検出器電圧、1.0kV;スキャン範囲、70-390m/zで運転した。イオン化方式は、イソブタンを試薬反応ガスとする化学イオン化法(CI)を用いた。

## 3. 結果と考察

### 3-1. GC-CI/MS測定上の問題

GC-CI/MS分析で得た非標識DHAメチル(標準品)のマススペクトルを図1(A)に示す。DHAメチルの擬似分子イオン(QM<sup>+</sup>)がm/z343に出現するとともに、QM<sup>+</sup>+1であるm/z344、ならびにQM<sup>+</sup>+2であるm/z345のイオンピークが確認できる。これらQM<sup>+</sup>+1とQM<sup>+</sup>+2のイオンピークは脂肪酸の構成元素となる炭素、水素、酸素の自然界に存在する質量数の異なる同位体ピークである。図1(A)に示すマススペクトル上でQM<sup>+</sup>:QM<sup>+</sup>+1:QM<sup>+</sup>+2のイオンピーク相対強度比は、DHAメチルの分子式より計算した天然同位体ピーク比(理論値)に一致するはずである。しかし日常のGC-CI/MS分析で取得するマススペクトルにおける相対強度比は、なかなか理論値に一致しない。その原因を種々検討した結果、イオン化室の汚れなど機器の整備上の問題、あるいはコンピュータ処理上の問題よりも、むしろGC-CI/MSへの検体注入量(重量)に大きく依存することが判明した。これは同一検体を濃度を変えて繰り返し分析し、マスキロマトグラフィーで測定したQM<sup>+</sup>の面積を横軸にプロットし、QM<sup>+</sup>+1の面

積を縦軸にプロットすれば、直線性を示す検量線 ( $y=0.2603x$ ,  $R^2=0.9996$ ) が成り立つことで確認した。また  $QM^+ + 2$  の面積を縦軸にプロットした検量線 ( $y=0.054x$ ,  $R^2=0.9161$ ) も直線性を示す。多数の検体を対象とする日常分析で、その検体注入量 (重量) を厳密に揃えることは不可能に近い。これらの検量線を用いることで検体注入量 (重量) の上限・下限が設定され、通常の GC-CI/MS 分析を行う適正感度内で検体測定が終了すれば、測定値はすべて有効となり利用価値は大きい。

図 1 (B) には、非標識 DHA メチル、 $[2-^2H]22:6$  メチル (後述、3-2.項)、ならびに  $[2, 2-^2H_2]$  DHA

メチルが混在する検体のマススペクトルを示す。 $m/z343$  は非標識 DHA メチルの  $QM^+$  であり、 $m/z345$  は非標識 DHA メチルの  $QM^+ + 2$  と  $[2, 2-^2H_2]$  DHA メチルの  $QM^+$  が共存したイオンピークである。

本研究はトレーサーとして用いた  $[2, 2-^2H_2]$  DHA をマウスの臓器脂質中に検出・定量することを目的としている。その臓器脂質にはマウス自身が生合成した非標識体とともに、食餌に由来する標識体が混在している。この混在する検体から標識体を定量するには (図 2 参照)、マスキロマトグラフィーで測定した非標識 DHA メチルの

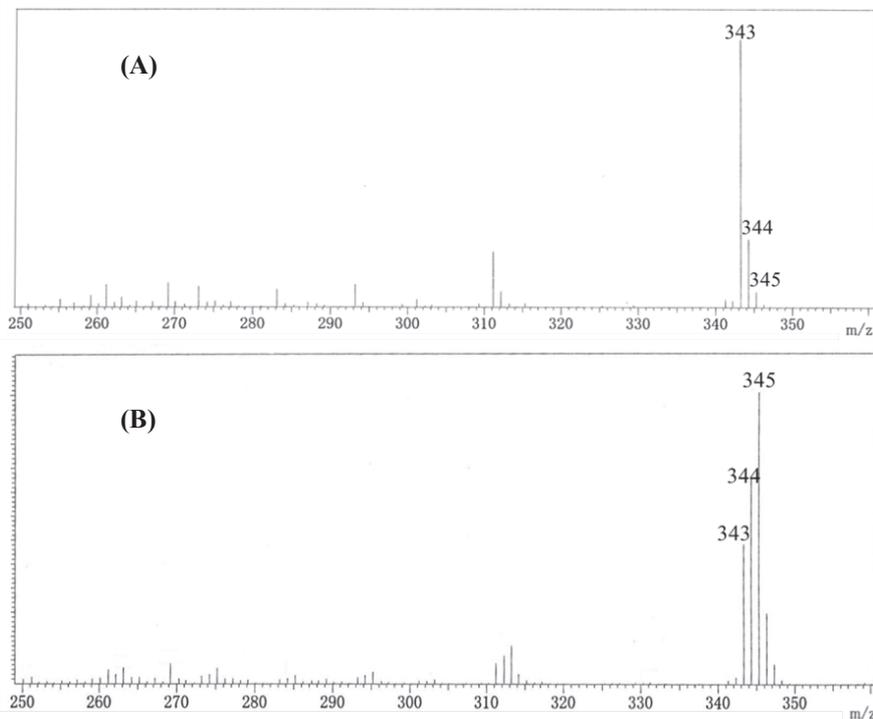


図 1 DHA メチルのマススペクトル (化学イオン化)  
(A) : 非標識体, (B) : 非標識体と標識体が混在

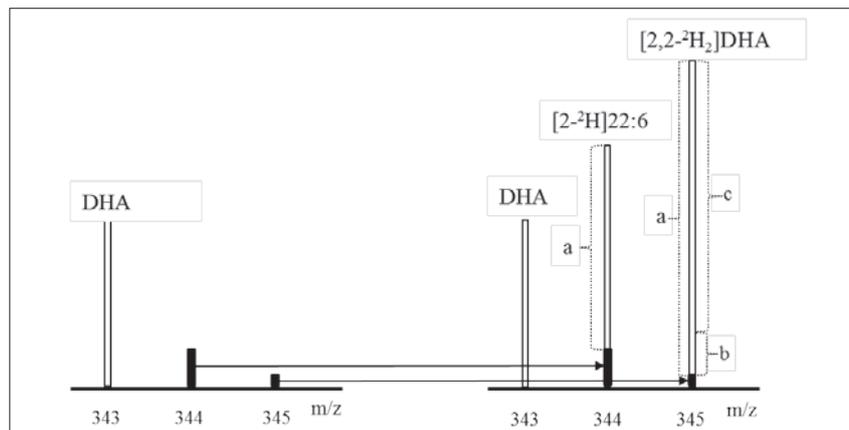


図 2 天然同位体の補正

m/z343 (QM<sup>+</sup>) の面積から、前述の検量線で非標識 DHA メチルの m/z345 (QM<sup>+</sup>+2) の面積を算出する。この面積を、マスクロマトグラフィーで測定した m/z345 の面積から差し引くことで、**図2**の a に相当する [2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHA の面積が求められる。また食餌に由来する重水素 1 個が入った [2-<sup>2</sup>H] 22:6 の真の面積が求められる。目的とする [2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHA の真の面積 c は、[2-<sup>2</sup>H] 22:6 (QM<sup>+</sup>は m/z344) の QM<sup>+</sup>+1 となる m/z345 の面積 b を同様にして作成した検量線から求め、それを差し引くことで求められる。

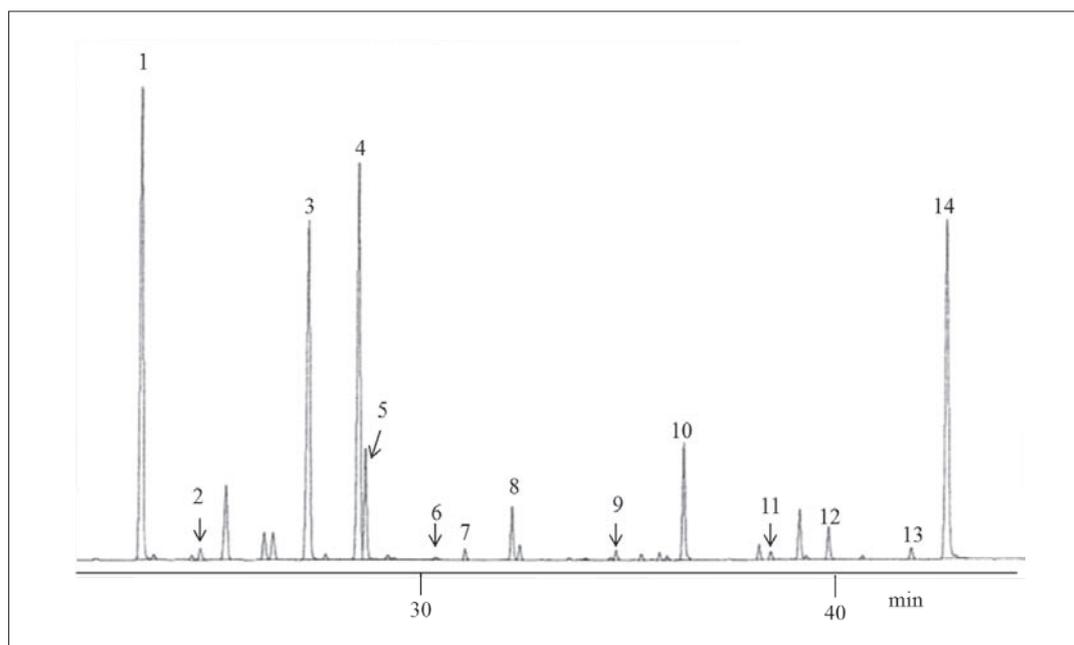
このように本研究で採用する安定同位体トレーサー法では、日常分析で使用される通常の GC-CI/MS 整備状態で分析が可能となる。

### 3.2. マウス脳複合脂質に取り込まれた [2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHA

**図3**に示すガスクロマトグラムは、DHA 投与群のマウス脳複合脂質構成脂肪酸を分析した 1 例 (1 匹分) である。DHA 投与群 3 匹それぞれから得た脂肪酸組成に個体差はなく、ほぼ一定であった。コントロール群と比較すると、DHA の割合は若干増加し (13.9 % から 16.1 %)、アラキ

ドン酸の割合が減少する傾向が見られ (7.4 % から 4.3 %)、EPA が DHA 投与群にのみ検出された (0.3 %)。しかし、飽和脂肪酸、モノエン脂肪酸、全 PUFA の割合は両群に大きな差はなかった。DHA 投与群のマウスは、いわば“DHA 過剰食”で 4 週間も飼育されている。それにもかかわらず、DHA の割合は大幅に増加せず、また全 PUFA の割合もほぼ一定に保たれていた。このことからマウス脳複合脂質の脂肪酸組成は、食餌脂質の脂肪酸組成、言い換えれば体外から供給される脂肪酸の量による影響をほとんど受けずに、独自の組成を維持する機構、すなわち DHA に関しては組成値の上限閾値が厳密に定められていることを意味している。しかし閾値内で存在する DHA は、その約半量が食餌に由来する外因性の DHA で置き換わっていた。その根拠は以下のとおりである。

**図4**は、**図3**に示した検体を GC-CI/MS 分析にかけて得られたマスクロマトグラムである。m/z345, 344, 343 それぞれに応答があり、標識体と非標識体を容易に判別できる。それぞれのピークトップには若干のずれがあり、これは分子内に重水素の数が多いほど GC 上の溶出時間が早い



**図3** マウス (DHA 投与群) の脳複合脂質構成脂肪酸のキャピラリーガスクロマトグラム

1=16:0, 2=16:1 (n-7), 3=18:0, 4=18:1 (n-9), 5=18:1 (n-7), 6=18:2 (n-6), 7=20:0, 8=20:1 (n-9), 9=22:0, 10=20:4 (n-6), 11=20:5 (n-3), 12=22:4 (n-6), 13=22:5 (n-3), 14=22:6 (n-3)

という同位体効果によるものである。m/z345のピークは、前述したように、[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHAメチルのQM<sup>+</sup>と非標識DHAメチルのQM<sup>+</sup>+2が合算されたものである。さらに、**図2**に記載したm/z344に相当する[2-<sup>2</sup>H]22:6に由来する天然同位体ピークもこの合算に参与している。これらを3-1.項の方法で補正後、22:6ピークに相当する非標識体と標識体を百分率で示したものを**表1**にまとめた。

DHA投与群では3匹のマウスとも、脳複合脂質を構成するDHAの約半量が食餌に由来する[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHAに置き換わっていた。以上のことから、消化・吸収された[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHAは、あるいは少なくともその一部は、β-酸化や再合成などの代謝を受けることなくそのままの形で血液脳関門を通過し、脳の複合脂質へ取り込まれた、と結論づけられる。

なお**図4**と**表1**に記載した[2-<sup>2</sup>H]22:6とは、[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHAのβ-酸化でEPAが生じる過程の中間体、[2-<sup>2</sup>H]22:6(3, 7, 10, 13, 16, 19)あるいは[2-<sup>2</sup>H]22:6(t2, 7, 10, 13, 16, 19)、ではないかと推定しているが構造確定には至っていない。[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHAの1サイクルのβ-酸化からEPAが生成する過程を以下に示す。

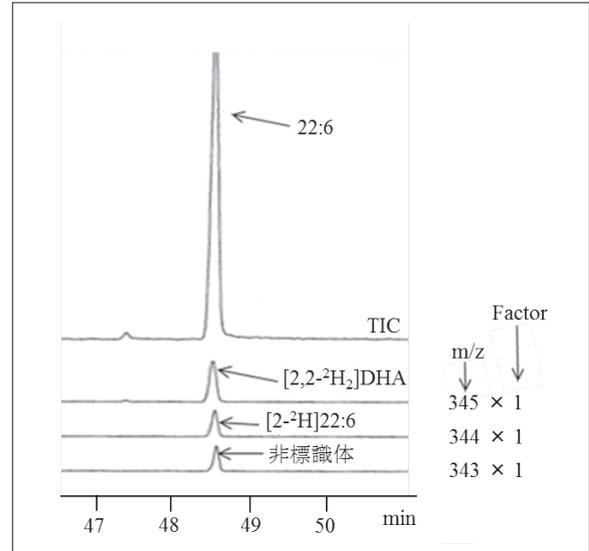
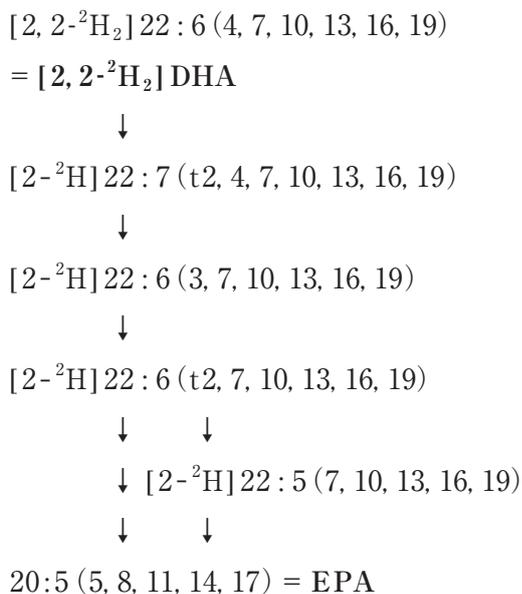


図4 マウス(DHA投与群)の脳複合脂質構成脂肪酸のマスククロマトグラム

表1 22:6ピークにおける非標識体と標識体の百分率

DHA投与群	非標識体	標識体	
		[2- <sup>2</sup> H]22:6	[2,2- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]DHA
マウス-1	26.9	24.3	48.8
	(4.5)	(4.0)	(8.1)
マウス-2	26.6	25.5	47.9
	(4.1)	(4.0)	(7.5)
マウス-3	26.5	25.0	48.5
	(4.3)	(4.0)	(7.8)
平均	26.7	24.9	48.4
	(4.3)	(4.0)	(8.3)

( ) は総脂肪酸に占める割合 (wt%)

本研究で検出したm/z344に相当するピーク(**図4**、**表1**)は、炭素数が22で二重結合が6つあり、重水素が1個入った脂肪酸であることは確実である。

従来、放射性同位体トレーサー法を利用することで行われていたこのような実験が、通常の実験室で何ら制約を受けることなく行えるということは、今後の学問の進歩に大きく貢献するものと期待できる。本研究ではマウスの全脳を用いた。脳を細分化し脳各部位におけるDHAの取り込みの度合いや、蓄積の時間経過などを追跡することも可能である。また脳複合脂質は、さらに各種脂質

クラスに細分化して分析することも今後必要となろう。

### 3.3. マウス脳複合脂質に取り込まれた [2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]EPA

本研究のコントロール群マウスでは、脳複合脂質構成脂肪酸としてEPAは検出されなかった。哺乳類の脳脂質に存在するEPAについては、全く検出されないとする論文と、微量に存在すると記載する論文の両方が発表されている。本研究では [2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHA の投与と全く同一の飼育条件と分析条件で、[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]EPA が血液脳関門を通過するかどうかを検証してみた。

図5には、EPA投与群マウスの脳複合脂質か

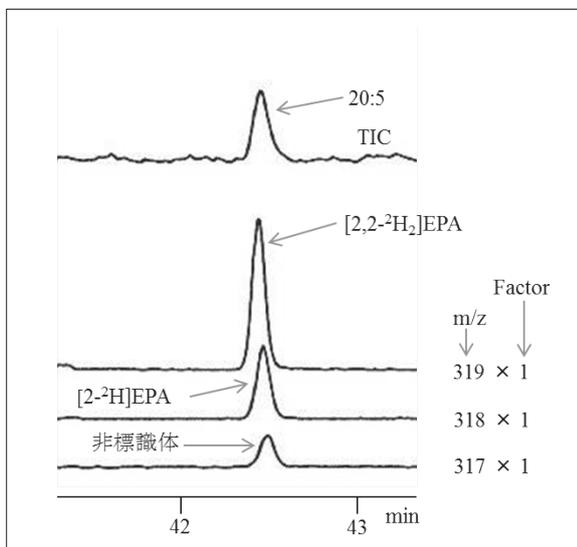


図5 マウス(EPA投与群)の脳複合脂質構成脂肪酸のマスクロマトグラム

表2 20:5ピークにおける非標識体と標識体の百分率

EPA投与群	非標識体	標識体	
		[2- <sup>2</sup> H]EPA	[2,2- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]EPA
マウス-1	17.7 (0.1)	30.7 (0.2)	51.7 (0.4)
マウス-2	23.6 (0.2)	34.8 (0.2)	41.6 (0.3)
マウス-3	20.8 (0.1)	35.4 (0.2)	43.8 (0.3)
平均	20.7 (0.1)	33.6 (0.2)	45.7 (0.3)

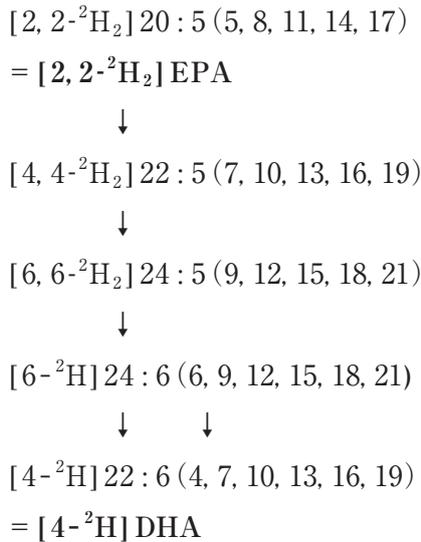
( ) は総脂肪酸に占める割合 (wt%)

ら調製した脂肪酸メチルのマスクロマトグラムを示す。また表2には、20:5ピークに相当する非標識体と標識体の百分率を示す。20:5ピークの総脂肪酸に占める割合は、GCにより約0.6%と定量されている。

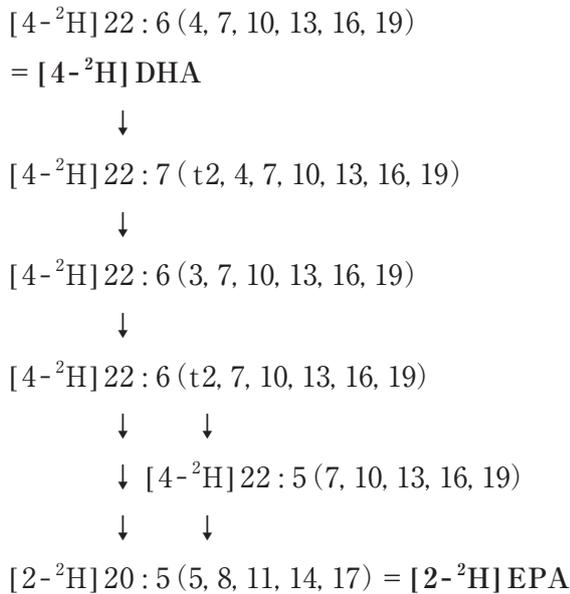
m/z319は[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]EPAのQM<sup>+</sup>であり(図5)、20:5ピークの40-50%(表2)が食餌に由来する[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]EPAそのものであった。これらの結果は、EPAが血液脳関門を通過できることがほぼ確実であることを示唆している。ただし本研究でのEPA投与群マウスは、DHA投与群の場合と同様に、いわば“EPA過剰食”で4週間も飼育されている。マウス体内のEPAプールにどの程度のEPAが存在すれば、血液脳関門を通過して、脳複合脂質に取り込まれるかについては現在のところ不明である。

前述したが(3.2項の図3)、EPAはDHA投与群に検出(0.3%)された。Ouelletら<sup>12)</sup>は、Control dietで飼育したマウスの脳にはEPAが検出されず、High-DHA dietで飼育したマウスの脳に0.2%検出したと報告した。過剰なDHA摂取が、脳複合脂質におけるEPAの存在に関与していることに間違いはなさそうである。EPAとDHAは脂肪酸代謝の上で密接に関係している。動物の生存にとって最も重要な臓器とされる脳の、それも脳機能に関与する複合脂質に、なぜ本来必要ではない脂肪酸がアシル基として取り込まれているのかについては、今後追求しなければならない大きな課題である。脳の高度機能化をDHAが担っているのであれば、逆に、EPAの存在が脳の高度機能化を阻害する可能性は否めない。なお、本研究とは別に行った安定同位体で標識したトランス脂肪酸の投与と実験から、トランス脂肪酸は血液脳関門を通過しないという結論を得ている。

図5と表2に記載した[2-<sup>2</sup>H]EPAの由来は、以下に示す経路<sup>13)</sup>により[4-<sup>2</sup>H]DHAへ変換後、



以下に示すように1サイクルのβ-酸化を受けて生成したと考えている。



この実験をもし放射性同位体トレーサーである[1-<sup>14</sup>C]EPAを用いて行ったとすると、[1-<sup>14</sup>C]-EPAはEPA → DHA → EPAの系を経てもそのまま[1-<sup>14</sup>C]EPAの形で検出されるので、生体内代謝を受けたかどうかは判別できない。しかし本研究で用いた[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]EPAは、EPA → DHA → EPAの系を経れば[2-<sup>2</sup>H]EPAとなるので、そのままの形である[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]EPAと明瞭に区別できる。本研究で検出したマウス脳複合脂質に存在する標識されたEPAは、食餌に由来するEPAそのものと、再合成されたEPAという2種類の標識体で構成されていることが分かる。

データ表示は省略したが、EPA投与群マウスの脳複合脂質には重水素2個が入った[4, 4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]22 : 5 (7, 10, 13, 16, 19)と、重水素1個が入った[4-<sup>2</sup>H]22 : 5 (7, 10, 13, 16, 19)と[4-<sup>2</sup>H]-DHAも検出・定量している。22 : 5 (7, 10, 13, 16, 19)はDPAと略され、慣用名となったEPA、DHAとともに、n-3系PUFAの相互変換に関与する重要な脂肪酸となっている。血液脳関門が関与する脳内へのPUFAの取り込みや、脳内でのPUFAのβ-酸化など、ここ3-4年間の成果<sup>12,14-18)</sup>は著しい。

3.4. マウス各臓器複合脂質に存在する標識体

食餌に由来する[2, 2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHAならびに[2, 2-

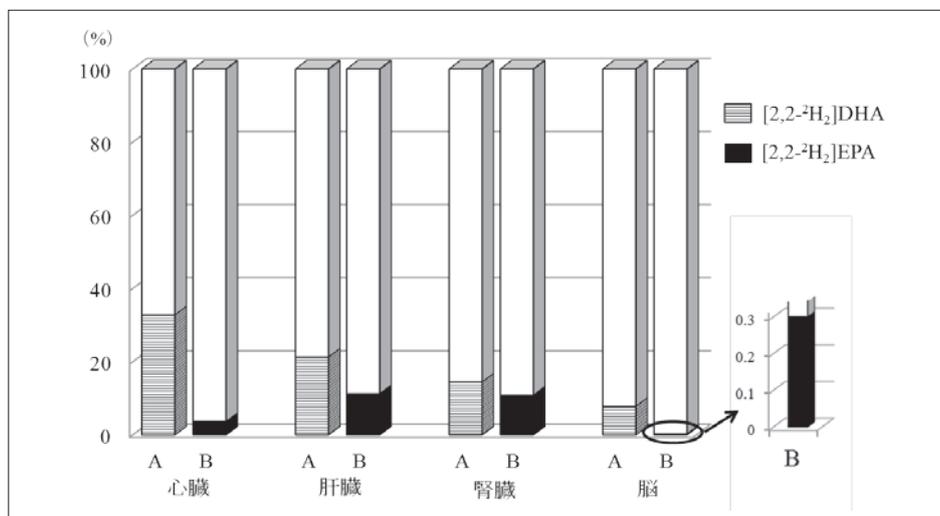


図6 マウス各臓器の複合脂質に存在する標識体 (wt%)  
 A: DHA投与群, B: EPA投与群

$^2\text{H}_2$ ]EPAは、そのままの形、あるいは代謝されて別の脂肪酸となり、マウス各臓器の複合脂質に存在した。図6では、各臓器の複合脂質を構成する総脂肪酸を100%とし、重水素が2個入った脂肪酸のみを標識体として割り振りしている。これによると、DHA投与群マウスの心臓では、複合脂質を構成する総脂肪酸の30%以上が食餌に由来する[2,2- $^2\text{H}_2$ ]DHAに置き換わっていた。またEPA投与群マウスの心臓では、肝臓や腎臓に比べて[2,2- $^2\text{H}_2$ ]EPAの占める割合は低い(10%以下)、[2,2- $^2\text{H}_2$ ]EPAに由来する代謝産物(標識されたEPA, DPA, DHA)を加算すると総脂肪酸に占める割合は30%近くにもなる。従ってマウスの心臓複合脂質構成脂肪酸は、肝臓や腎臓のそれに比べて、食餌に由来するPUFAの影響を受けやすいと言えるであろう。

本研究では、マウスはいずれも“DHA過剰食”あるいは“EPA過剰食”で飼育されたものである。[2,2- $^2\text{H}_2$ ]脂肪酸を任意の割合で配合した通常の脂肪酸組成をもつ食餌を作成し、それでマウスを飼育するコントロール実験も、“過剰食”投与の対象として行うことが可能である。

1. 項で述べたように、飽和脂肪酸はもとより、モノエン脂肪酸、ジエン脂肪酸、そして最も不飽和度が高いヘキサエン酸までを対象として、その標識体を合成する手法は確立された。さらに10グラム単位での標識体調製も容易に行える。今後、動物における脂肪酸の栄養特性や機能性を追求する研究には、[2,2- $^2\text{H}_2$ ]脂肪酸を用いる安定同位体トレーサー法が強力な武器になるものと思われる。

## 謝 辞

本研究は、(公財)浦上食品・食文化振興財団の研究助成なしでは遂行できなかったことを記して、同財団へ深謝の意を表します。また筆者の長年にわたる共同研究者である本学准教授山本公平

博士、ならびに共同研究を行って頂きました富山大学和漢医薬学総合研究所の浜崎智仁先生、長澤哲郎先生、富山大学医学部の浜崎景先生、データ解析を担当された本学大学院博士前期課程修士の吉田有里氏に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Dinh-Nguyen N, Raal A (1978) Perdeuterated normal-chain saturated mono- and dicarboxylic acids and methyl esters. *Prog Chem Fats Other Lipids*, 16:195-206.
- 2) Tulloch AP (1979) Synthesis of deuterium and carbon-13 labelled lipids. *Chem Phys Lipids*, 24:391-406.
- 3) Rakoff H (1982) Preparation of fatty acids and esters containing deuterium. *Prog Lipid Res*, 21:225-254.
- 4) Tulloch AP (1983) Synthesis, analysis and application of specifically deuterated lipids. *Prog Lipid Res*, 22:235-256.
- 5) Rohwedder WK (1985) Mass spectrometry of lipids labeled with stable isotopes. *Prog Lipid Res*, 24:1-18.
- 6) 野田万次郎, 三宅宏二 (1982) 2,2-重水素化脂肪酸メチルエステルの合成とそのプロトン核磁気共鳴スペクトル. *油化学*, 31:154-158.
- 7) 野田万次郎, 稲津宜彦 (1985) GC-MSによる2,2-重水素標識脂肪酸の検出と定量. *油化学*, 34:42-47.
- 8) Shibahara A, Yamamoto K, Takeoka M, Kinoshita A, Kajimoto G, Nakayama T, Noda M (1989) Application of a GC-MS method using deuterated fatty acids for tracing cis-vaccenic acid biosynthesis in kaki pulp. *Lipids*, 24:488-493.
- 9) Shibahara A, Yamamoto K, Takeoka M, Kinoshita A, Kajimoto G, Nakayama T, Noda M (1990) Novel pathways of oleic and cis-vaccenic acid biosynthesis by an enzymatic double-bond shifting reaction in higher plants. *FEBS Lett*, 264:228-230.
- 10) Shibahara A (1993) Novel pathways of oleic, cis-vaccenic and n-5 monoenoic acid biosynthesis by an enzymatic double-bond shifting reaction in higher plants, "Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants" (Murata N, Somerville C, editors), The American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp.33-39.
- 11) Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226:497-509.
- 12) Ouellet M, Emond V, Chen CT, Julien C, Bourasset F, Oddo S, LaFerla F, Bazinet RP, Calon F (2009) Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: an in situ cerebral perfusion study. *Neurochem Int*, 55:476-482.
- 13) Sprecher H (2000) Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 1486:219-231.

- 
- 14) Chen CT, Liu Z, Ouellet M, Calon F, Bazinet RP (2009) Rapid  $\beta$ -oxidation of eicosapentaenoic acid in mouse brain: an in situ study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 80:157-163.
- 15) Gao F, Kieseletter D, Chang L, Ma K, Rapoport SI, Igarashi M (2009) Whole-body synthesis secretion of docosahexaenoic acid from circulating eicosapentaenoic acid in unanesthetized rats. *J Lipid Res*, 50:2463-2470.
- 16) Rapoport SI, Ramadan E, Basselin M (2011) Docosahexaenoic acid (DHA) incorporation into the brain from plasma, as an in vivo biomarker of brain DHA metabolism and neurotransmission. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 96:109-113.
- 17) Igarashi M, Kim H-W, Chang L, Ma K, Rapoport SI (2012) Dietary n-6 polyunsaturated fatty acid deprivation increases docosahexaenoic acid metabolism in rat brain. *J Neurochem*, 120:985-997.
- 18) Rapoport SI (2013) Translational studies on regulation of brain docosahexaenoic acid (DHA) metabolism in vivo. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 88:79-85.

## Analysis of fatty acid metabolism in animals using stable isotope-labeled tracers

Akira Shibahara

*Department of Clinical Nutrition, Osaka Prefecture University*

Elucidation of the metabolism of dietary polyunsaturated fatty acids, such as DHA and EPA, is vital in understanding their functions. This study traced the incorporation of dietary DHA and EPA in the compound lipids of mouse organs, especially in the brain. We implemented our recently developed, safe, stable isotope-labeled tracer technique and successfully monitored the metabolism of dietary DHA and EPA.

For four weeks, mice were fed a diet containing stable isotope-labeled tracers: either [2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHA (ethyl ester form) or [2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]EPA (ethyl ester form). After perfusion of organs with saline under anesthesia, the four organs (brain, heart, kidney and liver) were removed. Each organ was homogenized with a chloroform/methanol mixture to extract the total lipids. The total lipids were separated by thin layer chromatography into each lipid class, and then the compound lipids were converted to fatty acid methyl esters by methanolysis using a hydrogen chloride/methanol reagent. The fatty acid methyl esters were simultaneously analyzed by capillary gas chromatography (GC) and gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry (GC-CI/MS). In GC-CI/MS analysis, the [2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHA and [2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]EPA were detected by the quasi molecular ions which shifted 2 mass units from those of the corresponding unlabeled DHA and EPA: their amounts were determined by mass chromatography in which the amounts of naturally occurring isotopes were subtracted.

In mice fed a diet containing [2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHA, simultaneous analysis by GC and GC-CI/MS showed that 48.4% of DHA was [2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHA and [2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHA made up 8.3% of the total fatty acids in the compound lipids of the brain. Consequently, it is clear that our method could easily detect the dietary [2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHA passing through the blood-brain barrier.

In the heart, [2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]DHA amounted to ca. 70% of the total amount of DHA and to more than 30% of the total fatty acids. This indicates that dietary DHA readily influences the fatty acid profile of heart lipids. Our data demonstrate that dietary DHA influences heart lipids more than it influences lipids of the brain, kidney and liver.

We did not detect any EPA in the brain compound lipids of mice fed a standard diet. In contrast, [2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]EPA was detected in the brain compound lipids of mice fed a diet containing [2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]EPA. The content was merely 0.3% of the total fatty acids, however, it is very likely that dietary [2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]EPA directly passes through the blood-brain barrier and becomes a constituent of the brain compound lipids.