

厚生労働科学研究費補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浜崎 智仁

平成23(2011)年3月

目 次

I. 総括研究報告

- 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. 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..... 7
大原 直樹
2. アラキドン酸補給の炎症への影響の評価..... 10
内藤由紀子
3. 乳癌に対するアラキドン酸の影響..... 13
螺良 愛郎
4. 脂質メタボロームを用いたラット炎症病態と必須脂肪酸バランスの解析..... 14
小林 哲幸
5. 発がんプロモーション過程への影響評価..... 34
永田 伴子
6. 加齢ラットの空間認知機能に及ぼすアラキドン酸長期投与の影響..... 55
橋本 道男
7. 老若マウスの脳機能に及ぼすアラキドン酸の比較検討..... 59
守口 徹

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 66

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 67

I. 総括研究報告

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

「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

アラキドン酸補給の安全性に関する研究の結果は、次の四項目に大別できる。

1. **脳機能に及ぼす影響** 老齢マウスにアラキドン酸(ARA)を投与すると、自発運動の亢進傾向がみられ、n-3 系欠乏時に投与すると運動機能の低下が見られた(守口)。また加齢ラットに ARA を投与すると、空間認知機能に変化はなかったが、報酬餌を取りきる時間が短縮された(橋本)。2. **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は ARA 投与により、乳癌細胞の増殖が促進された(螺良)。他の発癌と発癌プロモーションモデルでは、研究が進行中である(螺良、永田)。3. **アレルギー・炎症性疾患モデルへの影響** 脳卒中易発症高血圧自然発症ラットの病態(大原)、薬物誘導大腸炎モデルラットの病態(内藤)などへの ARA 投与の研究は続行中である。一方、n-6/n-3 バランスの異なる餌を与えたラットのメタボローム解析では、組織の ARA 増と炎症メディエーターの正の相関が明らかにされつつある(小林)。4. **情報収集・摂取量評価** 食事と組織 ARA レベルの相関に関する評価が進んでいる(鈴木)。一方、マウス胎児期の ARA 油の投与が、胎児の眼の発達を障害する場合があると報告された(前川ら、BBRC 2010)。これに基づき、眼の機能に対する影響を評価する研究を企画した。

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。

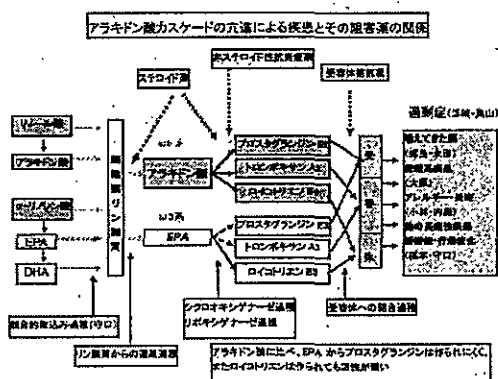
ARA を未熟児用粉ミルクに添加することの安全性に関しては、世界的なコンセンサスがある。しかし、成人に摂取量を 2 倍にするほど多量の ARA をサプリメントとして補給することの安全性については、ARA の組織での濃度あるいは摂取量とガンの死亡率に相関があることが知られており、また心疾患死亡率との相関があること

からも疑問がある。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)、アラキドン酸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

によるアラキドン酸油を輸入し、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事を目的とする。



B. 研究方法

1. ARA 補給の安全性に関する研究 (総括)・・・浜崎・奥山

リノール酸の過剰症が問題となっている条件下でもアラキドン酸の補給が有効で安全であるとする論文を解析し、欠けていると考えられる“長期投与の安全性”を実験的に評価するこの研究を総括する。限られた研究費の中で、さらに追加できる研究を検討した。

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・・・大原

雌雄各 32 匹の SHRSP (計 64 匹、5 週齢) を 1 群 8 匹からなる 4 群に分け、対照群、ARA 油 5、35 および 240 mg/kg 群とし、混合油 (対照群) または各用量の ARA 油を 13 週間強制経口投与する。投与期間中、症状観察 (1 回/日)、体重および摂餌量測定 (1 回/週) を行う。投与前、投与第 4、8 および 12 週に血圧を測定する (tail-cuff 法)。

投与期間終了後、定期解剖前に動物を 18 時間絶食させ、ペントバルビタール麻酔下で動脈採血し、血液学検査および血液生化学検査を行う。動物を屠殺剖検し、主要器官重量を測定し、さらに病理組織学的に検索する。

3. 脂質メタボローム解析法を用いたラット炎症病態と必須脂肪酸バランスの解析・・・小林

1) 経腸栄養剤投与によるラットへの脂肪酸取り込みの評価

雄性 Sprague-Dawley ラット (280-380 g) を二群に分け、一群には、経腸栄養剤として Oxepa (アボット ジャパン株式会社、EPA、DHA、γ-リノレン酸 (GLA) 等を含む)、もう一群には EPA、DHA を含まずにリノール酸が豊富な Pulmocare (アボット ジャパン株式会社) の投与を行った。経腸栄養剤投与後、0、1、3、5 日のそれぞれの時点において、血液と各臓器を採取した。得られた検体からリン脂質を分離・抽出してメチルエステル誘導体化後、ガスクロマトグラフにより脂肪酸組成を測定した。また、LC-ESI/MS 質量分析装置を用い、リン脂質分子種の分析を行った。

2) ラット腸管虚血再灌流炎症モデルを用いた抗炎症作用の評価

Oxepa、または Pulmocare を 3 日間経腸栄養投与したラットに、腸管虚血再灌流処置 (45 分虚血 4 時間再灌流) を行い、各種検体を採取した。各種器官・組織について、ガスクロマトグラフにより炎症前後の脂肪酸組成を測定した。また、炎症局所である腸管に関して、LC-ESI/MS 質量分析装置を用いた酸化脂肪酸測定、抗体アレイによる各種サイトカインの測定、および組織染色を行い、炎症症状を評価した。

4. ARA 補給の炎症への影響の評価・・・内藤

雄性 Wistar ラット 1 群 10 匹 6 群に分け、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。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) 含有食および水道水を自由摂取させた。ARA 投与第 8 週に (7 日間)、3%DSS 溶液を給水ビンで自由摂取させた。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、摂水量を測定した。

5. 胎仔期のARA投与が乳がん発症に及ぼす影響の評価・・・・螺良

1) ヒト乳癌細胞株(KPL-1)を移植したヌードマウスを用いて、乳癌細胞の成長に対するARAの直接的な影響を観察した。腫瘍塊にARA 10 μ lを直接投与した。

2) ヒト乳癌細胞株(KPL-1)を移植したヌードマウスを用いて、乳癌細胞の成長に対するARA添加食(0.4%, 1.5%, 6.1%)の影響を比較した。ARA添加食は乳癌細胞移植2週間前より摂食させた。

3) 妊娠雌ルイス系ラットに妊娠期・授乳期にARA添加食(0.4%, 1.5%, 6.1%)を摂取させた。50日齢雌仔ラットに50 mg/kg MNUを単回腹腔内投与し、乳腺の発癌率を検索した。

6. 発がんプロモーション過程への影響評価

・・・・永田

6 週齢の F344 系雄ラット 100 匹を 1 群 20 匹の 5 群に分け、5 種類のイニシエータを投与した。イニシエーション処置後 1 週間から ARA を 0、60、250 および 1000 mg/kg 体重となるように、飼料を各群に 24 週間自由摂取させた。また、イニシエーション処置を実施しない群を設け、同群には高用量群と同じ ARA 油濃度 53.8 g/kg の飼料を与えた。毎日一般状態を観察し、投与第 8 週間まで週 1 回の頻度で体重を測定し、第 9 週以降は 2 週に 1 回の頻度で体重を測定した。また、毎週 1 回の頻度で摂餌量を測定した。現在、投与第 10 週であり、24 週間の投与終了後、採血して一般血液学的検査を実施、全例を剖検し、腫瘍性変化を含む全身の器官・組織をホルマリン固定後、パラフィン包埋、ヘマトキシリンエ

オジン染色標本を作製し、光学顕微鏡下に観察を実施する。

7. 加齢ラットの空間認知機能に及ぼすアラキドン酸長期投与の影響・・・・橋本

F-1魚粉抜き固形飼料で2世代飼育した加齢Wistar系雄ラット(21カ月齢)を二群に分け、ARA (240 mg/kg BW/day) と対照基礎混合油(牛脂:大豆油:菜種油=2:1:1)を其々13週間経口投与した。投与期間中に放射状迷路法により各ラットの空間認知機能を評価した。8走路放射状迷路法を用い、投与開始6週間後から給餌制限(平均体重の77.4%)を行い、2週間の馴化期間の後に8走路のうちの4走路に報酬餌を置き、評価を行った。血液生化学一般検査および血漿と脳の脂肪酸測定を行った。

8. 老若マウスの脳機能に及ぼすARAの比較検討・・・・守口

n-3系脂肪酸欠乏もしくはn-3系脂肪酸正常飼料で飼育・繁殖した第2世代の老齢マウス(52週齢)を用いて、ARAの長期投与(240 mg/kg/day、13週間以上)における自発運動量、記憶学習(空間学習、モーリス水迷路試験)ならびに情動行動(高架式十字迷路試験および新奇環境摂食抑制試験)、運動協調性(ロータロッド)を測定した。評価終了後に、血液、肝臓、脳組織等を採集し、脂肪酸組成を測定。また、購入したARA油の脂肪酸組成・含量を分析し、日本で市販されているものと同等であることを確認した。

9. 我国の女子学生及び中高年女性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・・・・鈴木

1) 女子大生の食生活と血液中ARAのレベルについて

魚油添加DHA含有ヨーグルトあるいは対照ヨーグルトを、二重盲検法にて学生に3ヵ月間投与した。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。

2) 漁村及び農村地域の中高年女性の食生活と血漿中 ARA レベルについて

千葉県銚子市(漁村)と群馬県前橋市(農村)で被験者を募集した(銚子:105名、前橋:98名)。空腹時に採血を行い、脂肪酸組成などを測定し、食生活アンケートを行なった。

3) 漁村及び農村地域の中高年女性の魚食の多少と血漿中 ARA レベルとの関連性を検討した。

C. 研究結果

1. ARA 補給の安全性に関する研究(総括).....浜崎・奥山

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 が活動性あるいは皮膚の問題点(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(浜崎)。

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.....大原

投与第5週に、雄のARA 0 mg/kg 群で鼻からの出血が2例、雌の35 mg/kg 群の1例で眼内出血によると見られる片眼球の変色が認められた。第6週に雄の5 mg/kg 群で1例が死亡し、剖検の結果、脳硬膜下出血と、肺および胸腺の点状出血が認められた。投与第6週までの観察では、体重推移、摂餌量にARA 投与の影響は認められていない。第1および4週に測定した収縮期血圧からは、加齢による上昇が認められるが、雌雄ともに群間差は認められなかった。最大240mg/kg/day のARA を6週間経口投与したSHRSPでは、ARA の作用が明確には認められない。13週間投与後の結果がまだ出ていないので、これから検討する。

3. 脂質メタボローム解析法を用いたラット炎症病態と必須脂肪酸バランスの解析.....小林

ω3 系列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、ω6 系列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のが、各種脂質関連分子の変動から裏付けられた。

4. ARA 補給の炎症への影響の評価.....内藤

ARA 0 mg/kg と比較し、投与第7週まで一般症状(体重・摂餌量を含む)には、異常が認められなかった。投与第8週の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。これまでの結果からは、ARA 補給が、薬物誘導炎症性大腸炎を増悪する作用は認められなかった。平成23年4月時点で、投与期間が終了したところである。今後実施する、病理学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、大腸炎の指標を調べる検査(便の状態解析、大腸重量比、大腸 myeloperoxidase 活性、大腸粘膜培養上清 GRO/CINC-1 量)の結果とあわせて、炎症性疾患への影響を総合的に解析する。

5. 胎仔期のARA投与が乳がん発症に及ぼす影響の評価.....蝶良

1) ARA を直接腫瘍塊に投与した場合、腫瘍塊の体積ならびに組織像には非投与群と差はみられなかった。

2) ARA 添加食6.1%群では、他群に比べて腫瘍塊の体積が有意に大きく、乳癌細胞の成長を促進させた。現在、病理検査中である。

3) 現在、MNU 投与を終了し、経過観察中である。

6. 発がんプロモーション過程への影響評価

.....永田

ARA 投与第 10 週までの観察結果では、途中死亡例はなく、一般状態で中用量群 1 例に貧血が観察された。体重の推移では対照群との間に統計学的な有意差は観察されていないが、高用量群で低い傾向がみられている。摂餌量および体重から算出された ARA 摂取量は設定した 0、60、250 および 1000 mg/kg に近い値が得られている。今後、投与 24 週間の観察終了後に全例を剖検し、全身の器官を組織学的に検索し、腫瘍性変化の発生頻度から ARA の発癌促進作用の有無を評価する。

7. 加齢ラットの空間認知機能に及ぼす ARA 長期投与の影響.....橋本

体重は両群間で有意な変化が認められなかった。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が、ARA 投与ラットではすべての報酬餌をとりきるに要した時間（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、血漿の HDL・LDL コレステロール、ARA、ならびに n-6/n-3 比は増加し、パルミチン酸、オレイン酸、ならびにリノール酸は有意に低下した。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。海馬では ARA の摂取により、リノール酸と DHA/AA 比の低下と n-6/n-3 比の増加が認められた。ARA を摂取した加齢ラットでは、脳内の ARA が増加し、行動機能に影響を及ぼす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

ARA (240mg/kg/day) の 13 週間の投与により、n-3 系脂肪酸欠乏ならびに n-3 系脂肪酸正常マウス共に自発運動の上昇もしくはその傾向が観察された。水迷路試験、高架式十字迷路試験で

は、各群間に顕差はなかったが、n-3 系脂肪酸欠乏群では、新奇摂食抑制試験で不安傾向が、また、n-3 系脂肪酸欠乏マウスの ARA 投与群では、ロータロッド試験で顕著な運動機能の低下が特徴的に観察された。これらは、ARA 投与における自発運動量の上昇に伴って生じている可能性が高いと考えられた。今後、採取した組織中の脂肪酸組成を行ない、行動試験との関連性を総合的に考察する。

9. 我国の女子学生及び中高年女性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.....鈴木

1) 魚油含有 (DHA リッチ) ヨーグルトを摂取後では、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。一方、リノール酸においては、魚油含有ヨーグルト群の方が $27.7 \pm 2.3\%$ ($P < 0.01$) と有意に低い値を示した。

2) 漁村地域では、農村地域に比べて、肥満の人が多かった。おこずの調査では、魚をメインに食べるという人は漁村では 71% と高く、農村では半数の 50% であった。血液の脂肪酸構成は、農村地域と比較して漁村地域ではリノール酸が有意に低く、血漿 EPA および DHA が高かった。また、血球においては、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。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。

3) 漁村地域 (15 名) 及び農村地域 (16 名) の平均年齢はそれぞれ 66.6 ± 2.0 および 60.5 ± 2.4 歳の女性であり、BMI がほぼ同様で 21.6 であり、漁村地域の女性の方が農村地域の女性よりも、1 週間での魚介類摂取頻度が多い人々を選別した。血漿脂質の脂肪酸組成では、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 ± 0.2 で有意に高かった。リノール酸は農村地域の人 (27.4 ± 1.1) が漁村地域の人 (24.4 ± 1.8) より高かった。

D. 考察

ARA 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。人での研究は、すでに終了しているもので考察し、新たな介入 (ARA の投与) はしていない。今回の研究のために、本邦で市販されている ARA 油を動物実験に必要な量購入することは不可能であったため、同じ製法で ARA を製造している中国の会社より ARA 油を輸入することになった。輸入手続きに非常に時間を取られたため実験の開始時期が遅れ、現在も、研究が継続中である。

これまでの結果をまとめると以下のようになる。

○活動性の亢進： 老齢マウスに ARA を投与すると、自発運動の亢進傾向がみられ、n-3 系欠乏時に投与すると運動機能の低下が見られた(守口)。また加齢ラットに ARA を投与すると、空間認知機能に変化はなかったが、報酬餌を取りきる時間が短縮された(橋本)。このことはすでに終了した、ヒトでの横断的研究で ARA を含む多価不飽和脂肪酸と活動性に相関があることから、ヒトにもある程度当てはまる可能性がある。

○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は ARA 投与により、乳癌細胞の増殖が促進された(螺良)。他の発癌と発癌プロモーションモデルでは、研究が進行中である (螺良、永田)。

○アレルギー炎症性疾患モデルへの影響： 脳卒中易発症高血圧自然発症ラットの病態(太原)、薬物誘導大腸炎モデルラットの病態(内藤)などへの ARA 投与の研究は続行中である。一方、n-6/n-3 バランスの異なる餌を与えたラットのメタボローム解析では、組織の ARA 増と炎症メディエーターの正の相関が明らかにされつつある(小林)。

○情報収集・摂取量評価： 食事と組織 ARA レベルの相関に関する評価が進んでいる(鈴木)。

上記4項目をまとめると、ARA はがん、炎症、運動量など全てにわたって、活発化させるようである。特に、運動量増加は、n-3 系欠乏時には、落ち着きをなくすとも考えられる。

E. 結論

アラキドン酸 (ARA) は、がん、炎症、運動量など全てにわたって、促進的に作用する可能性がある。動物実験で安全性に問題があり、ヒトへの投与は恐らく勧められない。

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、マウス胎児で眼の分化・増殖障害が報告された。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。

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（食品の安心・安全確保推進研究事業） 分担研究報告書

「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」

研究分担者 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 毒性部

研究要旨

アラキドン酸（AA）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（本実験は、平成23年4月25日現在、進行中である）。

雌雄それぞれ32匹のSHRSPを4群に分け、AA 0、5、35および240mg/kgに該当するAA含有油を1日1回経口投与した。アラキドン酸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（AAで240mg）とほぼ同量を低用量、その約50倍を高用量とした。

投与第5週に、雄のAA 0 mg/kg群で鼻からの出血が2例、雌の35 mg/kg群の1例で眼内出血によると見られる片眼球の変色が認められた。第6週に雄の5 mg/kg群で1例が死亡し、剖検の結果、脳硬膜下出血と、肺および胸腺の点状出血が認められた。

投与第6週までの観察では、体重推移、摂餌量にAA投与の影響は認められていない。第1および4週に測定した収縮期血圧からは、加齢による上昇が認められるが、雌雄ともに群間差は認められなかった。

最大240mg/kg/dayのAAを6週間経口投与したSHRSPでは、AAの作用が明確には認められない。13週間投与後の結果を待ち、改めて報告する。

A. 研究目的

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、アラキドン酸（AA）投与が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評価する。

B. 研究方法

雌雄それぞれ32匹のSHRSPを4群に分け、AA 0、5、35および240mg/kgに該当するAA含有油を1日1回90日間経口投与する。アラキドン酸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（AAで240mg）とほぼ同じ量を低用量、その約50倍を高用量とした。

1) 一般状態の観察

投与期間中毎日、投与前後に一般状態を観察する。剖検日は搬出前に観察する。

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回の頻度で投与前に測定する。投与期間終了日および剖検日ならびに死亡時および切迫屠殺時にも測定する。

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する。

4) 血圧測定

投与前、投与第4週、8週および12週にtail-cuff

法で血圧を測定する。測定週は変更する可能性がある。

5) 採血

定期解剖例全例を、採血前（屠殺剖検前）に18～24時間絶食させる。その後、麻酔下で、腹部大動脈から下記（①～②）の順序で採血する。切迫屠殺例では、絶食を除き、可能な限り定期解剖例と同様に採血する。

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）

（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」にもとづき、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AA 0 mg/kg群の2例で鼻からの出血が、雌の35 mg/kg群の1例で眼内出血によると見られる片眼球の変色が認められた。また、第6週に雄の5 mg/kg群の1例が死亡した。剖検の結果、脳硬膜下血腫と肺および胸腺の点状出血が認めら

れた。

投与第6週までの観察では、体重推移（図1）、摂餌量にAA投与の影響は認められていない。

血圧

第1および4週の収縮期血圧（図2）には、加齢による経時的上昇が認められたが、雌雄ともに群間差は認められなかった。

D. 考察

AA投与第6週に雄の5 mg/kg 群で1例が死亡した以外、AA投与によると考えられる影響は認められなかった。この死亡は、高血圧、脳卒中の症状が全くなかった個体であった。これまでも別の研究で SHRSP の突然死を観察している。死亡は早朝が多く、胃内容物が多いことがほとんどであった。今回の研究目的とは関連が無いが、これは、ヒトのポックリ病¹⁾と似ている。

E. 結論

最大 240mg/kg/day の AA を 6 週間経口投与した SHRSP では、AA の作用が明確には認められない。13 週間投与後の結果を待って、改めて報告する。

(参考文献)

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(2), 84-94.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

未発表。

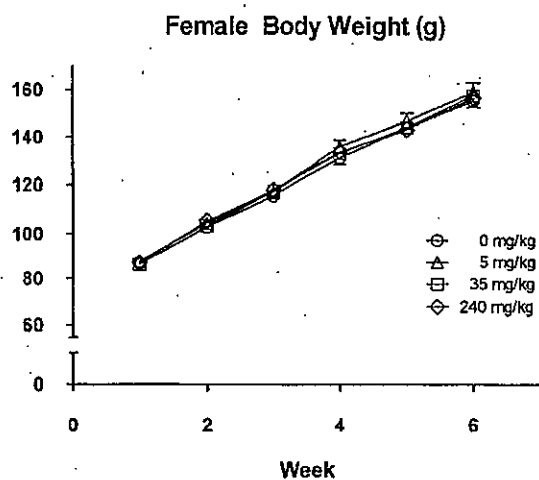
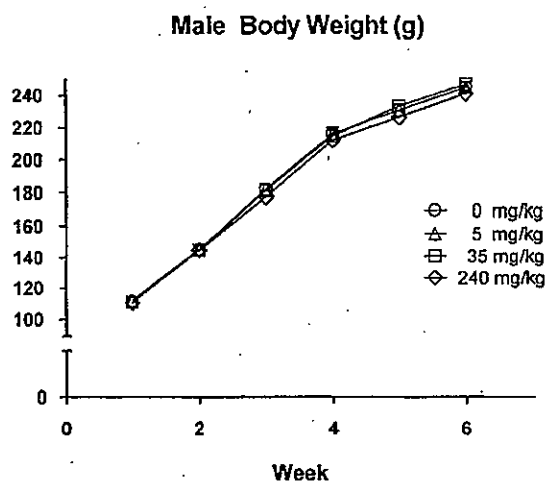


図 1 投与第6週までの観察では、体重推移摂餌量にAA投与の影響は認められない。

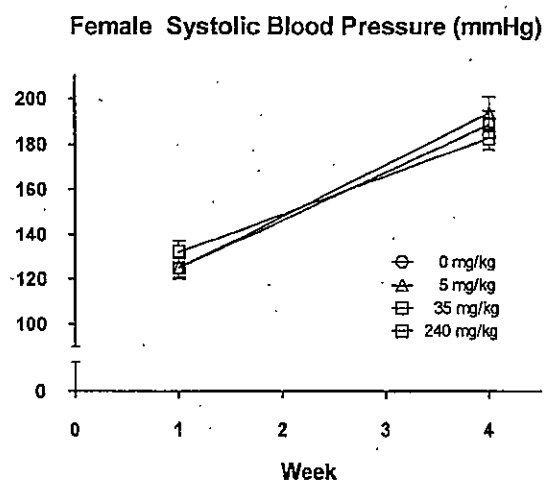
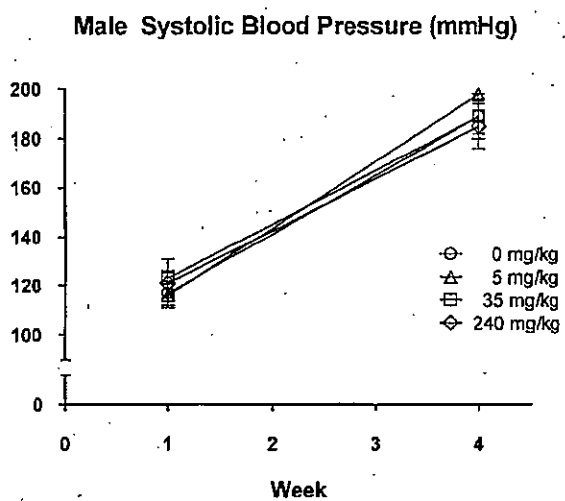


図 2 第1および4週の収縮期血圧雌雄ともに群間差は認められない。

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

「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、アラキドン酸投与による影響を調べた。実験では、雄性 Wistar ラットにアラキドン酸 0、5、35 または 240 mg/kg を 8 週間強制経口投与し、第 8 週（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アラキドン酸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、アラキドン酸 0 または 240 mg/kg のみ投与）も設定した。

投与第 7 週までの全動物の一般症状には、異常が認められなかった。また、アラキドン酸投与群の体重および摂餌量は、対照群（アラキドン酸 0 mg/kg）と比較して有意差は認められなかった。投与第 8 週の 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。本実験は平成 23 年 4 月現在、進行中である。

これまでの結果からは、アラキドン酸補給が、薬物誘導炎症性大腸炎を増悪する作用は認められなかった。今後実施する、病理学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、大腸炎の指標を調べる検査（便の状態解析、大腸重量比、大腸 myeloperoxidase 活性、大腸粘膜培養上清 GRO/CINC-1 量）の結果とあわせて、炎症性疾患への影響を総合的に解析する。

A. 研究目的

アラキドン酸の補給が、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、アラキドン酸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

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、アラキドン酸 0、5、35、240 mg/kg、大腸炎誘導なしアラキドン酸 0 および 240 mg/kg 群とした。動物は、温度 21.0～25.0℃、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。

2. 投与

アラキドン酸含有油(Lot No. 10050701、CABIO、中国)を7倍公比で混合油と混合し、アラキドン酸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、アラキドン酸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。

3. DSS誘導炎症性大腸炎の作製

アラキドン酸投与第8週に(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。

4. 検査および測定

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、摂水量を測定した。

〔平成23年4月時点で、投与期間が終了したところである。今後実施する検査項目は以下の通りである。病理学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、大腸炎の指標への影響を調べる検査(便の状態解析、大腸重量比、大腸myeloperoxidase活性、大腸粘膜培養上清GRO/CINC-1量)〕

(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

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投与群の動物に貧血が散見された。また、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。アラキドン酸投与群(5、35および240 mg/kg群)の摂餌量は、対照群(アラキドン酸0 mg/kg)と比較して有意差は認められなかった(図2)。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(程度および頻度の解析は、今後実施する予定)。なお、240 mg/kg投与群で、摂水量の低い動物が1例認められた。この動物では、DSS投与最終日に軟便が観察されたのみであった。

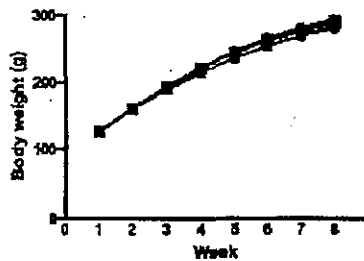


図1 体重の推移

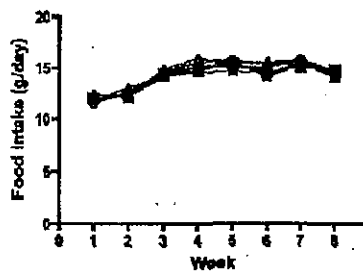


図2 摂餌量の推移

- アラキドン酸 0 mg/kg
- アラキドン酸 5 mg/kg
- △アラキドン酸 35 mg/kg
- ▲アラキドン酸 240 mg/kg
- アラキドン酸 0 mg/kg (DSS 投与なし)
- アラキドン酸 240 mg/kg (DSS 投与なし)

D. 考察

これまでに得られた結果から、アラキドン酸補給による DSS 誘導炎症性大腸炎への影響は認められなかった。なお、240 mg/kg 投与群認められた摂水量が低かった 1 例は、DSS 投与開始前までの一般状態は良好であったことから、状態の悪化により摂水量が低下したのではなく、摂水がうまくできなかったことによると考えられる。

今後実施予定の検査および測定項目は、より詳細に大腸炎に対する影響を解析することができることから、これらも含めて総

合的に評価する予定である。また、DSS 無投与群に関する解析から、正常動物へのアラキドン酸補給の影響の有無について評価する。

E. 結論

8 週間のアラキドン酸 (5、35 および 240 mg/kg) によって、薬物誘導大腸炎モデルラットの一般状態、体重、摂餌量および便には、明らかな作用は認められなかった。さらに解析を進めて報告する。

F. 健康危険情報

(記載せず)

G. 研究発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

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

「乳癌に対するアラキドン酸の影響」

研究分担者 螺良 愛郎 関西医科大学 教授
研究協力者 義澤 克彦 関西医科大学 講師
研究協力者 佐々木 朋 関西医科大学 専攻生

研究要旨

ヒト乳癌細胞移植モデルならびにN-メチル-N-ニトロソ尿素誘発乳腺発がんラットモデルを用いて、アラキドン酸補給が乳がん発症に及ぼす影響について明確にする。

A. 研究目的

アラキドン酸補給が乳がん発症に及ぼす影響について動物実験で明確にし、ヒトへの外挿を行う。

B. 研究方法

①ヒト乳癌細胞株(KPL-1)を移植したヌードマウスを用いて、乳癌細胞の成長に対するアラキドン酸の直接的な影響を観察した。腫瘍塊にアラキドン酸 10 μ l を直接投与した。

②ヒト乳癌細胞株(KPL-1)を移植したヌードマウスを用いて、乳癌細胞の成長に対するアラキドン酸添加食(0.4%, 1.5%, 6.1%)の影響を比較する。アラキドン酸添加食は乳癌細胞移植2週間前より摂食させた。

③妊娠雌ルイス系ラットに妊娠期・授乳期にアラキドン酸添加食(0.4%, 1.5%, 6.1%)を摂取させる。50日齢雌仔ラットに50 mg/kg MNUを単回腹腔内投与し、乳腺の発癌率を検索する。

C. 研究結果

①アラキドン酸を直接腫瘍塊に投与した場合、

腫瘍塊の体積ならびに組織像には非投与群と差はみられなかった。

②アラキドン酸添加食 6.1%群では、他群に比べて腫瘍塊の体積が有意に大きく、乳癌細胞の成長を促進させた。現在、病理検査中である。

③現在、MNU投与を終了し、経過観察中である。

D. 考察

特記せず。

E. 結論

アラキドン酸は乳癌細胞の成長を促進させる作用を有することが示唆されるが、そのメカニズムについては、現在検索中である。

F. 健康危険情報

特記せず。

G. 研究発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

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

「脂質メタボロームを用いたラット炎症病態と必須脂肪酸バランスの解析」

研究分担者 小林 哲幸 お茶の水女子大学大学院 教授

研究要旨：

最近のポストゲノムサイエンスにおいて、細胞内にある脂質代謝物を一斉に解析する手法である脂質メタボローム解析がたいへん注目されている。しかし、最新の質量分析装置を基盤としたその解析技術は未だ確立されてから日が浅く、病態研究への適用例は少ない。本研究では、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。その結果、 ω 3系列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、 ω 6系列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から、各種脂質関連分子の変動から裏付けられた。

A. 研究目的

メタボローム解析は、生体内において酵素などの代謝活動によって作り出された代謝物質を包括的・動的に捉える研究分野の一つである。その対象物質として脂質・糖質・アミノ酸などの膨大な種類の代謝物があり、環境要因や遺伝的背景の違いなどによって質的および量的に変動することから、メタボローム解析は生命現象や病態の解明において重要となってきた。中でも、最新の質量分析装置を用いた脂質メタボローム解析（リピドミクス）は、病態の基礎研究を行う上で最近、注目を集めており、食品成分の安全性研究にも適用が可能である。本研究では、アラキドン酸の長期摂取の安全性の評価方法の一つとして、最新の脂質メタボローム解析を応用することとした。今年度はその準備段階として、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を用いて、腸管虚血再灌

流により惹起した炎症反応と脂質栄養の関係について、脂質メタボローム解析により詳細に検討した。

B. 研究方法

B-1. 経腸栄養剤投与によるラットへの脂肪酸取り込みの評価

ラットは、Sprague-Dawley ラット、雄、体重 280-380 g を用いた。ラットの一つのグループには、経腸栄養剤として Oxepa（アボットジャパン株式会社、250mL 缶中に EPA 1.3g、DHA 0.55g、 γ -リノレン酸（GLA）1.1g 等を含む）、もう一方のグループには EPA, DHA を含まずにリノール酸が豊富な Pulmocare（アボットジャパン株式会社）の投与を行った（Table I）。経腸栄養剤投与後、0、1、3、5 日のそれぞれの時点において、血漿・血球成分・腸管・腸間膜リンパ節・肝臓・肺を採取した。

Table 1. Oxepa, Pulmocareの全脂質中の脂肪酸組成
Oxepa, Pulmocareより総脂質を抽出し、ガスクロマトグラフを用いて脂肪酸組成を測定した。

	Oxepa	Pulmocare
ミスチン酸(14:0)	1.5	0.3
パルミチン酸(16:0)	7.1	5.7
パルミトオレイン酸(16:1)	1.9	-
ステアリン酸(18:0)	2.5	2.1
オレイン酸(18:1 cis)	29.7	50.2
エライジン酸(18:1 trans)	2.0	1.9
リノール酸(18:2 ω6)	18.3	24.7
γ-リノレン酸(18:3 ω6)	6.0	-
α-リノレン酸(18:3 ω3)	4.0	5.1
エイコセン酸(20:1)	1.6	0.6
エイコサペンタエン酸(20:5 ω3)	6.5	-
ドコサヘキサエン酸(22:6 ω3)	2.7	-

(%)

得られた検体からリン脂質を分離・抽出してメチルエステル誘導体化後、ガスクロマトグラフ (GC-2014, Shimadzu, キャピラリーカラム DB-23, Agilent Technologies) により脂肪酸組成を測定した。また、LC-ESI/MS 質量分析装置 (QTRAP, AB SCIEX) を用いたリン脂質分子種の分析を行った。カラムは Inertsil SIL-100A 3μm 2.1 × 150 mm (GL Science) を用いた。ESI-MS/MS システムは、HP1100HPLC システム (Agilent Technologies) とエレクトロスプレーイオン源を装備した QTRAP™LC/MS/MS system (AB SCIEX) で行った。溶媒の送液は 200 μl/min の流速で行った。移動相は、0.1% ギ酸アンモニウムを含むアセトニトリル-メタノール-水 (18:11:1) (pH6.8) を用いた。マススペクトルはポジティブイオンモードにて、以下のパラメーターで測定した。カーテンガス 25.00、イオンスプレー電圧 5.50kV、コリージョンガス圧 4.00、ネブライザーガス 70.00psi、ターボガス 70.00psi であった。ソース温度は 300°C に設定した。

脂質全体の網羅的解析のため、ポジティブ分子量関連イオンをイオントラップにて高感度にモニターする enhanced mass scan (EMS) モード分析を行った。また、特定リン脂質の定量解析には multiple reaction monitoring (MRM) モード分析を行った。

Analyst (AB SCIEX) ソフトを用いて、MRM モードで測定したピークの面積を算出した。サンプル面積を IS 面積で割った補正値を用い、SIMCA+P (UMETRICS) の OPLS (Orthogonal PLS) 分析により解析を行った。

B-2. ラット腸管虚血再灌流炎症モデルを用いた抗炎症作用の評価

Oxepa、または Pulmocare を 3 日間経腸栄養投与したラットに、炎症として腸管虚血再灌流処置 (45 分虚血 4 時間再灌流) を行い、その後、血漿・血球成分・腸管・腸間膜リンパ節・肝臓・肺を採取した。腸管虚血再灌流処置は次のように行った。経十二指腸的持続栄養を Oxepa、もしくは Pulmocare を栄養剤として用い、3 日間施行した。3 日間施行後に栄養を中止し、ラットを揮発性吸入麻酔薬イソフルレンにて麻酔を行った。十分な麻酔効果を確認した後、上腹部に腹部正中切開を行い、血管遮断クリップを用いて上腸間膜動脈遮断を 45 分間施工した。その後、クリップによる遮断を解除し、4-0 絹糸にて閉腹を行った。麻酔から覚醒させ、再灌流 4 時間後に再び、検体採取のためにイソフルレン麻酔を行った。十分な麻酔効果を確認した後に、検体採取を行った。心臓より血液を採取し、直ちにヘパリン添加のスピッツに入れ、遠心させ、血漿、血球成分を採取した。遠心して

いる間に引き続き、腸管の採取を行った。回盲部より10cmのあたりから3cm程度、組織評価のために10%ホルマリン固定を行った。さらに20cm程度の回腸を検体として採取した。採取の際に腸管内を生理食塩水にて洗浄し、液体窒素にて冷却。検体は測定まで -80°C にて冷凍保存を行った。

各種器官・組織について、ガスクロマトグラフにより炎症前後の脂肪酸組成を測定した。また、炎症局所である腸管に関して、LC-ESI/MS質量分析装置を用いた酸化脂肪酸測定、抗体アレイによる各種サイトカインの測定、および組織染色を行い、炎症症状を評価した。

なお、動物を扱う実験は、共同研究機関である東京医科歯科大学、及び日本医科大学の動物実験委員会に実験計画書を申請して審査を受け、そこでの承認を得てから、東京医科歯科大学救急災害医学講座、及び日本医科大学救急医学講座の研究室にて行った。

C. D. 研究結果と考察

C-1. 経腸栄養剤投与によるラット血漿、組織への脂肪酸の取り込み

経腸栄養前、Oxepa、もしくはPulmocareを3日間経腸栄養投与したラットから採取した血漿、血球成分、腸管、腸間膜リンパ節、肝臓、肺について、生体内に多く含有される主要なリン脂質PC、LPC、PEについて質量分析装置によるリン脂質分子種分析を行った。主要リン脂質分子種、EMSモードでの測定で網羅的に変動の確認されたリン脂質分子種に関して、ポジティブイオンMRMモードで測定した。ピーク面積をIS面積で割り、補正した。ラット血漿リン脂質分子種分析について、全てのリン脂質分子種の補正面積値をグラフに表した例をFig. 1 (A)に掲載した。

変化の大きい分子種を抽出するため、データ解析にはSIMCA P+のOPLS分析を用いた。

OPLS分析は選択した2つのグループ間の変動を解析する。今回の解析には、補正面積値のみを用いているため、x軸は数値的差の大きさ、y軸は変動の大きさに相当する。測定に用いたISはPC、LPC、PE間で異なる脂質を使用しているため、今回はx軸の変動は考慮せず、y軸において、 $>|0.8|$ に位置する分子種(腸管・腸間膜の一部に関しては $>|0.6|$)について変動があったと見なした。各種器官・臓器について、経腸栄養前群とOxepa投与群(noEN vs. Oxepa)、Pulmocare投与群とOxepa投与群(Pulmocare vs. Oxepa)、経腸栄養前群とPulmocare投与群(noEN vs. Pulmocare)、それぞれの比較を行った。Fig. 1 (A)~(D)には血漿での詳細な結果を示した。

血漿以外の組織・臓器での分子種変動について、PulmocareとOxepa投与群間での比較をFig. 2にまとめた。各器官・臓器を横断的に見て、Pulmocare投与に比べてOxepa投与群では、EPAを含む二重結合数5の分子種が増加した。特に、PC36:5、LPC20:5については、多くの器官・臓器、コントロールで変動が見られた。同じω3系列であるDHAを含む二重結合数6の分子種でも、EPA程ではないが、増加変動を示す器官・臓器が多く見られた。DHA含有分子種では、特にPE分子種に変動が見られた。一方、リノール酸をもつ二重結合数2、AAを持つ二重結合数4の分子種については、Pulmocare投与で多いことが確認された。特に、多くの器官・臓器で変動が見られた分子種は、二重結合数2の分子種では、LPC18:2、PC34:2、PC36:2であり、二重結合数4の分子種では、LPC20:4であった。飽和と二重結合数1の分子種については、Pulmocare投与により、血漿・血球成分・腸管・腸間膜リンパ節で増加が見られた。

(A)

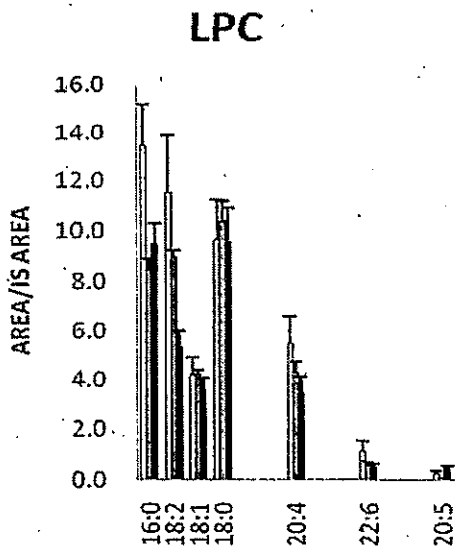
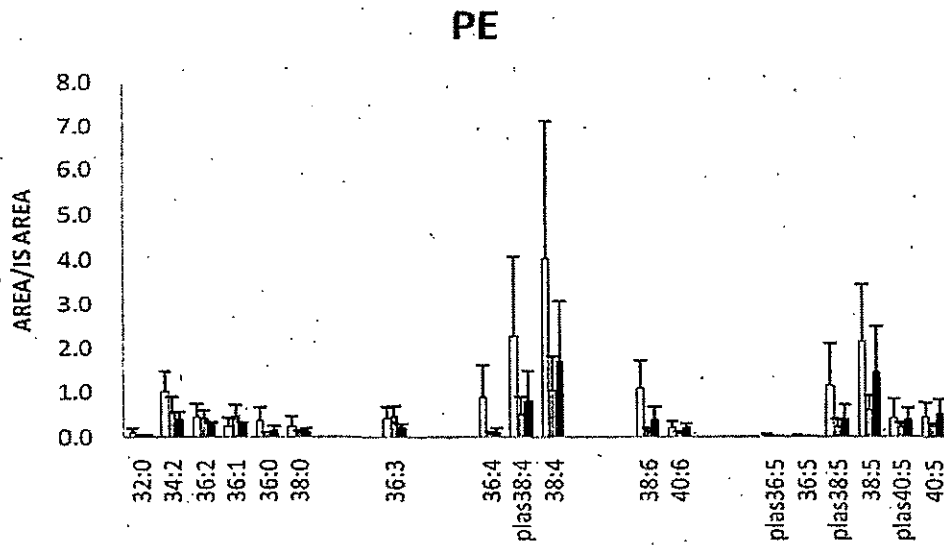
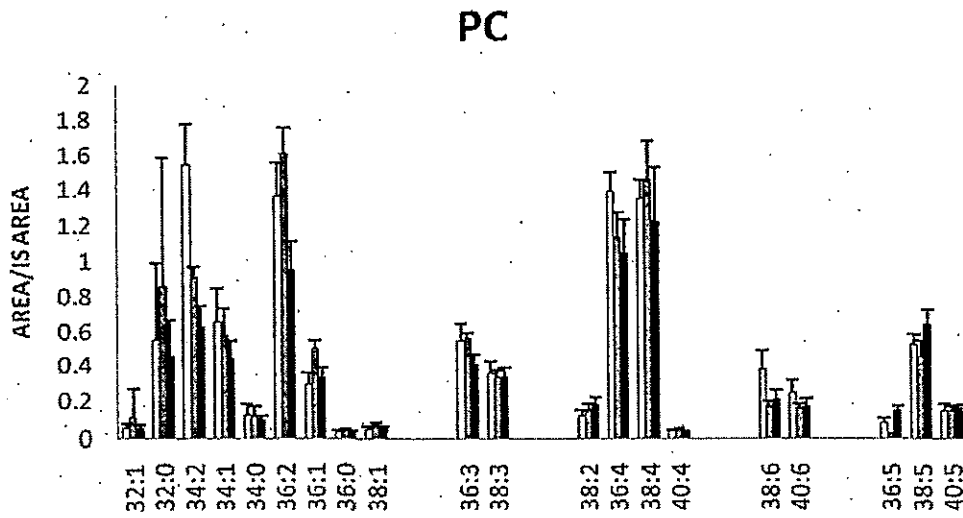


Fig 1. 質量分析装置による
ラット血漿リン脂質分子種分析
(A) 経腸栄養前後における
リン脂質分子種の変動

経腸栄養前、Oxepa,もしくは Pulmocare 投与 3日目のラット血漿
総脂質に関して、質量分析装置を用いて、リン脂質分子種ごと
に測定を行った。

noEN(□), Pulmocare(▨), Oxepa(■)

±S.D. n=3 各グラフ上の群は、左から飽和脂肪酸・一価二価脂
肪酸含有, DHLA 含有, AA 含有, DHA 含有, EPA 含有分子種
を示している。

(B)

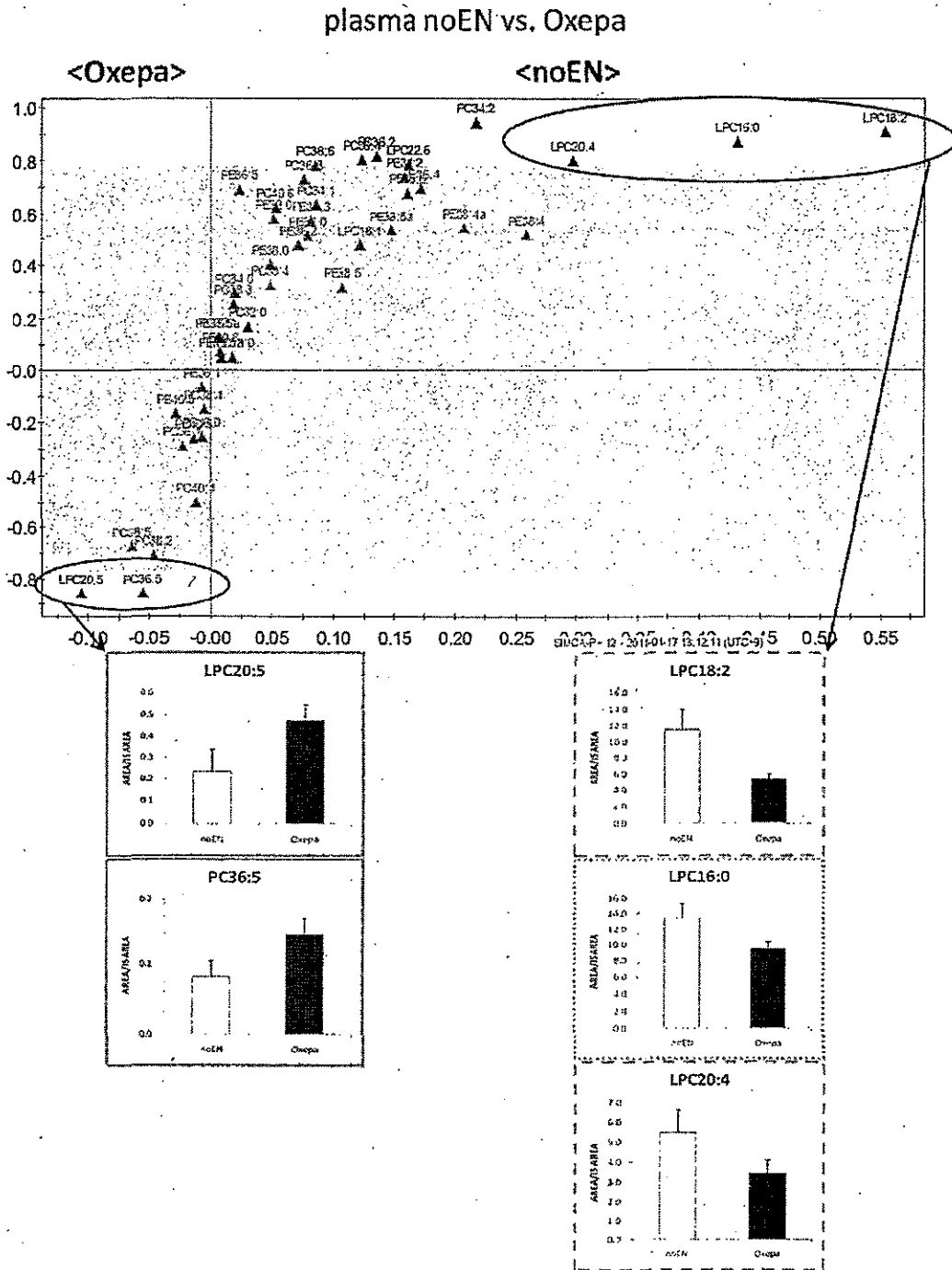


Fig. 1 質量分析装置によるラット血漿リン脂質分子種分析

(B) 経腸栄養前と Oxepa 投与における血漿リン脂質分子種変動 OPLS 分析

経腸栄養前と Oxepa 投与間でみられるリン脂質分子種変動の傾向を, SIMCA P+により解析した. 上図が S-plot で, y 軸より左が Oxepa, 右が noEN で変動した分子種を示す. y 軸における $>|0.8|$ は OPLS 分析で有効な範囲. 代表して, LPC20:5, PC36:5, LPC18:2, LPC16:0, LPC20:4 について, グラフを示した. $\pm S.D$ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$
.....は飽和・一価含有, - -は $\omega 6$ 含有, —は $\omega 3$ 含有分子種を表す.

(C)

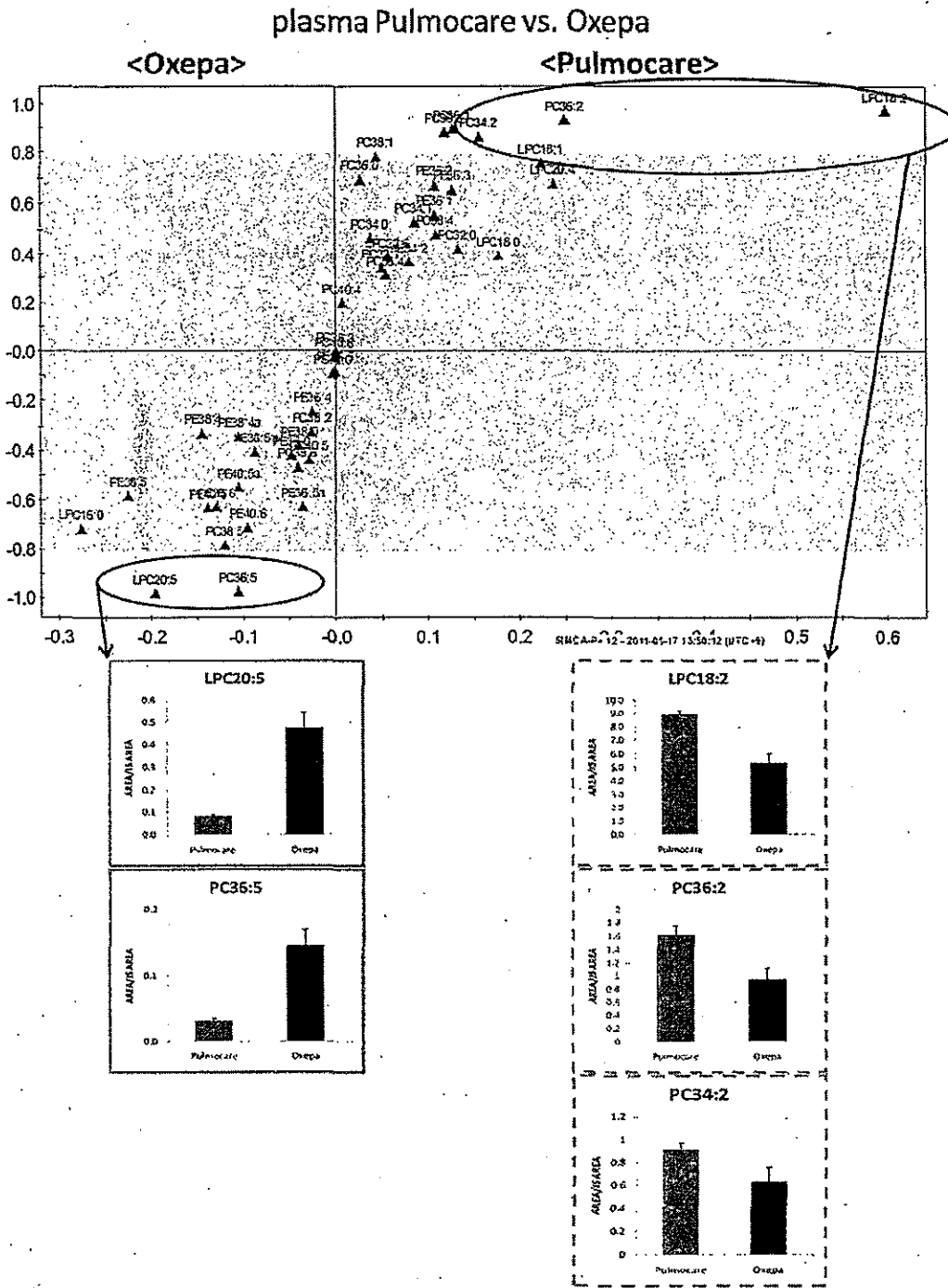


Fig. 1 質量分析装置によるラット血漿リン脂質分子種分析

(C) Pulmocare 投与と Oxepa 投与における血漿リン脂質分子種変動 OPLS 分析

Pulmocare 投与と Oxepa 投与間でみられるリン脂質分子種変動の傾向を、SIMCA P+により解析した。上図が S-plot で、y 軸より左が Oxepa、右が Pulmocare で変動した分子種を示す。y 軸における $>|0.8|$ は OPLS 分析で有効な範囲。代表して、LPC20:5、PC36:5、LPC18:2、PC36:2、PC34:2 について、グラフを示した。

±S.D * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ - - は $\omega 6$ 含有。— は $\omega 3$ 含有分子種を表す。

(D)

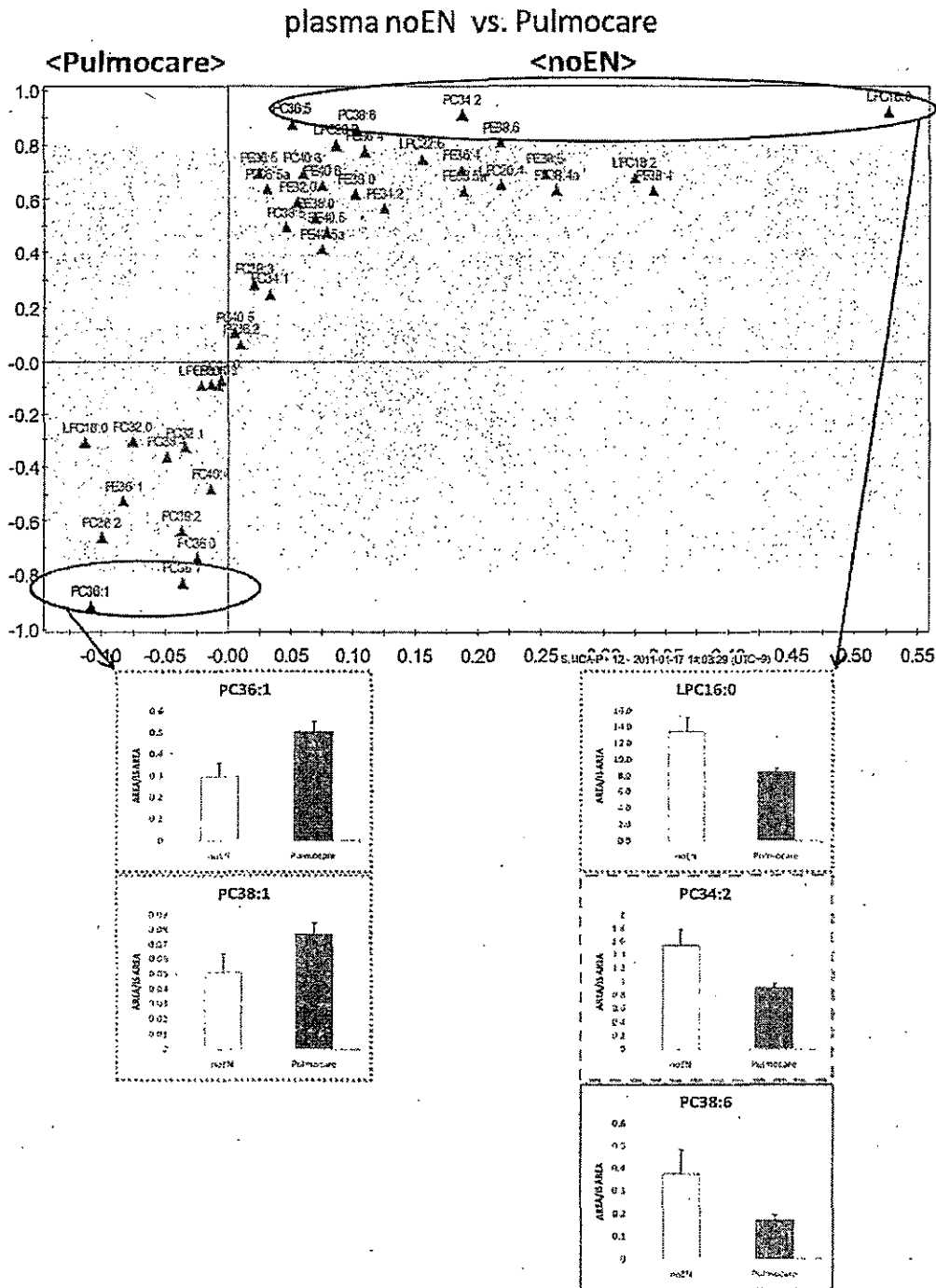


Fig. 1 質量分析装置によるラット血漿リン脂質分子種分析

(D) 経腸栄養前と Pulmocare 投与における血漿リン脂質分子種変動 OPLS 分析

経腸栄養前と Pulmocare 投与間でみられるリン脂質分子種変動の傾向を、SIMCA P+により解析した。上図が S-plot で、y 軸より左が Pulmocare、右が noEN で変動した分子種を示す。y 軸における >0.8 は OPLS 分析で有効な範囲。

代表して、PC36:1, PC38:1, LPC16:0, PC34:2 について、グラフを示した。±S.D * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$

.....囲みは飽和・一価含有、--囲みは $\omega 6$ 含有分子種を表す。

Pulmocare vs. Oxepa

	飽和 ω-1		ω-5		ω-3	
	0	1	2	4	5	6 & 3
plasma		FC36	LPC18 PC34 PC35		LPC20 PC35	PC35
blood cells		LPC18	LPC18	LPC20	LPC20 PC35	
intestine	LPC18 LPC18 PC34 PC34	LPC18 PC34		PEplac38	LPC20 PEplac40 PE40	PE40
lymph node			PE38 PE34 PC34 PC38	PEplac38 PC38	LPC20 PEplac40 PC35 PE36	PE42 PE38
liver			PC36 PE34 PE35	PC38 PE38	LPC20 PC35	PE40
lung					LPC20 PC36 PEplac36	PE35

Fig. 2 ラット各器官・臓器リン脂質分子種分析まとめ

経腸栄養前、3日間の Pulmocare, もしくは Oxepa を投与したラットの血漿, 血球成分, 腸管, 腸間膜リンパ節, 肝臓, 肺における、質量分析装置によるリン脂質分子種分析で OPLS 分析>0.8|であった分子種について、表にまとめた。列は各器官・臓器, 行は二重結合数を示す。濃いグレーは Pulmocare 投与によって増加した分子種, 薄いグレーは Oxepa 投与によって増加した分子種を示す。

※OPLS 分析>0.6|で集計した分子種については、細字で表している。

C-2. ラット腸管虚血再灌流における各器官・組織リン脂質脂肪酸組成の変動に及ぼす経腸栄養の効果

経腸栄養剤の違いによる、炎症後の脂肪酸組成変動を評価すべく、ラットに Oxepa, または Pulmocare を3日間経腸栄養投与後、炎症モデルとして腸管虚血再灌流処置を施した。このラットより採取された血漿、血球成分、腸管、腸間膜リンパ節、肝臓、肺について、ガスクロマトグラフを用いて総リン脂質中の脂肪酸組成を測定し、各経腸栄養剤投与による炎症前後の脂肪酸組成の変動を評価した。

総リン脂質脂肪酸量に占める EPA の割合は、Oxepa 投与群において、腸管虚血再灌流処置により、腸管以外の各器官・臓器では減少傾向を示した。特に、血漿、肝臓については有意な減少が見られた。腸管に関しては、他の器官・臓

器とは逆に、増加の傾向を示した。Pulmocare 投与群に関しては、腸管虚血再灌流処置により、肝臓以外のどの器官・臓器においても有意に増加した (Fig.3 (A))。

総リン脂質脂肪酸量に占める AA の割合は、Pulmocare 投与群の血漿・血球成分において、腸管虚血再灌流処置により、有意な増加を示した。しかし、Oxepa 投与群においても、Pulmocare 投与群においても EPA 程大きな変動は見られなかった (Fig.3 (B))。

総リン脂質脂肪酸量に占める DHA の割合は、Oxepa 投与群において、腸管虚血再灌流処置により、血漿、血球成分、肝臓、肺では増加の傾向を示した。血漿、肝臓については有意な増加が見られた。Pulmocare 投与群ではどの器官・臓器についても増加の傾向を示し、特に血漿、血球成分、腸管では有意差が見られた (Fig.3 (C))。

(A)

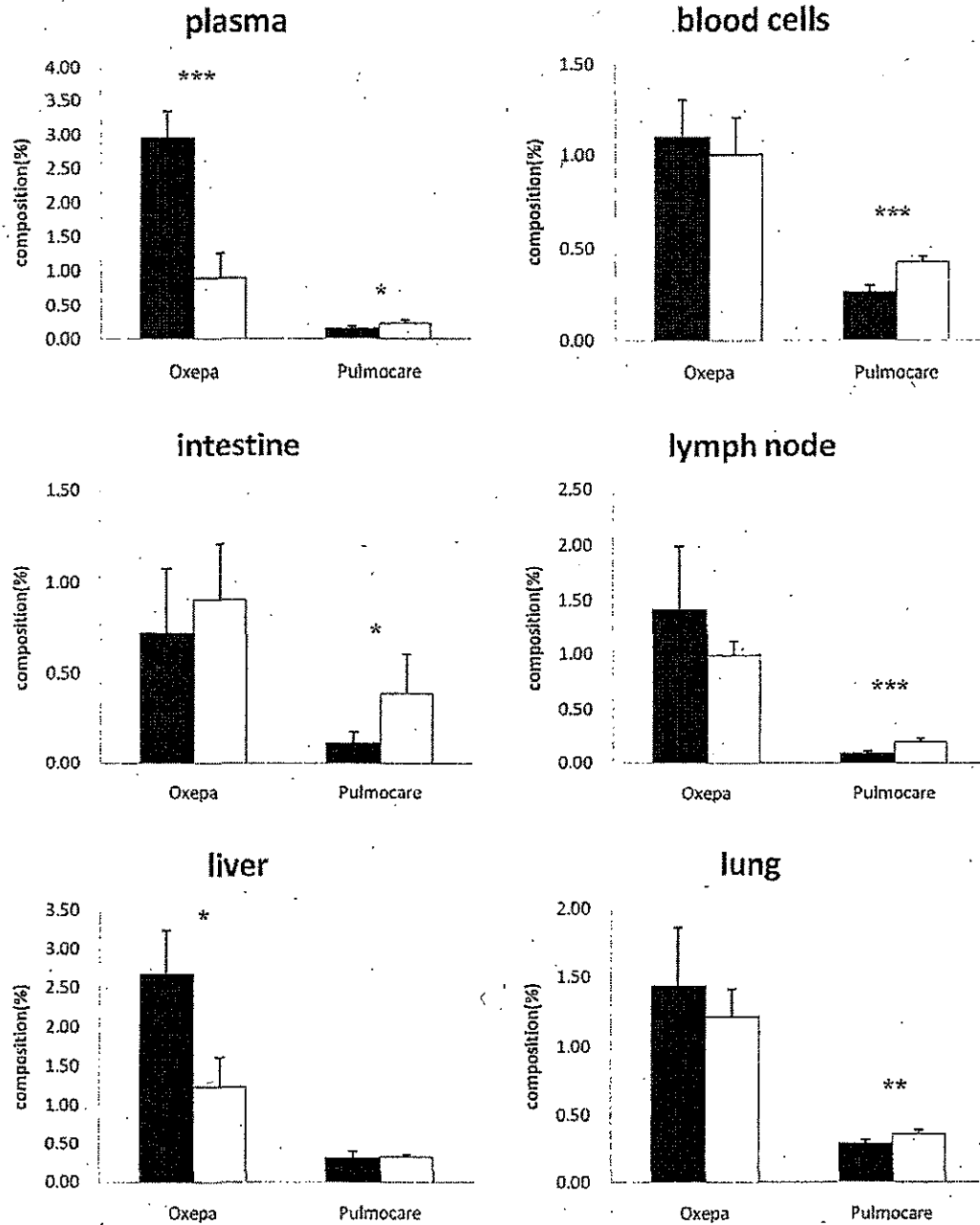


Fig. 3 腸管虚血再灌流モデルラットにおける各器官・組織リン脂質脂肪酸組成の変動

(A) 各器官・組織における EPA の変動

ラットに Oxepa もしくは Pulmocare を 3 日間経腸栄養投与。その後、炎症モデルとして腸管虚血再灌流処置(虚血 45 分、再灌流 4 時間)を行った。各器官・組織において総リン脂質脂肪酸量に対する EPA 量の割合をガスクロマトグラフにより算出した。EN 群(■)、EN+I/R 群(□)

±S.D * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, Oxepa:EN n=4, EN+I/R n=3, Pulmocare:EN n=6, EN+I/R n=3

(B)

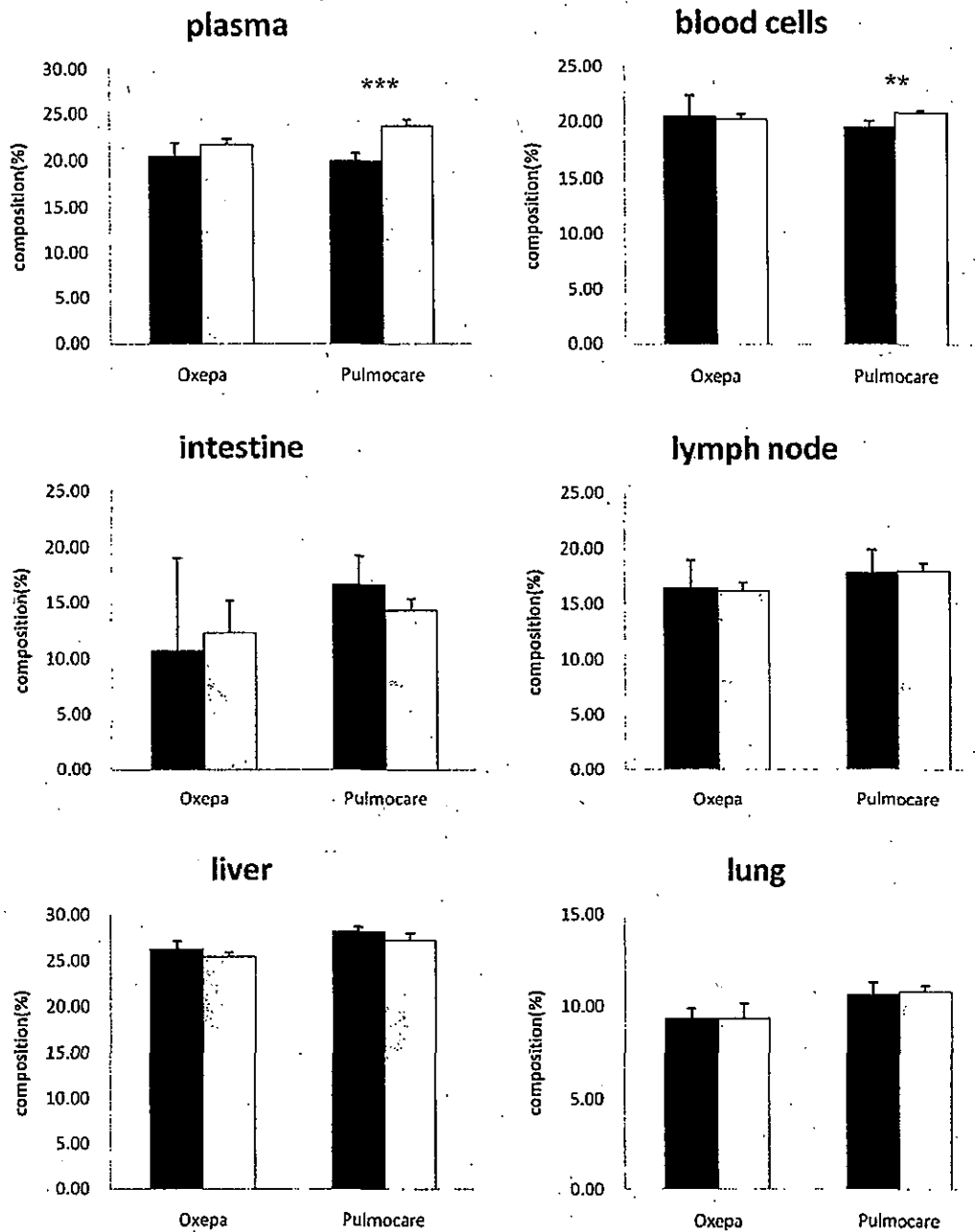


Fig. 3 腸管虚血再灌流モデルラットにおける各器官・組織リン脂質脂肪酸組成の変動

(B) 各器官・組織におけるAAの変動

ラットに Oxepa もしくは Pulmocare を 3 日間経腸栄養投与。その後、炎症モデルとして腸管虚血再灌流処置(虚血 45 分、再灌流 4 時間)を行った。各器官・組織において総リン脂質脂肪酸量に対する AA 量の割合をガスクロマトグラフにより算出した。EN 群(■)、EN+I/R 群(□)

±S.D * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, Oxepa:EN n=4, EN+I/R n=3, Pulmocare:EN n=6, EN+R/I n=3

(C)

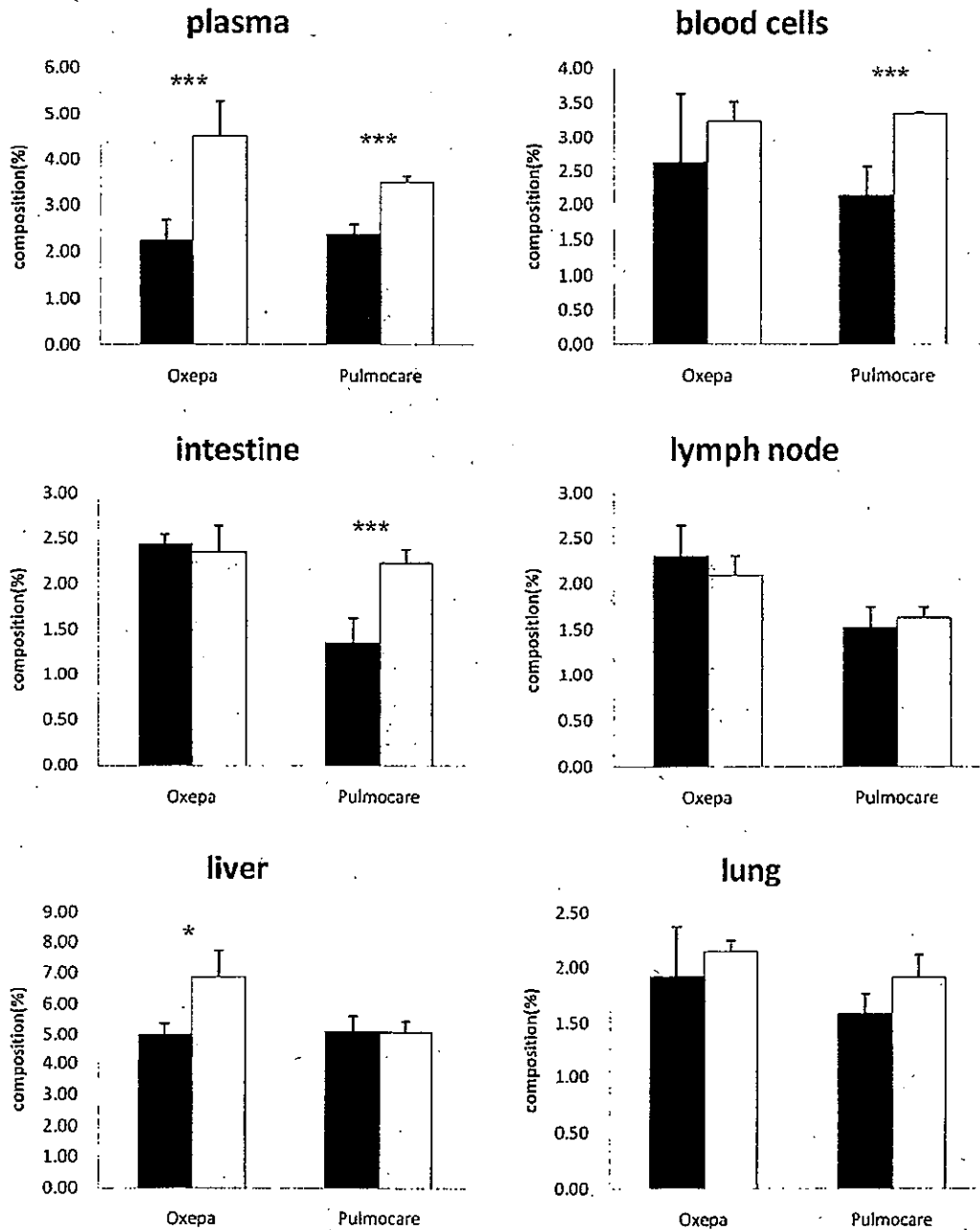


Fig. 3 腸管虚血再灌流モデルラットにおける各器官・組織リン脂質脂肪酸組成の変動

(C) 各器官・組織における DHA の変動

ラットに Oxepa もしくは Pulmocare を 3 日間経腸栄養投与。その後、炎症モデルとして腸管虚血再灌流処置(虚血 45 分、再灌流 4 時間)を行った。各器官・組織において総リン脂質脂肪酸量に対する DHA 量の割合をガスクロマトグラフにより算出した。EN 群(■)、EN+I/R 群(□)

±S.D * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, Oxepa:EN n=4, EN+I/R n=3, Pulmocare:EN n=6, EN+R/I n=3

C-3. 腸管虚血再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

経腸栄養剤の違いによる、炎症後の酸化脂肪酸変動を評価すべく、Oxepa、もしくはPulmocareを3日間経腸栄養投与後、炎症モデルとして腸管虚血再灌流処置を施したラットより採取した腸管について、質量分析装置を用いて酸化脂肪酸を測定した。

経腸栄養投与のみを施したラットの酸化脂肪酸測定結果をFig. 4 (A)に掲載した。炎症惹起処置を与えず、栄養のみの潜在的に存在する酸化脂肪酸についてPulmocare投与群とOxepa投与群を比較した。Oxepa投与群では、AA由来の酸化脂肪酸がPulmocare投与群より少ない傾向、EPA由来の酸化脂肪酸が多い傾向が見られた。また、DHA由来の酸化脂肪酸については、Oxepa投与群では検出限界以下の酸化脂肪酸が多く、Pulmocare投与群の方が多い傾向が見られた。

腸管虚血再灌流処置による酸化脂肪酸の変動を、Oxepa投与群、Pulmocare投与群それぞれについて検討した結果をFig. 4 (B)に掲載した。Oxepa投与群、Pulmocare投与群どちらについても、腸管虚血再灌流処置により、AA由来の酸化脂肪酸が増加の傾向が見られた。同様に、DHA由来の酸化脂肪酸も増加の傾向が見られた。EPA由来の酸化脂肪酸はOxepa投与群では増加の傾向が見られたが、Pulmocare投与群においては横ばい、もしくは検出限界以下であった酸化脂肪酸が多く見られた。

Oxepa投与後に腸管虚血再灌流処置を施したラットと、Pulmocare投与後に腸管虚血再灌流処置を施したラットについて各酸化脂肪酸を比較した結果をFig. 4 (C)に掲載した。Pulmocare投与後に炎症を与えた群と比較して、Oxepa投与後に炎症を与えた群では、AA由来の酸化脂肪酸が少なく、EPA由来の酸化脂肪酸が多く見られた。DHA由来の酸化脂肪酸に

関して、どちらの群とも大きな差異は見られなかった。

Fig. 4 (C)の結果をSIMCA P+によるOPLS分析で解析した結果をFig. 4 (D)に示した。y軸 $>|0.8|$ であった、主な酸化脂肪酸について、平均で算出したグラフを下図に示した。Pulmocare投与群では、Oxepa投与群に比べ、AA由来の炎症性脂質メディエーターであるLTB₄が有意に多く産生された。また、PGF₂ α 、12-HETEもPulmocare投与群で多い傾向が見られた。一方、Oxepa投与群では、Pulmocare投与群に比べ、5-HEPE、12-HEPEが有意に多い傾向が見られた。また、PGE₃についても多い傾向が見られた。他に、Pulmocare投与群が検出限界以下で、統計学的な評価はできないが、Oxepa投与群で多く見られた酸化脂肪酸として、PGD₃、15-HEPE、レゾルピンEシリーズの前駆体である18-HEPEが見出された。

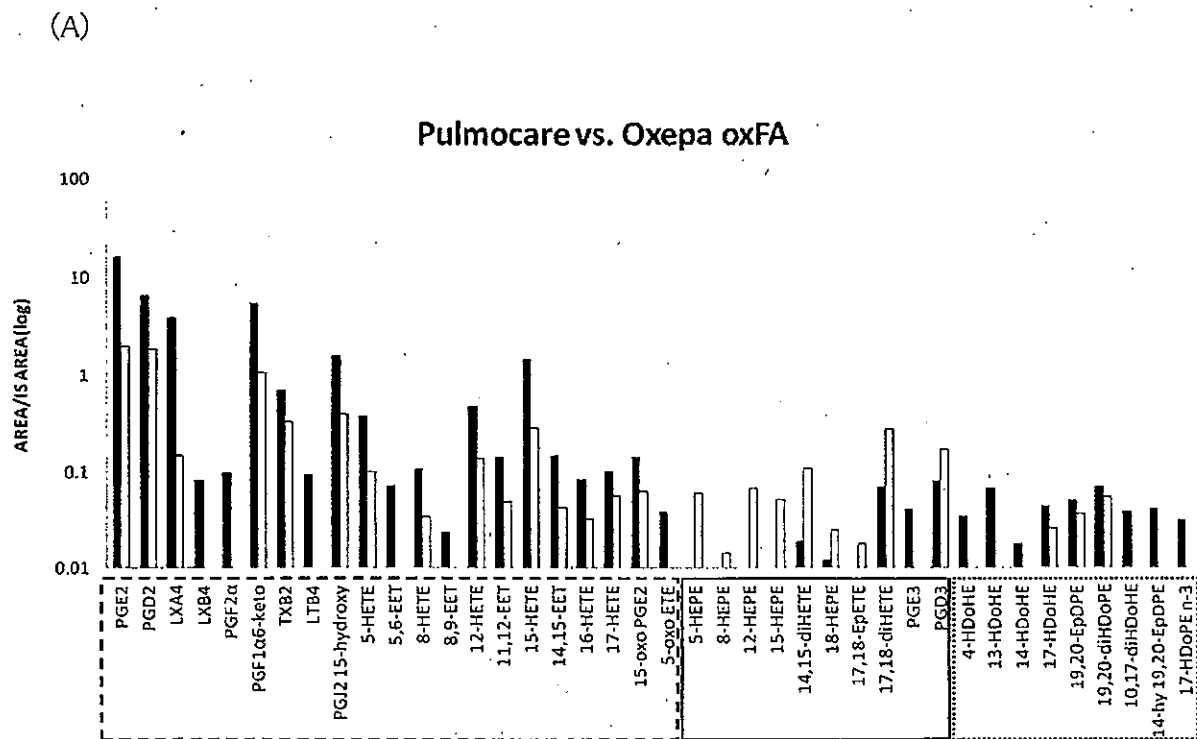


Fig. 4 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

(A) Oxepa, Pulmocare 投与による腸管の酸化脂肪酸変動

Oxepa 投与, もしくは Pulmocare 投与のみを施したラット腸管の酸化脂肪酸を質量分析装置により測定した。

Pulmocare (■), Oxepa (□) それぞれ n=2, 棒グラフの立たない箇所は測定限界以下であった。

---は AA 由来の酸化脂肪酸群, ——は EPA 由来の酸化脂肪酸群,は DHA 由来の酸化脂肪酸群を示す。

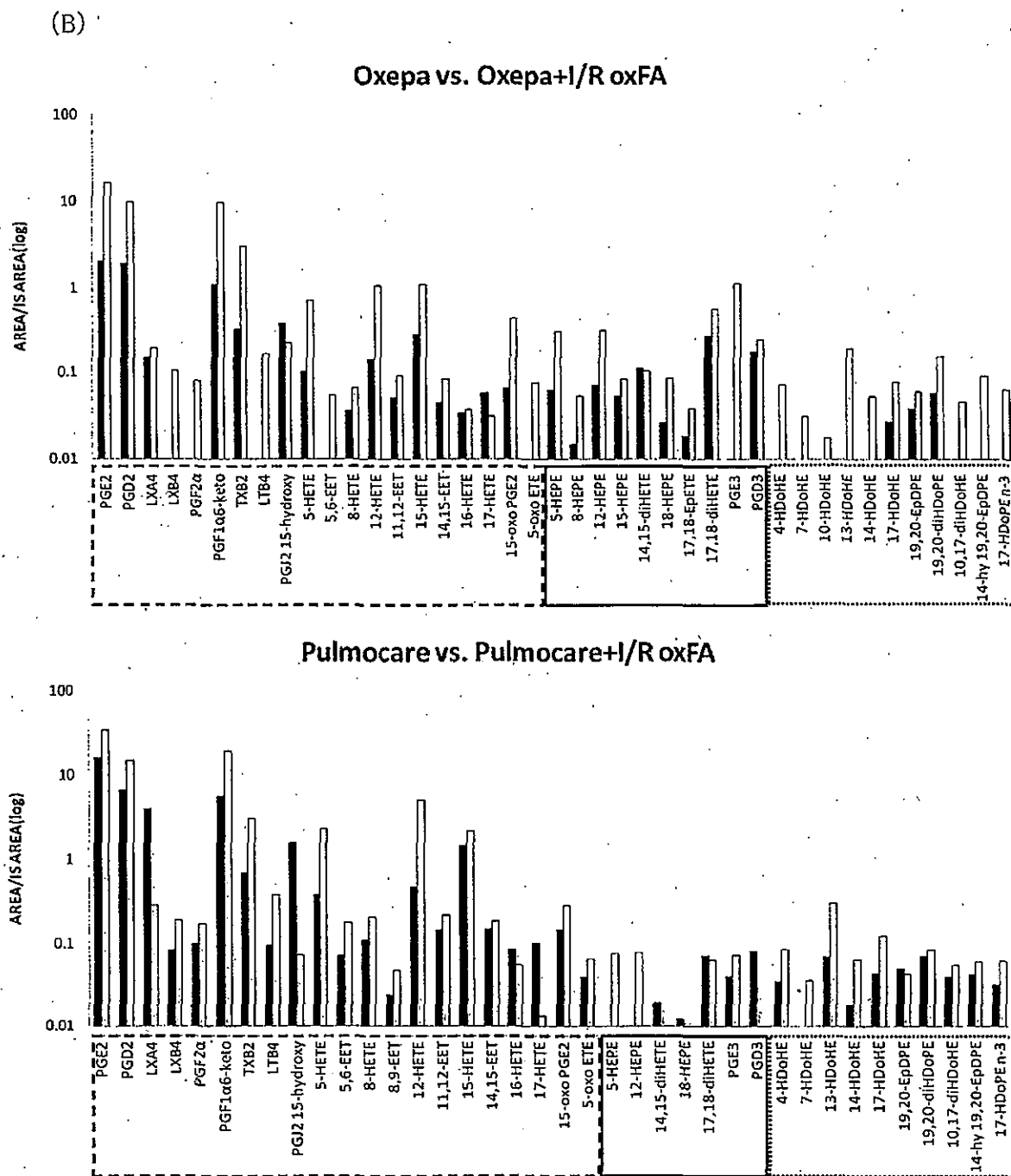


Fig. 4 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

(B) 腸管虚血再灌流処置によるラット腸管の酸化脂肪酸変動

経腸栄養剤投与処理のみを施したラットと、経腸栄養剤投与後、腸管虚血再灌流処置を施したラット腸管の酸化脂肪酸を質量分析装置により測定した。上図 Oxepa 投与、下図 Pulmocare 投与

EN (■), EN+I/R (□) それぞれ n=2, 棒グラフの立たない箇所は測定限界以下であった。

--- は AA 由来の酸化脂肪酸群, — は EPA 由来の酸化脂肪酸群, は DHA 由来の酸化脂肪酸群を示す。

(C)

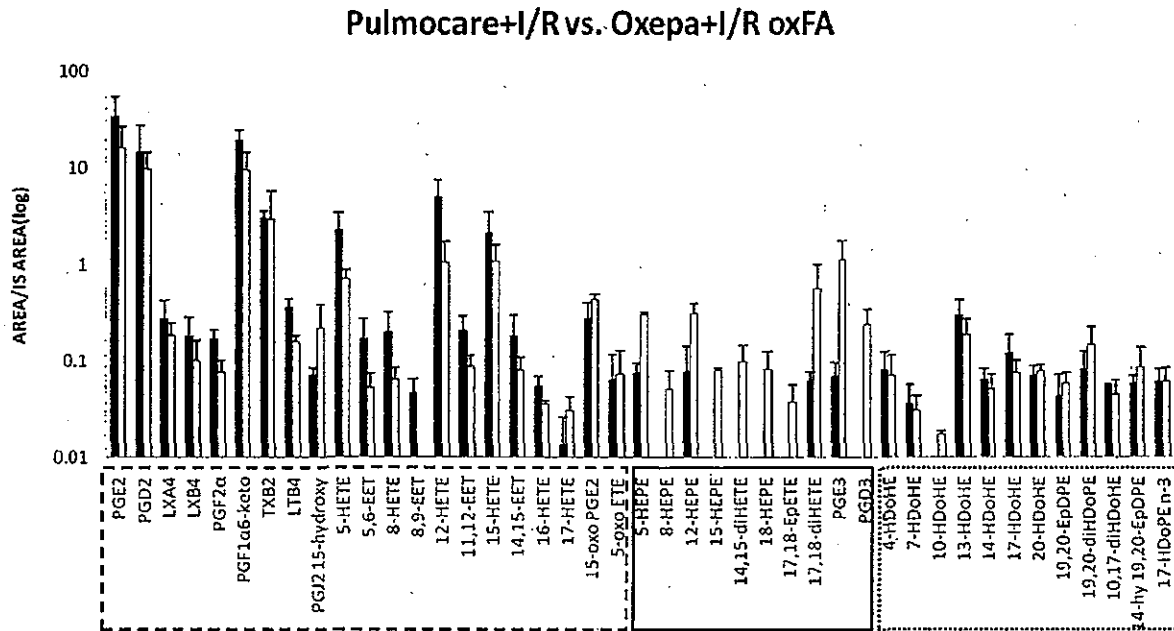


Fig. 4 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

(C) Oxepa+I/R, Pulmocare+I/R による腸管の酸化脂肪酸変動

Oxepa 投与後、もしくは Pulmocare 投与後に腸管虚血再灌流処置を施したラット腸管の酸化脂肪酸を質量分析装置により測定した。Pulmocare +I/R (■), Oxepa+I/R (□) ±S.D それぞれ n=3, 棒グラフの立たない箇所は測定限界以下であった。

--- は AA 由来の酸化脂肪酸群, — は EPA 由来の酸化脂肪酸群, は DHA 由来の酸化脂肪酸群を示す。

(D)

Pulmocare+I/R vs. Oxepa+I/R oxFA

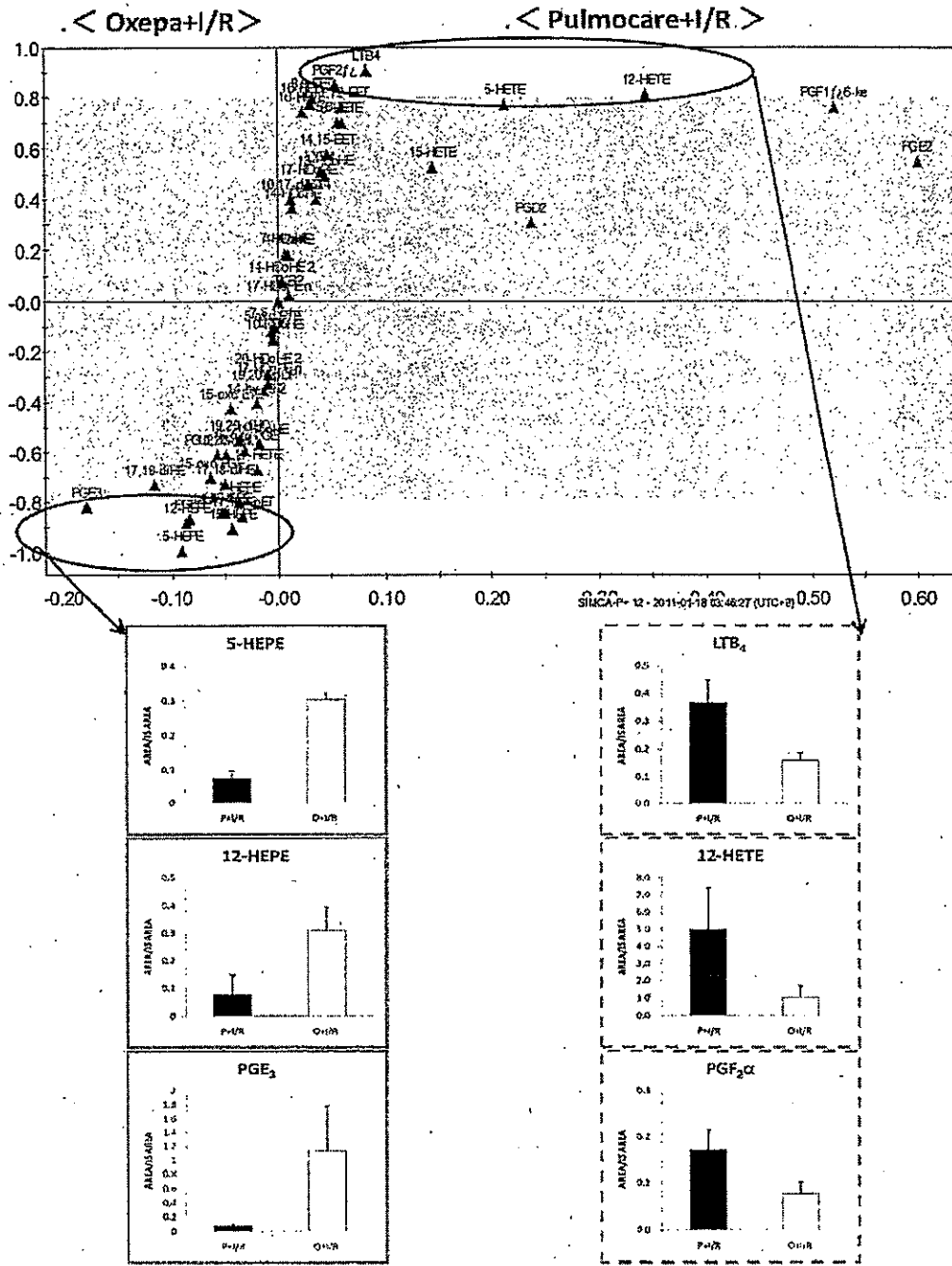


Fig. 4 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

(D) Oxepa+I/R, Pulmocare+I/R による腸管の酸化脂肪酸変動 OPLS 分析

Fig. 4 (C)のグラフで示した、Oxepa+I/R vs. Pulmocare+I/R でみられる腸管の酸化脂肪酸変動の傾向を、SIMCA P+により解析した。上図がS-plotで、y軸より左がOxepa+I/R、右がPulmocare+I/Rで変動した分子種を示す。y軸における>0.8はOPLS分析で有効な範囲。代表して、5-HEPE, 12-HEPE, PGE₂, LTB₄, 12-HETE, PGF₂αについて、グラフを示した。---はAA由来の酸化脂肪酸、—はEPA由来の酸化脂肪酸群。±S.D * p<0.05, ***p<0.005 n=3

C-4. 腸管虚血再灌流モデルラット腸管におけるサイトカイン変動

経腸栄養剤の違いによる、炎症後のサイトカイン変動を評価すべく、Oxepa、もしくはPulmocareを3日間経腸栄養投与後、炎症モデルとして腸管虚血再灌流処置を施したラットより採取された腸管について、サイトカイン抗体アレイを用いてサイトカインを測定した。

結果を Fig. 5 に示した。炎症性サイトカインである TNF α について、炎症依存的に増加する傾向が見られ、腸管虚血再灌流処置を施した

群の中でも、Pulmocare 投与群が Oxepa 投与群と比較して、高い傾向が見られた。

炎症性サイトカインである、MCP-1、IL-6、IL-1 β については、炎症依存的に上昇する傾向は見られたが、Oxepa 投与、Pulmocare 投与の間では傾向が見られなかった。

抗炎症性サイトカインである IL-10、IL-4、IL-13 については、炎症依存的に減少する傾向は見られたが、Oxepa 投与、Pulmocare 投与の間では傾向が見られなかった。

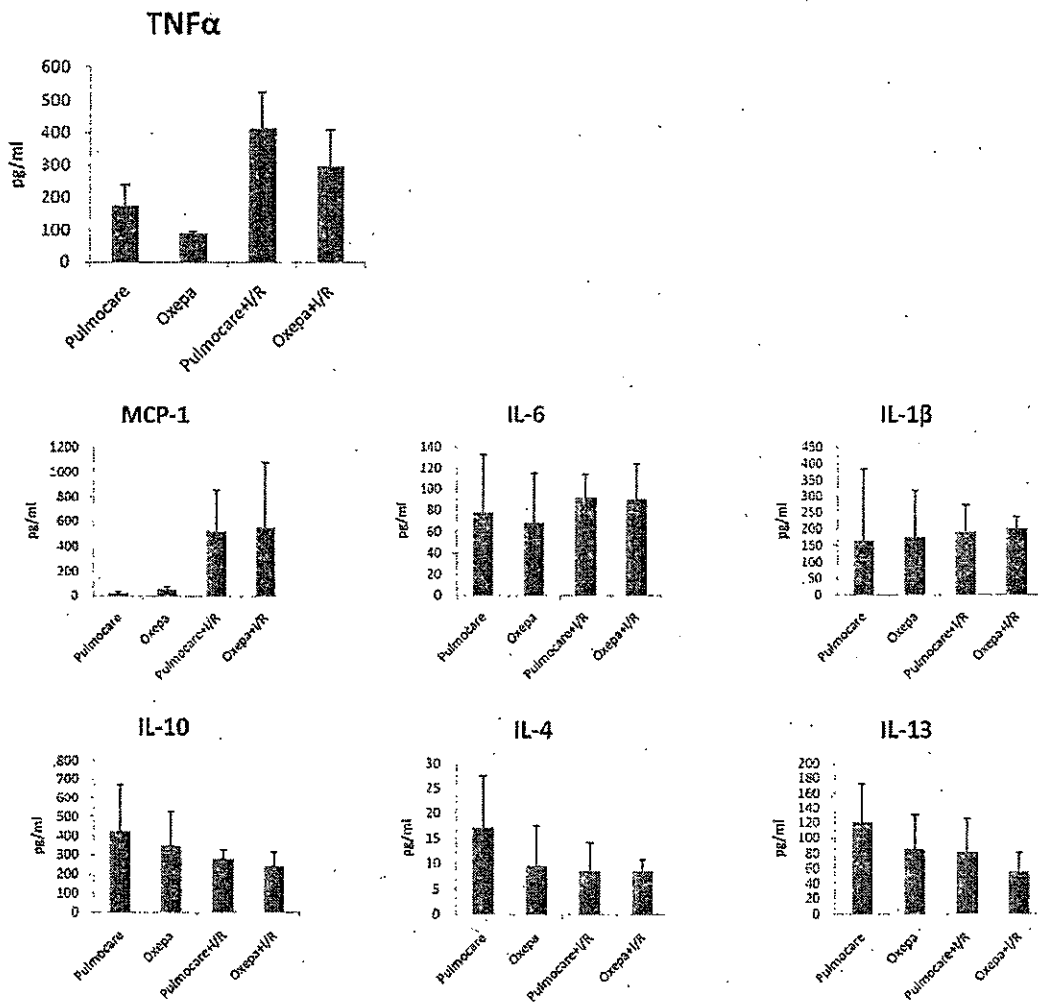


Fig. 5 腸管虚血再灌流モデルラット腸管におけるサイトカイン変動

Oxepa 投与後、もしくは Pulmocare 投与後に腸管虚血再灌流処置を施したラットサイトカインを、抗体アレイを用いて測定した。x 軸は右から Pulmocare, Oxepa, Pulmocare+I/R, Oxepa+I/R。

±S.D EN 群 n=3~4, EN+I/R 群 n=6

C-5. 腸管虚血再灌流モデルラット腸管の組織染色

経腸栄養剤の違いによる、腸管虚血再灌流炎症処理における組織損傷の度合いを評価するために、腸管の組織染色を行った。Fig. 6 (A)には代表的な組織染色の写真を示した。Fig. 6 (B)に

は、Chiu 分類を基準に損傷の程度を5段階に分類した際の平均値をグラフ化した。炎症依存的にスコアが増加し、腸管虚血再灌流処置を施した群の中でも、Pulmocare 投与群の方が Oxepa 投与群よりも炎症が増悪化していることが示された。

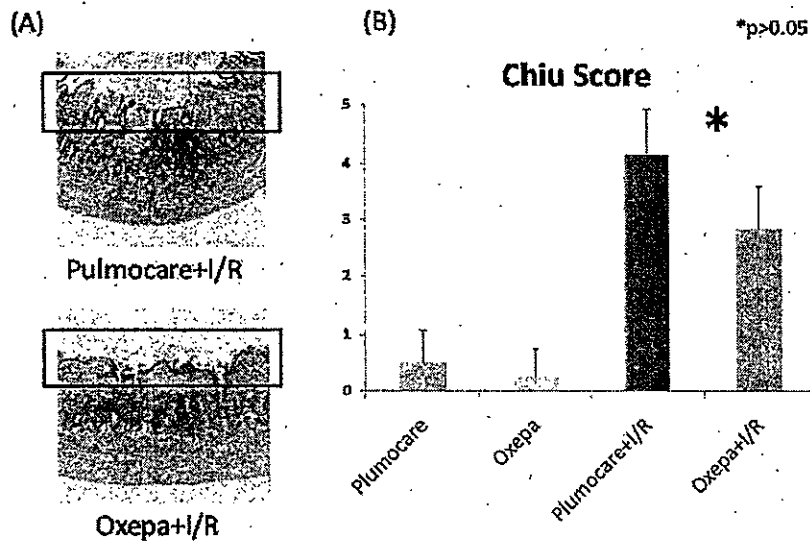


Fig. 6 腸管虚血再灌流モデルラット腸管の組織染色

(A) 組織染色写真

(B) Chiu Score の平均値 ± S.D., * $p < 0.05$, EN:n=4, EN+I/R:n=6

E. 結論

ラット血漿・血球成分・腸管・腸間膜リンパ節・肝臓・肺のどの器官・臓器においても、Oxepa 投与3日目までに総リン脂質中の EPA 含量が有意に増加した。AA・DHA に関しては横ばい、もしくは減少の傾向を示し、AA/EPA 比は血球成分・腸間膜リンパ節・肝臓・肺に関しては有意に減少、血漿・腸管に関しては減少傾向を示した。

腸管虚血再灌流炎症モデルラットの腸管以外の器官・臓器においては、炎症後の EPA 含量が Oxepa 投与群について炎症前より減少した。一方、Oxepa 投与群の腸管、Pulmocare 投与群については、EPA 含量は増加した。AA につい

ては Oxepa 投与群、Pulmocare 投与群共に EPA ほど大きな変化は見られなかった。

腸管虚血再灌流炎症モデルラット腸管の酸化脂肪酸分析により、Pulmocare 投与群に比べ Oxepa 投与群の方が AA 由来の酸化脂肪酸が減少し、EPA 由来の酸化脂肪酸が増加していることが示された。また、炎収束活性を持つレゾルビン E シリーズの前駆物質である 18-HEPE の増加も見られた。さらに、サイトカイン測定においては、TNF α について Pulmocare 投与群の方が Oxepa 投与群に比べて高い傾向が見られた。

炎症性サイトカインや myeloperoxidase 活性の結果も考慮すると、 ω 3 系列脂肪酸を強化し

た経腸栄養剤の投与は、分子レベルにおいても抗炎症作用を発揮していることが示唆された。以上の結果から、Oxepaの投与により全身的に増加したEPAは、炎症時に炎症局所に供給され、炎症を相対的に弱減する弱炎症性の物質や炎症収束を促進する物質へと変換されることが考えられる。これとは反対に、 ω 6系列のリノール酸を多く含むPulmocareを経腸栄養投与したラットでは、各種臓器においてアラキドン酸を含むリン脂質分子種が増加することが確認された。

以上のように、ラットの炎症疾患モデルでの脂質分析に、質量分析を基盤としたメタボローム解析が適用できることが明らかになった。来年度(平成23年度)は、アラキドン酸を投与した潰瘍性大腸炎モデルラットの脂質変動について、本方法を適用して詳細に解析する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- A) Hiroyasu Sato, Yoshitaka Taketomi, Yuki Isogai, Yoshimi Miki, Kei Yamamoto, Tomohiko Hosono, Satoru Arata, Yukio Ishikawa, Toshiharu Ishii, Tetsuyuki Kobayashi, Hiroki Nakanishi, Kazutaka Ikeda, Ryo Taguchi, Shuntaro Hara, Ichiro Kudo, and Makoto Murakami. Group III Secreted Phospholipase A2 Regulates Epididymal Sperm Maturation and Fertility. *J. Clin. Invest.*, 120(5): 1400-1414 (2010)
- B) Tamotsu Tsukahara, Shuwa Hanazawa, Tetsuyuki Kobayashi, and Kimiko Murakami-Murofushi. Cyclic Phosphatidic Acid Decreases Proliferation and Survival of Colon Cancer Cells through Inhibition of Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 93 (3-4): 126-133 (2010)
- C) Masako Fukushima, Emiko Takeyama, Seigo Shiga, Masao Takeuchi and Tetsuyuki Kobayashi. Dietary intake of green nut oil decreases levels of oxidative stress biomarkers. *J. Lipid Nutr.*, 19 (1): 111-119 (2010)
- D) Hiroyasu Sato, Yoshitaka Taketomi, Yuki Isogai, Seiko Masuda, Tetsuyuki Kobayashi, Kei Yamamoto, and Makoto Murakami. Group III Secreted Phospholipase A2 Transgenic Mice Spontaneously Develop Inflammation. *Biochem J.*, 421 (1): 17-27 (2009)
- E) 小林哲幸、求められる、油脂製品の安全性とリスク評価、*ファルマシア*、Vol.47, No.4, 317-321 (2011)

2. 学会発表

- A) 佐藤弘泰、磯貝有紀、武富芳隆、山本圭、石川由起雄、石井嘉晴、小林哲幸、中西広樹、池田和貴、田口良、原俊太郎、村上誠: III型分泌性ホスホリパーゼA₂の欠損はメタボリックシンドロームを改善する。第52回日本脂質生化学会(森秋旅館(群馬県渋川市))平成22年6月14, 15日
- B) 橋本由佳、河辺真由美、中西広樹、池田和貴、小林哲幸、田口良: ApoEノックアウトマウスにおける動脈硬化症の脂質メタボロミクス。第35回医用マズスペクトル学会(金城学院大学)平成22年9月9, 10日
- C) Koji Morishita, Saori Mikami, Junichi Aiboshi, Tetsuyuki Kobayashi, Yasuhiro Otomo: GROUP VIB Calcium-independent phospholipase A₂ is associated with acute lung injury after intestinal ischemia/reperfusion in mice, 69th Annual Meeting of American Association for the Surgery of Trauma in Boston at Marriott Copley Place, 2010.9.22

D) 橋本 由佳、河辺 眞由美、中西 広樹、池田 和貴、小林 哲幸、田口 良：脂質メタボロミクスによる ApoE ノックアウトマウスを用いた動脈硬化症の解明、第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会 BMB2010、神戸ポートアイランド、平成 22 年 12 月 7-10 日

E) Koji Morishita, Junichi Aiboshi, Saori Mikami, Yasuhiro Otomo, Yuri Yokoyama, Tetsuyuki Kobayashi: Group VIB PhospholipaseA₂ is Associated with Acute Lung Injury Following Trauma and Hemorrhagic Shock. The Society of Critical Care Medicine's (SCCM) 40th Critical Care Congress, San Diego, CA, USA, 2011.1.15-19.

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

「発がんプロモーション過程への影響評価」

研究分担者 永田伴子 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所副所長
研究協力者 立花滋博 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
青木聡子 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
安藤栄里子 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
立松憲次郎 岐阜薬科大学放射化学研究室 助教
大原直樹 金城学院大学薬学部 教授

研究要旨

ω -6 系多価不飽和必須脂肪酸のひとつであるアラキドン酸(AA)の発癌プロモーション効果を評価する目的でラットを用いた中期多臓器発癌試験法による発癌性評価実験を実施した。

F344 系雄ラット 100 匹を用いて多臓器に発癌イニシエーション処置を施すため、80 匹に N-diethylnitrosamine (100 mg/kg) を単回腹腔内投与し、N-methyl-N-nitrosourea (20 mg/kg) を第 1 および 2 週に 4 回腹腔内投与し、1, 2-dimethylhydrazine dihydrochloride (40 mg/kg) を第 3 および 4 週に 4 回皮下投与し、N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine を 0.05% 濃度で飲料水に混じて第 1 および第 2 週に投与、Dihydroxy-di-N-propylnitrosamine を 0.1% 濃度で飲料水に混じて第 3 および 4 週に投与した (DMBDD 処置)。20 匹は媒体対照とした。DMBDD 処置後、対照、低用量、中用量、高用量の 1 群 20 匹からなる 4 群に、AA 摂取量が 0、60、250 および 1000 mg/kg 体重となるように AA 含有油を混合した CE-2 粉末飼料を実験第 6 週から第 29 週までの 24 週間自由摂取させ、さらにイニシエーション無処置群の 20 匹には高用量群の AA 混餌飼料を自由摂取させ、投与観察を継続中である。投与期間中は全例の一般状態を毎日観察し、体重および摂餌量を定期的に測定している。

AA 投与第 10 週までの観察結果では、途中死亡例はなく、一般状態で中用量群 1 例に貧血が観察された。体重の推移では対照群との間に統計学的な有意差は観察されていないが、高用量群で低い傾向がみられている。摂餌量および体重から算出された AA 摂取量は設定した 0、60、250 および 1000 mg/kg に近い値が得られている。今後、投与 24 週間の観察終了後に全例を剖検し、全身の器官を組織学的に検索し、腫瘍性変化の発生頻度から AA の発癌促進作用の有無を評価する。

A. 研究目的

アラキドン酸(AA)は不飽和結合が4個の ω -6系不飽和脂肪酸であり、生体内ではAAは細胞膜のリン脂質に豊富に含まれ、脳、肝臓などあらゆる器官・組織に存在している。また、AAはホスホリパーゼA2によりリン脂質から遊離して、所謂アラキドン酸カスケードとよばれるシクロオキシゲナーゼ、5-リポキシゲナーゼ、P450などを介し、生理活性作用を有するプロスタグランジン、プロスタサイクリン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどの情報伝達物質に変換されることが知られる。

一方、AA摂取の安全性については、単回投与試験、反復経口投与試験結果はあるものの発癌性についての検討は*in vitro*の評価系で変異原性がないという報告があるのみで、動物を用いた発癌実験の報告はない。

そこで、AAの発癌促進効果を評価する目的でラットを用いた中期多臓器発癌試験を実施した。

B. 研究方法

6週齢のF344系雄ラット100匹を1群20匹の5群に分け、AA投与に先立ち、5種類のイニシエータを投与した。イニシエーション処置はN-diethylnitrosamine (DEN) 100 mg/kg BWを単回腹腔内投与し、N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 20 mg/kg BWを第1および2週に4回腹腔内投与し、1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH) 40 mg/kg BWを第3および4週に4回皮下投与した。また、N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)を0.05%濃度で第1および2週に、Dihydroxy-di-N-propylnitrosamine (DHPN)を0.1%濃度で第3および4週に飲水投与した(DMBDD 処置、Figure 1)。イニシエーション処置後1週間からAA投与量が0、60、250および1000 mg/kg体重となるように、AA油を0、3.2、13.4 および53.8 g/kgの濃度で混ぜた飼料を各群に24週

間自由摂取させた。また、イニシエーション処置を実施しない群を設け、同群には高用量群と同じAA油濃度 53.8 g/kgの飼料を与えた。なお、AA油は434.3 mg/gのAAを含有している。

AA投与開始後、毎日一般状態を観察し、投与第8週間まで週1回の頻度で体重を測定し、第9週以降は2週に1回の頻度で体重を測定した。また、毎週1回の頻度で摂餌量を測定した。現在、投与第10週で、24週間の投与終了後、採血して一般血液学的検査を実施、全例を剖検し、腫瘍性変化を含む全身の器官・組織をホルマリン固定後、パラフィン包埋、ヘマトキシリンエオジン染色標本を作製し、光学顕微鏡下に観察を実施する。

(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」にもとづき、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

一般状態

投与第10週までの観察期間中、250 mg/kg投与群の1例で投与第64日(投与第10週)から貧血が観察された。それ以外の動物では一般状態に著変は認められなかった。

体重 (Table 1-1~1-2; Appendix 1-1~1-5, Figure 2)

一般状態で貧血がみられた250 mg/kg投与群の1例では投与第10週に体重の減少が認められた。また、投与第10週までの期間を通して、1000 mg/kg

投与群（イニシエーション処置なし）の体重は対照群と比較して統計学的に有意な高値がみられた。なお、対照群との間に統計学的な有意差は観察されていないが、1000 mg/kg 投与群（イニシエーション処置あり）の体重は低い傾向にあった。

摂餌量 (Table 3, Appendix 3-1~3-5, Figure 3)

1000 mg/kg投与群（イニシエーション処置あり）において、対照群と比較して投与第1日の摂餌量が統計学的に有意な減少が観察されたが、それ以降の摂餌量に有意差は認められなかった。また、投与期間を通じて、1000 mg/kg投与群（イニシエーション処置なし）の摂餌量が対照群と比較して有意に高かった。

AA摂取量 (Table 4, Appendix 4-1~4-5)

各群のAA摂取量が、投与期間の早期には予定摂取量よりも多かったが、投与第10週ではほぼ予定摂取量のAAを摂取していた。

D. 考察

これまで発癌イニシエーションの評価としてAAに変異原性がないという報告があるものの、AAの発癌プロモーション作用については報告されていない。中期多臓器発癌試験法は発癌のプロモーション過程を評価する試験法で、従来一般的に実施されてきた発癌試験と比較すると、使用動物数が少なく、観察期間も24週間とこれまで要してきた104週間の観察投与期間に比較すると短い。AAが生体の細胞膜に多く存在し、全身の器官・組織に分布することを考慮すると今回用いたDMBDD法による多臓器イニシエーションは、AAの発癌促進作用を評価するうえで適切なモデルと考えられる。

E. 結論

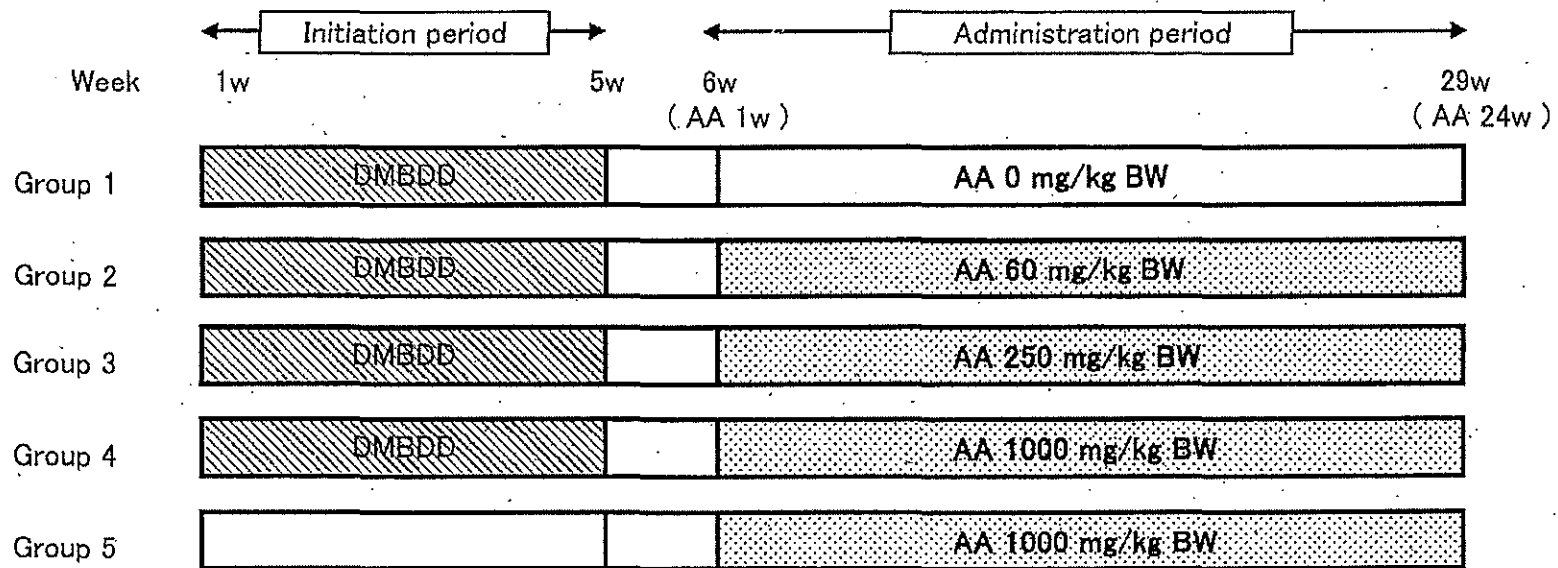
投与第10週までの観察では、死亡例はなく発癌を示唆する観察結果は得られていない。今後の各群の生存率、病理学的検査結果などを得て、AAの発癌プロモーション作用を評価する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

未発表。



DMBDD treatment

N-diethylnitrosamine (DEN) : 100 mg/kg BW, Day 1, i.p. injection

N-methyl-N-nitrosourea (MNU) : 20 mg/kg BW, Day 4, 7, 11, 14, i.p. injection

N-buthyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine(BBN) : 0.05 % in drinking water, 2 weeks

1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH) : 40 mg/kg BW, Day 18, 21, 25, 28, s.c. injection

Dihydroxy-di-N-propylnitrosamine (DHPN) : 0.1% in drinking water, 2 weeks

Figure 1 Study schedule of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

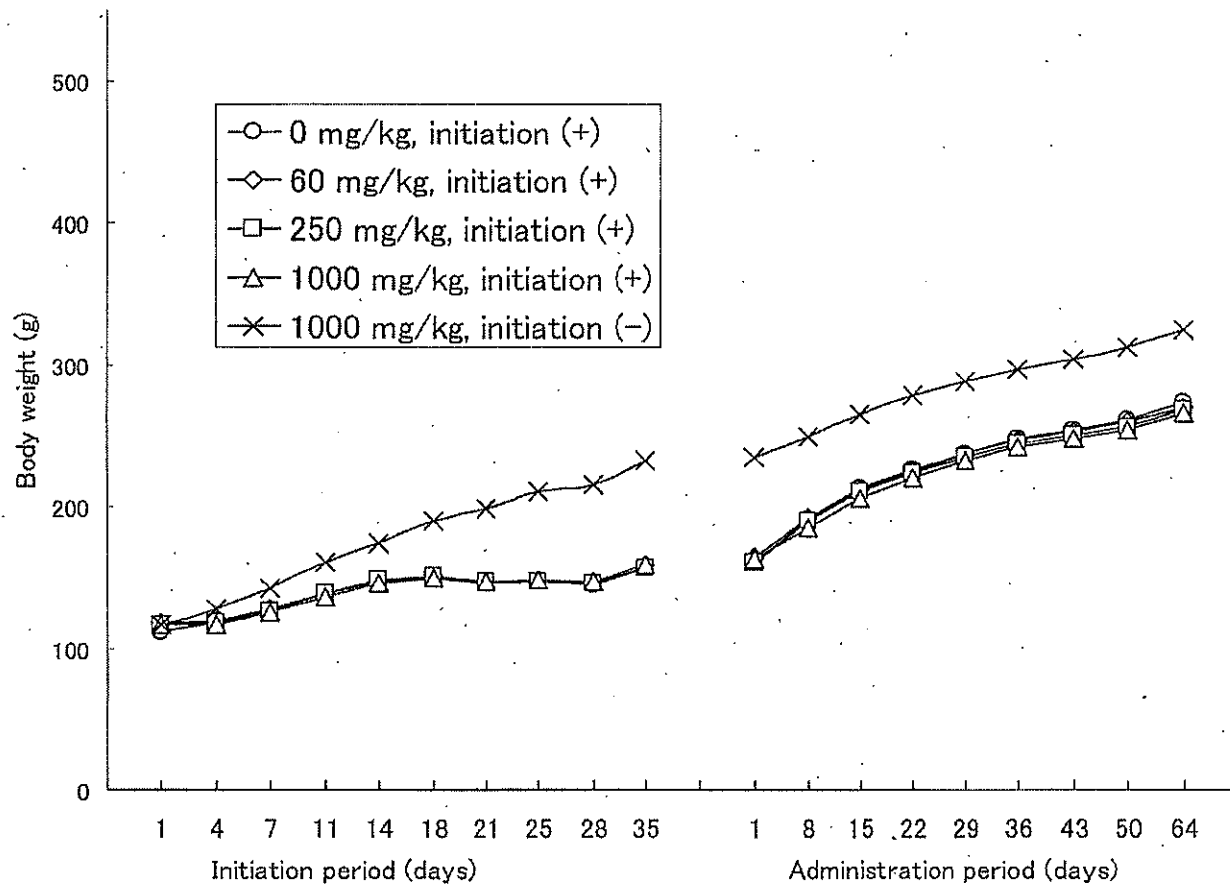


Figure 2 Body weight of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

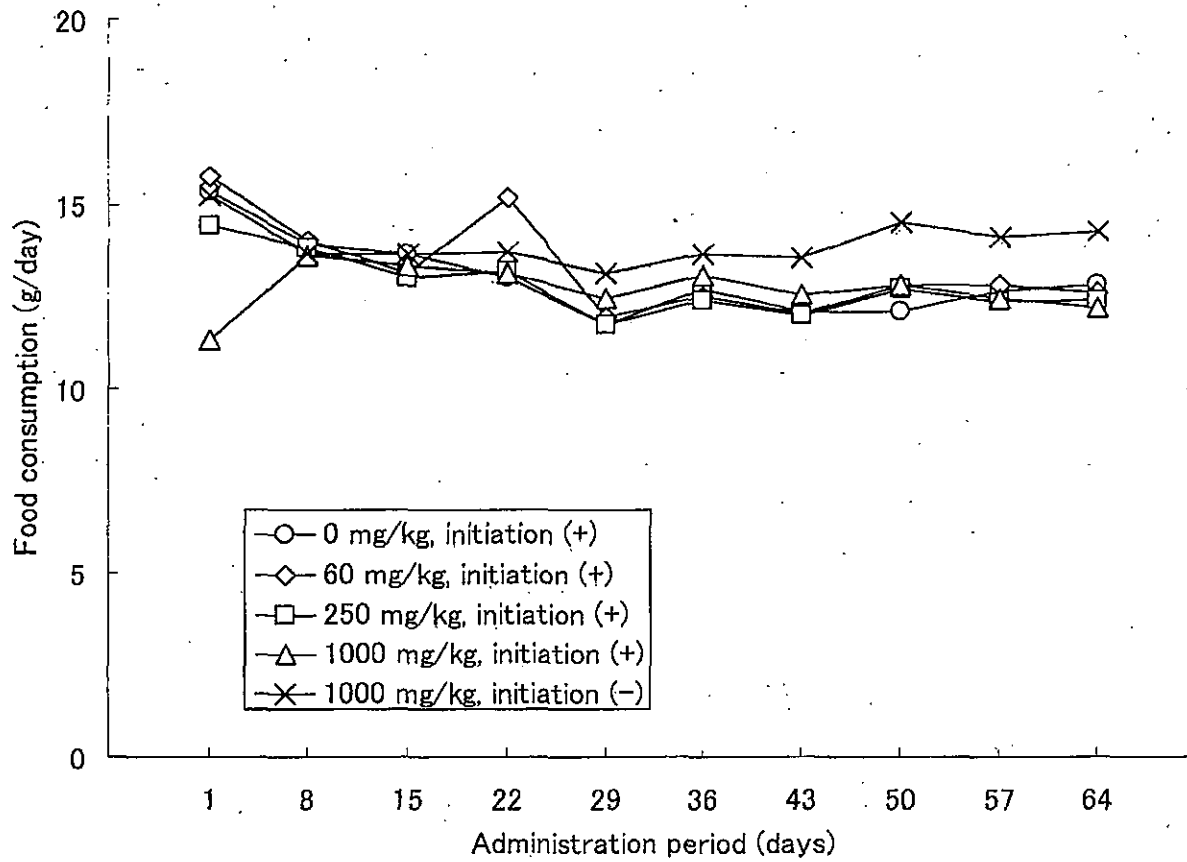


Figure 3 Food intake of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Table 1-1 Body weight (g) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose (mg/kg)	Initiation	Initiation period (days)									
		1	4	7	11	14	18	21	25	28	35
0	(+)	112.3 ±21.5 (20)	118.1 ±4.8 (20)	126.6 ±5.7 (20)	138.8 ±5.5 (20)	148.7 ±6.1 (20)	150.2 ±6.6 (20)	146.5 ±7.0 (20)	147.0 ±8.2 (20)	145.7 ±8.3 (20)	157.7 ±11.7 (20)
60	(+)	118.6 ±4.7 (20)	119.8 ±5.3 (20)	127.9 ±8.7 (20)	139.4 ±7.6 (20)	148.1 ±7.5 (20)	151.0 ±7.5 (20)	147.4 ±6.7 (20)	148.5 ±8.3 (20)	147.0 ±8.2 (20)	160.0 ±12.6 (20)
250	(+)	117.5 ±4.5 (20)	118.7 ±5.2 (20)	127.4 ±5.9 (20)	139.2 ±6.5 (20)	148.6 ±6.5 (20)	151.0 ±7.4 (20)	147.0 ±7.6 (20)	147.0 ±9.1 (20)	146.6 ±9.9 (20)	157.5 ±13.7 (20)
1000	(+)	116.5 ±5.4 (20)	117.0 ±5.7 (20)	125.6 ±6.1 (20)	137.0 ±7.1 (20)	146.9 ±7.1 (20)	150.5 ±7.3 (20)	147.1 ±8.9 (20)	148.4 ±8.9 (20)	147.7 ±9.6 (20)	159.4 ±14.6 (20)
1000	(-)	116.6 ±4.8 (20)	127.5 ** ±4.8 (20)	142.9 ** ±5.9 (20)	160.8 ** ±6.8 (20)	174.7 ** ±7.5 (20)	189.9 ** ±8.4 (20)	199.1 ** ±8.5 (20)	210.5 ** ±8.9 (20)	215.9 ** ±10.3 (20)	233.1 ** ±9.9 (20)

Mean±SD (N)

** , significant difference from the negative control, p<0.01

Table 1-2 Body weight (g) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose (mg/kg)	Initiation	Administration period (days)								
		1	8	15	22	29	36	43	50	64
0	(+)	161.2 ±12.9 (20)	191.4 ±11.9 (20)	213.3 ±10.2 (20)	227.2 ±9.5 (20)	238.2 ±10.2 (20)	248.6 ±10.0 (20)	255.1 ±10.6 (20)	262.8 ±10.9 (20)	274.6 ±12.1 (20)
60	(+)	164.1 ±12.7 (20)	192.3 ±12.0 (20)	212.7 ±10.6 (20)	225.6 ±9.5 (20)	237.4 ±9.9 (20)	247.0 ±9.9 (20)	253.8 ±10.6 (20)	260.5 ±10.7 (20)	271.1 ±10.6 (20)
250	(+)	160.7 ±14.0 (20)	189.9 ±12.2 (20)	211.2 ±12.0 (20)	224.1 ±11.8 (20)	235.5 ±11.5 (20)	245.6 ±11.7 (20)	250.8 ±12.1 (20)	257.7 ±12.0 (20)	269.0 ±14.5 (20)
1000	(+)	163.2 ±14.2 (20)	185.0 ±15.0 (20)	205.8 ±13.0 (20)	220.8 ±11.7 (20)	232.4 ±10.8 (20)	242.7 ±9.7 (20)	248.6 ±9.5 (20)	255.5 ±8.8 (20)	267.2 ±8.8 (20)
1000	(-)	234.8 ** ±10.1 (20)	249.9 ** ±11.3 (20)	266.2 ** ±12.3 (20)	278.7 ** ±12.7 (20)	288.6 ** ±13.6 (20)	297.6 ** ±12.6 (20)	304.7 ** ±12.9 (20)	313.4 ** ±12.7 (20)	325.7 ** ±12.7 (20)

Mean±SD (N)

** , significant difference from the negative control, p<0.01

Table 2 Water intake (mL/day) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose (mg/kg)	Initiation	Initiation period (days)								
		1	4	7	11	14	18	21	25	28
0	(+) .	13.6	15.1	14.7	17.7	18.4	14.6	18.8	19.6	20.6
		±6.8 (20)	±2.2 (20)	±2.6 (20)	±2.5 (20)	±2.5 (20)	±4.9 (20)	±4.8 (20)	±4.6 (20)	±4.7 (20)
60	(+) .	15.7	16.5	16.1	17.9	19.0	16.8	18.5	19.5	22.0
		±4.6 (20)	±8.0 (20)	±2.8 (20)	±2.6 (20)	±4.0 (20)	±5.6 (20)	±4.7 (20)	±4.5 (20)	±4.4 (20)
250	(+) .	14.4	13.8	15.1	18.3	19.9	16.3	20.3	21.2	20.1
		±3.6 (20)	±3.4 (20)	±2.3 (20)	±2.7 (20)	±2.5 (20)	±5.5 (20)	±4.6 (20)	±6.1 (20)	±3.4 (20)
1000	(+) .	12.0	13.4	14.2	18.3	18.6	15.7	19.2	20.3	20.9
		±5.0 (20)	±2.6 (20)	±2.8 (20)	±5.3 (20)	±2.3 (20)	±4.3 (20)	±3.7 (20)	±4.2 (20)	±3.8 (20)
1000	(-)	19.2 **	17.2 **	18.3 **	20.1 **	20.7 **	22.1 **	22.1 **	22.7	25.4 **
		±9.2 (20)	±3.1 (20)	±2.6 (20)	±2.0 (20)	±1.6 (20)	±1.4 (20)	±1.8 (20)	±2.3 (20)	±3.3 (20)

Mean±SD (N)

** , significant difference from the negative control, p<0.01

Table 3 Food intake (g/day) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose (mg/kg)	Initiation	Administration period (days)									
		1	8	15	22	29	36	43	50	57	64
0	(+) .	15.4	13.9	13.7	13.0	11.7	12.7	12.1	12.1	12.7	12.8
		±2.0 (20)	±1.3 (20)	±1.0 (20)	±1.1 (20)	±0.9 (20)	±1.2 (20)	±1.0 (20)	±0.9 (20)	±1.1 (20)	±2.8 (20)
60	(+) .	15.7	14.0	13.2	15.2	11.9	12.5	12.1	12.8	12.8	12.6
		±2.2 (20)	±1.0 (20)	±1.1 (20)	±6.1 (20)	±1.0 (20)	±0.9 (20)	±1.0 (20)	±0.9 (20)	±1.2 (20)	±0.9 (20)
250	(+) .	14.4	13.8	13.0	13.2	11.7	12.4	12.0	12.7	12.3	12.4
		±1.5 (20)	±1.2 (20)	±0.8 (20)	±1.0 (20)	±0.9 (20)	±1.0 (20)	±1.2 (20)	±1.1 (20)	±1.1 (20)	±1.0 (20)
1000	(+) .	11.3 **	13.6	13.3	13.1	12.5	13.1	12.5	12.8	12.5	12.2
		±2.1 (20)	±1.7 (20)	±1.4 (20)	±1.1 (20)	±1.2 (20)	±1.2 (20)	±1.2 (20)	±1.3 (20)	±1.2 (20)	±1.3 (20)
1000	(-)	15.3	13.6	13.7	13.7	13.1 **	13.6 *	13.6 **	14.5 **	14.1 **	14.3 **
		±1.8 (20)	±1.3 (20)	±0.9 (20)	±0.8 (20)	±1.0 (20)	±1.1 (20)	±0.7 (20)	±1.0 (20)	±1.2 (20)	±0.8 (20)

Mean±SD (N)

* , significant difference from the negative control, p<0.05

** , significant difference from the negative control, p<0.01

Table 4 Arachidonic acid intake (mg/kg/day) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose (mg/kg)	Initiation	Administration period (days)									
		1	8	15	22	29	36	43	50	64	
0	(+)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)
60	(+)	133.2	101.2	86.0	94.1	69.8	70.4	66.2	68.3	64.6	
		±15.1	±6.5	±7.1	±40.1	±4.9	±5.2	±5.9	±5.3	±4.2	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)
250	(+)	526.9	424.8	359.3	343.0	289.9	294.6	278.8	287.7	268.6	
		±75.6	±44.1	±30.6	±25.6	±24.9	±23.2	±30.3	±25.7	±19.9	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)
1000	(+)	1616.0	1717.2	1519.3	1390.9	1257.4	1258.8	1180.0	1171.9	1066.3	
		±224.0	±202.6	±167.5	±144.8	±149.2	±112.4	±115.5	±121.8	±120.5	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)
1000	(-)	1519.2	1273.3	1198.5	1147.8	1063.2	1070.2	1040.4	1081.1	1023.3	
		±159.5	±98.2	±61.7	±52.4	±69.5	±81.9	±55.0	±67.0	±62.9	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)

Mean±SD (N)

Appendix 1-1 Body weight (g) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Initiation period (days)									
			1	4	7	11	14	18	21	25	28	35
0 mg/kg	(+)	M01001	115.1	116.3	129.4	141.8	150.9	152.6	147.5	148.8	151.7	166.2
		M01002	114.8	115.0	123.9	136.6	146.5	144.8	141.0	133.3	131.9	140.2
		M01003	121.4	123.7	135.1	144.4	154.5	155.6	150.9	149.6	145.8	153.9
		M01004	118.6	122.6	131.8	144.5	156.1	156.8	149.5	153.6	154.7	171.0
		M01005	111.2	113.2	120.6	130.7	145.3	150.6	143.1	143.9	141.6	150.8
		M01006	113.9	114.8	124.2	136.9	143.9	149.9	146.1	151.9	149.1	162.7
		M01007	125.8	127.7	137.4	150.1	160.2	164.7	160.7	162.1	158.5	174.2
		M01008	111.6	110.2	118.8	128.8	137.0	136.1	132.3	134.7	132.9	140.1
		M01009	121.0	122.0	130.5	143.2	151.9	155.6	149.5	151.9	146.9	164.3
		M01010	117.5	117.7	126.6	140.0	149.5	145.3	147.5	145.9	146.1	164.5
		M01011	118.3	119.1	122.6	132.5	139.3	139.0	133.7	132.4	130.1	136.3
		M01012	117.8	123.3	130.9	141.7	151.5	152.5	147.8	145.3	143.9	156.0
		M01013	120.3	121.1	115.6	139.2	147.8	152.4	153.4	159.7	159.0	174.8
		M01014	121.7	118.7	127.4	137.3	148.2	147.1	142.3	139.3	143.4	148.6
		M01015	118.5	123.6	134.6	146.7	159.2	153.8	149.0	149.6	146.6	159.6
		M01016	114.7	117.5	125.9	136.5	149.0	152.5	150.6	153.0	150.7	166.2
		M01017	117.0	115.1	125.5	136.6	147.7	152.3	150.2	148.6	149.0	150.8
		M01018	110.3	111.5	121.4	134.9	141.8	145.9	143.4	142.7	143.8	157.7
		M01019	116.9	116.2	127.9	140.8	150.5	154.4	154.8	154.3	152.8	170.8
		M01020	111.3	112.0	121.6	132.2	143.5	142.9	136.4	139.8	135.0	144.7
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		112.3	118.1	126.6	138.8	148.7	150.2	146.5	147.0	145.7	157.7	
SD		±21.5	±4.8	±5.7	±5.5	±6.1	±6.6	±7.	±8.2	±8.3	±11.7	

Appendix 1-1 (continued) Body weight (g) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)								
			1	8	15	22	29	36	43	50	64
0 mg/kg	(+)	M01001	170.5	203.3	219.6	231.0	243.4	250.3	253.2	259.3	270.4
		M01002	138.9	172.8	201.6	214.9	228.1	238.5	246.9	256.2	271.6
		M01003	158.2	187.9	211.8	225.9	236.9	252.1	257.7	267.7	282.2
		M01004	175.1	205.1	224.9	237.2	250.9	256.3	260.7	267.0	282.3
		M01005	154.7	185.9	209.6	223.8	233.0	243.9	252.2	255.9	269.7
		M01006	167.8	195.5	220.9	237.2	250.8	262.6	269.8	280.8	292.3
		M01007	179.0	205.4	225.2	238.0	245.4	255.6	262.4	267.6	274.6
		M01008	141.0	173.2	197.4	211.7	223.2	233.2	241.6	249.7	264.1
		M01009	166.8	197.5	217.0	228.3	238.5	250.1	259.5	265.2	278.6
		M01010	170.3	198.4	216.4	231.1	241.6	249.4	256.1	263.9	273.0
		M01011	143.5	170.1	194.2	208.9	218.5	229.4	235.6	245.5	256.0
		M01012	157.3	187.6	207.9	225.2	236.0	249.4	254.1	264.9	271.1
		M01013	180.3	206.0	223.6	235.2	246.5	256.3	261.5	268.8	281.8
		M01014	149.7	183.1	205.3	217.4	226.4	238.9	245.7	256.6	268.3
		M01015	161.8	195.7	219.6	233.0	248.0	259.5	270.3	277.6	292.5
		M01016	170.5	200.1	220.0	235.7	247.0	258.7	266.1	273.3	286.4
		M01017	155.4	188.6	212.0	227.9	239.7	251.3	260.0	265.7	273.7
		M01018	161.1	191.2	211.7	225.3	233.6	241.3	244.8	253.2	263.6
		M01019	177.3	205.8	230.0	241.1	252.7	262.2	268.5	277.4	289.4
		M01020	145.5	174.5	197.4	214.8	224.4	233.9	236.0	238.7	243.8
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		161.2	191.4	213.3	227.2	238.2	248.6	255.1	262.8	274.6	
SD		±12.9	±11.9	±10.2	±9.5	±10.2	±10.1	±10.6	±10.9	±12.1	

Appendix 1-2 Body weight (g) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Initiation period (days)									
			1	4	7	11	14	18	21	25	28	35
60 mg/kg	(+)	M02021	119.4	118.5	127.5	138.1	147.2	147.2	139.9	142.7	138.7	158.7
		M02022	118.5	122.6	130.1	142.8	128.8	154.6	155.8	161.0	161.1	183.4
		M02023	118.6	117.6	101.2	131.3	142.1	142.7	137.8	137.1	134.6	139.9
		M02024	109.7	112.7	121.1	120.1	142.6	148.2	146.6	145.8	143.0	151.5
		M02025	109.8	112.3	121.2	131.5	141.1	132.8	140.5	144.8	143.5	165.4
		M02026	121.9	125.0	130.5	142.0	149.5	149.5	147.3	143.8	140.8	146.4
		M02027	123.5	123.0	133.6	145.4	151.6	153.1	149.5	146.1	144.7	159.8
		M02028	122.6	124.6	136.7	147.9	158.6	159.8	157.9	160.4	161.3	179.1
		M02029	124.9	126.3	133.2	141.9	152.1	153.0	146.8	142.8	142.3	145.4
		M02030	120.7	122.1	132.5	142.9	151.1	154.2	151.2	153.2	149.0	162.8
		M02031	117.0	119.8	128.5	139.9	149.4	152.0	146.5	159.4	157.6	174.7
		M02032	117.4	115.4	122.7	133.8	146.3	148.7	142.7	141.7	139.9	150.3
		M02033	115.5	115.5	124.8	137.4	149.0	150.6	146.5	153.3	151.1	163.5
		M02034	117.3	121.5	131.4	140.2	149.2	152.0	149.5	150.7	148.6	164.8
		M02035	109.6	106.2	114.2	127.1	134.4	134.6	131.1	130.5	134.1	138.7
		M02036	121.8	124.5	134.5	145.1	154.9	157.9	152.8	154.8	153.3	162.8
		M02037	117.0	118.1	129.4	138.7	148.2	155.8	150.1	151.2	153.8	170.3
		M02038	121.6	123.0	132.1	142.0	150.5	152.2	145.9	141.0	139.7	148.4
		M02039	121.1	122.3	134.3	147.0	155.7	157.5	150.2	151.2	148.2	163.7
		M02040	125.0	125.5	138.8	152.1	159.3	162.8	158.4	158.8	154.5	170.4
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		118.6	119.8	127.9	139.4	148.1	151.0	147.4	148.5	147.0	160.0	
SD		±4.7	±5.3	±8.7	±7.6	±7.5	±7.5	±6.7	±8.3	±8.2	±12.6	

Appendix 1-2 (continued) Body weight (g) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)								
			1	8	15	22	29	36	43	50	64
60 mg/kg	(+)	M02021	166.3	195.7	211.7	221.3	231.3	238.4	243.0	248.9	264.5
		M02022	185.3	207.2	222.7	230.9	242.8	249.4	256.4	264.4	275.0
		M02023	145.4	179.8	207.9	219.4	231.1	241.9	246.3	257.6	271.9
		M02024	154.4	181.2	206.0	218.8	228.3	240.0	243.3	250.3	261.2
		M02025	170.9	193.5	212.1	219.5	230.0	237.9	244.6	248.7	257.2
		M02026	151.4	175.5	201.2	217.4	232.0	241.4	248.1	253.1	265.6
		M02027	164.4	195.4	217.0	230.3	243.9	253.3	262.6	269.4	281.1
		M02028	184.2	209.8	227.0	238.2	251.4	258.6	263.2	270.4	280.3
		M02029	149.5	178.8	199.3	211.9	222.1	232.9	239.5	248.1	254.7
		M02030	165.8	194.8	217.2	227.2	237.7	247.9	254.3	259.7	268.5
		M02031	180.4	203.2	221.4	231.9	242.7	252.4	258.6	266.0	272.4
		M02032	154.2	179.4	202.0	219.7	230.1	240.8	248.0	255.4	269.4
		M02033	169.4	194.8	215.3	229.9	243.5	254.4	265.4	271.0	285.8
		M02034	164.0	190.5	208.6	218.2	230.0	240.2	245.8	256.6	265.3
		M02035	140.5	167.8	185.8	205.7	219.4	228.1	239.2	243.7	252.8
		M02036	164.5	201.6	221.7	236.4	248.9	261.4	267.5	271.8	280.2
		M02037	175.5	202.3	217.4	231.5	242.7	251.6	258.8	264.6	275.9
		M02038	154.5	186.2	208.1	224.5	235.2	245.8	249.1	253.6	264.5
		M02039	165.8	202.1	220.6	238.3	247.9	258.0	268.7	272.8	284.2
		M02040	176.3	206.5	230.0	241.9	256.4	265.2	274.2	284.5	290.8
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		164.1	192.3	212.7	225.6	237.4	247.0	253.8	260.5	271.1	
SD		±12.7	±12.	±10.6	±9.5	±9.9	±9.9	±10.6	±10.7	±10.6	

Appendix 1-3 Body weight (g) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Initiation period (days)									
			1	4	7	11	14	18	21	25	28	35
250 mg/kg	(+)	M03041	112.4	114.0	120.9	130.9	139.1	142.7	138.7	133.0	133.6	141.2
		M03042	125.0	124.4	132.0	141.0	149.6	153.9	150.1	148.7	150.7	162.2
		M03043	118.7	125.3	134.7	146.2	154.4	157.5	152.9	155.4	154.6	169.5
		M03044	114.1	115.5	120.7	132.0	139.8	144.3	136.9	133.1	131.2	134.5
		M03045	119.6	118.1	126.4	134.1	146.1	148.0	144.5	147.5	149.8	159.5
		M03046	122.2	120.5	128.2	140.5	151.9	157.6	155.4	159.0	159.5	179.3
		M03047	110.2	107.6	117.0	128.3	139.6	139.9	134.6	134.0	127.7	137.9
		M03048	118.7	118.3	128.4	140.1	149.9	153.9	147.1	149.2	149.2	159.1
		M03049	119.0	124.0	134.3	147.7	147.8	159.2	155.5	156.2	155.2	169.2
		M03050	121.9	122.2	134.0	145.2	155.4	152.6	145.5	145.4	143.9	150.1
		M03051	118.6	120.1	128.9	141.8	150.2	154.4	153.2	149.9	151.0	162.7
		M03052	121.6	125.1	133.3	147.4	157.5	161.5	160.4	162.7	161.9	179.5
		M03053	110.7	110.2	117.9	130.8	139.4	140.9	135.0	134.7	133.7	133.6
		M03054	114.6	119.8	131.8	143.1	153.8	155.5	149.7	147.5	150.0	162.7
		M03055	120.1	118.3	124.0	136.7	146.7	147.2	146.1	148.8	150.8	165.1
		M03056	111.7	113.3	121.0	132.6	142.2	146.7	141.4	142.2	140.9	149.5
		M03057	114.7	117.2	127.2	140.4	151.3	139.2	142.3	140.4	140.9	152.6
		M03058	124.4	126.7	137.1	151.7	162.4	165.0	158.5	161.5	160.2	172.9
		M03059	113.3	113.5	123.9	135.3	145.0	148.3	143.2	142.1	140.3	149.2
		M03060	118.2	119.6	125.9	137.4	149.5	152.3	149.8	148.6	147.8	158.7
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		117.5	118.7	127.4	139.2	148.6	151.0	147.0	146.6	146.6	157.5	
SD		±4.5	±5.2	±5.9	±6.5	±6.5	±7.4	±7.6	±9.1	±9.9	±13.7	

Appendix 1-3 (continued) Body weight (g) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)								
			1	8	15	22	29	36	43	50	64
.250 mg/kg	(+)	M03041	141.3	178.0	201.8	216.8	226.5	234.4	235.2	242.5	249.0
		M03042	169.9	196.2	218.7	227.1	238.9	249.7	253.5	262.7	278.2
		M03043	176.4	204.1	224.6	240.5	252.8	263.9	267.5	272.6	289.3
		M03044	137.6	166.7	188.6	202.7	215.6	223.1	226.6	233.2	243.5
		M03045	165.4	190.7	210.9	224.5	232.6	241.2	243.9	252.3	264.3
		M03046	181.7	203.3	221.4	234.8	242.6	250.6	257.7	263.3	274.7
		M03047	143.7	171.8	192.6	205.4	214.4	223.7	227.8	234.8	244.6
		M03048	163.3	192.3	215.9	225.4	235.7	250.1	250.9	258.5	267.9
		M03049	171.2	204.0	226.5	237.2	247.4	257.7	262.2	270.1	283.0
		M03050	150.6	181.4	209.4	222.7	239.2	252.8	260.6	265.9	279.1
		M03051	166.8	193.8	212.9	225.5	238.0	244.6	249.7	257.7	270.7
		M03052	182.3	208.3	223.1	236.3	249.3	255.7	262.1	269.5	280.4
		M03053	134.8	167.9	187.5	201.0	216.3	225.4	234.5	240.8	256.2
		M03054	168.1	195.4	214.5	221.4	233.1	242.8	247.9	254.0	264.0
		M03055	163.8	196.1	219.7	235.2	247.1	255.1	261.4	267.9	281.2
		M03056	152.8	183.6	203.8	217.9	229.0	241.5	245.7	254.4	267.0
		M03057	158.2	188.0	208.3	223.2	231.8	244.3	251.1	255.7	245.3
		M03058	172.7	201.9	226.7	239.3	250.1	259.9	266.5	273.9	285.8
		M03059	153.7	185.5	202.1	215.1	227.7	242.9	255.0	264.1	278.5
		M03060	160.1	189.4	215.9	230.6	241.7	251.6	256.3	260.1	277.2
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		160.7	189.9	211.2	224.1	235.5	245.6	250.8	257.7	269.0	
SD		±14.	±12.2	±12.	±11.8	±11.5	±11.7	±12.1	±12.	±14.5	

Appendix 1-4 Body weight (g) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Initiation period (days)									
			1	4	7	11	14	18	21	25	28	35
1000 mg/kg	(+)	M04061	123.4	123.8	132.3	143.6	153.3	159.1	156.5	161.9	164.9	180.8
		M04062	113.5	111.5	121.7	132.7	140.1	146.8	141.7	139.6	139.6	141.5
		M04063	115.3	113.4	119.1	132.3	140.7	149.0	146.0	149.2	148.2	160.8
		M04064	119.7	123.8	133.1	142.5	156.1	159.7	158.9	158.9	156.8	167.8
		M04065	115.4	113.1	121.4	132.7	143.8	146.4	140.7	136.8	137.2	145.5
		M04066	112.3	112.4	118.8	129.1	140.6	144.4	137.3	139.6	139.1	152.7
		M04067	124.0	125.5	132.5	141.9	154.8	158.0	156.9	157.1	158.5	177.7
		M04068	109.2	108.2	117.2	126.8	134.8	138.2	132.8	135.6	130.6	137.7
		M04069	115.6	116.7	127.4	140.4	150.1	154.3	150.7	152.2	152.4	160.9
		M04070	123.9	122.3	129.9	143.5	155.0	155.7	152.1	153.6	152.7	169.4
		M04071	108.9	110.9	118.9	126.7	138.5	142.0	137.8	140.5	145.2	146.1
		M04072	112.8	113.1	123.3	132.6	142.2	144.9	144.2	148.4	150.6	161.4
		M04073	124.7	128.3	138.3	152.1	160.0	164.2	163.8	165.3	164.6	195.7
		M04074	113.6	117.4	125.3	136.6	148.0	147.0	140.2	139.4	137.1	142.4
		M04075	113.5	113.8	121.5	132.4	143.7	148.2	144.5	145.0	145.7	157.6
		M04076	114.0	115.2	123.2	136.4	146.1	149.2	148.8	152.2	147.6	165.8
		M04077	120.5	116.5	125.1	134.6	144.1	145.1	137.8	141.4	138.1	151.3
		M04078	125.6	124.6	134.7	149.8	156.0	161.5	158.1	154.2	155.0	159.0
		M04079	112.4	117.1	128.3	140.6	149.4	152.8	154.5	156.0	152.1	166.6
		M04080	111.3	113.3	120.0	132.0	140.4	142.5	138.8	140.7	138.2	148.0
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20		
Mean		116.5	117.0	125.6	137.0	146.9	150.5	147.1	148.4	147.7	159.4	
SD		±5.4	±5.7	±6.1	±7.1	±7.1	±7.3	±8.9	±8.9	±9.6	±14.6	

Appendix 1-4 (continued) Body weight (g) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)								
			1	8	15	22	29	36	43	50	64
1000 mg/kg	(+)	M04061	184.1	203.6	220.3	235.1	244.6	252.2	257.8	265.7	279.4
		M04062	147.4	168.4	193.3	211.3	222.2	236.8	240.3	246.7	257.4
		M04063	166.1	183.7	206.7	225.3	238.3	253.6	258.2	262.6	267.3
		M04064	172.3	195.8	219.1	222.4	233.0	242.3	252.2	259.4	268.2
		M04065	148.9	164.4	188.0	206.5	221.8	237.2	243.4	252.4	265.7
		M04066	155.5	182.8	205.2	218.0	233.2	241.5	246.8	255.3	270.0
		M04067	180.4	204.4	218.4	233.7	245.6	255.9	260.3	268.4	280.7
		M04068	140.9	156.5	179.1	193.3	210.9	227.3	236.3	248.9	261.9
		M04069	160.9	185.4	209.0	221.3	231.9	242.0	247.5	252.4	264.0
		M04070	174.5	200.7	222.4	241.5	252.2	262.0	269.5	276.9	287.3
		M04071	155.1	178.4	199.1	216.5	226.3	236.5	243.2	249.8	265.4
		M04072	161.9	187.0	208.7	222.8	232.4	239.0	245.2	250.0	260.0
		M04073	197.4	213.4	226.4	236.7	244.8	250.4	252.7	256.1	267.6
		M04074	146.0	165.0	184.6	203.5	218.7	229.5	236.6	246.9	262.7
		M04075	163.5	183.9	206.6	224.2	235.5	244.8	251.6	260.6	272.2
		M04076	171.5	193.7	211.7	220.9	229.1	235.1	239.6	246.6	257.9
		M04077	156.0	181.6	201.6	216.8	224.3	234.7	240.9	247.7	254.8
		M04078	159.9	180.6	203.7	222.7	240.6	251.6	259.4	261.0	276.5
		M04079	171.0	197.4	215.9	229.9	242.6	251.3	255.6	260.3	269.7
		M04080	150.7	173.5	195.4	213.5	220.4	229.7	235.7	242.0	254.4
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		163.2	185.0	205.8	220.8	232.4	242.7	248.6	255.5	267.2	
SD		±14.2	±15.	±13.	±11.7	±10.8	±9.7	±9.5	±8.8	±8.8	

Appendix 1-5 Body weight (g) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Initiation period (days)									
			1	4	7	11	14	18	21	25	28	35
1000 mg/kg	(-)	M05081	114.8	129.1	147.1	165.0	181.4	195.0	204.0	214.3	220.7	235.7
		M05082	112.1	118.0	130.1	147.5	159.6	174.2	184.1	195.8	190.5	215.7
		M05083	118.6	130.4	145.2	162.4	174.7	191.6	200.4	214.1	219.8	232.7
		M05084	117.8	129.0	143.6	162.3	174.4	187.7	199.3	209.1	215.6	231.1
		M05085	112.9	125.6	138.0	154.5	165.4	178.0	185.9	196.0	202.0	219.4
		M05086	112.2	124.8	145.0	162.9	179.0	196.5	207.2	217.2	223.8	238.5
		M05087	109.3	120.8	134.1	149.7	163.6	176.7	185.2	194.2	202.9	219.7
		M05088	115.4	122.8	137.8	154.5	168.9	187.1	195.6	210.2	216.7	229.3
		M05089	114.4	127.2	142.2	160.7	175.4	190.5	197.0	209.3	217.0	236.3
		M05090	117.5	129.1	143.7	160.6	176.7	192.0	201.1	213.4	223.5	243.1
		M05091	120.6	133.4	150.9	169.5	183.9	198.7	205.1	213.2	221.6	227.0
		M05092	116.8	127.1	144.4	161.3	175.8	187.9	199.0	209.4	215.0	226.1
		M05093	120.2	128.4	144.0	158.0	170.7	186.7	192.6	204.1	209.2	226.5
		M05094	110.1	123.8	141.0	160.3	175.3	193.3	203.7	216.8	222.4	241.0
		M05095	125.6	132.4	146.8	165.2	180.0	199.4	209.4	222.8	231.4	249.3
		M05096	116.0	129.9	146.0	166.3	181.4	197.8	206.5	220.1	211.3	245.2
		M05097	122.6	134.1	152.1	171.2	185.1	199.8	210.6	220.4	227.8	242.2
		M05098	122.8	132.4	148.4	170.1	182.0	197.9	206.7	219.2	227.2	241.8
		M05099	109.4	118.2	132.3	148.9	161.7	174.2	185.3	196.1	202.5	219.2
		M05100	122.5	132.9	146.9	164.4	179.1	193.2	203.2	214.5	218.0	241.3
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		116.6	127.5 **	142.9 **	160.8 **	174.7 **	189.9 **	199.1 **	210.5 **	215.9 **	233.1 **	
SD		±4.8	±4.8	±5.9	±6.8	±7.5	±8.4	±8.5	±8.9	±10.3	±9.9	

** , significant difference from the negative control, p<0.01

Appendix 1-5 (continued) Body weight (g) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)									
			1	8	15	22	29	36	43	50	64	
1000 mg/kg	(-)	M05081	237.3	251.2	265.9	280.8	287.0	294.4	297.1	309.6	320.8	
		M05082	216.2	230.8	243.8	253.9	264.4	277.8	286.3	295.1	302.7	
		M05083	235.9	251.0	270.9	285.9	300.0	308.0	317.3	325.8	336.0	
		M05084	234.4	248.7	267.9	280.6	288.3	299.6	306.8	316.7	330.2	
		M05085	220.4	236.8	252.2	267.4	273.8	287.1	293.0	302.0	316.1	
		M05086	241.6	257.8	279.0	292.3	307.5	312.8	319.7	332.6	343.0	
		M05087	220.2	232.9	250.5	263.5	272.6	280.7	284.2	293.5	309.4	
		M05088	233.4	249.4	261.2	272.4	282.6	287.6	294.8	302.8	315.6	
		M05089	237.0	253.2	271.1	283.6	291.5	305.0	312.2	320.3	336.3	
		M05090	244.3	261.0	278.0	290.9	302.0	309.0	316.5	322.4	338.0	
		M05091	232.5	242.3	256.7	270.7	279.6	290.4	296.2	306.3	315.7	
		M05092	226.9	239.3	257.3	265.8	275.5	283.3	292.5	300.1	310.7	
		M05093	227.0	240.8	254.5	263.1	272.1	284.5	293.7	299.6	316.8	
		M05094	245.0	256.0	270.2	283.9	290.8	297.9	305.2	312.4	321.8	
		M05095	249.9	269.5	286.9	298.2	309.9	318.9	326.2	335.9	345.0	
		M05096	246.4	264.6	278.8	289.5	300.3	309.5	317.0	324.5	337.6	
		M05097	242.8	258.9	276.0	290.6	300.2	306.9	315.7	319.9	330.6	
		M05098	243.7	262.9	281.9	292.6	304.2	313.2	319.0	325.1	338.7	
		M05099	218.8	234.6	249.6	263.0	273.8	283.6	290.6	302.6	313.9	
		M05100	241.5	256.7	272.4	284.7	295.5	302.4	310.9	320.7	334.8	
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20		
Mean		234.8 **	249.9 **	266.2 **	278.7 **	288.6 **	297.6 **	304.7 **	313.4 **	325.7 **		
SD		±10.1	±11.3	±12.3	±12.7	±13.6	±12.6	±12.9	±12.7	±12.7		

** , significant difference from the negative control, p<0.01

Appendix 2-1 Water intake (mL/day) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Initiation period (days)									
			1	4	7	11	14	18	21	25	28	
0 mg/kg	(+)	M01001	12.7	14.5	14.3	19.6	17.7	4.1	16.6	21.7	22.5	
		M01002	19.8	18.3	15.6	15.4	20.2	21.7	23.6	23.5	26.9	
		M01003	12.6	14.8	13.1	16.5	20.6	12.1	23.6	23.4	31.4	
		M01004	10.4	12.7	16.0	19.0	16.6	13.6	17.1	20.5	20.8	
		M01005	11.9	15.6	16.8	18.1	17.9	11.9	14.1	16.3	14.4	
		M01006	7.7	11.7	12.1	15.6	15.5	9.9	16.5	17.1	15.1	
		M01007	36.3	16.5	16.1	21.5	16.7	15.8	19.1	21.2	25.2	
		M01008	7.6	15.9	12.5	15.5	14.9	12.5	15.3	4.2	18.1	
		M01009	13.0	15.6	16.7	15.9	16.6	19.6	16.9	22.6	18.1	
		M01010	9.5	11.6	13.1	14.2	16.0	13.5	12.4	16.0	21.2	
		M01011	14.4	12.2	14.0	19.8	18.6	14.8	20.0	22.9	20.7	
		M01012	16.5	16.4	17.8	19.1	19.0	13.6	21.6	18.1	19.2	
		M01013	12.8	13.3	12.7	16.3	16.0	14.4	13.1	16.0	17.6	
		M01014	12.3	15.9	15.0	20.3	21.2	14.9	17.4	21.7	11.3	
		M01015	18.5	20.1	8.4	22.7	21.6	28.2	34.3	22.6	27.5	
		M01016	11.5	12.6	11.3	15.6	15.2	11.8	19.2	21.0	23.0	
		M01017	15.9	15.2	16.6	19.5	24.3	19.7	21.0	17.6	19.7	
		M01018	17.6	16.5	16.1	16.7	19.6	11.6	19.5	25.2	19.9	
		M01019	1.5	14.5	15.6	13.6	18.1	13.0	16.0	22.2	17.8	
		M01020	10.3	17.3	20.1	18.7	20.7	14.5	19.6	18.9	21.2	
N		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)		
Mean		13.6	15.1	14.7	17.7	18.4	14.6	18.8	19.6	20.6		
SD		6.8	2.2	2.6	2.5	2.5	4.9	4.8	4.6	4.7		

Appendix 2-2 Water intake (mL/day) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Initiation period (days)								
			1	4	7	11	14	18	21	25	28
60 mg/kg	(+)	M02021	12.8	14.8	14.9	18.3	17.2	11.9	15.1	20.2	19.4
		M02022	11.3	9.8	13.3	17.2	34.3	13.1	17.0	20.0	27.4
		M02023	19.8	14.1	24.1	14.3	16.1	14.4	14.1	15.6	16.7
		M02024	11.5	14.2	16.2	25.2	18.1	13.1	18.4	21.3	23.0
		M02025	15.3	12.0	14.7	16.7	18.1	18.0	13.3	16.8	17.2
		M02026	18.8	12.6	15.2	17.3	19.0	20.0	21.4	23.6	25.2
		M02027	15.8	49.1	16.0	16.0	17.1	12.6	16.1	17.6	19.5
		M02028	15.2	18.7	19.0	22.3	22.0	24.0	25.7	27.4	27.8
		M02029	15.4	15.2	16.4	18.5	20.0	22.6	29.3	25.2	24.4
		M02030	10.9	15.2	14.7	15.6	17.4	16.9	16.7	17.6	22.3
		M02031	12.1	11.9	9.9	13.1	17.0	10.6	16.6	14.6	21.6
		M02032	14.0	14.1	13.6	19.9	16.4	14.1	17.3	18.4	22.7
		M02033	6.0	14.6	16.6	17.7	17.6	15.8	16.4	20.0	16.2
		M02034	14.8	16.1	16.3	19.4	19.7	34.6	23.5	22.0	33.2
		M02035	20.6	14.3	17.5	19.2	17.7	16.6	20.7	21.5	15.5
		M02036	18.5	18.2	17.7	17.2	15.3	15.7	21.1	21.0	20.8
		M02037	16.3	18.3	15.7	17.3	19.3	14.6	7.2	18.0	20.7
		M02038	23.1	16.5	16.5	17.8	19.1	12.1	19.7	5.9	19.8
		M02039	15.9	14.6	14.8	18.1	17.3	13.4	20.4	19.6	24.9
		M02040	25.8	15.3	19.8	17.4	20.5	22.2	19.5	22.8	21.2
N		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)		
Mean		15.7	16.5	16.1	17.9	19.0	16.8	18.5	19.5	22.0	
SD		4.6	8.0	2.8	2.6	4.0	5.6	4.7	4.5	4.4	

Appendix 2-3 Water intake (mL/day) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Initiation period (days)								
			1	4	7	11	14	18	21	25	28
250 mg/kg	(+)	M03041	20.2	15.3	13.6	20.5	21.8	12.1	16.9	24.8	22.9
		M03042	18.8	14.7	15.7	19.1	18.7	17.3	23.3	26.0	21.3
		M03043	12.7	14.9	16.4	18.1	22.4	14.5	15.7	16.4	20.1
		M03044	19.1	4.5	17.5	18.3	19.7	32.9	27.7	21.0	20.3
		M03045	10.5	13.5	12.6	19.1	17.8	11.6	17.4	16.9	15.4
		M03046	13.4	14.2	16.5	17.8	20.4	18.2	20.2	22.8	23.0
		M03047	12.3	16.9	16.3	21.5	20.5	22.9	17.7	17.5	16.4
		M03048	13.9	14.1	14.1	17.0	18.3	11.6	18.0	21.4	22.4
		M03049	14.5	15.3	13.8	9.6	24.9	24.8	32.7	38.4	24.6
		M03050	17.4	12.5	12.6	19.2	16.4	13.1	18.5	17.0	20.0
		M03051	14.2	4.3	16.1	19.8	20.6	13.9	24.2	24.3	25.4
		M03052	10.8	16.4	16.2	20.1	23.0	15.3	17.4	20.3	19.8
		M03053	10.6	13.0	11.7	17.2	13.3	9.5	15.6	17.9	12.9
		M03054	16.9	15.2	15.8	18.5	17.6	15.3	19.2	18.3	22.8
		M03055	21.2	14.9	14.2	20.6	21.2	16.0	19.9	18.2	18.5
		M03056	9.5	13.2	13.2	17.9	19.7	11.2	16.7	17.1	19.2
		M03057	10.9	15.1	12.9	15.8	19.4	15.1	16.2	8.8	14.7
		M03058	10.6	15.9	22.1	20.6	22.2	13.8	19.5	24.0	22.6
		M03059	13.1	16.1	14.6	15.0	19.7	15.6	23.2	30.0	22.9
		M03060	17.8	16.0	15.1	20.8	19.7	20.9	26.1	22.6	17.1
N		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)		
Mean		14.4	13.8	15.1	18.3	19.9	16.3	20.3	21.2	20.1	
SD		3.6	3.4	2.3	2.7	2.5	5.5	4.6	6.1	3.4	

Appendix 2-4 Water intake (mL/day) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Initiation period (days)								
			1	4	7	11	14	18	21	25	28
1000 mg/kg	(+)	M04061	16.0	16.0	13.4	19.2	18.1	18.0	19.6	24.2	23.4
		M04062	2.9	13.6	9.8	17.6	18.6	13.3	19.4	21.5	19.0
		M04063	6.8	9.4	12.5	16.5	19.4	13.7	17.9	17.5	21.6
		M04064	13.6	12.9	17.2	39.0	23.7	24.9	22.8	25.7	25.2
		M04065	11.3	13.5	14.2	17.5	16.8	12.4	20.2	17.0	18.4
		M04066	9.4	9.9	10.8	16.4	17.1	10.1	14.6	19.8	20.6
		M04067	22.6	16.3	16.0	19.7	18.4	24.6	21.4	23.9	25.3
		M04068	8.6	13.1	15.0	15.7	19.2	14.7	16.8	14.9	20.7
		M04069	20.2	17.5	17.9	19.6	21.9	21.5	26.9	29.7	24.3
		M04070	14.0	16.4	17.3	13.8	16.9	12.8	14.1	19.1	21.8
		M04071	8.9	9.1	9.6	14.9	15.0	13.9	18.8	18.5	17.2
		M04072	8.9	12.9	13.1	16.2	16.5	10.4	17.7	18.7	20.9
		M04073	10.6	14.5	15.0	14.2	21.3	12.8	18.0	21.5	25.0
		M04074	7.5	13.4	15.6	17.4	17.7	12.8	16.5	14.5	15.7
		M04075	9.6	11.0	10.1	15.9	18.7	17.7	17.3	17.9	18.7
		M04076	10.0	10.8	14.7	17.0	15.7	16.5	18.9	28.2	30.1
		M04077	19.6	13.7	13.2	15.9	20.5	11.4	15.1	16.5	17.2
		M04078	9.3	14.4	15.1	18.0	18.3	14.9	28.8	20.8	14.6
		M04079	17.4	17.7	19.8	21.8	21.7	18.0	21.0	19.1	18.3
		M04080	12.8	11.9	13.3	18.8	16.8	19.7	18.8	16.2	19.3
N		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	
Mean		12.0	13.4	14.2	18.3	18.6	15.7	19.2	20.3	20.9	
SD		5.0	2.6	2.8	5.3	2.3	4.3	3.7	4.2	3.8	

Appendix 2-5 Water intake (mL/day) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Initiation period (days)								
			1	4	7	11	14	18	21	25	28
1000 mg/kg	(-)	M05081	18.1	20.3	18.6	21.2	20.5	21.8	22.3	24.1	26.7
		M05082	19.4	16.3	16.3	18.4	21.2	20.5	20.4	20.7	30.3
		M05083	17.4	16.8	16.4	15.1	20.0	20.9	22.3	23.6	23.8
		M05084	20.4	19.7	20.3	20.0	20.4	23.9	22.9	27.1	25.0
		M05085	1.3	16.5	16.9	19.7	20.2	22.0	21.4	19.0	22.6
		M05086	20.1	18.7	19.3	20.2	21.2	24.8	25.2	25.5	25.8
		M05087	19.0	16.6	16.4	19.6	18.9	20.3	17.9	19.6	22.0
		M05088	17.3	16.8	17.3	18.9	17.6	22.4	22.2	23.7	25.0
		M05089	18.0	17.1	18.4	21.5	23.8	20.6	23.3	22.8	22.6
		M05090	10.9	5.5	15.7	22.6	20.5	22.3	22.4	26.4	24.2
		M05091	19.1	19.4	20.1	21.8	21.1	21.4	22.1	24.9	25.3
		M05092	19.7	19.8	19.6	20.2	19.7	21.8	20.8	21.0	23.2
		M05093	18.7	18.1	19.4	22.1	20.8	22.6	23.2	20.9	24.6
		M05094	15.5	16.4	19.0	21.9	18.2	23.7	25.1	23.8	27.7
		M05095	16.2	18.9	20.0	22.2	23.7	21.0	23.6	20.1	27.4
		M05096	21.1	17.8	20.0	22.0	23.7	24.1	22.7	24.5	35.3
		M05097	18.7	16.7	20.4	16.4	20.4	21.5	19.6	21.3	20.4
		M05098	18.6	18.8	19.8	19.6	20.7	23.1	22.4	22.4	24.5
		M05099	53.5	15.7	22.3	18.7	20.5	20.0	19.0	23.2	23.1
		M05100	20.3	17.7	10.3	20.5	21.3	22.5	22.5	20.0	28.6
N		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	
Mean		19.2 **	17.2 **	18.3 **	20.1 **	20.7 **	22.1 **	22.1 **	22.7	25.4 **	
SD		9.2	3.1	2.6	2.0	1.6	1.4	1.8	2.3	3.3	

** , significant difference from the negative control, p<0.01

Appendix 3-1 Food intake (g/day) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)									
			1	8	15	22	29	36	43	50	57	64
0 mg/kg	(+)	M01001	17.1	13.7	13.3	14.1	11.3	12.5	11.7	12.2	12.9	11.7
		M01002	13.4	11.1	12.5	13.3	12.0	13.7	11.5	13.8	13.6	13.5
		M01003	13.3	13.6	14.0	12.9	11.7	11.6	11.1	11.4	13.5	11.6
		M01004	18.4	15.1	14.2	14.6	11.2	12.7	12.3	12.7	12.4	12.9
		M01005	15.7	14.0	13.6	12.3	12.9	13.3	11.5	12.9	13.6	12.0
		M01006	16.5	16.4	13.0	15.2	14.2	14.3	14.2	13.1	14.5	12.1
		M01007	15.0	13.4	13.6	12.8	12.1	13.1	11.4	12.1	11.0	24.1
		M01008	13.2	13.2	11.7	10.8	12.0	13.2	11.7	13.2	12.6	12.1
		M01009	19.5	14.8	14.0	12.7	11.3	11.4	12.0	11.8	12.4	12.0
		M01010	16.0	14.1	14.3	13.0	11.2	12.2	12.3	12.8	12.1	10.8
		M01011	13.1	13.1	11.8	12.4	10.5	13.4	12.8	10.6	11.5	12.1
		M01012	14.5	14.1	14.4	13.5	11.8	12.1	13.3	12.6	13.4	12.6
		M01013	18.2	14.8	14.3	12.8	10.2	12.1	12.4	11.3	13.3	12.8
		M01014	12.9	12.5	13.2	13.3	11.4	11.7	11.4	11.7	11.1	11.2
		M01015	14.5	14.3	14.5	14.6	12.5	16.0	13.7	12.6	14.4	12.6
		M01016	16.1	16.0	14.2	12.6	12.2	12.6	11.3	10.8	13.0	12.3
		M01017	14.9	13.4	15.7	13.4	10.5	12.0	10.9	11.5	12.4	13.3
		M01018	16.4	13.2	14.1	10.9	11.1	11.1	12.6	11.6	11.8	11.5
		M01019	16.4	15.1	13.9	13.5	12.6	13.7	13.3	12.0	13.1	13.8
		M01020	12.1	11.7	12.9	12.2	11.6	11.9	10.9	11.2	10.9	11.5
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		15.4	13.9	13.7	13.0	11.7	12.7	12.1	12.1	12.7	12.8	
SD		2.0	1.3	1.0	1.1	0.9	1.2	1.0	0.9	1.1	2.8	

Appendix 3-2 Food intake (g/day) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)									
			1	8	15	22	29	36	43	50	57	64
60 mg/kg	(+)	M02021	15.6	13.1	13.1	12.5	11.1	12.8	11.1	14.0	12.4	11.8
		M02022	16.3	14.3	12.8	13.0	12.0	11.7	11.3	12.0	12.9	12.7
		M02023	15.3	15.4	13.9	16.5	12.2	12.5	14.2	13.3	13.2	14.2
		M02024	11.5	13.4	11.4	14.1	12.8	13.1	12.9	14.1	11.9	12.3
		M02025	15.0	13.0	11.9	22.6	10.4	10.5	11.4	10.9	10.9	11.0
		M02026	11.5	13.5	12.7	39.2	10.4	13.0	13.0	13.1	13.1	13.3
		M02027	17.2	14.6	13.8	14.3	12.4	12.3	12.2	13.8	14.3	13.5
		M02028	18.9	15.6	13.9	15.3	12.1	11.9	12.3	12.9	14.1	14.1
		M02029	14.4	13.0	11.5	13.0	12.8	12.3	10.9	11.5	12.6	11.9
		M02030	20.4	14.6	12.9	11.9	12.7	11.8	12.8	13.2	13.4	12.7
		M02031	17.7	16.0	13.3	12.1	12.1	12.2	11.6	12.2	11.2	11.4
		M02032	13.9	13.6	13.7	12.9	10.5	12.5	10.3	12.3	11.5	11.7
		M02033	15.6	13.0	13.1	13.3	11.5	13.2	12.1	13.5	14.5	13.5
		M02034	18.0	13.9	13.1	12.1	11.3	10.7	12.5	11.7	12.4	12.2
		M02035	12.8	12.7	12.2	12.4	10.8	12.9	11.7	13.1	10.8	11.2
		M02036	16.4	14.3	13.4	14.1	13.7	13.1	11.8	11.8	13.7	12.3
		M02037	16.7	13.8	12.6	11.7	12.2	12.5	13.9	12.6	13.6	13.6
		M02038	15.7	13.1	15.8	15.8	12.2	14.0	11.9	13.4	13.7	13.5
		M02039	16.6	14.8	15.0	14.2	11.9	13.8	11.3	13.1	14.1	12.5
		M02040	16.3	14.0	12.9	12.9	13.4	13.3	12.1	13.4	11.8	12.4
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		15.7	14.0	13.2	15.2	11.9	12.5	12.1	12.8	12.8	12.6	
SD		2.2	1.0	1.1	6.1	1.0	0.9	1.0	0.9	1.2	0.9	

Appendix 3-3 Food intake (g/day) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)									
			1	8	15	22	29	36	43	50	57	64
250 mg/kg	(+)	M03041	13.0	13.2	13.1	12.3	11.4	11.7	10.2	11.5	10.8	12.1
		M03042	13.7	13.3	11.1	12.0	12.6	12.3	12.9	12.8	12.7	12.3
		M03043	16.5	14.7	13.5	13.2	11.5	12.2	12.5	14.0	14.2	13.3
		M03044	14.1	12.7	13.3	13.9	10.1	10.6	10.6	11.8	12.5	11.1
		M03045	15.8	13.5	13.2	13.2	11.0	12.3	13.1	12.0	12.1	11.7
		M03046	14.1	14.4	12.9	12.0	12.7	11.6	11.1	13.3	12.2	11.8
		M03047	11.7	10.8	12.3	11.5	12.4	11.3	13.3	12.0	11.5	12.2
		M03048	15.7	13.5	13.3	12.8	10.8	12.4	10.3	11.9	13.4	11.4
		M03049	14.4	14.8	12.8	14.5	12.4	13.0	11.8	11.9	13.3	13.9
		M03050	12.9	14.4	12.1	12.1	12.9	12.9	12.4	13.7	12.3	14.0
		M03051	13.3	13.4	12.3	11.6	10.8	10.9	13.5	13.3	12.6	11.1
		M03052	16.3	13.3	13.6	13.7	12.1	13.4	11.3	13.3	12.7	13.7
		M03053	12.5	13.5	12.4	14.3	12.0	13.7	11.2	12.8	13.1	12.7
		M03054	14.8	14.6	12.0	12.8	11.2	11.7	11.0	11.6	11.6	12.4
		M03055	16.4	13.3	13.5	14.6	10.9	12.9	12.0	11.9	11.3	12.2
		M03056	15.7	12.6	13.8	14.1	10.8	12.6	12.9	12.2	12.3	11.1
		M03057	16.5	16.2	14.2	12.9	12.7	12.0	11.5	11.2	9.2	12.5
		M03058	14.4	14.6	12.8	14.4	13.4	14.2	13.4	13.9	14.0	14.0
		M03059	14.3	14.0	13.5	14.0	11.2	14.0	14.4	15.3	12.9	11.2
		M03060	12.6	15.4	14.3	14.0	11.3	12.6	10.5	14.0	12.1	13.4
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		14.4	13.8	13.0	13.2	11.7	12.4	12.0	12.7	12.3	12.4	
SD		1.5	1.2	0.8	1.0	0.9	1.0	1.2	1.1	1.1	1.0	

Appendix 3-4 Food intake (g/day) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)									
			1	8	15	22	29	36	43	50	57	64
1000 mg/kg	(+)	M04061	11.0	12.9	10.7	11.8	10.1	13.0	10.9	12.6	11.5	11.8
		M04062	10.0	14.3	13.2	13.4	12.0	11.6	13.1	12.0	11.0	12.8
		M04063	13.9	14.0	13.2	14.4	14.3	14.5	13.0	14.7	13.2	7.7
		M04064	11.1	14.6	13.2	13.1	12.5	13.2	13.6	13.6	14.0	13.1
		M04065	7.1	11.6	10.7	12.9	13.0	14.7	13.1	12.7	12.1	12.1
		M04066	11.3	15.5	15.9	13.9	13.4	13.0	12.6	10.8	14.4	13.4
		M04067	14.7	15.4	15.0	13.5	11.8	13.4	12.9	14.0	13.7	13.6
		M04068	7.9	9.0	12.2	13.3	13.3	12.1	13.0	12.5	12.3	12.9
		M04069	12.3	13.9	13.0	12.5	12.4	11.0	10.4	12.0	10.9	11.9
		M04070	11.8	14.8	14.7	13.6	13.9	13.5	11.6	12.8	11.7	11.0
		M04071	12.1	12.5	13.3	11.5	13.7	12.9	12.4	12.9	11.2	13.0
		M04072	11.4	13.6	11.9	11.9	10.3	12.4	11.8	12.7	11.5	11.3
		M04073	14.8	13.4	12.3	12.4	11.3	13.2	10.1	11.1	11.1	10.9
		M04074	10.3	13.0	13.8	14.9	14.2	14.9	12.4	14.3	13.3	12.9
		M04075	12.4	15.1	13.8	14.1	12.2	12.8	14.0	11.9	12.2	12.4
		M04076	12.4	12.9	13.1	13.5	11.9	11.6	12.4	11.9	11.6	11.9
		M04077	11.5	10.9	13.9	12.8	12.8	12.0	12.4	13.0	14.7	12.6
		M04078	10.3	16.2	15.2	15.0	12.9	15.4	14.4	14.8	14.0	13.1
		M04079	12.8	13.9	14.2	12.0	10.9	12.6	14.2	10.9	12.7	13.6
		M04080	7.7	14.1	13.6	11.6	12.5	13.6	12.6	14.9	12.1	11.7
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		11.3 **	13.6	13.3	13.1	12.5	13.1	12.5	12.8	12.5	12.2	
SD		2.1	1.7	1.4	1.1	1.2	1.2	1.2	1.3	1.2	1.3	

** , significant difference from the negative control, p<0.01

Appendix 3-5 Food intake (g/day) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)									
			1	8	15	22	29	36	43	50	57	64
1000 mg/kg	(-)	M05081	14.6	14.5	13.9	13.2	12.5	12.6	13.1	12.8	14.6	14.7
		M05082	14.4	11.0	12.3	12.2	12.9	11.8	13.4	14.1	14.7	14.2
		M05083	12.6	14.2	14.1	14.6	13.3	14.0	13.7	14.8	13.1	14.4
		M05084	13.1	14.0	12.7	13.5	11.6	15.0	14.1	14.5	14.7	15.4
		M05085	14.8	12.8	13.6	12.7	12.0	13.0	14.1	13.3	14.3	14.4
		M05086	16.5	13.9	15.6	14.9	13.4	15.3	14.2	16.0	15.1	14.6
		M05087	14.9	12.6	12.8	13.8	12.5	11.3	13.2	14.0	13.5	13.6
		M05088	13.8	11.7	13.4	13.2	12.2	14.0	12.4	14.7	12.2	13.5
		M05089	17.9	14.4	13.8	14.6	13.6	13.1	13.4	13.2	13.8	13.4
		M05090	15.0	13.9	15.0	13.4	14.3	14.8	14.7	15.9	15.5	13.7
		M05091	13.1	12.8	13.7	13.7	12.2	13.4	14.5	14.9	13.3	14.7
		M05092	14.8	11.8	12.7	13.8	13.5	15.8	12.7	15.3	14.8	15.5
		M05093	15.4	13.9	12.6	12.3	12.7	12.8	13.3	14.1	13.6	13.0
		M05094	13.4	14.0	12.7	13.9	13.7	14.2	12.9	13.9	11.8	14.5
		M05095	18.1	14.5	14.7	13.2	13.4	13.1	14.1	15.3	14.6	14.4
		M05096	18.2	13.0	15.1	15.0	14.8	13.9	14.3	14.3	14.6	15.2
		M05097	15.9	14.0	12.9	13.8	13.0	14.1	12.6	15.2	13.1	13.3
		M05098	15.3	15.9	13.7	13.1	15.6	13.6	13.2	13.9	16.5	14.5
M05099	15.2	13.3	13.7	14.0	13.3	12.8	13.7	13.4	12.7	12.9		
M05100	18.4	16.5	14.2	14.8	12.1	14.1	13.6	16.4	15.5	15.2		
N		23	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		15.2	13.6	13.7	13.7	13.1 **	13.6 *	13.6 **	14.5 **	14.1 **	14.3	
SD		1.8	1.3	0.9	0.8	1.0	1.1	0.7	1.0	1.2	0.8	

* , significant difference from the negative control, p<0.05

** , significant difference from the negative control, p<0.01

Appendix 4-1 Arachidonic acid intake (mg/kg/day) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)									
			1	8	15	22	29	36	43	50	64	
0 mg/kg	(+)	M01001	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01002	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01003	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01004	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01005	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01006	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01007	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01008	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01009	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01010	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01011	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01012	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01013	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01014	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01015	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01016	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01017	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01018	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01019	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		M01020	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
SD		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

Appendix 4-2 Arachidonic acid intake (mg/kg) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)								
			1	8	15	22	29	36	43	50	64
60 mg/kg	(+)	M02021	130.4	93.0	86.0	78.5	66.7	74.6	63.5	78.2	62.0
		M02022	122.3	95.9	79.9	78.2	68.7	65.2	61.2	63.1	64.2
		M02023	146.2	119.0	92.9	104.5	73.4	71.8	80.1	71.8	72.6
		M02024	103.5	102.8	76.9	89.6	77.9	75.9	73.7	78.3	65.4
		M02025	122.0	93.4	78.0	143.1	62.8	61.3	64.8	60.9	59.4
		M02026	105.6	106.9	87.7	250.6	62.3	74.8	72.8	71.9	69.6
		M02027	145.4	103.8	88.4	86.3	70.7	67.5	64.6	71.2	66.7
		M02028	135.8	103.3	85.1	89.3	66.9	64.0	64.9	66.3	69.9
		M02029	133.9	101.0	80.2	85.3	80.1	73.4	63.3	64.4	64.9
		M02030	171.0	104.2	82.5	72.8	74.3	66.2	70.0	70.6	65.7
		M02031	136.4	109.4	83.5	72.5	69.3	67.2	62.3	63.7	58.2
		M02032	125.3	105.4	94.3	81.6	63.4	72.1	57.7	66.9	60.4
		M02033	128.0	92.7	84.6	80.4	65.6	72.1	63.4	69.2	65.6
		M02034	152.5	101.4	87.3	77.1	68.3	61.9	70.7	63.4	63.9
		M02035	126.6	105.2	91.3	83.8	68.4	78.6	68.0	74.7	61.6
		M02036	138.6	98.6	84.0	82.9	76.5	69.6	61.3	60.3	61.0
		M02037	132.2	94.8	80.5	70.2	69.9	69.0	74.6	66.2	68.5
		M02038	141.2	97.8	105.5	97.8	72.1	79.2	66.4	73.4	70.9
		M02039	139.1	101.8	94.5	82.8	66.7	74.3	58.4	66.7	61.1
		M02040	128.5	94.2	77.9	74.1	72.6	69.7	61.3	65.5	59.3
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		133.2	101.2	86.0	94.1	69.8	70.4	66.2	68.3	64.6	
SD		15.1	6.5	7.1	40.1	4.9	5.2	5.9	5.3	4.2	

Appendix 4-3 Arachidonic acid intake (mg/kg) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)								
			1	8	15	22	29	36	43	50	64
250 mg/kg	(+)	M03041	478.2	408.6	366.0	320.7	286.2	278.7	236.4	261.7	282.8
		M03042	469.3	394.5	295.4	307.5	306.9	286.7	296.1	283.6	257.3
		M03043	599.8	451.7	363.9	333.1	276.9	282.2	283.8	313.2	267.5
		M03044	502.5	384.3	358.5	358.9	249.4	246.7	245.9	265.7	265.3
		M03045	639.9	457.3	398.9	374.0	298.6	320.0	334.7	297.4	257.6
		M03046	608.7	499.1	400.4	347.4	341.7	299.5	275.5	321.4	250.0
		M03047	405.1	321.7	333.7	302.3	309.6	270.8	312.2	274.9	290.3
		M03048	547.8	405.4	363.6	330.3	264.1	295.0	240.1	268.7	247.6
		M03049	485.2	426.6	328.6	352.6	288.5	291.1	257.7	252.8	285.8
		M03050	488.4	451.8	348.4	327.4	329.7	309.1	283.0	301.9	291.9
		M03051	468.0	408.9	339.4	300.7	270.2	263.0	322.1	306.8	238.6
		M03052	689.4	464.3	419.7	393.3	326.6	349.5	290.2	331.9	284.3
		M03053	444.1	400.6	328.5	353.8	282.6	312.5	249.3	278.1	288.5
		M03054	609.6	477.3	346.1	343.6	287.8	290.5	272.2	278.4	273.3
		M03055	525.3	380.7	354.9	361.9	261.5	299.6	271.0	263.0	252.5
		M03056	598.0	399.4	394.1	376.6	274.5	303.6	305.5	279.1	241.9
		M03057	560.9	462.1	364.9	316.5	298.7	271.0	255.2	241.3	296.6
		M03058	475.1	416.3	331.7	348.5	308.5	313.1	291.5	296.7	285.1
		M03059	456.5	391.1	352.2	344.8	261.5	318.6	319.7	330.4	234.0
		M03060	486.9	494.1	397.4	365.8	274.9	290.1	234.5	306.4	281.3
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		526.9	424.8	359.3	343.0	289.9	294.6	278.8	287.7	268.6	
SD		75.6	44.1	30.6	25.6	24.9	23.2	30.3	25.7	19.9	

Appendix 4-4 Arachidonic acid intake (mg/kg) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)								
			1	8	15	22	29	36	43	50	64
1000 mg/kg	(+)	M04061	1395.5	1479.8	1134.4	1172.3	964.4	1203.9	987.5	1107.6	986.4
		M04062	1584.5	1983.3	1594.9	1481.1	1261.3	1144.1	1273.2	1136.1	1161.4
		M04063	1954.5	1780.0	1491.5	1492.8	1401.5	1335.4	1175.9	1307.4	672.8
		M04064	1504.6	1741.5	1407.1	1375.7	1253.0	1272.4	1259.5	1224.5	1140.8
		M04065	1113.7	1648.0	1329.3	1459.0	1368.9	1447.4	1257.0	1175.2	1063.6
		M04066	1697.2	1980.4	1809.7	1489.2	1342.1	1257.2	1192.4	988.0	1159.1
		M04067	1903.2	1759.7	1604.1	1349.2	1122.1	1223.0	1157.5	1218.3	1131.6
		M04068	1309.5	1343.1	1591.0	1607.0	1472.9	1243.3	1284.9	1172.9	1150.4
		M04069	1785.4	1751.0	1452.7	1319.2	1248.9	1061.6	981.4	1110.4	1052.8
		M04070	1579.4	1722.3	1543.7	1315.3	1287.2	1203.4	1005.3	1079.6	894.2
		M04071	1822.1	1636.5	1560.2	1240.6	1413.9	1273.9	1190.8	1206.1	1144.0
		M04072	1644.6	1698.6	1331.7	1247.5	1035.1	1211.8	1124.0	1186.5	1015.1
		M04073	1751.1	1466.6	1268.9	1223.5	1078.1	1231.2	933.5	1012.3	951.3
		M04074	1647.7	1840.1	1746.0	1710.1	1516.5	1516.3	1224.1	1352.7	1146.9
		M04075	1771.3	1917.7	1560.1	1468.8	1209.9	1221.2	1259.6	1066.5	1064.0
		M04076	1688.7	1555.4	1445.3	1427.4	1213.2	1152.4	1208.7	1127.1	1077.7
		M04077	1721.7	1401.9	1610.3	1378.9	1332.8	1194.2	1202.2	1225.8	1155.0
		M04078	1504.5	2095.0	1742.8	1573.1	1252.2	1429.6	1296.5	1324.4	1106.5
		M04079	1748.3	1644.6	1536.1	1219.1	1049.4	1171.0	1297.5	978.0	1177.7
		M04080	1193.4	1898.1	1625.6	1269.0	1324.6	1382.8	1248.5	1438.0	1074.1
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		1616.0	1717.2	1519.3	1390.9	1257.4	1258.8	1180.0	1171.9	1066.3	
SD		224.0	202.6	167.5	144.8	149.2	112.4	115.5	121.8	120.5	

Appendix 4-5 Arachidonic acid intake (mg/kg) of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats.

Dose	Initiation	Animal No	Administration period (days)								
			1	8	15	22	29	36	43	50	64
1000 mg/kg	(-)	M05081	1437.0	1348.2	1220.9	1097.9	1017.2	999.6	1029.8	965.6	1070.2
		M05082	1555.6	1113.1	1178.3	1122.3	1139.5	992.1	1093.1	1115.9	1095.6
		M05083	1247.5	1321.3	1215.6	1192.7	1035.4	1061.6	1008.4	1061.0	1001.0
		M05084	1305.3	1314.8	1107.2	1123.7	939.7	1169.3	1073.4	1069.3	1089.3
		M05085	1568.3	1262.5	1259.5	1109.3	1023.6	1057.6	1123.9	1028.6	1064.0
		M05086	1595.1	1259.3	1305.9	1190.6	1017.8	1142.4	1037.4	1123.5	994.1
		M05087	1580.4	1263.6	1193.4	1223.2	1071.0	940.2	1084.8	1114.1	1026.6
		M05088	1380.9	1095.7	1198.2	1131.8	1008.3	1136.9	982.4	1133.8	999.1
		M05089	1764.0	1328.3	1188.9	1202.4	1089.7	1003.1	1002.5	962.5	930.6
		M05090	1434.0	1243.8	1260.2	1075.9	1105.9	1118.7	1084.8	1151.8	946.7
		M05091	1316.0	1233.8	1246.5	1182.0	1019.1	1077.7	1143.3	1136.1	1087.5
		M05092	1523.4	1151.7	1152.8	1212.6	1144.5	1302.6	1014.1	1190.7	1165.2
		M05093	1584.5	1348.2	1156.3	1091.9	1090.1	1050.8	1057.6	1099.2	958.4
		M05094	1277.4	1277.3	1097.8	1143.5	1100.3	1113.3	987.2	1039.2	1052.4
		M05095	1691.6	1256.6	1196.7	1033.9	1009.9	959.4	1009.6	1063.8	974.8
		M05096	1725.1	1147.5	1265.0	1210.1	1151.1	1048.9	1053.6	1029.2	1051.6
		M05097	1529.5	1263.0	1091.6	1109.1	1011.4	1073.0	932.2	1109.7	939.6
		M05098	1466.3	1412.5	1135.1	1045.7	1197.7	1014.2	966.4	998.6	999.9
		M05099	1622.5	1324.1	1281.9	1243.3	1134.5	1054.1	1101.1	1034.3	959.8
		M05100	1779.5	1501.2	1217.5	1214.1	956.4	1089.0	1021.7	1194.4	1060.4
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	
Mean		1519.2	1273.3	1198.5	1147.8	1065.2	1070.2	1040.4	1081.1	1023.3	
SD		159.5	98.2	61.7	62.4	69.5	81.9	55.0	67.0	62.9	

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

「加齢ラットの空間認知機能に及ぼすアラキドン酸長期投与の影響」

研究分担者 橋本 道男 島根大学医学部生理学講座環境生理学 准教授

研究要旨

脳内の代表的な多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸の学習・記憶機能への影響を検討するために、魚油抜き飼料で2世代にわたり飼育した21カ月齢のWistar系加齢雄ラットを2群に分け、アラキドン酸群にはアラキドン酸 (240 mg/kg BW/day) を、コントロール群には基礎混合油 (牛脂:大豆油:菜種油=2:1:1) を其々13週間にわたり経口投与を行った。

体重は両群間で有意な変化が認められなかった。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が、アラキドン酸投与ラットではすべての報酬餌をとりきるに要した時間 (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。アラキドン酸投与ラットでは、血漿のHDL・LDLコレステロール、アラキドン酸、ならびにn-6/n-3比は増加し、パルミチン酸、オレイン酸、ならびにリノール酸は有意に低下した。アラキドン酸投与ラットでは、大脳皮質のアラキドン酸が有意に増加し、リノール酸が低下した。海馬ではアラキドン酸の摂取により、リノール酸とDHA/AA比の低下とn-6/n-3比の増加が認められた。

アラキドン酸を摂取した加齢ラットでは、脳内のアラキドン酸が増加し、行動機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

A. 研究目的

脳内の代表的な n-6 系脂肪酸であるアラキドン酸は総脂肪酸の約 10% を占め、少量ではアラキドン酸カスケードを介して生成される生理活性物質が正常な脳機能を営む上で重要な役割を果たしていることがよく知られている。しかしながら、長期的に給与された外因性アラキドン酸による脳機能への影響についてはほとんど未解決のままである。本研究では、アラキドン酸エチルエステルによる老齢ラット認知機能向上効果の有無を検証する。

B. 研究方法

B-1. 加齢ラットとアラキドン酸投与:

F-1魚粉抜き固形飼料 (フナバシファーム、船橋市) で2世代飼育した加齢Wistar系雄ラット (21カ

月齢) を、アラキドン酸 (240 mg/kg BW/day) と対照基礎混合油 (牛脂:大豆油:菜種油=2:1:1) を其々経口投与するアラキドン酸群 (n=15) とコントロール群 (n=15) との2群に分け、投与期間中に放射状迷路法により各ラットの空間認知機能を評価した。総投与期間は13週間である。

表1には投与したアラキドン酸豊富油と対照基礎混合油の脂肪酸組成が示されている。アラキドン酸豊富油はCABIO社 (中国) から輸入され、アラキドン酸豊富油は対照基礎混合油に比べて、アラキドン酸が多く、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸が少ない組成である。

表 1 給油脂肪酸組成

	アラキドン酸油	対照基礎混合油
PLA(mol%)	6.95±0.00	13.8±0.01
STA(mol%)	5.91±0.00	13.8±0.01
OLA(mol%)	5.31±0.00	42.5±0.03
LA(mol%)	9.38±0.01	20.0±0.02
AA(mol%)	45.1±0.04	ND
EPA(mol%)	0.52±0.00	0.13±0.01
DPA(mol%)	ND	ND
DHA(mol%)	ND	ND

B-2. 空間認知機能評価法:

アラキドン酸群とコントロール群のラットを其々10匹から行動実験を開始した。評価法としては8走路放射状迷路法を用い、投与開始6週間後から給餌制限(平均体重の77.4%)を行い、2週間の馴化期間の後に8走路のうちの4走路に報酬餌を置き、評価を行った。このとき、放射状迷路法で得られる評価項目としては、Total Time (TT: 摂取所要時間)、Reference Memory Error (RME: 参照記憶エラー) ならびに Working Memory Error (WME: 作業記憶エラー) があり、RMEは長期記憶、WMEは短期記憶の指標として各々扱われている。

B-3. 血液生化学一般検査項目測定法:

- 1) 血液生化学一般検査項目: 医療法人仁寿会加藤病院に検査を依頼。主に酵素法により測定。
- 2) 血漿と脳の脂肪酸測定: ガスクロマト法

C. 研究結果

C-1. 体重と血液生化学一般検査項目への影響

・体重には2群間で有意差は認められなかった。
 ・アラキドン酸群ではコントロール群に比べて、血漿の総コレステロールは増加傾向が認められ (P=0.055)、HDLコレステロールとLDLコレステロールは有意に増加した (P<0.05) (表2)。その他の測定項目 (GOT、GTP、 γ -GTP、アルブミン、中性脂肪、血液尿素窒素、クレアチニン、ならびに空腹時血糖) にはアラキドン酸投与の影響は認められなかった。

表 2 体重・血液生化学一般検査項目

	Control群(n=15)	AA群(n=15)
体重 (g)	422±10	457±10
GOT (IU/L)	93.7±7.1	96.6±8.8
GTP (IU/L)	52.3±4.3	52.8±4.1
γ -GTP (IU/L)	1.9±0.2	1.6±0.2
ALB(mg/dL)	2.7±0.0	2.8±0.1
Total-C (mg/dL)	105.8±5.8	120.2±4.4*
TG ((mg/dL)	61.6±9.8	68.1±8.6
BUN(mg/dL)	17.2±0.6	18.4±0.6
CRE(mg/dL)	0.30±0.0	0.33±0.0*
BS(mg/dL)	128.9±4.6	140.2±7.3
HDL-C(mg/dL)	60.1±2.7	69.6±2.6**
LDL-C(mg/dL)	30.1±1.6	35.9±2.1**

数値は平均値±標準誤差で表している。

*0.05<P<0.1, **P<0.05.

C-2. 空間認知機能への影響 (図1)

・各群はそれぞれ10匹から行動評価実験を開始したが、最終的にはコントロール群は7匹、アラキドン酸群は8匹で行った。この原因としては、21カ月齢である加齢ラットの適応能力差であると思われる。

・参照記憶、作業記憶は、群間とブロック間でそれぞれ有意差はあるものの、相互作用には有意差が認められなかった。

・アラキドン酸投与ラットではコントロールラットに比べて摂取所要時間が有意に低値を示した (p=0.0011)。

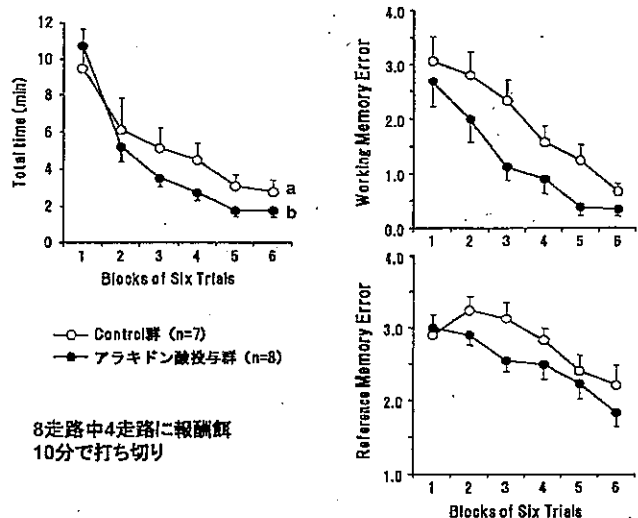


図1 空間認知機能に及ぼす影響

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

C-3. 血漿の脂肪酸組成への影響

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

表3血漿脂肪酸組成

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

数値は平均値±標準誤差で表している。*P<0.05

C-4. 大脳皮質・海馬の脂肪酸組成への影響

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

表4 大脳皮質の脂肪酸組成

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

数値は平均値±標準誤差で表している。

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

表5 海馬の脂肪酸組成

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

数値は平均値±標準誤差で表している。**P<0.05

D. 考察

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

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

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

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

本研究はまだ中途であり、血漿・脳内の各種生理活性物質とアラキドン酸摂取との関連性について検討は行っていない。老齢ラットでは、アラキドン酸の長期投与により学習・記憶機能には影響が認められなかった。しかし、報酬餌を摂取するために要する時間（摂取所要時間）はアラキドン酸投与により有意に低下した。神経細胞膜に増加したアラキドン酸はリパーゼA₂により遊離型となり、アラキドン酸カスケード由来各種プロスタノイドが産生される。これらのプロスタノイドが神経細胞の可塑性などに作用する可能性があり、今後の検討が待たれる。

E. 結論

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

謝辞

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

G. 研究発表

直接関係した業績はなく、以下には、間接的に関連した内容を掲載する。

学術論文

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

著書

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

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

「老若マウスの脳機能に及ぼすアラキドン酸の比較検討」

研究分担者 守口 徹 麻布大学 生命・環境科学部 教授

研究要旨

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

A. 研究目的

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

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

新奇環境摂食抑制試験)、運動協調性(ロータロッド)試験を用いた。

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

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

B. 研究方法

B-1. アラキドン酸の作用比較

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

B-1-1. アラキドン酸の投与

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

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

B-1-2. 自発運動量の測定

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

B-1-3 モーリス水迷路試験

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

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

B-1-4. 高架式十字迷路試験

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

B-1-5. 新奇環境摂食抑制試験

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

B-1-6. ロータロッド試験

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

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

B-1-7. 倫理面への配慮

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

B-2. アラキドン酸油と混合飼料の品質評価

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

B-2-1. 脂肪酸分析方法

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

C. D. 研究結果と考察

C-1. アラキドン酸の作用比較

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

結果が得られた後に行うものとする。

C-1-1. アラキドン酸投与期間中の体重変化と所見

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

C-1-2. 自発運動量

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

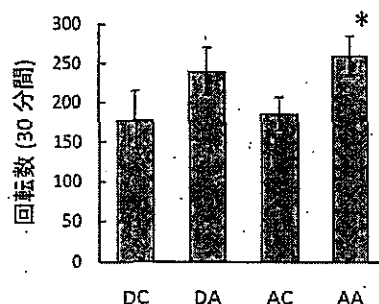


図1. 自発運動量に対するアラキドン酸油投与の影響
DC, n-3 Def-Cont (n=10); DA, n-3 Def-ARA (n=12); AC, n-3 Adq-Cont (n=10); AA: n-3 Adq-ARA (n=11)を示す。(*, P<0.05 vs AC, t-test)

C-1-3. モーリス水迷路試験

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

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

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

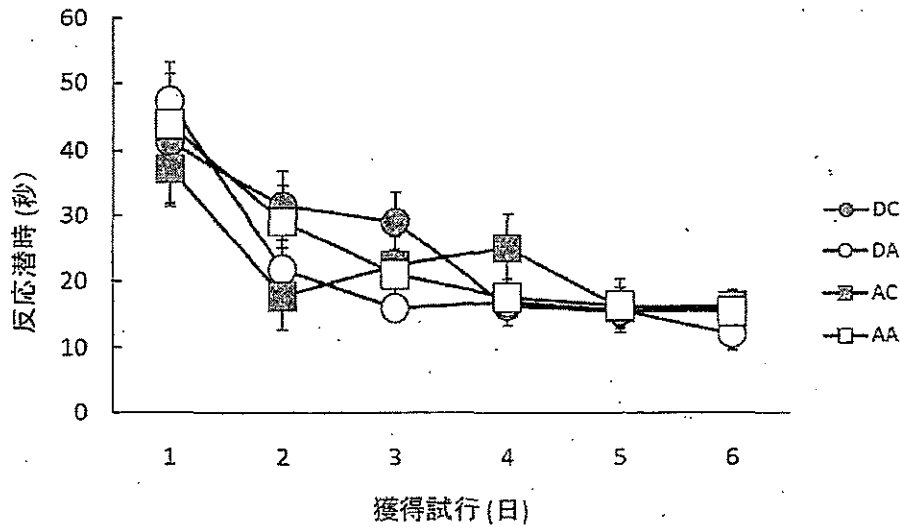


図 2. 水迷路試験の回避潜時におけるアラキドン酸油投与の影響
群名については、図 1 を参照のこと。

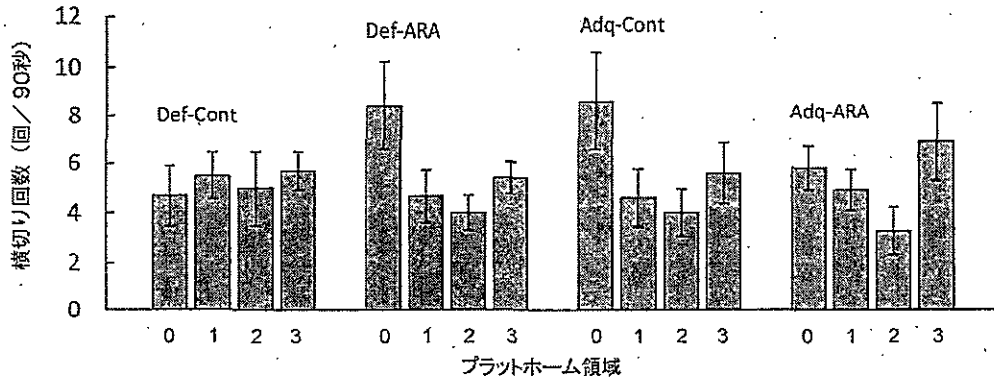
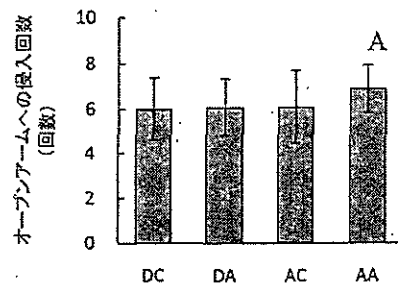


図 3. 水迷路試験の試験試行におけるアラキドン酸油投与の影響

C-1-4. 高架式十字迷路試験

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

たが、有意差は認められなかった(図 4B)。



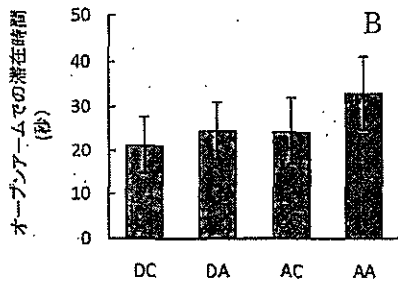


図4. 高架式十字迷路試験におけるアラキドン酸油投与の影響
 図Aは、オープンアームへの侵入回数を、図Bは、オープンアームでの滞在時間を示す。群名については、図1を参照のこと。

C-1-5. 新奇環境摂食抑制試験

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

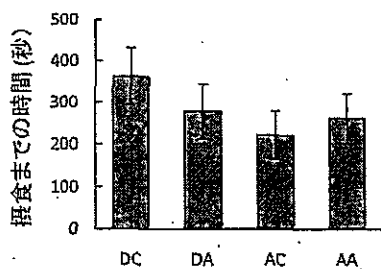


図5. 新奇環境摂食抑制試験におけるアラキドン酸油投与の影響
 群名については、図1を参照のこと。

C-1-6. 運動協調性(ロータロッド)試験

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

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

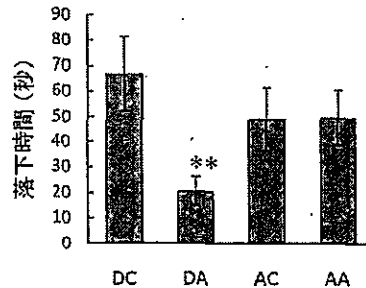


図6. ロータロッド試験におけるアラキドン酸油投与の影響
 群名については、図1を参照のこと。
 (**, $P < 0.01$ vs DC, t-test)

C-2. アラキドン酸油と混合飼料の品質評価

C-2-1. アラキドン酸油

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

C-2-2. アラキドン酸油混合飼料

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

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

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

数値は、平均値 ± 標準誤差で示した。(ND: 未検出)

G. 研究発表

本研究結果が直接関係した業績はないが、間接的に関連した内容を掲載する。

学術論文

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

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

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

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

IV. 研究成果の刊行物・別刷

求められる、油脂製品の安全性とリスク評価

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

1 はじめに

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

2 トランス脂肪酸

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

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

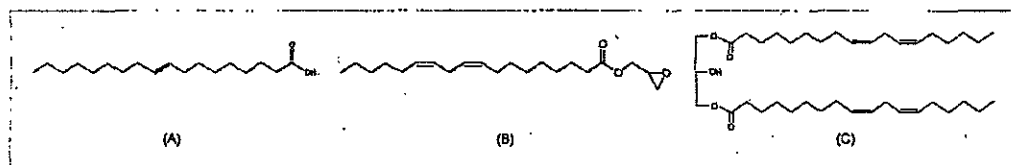


図1 油脂製品で問題となっている主な分子の構造式

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

表1 諸外国におけるトランス脂肪酸の規制(2010年12月現在)

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

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

これに対して我が国の動向はというと、最近になって消費者庁等が中心となり、食品に含まれるトランス脂肪酸の栄養成分表示の義務化へ向けた取組みが活発化してきている。内閣府の食品安全委員会^{※2}が公表しているトランス脂肪酸のファクトシート(科学的知見をまとめた概要書)⁴⁾によると、2010年12月現在、以下のような各省庁の動きがある。

厚生労働省は、「日本人の食事摂取基準(2010年版)」で、「日本人のトランス脂肪酸摂取量(欧米に比較し少ない摂取量)の範囲で疾病罹患のリスクになるかどうかは明らかでない」。しかし、「日本人の中にも欧米人のトランス脂肪酸摂取量に近い人もいる。このため日本でも工業的に生産されるトランス脂肪酸は、すべての年齢層で、少なく摂取することが望まれる」と記述している。⁵⁾ 農林水産省でも、トランス脂肪酸に関する文献調査や国内外の情報の収集・解析を行い、農水省のホームページで「トランス脂肪酸に関する情報」として公表している。⁶⁾

消費者庁では、2009年12月から関係省庁と連携して、トランス脂肪酸の摂取量や健康への影響等に関する情報収集を行い、栄養成分表示の制度化に向けた具体的な検討に取り組んでいる。2010年9月には、トランス脂肪酸に関するファクトシートを公表し、また食品事業者に対し、トランス脂肪酸を含む脂質に関する情報を自主的に開示する取組みを進めるよう要請するため、同年10月には、「トランス脂肪酸の情報開示に関する指針について(案)」を公表してパブリックコメントを募集し、2011年2月には見直すことも前提に指針を公表した。⁷⁾ 食品安全委員会でも、トランス脂肪酸について評価することを決定し、2010年4月から新開発食品専門調査会で評価のための検討が開始された。⁸⁾

それでは、日本人は実際にどのくらいの量のトランス脂肪酸を食べているのであろうか? 女子大学生⁹⁾や30~69歳の男女⁷⁾を対象にした食事栄養調査によると、日本人1日当たりのトランス脂肪酸の摂取量は、平均1.2~1.7g(総エネルギーの0.6~0.8%)であった。ただし成人男

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

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

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

3 ジアシルグリセロールとグリシドール

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

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

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

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

論を行うとしている。¹³⁾

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

4. その他の問題成分

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

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

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

5. おわりに

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

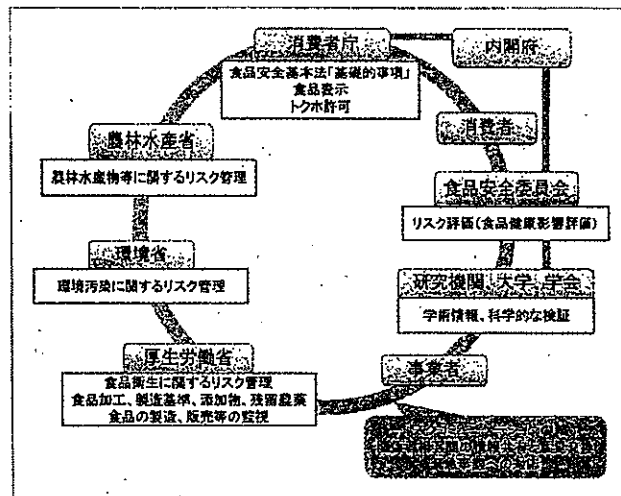


図2 食品の安全にかかわる行政機関と社会との連携

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

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

参考文献

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

