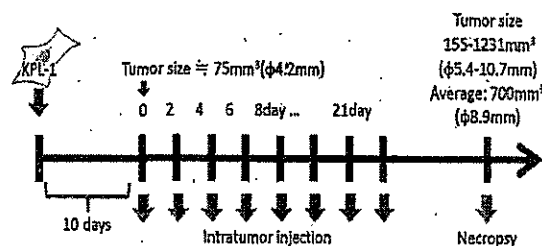


タル酵母)を自由摂取させた。下記の項目について観察し、腫瘍細胞移植後 35 日後に全ての動物を解剖した。

- ・一般状態および生死確認(2日毎)
- ・体重測定(5日毎)
- ・触診・腫瘍塊サイズ測定(5日毎)：腫瘍塊の長さ・幅を測定し、(長さ) x (幅)² x 0.5 の計算式により、腫瘍体積を算出した。
- ・乳腺腫瘍塊の重量測定(解剖時)
- ・乳腺腫瘍塊ならびに所属リンパ節(右腋窩リンパ節)の病理組織学的検査：10% 中性緩衝ホルマリンで1昼夜固定し、パラフィン包埋し、HE 染色標本を作製し、鏡検した。
- ・乳腺腫瘍の BrdU 陽性率：腫瘍細胞の増殖活性を観察するために、50mg/kg BrdU を解剖30分前に腹腔内投与し、ホルマリン・パラフィン標本を用いて抗 BrdU monoclonal 抗体(50倍希釈、Becton Dickinson)による免疫染色を実施した。Nanozoomer(浜松ホトニクス)を用いてデジタル画像を作成し、Image Jを用いて1mm²あたりの陽性細胞数をカウントした。
- ・乳腺腫瘍の TUNEL 陽性率：腫瘍細胞の細胞死を観察するために、ホルマリン・パラフィン標本を用いて terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) -mediated dUTP digoxigenin nick end-labeling(TUNEL) 法(Apop-Tag; Millipore)を実施した。Nanozoomer(浜松ホトニクス)を用いてデジタル画像を作成し、Image Jを用いて1mm²あたりの陽性細胞数をカウントした。

(図2-1: 実験プロトコール)



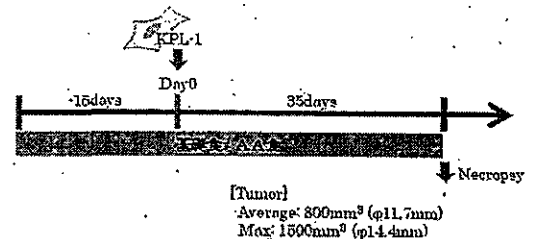
実験③ ARA のヒト乳癌細胞株移植動物での腫瘍増殖に対する影響(食餌暴露)：

BALB/c-nu/nu 系雌マウスを日本チャールスリバーから4週齢時に購入し、ARA 添加食

(0.13%, 0.50%, 2.01%)を摂食させた。6週齢時に 2.5×10^6 cells/animal の KPL-1 ヒト乳癌細胞株を右腋窩乳腺組織内に移植した(図3-1)。対照群として、基礎食(ARA 含有 0.008%)を摂食させ、同様に乳癌細胞を移植した群を設定した。下記の項目について観察し、35日後に全ての動物を解剖した。

- ・一般状態および生死確認(週2回)
- ・摂餌量および ARA 摂取量(週1回)
- ・体重測定(週1回)
- ・触診・腫瘍塊サイズ測定(週2回)：実験②と同様の方法で腫瘍体積を算出した。
- ・乳腺腫瘍塊の重量測定(解剖時)
- ・乳腺腫瘍塊ならびに所属リンパ節(右腋窩リンパ節)の病理組織学的検査：実験②と同様の方法で検査した。
- ・乳腺腫瘍の BrdU 陽性率：Nanozoomer(浜松ホトニクス)を用いてデジタル画像を作成し、腫瘍細胞 1500 個あたりの陽性細胞数を数え、陽性細胞率を算出した。
- ・乳腺腫瘍の TUNEL 陽性率：実験②と同じ方法で 1mm²あたりの陽性細胞数をカウントした。

(図3-1: 実験プロトコール)

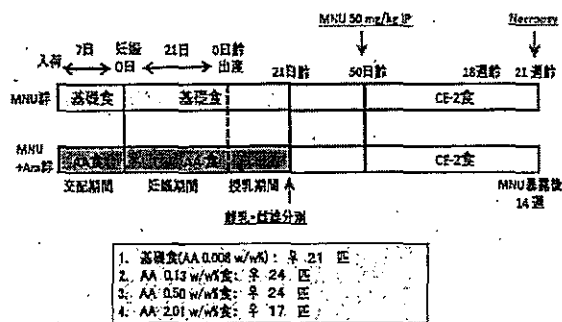


実験④ ARA の妊娠期・授乳期投与による MNU 誘発ラット乳癌発生への影響：

10ないし12週齢の雌雄ルイス系ラット(日本チャールスリバー)を購入後交配させ、交配期1週間、妊娠期3週間、授乳期3週間に ARA 添加食(0.13%, 0.50%, 2.01%)を摂取させた。離乳以降実験終了までは、市販飼料(CE-2、日本クレア)を摂食させた。出生した雌仔ラットの50日齢時に50mg/kg N-メチル-N-ニトロソ尿素(MNU、Sigma Aldrich、Lot No.099K1262)を単回腹腔内投与し、21週齢(MNU投与後14週)まで、下記の項目について観察した(図4-1)。

- ・一般状態および生死確認(母親および雌仔ラット：試験期間中1日1回)
- ・摂餌量およびARA摂取量(母親ラット：交配期～授乳期の毎週1回)
- ・体重(雌仔ラット：出生時～21週齢までの週1回とMNU投与時)
- ・触診ならびに乳腺腫瘍塊のサイズ測定(雌仔ラット：MNU投与後21週齢までの週1回)
- ・乳腺の肉眼的観察・乳腺腫瘍塊の重量測定(雌仔ラット：21週齢)
- ・乳腺組織ならびに乳腺腫瘍塊の病理組織学的検査(雌仔ラット：21週齢)：10%中性緩衝ホルマリンで1日固定し、パラフィン包埋し、HE染色標本を作製し、鏡検した。

(図4-1：実験プロトコール)



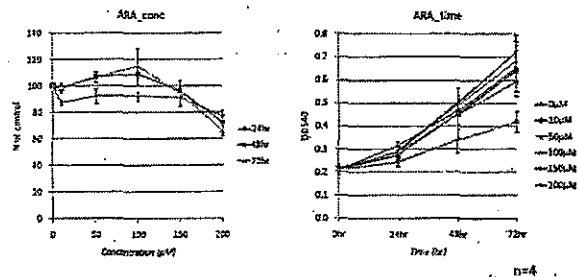
なお、全ての動物実験は本学動物実験委員会の承認を得て、本学動物センターにおいて実施した。動物は温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ 、照明1日12時間の環境下で飼育し、照射 (30Gy) 飼料は使用時まで冷蔵・遮光保存、飼料と滅菌水を自由摂取させた。

C. 研究結果および考察

実験① ARA のヒト乳癌細胞株に対する増殖活性への影響：

何れの暴露時間においても、 $200 \mu\text{M}$ で低値傾向がみられた。

(図1-1：MTTアッセイ)



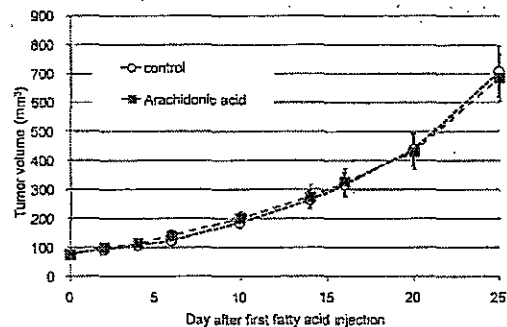
実験② ARA のヒト乳癌細胞株移植動物での腫瘍増殖に対する影響(直接暴露)：

一般状態および生死：試験期間中、両群とも異常ならびに死亡は観察されなかった。

体重：試験期間中、対照群に比べてARA群で有意な差はみられなかった。

腫瘍体積の推移：試験期間中、ARA群の腫瘍体積は、対照群のそれとほぼ同様の発育を示し、腫瘍体積に有意な差はみられなかった(図2-2、2-3)。

(図2-2：腫瘍体積)



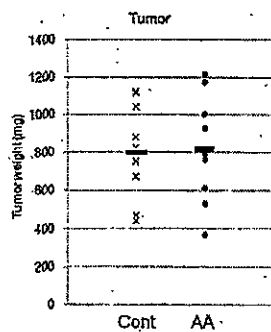
(図2-3：腫瘍細胞移植35日後の腫瘍塊の肉眼写真)



左が対照群、右がARA群

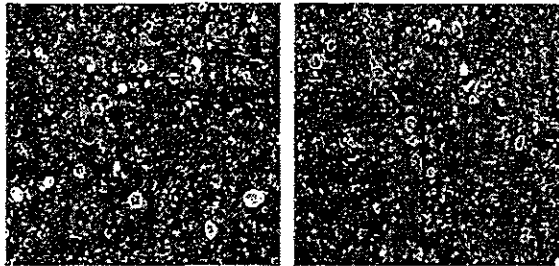
腫瘍重量：解剖時の移植塊の重量は、対照群が $799 \pm 78 \text{ mg}$ 、ARA群が $819 \pm 86 \text{ mg}$ であり、統計学的に有意な差を認めなかった(図2-4)。

(図2-4: 腫瘍重量)



病理組織学的検査: 移植した乳癌組織の組織型には、群による違いは認めなかった(図2-5)。乳癌組織内・周囲の炎症についても群間に差は認めなかった。さらに、所属リンパ節の検査では、対照群で1/10例、ARA群で2/10例に転移巣が観察されたものの、群間に差はみられなかった。

(図2-5: 各群の乳腺内移植腫瘍(腺癌)の組織像)



左が対照群、右がARA群

腫瘍細胞のBrdU陽性率: 1 mm²あたりの陽性細胞数は、対照群で539個に対して、ARA群では502個であった。統計学的に差はみられないことから、ARA群では腫瘍細胞の増殖活性に影響を及ぼさないと判断した。

腫瘍細胞のTUNEL陽性率: 1 mm²あたりの陽性細胞数は、対照群で83個に対して、ARA群では100個であり、若干の増加をみたが、統計学的に差はみられず、ARA群では細胞死発現の増加はみられないと判断した。

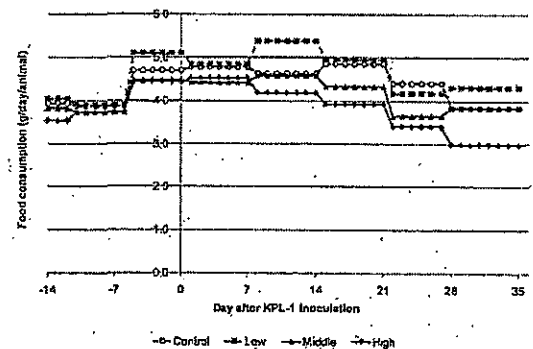
実験③ ARAのヒト乳癌細胞株移植動物での腫瘍増殖に対する影響(食餌暴露):

一般状態および生死: 試験期間中、何れの群

とも異常ならびに死亡は観察されなかった。

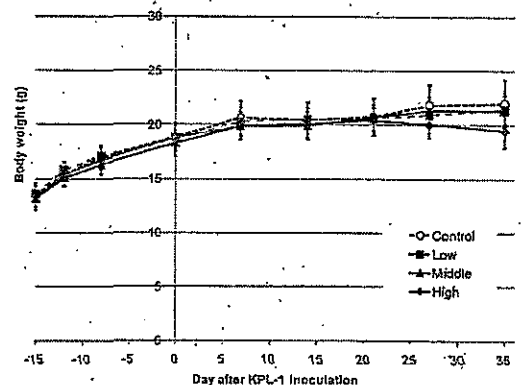
摂餌量・ARA摂取量: 1匹あたりの1日摂餌量は、移植2週間後から、ARA2.01%添加食群では他の群に比べ減少傾向がみられ、移植35日後では基礎食群(Control)で3.8g、ARA0.13%添加食群で4.3g、ARA0.50%添加食群で3.8gであったのに対し、ARA2.01%添加食群で3.0gと減少が顕著であった(図3-2)。試験期間中のARA摂取量(投与量)はARA0.13%添加食群で306 mg/kg、ARA0.50%添加食群で1070mg/kg、ARA2.01%添加食群で4033mg/kgとなり、公比3~4倍であった。なお、基礎食群(Control)においてもARAが含有されており、その投与量は18mg/kgであった。

(図3-2: 1匹あたりの1日摂餌量)



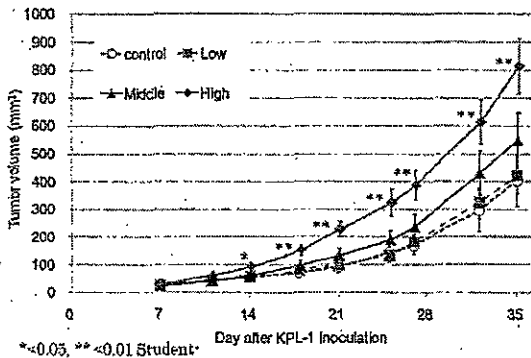
体重: 移植4週間後から、ARA2.01%添加食群では減少し、移植35日後では基礎食群(Control)で22.0g、ARA0.13%添加食群で21.4g、ARA0.50%添加食群で21.3gであったのに対し、ARA2.01%添加食群で19.5gと低値を示した(図2-3)

(図3-3: 体重の推移)

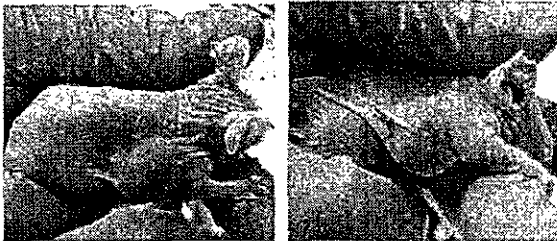


腫瘍体積の推移： 移植2週間後から、ARA2.01%添加食群では腫瘍体積が他群に比べて有意に増加し、移植35日後では基礎食群(Control)で405mm³、ARA0.13%添加食群で423mm³、ARA 0.50%添加食群で549mm³であったのに対し、ARA2.01%添加食群で813mm³と有意に増加した(図3-4、図3-5)。

(図3-4： 腫瘍体積)



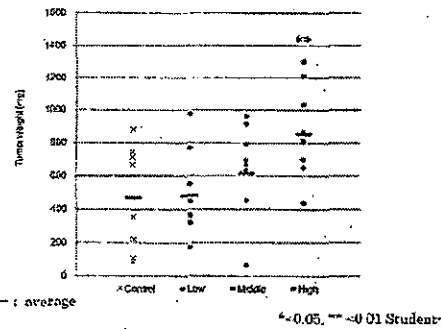
(図3-5： 腫瘍細胞移植35日後の腫瘍塊の肉眼写真)



左が基礎食群、右がARA 2.01%添加食群

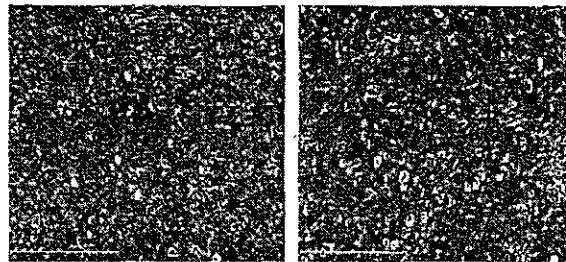
腫瘍重量： 解剖時の移植塊の重量は、基礎食群(Control)で470mg、ARA0.13%添加食群で483mg、ARA0.50%添加食群で616mgであったのに対し、ARA2.01%添加食群で852mgと有意に増加した(図3-6)。

(図3-6： 腫瘍重量)



病理組織学的検査： 移植した乳癌組織の組織型には、群による違いは認めなかった(図3-7)。乳癌組織内・周囲の炎症についても群間に差は認めなかった。さらに、所属リンパ節の検査では基礎食群で1/9例、ARA 0.13%添加食群で0/10例、ARA 0.50%添加食群で0/10例、ARA 2.01%添加食群で1/9例に転移巣が観察されたものの、群間に差はみられなかった。

(図3-7： 各群の乳腺内移植腫瘍(腺癌)の組織像)



左が基礎食群、右がARA 2.01%添加食群

腫瘍細胞のBrdU陽性率： 基礎食群で12.4%、ARA0.13%添加群で12.6%、ARA 0.50%添加群で11.5%、ARA2.01%添加群で15.1%であり、ARA2.01%添加群では基礎食群に比べて有意に増加した。

腫瘍細胞のTUNEL陽性率： 1mm²あたりの陽性細胞数は、基礎食群で155個、ARA 0.13%添加食群で166個、ARA0.50%添加食群で127個、ARA2.01%添加食群で147個であり、統計学的に差はみられないことから、ARA添加食群では細胞死発現の増加はみられないと判断した。以上、ARA2.01%添加食群では移植乳

癌の発育促進が観察された。この作用メカニズムについては不明であるが、①乳癌細胞に対するARAによる増殖促進作用は認めなかったこと(実験①)、②ARA添加により移植乳癌細胞の増殖活性は増加しなかったこと(実験②)から、ARAによる腫瘍細胞への直接的な作用というよりは、血管新生に対する作用など他の間接的なメカニズムが関与しているのかもしれない。

実験④ ARAの妊娠期・授乳期投与によるMNU誘発ラット乳癌発生への影響：

一般状態および生死： 乳腺腫瘍を持つ動物では、各群の数例で乳腺腫瘍部位の潰瘍、そこからの失血に起因する貧血(眼球退色)が観察された。乳腺腫瘍を持つ動物のうちARA0.50%添加食群の1例が、20週齢時に状態悪化により死亡した。

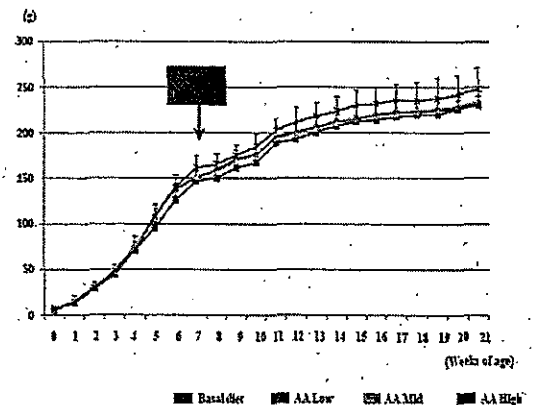
摂餌量・ARA摂取量： 母親の1匹あたりの摂餌量は各群に特に差は認めず、哺乳期間中の摂餌量が交配期や妊娠期の約3倍を示した。ARA摂取量は、交配期ならびに妊娠期では、基礎食群で4.7 - 5.2 mg/kg、ARA0.13%添加食群で77.7 - 83.5 mg/kg、ARA0.50%添加食群で261.8 - 332.7mg/kg、ARA2.01%添加食群で1075.1 - 1226.6mg/kgであった(表4-1)。これに対し、授乳期では各群とも摂餌量にともない、ARA摂取量が増加し、基礎食群で9.4mg/kg、ARA 0.13%添加食群で242.6mg/kg、ARA0.50%添加食群で874.0mg/kg、ARA 2.01%添加食群で3058.5 mg/kgを示した。ARA添加食群におけるARA摂取量(投与量)は公比3~4倍であった。

(表4-1：ARA摂取量)

Period	Dose of arachidonic acid (mg/kg)			
	Basal	Low	Mid	High
Mating (1 week)	5.2	83.5	532.7	1226.6
Pregnancy (3 weeks)	4.7	77.7	261.8	1075.1
Nursing (3 weeks)	9.4	242.6	874.0	3058.5
Estimated dose		50	250	1000

体重： ARA摂取終了時の3週齢では、基礎食群45g、ARA0.13%添加食群44g、ARA0.50%添加食群48g、ARA2.01%添加食群48gであり、群間に差はみられなかった。21週齢の最終体重は、基礎食群233g、ARA0.13%添加食群230g、ARA0.50%添加食群234g、ARA2.01%添加食群248gであり、ARA2.01%添加食群で、基礎食群に比べて有意に増加した。しかし、ARA摂取終了時の3週齢では群間に差はみられないことから、この体重の変化がARA摂取による影響ではないと判断した。

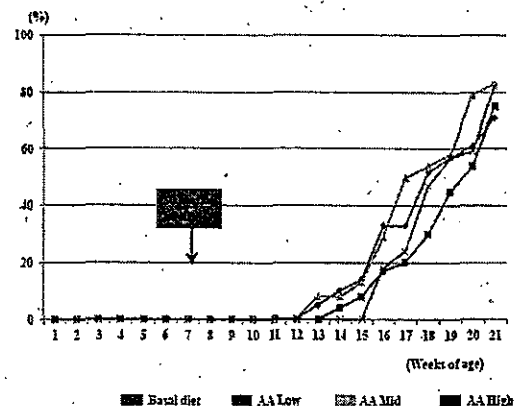
(図4-2：体重の推移)



触診：

基礎食群ならびにARA0.50%添加食群では13週齢から、ARA0.13%添加食群では14週齢から、ARA0.50%添加食群では16週齢から、乳腺腫瘍発生が観察された(図4-3)。21週齢時での発生頻度は、基礎食群で71%、ARA0.13%添加食群で75%、ARA0.50%添加食群で83%、ARA 2.01%添加食群で82%であり、群間に差はみられなかった。

(図4-3：触診で触知された乳腺腫瘍塊)



乳腺の肉眼的観察・乳腺腫瘍塊の重量測定：

剖検時に乳腺腫瘍が観察された頻度は、基礎食群で 15 / 21 例(71%、腫瘍数 33 個)、ARA0.13% 添加食群で 18 / 24 例(75%、腫瘍数 33 個)、ARA0.50% 添加食群で 20 / 24 例(83%、腫瘍数 53 個)、ARA2.01% 添加食群で 14 / 17 例(82%、腫瘍数 32 個)であり、1 匹あたりの乳腺腫瘍数は、基礎食群で 2.1 個、ARA0.13% 添加食群で 1.8 個、ARA0.50% 添加食群で 2.7 個、ARA2.01% 添加食群で 2.3 個であり、何れのパラメータも群間に有意な差はみられなかった(表 4-2)。さらに、剖検時に認められた乳腺腫瘍の重量に関しては、ばらつきが大きく、群間に有意な差はみられなかった。

(表 4-2 : 1 匹あたりの乳腺腫瘍数・重量)

	Basal	Arachidonic acid		
		Low	Mid	High
Multiplicity (tumors/rat)	2.1	1.8	2.7	2.3
Tumor weight				
Average (mg)	2057	1952	1353	699
SE	5261	2612	2672	1394

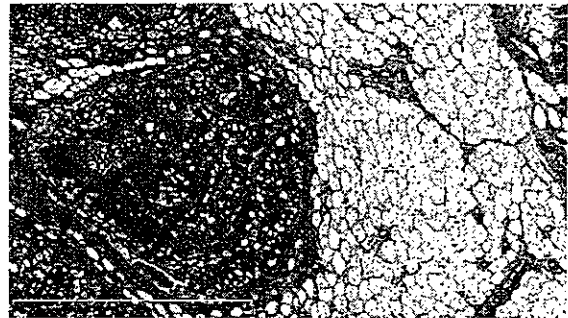
病理組織学的検査：

剖検で観察された乳腺腫瘍は、病理組織学的に乳腺腺癌であり、病理組織学的に検出された乳癌も含めた集計では、基礎食群で 20 / 21 例(95%、腫瘍数 67 個)に、ARA0.13% 添加食群で 21 / 24 例(88%、腫瘍数 78 個)に、ARA0.50% 添加食群で 23 / 24 例(96%、腫瘍数 93 個)に、ARA2.01% 添加食群で 17 / 17 例(100%、腫瘍数 68 個)に乳腺腺癌を認めた。さらに、1 匹あたりの乳腺腺癌数は、基礎食群で 3.2 個、ARA0.13% 添加食群で 3.3 個、ARA0.50% 添加食群で 3.9 個、ARA2.01% 添加食群で 4.0 個であった。何れのパラメータも群間に有意な差はみられず(表 4-3)、各群の正常乳腺および乳癌組織について、組織学的に差は認めなかった(図 4-4)。さらに、乳癌組織内・周囲の炎症の程度に関しても群間に差はみとめなかった。

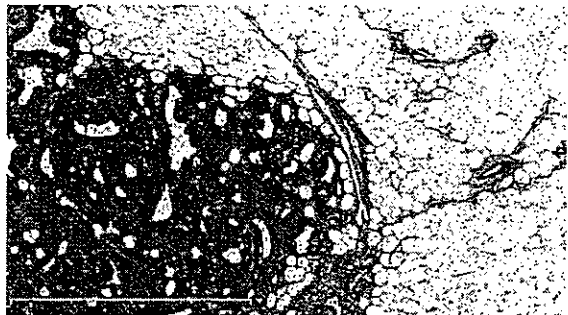
(表 4-3 : 1 匹あたりの乳腺腫瘍数・重量)

Group	Incidence	Multiplicity (tumors / rat)
Basal	20/21 (95%)	3.2 +/- 1.8
AA Low	21/24 (88%)	3.3 +/- 1.9
AA Mid	23/24 (96%)	3.9 +/- 2.2
AA High	17/17 (100%)	4.0 +/- 2.1

(図 4-4 : 各群の乳腺腺癌の組織像)



基礎食群：左が乳癌組織、右が正常乳腺



ARA2.01% 添加食群：左が乳癌組織、右が正常乳腺

D. 結論

ヒト乳癌細胞株(KPL-1)を用いた実験において、200 μM という高濃度において、乳癌細胞の成長に対する ARA による直接作用(抑制効果)をみとめた。ただし、この高濃度は生体内では再現できないほどの非生理条件と考えられた。

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 の直接作用をみたところ、何ら影響を認めなかった。一方、同じモデルを用いて ARA 添加食の影響をみたところ、ARA2.01% 添加食では、移植乳癌の発育が促進された。この作用メカニ

ズムについては不明であるが、乳癌細胞に対する直接作用以外のメカニズムが関与している可能性があり、今後の検討課題と思われる。

雌仔ラットに母親を通じてARAを暴露させ(交配期・妊娠期・授乳期にARA添加食を摂取)、MNU誘発乳癌の発生状況について観察したところ、乳腺腫瘍発生時期・数・重量・組織型には差は認めなかった。

よって、胎児期・新生仔期のARA投与は乳癌発生には影響はみないものの、成人期暴露では乳癌の進展を促す可能性が示唆された。

以上の結果から、ARA補給が乳がん発症に及ぼす影響については、その暴露時期が重要であり、交配期から授乳期暴露は乳癌発生に影響を及ぼさないと考えられた。

F. 健康危険情報

特記せず。

G. 研究発表

(学会発表)

1. 義澤克彦、佐々木 朋、木村彩子、三城弥範、木下勇一、上原範久、垺 貴司、守口 徹、螺良愛郎. アラキドン酸の妊娠期・授乳期投与によるMNU誘発ラット乳癌発生への影響. 第101回日本病理学会総会(東京)、平成24年4月(予定).
2. 佐々木 朋、義澤克彦、木村彩子、三城弥範、木下勇一、上原範久、垺 貴司、守口 徹、螺良愛郎. アラキドン酸のヒト乳癌細胞株移植動物での腫瘍増殖に対する影響. 第101回日本病理学会総会(東京)、平成24年4月(予定).

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（食品の安全確保推進研究事業）

総合研究報告書

「アラキドン酸等の脂肪酸摂取がラット炎症病態やマウス眼組織形成に及ぼす影響について」

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、細胞内の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注目されている。しかし、最新の質量分析装置を用いた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。

本研究の初年度は、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、各種脂質関連分子の変動から裏付けられた。

アラキドン酸（ARA）を過剰摂取すると、特定系統の雌性マウス胎仔において眼組織の発達異常が高頻度で発生することが報告されている。本研究の2年目では、その機構を明らかにするために、眼組織の発達異常が起こりやすい系統であるC57BL/6マウスを用いて各種脂肪酸補給食で飼育し、その胎仔の眼組織中のリン脂質分子種について質量分析装置を用いたメタボローム解析を適用した。その結果、交配2週間前から普通食にARAを4%添加した食餌で飼育したマウスの♀胎仔（E16.5）では、普通食のみや4%ドコサヘキサエン酸を添加した群に比べて、眼組織中のリゾリン脂質（リゾホスファチジルコリンとリゾホスファチジルエタノールアミン）の顕著な蓄積が認められた。一方、これは♀胎仔に特徴的な現象であり、♂胎仔ではリゾリン脂質の蓄積は見られず、眼組織形体異常が♂よりも♀で顕著であることと一致していた。以上より、ARA強化食によるマウス胎仔眼組織でのリゾリン脂質蓄積が、眼の発生や形体形成と関わっていることが示唆された。

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つく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（ARA）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。まず初年

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。

理化学研究所脳科学総合研究センターの前川らは、ARAを過剰摂取すると特定系統の雌性マウス胎仔において、ある程度の頻度で眼組織の発達異常が発生することを見出した (Maekawa et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 402: 431-437, 2010)。我々は、本研究の2年目では前川らと共同研究を行い、これらマウス胎仔の眼組織における脂質分子の変動を詳細に解析することにより、ARAの過剰摂取が雌性マウス胎仔の眼組織の発達異常に及ぼす機構について検討した。

B. 研究方法

B-1. 経腸栄養剤投与によるラットへの脂肪

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。

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 3 μ m 2.1 \times 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 QTRAPTM LC/MS/MS system (AB SCIEX) で行った。溶媒の送液は 200 μ l/min の流速で行った。移動相は、0.1% 硝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)

Table I. 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
ミリスチン酸(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(18:1cis)	29.7	50.2
エライジン酸(18:1trans)	2.0	1.9
リノール酸(18:2 ω 6)	18.3	24.7
γ -リノレン酸(18:3 ω 6)	6.0	-
α -リノレン酸(18:3 ω 3)	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 ω 3)	6.5	-
ドコサヘキサエン酸(22:6 ω 3)	2.7	-

(%)

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

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。カーテングス 25.00、イオンスプレー電圧 5.50kV、コリジョンガス圧 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 $^{\circ}$ 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 面積で割った補正值を用い、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、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℃ 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。

B-3. 高度不飽和脂肪酸補給食を与えたマウス胎仔眼組織の脂質抽出

眼組織の発達異常が起こりやすい系統である C57BL/6 マウスに対して、交配 2 週間前から、普通食、普通食に 4% ARA を強化した食餌、普通食に 4% ドコサヘキサエン酸 (DHA) を強化した食餌、あるいは 4% ARA と 4% DHA の両方を強化した食餌、以上の 4 種類の餌を投与した (Table II)。各食餌群のマウス胎仔 (E16.5, n=4) の眼組織を摘出し、Bligh and Dyer 法により総脂質を抽出した後、リン定量によりリン脂質の定量を行った。

B-4. マウス眼組織の脂質メタボローム解析

これら総脂質画分を用いて、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 3 μ m 2.1 \times 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/MS/MS system (AB SCIEX) で行った。溶媒の送液は 200 μ l/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、コリジョンガス圧 4.00、ネブライ

Table II. 食餌の脂肪酸組成

脂肪酸	食餌群 (ARA/DHA)			
	(-/-)	(+/-)	(-/+)	(+/+)
16:0 パルミチン酸	11.5	11.3	11.6	11.6
18:0 ステアリン酸	2.2	2.9	2.4	2.9
18:1 n-9 オレイン酸	28.8	26.8	28.6	26.6
18:2 n-6 リノール酸	54.7	50.3	50.4	46.1
18:3 n-3 α -リノレン酸	0.9	0.9	0.9	0.8
20:3 n-6 ジホモ- γ -リノレン酸	0.0	0.3	0.0	0.3
20:4 n-6 アラギドン酸 (ARA)	0.0	4.0	0.0	4.0
22:6 n-3 ドコサヘキサエン酸 (DHA)	0.0	0.0	4.0	4.0
その他	1.9	3.5	2.1	3.7
合計 (%)	100	100	100	100

ザーガス 70.00psi、ターボガス 70.00psi であった。ソース温度は 300℃ 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。サンプル面積を内部標準脂質のピーク面積で割った補正値を縦軸にプロットし、各リン脂質分子種プロフィールを食餌群間で比較した。

C. 研究結果

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。

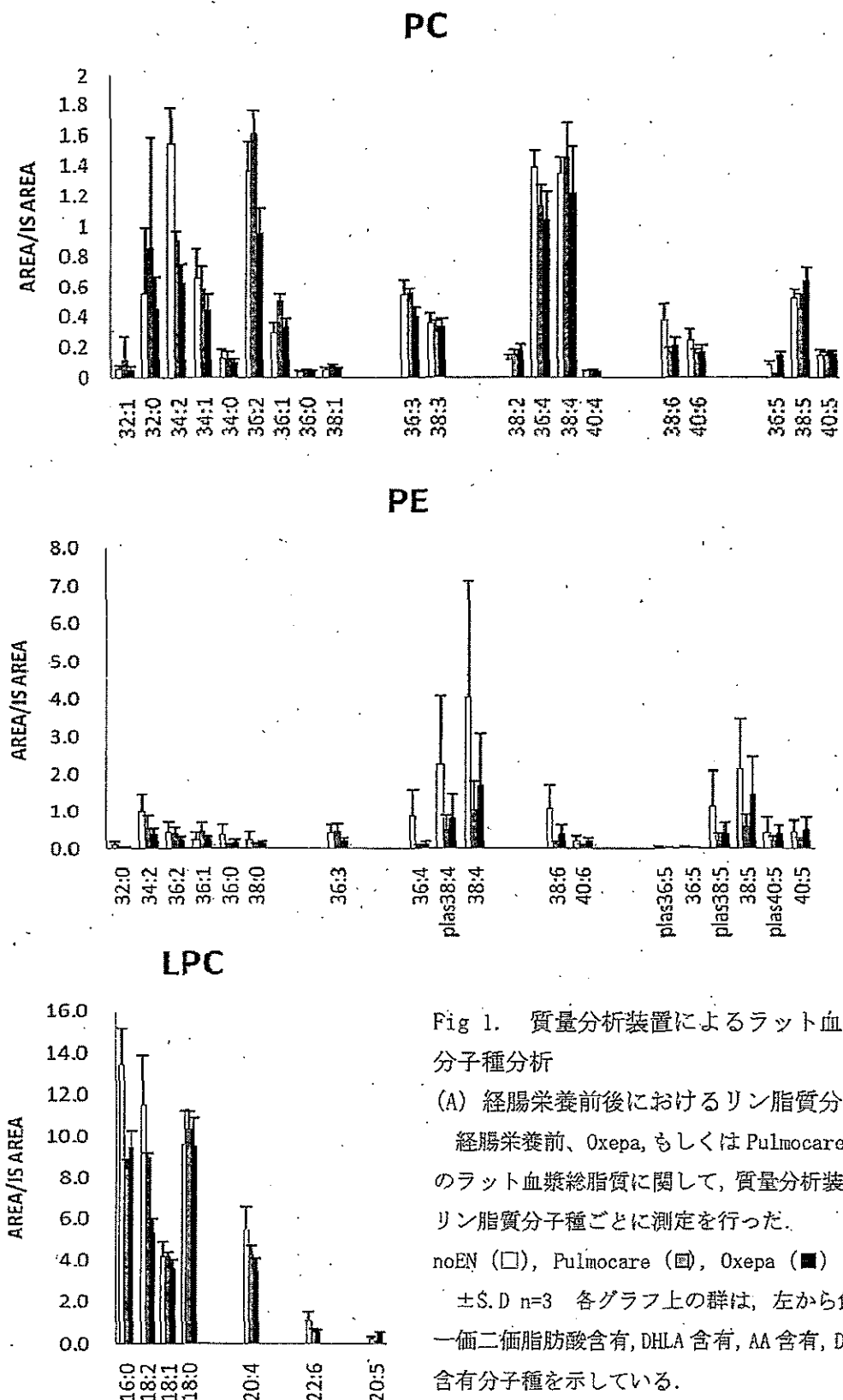


Fig 1. 質量分析装置によるラット血漿リン脂質分子種分析

(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。

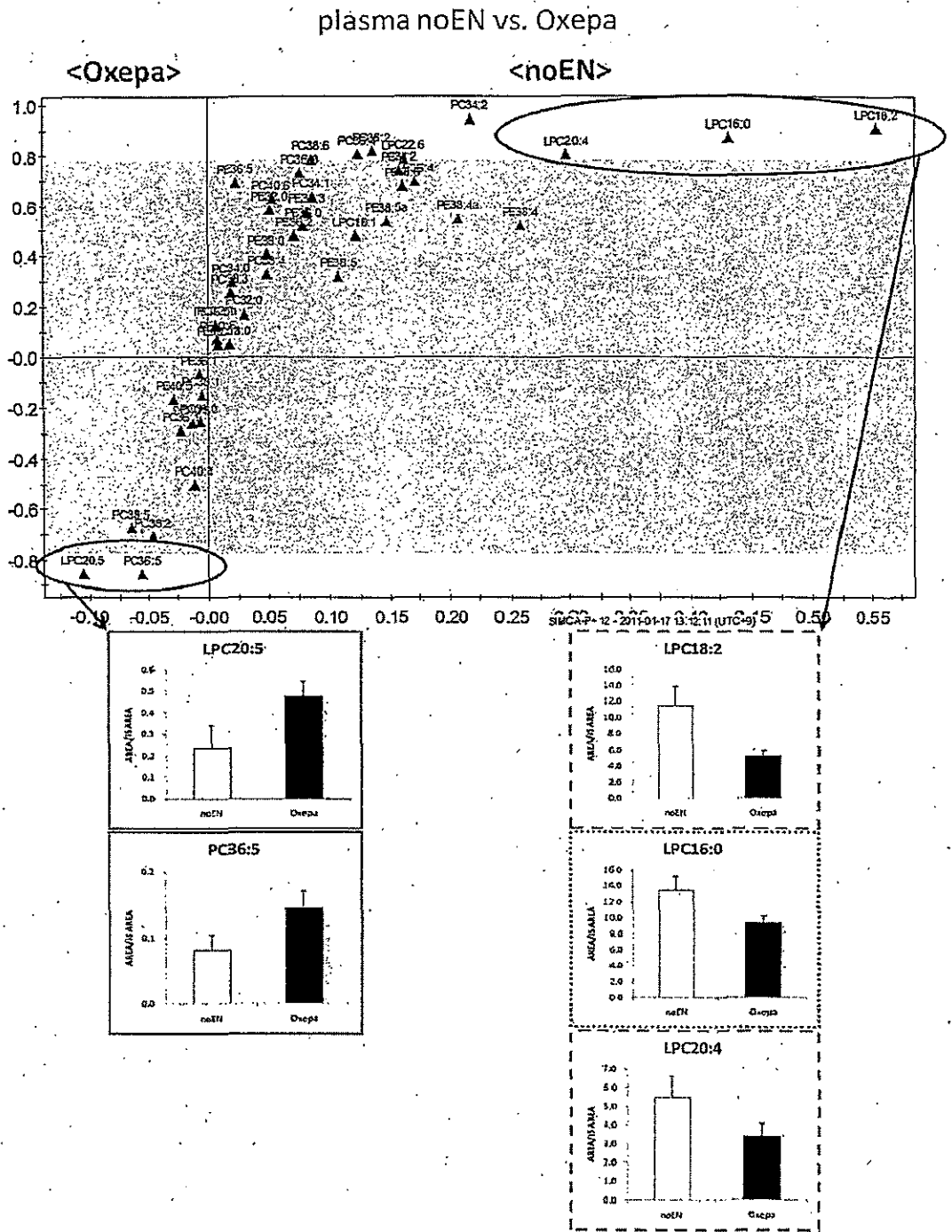


Fig. 1 質量分析装置によるラット血漿リン脂質分子種分析

(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。±S.D * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$

.....は飽和・一価含有, - - -はω6 含有, —はω3 含有分子種を表す。

(C)

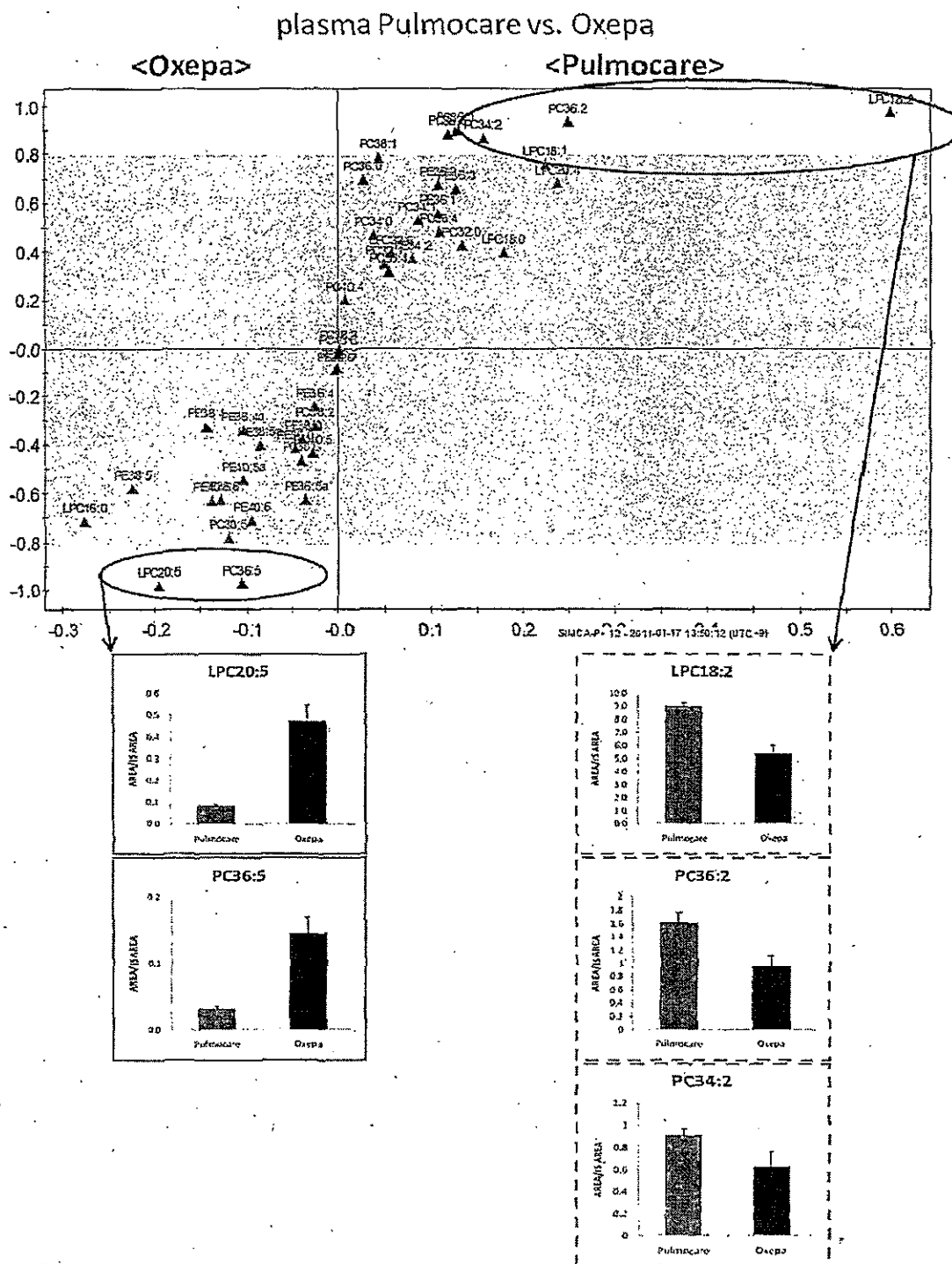


Fig. 1 質量分析装置によるラット血漿リン脂質分子種分析

(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)

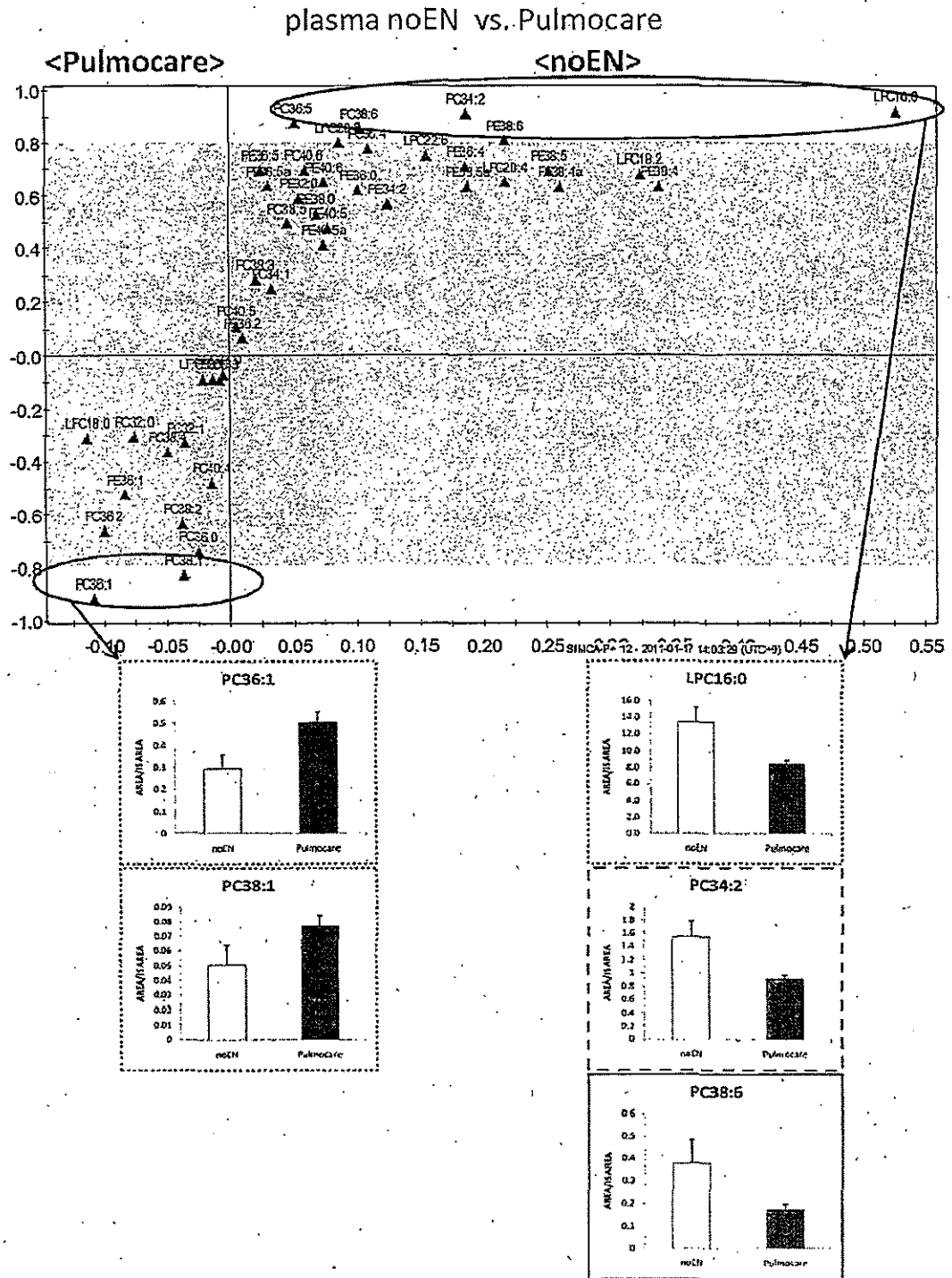


Fig. 1 質量分析装置によるラット血漿リン脂質分子種分析

(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。

血漿以外の組織・臓器での分子種変動について、Pulmocare と Oxypa 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 Oxypa 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 ω 3 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、ARA 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。

Pulmocare vs. Oxypa

	飽和 & 一価		ω 6		ω 3		ω 5 & ω 3	
	0	1	2	4	5	6	3	
plasma		PC36	LPC18 PC34 PC36		LPC20 PC36			PC36
blood cells		LPC18	LPC18	LPC20	LPC20 PC36			
intestine	LPC18 LPC18 PC32 PC34	LPC18 PC34		PEplac38	LPC20 PEplac40 PE40	PE40		
lymph node			PE38 PE34 PC34 EC38	PEplac38 PC38	LPC20 PEplac40 PC36 PE36	PE42		PE38
liver			PC36 PE34 PE36	PC38 PE38	LPC20 PC36	PE40		
lung					LPC20 PC36 PEplac36			PE36

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 Oxypa 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 Oxypa 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 ARA 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)

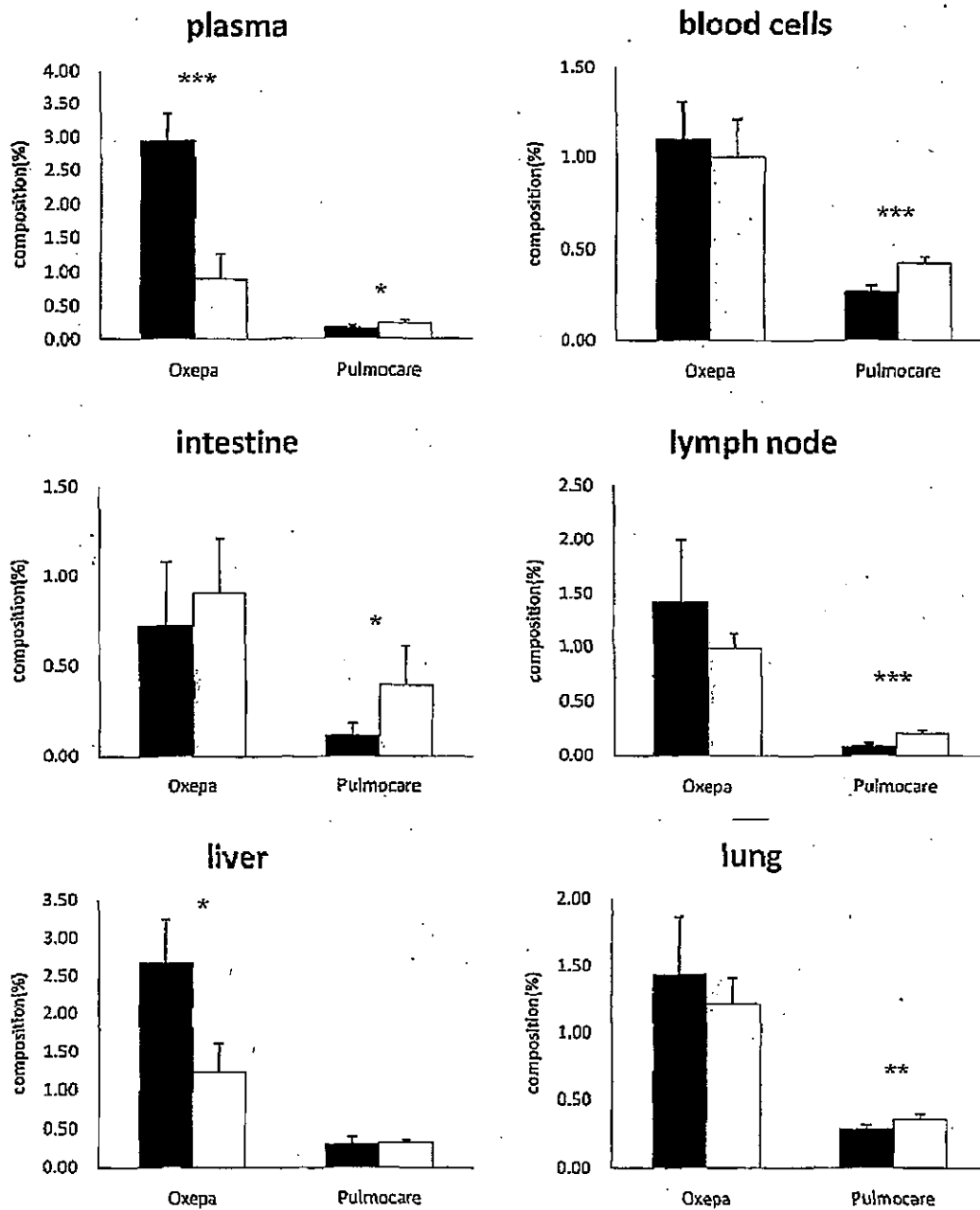


Fig. 3 腸管虚血再灌流モデルラットにおける各器官・組織リン脂質脂肪酸組成の変動

(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+R/I n=3

(B)

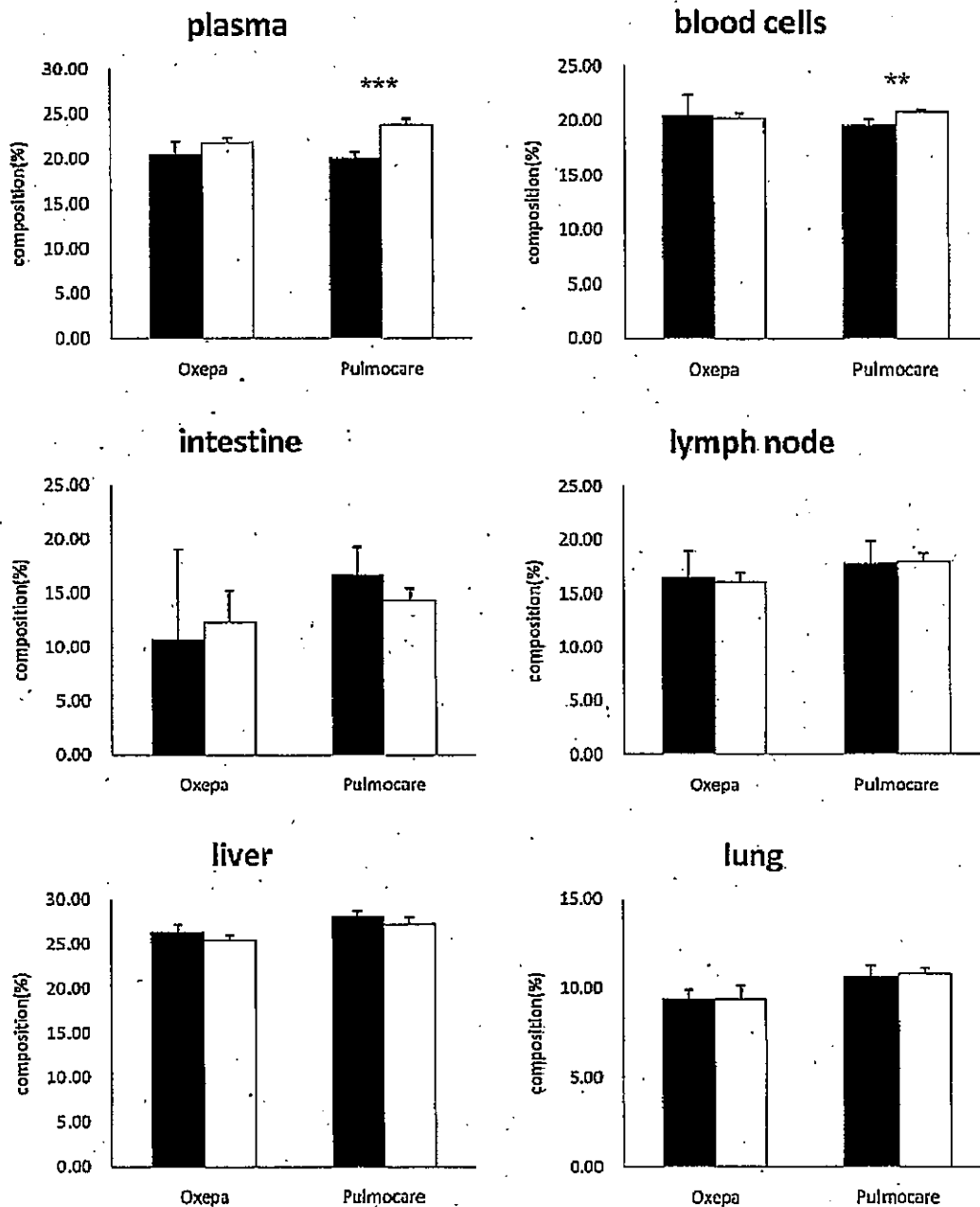


Fig. 3 腸管虚血再灌流モデルラットにおける各器官・組織リン脂質脂肪酸組成の変動

(B) 各器官・組織におけるARA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ARA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

(C)

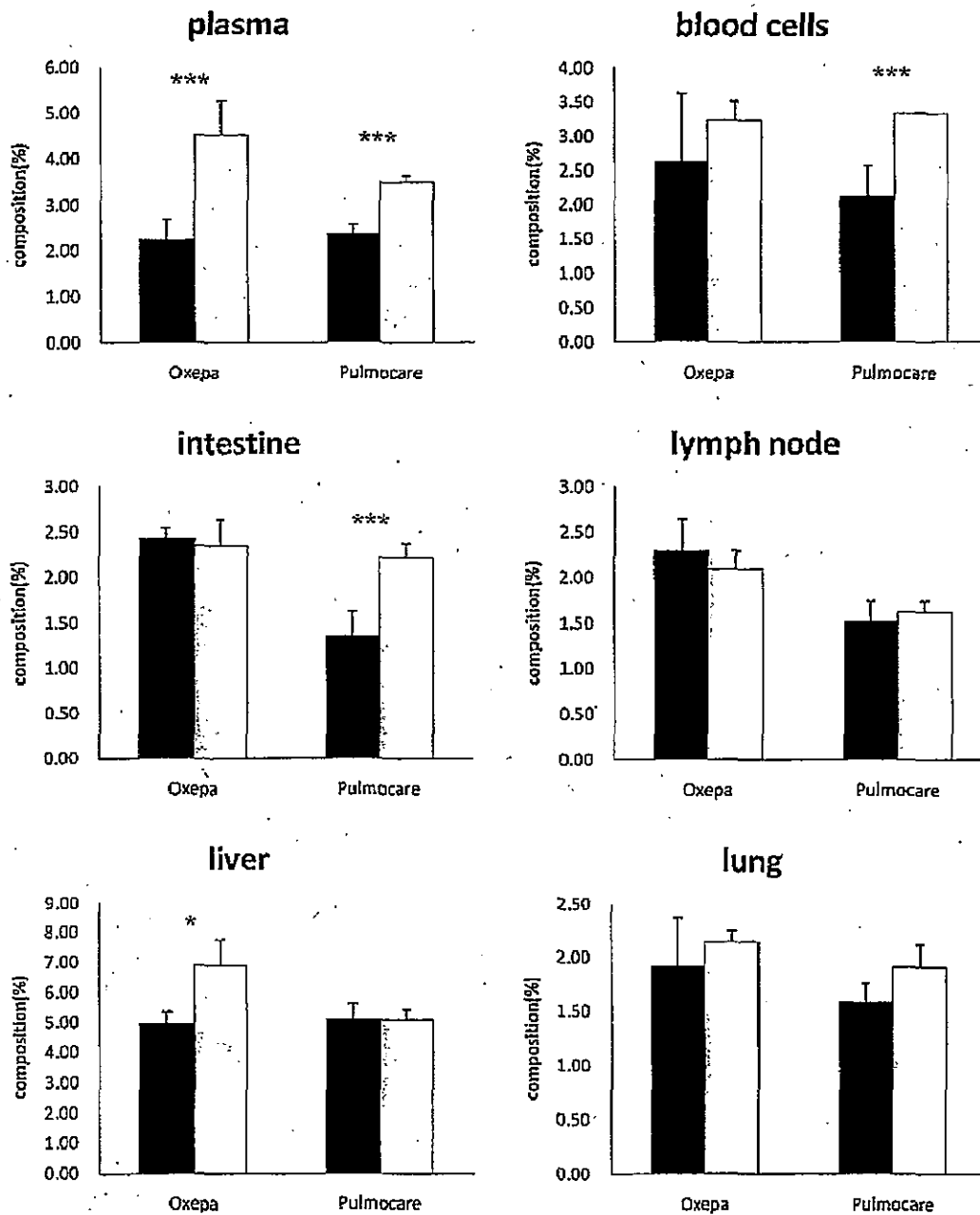


Fig. 3 腸管虚血再灌流モデルラットにおける各器官・組織リン脂質脂肪酸組成の変動

(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、ARA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、ARA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、ARA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、ARA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 a、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。

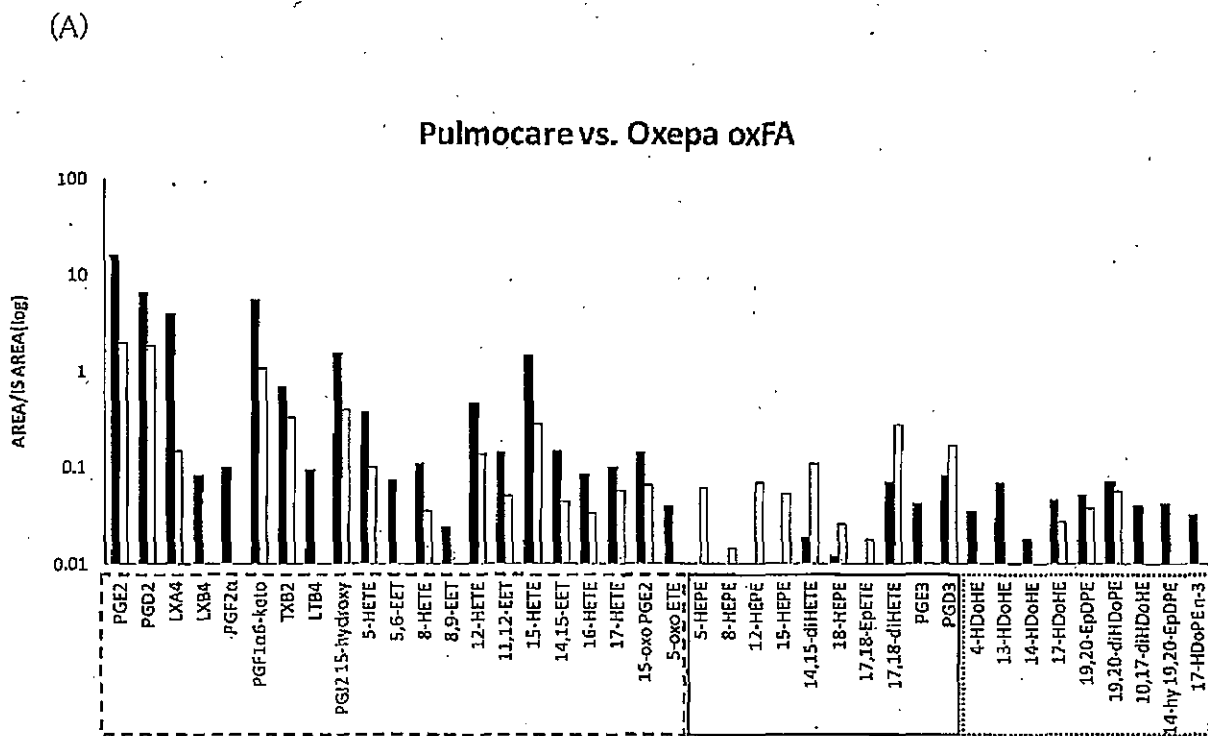


Fig. 4 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

(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 ARA 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.

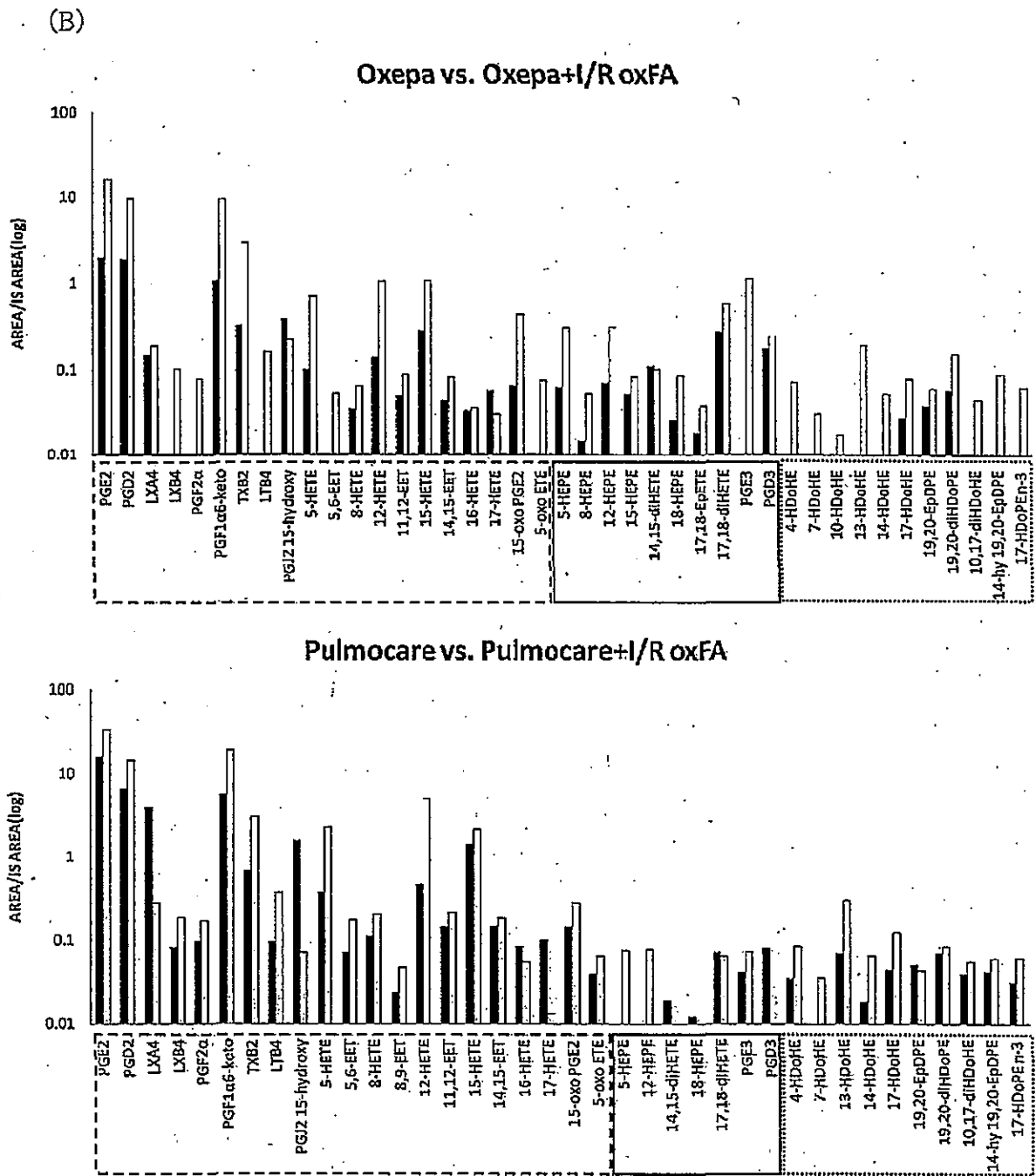


Fig. 4 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

(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 ARA 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)

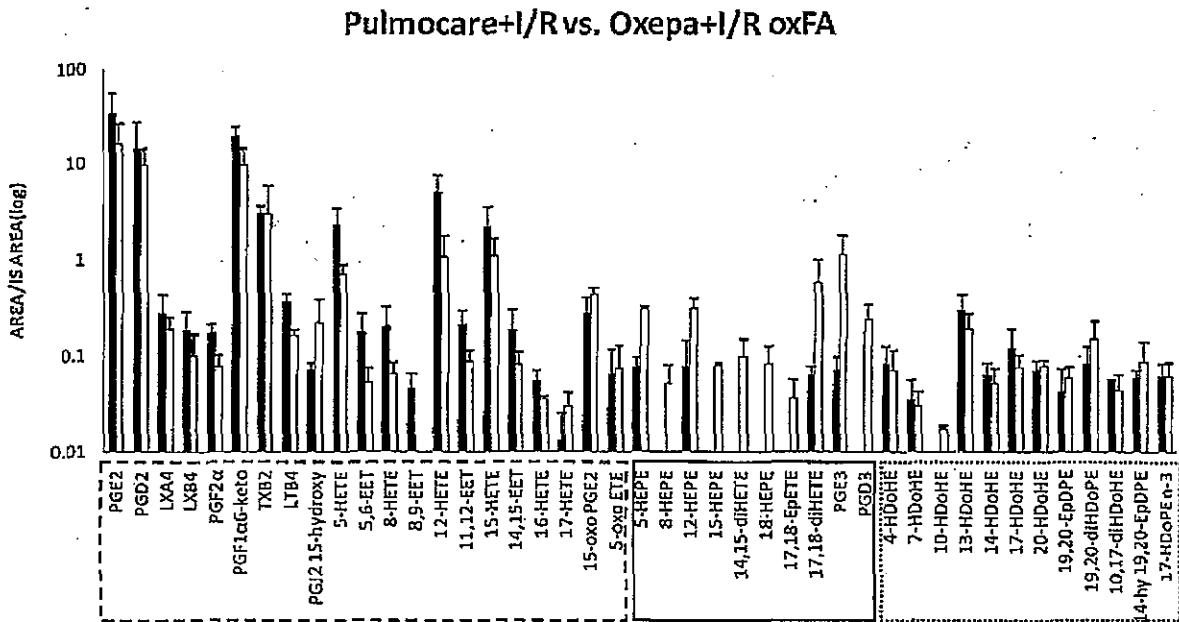


Fig. 4 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

(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 ARA 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)

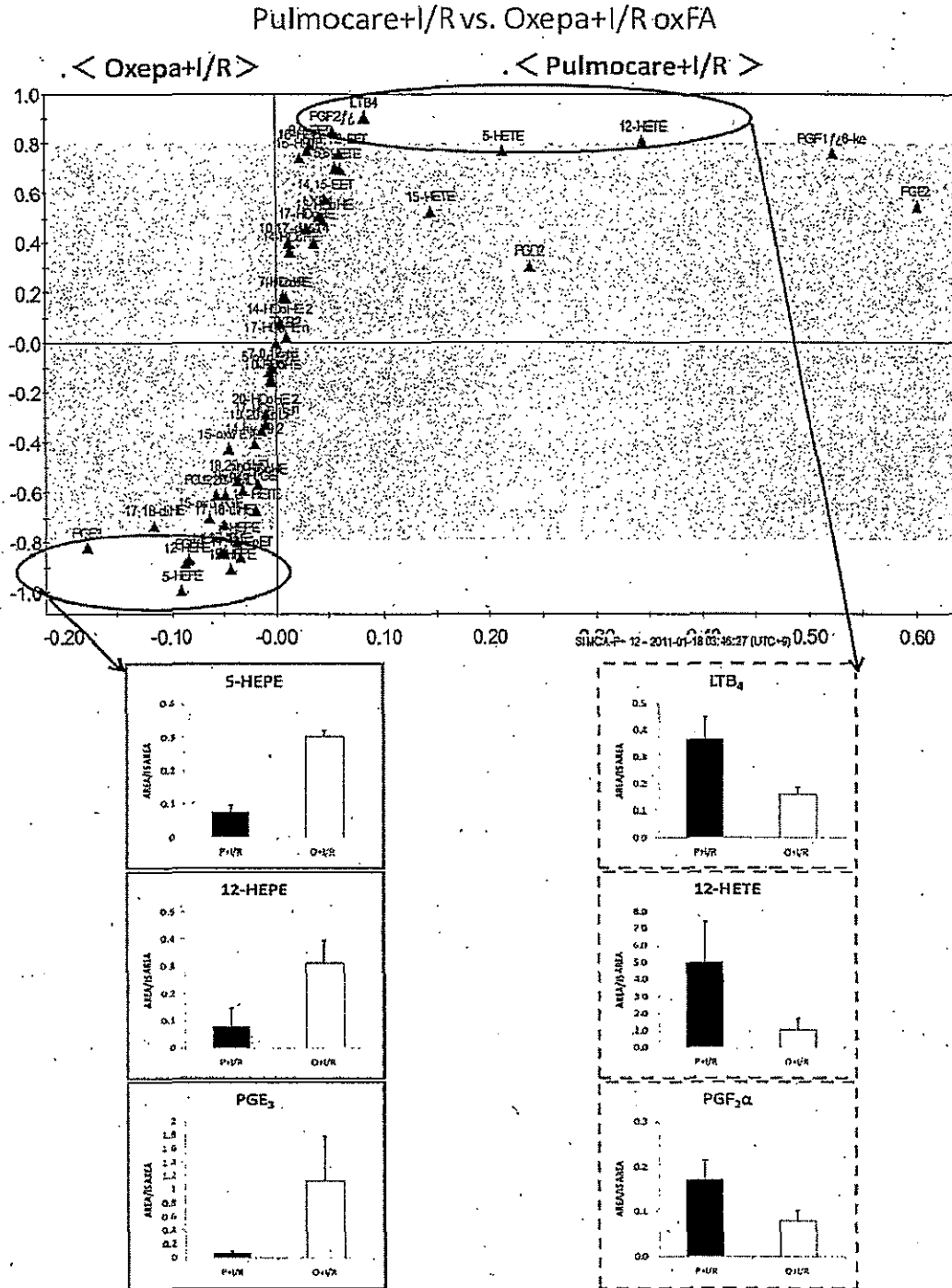


Fig. 4. 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

(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、PGE₃、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。

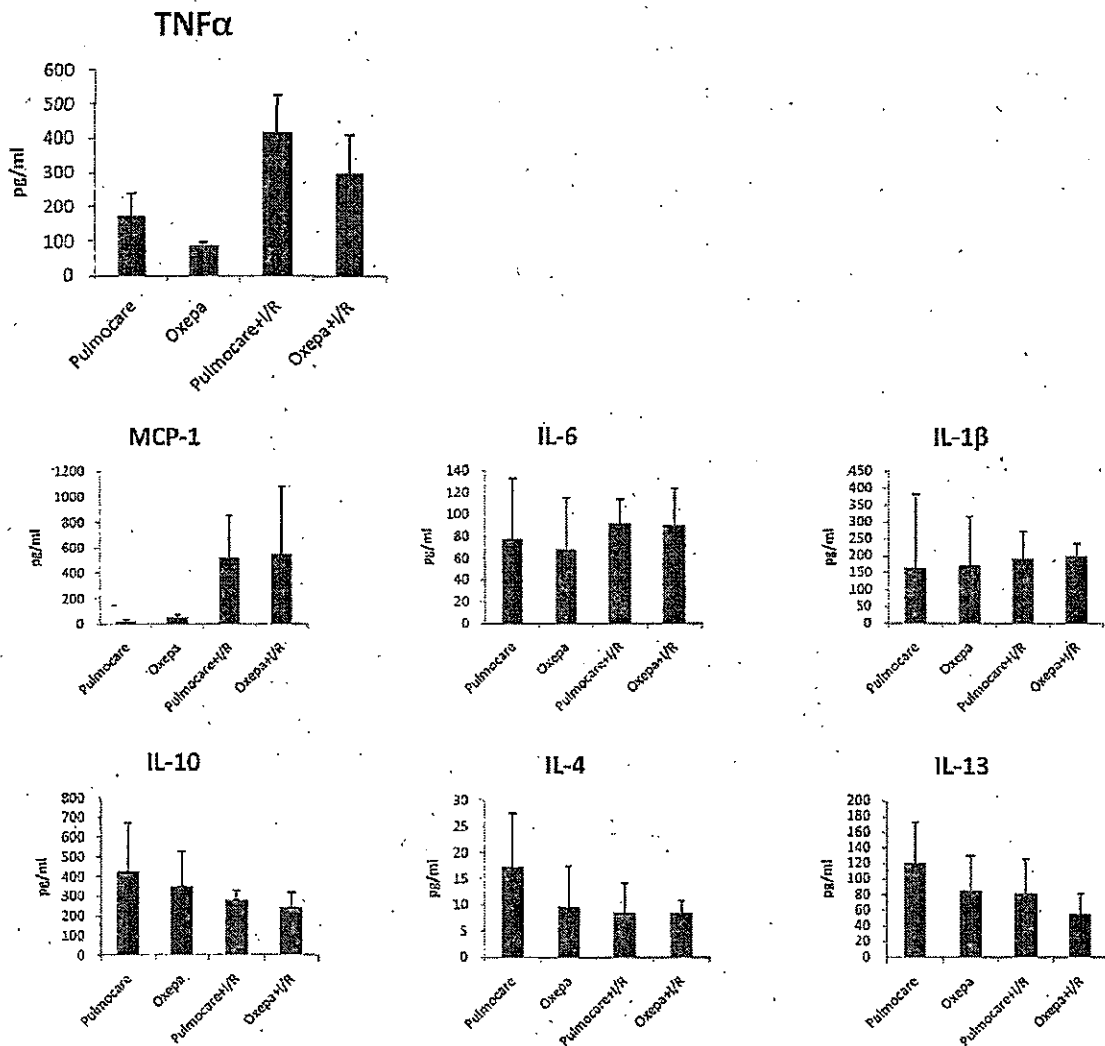


Fig. 5 腸管虚再灌流モデルラット腸管におけるサイトカイン変動

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。

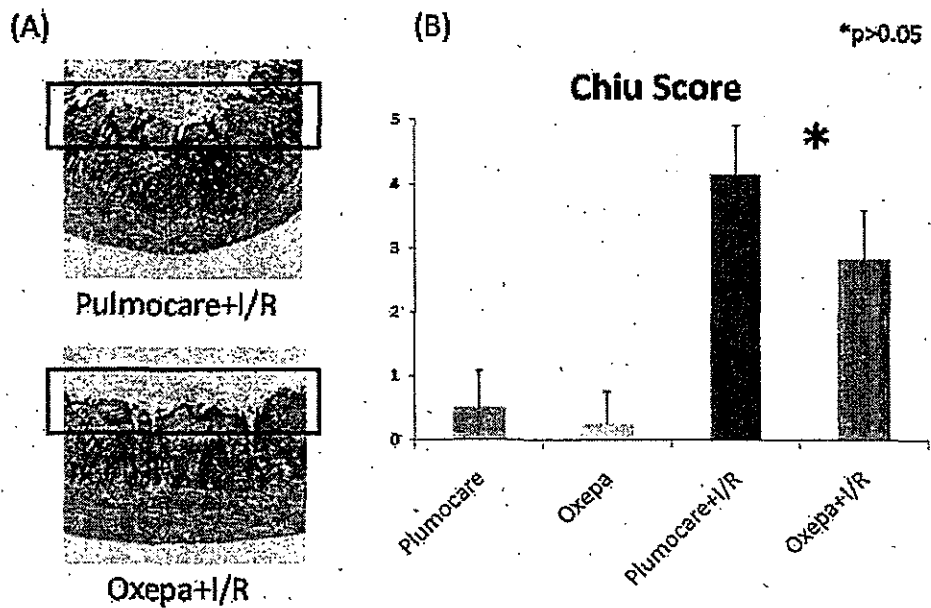


Fig. 6 腸管虚血再灌流モデルラット腸管の組織染色

(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

C-6. ARA 強化食を摂取したマウス胎仔の眼組織リン脂質のメタボローム解析

交配2週間前から高度不飽和脂肪酸含量の異なった4種類の食餌（普通食、普通食に4% ARAを強化した食餌、普通食に4%ドコサヘキサエン酸（DHA）を強化した食餌、あるいは4% ARAと4% DHAの両方を強化した食餌）で飼育したC57BL/6マウスから、E16.5胎仔（♀と♂、各n=4）の眼組織を摘出して総脂質を抽出した。質量分析装置を用いてリン脂質のメタボローム解析を行った結果、以下のことが明らかとなった。

眼組織でも主要なリン脂質であるホスファチジルコリンの分子種組成は、♀、♂とも各食餌群間で大きな違いは認められなかった（Fig. 7A, 7B）。このことから、普通食に4%のARAやDHAを添加しても眼組織の主要リン脂質であるホスファチジルコリンの分子種にはほとんど影響しないことが示された。

ホスファチジルコリンに次いで主要なホスファチジルエタノールアミンの分子種については、ホスファチジルコリンの場合と同様に、食餌群間での違いは見られなかった（Fig. 8A, 8B）。

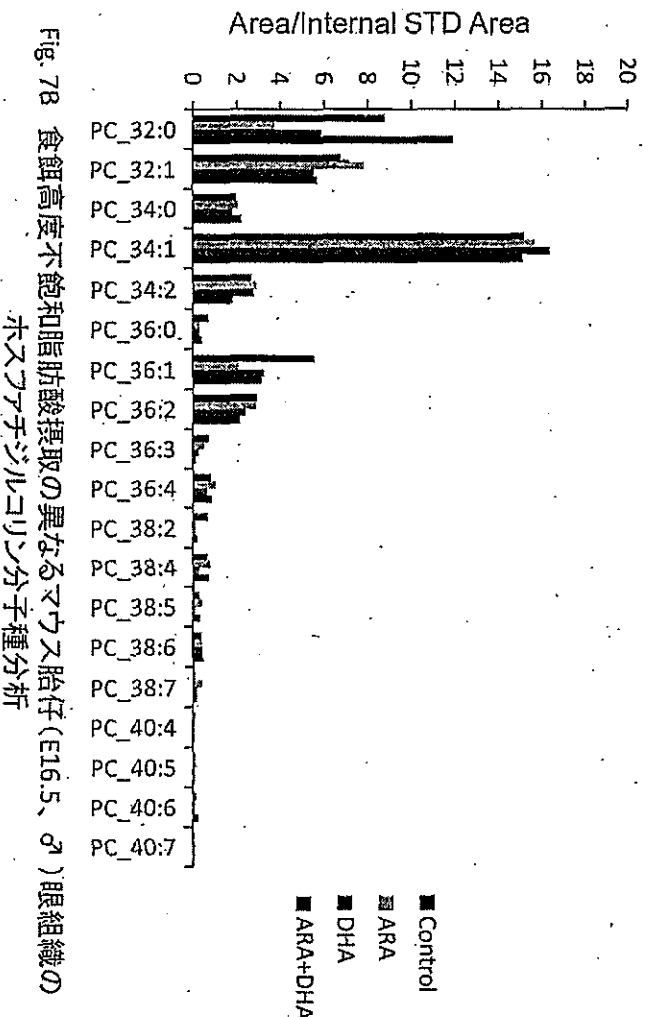
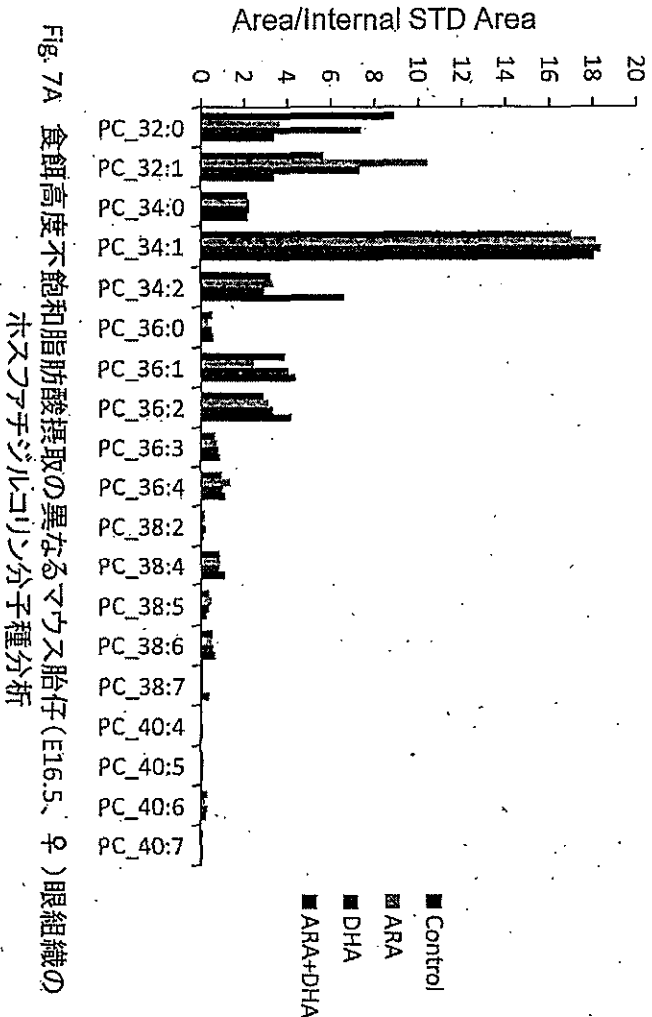
ホスファチジルセリンはホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンに比べると眼組織での含量は少ないが、ARAやDHAなどの高度不飽和脂肪酸を比較的多く結合していることが知られている。Fig. 9Aに示すように、♀の胎仔ではそれぞれの補給を反映してARA補給食では普通食に比べてPS38:4やPS40:4が増加し、DHA補給食ではPS40:6が増えていた。♂においても類似の傾向が認められたが♀に比べて影響は少なかった（Fig. 9B）。

C-7. ARA 強化食を摂取したマウス胎仔の眼組織リゾリン脂質のメタボローム解析

リゾホスファチジルコリンの分子種については、♀のARA強化群でLPC18:1、LPC18:0、LPC16:0、およびLPC20:4の含量が約5から9

倍高かった（Fig. 10A, 10B）。しかし、♂胎仔ではそのような特徴は見られなかった。一方、DHA強化食群は、♂♀胎仔とも普通食と比べて変化がなかった。さらに、ARAとDHAの両方を添加した食餌群ではリゾホスファチジルコリンの蓄積は見られなかった。

リゾホスファチジルエタノールアミンの分子種は、リゾホスファチジルコリンの場合と同様に、♀胎仔のARA強化群でLPE18:1、LPE18:0、LPE22:6、およびLPE20:4の含量が特徴的に高かった（Fig. 11A, 11B）。一方、DHA強化食群やDHAとARAの両方を添加した食餌群では、♂♀胎仔とも普通食に比べてリゾホスファチジルエタノールアミン分子種の変化は認められなかった。



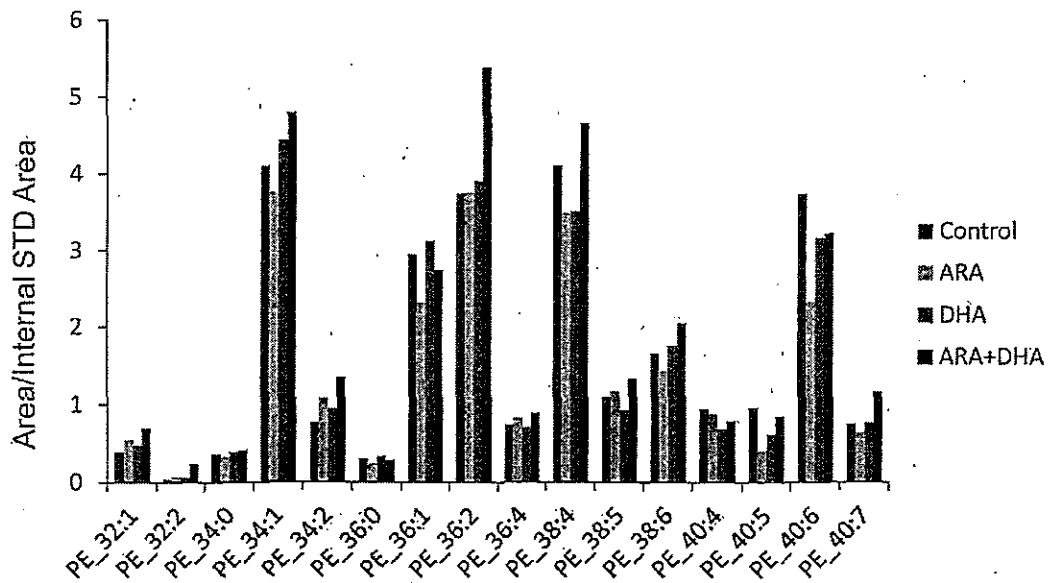


Fig. 8A 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♀)眼組織のホスファチジルエタノールアミン分子種分析

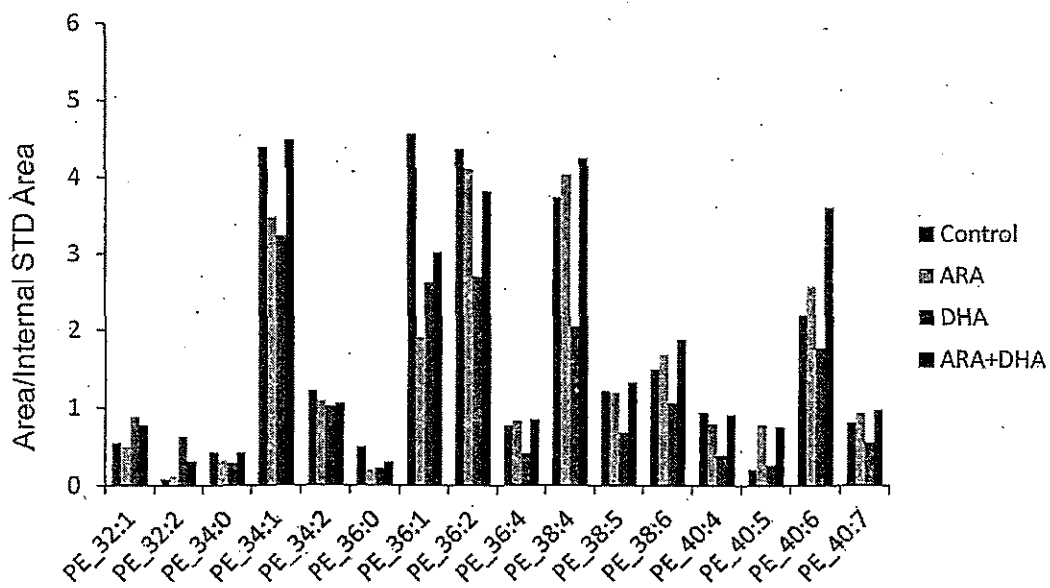


Fig. 8B 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♂)眼組織のホスファチジルエタノールアミン分子種分析

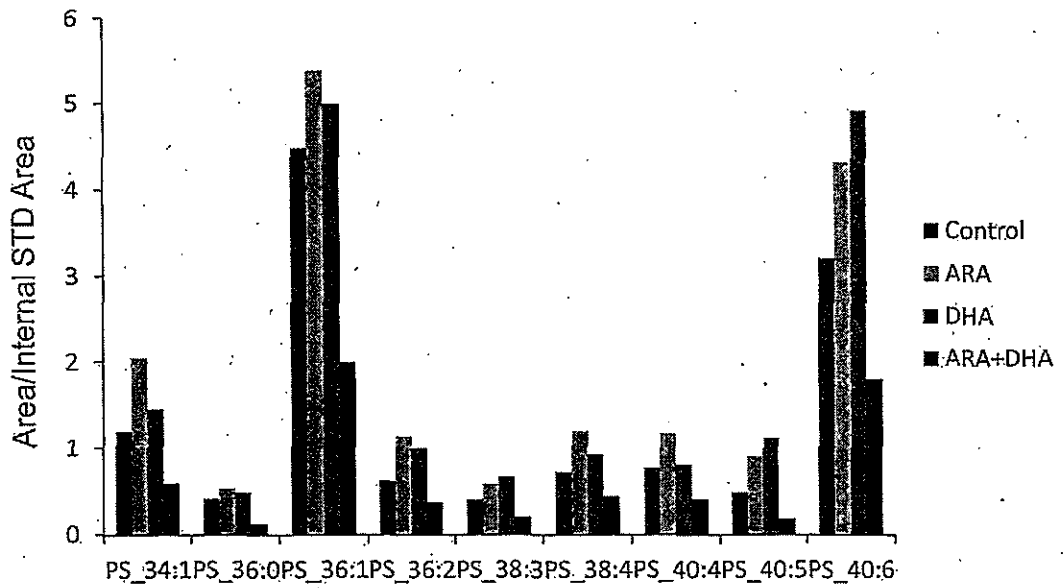


Fig. 9A 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♀)眼組織のホスファチジルセリン分子種分析

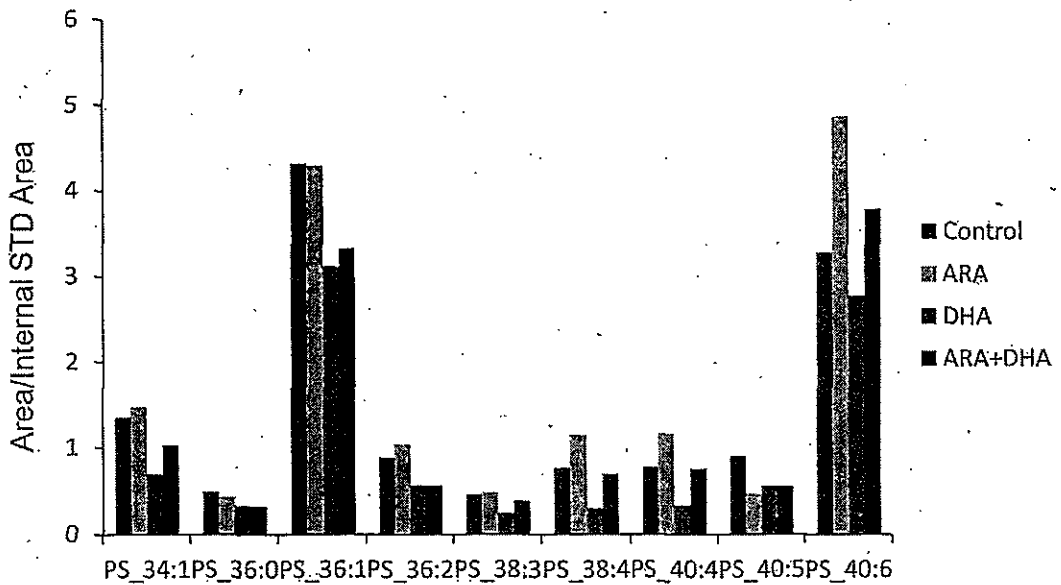


Fig. 9B 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♂)眼組織のホスファチジルセリン分子種分析

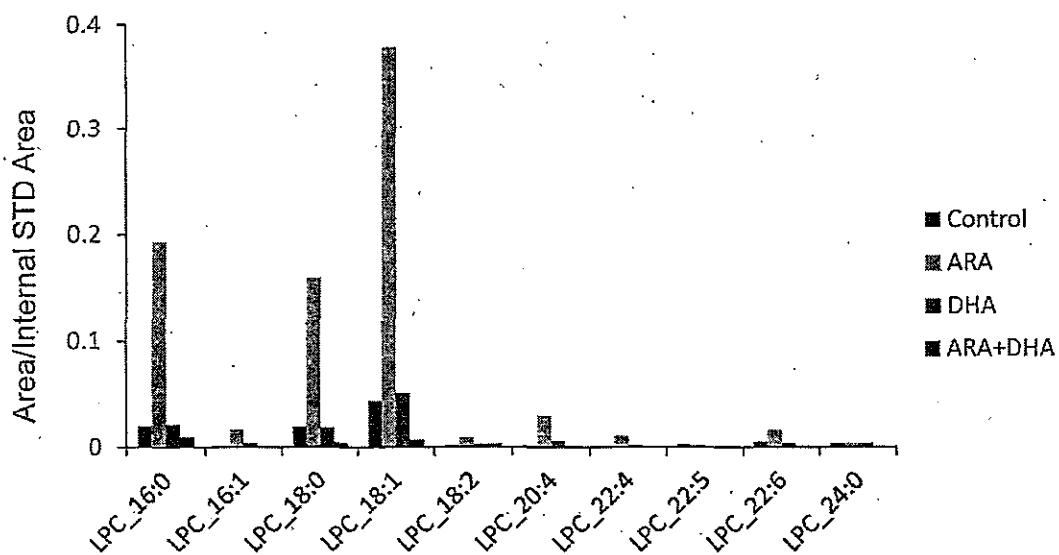


Fig. 10A 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔 (E16.5、♀) 眼組織のリゾホスファチジルコリン分子種分析

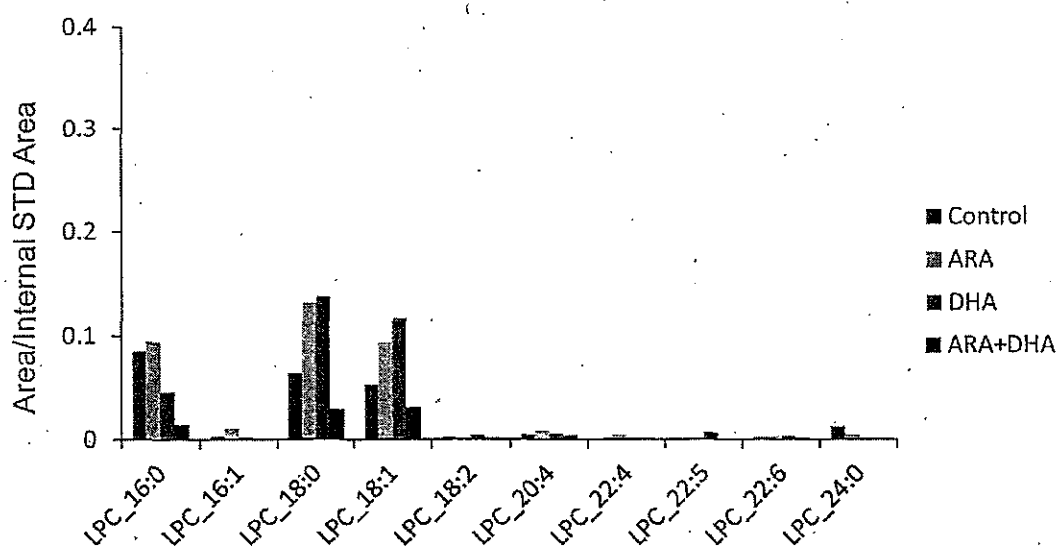


Fig. 10B 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔 (E16.5、♂) 眼組織のリゾホスファチジルコリン分子種分析

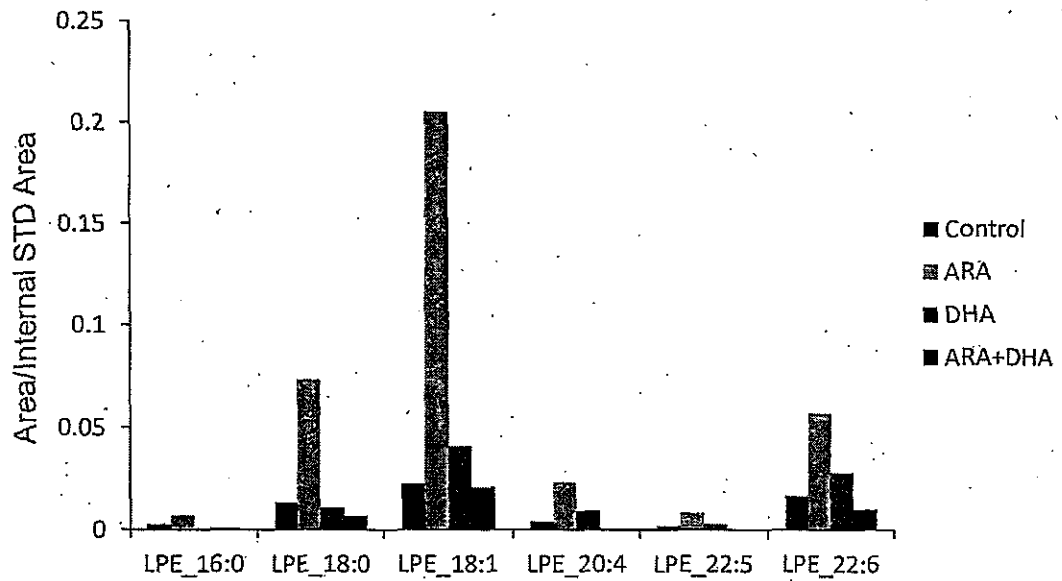


Fig. 11A 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔 (E16.5、♀) 眼組織のリゾホスファチジルエタノールアミン分子種分析

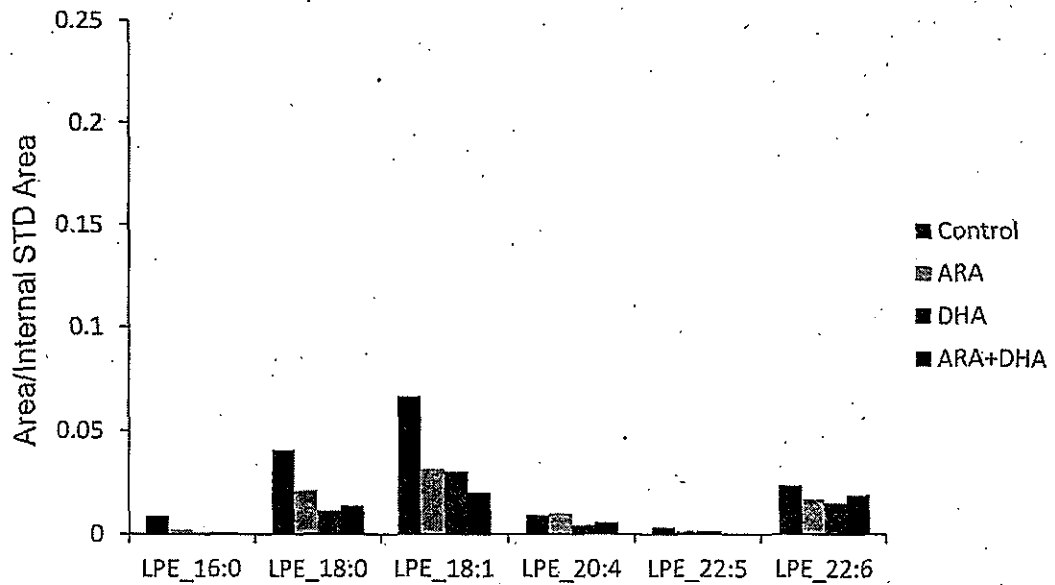


Fig. 11B 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔 (E16.5、♂) 眼組織のリゾホスファチジルエタノールアミン分子種分析

D. 考察

D-1. 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での脂質メタボローム解析

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。ARA・DHAに関しては横ばい、もしくは減少の傾向を示し、ARA/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。ARA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ARA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、炎症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ARA

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。

D-2. マウス眼組織形成へのARA補給の影響

眼組織の発達異常が起こりやすい系統であるC57BL/6マウスに対して、交配2週間前から普通食にARAを4%添加した食餌で飼育した場合、E16.5♀胎仔の眼組織中のリゾリン脂質(リゾホスファチジルコリンとリゾホスファチジルエタノールアミン)が高かった。♂においてはこのような違いは見られず、♀に特徴的な現象であった。ARA強化食によるC57BL/6マウスの眼組織形成異常は、♀において顕著であることが報告されており(Maekawa et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 402: 431-437, 2010)、今回の結果はたいへん興味深い。C57BL/6マウス以外の眼組織形成異常が起こりにくいマウス系統との比較検討も今後行われる必要がある。

一方、DHA添加ではリゾリン脂質の蓄積はなく、さらにARAと一緒にDHAを添加することによりリゾリン脂質の蓄積が見られなくなった。したがって、DHAはARAの効果を打ち消す作用を有していると考えられる。

飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸を含有したリゾリン脂質分子種が増加していることから、ARA強化食によって♀マウス胎仔の眼組織においてある種のホスホリパーゼA₂が活性化されていることが考えられる。最近我々は、リゾホスファチジルコリンやリゾホスファチジルエタノールアミンが、ラットでの出血性ショック時にリンパ液中に蓄積して炎症を増悪していることを明らかにした。その際には、Ca²⁺-非依存的ホスホリパーゼA₂ γ が関わっている。本研究テーマである眼組織形成におけるリゾリン脂質の蓄積に関しても、今後、各種ホスホリパー

ゼ A₂ 遺伝子の発現量や酵素タンパク質量を解析する必要がある。

一方で、眼組織の形成に関わる各種遺伝子の発現については、前川らが詳しく解析しているが、これら *Pitx3* や *Pax6* 遺伝子の発現にリゾリン脂質の蓄積がどのように関わっているかも形成異常の機構を探る上で興味深い。

本研究ではリン脂質に焦点を当てて解析したが、ARA をはじめとする遊離脂肪酸やその他の脂質を定量解析することにより、眼組織形成と ARA 強化食の関係をさらに明らかにすることができる。また、眼組織以外の組織、臓器中のリン脂質メタボローム解析もメカニズムを探る上での残された課題である。

E. 結論

本研究の初年度は、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。

第二年度は、眼組織の発達異常が起こりやすい系統である C57BL/6 マウスに対して、交配 2 週間前から普通食に ARA を 4% 添加した食餌で飼育し、眼組織の脂質分子種について脂質メタボローム解析を行った。その結果、E16.5 胎仔の眼組織中においてリゾリン脂質（リゾホスファチジルコリンとリゾホスファチジルエタノールアミン）の蓄積が認められた。♂ではリゾリン脂質の蓄積は見られず、♀に特徴的な現象であり、眼組織の形体異常が♂よりも♀で顕著であることと一致していた。以上より、ARA 強化食による眼組織でのリゾリン脂質蓄積が、眼の発生や形体形成と関わっていること

が示唆された。

F. 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 眞由美、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回医用マスメクトル学会(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 Phospholipase A₂ 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.
- F) 佐藤 格夫、遠藤 奈保子、鈴木 崇生、朝倉隆之、朱 然、西山 慶、大鶴 繁、加藤 源太、趙 晃濟、小林 哲幸、小池 薫: EPA, γ -リノレン酸を強化した栄養剤投与による侵襲下での脂肪酸代謝動態の影響。日本外科代謝栄養学会第48回学術集会(名古屋国際会議場)、2011.7.7-8
- G) 三上さおり、森下幸治、横山友里、小林哲幸、大友康裕: ヒト好中球の生理活性の発現にカルシウム非依存的ホスホリパーゼ A₂ が関与する。第26回日本Shock学会総会(アクトシティ浜松コンgresセンター)、平成23年5月20-21日
- H) 横山友里、三上さおり、森下幸治、相星惇一、大友康裕、小林哲幸: ラット出血性ショックにおけるカルシウム非依存性ホスホリパーゼ A₂ の関与。第84回日本生化学会大会(国立京都国際会館)、平成23年9月21-24日
- I) 下華奈子、武富芳隆、三木寿美、小島卓巳、小林哲幸、山本圭、村上誠: アトピー性皮膚炎モデルにおける分泌性ホスホリパーゼ A₂ 分子群の機能解析。第84回日本生化学会大会(国立京都国際会館)、平成23年9月21-24日

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進事業） 総合研究報告書

「発癌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)食品薬品安全センター秦野研究所副所長

研究要旨

アラキドン酸 (ARA) の発癌プロモーション効果を評価する目的で中期多臓器発癌試験による発癌性評価実験を実施した。F344 雄ラット 100 匹を 1 群 20 匹の 5 群に分け、4 群は多臓器発癌イニシエーション (Init) 処置のため *N*-diethylnitrosamine (100 mg/kg, i.p.)、*N*-methyl-*N*-nitrosourea (20 mg/kg, i.p.) を第 1、2 週に 4 回、1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (40mg/kg, i.s.c) を第 3、4 週に 4 回、第 1、2 週に飲水に混じた *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (0.05%) を、Dihydroxy-di-*N*-propylnitrosamine は 0.1% 濃度で飲水に混じて第 3、4 週に投与し、ARA 摂取量が 0、60、250 および 1000 mg/kg 体重となるように ARA 含有油を混じた粉末飼料を、Init 無処置群には媒体を投与し、高用量 ARA 混餌飼料を第 6 から 24 週間自由摂取させた。投与期間中は定期的に一般状態観察、体重および摂餌量を測定し、投与期間終了後、血液学的検査、剖検、器官重量測定および組織学的検査を実施した。1 日当たり ARA 摂取量は低、中、高用量群でそれぞれ 70、292、1183 mg/kg 体重、Init 無処置群では 1060 mg/kg 体重であった。Init 処置した対照群と各 ARA 投与群間では一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査結果、生存率、担癌動物発生率に差はなかったが、器官別腫瘍発生率では膀胱の乳頭腫が対照、低、中、高用量群でそれぞれ 1、3、5、7 例と高用量群で有意に発生頻度 ($p < 0.05$) が高く、投与用量に応じて増加傾向もみられた ($p < 0.01$)。以上の結果から、本実験下において、ARA は膀胱粘膜における乳頭腫発生を促進させる作用を有することが明らかになった。

A. 研究目的

アラキドン酸 (ARA) 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* 評価系において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、ARA 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 (F344/DuCr1Crlj、日本チャールス・リバー) 100 匹を 1 群 20 匹

の 5 群に分け、このうち 4 群には ARA 投与に先立ち、以下の 5 種類のイニシエータを投与した。イニシエーション (Init) 処置は *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 回皮下投与した。また、*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine を 0.05% 濃度で飲料水に混じて第 1 および 2 週に、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 (Figure 1)。Init 処置期間中は摂水量を測定した (Table 2)。Init 処置後1週間から対照、低用量、中用量、高用量の4群に、ARA 投与量が0、60、250 および 1000 mg/kg 体重、公比4となるように、ARA 油 (Lot No.10050701、CABIO、中国) を0、32、134 および 538 g/kg の濃度で混ぜた CE-2 粉末飼料 (日本クレア) を各群に実験第6週から第29週までの24週間自由摂取させた。Init 無処置群20匹には Init 処置に用いた媒体を投与したのち、高用量群と同じ ARA 油濃度 538 g/kg の飼料を与えた。各群の飼料中の総油脂量は混合油 (2.5% ラード、1.25% カノーラ油、1.25% 大豆油) で同一となるように調整した。なお、ARA 油は 434.3 mg/g の ARA を含有していた。

ARA 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。24週間の投与終了後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部後大静脈より採血して血液学的検査 (赤血球数、ヘマトクリット値、血色素量、網状赤血球比率、MCV、MCH、MCHC、白血球数、白血球分類、血小板数:XT-2000iV、シスメックス) を実施した。その後、全例を剖検し、器官重量 (脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体、前立腺、顎下腺、下垂体、甲状腺、副腎) を測定し、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した。

対照群に対する各被験物質投与群の有意差検定は以下の方法で行った。生存時間は Log-rank 検定、腫瘍発生率は Fisher's exact probability test (片側、有意水準 1%、5%)、腫瘍発生の用量依存性については Cochran-Armitage 検定を実施した。体重、摂餌量、摂水量、血液学検査および器官重量は群毎に平均値、標準偏差を算出し、Bartlett の方法に

より分散の一様性について検定を行った。分散が一様であった場合は一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められる場合は、Dunnnett 法により多重比較を行った。一方、分散が一様でなかった場合は Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意性が認められた場合は、Dunnnett 型の検定法で多重比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、財団法人食品薬品安全センター秦野研究所「動物実験に関する指針」にもとづき、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

生存率 (Figure 2) および一般状態

ARA 投与期間中、Init 処置した対照、低、中および高用量群で、それぞれ4、3、8 および5例の死亡および瀕死屠殺例がみられた。最初の死亡例は投与第86日の高用量群の1例であり、投与第10週から立毛、被毛の汚れおよび削瘦が認められた。その他の Init 処置対照、低、中用量群では、それぞれ投与第17、23 および15週以降に死亡あるいは切迫屠殺動物が認められた。投与期間終了時の Init 処置対照、低、中、高用量群の生存率はそれぞれ80、85、60 および75%であったが、対照群との間に生存率の差はなかった。

一般状態の変化として、貧血は Init 処置対照、低および高用量群でも、それぞれ投与第17、22 および23週以降に認められ、投与期間中、Init 処置各群で、それぞれ3、1、4 および2例で観察された。また、Init 処置群では、赤色尿がそれぞれ投与第17、18、11 および14週以降に4、6、6 および11例で観察された。赤色便あるいは黒色便がそれぞれ投与第21、17、14 および15週以降に4、2、4 および6例で認

められた。軟便あるいは下痢便がそれぞれ投与第23、17、13および15週以降に4、1、4および3例で観察された。その他、腹部の膨隆が対照および低用量群の各1例に、頭部の浮腫が低、中、高用量群各1例、後肢麻痺が対照、中、高用量群の各1例で観察された。さらに、Init処置群では触診により腫瘤が確認され、それぞれ投与第16、18、16および14週以降に腫瘤が観察された。

Init無処置群では一般状態の変化は認められなかった。

体重 (Table 1-1 ~ 1-2, Figure 3)

Init処置群では、観察期間を通じて対照とARA投与各群の間に有意な体重の差はみられなかった。Init無処置群の体重はInit処置対照群と比較して有意に高かった。

摂餌量 (Table 2-1 ~ 2-2, Figure 4)

Init処置群では、投与第1日に高用量群で対照群と比較して有意な摂餌量減少が観察されたが、以後、投与終了時まで有意な摂餌量の差はみられなかった。観察第29日以降、Init無処置群の摂餌量はInit処置対照群と比較して有意に高かった。

ARA摂取量 (Table 4-1 ~ 4-2)

体重および摂餌量から算出されたInit処置群のARA摂取量は、投与第1あるいは第8日に最大摂取量を示したのち漸減し、低用量群では第162日、中用量群では第106日、高用量群では第148日に最小摂取量となった。1日平均ARA摂取量は、低用量群が70.2 mg/kg、中用量群が291.9 mg/kg、高用量群では1182.8 mg/kg、Init無処置群では1060.2 mg/kgとなった。投与期間終了時生存例における1匹当たり平均総ARA摂取量は、低用量群では3043.8 mg、中用量群では12423.6 mg、高用量群では49578.3 mg、Init無処置群では55640.5 mgであった。

血液学的検査 (Table 5)

Init処置対照と低、中、高用量群間では有意な差は認められなかった。Init無処置群とInit処置対照群を比較すると、Init無処置対照群では赤血球数、ヘマトクリット値、血色素量、MCHCおよび白血球数の有意な増加、網状赤血球比率の有意な低下がみられた。

器官重量 (Table 6 ~ 7)

Init処置高用量群では対照群に比較して、心臓、肝臓および顎下腺の実重量および比体重重量の有意な増加がみられ、顎下腺の実重量の有意な増加は中用量群においても認められた。Init無処置対照群の多くの器官では表に示したようにInit処置対照群と比較し実重量および比体重重量ともに有意差がみられた。

剖検所見

Init無処置群では全例のいずれの器官においても肉眼的に結節あるいは腫瘤性変化は認められなかった。

Init処置群では胸水の貯留が各群の1~3例に、腹水の貯留が対照群、低および中用量群のそれぞれ3例に観察された。結節あるいは腫瘤性変化は、主として肺、甲状腺、消化管、腎臓に對照群を含む各投与群に観察された。肝臓には表面の粗造化、微小変色点が多く例に観察された。

組織学所見 (Table 8 ~ 9)

投与期間中の死亡あるいは瀕死例では全例に腫瘍が認められたことから、偶発死亡例はなく全群の全例が有効例と判断された (Table 8)。

造血系組織、肺、甲状腺、腎臓、膀胱、小腸、大腸に観察された代表的腫瘍、過形成、これらの器官における腫瘍の発生頻度を、有効例数に対する腫瘍性変化発生数とその百分比、投与終了時生存例数に対するそれらの発生数および百分比としてTable 9に示した。有効例のうち、全身に何らかの腫瘍を有していた例数は、Init

処置群の全群全例であった。良性、悪性腫瘍別に Init 処置した対照群と各 ARA 投与群を比較した結果においても腫瘍発生頻度に差はなかった。さらに、投与終了時生存例で良性、悪性腫瘍別に比較した場合にも、対照群と各 ARA 投与群の間に発生頻度の差はなかった。

Init 処置動物の器官別腫瘍発生率を有効例で比較した場合、膀胱の乳頭腫が対照、低、中、高用量群でそれぞれ1、3、5、7例と高用量群での発生例数が対照群に比較して有意に高く ($p < 0.05$)、用量とともに発生頻度も増加し ($p < 0.01$)、投与終了時生存例における発生頻度も高用量群で有意に高かった ($p < 0.01$)。さらに、投与終了時生存例における腎臓移行上皮から発生した乳頭腫は、対照、低、中、高用量群でそれぞれ0、2、2、3例であり、投与終了時生存例で比較すると用量相関性がみられた ($p < 0.05$)。

肺では、中用量群で腺腫、低用量群では肺胞・細気管支上皮の過形成の発生頻度がそれぞれ対照群と比較して低下した。

甲状腺ではろ胞上皮細胞由来の腺腫の発生頻度が対照群と比較して中用量群で低下し、ろ胞上皮細胞の過形成は高用量群で発生頻度が有意に高かった。

このほか、造血系組織では胸腺から発生した悪性リンパ腫および過形成、腎臓の腎芽腫、小および大腸粘膜上皮から発生した腺腫、腺癌などの発生例数を表に示したが、いずれも対照群との間に発生頻度の差は認められなかった。肝臓には肝細胞由来腺腫が Init 処置対照群1例、高用量群2例に見られたほか、全例に多数の変異細胞巣が観察された。

また、皮膚、皮下組織、舌、ジンバル腺を含めた観察器官・組織には散発的に少数例で腫瘍発生が見られた。

Init 無処置群では腫瘍発生はなかった。

非腫瘍性病変では、Init 処置対照群と高用量群の間で発生頻度および変化の程度に有意差のみられる所見はなかった。

D. 考察

ARA 摂取の安全性評価として、非遺伝毒性物質の発癌プロモーション活性を比較的短期間に評価できる試験法であり、医薬品非臨床試験ガイドラインにおいても推奨されている中期多臓器発癌試験を実施した。

組織学的検索結果から、Init 処置した動物の80匹全例に何らかの腫瘍の発生が確認され、Init 非処置動物には腫瘍発生はなかったことから、発癌プロモーション作用を評価する試験系として適切に実施された試験と考えられる。

用量設定は、1日当りの ARA 摂取量を 1000 mg/kg 体重を高用量とし、以下は公比4とし、中用量は 250 mg/kg に、低用量は 60 mg/kg を想定し混餌検体を調製したが、体重および摂餌量から算出した ARA 平均摂取量は約 70、300、1200 mg/kg と予想摂取量を上回る結果となった。Init 無処置群での ARA 摂取量は約 1060 mg/kg であった、Init 処置した対照群と ARA 投与群間では体重、摂餌量に有意差は認められなかったことから、Init 処置に関連した体重、摂餌量の低下に起因するものと考えられる。

血液学的検査で Init 無処置対照群にみられた赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、平均赤血球血色素量濃度の有意な増加は、これらの値自体は正常値範囲にあることから、逆に Init 処置対照群の赤血球系各測定値が低いことから生じた有意差と判断される。Init 無処置対照群のその他の血液学的検査結果を背景値と比較すると白血球の増加、好中球比率低下、リンパ球比率増加、血小板数低下が伺えた。器官重量についても同様で、Init 無処置対照群に観察された多くの有意差は Init 処置対照群での値が低いことを示すものと考えられる。

Init 処置で飲水投与した N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosoamine (BBN) は膀胱に癌を誘発させる化学物質として知られている。Init 処置期間中の飲水量に群間差はなかったこ

とから、BBN 摂取量にも群間差はなかったと考えられる。Init 処置対照群では乳頭腫が1例と発生数は少なかったが、前癌病変として膀胱粘膜上皮である移行上皮細胞の過形成が12例に観察されている。さらに、移行上皮の過形成は低用量群6例、中用量群3例と発生が減少、一方、乳頭腫はそれぞれ3、5例と増加した。これらの結果は、ARA 投与により過形成から乳頭腫への発癌過程が促進された可能性を示すものと考えられる。さらに、膀胱粘膜と同じく移行上皮で覆われている腎臓腎盂から発生した乳頭腫においても、対照群に発生はなく、低および中用量群2例、高用量群3例と統計学的な有意差はないが、ARA 投与用量増加とともに乳頭腫の発生が増え、移行上皮の過形成は対照群5例、低用量群4例、中用量群3例と膀胱移行上皮の過形成と同様に減少が認められた。これら膀胱および腎臓の乳頭腫、過形成の結果から、膀胱に観察された用量に相関した乳頭腫の増加は、対照群での乳頭腫の発生頻度が低いことに起因した偶発的な統計学的有意差ではなく、ARA 投与に関連した生物学的意味を反映した結果と考えられる。

今回、Init 処置群では対照を含め各 ARA 投与群に大腸腺癌の発生が見られたが、対照と ARA 投与群の間で発生頻度に差はなかった。自然発生性消化管腫瘍は、今回使用した F344 系ラットでは発生がまれなことが知られている。ARA はシクロオキシゲナーゼ (COX) によりプロスタノイドに代謝されるが、COX 阻害剤であるアスピリンを代表とする非ステロイド系抗炎症剤投与が大腸癌発生を抑制することは疫学的にも明らかにされている。さらに、ラットを用いたブチルニトロソアミン誘発膀胱腫瘍では COX-2 阻害剤投与により腫瘍発生が抑制されるという報告がある。これら COX 阻害剤の抗癌効果を考慮すると、今回 ARA 投与下に得られた膀胱腫瘍発生に用量相関性がみられたことは妥当な結果と考えられる。一方、腸管粘膜から発生した腺癌の結果は ARA 用量に関連

がみられなかったことは、消化管粘膜上皮と移行上皮という細胞の違いに起因する可能性など、少なくとも COX のみでは説明できない興味ある所見と考えられる。

E. 結論

中期多臓器発癌試験による ARA の発癌プロモーション作用を評価し、ARA は膀胱粘膜から発生する乳頭腫発生を促進することが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

学会発表

立花滋博、青木聡子、安藤米里子、斉藤義明、関剛幸、古谷真美、立松憲次郎、大原直樹、永田伴子：アラキドン酸のラットにおける中期多臓器発癌試験。日本脂質栄養学会第 20 回大会 (2011 年 9 月 2、3 日、坂戸市)。

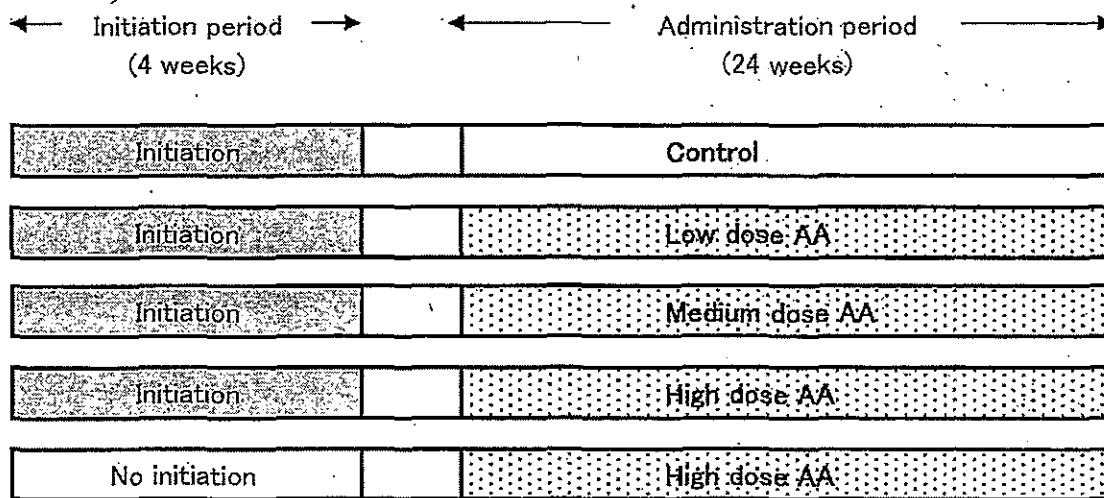


Figure 1. Experimental design of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats

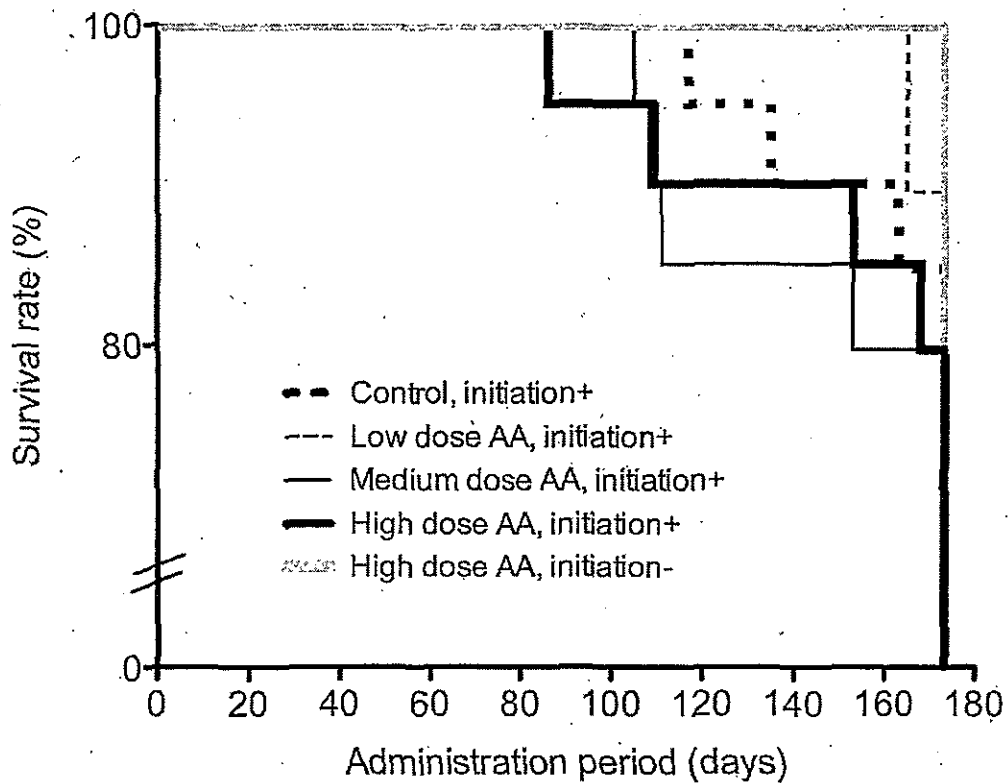


Figure 2. Survival rate of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

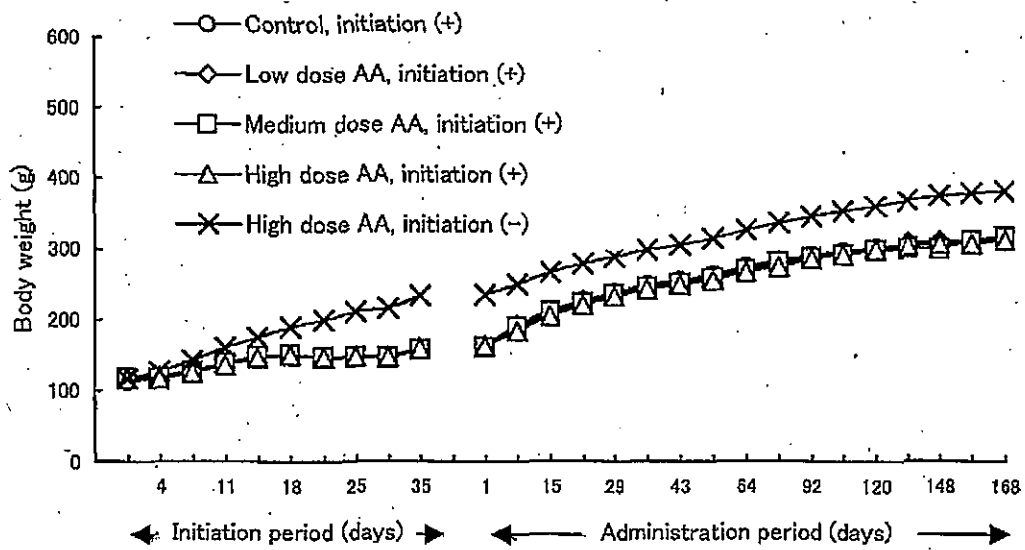


Figure 3 Body weight of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

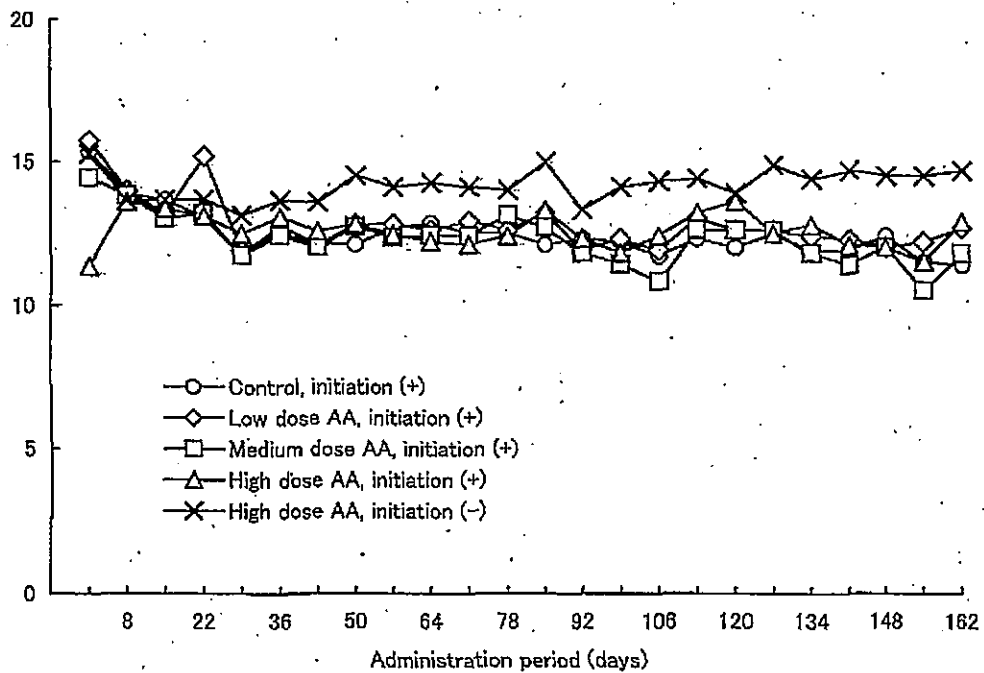


Figure 4 Food intake of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

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

Dose group	Initiation	Initiation period (days)									
		1	4	7	11	14	18	21	25	28	35
Control	+	116.9	118.1	126.6	138.8	148.7	150.2	146.5	147.0	145.7	157.7
		±4.1 (20)	±4.8 (20)	±5.7 (20)	±5.5 (20)	±6.1 (20)	±6.6 (20)	±7.0 (20)	±8.2 (20)	±8.3 (20)	±11.7 (20)
Low	+	118.6	119.8	127.9	139.4	148.1	151.0	147.4	148.5	147.0	160.0
		±4.7 (20)	±5.3 (20)	±8.7 (20)	±7.6 (20)	±7.5 (20)	±7.5 (20)	±6.7 (20)	±8.3 (20)	±8.2 (20)	±12.6 (20)
Medium	+	117.5	118.7	127.4	139.2	148.6	151.0	147.0	147.0	146.6	157.5
		±4.5 (20)	±5.2 (20)	±5.9 (20)	±6.5 (20)	±6.5 (20)	±7.4 (20)	±7.6 (20)	±9.1 (20)	±9.9 (20)	±13.7 (20)
High	+	116.5	117.0	125.6	137.0	146.9	150.5	147.1	148.4	147.7	159.4
		±5.4 (20)	±5.7 (20)	±6.1 (20)	±7.1 (20)	±7.1 (20)	±7.3 (20)	±8.9 (20)	±8.9 (20)	±9.6 (20)	±14.6 (20)
High	-	116.6	127.5 **	142.9 **	160.8 **	174.7 **	189.9 **	199.1 **	210.5 **	215.9 **	233.1 **
		±4.8 (20)	±4.8 (20)	±5.9 (20)	±6.8 (20)	±7.5 (20)	±8.4 (20)	±8.5 (20)	±8.9 (20)	±10.3 (20)	±9.9 (20)

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

* , significant difference from the control, p<0.05

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

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

Dose group	Initiation	Administration period (days)								
		1	8	15	22	29	36	43	50	64
Control	+	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)
Low	+	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)
Medium	+	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)
High	+	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)
High	-	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)

Parameter: mean±S.D.

(-): number of animal

*, significant difference from the control, p<0.05

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

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

Dose group	Initiation	Administration period (days)							
		78	92	106	120	134	148	162	168
Control	+	283.1 ±14.3 (20)	290.6 ±14.8 (20)	296.2 ±16.5 (20)	300.9 ±19.3 (19)	306.2 ±19.1 (18)	306.5 ±22.4 (18)	310.7 ±18.6 (16)	309.6 ±20.2 (16)
Low	+	279.9 ±12.0 (20)	288.8 ±13.1 (20)	293.3 ±15.1 (20)	300.0 ±15.5 (20)	308.4 ±13.3 (20)	311.1 ±16.2 (20)	311.9 ±20.0 (18)	318.0 ±12.5 (17)
Medium	+	280.5 ±14.9 (20)	286.8 ±16.6 (20)	291.4 ±18.2 (19)	297.7 ±17.0 (17)	300.4 ±22.0 (17)	299.3 ±36.6 (16)	310.8 ±26.9 (13)	317.3 ±18.5 (12)
High	+	274.1 ±16.8 (20)	285.3 ±11.1 (19)	291.4 ±11.9 (18)	299.0 ±11.6 (18)	304.2 ±13.8 (18)	306.4 ±18.9 (18)	306.9 ±23.7 (16)	312.6 ±16.3 (15)
High	-	335.9 ** ±13.4 (20)	344.7 ** ±13.1 (20)	352.3 ** ±13.7 (20)	359.5 ** ±13.8 (20)	367.3 ** ±13.8 (20)	374.8 ** ±14.0 (20)	378.3 ** ±14.3 (20)	381.6 ** ±13.9 (20)

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

* , significant difference from the control, p<0.05

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

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

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

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

*, significant difference from the control, p<0.05

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

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

Dose group	Initiation	Administration period (days)							
		1	8	15	22	29	36	43	50
Control	+	15.4 ±2.0 (20)	13.9 ±1.3 (20)	13.7 ±1.0 (20)	13.0 ±1.1 (20)	11.7 ±0.9 (20)	12.7 ±1.2 (20)	12.1 ±1.0 (20)	12.1 ±0.9 (20)
Low	+	15.7 ±2.2 (20)	14.0 ±1.0 (20)	13.2 ±1.1 (20)	15.2 ±6.1 (20)	11.9 ±1.0 (20)	12.5 ±0.9 (20)	12.1 ±1.0 (20)	12.8 ±0.9 (20)
Medium	+	14.4 ±1.5 (20)	13.8 ±1.2 (20)	13.0 ±0.8 (20)	13.2 ±1.0 (20)	11.7 ±0.9 (20)	12.4 ±1.0 (20)	12.0 ±1.2 (20)	12.7 ±1.1 (20)
High	+	11.3 ** ±2.1 (20)	13.6 ±1.7 (20)	13.3 ±1.4 (20)	13.1 ±1.1 (20)	12.5 ±1.2 (20)	13.1 ±1.2 (20)	12.5 ±1.2 (20)	12.8 ±1.3 (20)
High	-	15.3 ±1.8 (20)	13.6 ±1.3 (20)	13.7 ±0.9 (20)	13.7 ±0.8 (20)	13.1 ** ±1.0 (20)	13.6 * ±1.1 (20)	13.6 ** ±0.7 (20)	14.5 ** ±1.0 (20)

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

* , significant difference from the control, p<0.05

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

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

Dose group	Initiation	Administration period (days)								
		57	64	71	78	85	92	99	106	
Control	+	12.7	12.8	12.5	12.5	12.1	12.3	12.2	11.7	
		±1.1	±2.8	±0.9	±0.8	±2.0	±0.9	±1.2	±0.7	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	
Low	+	12.8	12.6	12.9	12.6	13.2	11.9	12.3	11.9	
		±1.2	±0.9	±1.1	±1.1	±1.1	±1.0	±0.9	±1.5	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	
Medium	+	12.3	12.4	12.4	13.1	12.7	11.8	11.4	10.8	
		±1.1	±1.0	±1.5	±1.1	±1.4	±1.0	±3.0	±3.5	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(19)	
High	+	12.5	12.2	12.1	12.4	13.3	12.3	11.8	12.4	
		±1.2	±1.3	±1.7	±1.4	±1.2	±1.2	±2.9	±1.0	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(19)	(19)	(19)	(18)	
High	-	14.1 **	14.3 **	14.1 **	14.0 **	15.0 **	13.3 **	14.1 **	14.3 **	
		±1.2	±0.8	±1.1	±0.9	±1.0	±0.9	±0.9	±0.9	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

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

Table 4-1 Intake of arachidonic acid (mg/kg/day) in the medium term multi-organ carcinogenesis study in rats

Dose group	Initiation	Administration period (days)									
		1	8	15	22	29	36	43	50	64	
Control	+	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)
Low	+	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)	
Medium	+	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)	
High	+	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)	
High	-	1519.2	1273.3	1198.5	1147.8	1063.2	1070.2	1040.4	1081.1	1023.3	
		±159.5	±98.2	±61.7	±62.4	±69.5	±81.9	±55.0	±67.0	±62.9	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	

Parameter: mean±S.D.
 (): number of animal

Table 4-2 Intake of arachidonic acid (mg/kg/day) in the medium term multi-organ carcinogenesis study in rats

Dose group	Initiation	Administration period (days)							Total intake (mg/ animal)	Average intake (mg/kg/day)
		78	92	106	120	134	148	162		
Control	+	0.0 ±0.0 (20)	0.0 ±0.0 (20)	0.0 ±0.0 (20)	0.0 ±0.0 (19)	0.0 ±0.0 (18)	0.0 ±0.0 (18)	0.0 ±0.0 (16)	0.0 ±0.0 (16)	0.0
Low	+	62.7 ±4.6 (20)	57.0 ±4.4 (20)	56.3 ±5.3 (20)	58.3 ±5.5 (20)	56.0 ±4.6 (20)	53.5 ±4.1 (20)	53.0 ±13.8 (18)	3043.8 ±129.5 (18)	70.2
Medium	+	271.5 ±23.9 (20)	239.6 ±18.8 (20)	214.2 ±67.9 (19)	246.3 ±19.8 (17)	228.3 ±37.2 (17)	230.2 ±37.2 (16)	216.7 ±66.0 (13)	12423.6 ±725.9 (13)	291.9
High	+	1056.7 ±84.4 (20)	1003.8 ±87.2 (19)	993.4 ±73.5 (18)	1064.4 ±103.3 (18)	982.8 ±126.2 (18)	910.8 ±170.7 (18)	979.4 ±112.8 (16)	49578.3 ±3369.3 (16)	1182.8
High	-	972.8 ±75.1 (20)	903.8 ±60.2 (20)	950.0 ±64.7 (20)	903.0 ±62.7 (20)	918.2 ±76.8 (20)	905.2 ±61.7 (20)	908.4 ±69.4 (20)	55640.5 ±2158.8 (20)	1060.2

Parameter: mean±S.D.
(): number of animal

Table 5-1 Hematological analysis of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group	Initiation	RBC (10 ⁴ /uL)	HCT (%)	HGB (g/dL)	RET% (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
Control	+	784 ±174 (16)	37.5 ±5.6 (16)	12.5 ±2.5 (16)	8.62 ±9.21 (16)	49.1 ±7.3 (16)	16.1 ±1.3 (16)	33.0 ±2.5 (16)
Low	+	836 ±118 (17)	38.9 ±4.8 (17)	13.1 ±1.8 (17)	4.79 ±2.42 (17)	46.7 ±1.5 (17)	15.7 ±0.5 (17)	33.8 ±1.1 (17)
Medium	+	834 ±102 (12)	38.7 ±4.1 (12)	12.9 ±1.9 (12)	6.54 ±5.16 (12)	46.5 ±1.5 (12)	15.5 ±0.9 (12)	33.3 ±1.9 (12)
High	+	818 ±127 (15)	39.4 ±4.5 (15)	13.0 ±1.8 (15)	6.79 ±5.96 (15)	48.7 ±3.9 (15)	15.9 ±0.8 (15)	32.8 ±1.6 (15)
High	-	927 ** ±58 (20)	43.1 ** ±1.5 (20)	14.8 ** ±0.5 (20)	3.28 * ±0.49 (20)	46.6 ±1.7 (20)	16.0 ±0.7 (20)	34.4 ** ±1.0 (20)

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

* , significant difference from the control, p<0.05

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

Table 5-2 Hematological analysis of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group	Initiation	WBC (10 ² /uL)	NEUT% (%)	LYMPH% (%)	MONO% (%)	EOSI% (%)	BASO% (%)	PLT (10 ⁴ /uL)
Control	+	54.6 ±38.1 (16)	37.8 ±10.7 (15)	58.5 ±10.7 (15)	2.6 ±0.7 (16)	1.1 ±0.5 (16)	0.0 ±0.1 (16)	53.0 ±15.7 (16)
Low	+	42.2 ±12.9 (17)	32.8 ±8.0 (17)	63.5 ±7.6 (17)	2.6 ±1.2 (17)	1.1 ±0.3 (17)	0.0 ±0.2 (17)	54.4 ±7.1 (17)
Medium	+	50.2 ±26.2 (12)	38.6 ±9.9 (12)	57.5 ±10.2 (12)	2.7 ±0.9 (12)	1.2 ±0.3 (12)	0.0 ±0.1 (12)	61.0 ±19.7 (12)
High	+	44.5 ±8.9 (15)	41.1 ±10.7 (15)	55.1 ±10.9 (15)	2.7 ±1.3 (15)	1.1 ±0.5 (15)	0.0 ±0.1 (15)	55.6 ±19.1 (15)
High	-	56.5 ** ±12.2 (20)	35.6 ±7.6 (20)	60.9 ±8.3 (20)	2.3 ±0.7 (20)	1.1 ±0.4 (20)	0.0 ±0.0 (20)	57.8 ±16.3 (20)

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

* , significant difference from the control, p<0.05

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

Table 6 Absolute organ weight of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group		Control	Low	Medium	High	High
Initiation		+	+	+	+	-
Number of animals		16	17	12	15	20
Body weight	(g)	291.5 ± 18.9	298.8 ± 12.1	297.6 ± 18.4	293.3 ± 15.5	362.0 ± 14.5 **
Brain	(mg)	1868.8 ± 52.1	1872.7 ± 43.3	1866.8 ± 45.2	1874.6 ± 38.6	1951.2 ± 34.5 **
Thymus	(mg)	127.7 ± 171.8	289.8 ± 890.3	83.0 ± 41.8	682.0 ± 2282.9	89.0 ± 8.9 (19)
Heart	(mg)	861.3 ± 77.6	874.1 ± 43.7	900.5 ± 51.9	941.5 ± 48.2 **	1011.9 ± 46.6 **
Lungs	(mg)	1079.2 ± 67.5	1083.9 ± 60.8	1069.3 ± 68.1	1141.4 ± 207.8	974.1 ± 35.6 **
Liver	(mg)	7385.7 ± 704.0	7253.7 ± 634.5	7556.6 ± 536.3	8264.9 ± 646.8 **	9155.5 ± 449.7 **
Kidneys	(mg)	2206.0 ± 576.3 (15)	2145.7 ± 248.7	2416.7 ± 831.1 (11)	2128.8 ± 266.1	2059.1 ± 108.1
Spleen	(mg)	982.3 ± 392.4	826.5 ± 96.5	966.2 ± 260.5	934.2 ± 228.2	743.2 ± 38.3 **
Testes	(mg)	2242.0 ± 297.8	2179.3 ± 451.5	2161.4 ± 259.7	2299.7 ± 239.2	3164.8 ± 85.1 **
Epididymides	(mg)	606.0 ± 104.7	642.2 ± 105.6	647.0 ± 68.1	659.4 ± 67.8	959.2 ± 38.2 **
Prostate	(mg)	231.1 ± 50.0	228.6 ± 62.1 (16)	225.3 ± 48.0	239.6 ± 74.5	307.5 ± 68.5 **
Submandibular glands	(mg)	451.2 ± 49.6	488.2 ± 27.1	499.8 ± 34.3 *	501.7 ± 28.3 *	544.3 ± 24.0 **
Pituitary gland	(mg)	6.9 ± 0.8	7.7 ± 3.8	7.0 ± 0.6	6.7 ± 0.6	8.0 ± 0.7 **
Thyroid gland	(mg)	19.8 ± 7.0	31.5 ± 43.1	30.1 ± 27.2	30.3 ± 20.6	15.0 ± 1.7 *
Adrenal glands	(mg)	38.5 ± 8.4	35.7 ± 2.4	36.2 ± 2.9	40.8 ± 6.7	38.1 ± 3.3

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

* , significant difference from the control, p<0.05

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

Table 7 Relative organ weight (mg%) of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group		Control		Low		Medium		High		High	
Initiation		+		+		+		+			
Number of animals		16		17		12		15		20	
Body weight	(g)	291.5 ± 18.9		298.8 ± 12.1		297.6 ± 18.4		293.3 ± 15.5		362.0 ± 14.5	**
Brain	(mg%)	643.59 ± 43.56		627.68 ± 26.50		629.62 ± 43.76		640.60 ± 33.26		539.70 ± 19.69	**
Thymus	(mg%)	43.40 ± 56.66		97.18 ± 298.45		27.90 ± 14.18		235.60 ± 788.30		24.52 ± 2.54	(19)
Heart	(mg%)	296.47 ± 30.92		292.72 ± 12.97		303.23 ± 20.20		321.56 ± 19.20 *		279.61 ± 8.58	**
Lungs	(mg%)	371.37 ± 28.95		363.00 ± 19.40		359.67 ± 18.69		389.96 ± 73.37		269.36 ± 11.12	**
Liver	(mg%)	2547.41 ± 345.02		2427.29 ± 175.70		2539.74 ± 100.72		2826.62 ± 304.61 **		2530.25 ± 101.31	
Kidneys	(mg%)	765.98 ± 253.32 (15)		718.62 ± 82.47		812.68 ± 291.51 (11)		730.25 ± 129.35		569.17 ± 27.81	**
Spleen	(mg%)	344.94 ± 166.63		276.51 ± 28.83		324.51 ± 82.95		319.55 ± 80.91		205.48 ± 10.45	**
Testes	(mg%)	769.48 ± 89.96		729.96 ± 151.54		728.26 ± 91.18		785.67 ± 88.96		875.53 ± 40.03	**
Epididymides	(mg%)	207.85 ± 32.21		215.01 ± 34.80		217.80 ± 23.05		225.29 ± 25.99		265.29 ± 12.82	**
Prostate	(mg%)	79.08 ± 15.61		76.58 ± 19.87 (16)		75.90 ± 16.34		81.74 ± 25.11		84.82 ± 17.54	
Submandibular glands	(mg%)	155.13 ± 17.23		163.42 ± 6.26		168.3 ± 13.02		171.38 ± 11.75 **		150.49 ± 6.84	
Pituitary gland	(mg%)	2.35 ± 0.22		2.58 ± 1.20		2.36 ± 0.24		2.28 ± 0.21		2.20 ± 0.19	
Thyroid gland	(mg%)	6.79 ± 2.26		10.46 ± 13.95		9.92 ± 8.39		10.27 ± 6.92		4.14 ± 0.49	**
Adrenal glands	(mg%)	13.34 ± 3.37		11.94 ± 0.55		12.20 ± 1.34		13.96 ± 2.56		10.52 ± 0.90	**

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

* , significant difference from the control, p<0.05

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

Table 8 Neoplastic changes of died and sacrificed rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid.

Dose group	Animal no.	Day	Fate	Main tumor or cause of death
Control	M01008	163	D	Schwannoma, malignant (hydrothorax, hemorrhagic)
	M01014	117	D	Mesothelioma, malignant (ascites, hemorrhagic)
	M01015	135	D	Schwannoma, malignant
	M01017	160	S	Nephroblastoma
Low AA	M02025	160	S	Schwannoma, malignant (subcutaneous)
	M02029	165	D	Schwannoma, malignant (abdominal cavity)
	M02035	165	D	Mesothelioma, malignant (thoracic cavity)
Medium AA	M03041	111	D	Adenocarcinoma (small intestine), Nephroblastoma
	M03044	153	S	Adenocarcinoma (large intestine), Nephroblastoma
	M03046	145	S	Lymphoma, malignant
	M03047	168	S	Lymphoma, malignant
	M03048	160	S	Nephroblastoma
	M03052	110	D	Lymphoma, malignant
	M03057	105	D	Adenocarcinoma (small intestine)
High AA	M04063	86	D	Schwannoma, malignant (abdominal cavity)
	M04064	160	S	Sarcoma (abdominal cavity)
	M04069	109	D	Lymphoma, malignant
	M04072	168	D	Keratoacanthoma
	M04077	153	D	Lymphoma, malignant

AA, arachidonic acid; D, died; S, sacrificed at moribund condition

Table 9 Incidence of primary tumors in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

	Effective cases				Terminal sacrifice			
	Control	Low AA	Medium AA	High AA	Control	Low AA	Medium AA	High AA
Tumor bearing animals	20 / 20 (100 %)	20 / 20 (100 %)	20 / 20 (100 %)	20 / 20 (100 %)	16 / 16 (100 %)	17 / 17 (100 %)	12 / 12 (100 %)	15 / 15 (100 %)
Benign	20 / 20 (100 %)	17 / 20 (85 %)	17 / 20 (85 %)	18 / 20 (90 %)	16 / 16 (100 %)	15 / 17 (88 %)	10 / 12 (83 %)	15 / 15 (100 %)
Malignant	18 / 20 (90 %)	13 / 20 (65 %)	16 / 20 (80 %)	18 / 20 (90 %)	15 / 16 (94 %)	10 / 17 (59 %)	10 / 12 (83 %)	14 / 15 (93 %)
<i>(Hemopoietic system, thymus)</i>								
Malignant lymphoma	2 / 20 (10 %)	1 / 20 (5 %)	2 / 20 (10 %)	4 / 20 (20 %)	1 / 16 (6 %)	1 / 17 (6 %)	0 / 13 (0 %)	2 / 15 (13 %)
Hyperplasia, lymphocyte	8 / 20 (40 %)	5 / 20 (25 %)	2 / 20 (10 %)	7 / 20 (35 %)	8 / 16 (50 %)	5 / 17 (29 %)	7 / 13 (54 %)	7 / 15 (47 %)
Tumor bearing animal	2 / 20 (10 %)	1 / 20 (5 %)	2 / 20 (10 %)	4 / 20 (20 %)	1 / 16 (6 %)	1 / 17 (6 %)	0 / 13 (0 %)	2 / 15 (13 %)
<i>(Lung)</i>								
Adenocarcinoma	2 / 20 (10 %)	1 / 20 (5 %)	1 / 20 (5 %)	2 / 20 (10 %)	2 / 16 (13 %)	1 / 17 (6 %)	1 / 13 (8 %)	1 / 15 (7 %)
Adenoma	9 / 20 (45 %)	9 / 20 (45 %)	3 / 20 (15 %)*	11 / 20 (55 %)	8 / 16 (50 %)	8 / 17 (47 %)	1 / 13 (8 %)*	10 / 15 (67 %)
Hyperplasia, alveolar/bronchiolar	19 / 20 (95 %)	10 / 20 (50 %)**	15 / 20 (75 %)	18 / 20 (90 %)	16 / 16 (100 %)	9 / 17 (53 %)**	11 / 13 (85 %)	15 / 15 (100 %)
Tumor bearing animal	9 / 20 (45 %)	10 / 20 (50 %)	4 / 20 (20 %)	13 / 20 (65 %)	8 / 16 (50 %)	9 / 17 (53 %)	2 / 13 (15 %)	11 / 15 (73 %)
<i>(Thyroid gland)</i>								
Adenocarcinoma, follicular cell	4 / 20 (20 %)	2 / 20 (10 %)	3 / 20 (15 %)	8 / 20 (40 %)	4 / 16 (25 %)	2 / 17 (12 %)	2 / 13 (15 %)	7 / 15 (47 %)
Adenoma, follicular cell	13 / 20 (65 %)	12 / 20 (60 %)	6 / 20 (30 %)*	9 / 20 (45 %)	11 / 16 (69 %)	11 / 17 (65 %)	5 / 13 (38 %)	6 / 15 (40 %)
Hyperplasia, follicular cell	14 / 20 (70 %)	8 / 20 (40 %)	9 / 20 (45 %)	19 / 20 (95 %)**	11 / 16 (69 %)	6 / 17 (35 %)	6 / 13 (46 %)	15 / 15 (100 %)*, #
Tumor bearing animal	14 / 20 (70 %)	14 / 20 (70 %)	9 / 20 (45 %)	17 / 20 (85 %)	12 / 16 (75 %)	13 / 17 (76 %)	7 / 13 (54 %)	13 / 15 (87 %)
<i>(Kidney)</i>								
Nephroblastoma	11 / 20 (55 %)	10 / 20 (50 %)	8 / 20 (40 %)	10 / 20 (50 %)	10 / 16 (63 %)	8 / 17 (47 %)	5 / 13 (38 %)	9 / 15 (60 %)
Papilloma, transitional cell	0 / 20 (0 %)	2 / 20 (10 %)	2 / 20 (10 %)	3 / 20 (15 %)	0 / 16 (0 %)	2 / 17 (12 %)	2 / 13 (15 %)	3 / 15 (20 %)#
Hyperplasia, transitional cell	5 / 20 (25 %)	4 / 20 (20 %)	3 / 20 (15 %)	9 / 20 (45 %)	3 / 16 (19 %)	4 / 17 (24 %)	2 / 13 (15 %)	6 / 15 (40 %)
Tumor bearing animal	12 / 20 (60 %)	12 / 20 (60 %)	9 / 20 (45 %)	11 / 20 (55 %)	11 / 16 (69 %)	10 / 17 (59 %)	6 / 13 (46 %)	10 / 15 (67 %)
<i>(Urinary bladder)</i>								
Papilloma	1 / 20 (5 %)	3 / 20 (15 %)	5 / 20 (25 %)	7 / 20 (35 %)*, ##	1 / 16 (6 %)	3 / 17 (18 %)	3 / 13 (23 %)	7 / 15 (47 %)**, ##
Hyperplasia, transitional cell	12 / 20 (60 %)	6 / 20 (30 %)	3 / 20 (15 %)	6 / 20 (30 %)	10 / 16 (63 %)	6 / 17 (35 %)	2 / 13 (15 %)	5 / 15 (33 %)
Tumor bearing animal	1 / 20 (5 %)	4 / 20 (20 %)	5 / 20 (25 %)	7 / 20 (35 %)*, #	1 / 16 (6 %)	4 / 17 (24 %)	3 / 13 (23 %)	7 / 15 (47 %)**, ##
<i>(Small intestine)</i>								
Adenocarcinoma	2 / 20 (10 %)	3 / 20 (15 %)	4 / 20 (20 %)	3 / 20 (15 %)	2 / 16 (13 %)	0 / 17 (0 %)	1 / 13 (8 %)	3 / 15 (20 %)
<i>(Large intestine)</i>								
Adenocarcinoma	4 / 20 (20 %)	3 / 20 (15 %)	5 / 20 (25 %)	4 / 20 (20 %)	4 / 16 (25 %)	3 / 17 (18 %)	4 / 13 (31 %)	4 / 15 (27 %)
Adenoma	2 / 20 (10 %)	2 / 20 (10 %)	1 / 20 (5 %)	0 / 20 (0 %)	2 / 16 (13 %)	2 / 17 (12 %)	1 / 13 (8 %)	0 / 15 (0 %)
Tumor bearing animal	6 / 20 (30 %)	5 / 20 (25 %)	7 / 20 (35 %)	5 / 20 (25 %)	6 / 16 (38 %)	5 / 17 (29 %)	5 / 13 (38 %)	5 / 15 (33 %)

*, p<0.05, **, p<0.01: significant difference from the control by Fisher's exact probability test.

#, p<0.05, ##, p<0.01: Cochran-Armitage trend test.

AA, arachidonic acid

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業） 分担研究報告書

「ラットの認知機能、網膜機能、免疫能、骨格筋に及ぼすアラキドン酸長期投与の影響に関する研究」

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
研究協力者 片倉 賢紀 島根大学医学部生理学講座環境生理学 助教
田邊 洋子 同大学総合科学研究支援センター 技術専門職員
井上 隆之 同大学医学部解剖学講座発生生物学 大学院生
谷戸 正樹 同学部眼科学講座 講師
海津 幸子 同講座 助教
三木 和博 武庫川女子大学薬学部病態生理学講座 教授
十万佐知子 同講座 非常勤助教

研究要旨

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

1）空間認知機能の評価指標である参照記憶や作業記憶には有意な影響は認められなかったが、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、大脳皮質のARAが有意に増加し、リノール酸が低下した。

ARA摂取は、加齢ラットの大脳皮質のARAを増加させ行動パターンに影響を及ぼす可能性が示唆された。

2）若齢ラットへARAを投与する前と投与1ヶ月後の網膜電図には影響は認められなかった。3カ月後の網膜電図は、コントロール群、ドコサヘキサエン酸（DHA）群共に加齢に伴い振幅の低下が認められたが、ARA群では右目だけではあるが加齢に伴う振幅の低下が抑制された。目下投与継続中である。

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

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