

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

アラキドン酸補給の安全性に関する研究

(H22-食品-一般-002)

平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 浜崎 智仁

平成24(2012)年3月

目 次

I. 総合研究報告

- アラキドン酸補給の安全性に関する研究 1
浜崎智仁・奥山治美

II. 分担研究報告

- 1-1. 我国の女子学生、中高年及び高齢者の食生活と血液中のアラキドン酸等
多価不飽和脂肪酸の割合について 8
鈴木平光
2. 脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) を用いるアラキドン酸の
病態進行に対する影響の検討 17
大原直樹
3. アラキドン酸補給の炎症への影響の評価 35
内藤由紀子
4. 胎仔期のアラキドン酸が乳癌発症に及ぼす影響 54
螺良愛郎
5. アラキドン酸等の脂肪酸摂取がラット炎症病態やマウス眼組織形成に
及ぼす影響について 62
小林哲幸
6. 発癌プロモーション過程への影響評価 91
永田伴子
7. ラットの認知機能、網膜機能、免疫能、骨格筋に及ぼすアラキドン酸長期投与の
影響に関する研究 112
橋本道男
8. 老若マウスの脳機能に及ぼすアラキドン酸の比較検討 123
守口 徹

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 135

IV. 研究成果の刊行物・別刷 136

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業） 総合研究報告書

「アラキドン酸補給の安全性に関する研究」

研究代表者 浜崎 智仁 富山大学和漢医薬学総合研究所 教授

研究分担者 奥山 治美 金城学院大学脂質栄養オープンリサーチセンター 教授

研究協力者 鈴木 平光 女子栄養大学栄養学部 教授

研究要旨

アラキドン酸（ARA）補給の安全性に関する研究結果を次の5項目に大別して述べる。

1. 脳機能・脳卒中への影響 ARAの慢性的な投与は、n-3系脂肪酸欠乏状態を充進させ自発運動量を増やし、運動機能を低下させた（守口）。脳卒中易発症高血圧自然発症ラットへのARA投与は、麻痺、死亡等に影響を与えなかったが、雌の血清中リン脂質濃度が用量依存的に低下した（大原）。

2. 眼組織・運動機能に及ぼす影響 魚油抜き資料で2世代飼育したラットにARAを13週間投与しても、空間認知機能への影響はなかった。ARA投与ラットでは、すべての報酬餌をとりきるのに要した時間がコントロール群より有意に低下した。3ヶ月で右眼での網膜電位の低下が抑えられた（橋本）。眼組織の異常が出やすいマウス（C57BL/6）ではARA投与により、早胎児の眼組織のリゾリン脂質が増加した。これは早胎児に眼の異常が出やすいことと一致した（小林）。

3. 発癌と発癌プロモーションへの影響 ヒト乳癌細胞株を移植したヌードマウスでARAは用量依存的に、乳癌細胞を増殖促進し、移植35日後ではARA 2.01%添加食群で体積も重量も対照群の二倍になった（螺良）。発癌プロモーションモデルでは、生存率・担癌動物発生率に差はなかったが、膀胱の乳頭腫発生がARA用量依存的に増えた（永田）。

4. アレルギー・炎症性疾患・免疫能への影響 n-6系脂肪酸に富む経腸栄養剤をラットに投与すると、炎症促進作用を裏付ける分子群が多くなった（n-3ではその逆）（小林）。魚油抜き飼料で2世代飼育した若年ラットにARAを投与したところNK活性が低下した。高齢ラットでは下肢骨格筋の酸化ストレスが増加した（橋本）。薬物誘導大腸炎モデルラットでは高用量ARA投与で粘膜下浮腫の増加、マクロファージの浸潤増加など、炎症が充進する所見が得られた（内藤）。

5. 情報収集・摂取量評価 介入試験で、DHAの多い魚油の摂取は血中のARAを増加させ、EPAの多い魚油の摂取はARAを低下させる傾向があった（鈴木）。400名を超す疫学調査でも、赤血球中のEPAとARAに逆相関、DHAとARAに正相関が見られた。健常女性132名での検討では、血中ARAは顔面のシミ面積（全員）とあるいはシワの長さ（30代女性のみ）と強い相関が見られた（浜崎）。

【結論】 ARA油を補給すると、癌、炎症性の充進、運動機能低下などが認められた。またマウス胎児で眼の奇形が発生し、女性の皮膚に好ましくない影響を与える可能性が高い。これらの結果、癌を含む炎症性疾患が増えている現在、一般者にARA油を補給することは避けるべきであり、マウス胎児に催奇性を示したことは、サプリメントの安全性に根本的な問題を提起していると考えられる。

研究分担者

奥山 治美 (金城学院大学脂質栄養オープン
リサーチセンター 教授)

大原 直樹 (金城学院大学薬学部 教授)

内藤由紀子 (独立行政法人国立循環器病研究
センター 室長)

螺良 愛郎 (関西医科大学医学部 教授)

小林 哲幸 (お茶の水女子大学大学院 教授)

永田 伴子 (財食品薬品安全センター秦野研
究所 副所長)

橋本 道男 (島根大学医学部 准教授)

守口 徹 (麻布大学生命・環境科学部 教授)

研究協力者

鈴木 平光 (女子栄養大学栄養学部 教授)

A. 研究目的

過去半世紀の間のリノール酸 (アラキドン酸 (ARA) 前駆体) の摂取増に伴い、ARA カスケードを抑える医薬品が有効な疾患が増えてきた (流れ図)。このような食環境で、ARA を補給することが安全かどうかを評価することを目的とする。

ARA 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、世界的なコンセンサスがある。しかし、成人に摂取量を 2 倍にするほど多量の ARA 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、ARA の組織での濃度あるいは摂取量とガンの死亡率に相関があることが知られており、また心疾患死亡率とに相関があることから疑問がある。そこで、当研究班は ARA の安全性を再評価し、結果を公表する必要性を強く感じている。

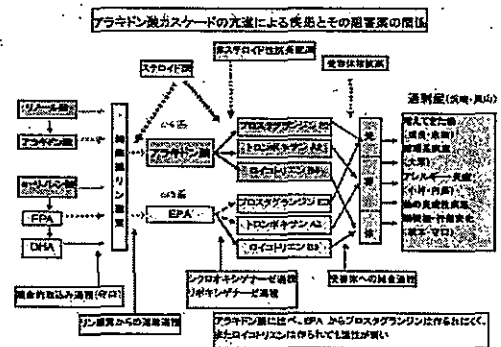
最近、前駆体のリノール酸が十分に存在する条件でも ARA の補給が脳機能を向上させ (動物実験・臨床試験)、ARA 補給で血栓傾向が亢進するような副作用は認められなかった (臨床試験) と報告された。一見説得力のある論文であるが、問題点がいくつか見つかっており、その安全性と有効性の結論に疑問がもたれる。

具体的には、当研究班では、すでに日本でサ

プリメントとして市販され、また育児用ミルクに添加が検討されている発酵 ARA 油と同製法による ARA 油を輸入し (下記参照)、市販品と脂肪酸組成・含量がほぼ同等であることを確認する。次に輸入された ARA 油を含む餌で動物実験を開始し、炎症性、発癌のプロモーション過程、加齢ラットにおける脳機能などに及ぼす影響を広範囲に評価することとした。

この研究では、利益相反が起こらないように、企業から ARA 製品を無料あるいは極めて安価で入手することはできない。しかし通常の方法で購入しては極めて高価なため、限られている研究費がさらに圧迫されてしまう。そこで、同品質の製品を海外から個人輸入する必要が出てきた。

なお、この研究班が組織される前に終了した介入試験あるいは疫学調査 (いずれも倫理委員会の承認を経て実施されたもの) を ARA に関して再検討することとした。



B. 研究方法

1. ARA 補給の安全性に関する研究 (総括及び疫学調査)・・・浜崎・奥山

当研究班の大きな課題「ARA を補給することが安全かどうか」を総括する (総括)。ARA の補給が安全であるかを調べる一つの手段として、すでに終了したヒトでの調査を再検討することにした。132 名 (20-60 歳、健常女性) につき、血漿中の ARA とロボスキシン・アナライザーによる皮膚の状況について相関を検討した。次に

健康人 456 名での疫学調査を見直し、ARA と他の脂肪酸の関連を調べた (疫学調査)。

1.2. 我国の女子学生、中高年及び高齢者の食生活と血液中の ARA 等多価不飽和脂肪酸の割合について・・・鈴木

以下の 6 つの魚油を含む食品を投与する介入試験及び 2 つ疫学調査 (②と③) につき、血漿中脂肪酸を測定した。摂取魚油の違いによる脂肪酸構成の変化を観察した。

①女子大生の血漿脂質中の ARA 等の割合に及ぼす魚油含有ヨーグルト摂取の影響

②漁村及び農村地域の中高年女性の食生活と血漿脂質中の ARA 等の割合について

③漁村及び農村地域の中高年女性の魚食の多少と血漿脂質中の ARA の割合との関連性の解明

④事業所に勤務する中高年における血漿脂質中の ARA 等の割合に及ぼす精製魚油カプセル摂取の影響

⑤事業所に勤務する中高年における血漿脂質中の ARA 等の割合に及ぼす精製魚油含有ドリンク摂取の影響

⑥ S 市役所に勤務する中高年の血漿脂質中の ARA 等の割合に及ぼす魚油含有ヨーグルトの摂取の影響

⑦高齢者の血漿脂質中の ARA 等の割合に及ぼす魚油及び緑茶抽出物含有食品の摂取の影響

⑧高齢者の血漿脂質中の ARA 等の割合に及ぼす魚油含有ヨーグルト摂取の影響

2. 脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) を用いる ARA の病態進行に対する影響の検討・・・大原

ARA 投与が高血圧、血管傷害、脳出血等を増悪するか否かを評価する目的で、SHRSP 32 匹を 4 群にわけ、13 週間 ARA を 0、5、35 および 240mg/kg 1 日 1 回強制経口投与した。ARA 含有サプリメントを目安として設定されている 1 日摂取量 (ARA で 240mg) と体重当たりの換算ではほぼ同量を低用量、その約 50 倍

を高用量とし、公比 7 で中用量群を設けた。

3. ARA 補給の炎症への影響の評価・・・内藤
ARA 投与が炎症に与える影響を調べるため、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導大腸炎モデルを用いた。雄性 Wistar ラットに ARA 0、5、35 または 240 mg/kg を 8 週間混餌投与し、第 8 週の 7 日間は、大腸炎を誘導するために DSS を並行投与した。DSS を投与しない群 (投与期間 8 週間、ARA 0 または 240 mg/kg のみ投与) も設定した。

4. 胎仔期の ARA が乳癌発症に及ぼす影響・・・螺良

①ヒト乳癌細胞株 KPL-1 (エストロゲン受容体陽性) を 24 時間培養し、その後 10、50、100、150 および 200 μ M の ARA 溶液を 24、48 および 72 時間連続暴露し、MTT アッセイを実施した。

②雌 BALB/c-nu/nu 系マウスに 2.5×10^6 cells/animal の KPL-1 ヒト乳癌細胞株を右腋窩乳腺組織内に移植し、10 日後から ARA 10μ L を 1 日おきに原発腫瘍塊内に直接投与した。体重、腫瘍サイズ、乳腺腫瘍の BrdU 陽性率、リンパ節等を調査した。

③ BALB/c-nu/nu 系雌マウスに 2 週間 ARA 添加食 (0.13%、0.50%、2.01%) を摂食させ、 2.5×10^6 cells/animal の KPL-1 ヒト乳癌細胞株を右腋窩乳腺組織内に移植した。対照群として、基礎食 (ARA 含有 0.008%) を摂食させた。35 日後に全ての動物を解剖した。上記②と同様に多項目にわたり調査した。

④雌雄ルイス系ラットを購入後交配させ、交配期 1 週間、妊娠期 3 週間、授乳期 3 週間に ARA 添加食 (0.13%、0.50%、2.01%) を摂食させた。離乳以降実験終了までは、市販飼料 (CE-2、日本クレア) を摂食させた。出生した雌仔ラットの 50 日齢時に 50 mg/kg N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU) を単回腹腔内投与し、21 週齢 (MNU 投与後 14 週) まで、各種の項目

を調査した。

5. ARA等の脂肪酸摂取がラット炎症病態やマウス眼組織形成に及ぼす影響について・・・小林
必須脂肪酸バランスの異なる経腸栄養剤を投与したラットの腸管虚血再灌流炎症モデル実験系を用いて脂質メタボローム解析の手法を確立し、その有効性を検証した。次に、ARAを過剰摂取すると、C57BL/6マウスの雌性マウス胎仔において眼組織の発達異常が高頻度で発生するため、その機構を明らかにするべく、同系統マウスを各種脂肪酸補給食で飼育し、その胎仔の眼組織中のリン脂質分子種について質量分析装置を用いたメタボローム解析を行った。

6. 発癌プロモーション過程への影響評価・・・永田

ARAの発癌プロモーション効果を評価する目的で中期多臓器発癌試験を実施した。F344雄ラット100匹を5群に分け(1群は無処置群)、4群は多臓器発癌イニシエーション(Init)処置のためN-diethylnitrosamine(100 mg/kg, i.p.)、N-methyl-N-nitrosourea(20 mg/kg, i.p.)を第1、2週に4回、1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride(40 mg/kg, i.s.c)を第3、4週に4回、また、第1、2週にはN-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine(0.05%)を飲水に混じ、第3、4週にはDihydroxy-di-N-propylnitrosamine(0.1%)を飲水に混じて投与した。ARA摂取量が0、60、250および1000 mg/kg体重となるようにARA含有油を混じた粉末飼料を投与し(Init無処置群には媒体のみ)、高用量ARA混餌飼料を第6から24週間自由摂取させた。投与期間中は定期的に一般状態観察、体重および摂餌量を測定し、投与期間終了後、血液学的検査、剖検、器官重量測定および組織学的検査を実施した。

7. ラットの網膜、NK細胞活性、骨格筋に及ぼすARA長期投与の影響に関する研究・・・

橋本

魚油抜き飼料で2世代にわたり飼育した若齢ラットあるいは老齢ラットに13週間にわたりARAを長期投与(240 mg/kg BW/day)し、①脳機能として空間認知機能、②網膜機能として網膜電図、③免疫能としてNK細胞活性、さらに④下腿骨格筋脂肪酸組成及び酸化ストレスへの影響を検討した。

8. 老若マウスの脳機能に及ぼすARAの比較検討・・・守口

輸入されたARA製品(研究目的の項を参照のこと)に十分なARAが含まれ、問題となる脂肪酸等が紛れていないことをガスクロマト法などで確認した。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・繁殖した老齢(52週齢)と若齢(16週齢)マウスへARA(240 mg/kg/day)を長期投与し、脳機能・運動機能への影響を検討した。

倫理面への配慮

上記研究で1.と1.2.に関してはヒトでのデータを含んでいる。これらの研究は、当研究班が企画したものではなく、研究時にすでに終了していたものを利用している。なお、それぞれの研究は倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

1. ARA補給の安全性に関する研究(総括及び疫学調査)・・・浜崎・奥山

22年度には、全体のバランスと今後さらに加える研究等を検討した。特に前川論文(BBRC 2010:402:431)では、ARAで小眼症が見られたことから、班員の小林と共同でさらに研究を進める事になった。また、すでに終了しているヒトでの横断的研究を見直し、ARAが健常女性の皮膚の問題点(シミ、シワ)と関連している可能性があるため、この点を検討することとした。研究全体のまとめに関しては、Dの「考察」を参照されたい(総括)。女性の額以外の顔面

部でシミの面積と ARA との間に正相関が見られた ($r=0.24$, $p=0.006$, $n=132$, 各種補整後)。30 歳代に限れば、シワの長さも ARA に強い正相関が見られた ($r=0.47$, $p=0.006$, $n=30$, 補整後)。456 名での疫学調査では、赤血球中の EPA と ARA に強い負の相関があり ($r=0.27$, 年齢・性別補整後)、DHA と ARA には正の相関が見られた ($r=0.23$, 年齢・性別補整後)。これらの相関は鈴木研究協力者のデータに一致する。

1.2. 我国の女子学生、中高年及び高齢者の食生活と血液中の ARA 等多価不飽和脂肪酸の割合について・・・鈴木

8つの研究をまとめると以下のようにになった。女子学生、中高年及び高齢者の血漿脂質に占める ARA の割合は、4.8～5.9% の範囲にあった。DHA の多い魚油の摂取は ARA を増加させ、EPA の多い魚油は減少させる傾向にあった。なお、この時、魚油摂取の影響は、1.0% 以内であった。

2. 脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) を用いる ARA の病態進行に対する影響の検討・・・大原

ARA の投与は、体重、摂餌量、症状、死亡率に影響を与えなかった。血液学および病理学的検査所見にも ARA 投与の影響は認められなかった。血液生化学では、雌の血漿中リン脂質濃度が用量に依存して低下し、240mg/kg では対照群と比較して有意な低値を示したが、これ以外に影響は見られなかった。この実験条件下で無毒性量を求めるとすれば、雄では 240 mg/kg、雌では血漿中リン脂質濃度への影響を有害効果と考えた場合に 35 mg/kg と判断することができる。

3. ARA 補給の炎症への影響の評価・・・内藤

DSS 投与群においては、ARA 5 および 35 mg/kg 投与による影響は認められなかった。一方、240 mg/kg 投与により、好中球比および好酸球

比減少とリンパ球比上昇、血漿 ARA 量の増加、大腸の暗赤色化、大腸粘膜下組織の浮腫の発現頻度と程度の増加、大腸組織におけるマクロファージの浸潤の増加、大腸 myeloperoxidase 活性の上昇が認められた。DSS 非投与群においては、ARA 240 mg/kg 投与により、血漿中 ARA 量および ARA 比の上昇、EPA/ARA 比の低下が認められたのみで、その他の影響はみられなかった。

4. 胎仔期の ARA が乳癌発症に及ぼす影響・・・螺良

①何れの暴露時間においても、ARA 200 μ M (生理的には存在しない高濃度) で MTT の低値傾向がみられた。

②試験期間中、両群とも異常ならびに死亡は観察されなかった。ARA を投与しても、体重、腫瘍体積、収容重量、病理組織学的検査、腫瘍細胞の BrdU 陽性率、腫瘍細胞の TUNEL 陽性率に差はなかった。

③試験期間中、何れの群とも異常ならびに死亡は観察されなかった。1匹あたりの1日摂餌量は、移植2週後から、ARA 2.01% 添加食群では他の群に比べ減少傾向がみられた。体重は ARA 2.01% 添加食群で低値を示した。移植2週後から、ARA 2.01% 添加食群では腫瘍体積が他群に比べて有意に増加し、移植35日後では ARA 2.01% 添加食群で体積も重量も対照群のほぼ二倍になった。ARA 2.01% 添加食群では腫瘍細胞の BrdU 陽性率が有意に増加した。腫瘍細胞の TUNEL 陽性率も群間で差はなかった。

④いずれの項目に関しても群間に差は認められなかった。

5. ARA 等の脂肪酸摂取がラット炎症病態やマウス眼組織形成に及ぼす影響について・・・小林

n-3系脂肪酸を豊富に含む経腸栄養剤の投与は、各種脂質メディエーターやその前駆体分子レベルにおいても抗炎症作用を裏付ける変動が観察

されたのに対し、n-6系脂肪酸に富む経腸栄養剤は炎症を増悪する分子群が多くなることで、各種脂質関連分子の変動から裏付けられた。眼に関しては、交配2週間前から普通食にARAを4%添加した食餌で飼育したマウスの♀胎仔(E16.5)では、普通食のみや4%DHAを添加した群に比べて、眼組織中のリゾリン脂質(リゾホスファチジルコリンとリゾホスファチジルエタノールアミン)の顕著な蓄積が認められた。一方、これは♀胎仔に特徴的な現象であり、♂胎仔ではリゾリン脂質の蓄積は見られず、眼組織形態異常が♂よりも♀で顕著であることと一致していた。

6. 発癌プロモーション過程への影響評価・・・永田

Init処置した対照群と各ARA投与群間では一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査結果、生存率、担癌動物発生率に差はなかったが、器官別腫瘍発生率では膀胱の乳頭腫が対照、低、中、高用量群でそれぞれ1、3、5、7例と高用量群で有意に発生頻度($p < 0.05$)が高く、投与用量に応じて増加傾向もみられた($p < 0.01$)。

7. ラットの網膜、NK細胞活性、骨格筋に及ぼすARA長期投与の影響に関する研究・・・橋本

①空間認知機能の評価指標である参照記憶や作業記憶には有意な影響は認められなかった。ARA投与ラットでは、すべての報酬餌をとりきるのに要した時間(摂取所要時間)がコントロール群に比べて有意に低値を示した。ARA投与ラットでは、大脳皮質のARAが有意に増加し、リノール酸が低下した。ARA摂取は、加齢ラットの大脳皮質のARAを増加させ行動パターンに影響を及ぼす可能性が示唆された。

②若齢ラットへARAを投与する前と投与1ヶ月後の網膜電図には影響は認められなかった。3ヵ月後の網膜電図は、コントロール群、DHA群共に加齢に伴い振幅の低下が認められたが、

ARA群では右目だけではあるが加齢に伴う振幅の低下が抑制された。

③若齢ラットのNK細胞活性は、ARA群ではコントロール群、DHA群に比べて有意に低下したことから、ARA長期投与による免疫能の低下が示唆された。

④ARA投与老齢ラット下腿骨格筋の速筋のARAが有意に増加した。また速筋の活性酸素種が増加した。一方、遅筋のARA量には変化が認められなかったが、過酸化脂質量が増加した。ARAの長期摂取は下腿骨格筋の酸化ストレスを増大させる可能性が示唆された。

8. 老若マウスの脳機能に及ぼすARAの比較検討・・・守口

輸入したARA製品は、ARAが十分に含まれており、研究材料として問題ないことが判明した。老齢マウスにARAを13週間投与すると、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、新奇摂食抑制試験では、ARA投与に起因した作用は観察されなかったが、n-3系脂肪酸欠乏マウスへARAを投与すると、ロータロッド試験で顕著な運動機能の低下が認められた。試験終了後の血液および脳組織中の脂肪酸組成の解析では、ARAの長期投与は、血液および脳組織中のARAを中心としたn-6系脂肪酸の上昇と共にDHAを有意に減少させていた。また、n-3系脂肪酸欠乏若齢マウスに同量のARAを投与すると3週目から、自発運動量の有意な上昇が認められた。これらのことから、ARAの慢性的な投与は、n-3系脂肪酸欠乏状態を亢進させて、n-3系脂肪酸欠乏状態に特徴的な自発運動量を上昇させ、運動機能を低下させていることが考えられた。

D. 考察

ARA 長期補給が安全かを調べるために、各種動物実験を組み検討した。ヒトでの研究は、すでに終了している疫学調査あるいは介入試験で考察し、新たな介入試験は実施していない。利益相反を起こさないように、今回の研究では ARA 油を輸入する必要が生じ、輸入手続きに時間がかかってしまった(研究目的参照)。しかし、班員の努力により、時間内に必要な研究を全て遂行することができた。

研究要旨にもまとめたように、ARA 補給でいろいろな問題が出現した。問題となりそうなものをあげると、脳内 DHA の有意な低下、自発運動の亢進、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(雌)の血清中リン脂質濃度の低下、眼の発達異常が出やすいマウスでのリゾリン脂質の増加、ヒト乳癌細胞株を移植したヌードマウスでは ARA の用量依存的に乳癌細胞が増殖、発癌プロモーションモデルでは膀胱の乳頭腫発生が増加、NK 活性の低下した、老齢ラットでは下肢骨格筋の酸化ストレスが増加、薬物誘導大腸炎モデルラットでは炎症の亢進、健康女性の顔面のシミおよびシワが ARA と相関するなど。ARA の投与が認知症などで有効との報告もあるが、今回報告したように問題点もかなりある。利益と危険性の兼ね合いが大切であるが、この場合 EPA・DHA と比較するのがよさそうである。EPA・DHA を含む魚油の投与研究は ARA の千倍ほど報告があるが、魚油の危険性を示す研究発表は極めて少ない。実質的には皆無である。その点 ARA は我々が2年間研究しただけで、危険性が多岐にわたり確認された。ある状況下では、ARA の投与が有効である可能性もあるが、いろいろな危険性(特に長期投与での発癌)を考えると、ARA の補給は考えにくい。

ヒトでの投与研究は危険と考え、我々は動物での研究で話を進めた(ただし魚油の投与や疫学調査ですでに終了しているものは、ヒトでの研究も加えた)。動物実験でいつも問題となるの

は投与量の問題である。小動物は、体重に比べて体表面積が大きいので、一定体温を保とうとすれば代謝速度が早くなる。そこで、ARA も燃料として使われる可能性が極めて高く、ヒトでの体重あたりの投与量では、研究ができない。また、毒性を考慮するとすれば、安全域を広める必要があるため、今回の投与量(高用量群ではヒトでの50倍程度が多い)は十分意味があると考えられる。

以上をまとめると、ARA は癌、炎症、自発運動量など全てにわたって活性化させるようで(ただしNK活性は低下した)、危険と考えられる。

なお、当研究班は限られた経費を有効に利用し、時間内に当初の目的を十分果たしたと考える。

E. 結論

ARA は、癌、炎症、自発運動上昇・運動機能低下など全てにわたって、促進的に作用する可能性が示された。動物実験で催奇性という根本的な安全性の問題が認められ、この問題が解決しない限り、一般者への補給は勧められない

F. 健康危険情報

動物実験で乳がん細胞の増殖促進が見られた。炎症を亢進させる可能性もある。また、マウス胎仔で眼の分化・増殖障害が報告された。女性の皮膚に問題を起こす可能性がある。現時点で、発酵法で作られた ARA 油の安全性に問題があることが、指摘できる。

G. 研究発表

該当なし。ただし、日本脂質栄養学会(2012年9月)で成果の一部を発表する予定。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業） 分担研究報告書

「我国の女子学生、中高年及び高齢者の食生活と血液中のアラキドン酸等多価不飽和脂肪酸の割合について」

研究分担者 鈴木 平光 女子栄養大学栄養学部 教授
研究協力者 山田 麻未 女子栄養大学 大学院生
研究協力者 ボインドグルン・金花 女子栄養大学 客員研究員

研究要旨

女子学生、中高年及び高齢者の血漿脂質に占めるアラキドン酸（ARA）の割合は、4.8～5.9%の範囲にあった。DHAの多い魚油の摂取はARAを増加させ、EPAの多い魚油は減少させる傾向にあった。なお、この時、魚油摂取の影響は、1.0%以内であった。

A. 研究目的

本研究では、我国の女子学生、中高年及び高齢者の食生活と血漿脂質中の多価不飽和脂肪酸の割合を明らかにし、血漿脂質中のアラキドン酸（ARA）の割合に及ぼす魚油摂取の影響について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 介入試験 1. 女子大生の血漿脂質中のARA等の割合に及ぼす魚油含有ヨーグルト摂取の影響について⁽¹⁾

被験者の募集は女子栄養大学にて行なった。研究実施期間中に、対象者全員に食事記録や体調変化などの日誌を3ヵ月間記入してもらった。魚油添加によるDHA（ドコサヘキサエン酸）含有ヨーグルト摂取群の学生（28名）には1日100gのDHAヨーグルト（DHAを0.6g含有）を3ヵ月間与えた。また、プラセボ群の学生（30名）には、魚油の代わりにサフラワー油を含むヨーグルトを同様に与えた。摂取前及び1、2、3ヵ月目に血漿中の脂肪酸組成などの測定を行なった。なお、本研究は女子栄養大学

医学倫理委員会の承認を得た後、二重盲検法にて実施した。

2) 疫学調査 1. 漁村及び農村地域の中高年女性の食生活と血漿脂質中のARA等の割合について⁽²⁾

調査地域として、漁村は千葉県銚子市を、農村は群馬県前橋市を選定した。そして、各地域の保健所や漁業組合などの協力により、被験者を募集し、計203名（銚子:105名、前橋:98名）の方の応募があった。本研究への参加者は、空腹時に採血を行い、食生活などを知るためのアンケートを行なった。また、参加者の血漿中の脂肪酸組成を測定した。なお、本研究は女子栄養大学医学倫理委員会の承認を得た後に実施した。

3) 疫学調査 2. 漁村及び農村地域の中高年女性の魚食の多少と血漿脂質中のARAの割合との関連性の解明⁽³⁾

疫学調査1の基礎データのもとに、魚の摂取量を考慮し、銚子では魚食が週3～7回以上の人、前橋では魚食が1～4回の人を対象として参加者を募集したところ、漁村地域15名、農村地

域16名、計31名の方の協力を得た。参加者には7日分の日誌(食事記録)に記入してもらった。なお、本研究も女子栄養大学医学倫理委員会の承認を得た後に実施した。

4) 介入試験2. 事業所に勤務する中高年における血漿脂質中のARA等の割合に及ぼす精製魚油カプセル摂取の影響について⁽⁴⁾

被験者の募集は東京都内の事業所にて行なった。被験者全員に食事記録や体調の変化などについて試験終了前の1週間調査した。魚油(DHA)含有カプセル摂取群の被験者(24名)には1日15粒の魚油カプセル(DHAを729mg含有)を3ヵ月間与えた。また、プラセボ群の被験者(21名)には、魚油の代わりにサフラワー油が入ったカプセルを同様に与えた。摂取前及び1.5、3ヵ月目に血漿脂質中の脂肪酸組成などの測定を行なった。なお、本研究は女子栄養大学医学倫理委員会の承認を得た後、二重盲検法にて実施した。

5) 介入試験3. 事業所に勤務する中高年における血漿脂質中のARA等の割合に及ぼす精製魚油含有ドリンク摂取の影響について⁽⁵⁾

介入試験2と同様に実施したが、魚油含有ドリンク摂取群の被験者(24名)には1日100mlのドリンク(EPA(エイコサペンタエン酸)を600mg含有)を3ヵ月間与えた。また、プラセボドリンクとしては、魚油に代わりにオリーブ油が入ったものを用いた。

6) 介入試験4. S市役所に勤務する中高年の血漿脂質中のARA等の割合に及ぼす魚油含有ヨーグルトの摂取の影響について⁽⁶⁾

被験者の募集は埼玉県S市役所にて行なった。被験者全員に食事記録や体調変化などの日誌を、試験開始3ヵ月目と6ヵ月目の前に、それぞれ1週間分記入してもらった。魚油含有(DHAリッチ)ヨーグルト摂取群の被験者(32名)には1日100gのDHAヨーグルト(DHAを600mg含有)を3ヵ月間与えた。また、プラセボ群の被験者(32名)には、魚油の代わりにサフラワー油を含むヨーグルトを同様に与

えた。本研究はクロスオーバー法で実施したため、全員がそれぞれのヨーグルトを3ヵ月間摂取した。また、摂取前及び1.5、3、4.5、6ヵ月目に血漿脂質中の脂肪酸組成などの測定を行なった。なお、本研究は女子栄養大学医学倫理委員会の承認を得た後、二重盲検法にて実施した。

7) 介入試験5. 高齢者の血漿脂質中のARA等の割合に及ぼす魚油及び緑茶抽出物含有食品の摂取の影響について⁽⁷⁾

被験者の募集は特別養護老人ホームで行なった。魚油+緑茶抽出物強化食品摂取(以下試験)群の者には、1日あたり3g(DHAを700mg含有)の魚油と0.5g(約80%カテキン含有)の緑茶抽出物を添加した加工食品(約30品)を6ヵ月間与えた。また、プラセボ群の者には、魚油の代わりにサフラワー油を、緑茶抽出物の代わりに小麦デンプンを含む加工食品を同様に与えた。摂取前、3ヵ月後、6ヵ月後に改訂長谷川式簡易知能評価スケールを用いた検査を行うと同時に採血し血漿を得た。この血漿脂質中の脂肪酸組成を測定した。なお、本研究は農研機構食品総合研究所ヒト試験に関する倫理委員会の承認を得た後、二重盲検法により実施した。

8) 介入研究6. 高齢者の血漿脂質中のARA等の割合に及ぼす魚油含有ヨーグルト摂取の影響について⁽⁸⁾

被験者の募集は特別養護老人ホームで行なった。魚油添加によるDHA含有ヨーグルト摂取(以下DHAヨーグルト)群の者には、1日あたり100gのDHAヨーグルト(DHAを600mg含有)を6ヵ月間与えた。また、プラセボ群の者には、魚油の代わりにサフラワー油を含むヨーグルトを同様に与えた。被験者においては、摂取前、3ヵ月後、6ヵ月後に採血し血漿を得た。この血漿脂質中の脂肪酸組成を測定した。なお、本研究は農研機構食品総合研究所ヒト試験に関する倫理委員会の承認を得た後、二重盲検法により実施した。

(倫理面への配慮)

上記のすべての試験研究においては、それぞれの倫理委員会で、実験研究の実施計画、個人の人権の擁護、社会的影響、同意書、個人および社会への不利益や危険性、学術上の貢献の予測、利益相反について審議し、承認を得た後、実施した。

C. 研究結果

1) 介入試験1: 被験者である女子大生の食事調査から、魚介類は週 1.3 ± 1.8 回、肉類は週 3.3 ± 1.5 回の頻度で摂取しており、魚より肉を食べる習慣が多い傾向にあった。魚油含有 (DHA リッチ) ヨーグルトを摂取した人では、ARA $5.9 \pm 0.8\%$ ($P < 0.05$)、EPA $2.1 \pm 1.3\%$ ($P < 0.01$)、DHA $5.2 \pm 1.7\%$ ($P < 0.01$) で有意に高い値を示した。また、n-6/n-3 比は、魚油含有ヨーグルト群において $5.0 \pm 1.8\%$ ($P < 0.01$) となり、摂取前と比較しても3ヵ月間で有意に低下した (表1)。

2) 疫学調査1: 漁村地域の人では、農村地域のヒトに比べ、メインとなるおかずには魚を挙げるひが多く、摂取頻度も高い傾向にあった。農村地域と比較して漁村地域では血漿脂質中のリノール酸 ($27.9 \pm 0.4\%$) が有意に低く、EPA および DHA がそれぞれ $2.8 \pm 0.1\%$ と $4.5 \pm 0.1\%$ であり、有意に高い傾向が見られた。また、血球脂質においては、リノール酸 ($13.1 \pm 0.2\%$) は血漿と同様の傾向が見られ、EPA は漁村地域で有意に高かった。さらに、漁村地域の血漿においては n-6/n-3 比が 5.3 ± 0.2 で有意に低い結果であった。しかし、血漿および血球の ARA については、地域差が見られなかった (表2)。

3) 疫学調査2:

血漿脂質においては、農村地域よりも漁村地域の方が、ARA、EPA および DHA が高い傾向にあり、特に、DHA は $5.9 \pm 0.2\%$ で有意に高かった。リノール酸は農村地域の人 ($27.4 \pm 1.1\%$) が漁村地域の人 ($24.4 \pm 1.8\%$) より高

かった。また、n-6/n-3 比は漁村地域の方が農村地域の人より有意に低かった。血球脂質では、農村地域よりも漁村地域の方が、リノール酸が有意に低く、ARA および EPA は漁村地域の人で高い傾向にあり、EPA には有意差が見られた (表3)。

4) 介入試験2: 食事調査から、魚油 (DHA リッチ) カプセル群もプラセボカプセル群もともに、食生活に大きな特徴をもったものは見られなかった。しかし、魚介類は週 6.6 ± 2.7 回、食肉類は週 5.3 ± 2.5 回の頻度で摂取しており、肉より魚を食べる習慣が多い傾向にあった。魚油カプセル群のヒトでは、摂取3ヵ月後に ARA $5.7 \pm 1.4\%$ ($P < 0.05$)、EPA $3.6 \pm 1.6\%$ ($P < 0.05$)、DHA $6.2 \pm 1.3\%$ ($P < 0.01$) となり、有意に高い値を示した (表4)。

5) 介入試験3: 介入試験2の結果と同様に、魚油 (EPA リッチ) ドリンク群もプラセボドリンク群もともに、食生活に大きな特徴をもったものは見られなかった。しかし、魚介類は週 8.3 ± 4.2 回、食肉類は週 5.1 ± 2.7 回の頻度で摂取しており、肉より魚を食べる習慣を持っていた。魚油ドリンク群のヒトでは、摂取3ヵ月後に ARA ($4.2 \pm 1.2\%$, $P < 0.05$) は減少し、EPA ($3.9 \pm 1.8\%$, $P < 0.05$) は有意に高い値を示した (表5)。

6) 介入試験4: 食事調査結果から、両群ともに、魚介類は週 5.8 ± 3.2 回、食肉類は週 9.6 ± 2.8 回の頻度で摂取しており、魚より肉を食べる習慣を持っていた。血漿脂質中の多価不飽和脂肪酸組成について、DHA ヨーグルトの摂取期間の前後を比較した時に、血漿脂質中の ARA には影響が見られなかったが、EPA ($2.2 \pm 1.1\%$, $P < 0.01$) 及び DHA (4.5 ± 1.1 , $P < 0.05$) が有意に上昇する傾向が見られた (表6)。

7) 介入試験5: 6ヵ月後の血漿脂質中の多価不飽和脂肪酸組成においては、プラセボ群と比較して、試験群において ARA ($5.8 \pm 0.8\%$, $P < 0.05$)、EPA ($3.8 \pm 0.9\%$, $P < 0.05$) 及び DHA ($5.6 \pm 0.7\%$, $P < 0.05$) が有意に高い値

を示した。また、試験群で n-3/n-6 が上昇する傾向が見られた (表 7)。

8) 介入試験 6: 6 ヶ月後の血漿脂質中の多価不飽和脂肪酸組成においては、魚油含有 (DHA リッチ) ヨーグルトを摂取した群で、ARA ($6.2 \pm 0.2\%$ 、 $P < 0.05$)、EPA ($3.7 \pm 0.2\%$ 、 $P < 0.05$) 及び DHA ($5.9 \pm 0.3\%$ 、 $P < 0.05$) が有意に高い値を示した。また、魚油含有ヨーグルト群で n-3/n-6 が上昇する傾向が見られた (表 8)。

D. 考察

1) 介入試験 1 において、若い世代の女性では、肉を食べることが魚介類を食べることより多く、肉類の摂取頻度は魚介類の 3 倍も高い。また、通常の食生活では、リノール酸の摂取は多いが、魚油含有ヨーグルトを 3 ヶ月間摂取させたところ、血漿脂質に占めるリノール酸の割合は低下し、ARA や、EPA、DHA の割合は増加した。このことから、魚油に若干含まれる ARA または DHA が血漿脂質の ARA の割合に影響している可能性が考えられる。

2) 疫学調査 1 において、漁村地域および農村地域住民の血液検査結果では、大きな違いがなかったが、魚の摂取頻度が高いほど、血漿脂質中の EPA および DHA の割合が高い傾向にあり、n-6/n-3 比が低くなることが認められた。しかし、ARA には大きな違いは見られなかった。このことは、魚介類の摂取量が若干異なるぐらいでは、血漿脂質中の ARA の割合への影響はほとんどないことを示していると思われる。

3) 疫学調査 2 において、漁村地域の方で、特に魚介類の摂取頻度が高く、非肥満の人では、魚介類の摂取頻度が少ない農村地域の人に比べ、ARA、EPA および DHA が高く、リノール酸は低く、n-6/n-3 比は有意に低いことが認められた。このことから、魚介類を多く食べると、血漿脂質中の ARA の割合が若干多くなると考えられる。

4) 介入試験 2 において、魚油が入ったカプセルを 1 日 15 粒 (DHA を 729mg) 摂取することで、血漿脂質中の ARA、EPA、DHA などの多価不飽和脂肪酸の割合が上昇することが認められた。魚油中には ARA が若干含まれていることなどが影響して、魚油カプセル群において、ARA の割合が 0.9% 程度上昇したと思われる。

5) 介入試験 3 において、魚油を配合し EPA を 600mg 摂取できるようにしたドリンク 100ml を 1 日 1 回摂取することで、血漿脂質中の EPA が上昇し、ARA が 0.6% 程度低下することが認められた。このことは、DHA リッチな魚油では ARA の割合が増えるのとは逆の結果である。今後は、更に詳細に DHA リッチの魚油または EPA リッチの魚油を摂取した時の ARA レベルに及ぼす影響も検討する必要があると思われる。

6) 介入研究 4 において、魚油を配合し DHA を 600mg 摂取できるようにしたヨーグルトを 1 日 1 回 (100g) 摂取することで、血漿脂質中の EPA、DHA などの多価不飽和脂肪酸を上昇させることが認められた。本研究では、リノール酸や ARA の血漿脂質中の割合には大きな違いは見られなかったが、被験者の肉類の摂取頻度は魚介類の 1.6 倍高かった。このように欧米化された食生活は生活習慣病を招く可能性があり、普段の食事でも EPA や DHA を十分摂取する必要があると思われる。

7) 介入試験 5 において、高齢者が魚油 (DHA リッチ) 及び緑茶抽出物含有食品を 6 ヶ月間摂取することで、血漿脂質中の ARA、EPA、DHA などの割合を増加することが認められた。この試験結果においても、魚油中に含まれる ARA の影響等により、血漿脂質中の ARA のレベルが 0.4% 程度上昇したと思われる。また、魚油には n-3 系脂肪酸が多く含まれるため、n-3/n-6 も上昇する傾向が見られたと考えられる。

8) 介入試験 6 において、高齢者が魚油 (DHA リッチ) 含有ヨーグルトを 1 日 1 回摂取するこ

とで、血漿脂質中のARA、EPA、DHAなどの多価不飽和脂肪酸の割合を上昇させることが認められた。この場合も、介入試験5と同様に考えられる。

E. 結論

1. 女子学生、中高年及び高齢者の血漿脂質に占めるARAの割合は、4.8～5.9%の範囲にあったが、これには日々の食生活が影響している可能性がある。

2. 通常摂取量とほぼ同量の魚油を3～6ヵ月間強化する事で、血漿脂質中のARAの割合が変化することが認められた。しかし、DHAが多い魚油とEPAが多い魚油では影響が異なり、DHAはARAを増加させ、EPAは減少させる傾向にあった。なお、この時、魚油摂取の影響は、1.0%以内であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 鈴木平光、西塔正孝、樋口智之、ポインドグルン・金花、白井展也、他、“女子大生の心理状態及び視力に及ぼすDHAヨーグルト摂取の影響”。脂質栄養学、Vol.17、No.2、p158 (2008)。

2) 鈴木平光、西塔正孝、樋口智之、ポインドグルン・金花、白井展也、他、“漁村及び農村地域の食生活と血液性状等の比較検討”。脂質栄養学、Vol.17、No.2、p140 (2008)。

3) 鈴木平光、西塔正孝、樋口智之、ポインドグルン・金花、白井展也、他、“漁村及び農村地域住民の食生活、血漿脂質、耐糖能についての比較検討”。第47回日本油化学会年会、講演要旨集、p223 (2008)。

4) 鈴木平光、ポインドグルン・金花、西塔正孝、樋口智之、白井展也、“中高年の血漿成分に及ぼすDHA含有精製魚油摂取の影響”。脂質栄養学、Vol.19、No.2、p197 (2010)。

5) 山田麻未、ポインドグルン・金花、西塔正孝、白井展也、鈴木平光、“中高年の血漿成分に及ぼす魚油含有ドリンク摂取の影響”。脂質栄養学、Vol.20、No.2、p134 (2011)。

6) 山田麻未、ポインドグルン・金花、西塔正孝、鈴木平光、樋口智之、白井展也、他、“坂戸市役所職員のメタボリックシンドローム危険因子に及ぼすDHA含有ヨーグルト摂取の影響”。脂質栄養学、Vol.20、No.2、p163 (2011)。

7) 鈴木平光、樋口智之、西塔正孝、白井展也、土橋裕美子、森川洋一、“高齢者の知的機能に及ぼす魚油及び緑茶抽出物含有食品摂取の影響：特別養護老人ホームにおける6ヵ月の試験結果”。脂質栄養学、Vol.15、No.2、p160 (2006)。

8) 鈴木平光、樋口智之、西塔正孝、白井展也、土橋裕美子、森川洋一、他、“高齢者の知的機能に及ぼすDHA含有ヨーグルト摂取の影響：特別養護老人ホームにおける6ヵ月の試験結果”。脂質栄養学、Vol.16、No.2、p156 (2007)。

表1 女子学生の血漿脂質中のアラキドン酸等の割合に及ぼす魚油含有ヨーグルト摂取の影響(%)

		n-6		n-3		n-6/n-3
		18:2	20:4	20:5	22:6	
魚油 ヨーグルト群	摂取前	28.9±2.0	5.3±1.4	1.2±0.7	4.4±2.9	8.1±4.1
	3ヵ月後	27.7±2.3**	5.9±0.8*	2.1±1.3**	5.2±1.7**	5.0±1.8**
プラセボヨーグルト群	摂取前	28.7±2.7	5.1±1.3	0.8±0.6	3.6±1.5	9.0±3.5
	3ヵ月後	29.5±2.4	5.4±0.8	1.0±0.6	3.6±2.0	9.2±3.7

(Student-t テスト、平均値±SD、* : P<0.05、** : P<0.01)

表2 漁村及び農村地域の中高年女性の血漿及び血球脂質の不飽和脂肪酸組成 (%)

	n-6		n-3		n-6/n-3
	18:2	20:4	20:5	22:6	
血漿					
漁村地域 (n=105)	27.9±0.4*	5.3±0.1	2.8±0.1*	4.5±0.1*	5.3±0.2*
農村地域 (n=98)	30.5±0.4	5.4±0.1	2.4±0.1	4.1±0.1	6.1±0.2
血球					
漁村地域 (n=105)	13.1±0.2*	7.6±0.2	2.1±0.1*	5.5±0.1	2.4±0.1
農村地域 (n=98)	13.9±0.2	8.2±0.2	1.8±0.1	5.7±0.1	2.5±0.1

Student-t テスト、平均値±SD、* : P<0.01 (農村地域との比較)

表3 魚食に多少のある漁村及び農村地域の中高年女性の血漿及び血球脂質の不飽和脂肪酸組成 (%)

	n-6		n-3		n-6/n-3
	18:2	20:4	20:5	22:6	
血漿					
漁村地域 (n=15)	24.4±1.8	5.6±0.3	3.1±0.3	5.9±0.2*	3.5±0.3*
農村地域 (n=16)	27.4±1.1	5.1±0.3	2.0±0.3	4.1±0.4	6.6±1.0
血球					
漁村地域 (n=15)	9.8±0.2*	10.1±0.4	2.9±0.2*	8.0±0.2	1.5±0.4
農村地域 (n=16)	12.3±0.6	9.3±0.4	1.7±0.1	8.2±0.8	1.8±0.2

(Student-t テスト、平均値±SD、* : P<0.01 (農村地域との比較))

表4 事業所に勤務する中高年における血漿脂質中のアラキドン酸等の割合に及ぼす精製魚油カプセル摂取の影響 (%)

		n-6		n-3	
		18:2	20:4	20:5	22:6
魚油カプセル群	摂取前	24.0±4.3	4.8±1.4	2.7±1.0	4.7±1.0
	3カ月後	23.6±2.9	5.7±1.4*	3.6±1.6*	6.2±1.3**,##
プラセボカプセル群	摂取前	24.2±3.3	5.2±1.4	2.6±1.4	5.4±2.0
	3カ月後	24.4±4.0	5.1±1.5	2.8±1.3	4.9±1.3

(student-t テスト、平均値±SD、摂取前後の比較、* : P<0.05、** : P<0.01、プラセボ群との比較、# : P<0.05、## : P<0.01)

表5 事業所に勤務する中高年における血漿脂質中のアラキドン酸等の割合に及ぼす精製魚油含有ドリンク摂取の影響(%)

		n-6		n-3	
		18:2	20:4	20:5	22:6
魚油含有 ドリンク群	摂取前	22.0±3.2#	4.8±1.1	2.4±1.4	4.8±1.2
	3カ月後	21.5±4.1	4.2±1.2#	3.9±1.8**,#	4.8±1.3
プラセボド リンク群	摂取前	24.2±3.3	5.3±1.3	2.7±1.6	5.0±1.5
	3カ月後	23.1±3.2	5.0±1.1	2.8±1.4	4.6±1.1

(student-t テスト、平均値±SD、摂取前後の比較、*:P<0.05、**:P<0.01、プラセボ群との比較、#:P<0.05、##:P<0.01)

表6 5市役所に勤務する中高年の血漿脂質中のアラキドン酸等の割合に及ぼす魚油含有ヨーグルトの摂取の影響(%)

		n-6		n-3	
		18:2	20:4	20:5	22:6
魚油含有 ヨーグルト群	摂取前	26.5±6.6	5.4±1.4	1.5±1.0	3.9±1.8
	3カ月後	25.7±3.3	5.3±1.3	2.2±1.1**	4.5±1.1*
プラセボヨー グルト群	摂取前	26.5±6.6	5.4±1.4	1.5±1.0	3.9±1.8
	3カ月後	24.8±5.4	5.3±0.8	1.8±1.0	4.1±1.3

(student-t テスト、平均値±SD、摂取前後の比較、*:P<0.05、**:P<0.01、プラセボ群との比較、#:P<0.05、##:P<0.01)

表7 高齢者の血漿脂質中のアラキドン酸等の割合に及ぼす魚油及び緑茶抽出物含有食品の摂取の影響(%)

		n-6		n-3		n-3/n-6
		18:2	20:4	20:5	22:6	
魚油+緑茶抽出 物含有食品群	摂取前	26.3±2.4	5.4±0.8	2.4±0.9	3.4±0.6	0.2±0.1
	6カ月後	25.7±1.6	5.8±0.8#	3.8±0.9#	5.6±0.7#	0.3±0.0
プラセボ 食品群	摂取前	26.6±2.1	5.3±0.7	2.6±0.5	3.6±0.6	0.2±0.0
	6カ月後	26.0±2.9	4.9±1.0	2.6±0.5	4.5±0.6	0.2±0.1

(student-t テスト、平均値±SD、プラセボ群との比較、#:P<0.05)

表8 高齢者の血漿脂質中のアラキドン酸等の割合に及ぼす魚油含有ヨーグルト摂取の影響(%)

		n-6		n-3		n-3/n-6
		18:2	20:4	20:5	22:6	
魚油含有 ヨーグルト群	摂取前	25.8±0.7	5.9±0.2	2.4±0.2	4.6±0.2	0.25
	6カ月後	24.8±0.6	6.2±0.2#	3.7±0.2#	5.9±0.3#	0.35
プラセボ ヨーグルト群	摂取前	27.4±0.8	5.8±0.2	2.3±0.2	4.5±0.2	0.24
	6カ月後	26.7±0.7	5.5±0.2	2.6±0.2	4.5±0.2	0.26

(student-t テスト、平均値±SE、プラセボ群との比較、#:P<0.05)

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進事業）

総合研究報告書

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）を用いるアラキドン酸の 病態進行に対する影響の検討

分担研究者 大原 直樹 金城学院大学薬学部教授

研究協力者 内藤由紀子 国立循環器病研究センター研究所 病態ゲノム医学部 室長

立花 滋博 財団法人食品薬品安全センター-秦野研究所 試験部

研究要旨

アラキドン酸（ARA）投与が炎症性病態（高血圧、血管傷害、脳出血等）を増悪するか否かを評価する目的で、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）を用いた13週間（90日間）反復投与毒性試験を実施した。雌雄それぞれ32匹のSHRSPを1群8匹からなる4群に分け、ARA 0、5、35および240mg/kgに該当するARA含有油を1日1回強制経口投与した。ARA含有サプリメントに目安として設定されている1日摂取量（ARAで240mg）と体重当たりの換算でほぼ同量を低用量、その約50倍を高用量とし、公比7で中用量群を設けた。投与第5週に、雄のARA 0mg/kg群の2例で、雌の35mg/kg群の1例で脳卒中を疑わせる症状が顕われ、以降、症状を伴う個体の数は増し、雄では投与期間中に全例で脳卒中症状が認められた。雌では異常な症状が全く認められなかった個体が、0、5、35および240mg/kg群で、それぞれ、2、2、3および1例あった。また、雄では投与期間終了までに、0、5、35および240mg/kg群で、それぞれ、3、4、1および2例が死亡した。雌では、5、35および240mg/kg群で、それぞれ1例が死亡した。これらの死亡例の中には、実験の初期に、脳卒中症状が先行せず、突然死亡する例があった。これは、雄のみ、0、5および240mg/kg群で、それぞれ1、2および1例認められた。これらの個体では、肺水腫がみられ、心不全が示唆された。体重、摂餌量にARA投与の影響は認められなかった。血液学および病理学的検査所見にもARA投与の影響は認められなかった。血液生化学では、雌の血漿中リン脂質濃度が用量に依存して低下し、240mg/kgでは対照群と比較して有意な低値を示したが、これ以外に影響は見られなかった。この実験条件下で無毒性量（NOAEL）を求めるとすれば、雄では240mg/kg、雌では血漿中リン脂質濃度への影響を有害効果と考えた場合に35mg/kgと判断することができる。

A. 研究目的

アラキドン酸（ARA）投与が脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）における炎症性病態（高血圧、血管傷害、脳出血等）を増悪するか否かを、医薬品非臨床試験ガイドラインに準じた13週間（90日間）反復投与毒性試験を実施して評価した。本実験の結果は、主として平成23年度に得られたもので、内容は、総括・分担報告書とほぼ同様である。

B. 研究方法

動物

雌雄それぞれ32匹のSHRSPを1群8匹からなる4群に分け、ARA 0、5、35および240mg/kgに相当するARA含有油を1日1回、90日間強制経口投与した。用量は、ARA含有サプリメントの目安として設定されている1日摂取量（ARAとして240mg）とほぼ同量を低用量（5mg/kg）、その約50倍を高用量（240mg/

kg) とし、公比約 7 で中用量 (35mg/kg) を設定した。

飼料

ラット・マウス用標準粉末飼料、CE-2 (日本クレア) に 2.5w/w% ラード、1.25w/w% カノーラ油および 1.25w/w% 大豆油を添加した基礎飼料を与えた。

1) 一般状態の観察

投与期間中は、毎日、投与前後に一般状態を観察した。特に、脳卒中によると考えられる症状 (眼球突出、過敏、鈍麻、多動、運動障害、震え、痙攣、四肢の麻痺、突然死) の観察には留意した。

2) 体重測定

投与初日に体重を測定し、以後、投与期間終了時まで毎週 1 回の頻度で投与前の体重を測定した。投与期間終了日、剖検日および死亡時にも測定した。

3) 摂餌量測定

投与第 1 週では、投与第 1 日から第 2 日にかけて 1 日あたりの摂餌量を測定し、以後毎週 1 回の頻度で 1 日あたりの摂餌量を測定した。

4) 血圧測定

投与開始前、投与第 4 週および 10 週に tail-cuff 法で血圧を測定した (MK-2000 ST、室町機械を使用)。

5) 採血・剖検

定期解剖対象個体の全例を屠殺剖検前 18 時間絶食させた。続いて、50mg/kg ペントバルビタールナトリウム腹腔内投与により麻酔し、腹部大動脈から下記の順序で採血した後、剖検した。

①血液学的検査用採血 (抗凝固剤: EDTA 2K)

②血液生化学的検査用採血 (抗凝固剤: ヘパリン Na)

肉眼的観察の後、器官重量を測定し、主な器官、組織をホルマリン固定後、薄切した切片をヘマトキシリン・エオジン染色して組織観察を

行った。

なお、雄は症状の悪化が見られたため、11 週に剖検した。

切迫屠殺例は雌雄ともに 240mg/kg 群で 1 例あった。死亡例からは採血しなかった。

(倫理面への配慮)

本研究は、財団法人食品薬品安全センター秦野研究所「動物実験に関する指針」に基づき、同所動物実験委員会による実験計画書の審査が行われ、実験動物に対する動物愛護上の配慮等、倫理的配慮が適性であることが確認された後、同研究所研究管理委員会によって実施許可されたものである。

C. 研究結果

一般症状および体重

投与第 5 週に、雄の ARA 0mg/kg 群の 2 例で鼻からの出血が、雌の 35mg/kg 群の 1 例で眼内出血によるとみられる片眼球の変色が認められた。以降、脳卒中を疑わせる症状は、雄では、投与期間中に全例で認められた。雌では異常な症状が全く認められなかった個体が、0、5、35 および 240mg/kg 群で、それぞれ、2、2、3 および 1 例あった。また、第 6 週に雄の 5mg/kg 群の 1 例が死亡し、以降、投与期間終了までに、雄の 0、5、35 および 240mg/kg 群で、それぞれ、3、4、1 および 2 例が死亡した。雌では、投与期間終了までに、5、35 および 240mg/kg 群で、それぞれ 1 例が死亡した。剖検の結果、雄の 0、5 および 240mg/kg 群の死亡例では、脳出血が見られた。またこれらの途中死亡例の全例で肺のうっ血が認められた。雌の途中死亡例では、5 および 35mg/kg 群のそれぞれ 1 例で脳出血が認められた。

体重は、雄では、脳卒中症状の発症頻度が増した 8 週以降でバラツキが大きくなったが、群間差は見られなかった。雌では 9 週まで体重が増大し、プラトーに達した (Figure 1, Table 1)。摂餌量は、雄では投与 4 週までは増大したが、

その後低下に転じた。脳卒中症状を示す個体が増えるにつれて低下し、かつ、バラツキが大きくなった。雌では投与7週までは概ね増大し、8週以降はバラツキが大きくなった。8週のARA 240mg/kg群では対照群と比較して有意に大きくなった。その他の時点では両性ともに群間差が認められなかった (Figure 2、Table 2)。

血圧

第1、4および10週の収縮期および拡張期血圧には、加齢による経時的上昇が認められたが、雌雄ともに、各測定時点における群間差は認められなかった (Figure 3、Table 3)。心拍数にも影響は認められなかった (Table 3)。

血液学および血液生化学的検査結果

血液学的検査では、雌雄ともに異常所見は認められなかった。血液生化学的検査では、雌の血漿中リン脂質濃度がARAの用量に依存して低下し、240mg/kgでは対照群と比較して有意な低値を示した。他の項目には、雌雄ともにARAの影響は認められなかった (Table 4、Table 5)。

器官重量、解剖所見および病理組織観察結果

いずれの器官においても、器官重量およびその体重相対重量には影響が認められなかった。雌の副腎重量は、ARA 35および240mg/kg投与群で低下する傾向が見られた (Table 6)。病理学的検査では、雄の脳出血、浮腫、梗塞の頻度が雌に比べ高かったが、群間差はなかった。一方、昇圧によると考えられる血管の肥厚、心肥大は性差無く認められたが、これにも群間差はなかった。病理組織観察の結果にも群間差は認められなかった (Table 7)。

D. 考察

今回の実験は、医薬品非臨床試験ガイドラインに準じた13週間反復投与毒性試験を、SHRSP

を用いて実施したものである。観察期間中に脳卒中による死亡があり、その頻度は雌よりも雄で高かったが、ARAの用量とは関連が無かった。ARAは、サプリメントとしての推奨用量の約50倍を高用量に設定したが、この用量までARAの有害効果は認められなかった。

今回の実験条件下におけるNOAELは、雄では240mg/kg以上、雌では血漿中リン脂質濃度への有意な影響を有害効果と考えれば、35mg/kgと判断できる。

脳卒中症状が無い個体が、実験の初期に突然死亡するケースがあった。これは、雄のみで、0、5および240mg/kg群でそれぞれ1、2および1例認められた。剖検の結果、マクロでは硬膜下出血が認められたため、脳卒中による突然死とも判断できるが、これらの個体では、肺水腫がみられ、心不全が起こったことを示唆した。また、全例の胃内に飼料が残存していた。死亡に先行して明らかな脳卒中症状が見られた例では、胃内が空であった。突然死は早朝に認められた例が多く (実験者によって発見されたとき、硬直前である等)、暗期 (19時~7時) に活発に摂食した後、突然死亡したものと考えられた。これは、ヒトのポックリ病^{1,2)}との関連を疑わせる。食後高脂血症のヒトでは、血漿中レムナントレベルの持続的上昇と、それに伴うRhoキナーゼの活性化による平滑筋の収縮タンパク感受性亢進によって、血管の攣縮が起こることが、原因の一つであると考えられている。上述の知見は、筆者がSHRSPを用いた安全性試験を実施した際に、全ての実験で認められている。今回のARAの安全性評価とは関連が無いが、SHRSPがもつ病態には、冠動脈の攣縮による心不全死が一定頻度で含まれているものと考えられる。

ARAはp38 MAPK経路を刺激することによって、インスリンによるG6PD mRNA産生増大を阻害し、それによってインスリン情報伝達を阻害する³⁾。一方、SHRSPは末梢組織へのグルコース取り込みに障害があり⁴⁾、糖尿

病モデル動物の一つと考えられる。高用量のARAはSHRSPの背景病態を悪化させると推測したが、今回の用量では全く影響が認められなかった。ARA含有サプリメントの1日摂取量の50倍の用量でも病態悪化が認められなかったことから、ARAはSHRSPにおいてインスリン情報伝達を阻害する可能性があるとしても、血圧上昇や血管傷害を増悪させることは無いと考えられた。

また、今回の結果から、SHRSPの病態が顕われる時期には性差があり、雄は雌より早く重症化することが確認された。この経過にもARAは影響を及ぼさなかった。

E. 結論

最大240mg/kg/dayのARAを13週間経口投与したSHRSPでは、ARAの有害効果が認められなかった。この実験条件下におけるNOAELは、雄では240mg/kg、雌では35mg/kgと判断できる。

本実験結果の概要をTable 8として末尾に示した。

(参考文献)

1. Takeichi S, Nakajima Y, Yukawa N, Saito T, Seto Y, Huang XL, Kusakabe T, Jin ZB, Hasegawa I, Nakano T, Saniabadi A, Adachi M, Ohara N, Wang T, Nakajima K. 2001. Plasma triglyceride-rich lipoprotein remnants as a risk factor of 'Pokkuri disease'. *Leg Med (Tokyo)*. 3, 84-94.
2. Oi K, Shimokawa H, Hiroki J, Uwatoku T, Abe K, Matsumoto Y, Nakajima Y, Nakajima K, Takeichi S, Takeshita A. 2004. Remnant lipoproteins from patients with sudden cardiac death enhance coronary vasospastic activity through upregulation of Rho-kinase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 918-922.

3. Talukdar I, Szeszel-Fedorowicz W, Salati LM. 2005. Arachidonic acid inhibits the insulin induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase via p38 MAP kinase, 2005. *J. Biol. Chem.* 280, 40660-40667.

4. Collison M, James DJ, Graham D, Holman DG, Connell JMC, Dominiczak AF, Gould GW, Salt IP. 2005. Reduced insulin-stimulated GLUT4 bioavailability in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Diabetologia* 48, 539-546.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

青木聡子、立花滋博、安藤栄里子、田面喜之、古谷真美、永田伴子、内藤由紀子、大原直樹。

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)を用いるアラキドン酸の病態進行に対する影響の検討。

脂質栄養学 20 (2) 154 (2011)。日本脂質栄養学会第20回大会 (2011年9月2、3日、坂戸市)。

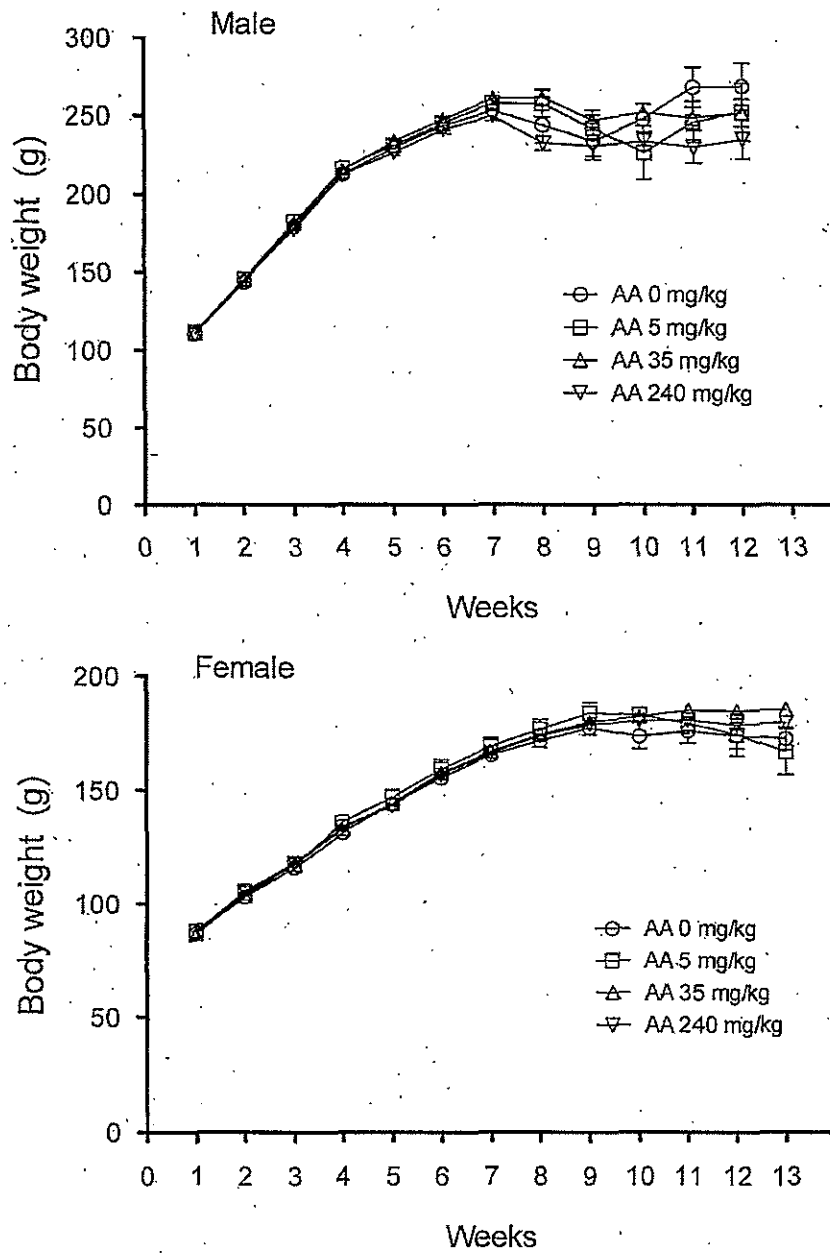


Figure 1 Body weight gains of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Symbols with vertical bars are means with SEM of 4~8 animals (See Table 1).

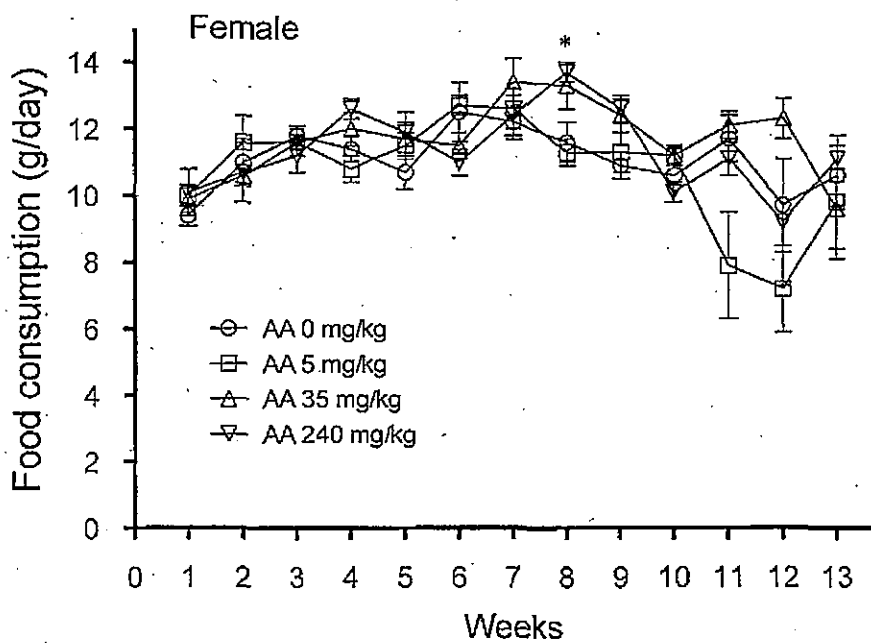
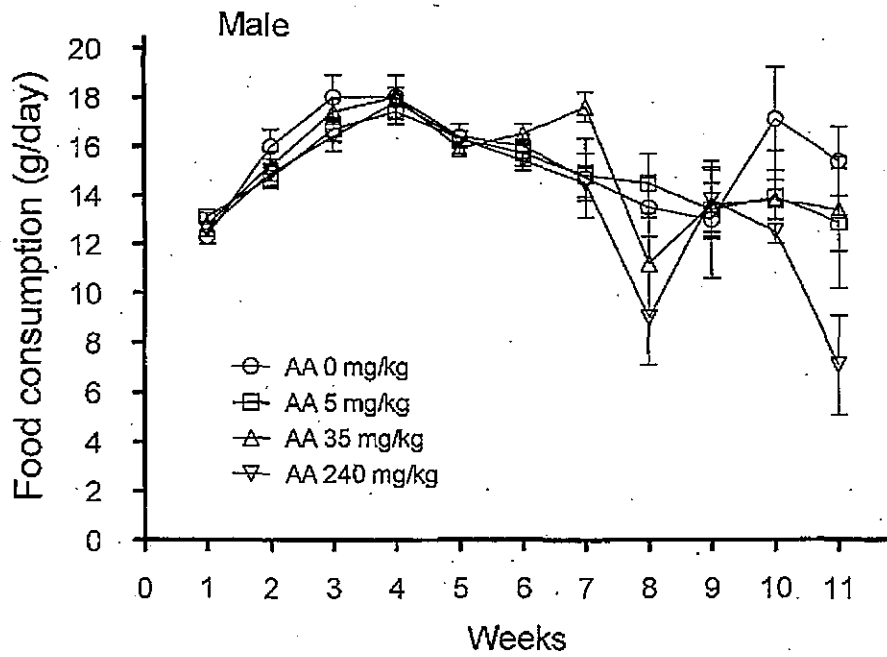


Figure 2 Food consumptions of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Symbols with vertical bars are means with SEM of 4~8 animals (See Table 2).

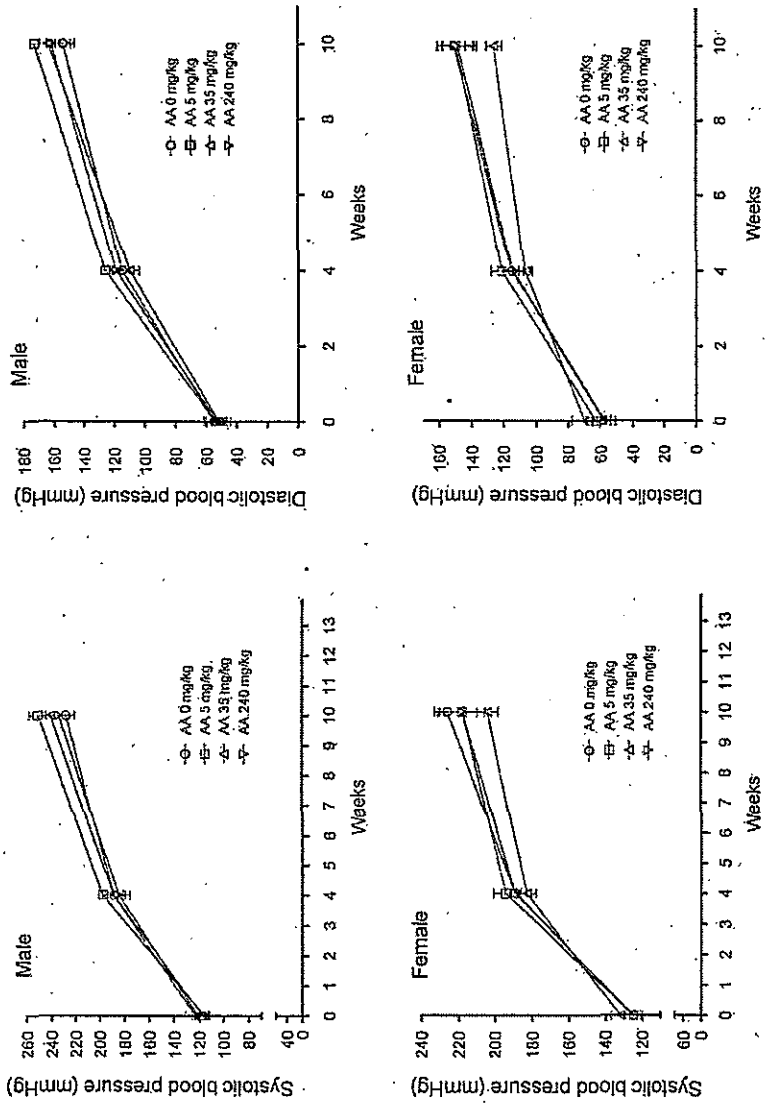


Figure 3 Changes in systolic and diastolic blood pressure of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Symbols with vertical bars are means with SEM of 4-8 animals (see Table 3).

Table 1 Changes in body weights of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Male

Dose	Administration period (weeks)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AA 0 mg/kg	110.6 ±2.5 (8)	143.6 ±3.2 (8)	179.2 ±3.8 (8)	212.6 ±4.2 (8)	229.0 ±4.9 (8)	243.3 ±5.2 (8)	252.7 ±6.2 (8)	243.8 ±11.8 (8)	233.4 ±11.6 (7)	247.5 ±9.4 (8)	267.8 ±12.8 (5)	268.4 ±15.2 (5)
AA 5 mg/kg	111.8 ±2.6 (8)	145.6 ±2.8 (8)	182.1 ±3.5 (8)	216.1 ±3.8 (8)	230.8 ±4.0 (8)	244.9 ±3.9 (8)	257.6 ±4.4 (7)	257.1 ±8.4 (6)	241.9 ±8.1 (6)	229.1 ±17.0 (5)	245.6 ±13.0 (4)	252.0 ±18.3 (4)
AA 35 mg/kg	111.8 ±2.4 (8)	145.0 ±3.1 (8)	181.4 ±3.4 (8)	214.6 ±3.2 (8)	233.3 ±3.6 (8)	246.8 ±4.1 (8)	250.5 ±3.7 (8)	261.0 ±5.7 (8)	246.9 ±6.1 (8)	251.7 ±5.2 (8)	248.4 ±6.5 (8)	251.6 ±8.7 (8)
AA 240 mg/kg	110.3 ±2.1 (8)	144.8 ±3.1 (8)	177.6 ±3.1 (8)	212.1 ±2.5 (8)	226.0 ±3.0 (8)	241.0 ±2.6 (8)	249.6 ±1.7 (8)	232.2 ±4.6 (7)	230.6 ±6.8 (7)	233.2 ±6.2 (7)	229.7 ±10.2 (7)	234.6 ±12.6 (6)

Values represent as mean ± SE (N)

Female

Dose	Administration period (weeks)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
AA 0 mg/kg	85.9 ±2.1 (8)	102.9 ±2.5 (8)	115.9 ±2.4 (8)	131.3 ±2.6 (8)	143.9 ±2.4 (8)	155.3 ±2.7 (8)	165.4 ±2.8 (8)	171.7 ±3.0 (8)	177.3 ±3.1 (8)	173.7 ±5.7 (8)	175.8 ±5.2 (8)	173.9 ±5.7 (8)	172.5 ±5.0 (8)
AA 5 mg/kg	87.8 ±1.6 (8)	104.5 ±2.1 (8)	117.3 ±2.2 (8)	135.9 ±2.8 (8)	148.8 ±3.5 (8)	159.1 ±4.2 (8)	169.0 ±3.9 (8)	176.7 ±4.3 (8)	183.8 ±4.6 (8)	182.8 ±3.4 (8)	179.1 ±4.4 (8)	174.2 ±9.1 (8)	166.9 ±10.1 (8)
AA 35 mg/kg	86.4 ±2.7 (8)	103.4 ±2.0 (8)	117.7 ±1.9 (8)	133.2 ±2.1 (8)	144.2 ±1.7 (8)	157.6 ±1.9 (8)	166.9 ±2.1 (8)	174.4 ±2.0 (8)	179.8 ±1.9 (8)	182.1 ±2.3 (8)	184.8 ±2.5 (8)	184.5 ±2.1 (8)	185.3 ±2.5 (8)
AA 240 mg/kg	87.5 ±1.6 (8)	105.5 ±1.8 (8)	118.1 ±1.9 (8)	133.9 ±1.3 (8)	143.1 ±1.2 (8)	156.6 ±1.3 (8)	166.2 ±1.6 (8)	173.8 ±1.9 (8)	178.8 ±1.3 (8)	180.4 ±1.8 (8)	180.7 ±2.9 (8)	178.3 ±4.2 (7)	179.7 ±3.0 (7)

Values represent as mean ± SE (N)

Table 2 Food consumptions of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Male

Dose	Administration period (weeks)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
AA 0 mg/kg	12.3 ±0.3 (8)	16.0 ±0.7 (8)	18.0 ±0.9 (8)	18.0 ±0.4 (8)	16.4 ±0.5 (8)	16.0 ±0.5 (8)	14.7 ±1.6 (8)	13.5 ±1.2 (8)	13.0 ±2.4 (7)	17.1 ±2.1 (6)	15.4 ±1.4 (5)
AA 5 mg/kg	13.1 ±0.3 (8)	14.7 ±0.3 (8)	16.7 ±0.5 (8)	17.4 ±0.5 (8)	16.3 ±0.6 (8)	15.7 ±0.5 (8)	14.8 ±0.9 (7)	14.5 ±1.2 (6)	13.4 ±1.1 (6)	13.9 ±1.9 (5)	12.9 ±2.7 (4)
AA 35 mg/kg	12.8 ±0.5 (8)	15.2 ±0.6 (8)	17.4 ±0.5 (8)	18.0 ±0.9 (8)	15.9 ±0.3 (8)	16.5 ±0.4 (8)	17.6 ±0.6 (8)	11.2 ±1.9 (8)	13.6 ±1.4 (8)	13.8 ±0.8 (8)	13.4 ±1.7 (8)
AA 240 mg/kg	12.6 ±0.3 (8)	14.9 ±0.6 (8)	16.4 ±0.6 (8)	17.8 ±0.6 (8)	16.3 ±0.3 (8)	15.4 ±0.4 (8)	14.5 ±0.7 (8)	9.0 ±1.9 (7)	13.8 ±1.3 (7)	12.5 ±0.5 (7)	7.1 ±2.0 (7)

Values represent as mean ± SE (N)

Female

Dose	Administration period (weeks)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
AA 0 mg/kg	9.4 ±0.3 (8)	11.0 ±0.7 (8)	11.8 ±0.3 (8)	11.4 ±0.4 (8)	10.7 ±0.5 (8)	12.5 ±0.9 (8)	12.2 ±0.5 (8)	11.6 ±0.6 (8)	10.9 ±0.4 (8)	10.6 ±0.8 (8)	11.7 ±0.7 (8)	9.7 ±1.4 (8)	10.6 ±0.9 (8)
AA 5 mg/kg	10.0 ±0.3 (8)	11.6 ±0.8 (8)	11.8 ±0.4 (8)	10.8 ±0.4 (8)	11.5 ±0.4 (8)	12.7 ±0.3 (8)	12.6 ±0.6 (8)	11.3 ±0.4 (8)	11.3 ±0.6 (8)	11.2 ±0.2 (8)	7.9 ±1.8 (8)	7.2 ±1.3 (8)	9.8 ±1.7 (8)
AA 35 mg/kg	9.9 ±0.4 (8)	10.6 ±0.3 (8)	11.6 ±0.2 (8)	12.0 ±0.5 (8)	11.7 ±0.5 (8)	11.5 ±0.4 (8)	13.4 ±0.7 (8)	13.3 ±0.7 (8)	12.4 ±0.5 (8)	11.2 ±0.3 (8)	12.1 ±0.4 (8)	12.3 ±0.6 (8)	9.5 ±1.2 (8)
AA 240 mg/kg	10.1 ±0.7 (8)	10.7 ±0.9 (8)	11.2 ±0.5 (8)	12.6 ±0.3 (8)	11.9 ±0.6 (8)	11.0 ±0.4 (8)	12.4 ±0.6 (8)	13.7* ±0.3 (8)	12.8 ±0.4 (8)	10.1 ±0.3 (8)	11.1 ±0.5 (8)	9.2 ±1.9 (7)	11.1 ±0.7 (7)

Values represent as mean ± SE (N)

* significantly different from the control group, p<0.05, (Dunnnett's test)

Table 3 Blood pressure and heart rate of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Male

Dose	Before administration period				4th week of administration period				10th week of administration period			
	Heart rate (beats/min)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)	Heart rate (beats/min)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)	Heart rate (beats/min)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)
AA 0 mg/kg	554 ±11 (8)	117 ±5 (8)	76 ±6 (8)	55 ±7 (8)	472 ±25 (8)	189 ±7 (8)	140 ±5 (8)	115 ±5 (8)	493 ±17 (6)	228 ±7 (6)	178 ±7 (6)	154 ±8 (6)
AA 5 mg/kg	577 ±8 (8)	116 ±5 (8)	75 ±6 (8)	54 ±7 (8)	498 ±7 (8)	198 ±3 (8)	150 ±2 (8)	126 ±3 (8)	438 ±34 (4)	251 ±7 (4)	199 ±8 (4)	173 ±7 (4)
AA 35 mg/kg	553 ±10 (8)	123 ±8 (8)	76 ±8 (8)	52 ±8 (8)	483 ±8 (8)	189 ±9 (8)	137 ±7 (8)	110 ±6 (8)	489 ±13 (8)	241 ±4 (8)	189 ±4 (8)	164 ±5 (8)
AA 240 mg/kg	564 ±5 (8)	121 ±5 (8)	76 ±6 (8)	53 ±7 (8)	489 ±19 (8)	185 ±9 (8)	141 ±8 (8)	119 ±8 (8)	446 ±24 (7)	234 ±13 (7)	186 ±13 (7)	162 ±13 (7)

Values represent as mean ± SE (N)

Female

Dose	Before administration period				4th week of administration period				10th week of administration period			
	Heart rate (beats/min)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)	Heart rate (beats/min)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)	Heart rate (beats/min)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)
AA 0 mg/kg	559 ±7 (8)	125 ±5 (8)	81 ±6 (8)	58 ±7 (8)	528 ±7 (8)	189 ±3 (8)	140 ±2 (8)	115 ±2 (8)	515 ±8 (8)	226 ±7 (8)	176 ±7 (8)	151 ±7 (8)
AA 5 mg/kg	555 ±7 (8)	125 ±5 (8)	84 ±5 (8)	63 ±6 (8)	526 ±7 (8)	184 ±7 (8)	146 ±7 (8)	121 ±7 (8)	456 ±21 (8)	218 ±13 (8)	173 ±12 (8)	150 ±11 (8)
AA 35 mg/kg	548 ±5 (8)	132 ±5 (8)	91 ±6 (8)	70 ±8 (8)	524 ±7 (8)	183 ±5 (8)	132 ±4 (8)	107 ±4 (8)	475 ±21 (8)	204 ±6 (8)	152 ±5 (8)	126 ±5 (8)
AA 240 mg/kg	560 ±7 (8)	125 ±4 (8)	79 ±4 (8)	57 ±3 (8)	539 ±4 (8)	189 ±6 (8)	139 ±5 (8)	114 ±6 (8)	508 ±18 (8)	218 ±12 (8)	172 ±11 (8)	149 ±12 (8)

Values represent as mean ± SE (N)

SBP, systolic blood pressure; MBP, mean blood pressure; DBP, diastolic blood pressure

Table 4 Hematology of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Male

Dose	RBC ($\times 10000/\mu\text{L}$)	Hct (%)	Hgb (g/dL)	Reticulocyte (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
AA 0 mg/kg	972.6 ± 19.0 (5)	46.0 ± 1.0 (5)	16.5 ± 0.6 (5)	7.5 ± 0.3 (5)	47.3 ± 0.6 (5)	17.0 ± 0.3 (5)	35.9 ± 0.7 (5)
AA 5 mg/kg	990.3 ± 22.1 (4)	46.9 ± 0.9 (4)	16.7 ± 0.3 (4)	9.8 * ± 1.0 (4)	47.3 ± 0.5 (4)	16.9 ± 0.1 (4)	35.7 ± 0.5 (4)
AA 35 mg/kg	966.7 ± 30.4 (7)	45.6 ± 1.2 (7)	16.2 ± 0.5 (7)	8.3 ± 0.2 (7)	47.2 ± 0.3 (7)	16.7 ± 0.1 (7)	35.4 ± 0.3 (7)
AA 240 mg/kg	958.9 ± 38.8 (7)	46.8 ± 2.3 (7)	16.5 ± 0.9 (7)	7.8 ± 0.5 (7)	48.7 ± 0.4 (7)	17.2 ± 0.3 (7)	35.2 ± 0.4 (7)

Dose	WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Lymphocyte (%)	Monocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Platelet ($\times 10000/\mu\text{L}$)
AA 0 mg/kg	39.7 ± 3.2 (5)	40.5 ± 1.9 (5)	51.8 ± 2.5 (5)	6.7 ± 1.0 (5)	1.1 ± 0.2 (5)	0.0 ± 0.0 (5)	46.3 ± 9.2 (5)
AA 5 mg/kg	37.4 ± 1.7 (4)	41.9 ± 5.4 (4)	50.7 ± 6.0 (4)	6.3 ± 0.9 (4)	1.1 ± 0.1 (4)	0.0 ± 0.0 (4)	41.0 ± 3.0 (4)
AA 35 mg/kg	42.6 ± 3.6 (7)	43.5 ± 3.3 (7)	50.6 ± 3.0 (7)	5.2 ± 0.5 (7)	0.7 ± 0.1 (7)	0.0 ± 0.0 (7)	40.8 ± 4.1 (7)
AA 240 mg/kg	35.6 ± 7.6 (7)	52.4 ± 7.1 (7)	42.3 ± 6.6 (7)	4.5 ± 0.7 (7)	0.8 ± 0.2 (7)	0.0 ± 0.0 (7)	41.2 ± 2.6 (7)

Values represent as mean \pm SE (N)

MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration

*, significantly different from the control group $p < 0.05$ (Dunnett's test)

(continued on next page)

Female

Dose	RBC ($\times 10000/\mu\text{L}$)	Hct (%)	Hgb (g/dL)	Reticulocyte (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
AA 0 mg/kg	1073.8 ± 25.0 (8)	50.3 ± 1.2 (8)	17.8 ± 0.5 (8)	7.5 ± 0.9 (8)	46.8 ± 0.4 (8)	16.6 ± 0.1 (8)	35.5 ± 0.1 (8)
AA 5 mg/kg	1066.1 ± 34.1 (7)	49.2 ± 1.3 (7)	17.7 ± 0.6 (7)	6.9 ± 0.9 (7)	46.2 ± 0.5 (7)	16.6 ± 0.1 (7)	36.0 ± 0.3 (7)
AA 35 mg/kg	1040.7 ± 17.3 (7)	48.3 ± 0.8 (7)	17.1 ± 0.3 (7)	6.7 ± 0.8 (7)	46.5 ± 0.5 (7)	16.4 ± 0.1 (7)	35.3 ± 0.2 (7)
AA 240 mg/kg	1052.8 ± 18.9 (8)	49.2 ± 1.2 (8)	17.4 ± 0.4 (8)	6.4 ± 0.8 (8)	46.2 ± 0.4 (8)	16.4 ± 0.1 (8)	35.4 ± 0.1 (8)

Dose	WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Lymphocyte (%)	Monocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Platelet ($\times 10000/\mu\text{L}$)
AA 0 mg/kg	45.2 ± 3.1 (8)	38.8 ± 6.7 (8)	55.1 ± 6.6 (8)	5.1 ± 0.5 (8)	1.0 ± 0.2 (8)	0.0 ± 0.0 (8)	50.2 ± 4.8 (8)
AA 5 mg/kg	41.9 ± 2.3 (7)	29.9 ± 5.1 (7)	62.7 ± 4.6 (7)	5.9 ± 0.5 (7)	1.5 ± 0.3 (7)	0.0 ± 0.0 (7)	49.5 ± 6.1 (7)
AA 35 mg/kg	37.4 ± 2.8 (7)	26.5 ± 2.5 (7)	66.8 ± 2.4 (7)	5.1 ± 0.4 (7)	1.6 ± 0.2 (7)	0.0 ± 0.0 (7)	50.3 ± 9.9 (7)
AA 240 mg/kg	38.8 ± 1.9 (8)	34.1 ± 6.3 (8)	58.6 ± 6.7 (8)	5.9 ± 0.9 (8)	1.4 ± 0.2 (8)	0.0 ± 0.0 (8)	50.4 ± 5.9 (8)

Values represent as mean \pm SE (N)

MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration

Table 5 Blood biochemistry of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Male

Date	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Phospholipid (mg/dL)	Free fatty acid (mEq/L)	Total bilirubin (mg/dL)	Blood urea nitrogen (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
AA 0 mg/kg	5.8 ±0.1 (5)	2.6 ±0.0 (5)	1.50 ±0.05	169 ±7 (5)	81 ±8 (5)	31 ±3 (5)	124 ±8 (5)	0.56 ±0.07 (5)	0.10 ±0.01 (5)	35 ±4 (5)	0.7 ±0.0 (5)
AA 5 mg/kg	5.9 ±0.1 (4)	3.8 ±0.1 (4)	1.78 ±0.03 (4)	191 ±14 (4)	93 ±9 (4)	42 ±3 (4)	142 ±10 (4)	0.70 ±0.08 (4)	0.10 ±0.01 (4)	37 ±2 (4)	0.7 ±0.0 (4)
AA 35 mg/kg	5.7 ±0.1 (7)	3.7 ±0.0 (7)	1.91 ±0.05 (7)	174 ±6 (7)	84 ±4 (7)	26 ±4 (7)	125 ±5 (7)	0.55 ±0.04 (7)	0.10 ±0.01 (7)	32 ±4 (7)	0.8 ±0.1 (7)
AA 240 mg/kg	5.6 ±0.1 (6)	3.7 ±0.1 (6)	1.91 ±0.10 (6)	165 ±8 (6)	96 ±9 (6)	24 ±4 (6)	118 ±5 (6)	0.52 ±0.10 (6)	0.09 ±0.02 (6)	40 ±4 (6)	0.8 ±0.1 (6)

Date	Ca (mg/dL)	Inorganic phosphate (mg/dL)	Alkaline phosphatase (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	γ -GTP (U/L)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
AA 0 mg/kg	10.0 ±0.1 (5)	6.0 ±0.1 (5)	422 ±28 (5)	114 ±32 (5)	71 ±30 (5)	1 ±0 (5)	137.4 ±1.8 (5)	4.21 ±0.37 (5)	99.3 ±2.0 (5)
AA 5 mg/kg	10.1 ±0.1 (4)	6.0 ±0.5 (4)	422 ±45 (4)	83 ±5 (4)	40 ±4 (4)	1 ±0 (4)	137.1 ±1.7 (4)	4.48 ±0.71 (4)	99.0 ±2.9 (4)
AA 35 mg/kg	10.0 ±0.1 (7)	6.9 ±0.4 (7)	395 ±25 (7)	85 ±4 (7)	44 ±4 (7)	1 ±0 (7)	135.8 ±1.6 (7)	3.88 ±0.33 (7)	98.7 ±2.3 (7)
AA 240 mg/kg	9.8 ±0.1 (6)	7.4 ±0.6 (6)	395 ±14 (6)	85 ±4 (6)	41 ±3 (6)	1 ±0 (6)	140.0 ±1.2 (6)	4.19 ±0.57 (6)	102.0 ±1.7 (6)

Values represent as mean ± SE (n)

(continued on next page)

Female

Dose	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Phospholipid (mg/dL)	Free fatty acid (mEq/L)	Total bilirubin (mg/dL)	Blood urea nitrogen (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
AA 0 mg/kg	5.7 ±0.2 (8)	3.7 ±0.3 (8)	1.78 ±0.05 (8)	163 ±10 (8)	94 ±3 (8)	51 ±12 (8)	151 ±8 (8)	0.74 ±0.03 (8)	0.10 ±0.01 (8)	41 ±10 (8)	0.8 ±0.1 (8)
AA 6 mg/kg	5.7 ±0.1 (7)	3.6 ±0.1 (7)	1.80 ±0.04 (7)	165 ±17 (7)	95 ±10 (7)	50 ±22 (7)	143 ±7 (7)	0.69 ±0.06 (7)	0.09 ±0.01 (7)	29 ±2 (7)	0.7 ±0.0 (7)
AA 35 mg/kg	5.8 ±0.1 (7)	3.7 ±0.05 (7)	1.81 ±0.05 (7)	161 ±5 (7)	93 ±8 (7)	29 ±3 (7)	135 ±6 (7)	0.60 ±0.05 (7)	0.09 ±0.01 (7)	26 ±3 (7)	0.7 ±0.0 (7)
AA 240 mg/kg	5.7 ±0.2 (7)	3.5 ±0.1 (7)	1.78 ±0.06 (7)	141 ±8 (7)	77 ±5 (7)	35 ±4 (7)	126 ±5 (7)	0.62 ±0.08 (7)	0.09 ±0.01 (7)	27 ±3 (7)	0.7 ±0.1 (7)

Dose	Ca (mg/dL)	Inorganic phosphate (mg/dL)	Alkaline phosphatase (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	γ-GTP (U/L)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
AA 0 mg/kg	10.2 ±0.1 (8)	5.5 ±0.4 (8)	279 ±14 (8)	85 ±9 (8)	32 ±2 (8)	1 ±0 (8)	138.7 ±1.7 (8)	2.94 ±0.31 (8)	99.7 ±1.7 (8)
AA 6 mg/kg	10.2 ±0.1 (7)	5.7 ±0.2 (7)	252 ±12 (7)	81 ±8 (7)	38 ±5 (7)	1 ±0 (7)	134.3 ±1.5 (7)	3.78 ±0.28 (7)	93.4 ±1.8 (7)
AA 35 mg/kg	10.1 ±0.2 (7)	5.3 ±0.3 (7)	207 ±14 (7)	78 ±2 (7)	33 ±1 (7)	1 ±0 (7)	138.8 ±0.4 (7)	3.48 ±0.20 (7)	103.2 ±0.8 (7)
AA 240 mg/kg	10.0 ±0.1 (7)	6.4 ±0.6 (7)	228 ±23 (7)	73 ±1 (7)	34 ±1 (7)	1 ±0 (7)	107.5 ±0.4 (7)	3.16 ±0.08 (7)	102.2 ±1.1 (7)

Values represent as mean ± SE (n)

* significantly different from the control group p < 0.05 (Dunnnett's test)

Table 6 Changes in organ weights of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Male

Dose	Body weight (g)	Brain		Heart		Liver		Kidney (R)		Kidney (L)		Kidney		Spleen		Testis (R)		Testis (L)		Testis		Adrenal gland (R)		Adrenal gland (L)		Adrenal gland	
		(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(mg)	(mg%)	(mg)	(mg%)	(mg)	(mg%)
AA 0 mg/kg	249.5 ±13.6 (5)	2.1940 ±0.0907 (5)	0.89 ±0.06 (5)	1.3246 ±0.0706 (5)	0.53 ±0.02 (5)	7.9504 ±0.5993 (5)	3.17 ±0.09 (5)	1.0849 ±0.0634 (5)	0.44 ±0.01 (5)	1.0784 ±0.0768 (5)	0.43 ±0.01 (5)	2.1033 ±0.1299 (5)	0.87 ±0.02 (5)	0.7024 ±0.0401 (5)	0.28 ±0.01 (5)	1.4465 ±0.0449 (5)	0.58 ±0.02 (5)	1.4679 ±0.0352 (5)	0.59 ±0.02 (5)	2.9144 ±0.0789 (5)	1.18 ±0.03 (5)	24.3 ±0.7 (5)	0.88 ±0.71 (5)	31.0 ±4.4 (5)	12.22 ±1.04 (5)	55.2 ±3.9 (5)	22.11 ±0.68 (5)
AA 6 mg/kg	229.7 ±18.9 (4)	2.2398 ±0.1602 (4)	1.00 ±0.13 (4)	1.2934 ±0.0994 (4)	0.57 ±0.03 (4)	7.6228 ±0.3441 (4)	3.35 ±0.16 (4)	1.0549 ±0.0817 (4)	0.46 ±0.00 (4)	1.0470 ±0.0822 (4)	0.46 ±0.01 (4)	2.1018 ±0.1637 (4)	0.92 ±0.01 (4)	0.5091 ±0.0991 (4)	0.26 ±0.02 (4)	1.3593 ±0.0760 (4)	0.60 ±0.02 (4)	1.3226 ±0.1197 (4)	0.58 ±0.03 (4)	2.6919 ±0.1943 (4)	1.18 ±0.05 (4)	27.2 ±1.3 (4)	12.11 ±1.32 (4)	27.5 ±1.7 (4)	12.12 ±0.90 (4)	54.7 ±2.8 (4)	24.22 ±2.19 (4)
AA 35 mg/kg	239.7 ±5.2 (7)	2.1254 ±0.0682 (7)	0.88 ±0.03 (7)	1.3277 ±0.0494 (7)	0.55 ±0.01 (7)	7.6562 ±0.2251 (7)	3.19 ±0.05 (7)	1.0958 ±0.0379 (7)	0.48 ±0.01 (7)	1.0766 ±0.0313 (7)	0.45 ±0.01 (7)	2.1724 ±0.0673 (7)	0.91 ±0.01 (7)	0.6673 ±0.0368 (7)	0.28 ±0.01 (7)	1.4281 ±0.0362 (7)	0.60 ±0.01 (7)	1.4668 ±0.0531 (7)	0.61 ±0.02 (7)	2.8979 ±0.0857 (7)	1.21 ±0.02 (7)	24.4 ±1.3 (7)	10.19 ±0.49 (7)	27.1 ±1.1 (7)	11.32 ±0.46 (7)	51.5 ±2.3 (7)	21.51 ±0.91 (7)
AA 240 mg/kg	217.9 ±10.8 (5)	2.2309 ±0.0840 (5)	1.05 ±0.10 (5)	1.2540 ±0.0374 (5)	0.56 ±0.01 (5)	8.9866 ±0.3239 (5)	3.22 ±0.07 (5)	1.0992 ±0.0459 (5)	0.46 ±0.01 (5)	0.9558 ±0.0350 (5)	0.44 ±0.01 (5)	1.9539 ±0.0801 (5)	0.90 ±0.02 (5)	0.5763 ±0.0513 (5)	0.27 ±0.02 (5)	1.3460 ±0.0737 (5)	0.82 ±0.02 (5)	1.1562 ±0.1717 (5)	0.52 ±0.08 (5)	2.5030 ±0.2309 (5)	1.14 ±0.07 (5)	26.7 ±0.7 (5)	12.46 ±0.88 (5)	27.3 ±1.0 (5)	12.71 ±0.89 (5)	54.0 ±1.7 (5)	25.17 ±1.77 (5)

Values represent as mean ± SE (N)

Female

Dose	Body weight (g)	Brain		Heart		Liver		Kidney (R)		Kidney (L)		Kidney		Spleen		Ovary (R)		Ovary (L)		Ovary		Adrenal gland (R)		Adrenal gland (L)		Adrenal gland	
		(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	(mg)	(mg%)	(mg)	(mg%)	(mg)	(mg%)	(mg)	(mg%)	(mg)	(mg%)	(mg)	(mg%)
AA 0 mg/kg	166.0 ±4.4 (8)	1.8432 ±0.0434 (8)	1.18 ±0.05 (8)	1.0222 ±0.0274 (8)	0.65 ±0.01 (8)	5.2437 ±0.2469 (8)	3.32 ±0.12 (8)	0.6752 ±0.0105 (8)	0.43 ±0.01 (8)	0.6459 ±0.0098 (8)	0.41 ±0.01 (8)	1.3211 ±0.0189 (8)	0.84 ±0.02 (8)	0.4085 ±0.0405 (8)	0.26 ±0.02 (8)	28.0 ±1.6 (8)	16.71 ±0.79 (8)	28.8 ±2.4 (8)	18.10 ±1.16 (8)	68.4 ±3.6 (8)	36.81 ±1.62 (8)	28.9 ±1.1 (8)	16.50 ±1.17 (8)	31.5 ±1.2 (8)	20.13 ±1.23 (8)	60.4 ±2.2 (8)	36.63 ±2.37 (8)
AA 5 mg/kg	162.9 ±3.4 (7)	1.8434 ±0.0785 (7)	1.14 ±0.03 (7)	1.0396 ±0.0335 (7)	0.64 ±0.02 (7)	5.3402 ±0.2256 (7)	3.20 ±0.15 (7)	0.7046 ±0.0211 (7)	0.43 ±0.01 (7)	0.6611 ±0.0168 (7)	0.42 ±0.01 (7)	1.3958 ±0.0356 (7)	0.85 ±0.02 (7)	0.4716 ±0.0311 (7)	0.29 ±0.02 (7)	29.1 ±1.9 (7)	17.84 ±0.99 (7)	27.7 ±1.1 (7)	17.00 ±0.60 (7)	56.9 ±2.5 (7)	34.85 ±1.25 (7)	30.0 ±3.7 (7)	19.00 ±2.21 (7)	32.8 ±3.6 (7)	20.15 ±2.13 (7)	63.7 ±7.3 (7)	38.16 ±4.33 (7)
AA 35 mg/kg	169.3 ±4.2 (7)	1.7699 ±0.0288 (7)	1.05 ±0.03 (7)	1.0920 ±0.0289 (7)	0.62 ±0.01 (7)	5.3440 ±0.1813 (7)	3.16 ±0.08 (7)	0.7064 ±0.0201 (7)	0.42 ±0.01 (7)	0.6010 ±0.0303 (7)	0.41 ±0.01 (7)	1.3073 ±0.0467 (7)	0.63 ±0.02 (7)	0.4758 ±0.0216 (7)	0.28 ±0.01 (7)	32.2 ±2.4 (7)	18.92 ±1.10 (7)	32.6 ±1.7 (7)	19.26 ±1.01 (7)	54.8 ±2.8 (7)	38.18 ±1.01 (7)	25.1 ±0.9 (7)	14.82 ±0.45 (7)	28.8 ±1.1 (7)	17.01 ±0.61 (7)	53.0 ±1.9 (7)	31.83 ±0.99 (7)
AA 240 mg/kg	169.3 ±3.5 (7)	1.8266 ±0.0491 (7)	1.10 ±0.04 (7)	1.0477 ±0.0173 (7)	0.63 ±0.02 (7)	6.3849 ±0.1417 (7)	3.24 ±0.05 (7)	0.6930 ±0.0195 (7)	0.42 ±0.01 (7)	0.6953 ±0.0120 (7)	0.42 ±0.01 (7)	1.3983 ±0.0181 (7)	0.84 ±0.02 (7)	0.4642 ±0.0249 (7)	0.29 ±0.02 (7)	32.2 ±1.6 (7)	19.42 ±0.98 (7)	31.3 ±0.6 (7)	18.63 ±0.45 (7)	63.5 ±1.8 (7)	38.26 ±1.14 (7)	27.5 ±1.1 (7)	16.65 ±0.95 (7)	28.9 ±1.5 (7)	17.50 ±1.13 (7)	56.5 ±2.4 (7)	34.15 ±1.97 (7)

Values represent as mean ± SE (N)

* significantly different from the control group p<0.05(Dunnett's test)

Absolute weight and relative weight to body weight are shown.

Table 7 Histology of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Male

Group	AA 0 mg/kg (n=5)					AA 5 mg/kg (n=4)					AA 35 mg/kg (n=8)					AA 240 mg/kg (n=5)									
	-	±	+	2+	3+	Pos	-	±	+	2+	3+	Pos	-	±	+	2+	3+	Pos	-	±	+	2+	3+	Pos	
Brain																									
Hemorrhage, cerebrum	2	1	1	1	0	3	3	0	1	0	0	1	4	3	1	0	0	4	3	2	0	1	0	3	
Gliosis, cortex	1	1	3	0	0	4	2	0	2	0	0	2	4	0	3	1	0	4	0	0	5	1	0	6	
Infarct, recent	2	1	0	2	0	3	2	0	1	1	0	2	5	0	3	0	0	3	3	0	3	0	0	3	
Cyst, cortex	5	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	1	4	0	4	0	0	4	5	0	0	0	0	0	
Edema	2	0	3	0	0	3	2	0	2	0	0	2	5	1	2	0	0	3	3	0	3	0	0	3	
Thickening, media, arteriole	4	0	1	0	0	1	4	0	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1	5	0	1	0	0	1	
Infiltration, macrophage with pigment	4	0	1	0	0	1	3	1	0	0	0	1	6	2	0	0	0	2	4	2	0	0	0	2	
Venous thrombosis, middle cerebral	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	5	0	1	0	0	1	
Fibrin thrombus	5	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	1	7	0	1	0	0	1	6	0	0	0	0	0	
Dilatation, ventricle	5	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	1	6	0	2	0	0	2	6	0	0	0	0	0	
Thymus																									
atrophy	3	0	2	0	0	2	3	1	0	0	0	1	5	1	1	1	0	3	3	2	1	0	0	3	
Hemorrhage	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	7	1	0	0	0	1	8	0	0	0	0	0	
Lung																									
Accumulation, foamy cell, alveolus	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	
Edema	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	
Congestion	3	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	
Heart																									
Thickening, media, arteriole	0	5	0	0	0	5	0	3	1	0	0	4	0	7	1	0	0	8	0	5	1	0	0	6	
Myocardial fibrosis/degeneration	3	1	1	0	0	2	1	2	1	0	0	3	4	3	1	0	0	4	2	1	3	0	0	4	
Eosinophilic change, myocardium	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1	6	0	0	0	0	0	
Liver																									
Thickening, media, arteriole	0	2	3	0	0	5	3	1	0	0	0	1*	2	4	2	0	0	8	1	3	2	0	0	5	
Pigment, greenish, Kupffer cell	1	4	0	0	0	4	1	3	0	0	0	3	5	3	0	0	0	3	3	3	0	0	0	3	
Proliferation, bile duct	1	4	0	0	0	4	3	1	0	0	0	1	1	7	0	0	0	7	2	4	0	0	0	4	
Necrosis, fresh, focal	4	0	1	0	0	1	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	
Kidney																									
Nephropathy, chronic	0	0	1	4	0	5	0	0	0	4	0	4	0	0	0	3	0	8	0	0	0	8	0	8	
Inflammation, pelvis	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	5	0	1	0	0	1	
Spleen																									
Congestion	3	0	2	0	0	2	4	0	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1	3	0	3	0	0	3	
Hemolysis, extramedullary	1	1	3	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	3	5	0	0	8	1	4	1	0	0	5	
Atrophy, follicle	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1	6	0	0	0	0	0	
Thickening, media, arteriole	2	2	1	0	0	3	0	3	1	0	0	4	3	4	1	0	0	5	2	4	0	0	0	4	
Adrenal gland																									
Necrosis, focal with/without occluded arteriole	4	1	0	0	0	1	3	1	0	0	0	1	8	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	
Stomach																									
Abnormality	6	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	
Testis																									
Atrophy, seminiferous tubule	4	1	0	0	0	1	2	2	0	0	0	2	7	1	0	0	0	1	4	0	2	0	0	2	
Epididymis																									
Cell debris, seminiferous tubule	2	2	1	0	0	3	2	1	1	0	0	2	4	4	0	0	0	4	2	2	0	2	0	4	
Vasculitis	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0	2	0	0	2	3	0	3	0	0	3	
Prostate																									
Prostatitis	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	5	0	0	1	0	1	
Pancreas																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Small intestine																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Large intestine																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mesenteric lymphnode																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pituitary gland																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thyroid gland																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Parathyroid gland																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinary bladder																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eye ball																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-, negative; ±, very slight; +, slight; 2+, moderate; 3+, severe
 Pos, Sum of the number of animals with positive finding
 *, p<0.05, significantly different from the incidence of animals with positive finding in AA 0 mg/kg group (Fisher's exact test).

(continued on next page)

Female

Group Grade	AA 0 mg/kg (n=8)					AA 5 mg/kg (n=7)					AA 35 mg/kg (n=7)					AA 240 mg/kg (n=7)									
	-	±	+	2+	3+	Pos	-	±	+	2+	3+	Pos	-	±	+	2+	3+	Pos	-	±	+	2+	3+	Pos	
Brain																									
Gliosis, cortex	5	1	2	0	0	3	4	1	2	0	0	3	5	0	2	0	0	2	4	0	3	0	0	3	3
Necrosis, focal, white matter	5	1	2	0	0	3	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	6	0	1	0	0	1	1
Infiltration, macrophage with pigment	8	2	0	0	0	2	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
Cyst, cortex	6	0	2	0	0	2	5	1	1	0	0	2	6	0	1	0	0	1	6	1	0	0	0	1	1
Edema	8	0	2	0	0	2	5	0	2	0	0	2	5	1	1	0	0	2	5	1	1	0	0	2	2
Fibrin thrombus	8	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	6	0	1	0	0	1	6	0	1	0	0	1	1
Thickening, media, arteriole	8	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	1	6	1	0	0	0	1	1
Hemorrhage	8	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	1	5	2	0	0	0	2	7	0	0	0	0	0	0
Heart																									
Thickening, media, arteriole	2	3	0	0	0	5	1	6	0	0	0	6	2	5	0	0	0	5	2	5	0	0	0	5	5
Myocardial fibrosis/degeneration	3	2	3	0	0	5	4	2	1	0	0	3	6	1	0	0	0	1	2	4	1	0	0	5	5
Lung																									
Metaplasia, osseous	7	1	0	0	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
Mineralization, arterial wall	8	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
Liver																									
Fatty change, periportal	5	3	0	0	0	3	5	2	0	0	0	2	4	3	0	0	0	3	5	2	0	0	0	2	2
Thickening, media, arteriole	0	7	1	0	0	8	0	5	2	0	0	7	2	5	0	0	0	5	0	7	0	0	0	7	7
Pigment, greenish, Kupffer cell	4	4	0	0	0	4	6	1	0	0	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
Proliferation, bile duct	4	4	0	0	0	4	3	4	0	0	0	4	1	0	0	0	0	6	3	4	0	0	0	4	4
Single cell necrosis	6	2	0	0	0	2	3	4	0	0	0	4	3	4	0	0	0	4	6	1	0	0	0	1	1
Microgranuloma	7	1	0	0	0	1	2	5	0	0	0	5*	4	3	0	0	0	3	7	0	0	0	0	0	0
Fatty change, zonal	8	0	0	0	0	0	8	1	0	0	0	1	7	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	1	1
Kidney																									
Nephropathy, chronic	0	0	5	3	0	8	0	0	5	2	0	7	0	0	5	2	0	7	0	0	4	3	0	7	7
Mineralization	6	2	0	0	0	2	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
Spleen																									
Hematopoiesis, extramedullary	1	5	2	0	0	7	2	2	1	1	0	4	0	4	2	1	0	7	0	6	0	1	0	7	7
Thickening, media, arteriole	7	1	0	0	0	1	5	1	1	0	0	2	4	3	0	0	0	3	3	3	1	0	0	4	4
Stomach																									
Erosion, glandular stomach	5	0	3	0	0	3	6	0	1	0	0	1	7	0	0	0	0	5	7	0	0	0	0	0	0
Epidermal cyst	7	0	1	0	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
Large intestine (Caecum)																									
Erosion	8	0	0	0	0	0	8	0	1	0	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
Pituitary gland																									
Cyst	7	0	1	0	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
Thymus																									
Atrophy	8	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	1	1
Harderian gland																									
Cellular infiltration, lymphocyte	8	0	0	0	0	0	5	0	0	1	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
Pancreas																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Small intestine																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mesenteric lymphnode	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adrenal gland																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thyroid gland																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Parathyroid gland																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ovary																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uterus																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinary bladder																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eye ball																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Submandibular lymphnode																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aorta																									
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-, negative; ±, very slight; +, slight; 2+, moderate; 3+, severe.

Pos, Sum of the number of animals with positive finding

*, p<0.05, significantly different from the incidence of animals with positive finding in AA 0 mg/kg group (Fisher's exact test).

Table 8 Summary of the results

使用動物・系統 投与経路	ラット, SHRSP, SPF 強制経口投与	動物数 各群8匹							
		群 投与量 (mg/kg) 性		低用量 5		中用量 35		高用量 240	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
死亡数		3	0	4	1	1	1	1	0
切迫屠殺数		0	0	0	0	0	0	1*	1*
生存数		5	8	4	7	7	7	6	7
生存率		62.5	100.0	50.0	87.5	87.5	87.5	75.0	87.5
体重				-	-	-	-	-	-
摂餌量				-	-	-	-	-	△ 8Wのみ
一般状態	トレイ上に出血あと(血しぶき)	2	1	1	0	2	0	2	0
	上半身や頭が不随意に動く	3	3	3	1	4	2	5	1
	易刺激性	5	6	6	2	5	2	7	4
	間代性痙攣	0	2	2	2	0	0	1	0
	腹臥位、自発運動低下	4	3	4	6	7	0	6	2
	立毛	5	4	3	6	7	0	4	2
	下腹部の尿汚れ	4	0	2	2	3	0	1	1
	削瘦	2	2	2	3	1	0	4	0
	軟便/下痢	0	1	0	0	0	0	2	1
	排便量減少	4	3	4	4	6	2	5	4
血圧	投与4週目			-	-	-	-	-	-
	投与10週目			-	-	-	-	-	-
血液学検査				-	-	-	-	-	-
血液生化学検査	リン脂質濃度			-	-	-	-	-	▽
器官重量	解剖時体重			-	-	-	-	-	-
	副腎(相対重量、右側のみ)			-	-	-	▽	-	-
剖検所見	(生存例/死亡例)								
脳	硬膜下出血	0/3	0/0	0/3	0/1	0/0	0/1	0/1	2/0
	出血、実質	2/2	1/0	1/0	1/0	3/0	1/1	3/0	0/0
心臓	うっ血	0/2	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	1/0
	シスト	1/0	1/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0
腎臓	浮腫	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	0/0	0/0	0/0
	小型化	0/2	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0
腎臓	硬い	0/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0
	淡色部	1/0	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	2/0	0/0
	心尖部淡色	0/0	3/0	1/1	1/1	1/0	0/0	1/1	4/0
	表面粗造	1/0	2/0	2/0	0/0	4/0	0/0	3/0	2/0
組織学所見	肝臓 小肉芽腫 (pos)	0	1	0	5△	0	3	0	2
	細動脈中膜肥厚 (pos)	5	8	1▽	7	6	5	5	7

△, 対照群に比べ有意な増加(p<0.05)

▽, 対照群に比べ有意な減少(p<0.05)

-, 変化なし 数値, 例数

*切迫屠殺動物の変化: 好中球↑、リンパ球↓、尿素窒素↑、無機リン↑、AST↑、脾臓重量↓

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業） 総合研究報告書

「アラキドン酸補給の炎症への影響の評価」

研究分担者 内藤 由紀子 独立行政法人国立循環器病研究センター・室長

研究要旨

アラキドン酸（ARA）補給による炎症性疾患への影響を調べるため、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導大腸炎モデルラットを用い、ARA 投与による影響を調べた。実験では、雄性 Wistar ラットに ARA 0、5、35 または 240 mg/kg を 8 週間混餌投与し、第 8 週の 7 日間は、大腸炎を誘導するために DSS を並行投与した。また、DSS 投与が有効であるか確認するため、および正常動物への ARA 補給の影響を調べるため、DSS を投与しない群（投与期間 8 週間、ARA 0 または 240 mg/kg のみ投与）も設定した。

DSS 投与群の投与第 7 週までおよび DSS 非投与群の投与期間中、一般症状、体重および摂餌量に異常は認められなかった。投与第 8 週の DSS 投与群では、DSS 投与第 3 日以降、軟便～下痢便、赤褐色～赤色便等が全例で観察された。ARA 240 mg/kg 群の症状の発現は早い傾向を示したが、程度には群間差がなかった。

DSS 投与群においては、ARA 5 および 35 mg/kg 投与による影響は、ほとんど認められなかった。一方、240 mg/kg 投与により、好中球比および好酸球比減少とリンパ球比上昇、血漿 ARA 量の増加、大腸の暗赤色化、大腸粘膜下組織の浮腫の発現頻度と程度の増加、大腸組織におけるマクロファージの浸潤の増加、大腸 myeloperoxidase 活性の上昇が認められた。DSS 非投与群においては、ARA 240 mg/kg 投与により、血漿中 ARA 量および ARA 比の上昇、EP/ARA 比の低下が認められたのみで、その他の影響はみられなかった。

以上をまとめると、ラットに ARA 5、35 および 240 mg/kg を 8 週間投与し、その最終週に DSS 投与によって大腸炎を誘導すると、5 および 35 mg/kg 投与による影響はほとんど認められなかった。一方 240 mg/kg 投与によっては、大腸の粘膜下組織の浮腫、MPO 活性の上昇、マクロファージの浸潤の増加等、大腸炎が促進する可能性が示唆されたが、この用量は、ヒトの 1 日摂取目安量の約 50 倍に相当する量であった。また、正常動物においては、240 mg/kg 投与によって血漿 ARA 量増加および EPA/ARA 比低下が認められたことから、これが生体に影響を与えるのか否かについては、さらに研究が必要と考えられる。

A. 研究目的

アラキドン酸（ARA）の補給が、炎症性疾患に影響を与えるか否か調べることを目的とし、ARA を投与したラットに炎症性大腸炎を誘導するデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）を経

口投与し、誘導された大腸炎の程度や頻度等を評価した。また、DSS を投与しない群も設定し、正常動物への影響の有無を評価することも目的とした。

B. 研究方法

B-1 動物

雄性 Wistar ラット (Slc:Wistar, 4 週齢、日本エスエルシー、静岡) 60 匹を購入し、1 週間の検疫・馴化後、1 群 10 匹 6 群に分けた。それぞれ、ARA 0、5、35、240 mg/kg、大腸炎誘導なし ARA 0 および 240 mg/kg 群とした。動物は、温度 21.0 ~ 25.0°C、湿度 40.0 ~ 75.0%、換気設定約 15 回/時間および明暗サイクル 12 時間 (7 ~ 19 時: 点灯、19 ~ 7 時: 消灯) の条件で管理された飼育室内で飼育した [飼育密度は 1 匹/ケージ (金属製金網床ケージ、220 w × 270 d × 190 h mm)]。また、5% 混合油 (2.5% ラード、1.25% カノーラ油、1.25% 大豆油、植田製油) 含有 CE-2 (日本クレア、東京) および水道水 (秦野市水道局給水) を自由摂取させた。

B-2 投与

ARA 含有油 (Lot No. 10050701、CABIO、中国) を 7 倍公比で混合油と混合し、ARA 0.5、35 および 240 mg/kg (投与容量 0.6 mL/kg) を、8 週間毎日強制経口投与した。なお投与量は、ARA 含有サプリメントが目安として設定している 1 日摂取量とほぼ同量を低用量、約 50 倍を高用量とした。

B-3 DSS 誘導炎症性大腸炎の作製

ARA 投与第 8 週の 7 日間、3% DSS 溶液 (和光純薬工業、東京) を給水ビンで自由摂取させた。

B-4 症状観察、体重、摂餌量および摂水量測定、便の性状観察

投与期間中の毎日、全例の一般状態 (便の性状を含む) を観察した。また、週 1 回体重および摂餌量を測定した。さらに DSS 投与期間中は毎日、摂水量を測定し、便の性状を観察した。

B-5 採血

投与期間終了後、剖検前 18 ~ 24 時間絶食させ、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部大静脈から採血した (凝固剤: 血液学的検査用は EDTA 2K、血液生化学検査用および脂

肪酸組成測定用はヘパリン)。

B-6 血液学的検査

赤血球数、白血球数、白血球分類、網状赤血球比率、血小板数、ヘマトクリット値、血色素量、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度を測定した (血液自動分析装置、XT-2000iV、シスメックス)。

B-7 血液生化学的検査

B-5 のように採取した血液から血漿を得、総タンパク濃度 (TP)、アルブミン濃度 (γ -ALB)、A/G 比、グルコース濃度 (Glc)、総コレステロール濃度 (TC)、トリグリセライド濃度 (TG)、リン脂質濃度 (PL)、遊離脂肪酸濃度 (NEFA)、総ビリルビン濃度 (tbil)、尿素窒素濃度 (BUN)、クレアチニン濃度 (Cre)、 γ -グルタミルトランスアミノペプチダーゼ活性 (γ -GTP)、アルカリフォスファターゼ活性 (ALP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性 (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性 (ALT)、カルシウム濃度 (Ca)、無機リン濃度 (IP) (以上、自動分析装置、JCA-BM6010、日本電子)、ナトリウムイオン濃度 (Na)、カリウムイオン濃度 (K)、塩素イオン濃度 (Cl) (以上、全自動電解質分析装置、EA05、エイアンドティー) を測定した。

B-8 血漿中脂肪酸測定

B-5 のように採取した血液から血漿を得、Bligh and Dyer の方法 1) により血漿から総脂質を抽出した。サンプルには標準物質として、ヘプタデカン酸 (17:0、Sigma、St Louis、MO) を加えた。2 回抽出した溶液を窒素ガス気流下で乾固した。これに 5% HCl-メタノール (東京化成、東京) を 2 mL 加え、100°C、1 時間で脂肪酸メチルエステル誘導体化した。放冷後、水と石油エーテルを 2 mL ずつ加え上層 (石油エーテル層) を分取した。キャピラリーカラム (J&W DB-225、Agilent、Loveland、CO) を装着したガスクロマトグラフ (GC-18A、島津製作所、京都) により血漿中の脂肪酸量を測定した。

B-9 病理学的検査

放血致死後、剖検し、器官、組織の肉眼的観察を実施した。脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎および精巣の器官重量を測定し、併せて比体重値（相対重量）を算出した。また、脳、下垂体、大動脈、甲状腺（上皮小体を含む）、胸腺、心臓、肺（気管支を含む）、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、顎下リンパ節、精巣、精巣上体、前立腺および膀胱を固定保存し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色標本を作製して病理組織学的に検査した。検査は、対照群および高用量群の動物について行った（*固定保存：精巣および精巣上体はブアン液に固定し、その他の器官・組織は0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液）。さらに大腸については、マッソントリクローム（MT）染色を行い、線維化を評価した。

B-10 大腸重量測定

大腸を摘出して、長さおよび重量を測定し、単位長さ当たりの重量比を算出した。

B-11 免疫組織化学法による大腸粘膜のCD68陽性細胞発現

大腸組織におけるマクロファージの浸潤を評価するため、対照群および高用量群の全例の大腸組織標本を作製し、CD68の免疫染色を行った。組織切片を脱パラフィン処理し、抗原賦活化および非特異反応のブロックの後、一次抗体（CD68、Serotec、1:500）を添加してインキュベートし（4℃、overnight）、二次抗体（Simplestain MAX-PO、Nichirei）を添加して室温で20分間インキュベートした。次に3,3-diaminobenzidine（DAB）を適用して発色させた。ランダムな5視野中の陽性細胞数を計測し、単位面積当たりの数を算出した。

B-12 びらん部位の測定

大腸のびらんを評価するため、アルシアンブルー染色を行った。病理組織観察部位より上部4cmの範囲で、大腸を長軸方向に切開し、3%酢酸水溶液に5分間浸漬した。精製水で洗浄した後、1%アルシアンブルー溶液で20分

間染色し、酢酸溶液で洗浄して写真撮影した（COOLPIX5700、ニコン）。濃青色部位（びらん部位）の面積を測定し（Image J 1.44p）、大腸粘膜中の染色部位の割合を算出した。

B-13 myeloperoxidase（MPO）活性測定

大腸組織をホモジネートし、炎症性マーカーであるMPO活性を測定した（Myeloperoxidase Activity Assay Kit、Biovision）。

【参考文献】

1) Bligh EG, Dyer WJ, A rapid method for total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917, 1959.

（倫理面への配慮）

「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和48年10月1日、法律第105号、平成18年6月2日一部改正）、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成18年4月28日、環境省告示第88号）および「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」（平成18年6月1日、科発第0601001号）」を遵守し、「財団法人食品薬品安全センター秦野研究所動物実験に関する指針」（平成2年10月1日、平成22年10月1日改正）に基づく研究計画書を作成し、同研究所動物実験委員会による審査が行われ、実験動物に対する動物愛護上の配慮等、倫理的配慮が適正であることが確認されている（実験動物委員会承認番号2100030A）。

C. 研究結果

C-1 一般状態、体重、摂餌量、摂水量

投与第7週まで、全動物の一般症状には異常は認められなかった。しかし、DSS投与が開始した投与第8週は、DSS投与群の各群6~9例で貧血が認められたが群間差はなかった。

投与第7週までの全例の体重は、順調に増加し、群間差は認められなかった（図1）。DSS無投与群の全例の体重は、その後引き続き投与終了時まで順調に増加した一方、DSS投与群

では、投与最終日（投与第56日）の体重はその前回の体重（投与第50日）よりも減少した。

ARA投与群（5、35および240 mg/kg群）の摂餌量は、対照群（ARA0mg/kg）と比較して有意差は認められなかった（図1）。

DSS投与期間中の摂水量は、群間差は認められなかった。

C-2 便の性状

DSS投与期間中の便は、DSS投与第3日以降、軟便～下痢便、赤褐色～赤色便、肛門周囲の赤褐色便付着等が観察された（表1）。ARA240 mg/kg群での発現時期は早い傾向がみられたが、症状の程度には群間差がなかった。

C-3 血液学的検査

対照群と比較して、240mg/kg群の好中球比および好酸球比の低下およびリンパ球比の上昇が認められた（図2）。しかし用量依存性はみられなかった。赤血球系には影響が認められなかった（結果は示さず）。

C-3 血液生化学的検査

測定項目において群間差は認められなかった（表2）。

C-4 血漿脂肪酸組成

DSS誘導大腸炎モデルにおいては、ARA240 mg/kg群の血漿中ARA濃度は、ARA0mg/kg群と比較して、有意に高値を示したが、総脂肪酸に占めるARAの割合は、群間差がなかった（図3）。しかし、大腸炎を誘導していない正常動物においては、ARA240mg/kg群のARA濃度および割合のどちらも、ARA0mg/kg群と比較して高値を示した。また、EPA/ARA比は、大腸炎モデルにおいては群間差が認められなかったが、正常動物においてはARA 240 mg/kg群で有意に低値を示した。

C-5 器官重量

群間差が認められなかった（表3）。

C-6 肉眼観察

大腸の暗赤色化は、対照群では1例であったのに対し、5および240mg/kg群においてそれぞれ7および6例であった（表4）。

C-7 組織学的観察

結腸および盲腸の粘膜下組織の浮腫は、対照群と比較して、240mg/kg群において高頻度に認められる傾向があり、その程度は高かった（表5および写真1および2）。

C-8 大腸重量比

群間差が認められなかった（表6）。

C-9 大腸粘膜におけるCD68陽性細胞の発現

ARA240mg/kg群の大腸粘膜部分のCD68陽性細胞（マクロファージ）の発現は、どちらもARA0mg/kg群と比較して有意に多かった（図4および写真1および2）。

C-10 びらん面積の比較

アルシアンブルーで染色したびらん部位は、ARA 35および240mg/kg投与により大きい傾向が認められたが有意差はなかった（図5）。

C-11 MPO活性

ARA240mg/kg群の大腸MPO活性は、ARA0 mg/kg（対照）群と比較して有意に高値を示し、用量依存性が認められた（図6）。

D. 考察

本研究の結果から、ARA補給したDSS誘導炎症性大腸炎ラットにおいて、現在市販されているARA補給剤の1日摂取目安量に相当する低用量（5mg/kg）および中用量（35mg/kg）の投与によっては、ほとんど影響が認められなかった。しかし、高用量として設定したARA 240mg/kg投与が炎症を促進することが認められた。これは市販品の1日摂取目安量の約50倍に相当する量であり、また、比較的感度の高い評価方法によって認められた変化であった。これらのことから、ARA補給が炎症性大腸炎を顕著に促進する可能性は低いと考えられる。

炎症が関与する疾患は多数存在する。疾患によって、ARA補給による影響の有無あるいは影響が認められる用量が異なる可能性があるため、炎症性大腸炎以外の炎症性疾患に関しても研究が必要であると考えられる。

血漿中の総脂肪酸に占めるARAの割合は、

正常動物においては、ARA240mg/kg 投与によって増加したが、大腸炎動物においては増加しなかった。炎症においては、ARA カスケードの代謝が促進している可能性が示唆された。

血中の EPA/ARA 比は、心血管イベントを予測する新規のリスクファクターとして注目を集めている。EPA に対して ARA が多くなり、EPA/ARA 比が低くなると、疾患リスクが高まると考えられている。本研究での正常動物の血漿 EPA/ARA 比は、ARA0mg/kg 群と比較して、ARA240mg/kg 群では有意に低値を示した。この差が心血管イベントのリスクを上昇させるものかどうか、EPA (または DHA) を同時補給した場合はどうなるのか等、本研究では明らかにならなかったが、安全に摂取するための情報提供のためにはさらに研究を進める必要があると考える。医薬品を投薬される場合と異なり、一般消費者が自由に摂取できる食品であるという認識は重要だと考える。

E. 結論

8 週間の ARA5 および 35mg/kg 投与によって、薬物誘導大腸炎モデルラットにおいて、顕著な変化は認められなかった。しかし、市販品の 1 日摂取目安量の約 50 倍に相当する 240mg/kg 投与によって、大腸の粘膜下組織の浮腫の増加、炎症性マーカーである MPO 活性の上昇、マクロファージの浸潤促進が認められたことから、この用量においては炎症性大腸炎が促進する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

内藤由紀子、立花滋博、安藤栄里子、青木聡子、古谷真美、田面義之、永田伴子、岩井直温、薬物誘導大腸炎モデルラットにおけるアラキドン酸補給の影響、日本脂質栄養学会第 20 回大会、2011 年 9 月 2～3 日 (埼玉県坂戸市)、Journal

of Lipid Nutrition 20, 2, 155, 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

表1 便の性状

Group	Animal No.	Day							
		1	2	3	4	5	6	7	8
ARA 0 mg/kg DSS+	1					1	2	3	4
	2			1	2	2	2	2	2
	3					2	3	4	4
	4					2	2	3	3
	5					2	2	2	2
	6				1	2	2	2	2
	7					2	2	2	2
	8					1	2	2	2
	9						2	3	3
	10						2	2	2
ARA 5 mg/kg DSS+	11		1	1	2	2	2	2	2
	12					1	2	2	2
	13					2	2	4	4
	14					2	2	2	2
	15					1	2	3	3
	16					2	2	2	2
	17								
	18				1	2	2	2	2
	19				2	2	2	4	4
	20					2	2	2	2
ARA 35 mg/kg DSS+	21					1	2	2	2
	22					2	2	2	2
	23			1	2	2	3	4	4
	24					2	2	4	4
	25						2	2	2
	26					2	2	2	2
	27						2	2	2
	28					2	2	2	2
	29						2	2	2
	30						2	2	2
ARA 240 mg/kg DSS+	31		1	2	2	2	2	2	2
	32					1	1	2	2
	33		1	2	3	3	4	4	4
	34					2	2	2	2
	*35							1	1
	36					2	2	2	2
	37					1	2	2	2
	38					2	2	2	2
	39				1	1	2	2	2
	40				2	2	2	4	4

*, poor water supply

Group	Animal No.	Day							
		1	2	3	4	5	6	7	8
ARA 0 mg/kg DSS-	41								
	42								
	43								
	44								
	45								
	46								
	47								
	48								
	49								
	50								
ARA 240 mg/kg DSS-	51								
	52								
	53								
	54								
	55								
	56								
	57								
	58								
	59								
	60								

1, loose
 2, brown-red colored
 3, red colored
 4, diarrhea

Slight
 ↑
 ↓
 Severe

表 2 血液生化学検査

Dose	TP (g/dL)	rALB. (g/dL)	rA/B	Glc (mg/dL)	TG (mg/dL)	TG (mg/dL)	PL (mg/dL)	NEFA (mEq/L)	tbil (mg/dL)	BUN (mg/dL)
AA 0 mg/kg DSS+	5.0 ±0.1	3.3 ±0.1	2.0 ±0.1	133.0 ±5.0	61.0 ±2.0	20.0 ±6.0	108.0 ±7.0	0.9 ±0.2	0.0 ±0.0	24.0 ±2.0
AA 5 mg/kg DSS+	4.9 ±0.1	3.2 ±0.1	1.8 ±0.1	136.0 ±4.0	57.0 ±4.0	30.0 ±6.0	113.0 ±9.0	1.0 ±0.1	0.0 ±0.0	25.0 ±1.0
AA 35 mg/kg DSS+	5.1 ±0.1	3.4 ±0.1	2.0 ±0.1	132.0 ±5.0	55.0 ±2.0	29.0 ±13.0	105.0 ±7.0	0.9 ±0.2	0.0 ±0.0	23.0 ±1.0
AA 240 mg/kg DSS+	5.0 ±0.1	3.2 ±0.1	1.8 ±0.1	138.0 ±3.0	59.0 ±2.0	24.0 ±5.0	109.0 ±4.0	1.0 ±0.1	0.0 ±0.0	23.0 ±1.0
AA 0 mg/kg	5.7 ±0.1	3.9 ±0.0	2.2 ±0.1	153.0 ±4.0	51.0 ±3.0	49.0 ±3.0	95.0 ±3.0	0.6 ±0.0	0.0 ±0.0	18.0 ±1.0
AA 240 mg/kg	5.5 ±0.1	3.8 ±0.0	2.2 ±0.1	156.0 ±7.0	55.0 ±2.0	47.0 ±4.0	94.0 ±2.0	0.4 ±0.1	0.0 ±0.0	19.0 ±1.0

Values represent as mean ± SE (N=10)

Dose	Cre (mg/dL)	Ca (mg/dL)	IP (mg/dL)	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	γ-GTP (U/L)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
AA 0 mg/kg DSS+	0.5 ±0.0	9.4 ±0.1	6.6 ±0.2	444.0 ±21.0	71 8	48 5	1 0	141.9 0.5	5.22 0.51	105.9 0.5
AA 5 mg/kg DSS+	0.5 ±0.0	9.3 ±0.1	6.4 ±0.2	481.0 ±31.0	68 7	56 8	2 1	141.5 0.3	5.62 0.36	106.2 0.6
AA 35 mg/kg DSS+	0.5 ±0.0	9.4 ±0.1	6.5 ±0.2	487.0 ±24.0	82 16	67 19	1 1	141.5 0.5	4.98 0.44	105.6 0.6
AA 240 mg/kg DSS+	0.6 ±0.0	9.4 ±0.1	6.4 ±0.2	453.0 ±20.0	60 5	47 7	1 0	141.4 0.3	5.2 0.36	105.7 0.5
AA 0 mg/kg	0.5 ±0.0	9.5 ±0.1	6.8 ±0.1	464.0 ±11.0	65 1	43 2	0 0	142.5 0.1	3.78 0.15	104.8 0.3
AA 240 mg/kg	0.5 ±0.0	9.3 ±0.1	6.8 ±0.2	483.0 ±19.0	69 3	41 2	0 0	142.8 0.3	3.64 0.08	105.6 0.3

Values represent as mean ± SE (N=10)

表 3 相对器官重量 (比体重)

Group	BW (g)	Brain (g/kg BW)	Heart (g/kg BW)	Liver (g/kg BW)	Kidneys (g/kg BW)	Spleen (g/kg BW)	Testes (g/kg BW)	Adrenal glands (g/kg BW)
AA 0 mg/kg	272.8	6.58	2.81	28.35	6.75	3.11	9.95	152.05
DSS+	±6.8	±0.17	±0.06	±0.33	±0.22	±0.15	±0.18	±9.49
AA 5 mg/kg	246.1	7.11	2.97	27.87	7.01	3.88	10.62	156.40
DSS+	±5.0	±0.16	±0.06	±0.53	±0.12	±0.20	±0.20	±9.67
AA 35 mg/kg	263.7	6.71	2.88	27.72	6.57	3.46	10.30	137.13
DSS+	±5.3	±0.11	±0.09	±0.36	±0.12	±0.29	±0.22	±3.20
AA 240 mg/kg	267.8	6.63	2.85	28.94	6.68	3.54	10.07	152.36
DSS+	±7.8	±0.18	±0.05	±0.20	±0.13	±0.18	±0.20	±5.56
AA 0 mg/kg	264.4	6.35	2.77	27.75	6.14	2.47	9.97	141.56
DSS-	±6.1	±0.12	±0.03	±0.35	±0.06	±0.06	±0.17	±8.55
AA 240 mg/kg	277.4	6.39	2.74	28.06	5.89	2.35	9.73	145.99
DSS-	±6.5	±0.13	±0.02	±0.28	±0.05	±0.08	±0.22	±8.52

Values represent as mean ± SE (N=10)

表 4 肉眼觀察所見

Group	0 mg/kg +DSS	5 mg/kg +DSS	35 mg/kg +DSS	240 mg/kg +DSS	0 mg/kg	240 mg/kg
(Liver)						
Pale	5	8	6	7	0	0
(Kidney)						
Pale	0	0	0	1	0	0
(Adrenal gland)						
Small	1	0	0	1	0	0
(Spleen)						
Enlargement	3	7	3	7	0	0
(Pancreas)						
Pale	2	2	0	2	0	0
(Femur, Bone marrow)						
Pale	4	7	3	6	0	0
(Ileum)						
Blackish contents	1	1	0	1	0	0
(Cecum)						
Dark red	1	7	2	6	0	0
Dilated	0	0	0	1	0	0
Loose contents	3	0	3	0	0	0
Blackish contents	2	2	2	2	0	0
(Colon)						
Dilated	0	0	0	1	0	0
Loose contents	3	0	3	0	0	0
Blackish contents	2	1	1	2	0	0
(Rectum)						
Loose contents	3	0	2	0	0	0
Blackish contents	0	0	1	1	0	0
(Whole body)						
Pale	2	1	2	0	0	0
Soiled perineal region	3	5	4	4	0	0
Smudge around eyes	0	1	0	0	0	0
Smudge of perinasal area	0	1	0	0	0	0

Animal numbers which positive findings were observed in.

表 5-1 組織学的観察所見

Group	AA 0 mg/kg+DSS		AA 240 mg/kg+DSS		AA 0 mg/kg		AA 240 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
Liver								
Hematopoiesis, extramedullary	0	10	2	7	10	0	10	0
Microgranuloma	10	0	7	2	10	0	9	1
Proliferation, bile duct	10	0	9	0	9	1	10	0
Kidney								
Hyaline droplet, tubular epithelium	2	8	0	9	0	10	0	10
Basophilic tubular epithelium, proximal	8	2	7	2	8	2	5	5
Spleen								
Hematopoiesis, extramedullary	0	10	0	9	0	10	0	10
Congestion, acute	10	0	9	0	4	6	7	3
Colon/Cecum								
Erosion/ulcer, epithelium	5	5	4	5	10	0	10	0
Edema, submucosa	6	4	2	7	10	0	10	0
Cellular infiltration, inflammatory	5	5	2	7	10	0	10	0
Hemorrhage, fresh, submucosa	9	1	8	1	10	0	10	0
Heart								
Degeneration/fibrosis, myocardium	9	1	8	1	8	2	6	4
Lung								
Cellular infiltration, neutrophil	9	1	9	0	10	0	10	0
Hemorrhage, alveolar	9	1	9	0	10	0	10	0
Fibrin thrombus	10	0	8	1	10	0	10	0
Accumulation, foamy cell	10	0	8	1	10	0	10	0
Thyroid gland								
Ectopic thymus	9	1	7	2	10	0	10	0
Ultimobranchial body	10	0	8	1	10	0	10	0
Pancreas								
Increase, Zymogen granules, exocrine cell	7	3	6	3	8	2	8	2

-, negative; +, positive

表 5-2 組織学的観察所見 (結腸および盲腸)

	AA 0 mg/kg DSS (+)						AA 240 mg/kg DSS (+)					
	-	±	+	2+	3+	Pos	-	±	+	2+	3+	Pos
Colon/Cecum												
Erosion/ulcer, epithelium	5	2	3	0	0	5	4	1	3	1	0	5
Edema, submucosa	6	0	3	1	0	4	2	0	1	6	0*	7
Cellular infiltration, inflammatory	5	1	3	1	0	5	2	4	2	1	0	7
Hemorrhage, fresh, submucosa	9	0	1	0	0	1	8	0	1	0	0	1

*. p<0.05 by Mann-Whitney's U-test

-, negative; ±, minimal; +, slight; 2+, moderate; 3+, marked; Pos, total of positive grades

表 6 大腸重量比 (単位長さ当たりの重量)

Dose	relative weight (mg/cm)
ARA 0 mg/kg +DSS	123.1±5.1
ARA 5 mg/kg +DSS	118.0±7.6
ARA 35 mg/kg +DSS	124.9±6.7
ARA 240 mg/kg +DSS	123.2±4.3
ARA 0 mg/kg	91.1±3.5
ARA 240 mg/kg	92.6±2.7

Values represent as mean ± SE (N)

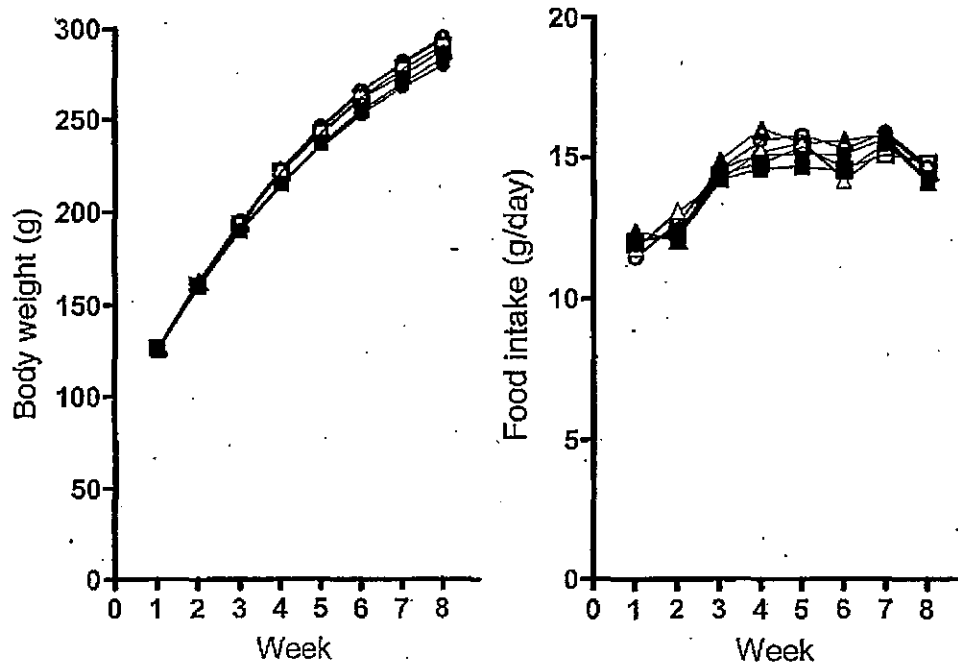


図1 体重 (左) および摂餌量 (右) の推移

○ ARA 0 mg/kg、● ARA 5 mg/kg、△ ARA 35 mg/kg、▲ ARA 240 mg/kg、□ ARA 0 mg/kg (DSS 投与なし)、■ ARA 240 mg/kg (DSS 投与なし)

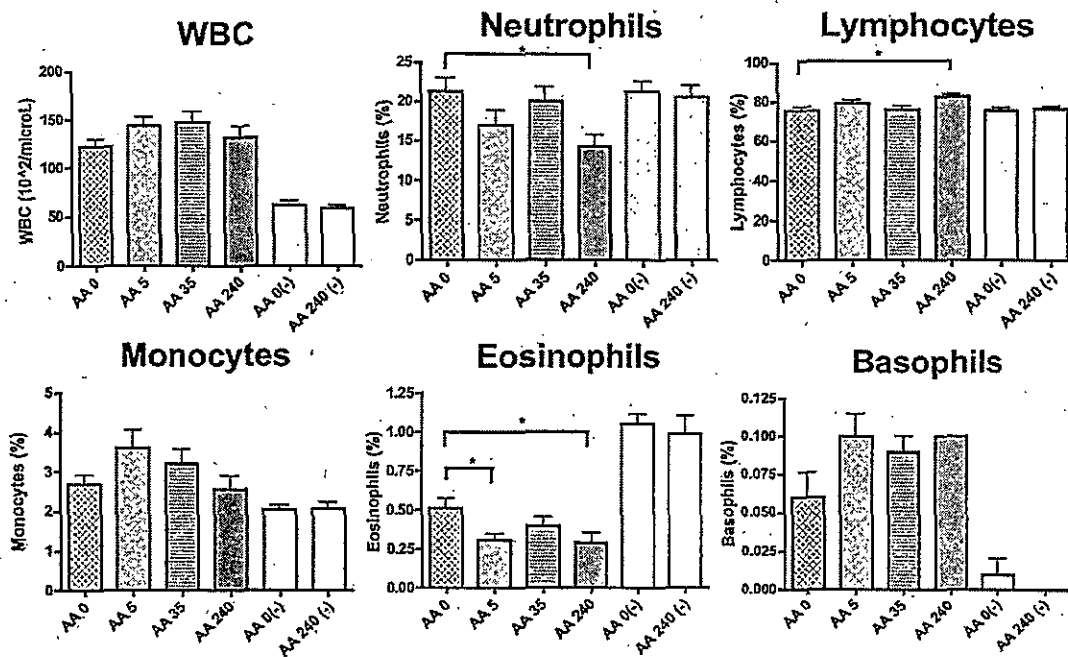


図2 血液学的検査（白血球数および白血球百分比）

* $p < 0.05$, significantly different from the values of AA 0 mg/kg group (Dunnett t-test)

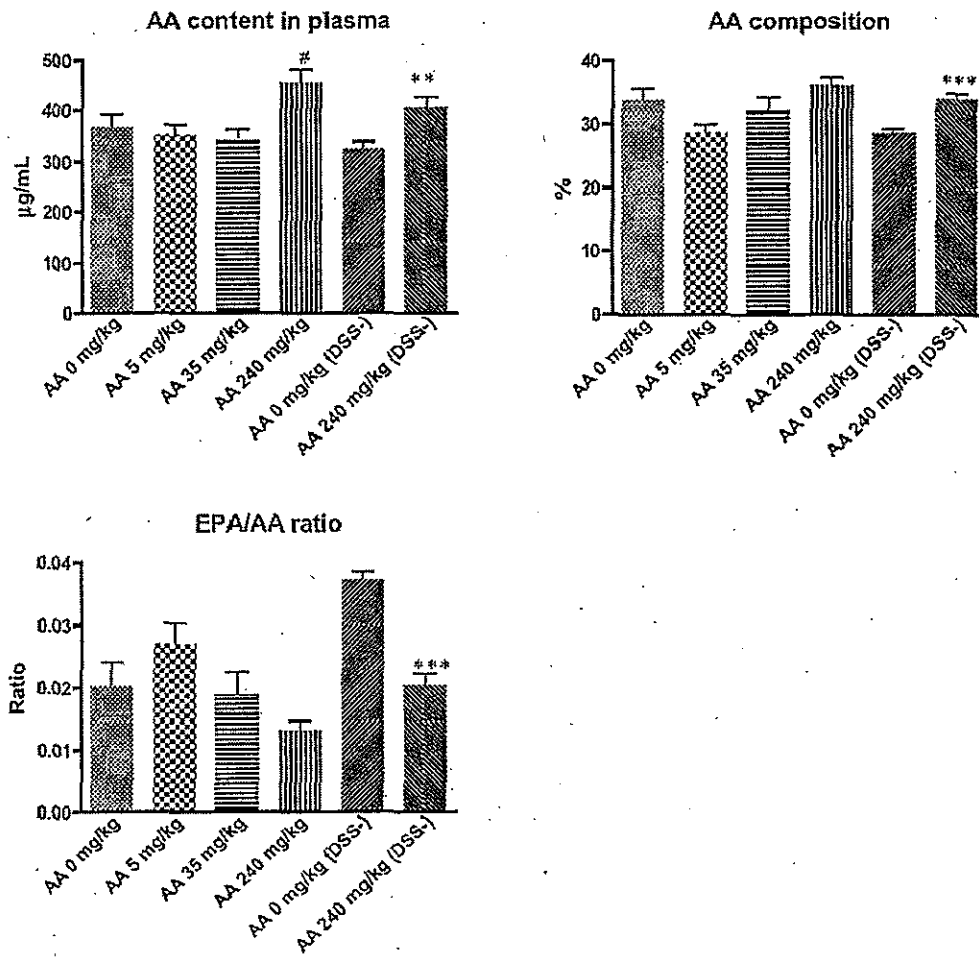


图 3 血浆中脂肪酸量

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, significantly different from the values of AA 0 mg/kg (DSS-) group (unpaired t-test)

$p < 0.05$, significantly different from the value of AA 0 mg/kg group (Dunnett t-test)

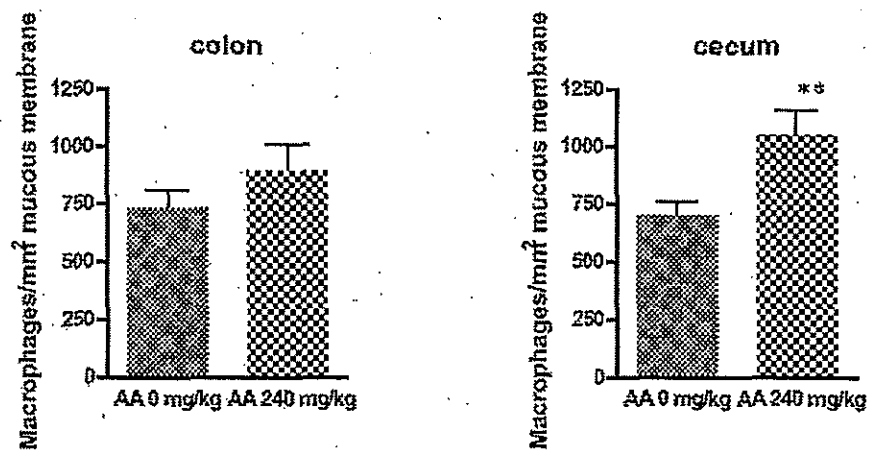


図4 大腸組織におけるマクロファージ浸潤

大腸の単位粘膜面積当たりの CD-68 陽性細胞数

**p<0.01, significantly different from the value of AA 0 mg/kg group (Unpaired t-test)

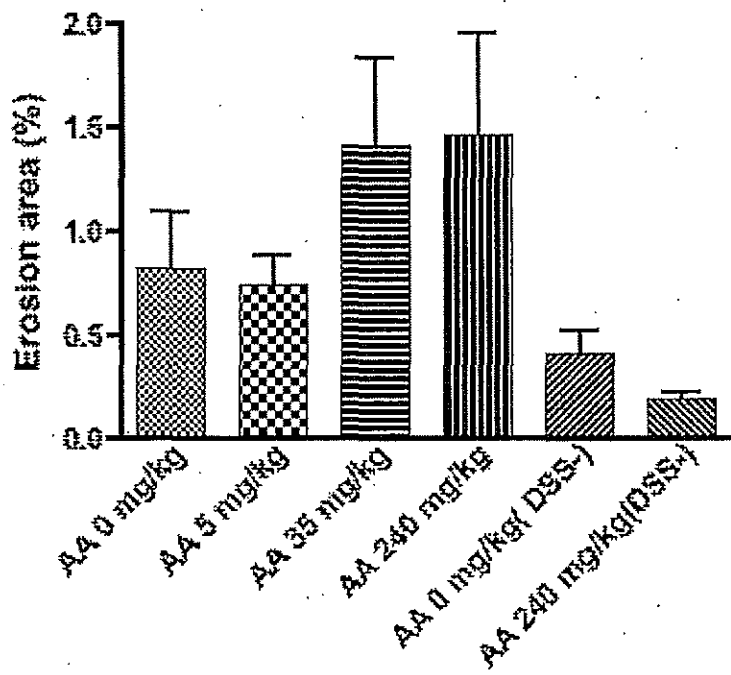


図5 大腸びらん部位 (大腸粘膜におけるびらん面積の割合)

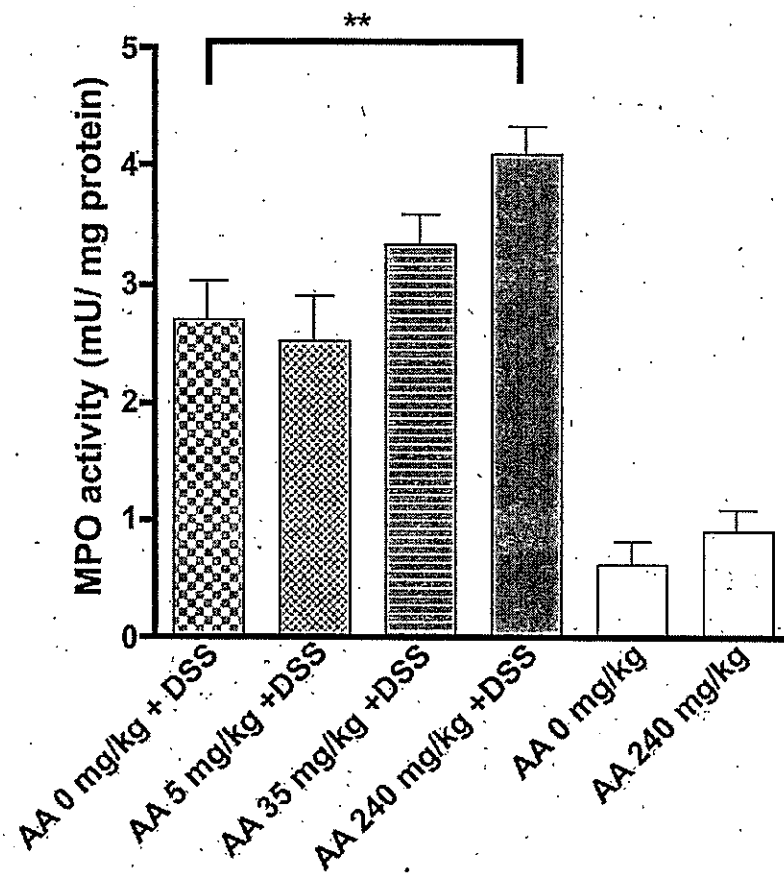


图 6 大腸組織 Myeloperoxidase (MPO) 活性

**p<0.01, significantly different from the value of AA 0 mg/kg group (Dunnett t-test)

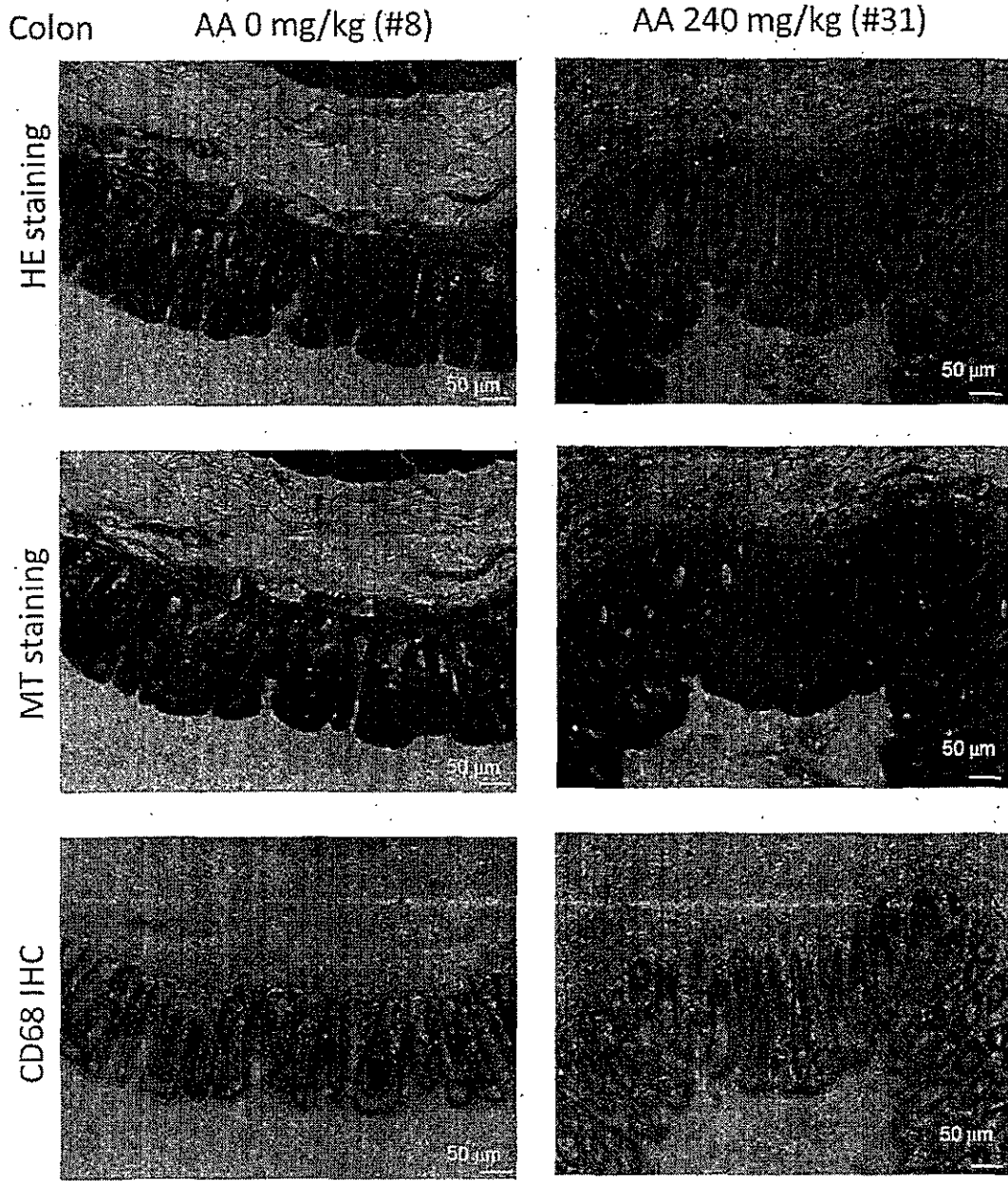


写真1 結腸組織写真 (典型例)

左：AA 0 mg/kg 群 (動物番号 8)、右：AA 240 mg/kg 群 (動物番号 31)、上：ヘマトキシリン・エオジン染色、中：マッソントリクローム染色、下：CD-68 免疫染色

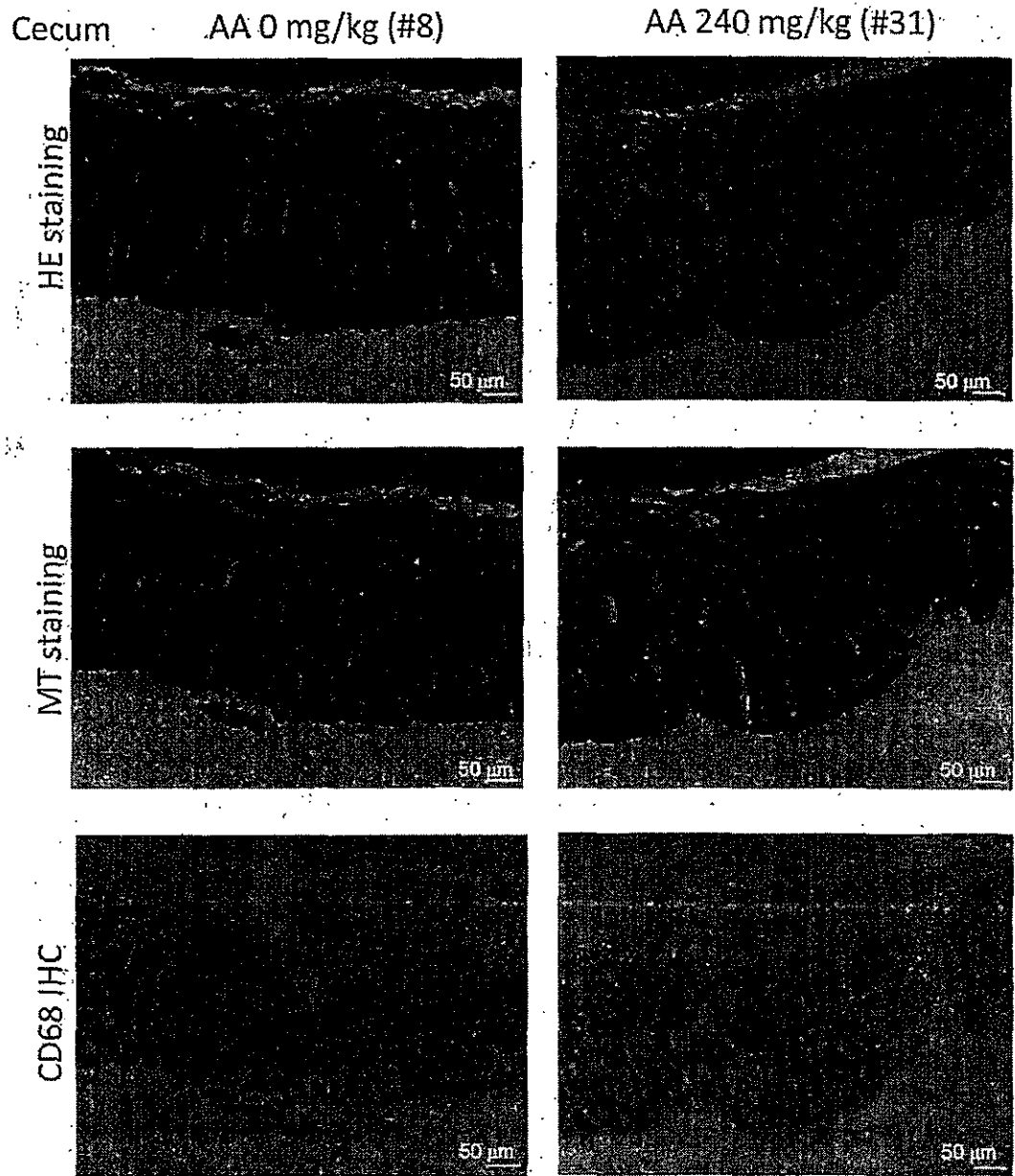


写真2 盲腸組織写真 (典型例)

左 : AA 0 mg/kg 群 (動物番号 8)、右 : AA 240 mg/kg 群 (動物番号 31)、上 : ヘマトキシリン・エオジン染色、中 : マッソントリクローム染色、下 : CD-68 免疫染色

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

「胎仔期のアラキドン酸が乳癌発症に及ぼす影響」

研究分担者 関西医科大学病理学第二講座 教授 螺良 愛郎
研究協力者 関西医科大学病理学第二講座 講師 義澤 克彦
研究協力者 関西医科大学病理学第二講座 専攻生 佐々木 朋

研究要旨

ヒト乳癌細胞移植マウスモデルならびにN-メチル-N-ニトロソ尿素誘発乳腺発癌ラットモデルを用いて、アラキドン酸補給が乳癌発症ならびに進展に及ぼす影響について暴露時期の検討も交えて明確にする。

A. 研究目的

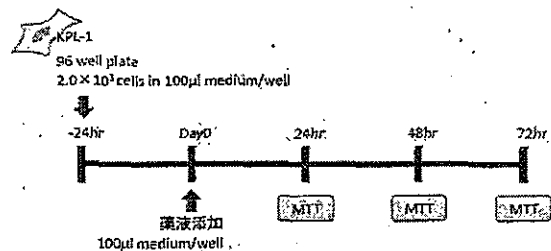
癌の発生・増殖・転移には脂肪の摂取量とともにその種類が影響する。n-6系多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸(ARA)については疫学的に癌の発生と関連するという報告(Murff HJ et al, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 18:2283-91, 2009)や高濃度で殺細胞効果ありとの報告もみるが、詳細な検討は乏しい。さらにARAは母乳に含まれる必須脂肪酸で、胎児期から新生児期にかけて脳神経系・網膜組織に多い脂肪酸であり、ベビーミルクの規格においてARA配合が推奨されているが、新生児期暴露による癌の発生・増殖に関する報告はない。我々はARA補給が乳癌発症に及ぼす影響について細胞培養実験ならびに動物発癌実験で検討し、ヒトへの外挿を考察した。

B. 研究方法

実験① ARAのヒト乳癌細胞株に対する増殖活性への影響：
ヒト乳癌細胞株であるKPL-1(エストロゲン受容体陽性)をphenol red (-)の10%ウシ胎仔血清とグルタミンを添加したDMEMD/5921培地で24時間培養し、その後10, 50, 100, 150および200 μMのARA溶液(100%エタノール

溶解)を24, 48および72時間連続暴露し、MTTアッセイを実施した。なお、本実験を4回繰り返し、細胞増殖促進/抑制効果を判定した(図1-1)。

(図1-1: 実験プロトコール)



実験② ARAのヒト乳癌細胞株移植動物での腫瘍増殖に対する影響(直接暴露)：雌BALB/c-nu/nu系マウスを日本チャールスリバーから購入し、6週齢時に 2.5×10^6 cells/animalのKPL-1ヒト乳癌細胞株を右腋窩乳腺組織内に移植した。10日後に腫瘍体積が約 75 mm^3 に成長したのを確認した後、ARA $10 \mu\text{L}$ ($30 \mu\text{g/mL}$ in EtOH + PBS)を1日おきに原発腫瘍塊内に直接投与した(図2-1)。対照群として、同様に乳癌細胞株を移植した動物に、0.2% EtOH (PBS溶解)を投与した群を設定した。なお、飼料は市販固形餌(CMF 30Gy、オリエン