

# 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業） 分担研究報告書

胎仔期のアラキドン酸が乳癌発症に及ぼす影響

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

## 研究要旨

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

## A. 研究目的

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

## B. 研究方法

実験① ARAのヒト乳癌細胞株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%)を摂取させた。6週齢時に  $2.5 \times 10^6$

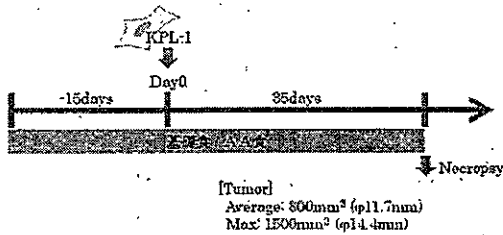
cells/animalのKPL-1ヒト乳癌細胞株を右腋窩乳腺組織内に移植した(図1-1)。対照群として、基礎食(ARA含有0.008%)を摂取させ、同様に乳癌細胞を移植した群を設定した。下記の項目について観察し、35日後に全ての動物を解剖した。

- ・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：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、50 mg/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、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: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1mm<sup>2</sup>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② 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:

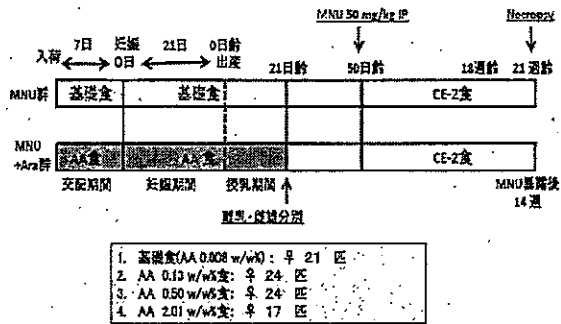
10ないし12週齢の雌雄ルイス系ラット(日本チャールスリバー)を購入後交配させ、交配期1週間、妊娠期3週間、授乳期3週間にARA添加食(0.13%, 0.50%, 2.01%)を摂取させた。離乳以降実験終了までは、市販飼料(CE-2、日本クレア)を摂食させた。出生した雌仔ラットの50日齢時に50 mg/kg N-メチル-N-ニトロソ尿素(MNU、Sigma Aldrich、Lot No.099K1262)を単回腹腔内投与し、21週齢(MNU投与後14週)まで、下記の項目について観察した(図2-1)。

- ・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2-1: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 ± 2℃、湿度60 ± 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

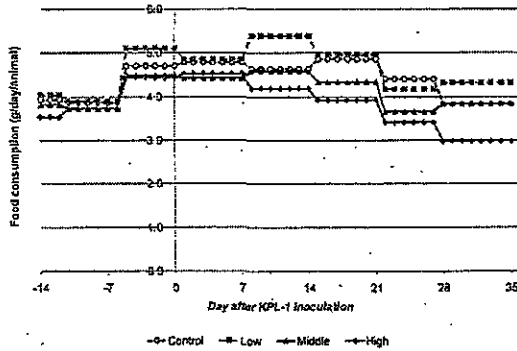
実験① ARAのヒト乳癌細胞株移植動物での腫瘍増殖に対する影響(食餌暴露):

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、ARA 2.01%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3.8 g、ARA 0.13%添加食群で4.3 g、ARA 0.50%添加食群で3.8 gであったのに対し、ARA 2.01%添加食群で3.0 gと減少が顕著であった(図1-2)。試験期間中のARA摂取量(投与量)はARA 0.13%添加食群で306 mg/kg、ARA 0.50%添加食群で1070 mg/kg、ARA 2.01%添加食群で4033 mg/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

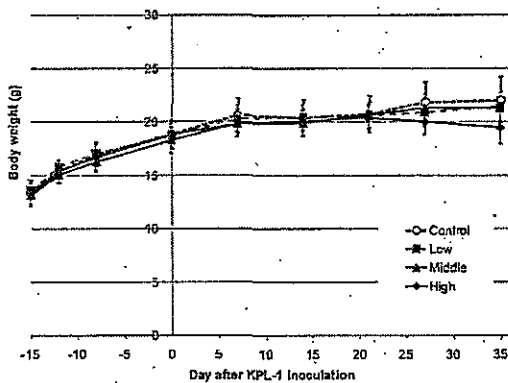
含有されており、その投与量は 18 mg/kg であった。

(図 1-2 : 1匹あたりの1日摂餌量)



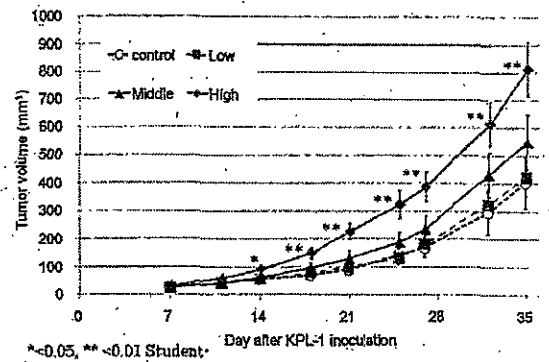
**体重:** 移植 4 週後から、ARA 2.01% 添加食群では減少し、移植 35 日後では基礎食群 (Control) で 22.0 g、ARA 0.13% 添加食群で 21.4 g、ARA 0.50% 添加食群で 21.3 g であったのに対し、ARA 2.01% 添加食群で 19.5 g と低値を示した(図 1-3)

(図 1-3 : 体重の推移)

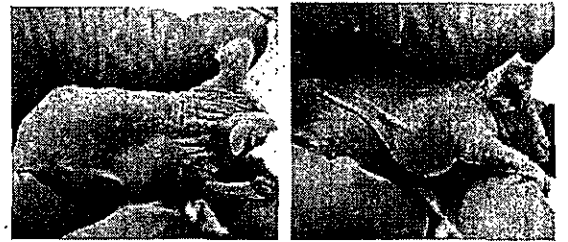


**腫瘍体積の推移:** 移植 2 週後から、ARA 2.01% 添加食群では腫瘍体積が他群に比べて有意に増加し、移植 35 日後では基礎食群 (Control) で 405 mm<sup>3</sup>、ARA 0.13% 添加食群で 423 mm<sup>3</sup>、ARA 0.50% 添加食群で 549 mm<sup>3</sup> であったのに対し、ARA 2.01% 添加食群で 813 mm<sup>3</sup> と有意に増加した(図 1-4、図 1-5)。

(図 1-4 : 腫瘍体積)



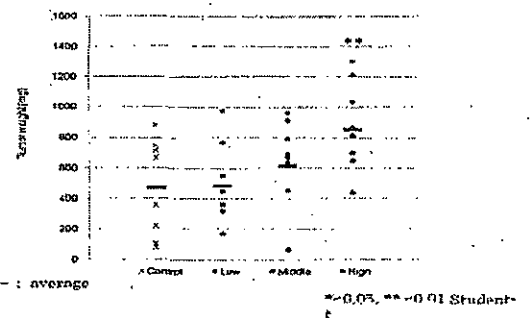
(図 1-5 : 腫瘍細胞移植 35 日後の腫瘍塊の肉眼写真)



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 470 mg、ARA 0.13% 添加食群で 483 mg、ARA 0.50% 添加食群で 616 mg であったのに対し、ARA 2.01% 添加食群で 852 mg と有意に増加した(図 1-6)。

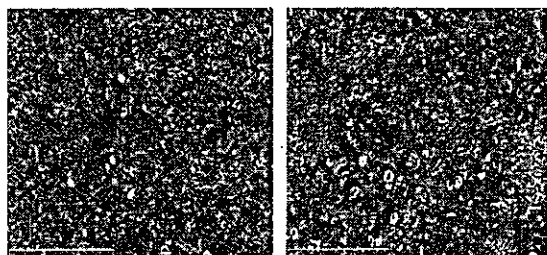
(図 1-6 : 腫瘍重量)



**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 1-7)。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1-7: 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%、ARA0.50%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: 1mm<sup>2</sup>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、ARA 0.50%添加食群で127個、ARA 2.01%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、ARA 2.01%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ものの(前年度報告済み)、②ARA食餌添加により移植乳癌細胞の増殖活性が増加したこと(本実験)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② 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ARA 0.50%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、ARA 0.13%添加食群で77.7-83.5 mg/kg、ARA 0.50%添加食群で261.8-332.7 mg/kg、ARA 2.01%添加食群で1075.1-1226.6 mg/kgであり、ARA添加食群では、推定投与量の60, 250, および1000 mg/kgを若干上回る値であった(表2-1)。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9.4 mg/kg、ARA 0.13%添加食群で242.6 mg/kg、ARA 0.50%添加食群で874.0 mg/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倍となり、予想通りであった。

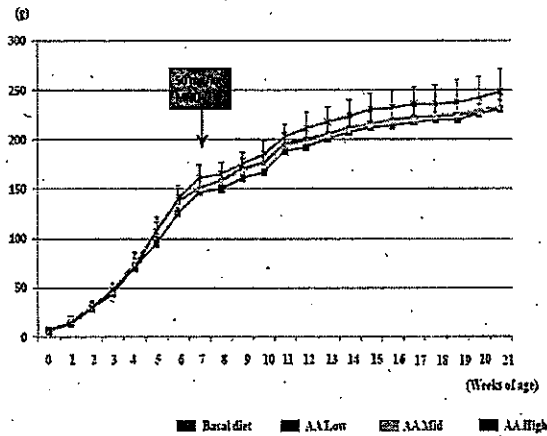
(表2-1: ARA摂取量)

Period	Dose of arachidonic acid (mg/kg)			
	Basal	Arachidonic acid		
		Low	Mid	High
Mating (1 week)	5.2	83.6	332.7	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		60	250	1000

体重: ARA摂取終了時の3週齢では、基礎食群45g、ARA 0.13%添加食群44g、ARA 0.50%添加食群48g、ARA 2.01%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、ARA 0.13%添加食群230g、ARA 0.50%添加食群234g、ARA 2.01%添加食群248gであり、ARA 2.01%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。

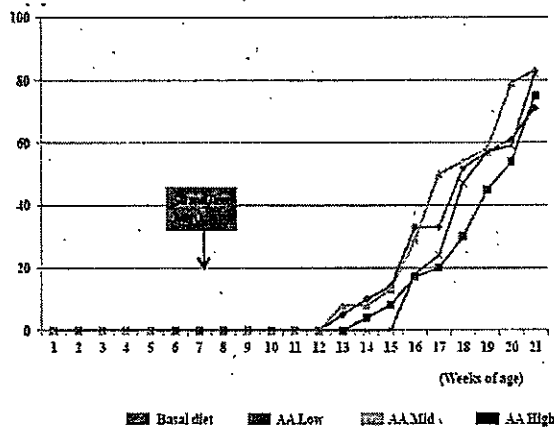
(図2-2: 体重の推移)



触診:

基礎食群ならびにARA 0.50% 添加食群では13週齢から、ARA 0.13% 添加食群では14週齢から、ARA 0.50% 添加食群では16週齢から、乳腺腫瘍発生が観察された(図2-3)。21週齢時での発生頻度は、基礎食群で71%、ARA 0.13% 添加食群で75%、ARA 0.50% 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2-3: 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)、ARA 0.13% 添加食群で18/24例(75%、腫瘍数33個)、ARA 0.50% 添加食群で20/24例(83%、腫瘍数53個)、ARA 2.01% 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、ARA 0.13% 添加食群で1.8個、ARA 0.50% 添加食群で2.7個、ARA 2.01% 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2-2)。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2-2: 1匹あたりの乳腺腫瘍数・重量)

	Basal	Arachidonic acid		
		Low	Mid	High
Multiplicity (number/tumour)	2.1	1.8	2.7	2.3
Tumour weight				
Average (mg)	2067	1052	1853	899
SE	5251	2612	2672	1894

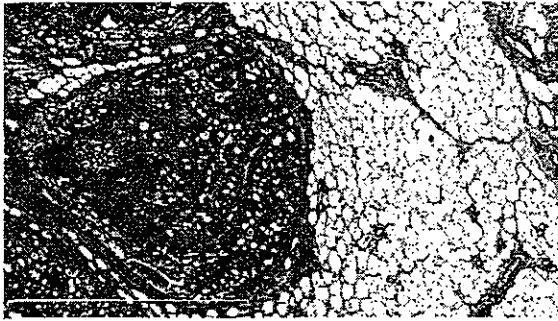
病理組織学的検査:

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、ARA 0.13% 添加食群で21/24例(88%、腫瘍数78個)に、ARA 0.50% 添加食群で23/24例(96%、腫瘍数93個)に、ARA 2.01% 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、ARA 0.13% 添加食群で3.3個、ARA 0.50% 添加食群で3.9個、ARA 2.01% 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2-3)、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2-4)。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。

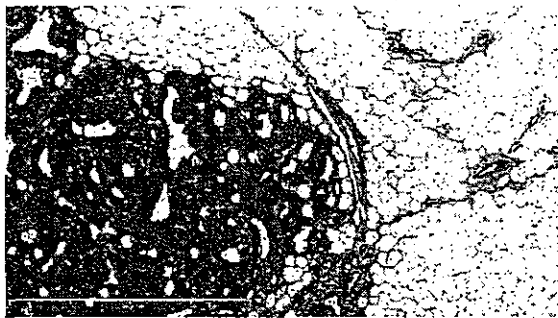
(表 2-3 : 1 匹あたりの乳腺腫瘍数・重量)

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 2-4 : 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



ARA 2.01% 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)を移植したヌードマウスを用いて、ARA 添加食の影響をみたところ、ARA 2.01% 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、垪 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、垪 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） 分担研究報告書

「アラキドン酸補給食がマウス眼組織の形成に及ぼす影響」

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：

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早胎仔（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、これは早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♂よりも早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の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。

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、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することとした。

## B. 研究方法

B-1. 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(表1)。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-2. 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 $\mu$ 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QTRAPMLC/MS/MS system(AB SCIEX)で行った。溶媒の送液は200  $\mu$ 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 $^{\circ}$ 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. 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る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

表1. 食餌の脂肪酸組成

脂肪酸	食餌群 (ARA/DHA)			
	(-/-)	(+/-)	(-/+)	(+/+)
16:0	11.5	11.3	11.6	11.6
18:0	2.2	2.9	2.4	2.9
18:1 n-9	28.8	26.8	28.6	26.6
18:2 n-6	54.7	50.3	50.4	46.1
18:3 n-3	0.9	0.9	0.9	0.8
20:3 n-6	0.0	0.3	0.0	0.3
20:4 n-6	0.0	4.0	0.0	4.0
22:6 n-3	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



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(図 1 A、1 B)。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(図 2 A、2 B)。

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。図 3 A 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(図 3 B)。

#### C-2. 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(図 4 A、4 B)。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(図 5 A、5 B)。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。

#### D. 考察

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、アラキドン酸強化食によって♀マウス胎仔の眼組織においてある種のホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 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、Ca<sup>2+</sup>-非依存的ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>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 A<sub>2</sub> 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 *Pitx 3* や *Pax 6* 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

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

なし

### 2. 学会発表

A) 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

B) 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 A<sub>2</sub> が関与する。第 26 回日本 Shock 学会総会（アクティシティ浜松コンgresセンター）、平成 23 年 5 月 20-21 日

C) 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 A<sub>2</sub> 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

D) 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 A<sub>2</sub> 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

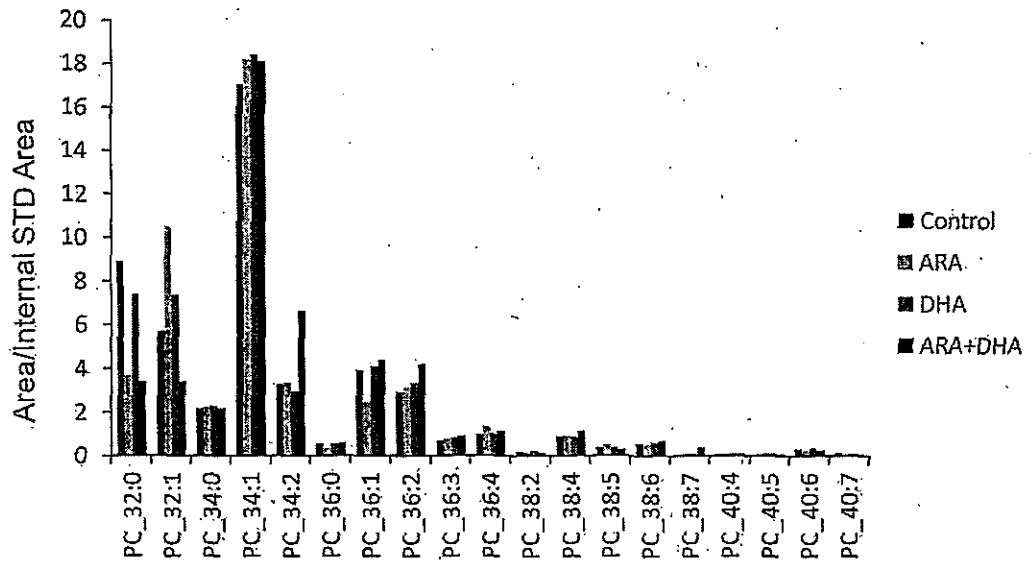


図1A 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♀)眼組織のホスファチジルコリン分子種分析

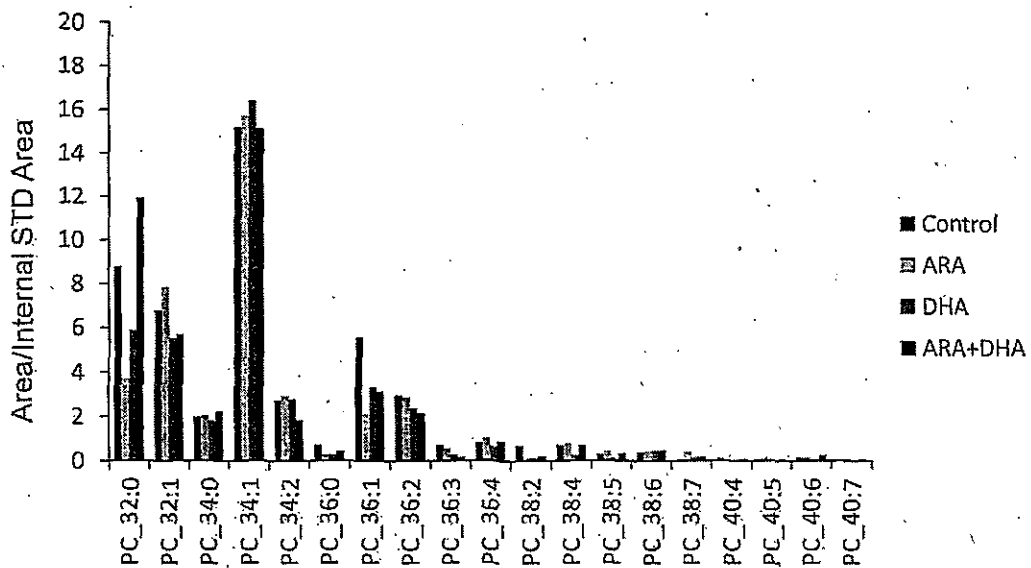


図1B 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♂)眼組織のホスファチジルコリン分子種分析

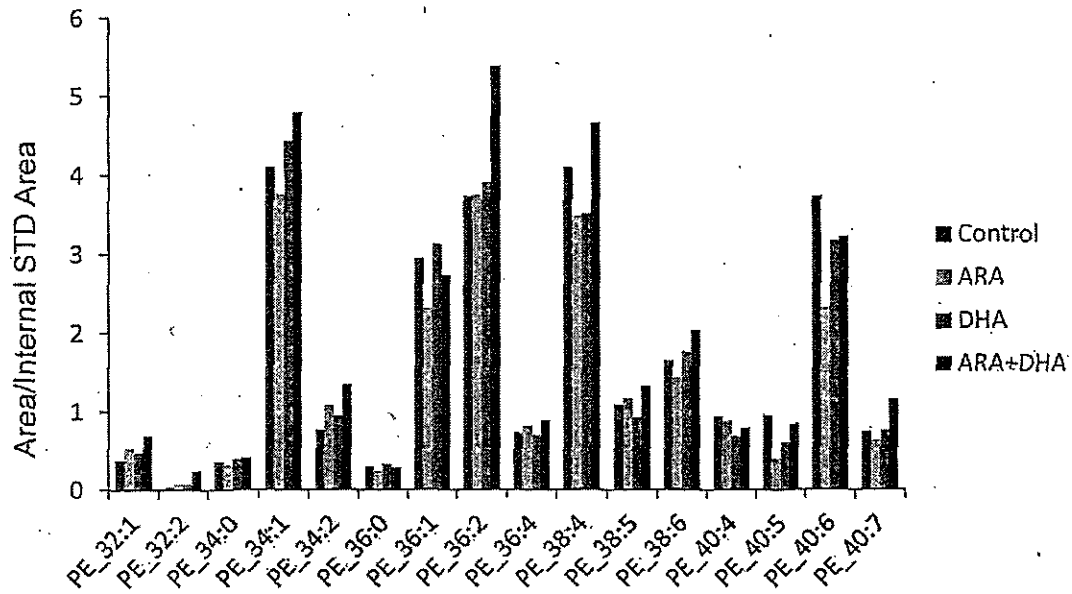


図2A 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♀)眼組織のホスファチジルエタノールアミン分子種分析

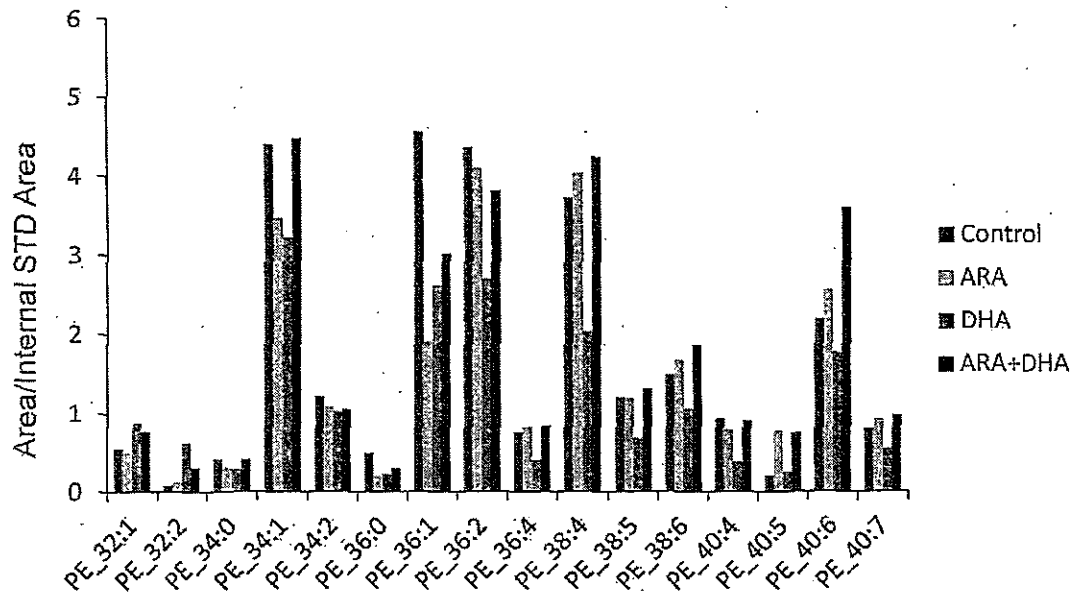


図2B 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♂)眼組織のホスファチジルエタノールアミン分子種分析

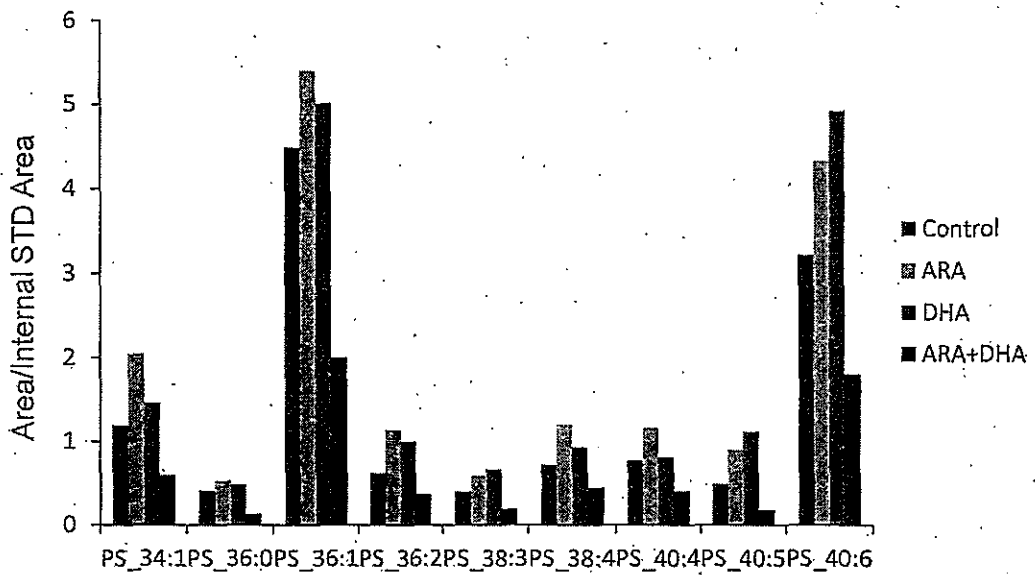


図3A 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♀)眼組織のホスファチジルセリン分子種分析

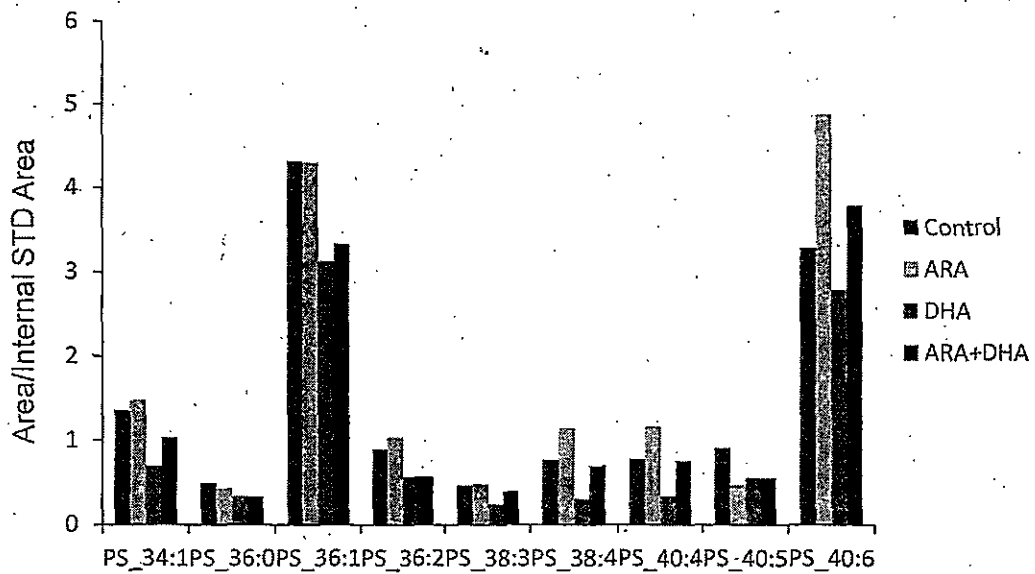


図3B 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♂)眼組織のホスファチジルセリン分子種分析

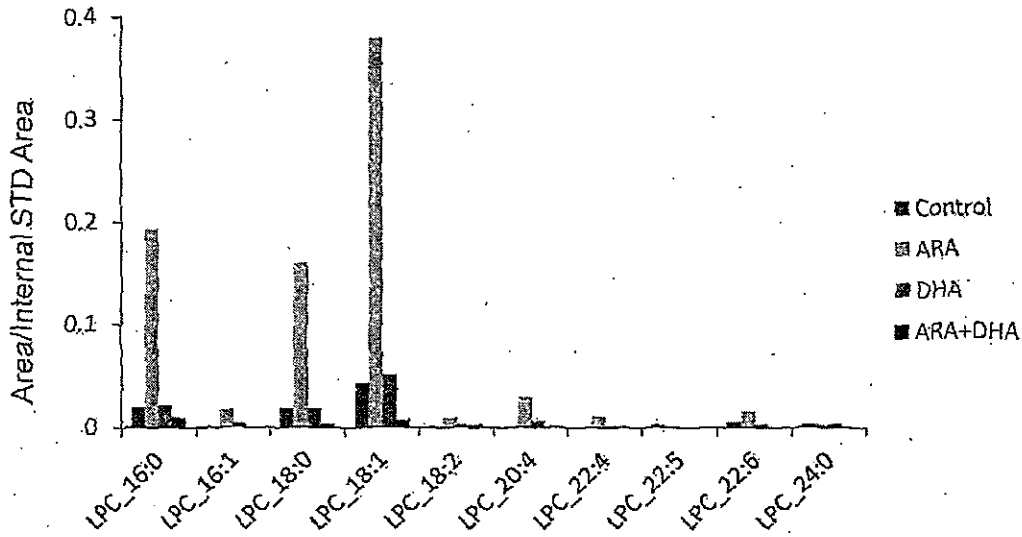


図4A 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♀)眼組織のリゾホスファチジルコリン分子種分析

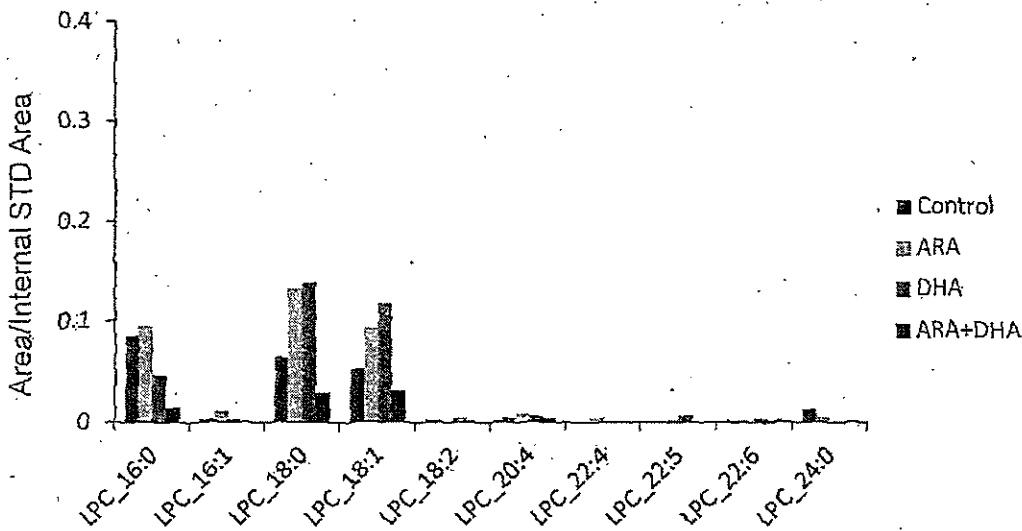


図4B 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♂)眼組織のリゾホスファチジルコリン分子種分析

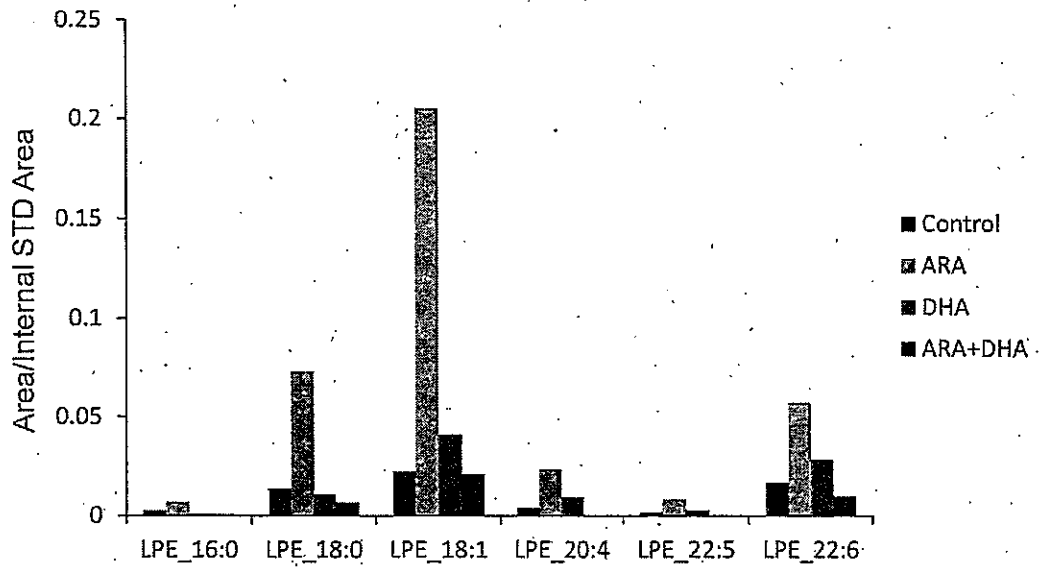


図5A 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♀)眼組織のリゾホスファチジルエタノールアミン分子種分析

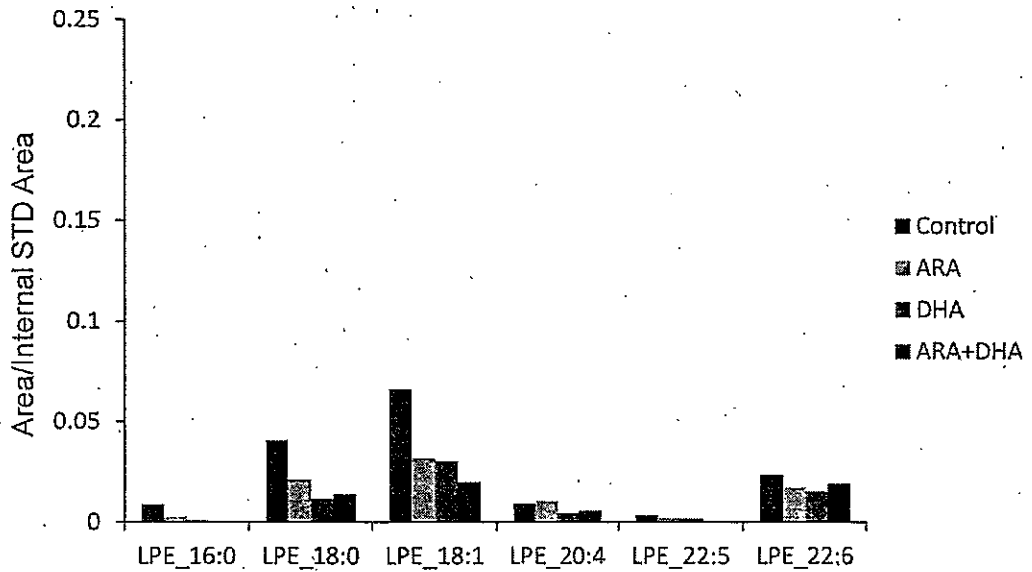


図5B 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♂)眼組織のリゾホスファチジルエタノールアミン分子種分析

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

「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  
斉藤 義明 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

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, isc)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/DuCrjCrlj、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 53.8 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53.8 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、精巣上部、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、Dunnett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、Dunnett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処置対照群と低、中、高用量群間に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と比較して、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、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、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に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有意な結果と考えられる。

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により大腸癌発生が抑制され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 用量には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思われた。

#### 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に促進効果を有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、安藤栄里子、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)。

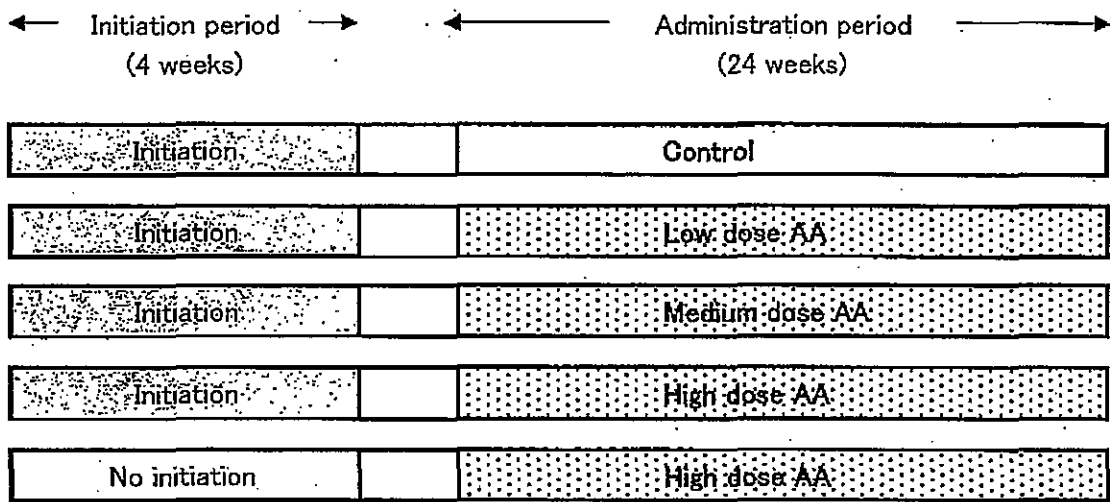


Figure 1 Experimental design of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats

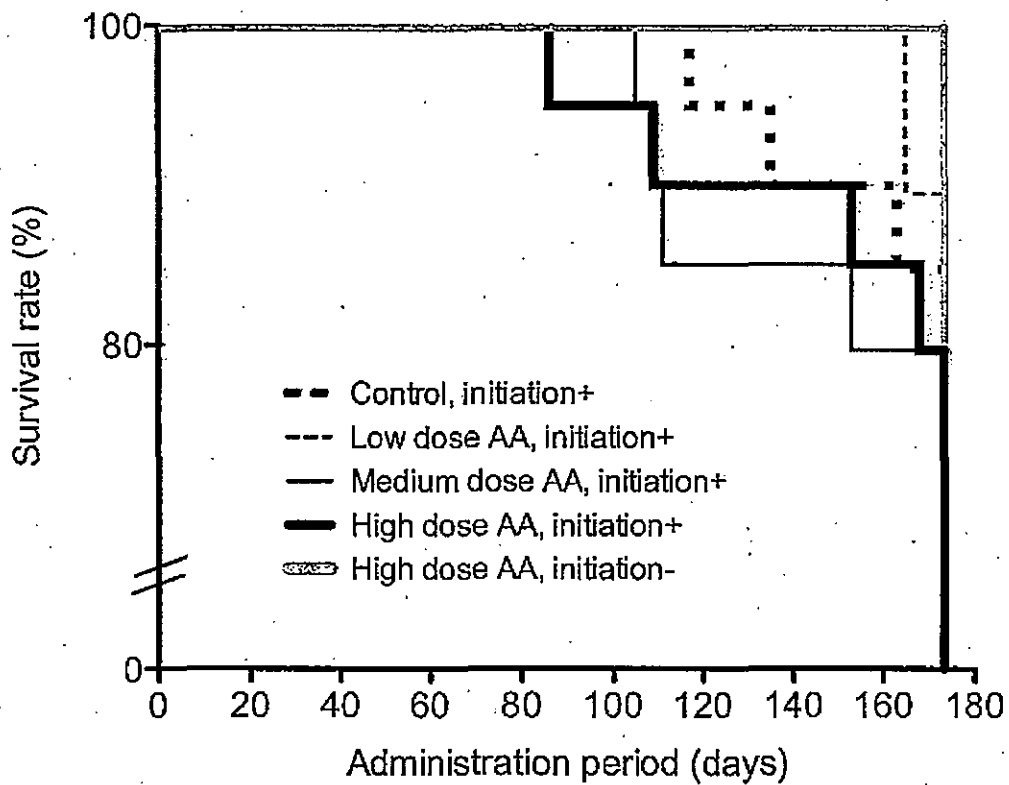


Figure 2 Survival rate of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

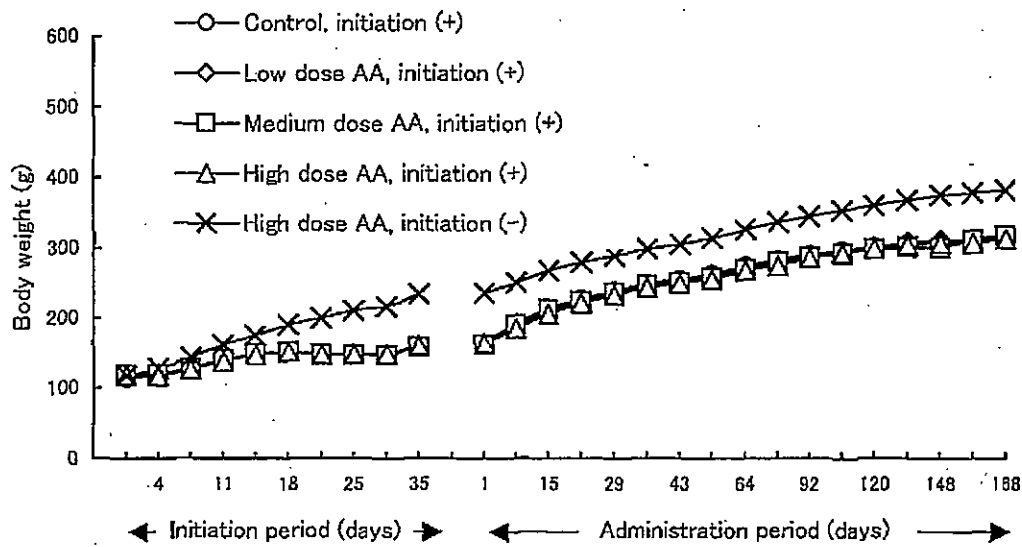


Figure 3 Body weight of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

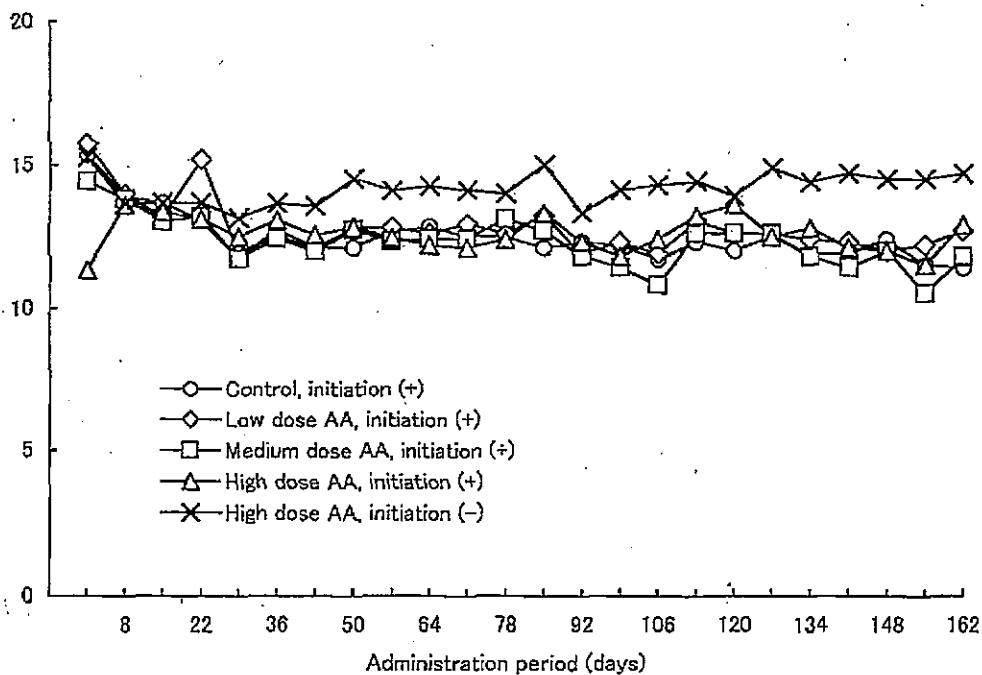


Figure 4 Food intake of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

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	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)
Low	+	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)
Medium	+	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)
High	+	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)
High	-	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)

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	13.9	13.7	13.0	11.7	12.7	12.1	12.1
		±2.0 (20)	±1.3 (20)	±1.0 (20)	±1.1 (20)	±0.9 (20)	±1.2 (20)	±1.0 (20)	±0.9 (20)
Low	+	15.7	14.0	13.2	15.2	11.9	12.5	12.1	12.8
		±2.2 (20)	±1.0 (20)	±1.1 (20)	±6.1 (20)	±1.0 (20)	±0.9 (20)	±1.0 (20)	±0.9 (20)
Medium	+	14.4	13.8	13.0	13.2	11.7	12.4	12.0	12.7
		±1.5 (20)	±1.2 (20)	±0.8 (20)	±1.0 (20)	±0.9 (20)	±1.0 (20)	±1.2 (20)	±1.1 (20)
High	+	11.3 **	13.6	13.3	13.1	12.5	13.1	12.5	12.8
		±2.1 (20)	±1.7 (20)	±1.4 (20)	±1.1 (20)	±1.2 (20)	±1.2 (20)	±1.2 (20)	±1.3 (20)
High	-	15.3	13.6	13.7	13.7	13.1 **	13.6 *	13.6 **	14.5 **
		±1.8 (20)	±1.3 (20)	±0.9 (20)	±0.8 (20)	±1.0 (20)	±1.1 (20)	±0.7 (20)	±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 ±1.1 (20)	12.8 ±2.8 (20)	12.5 ±0.9 (20)	12.5 ±0.8 (20)	12.1 ±2.0 (20)	12.3 ±0.9 (20)	12.2 ±1.2 (20)	11.7 ±0.7 (20)	
Low	+	12.8 ±1.2 (20)	12.6 ±0.9 (20)	12.9 ±1.1 (20)	12.6 ±1.1 (20)	13.2 ±1.1 (20)	11.9 ±1.0 (20)	12.3 ±0.9 (20)	11.9 ±1.5 (20)	
Medium	+	12.3 ±1.1 (20)	12.4 ±1.0 (20)	12.4 ±1.5 (20)	13.1 ±1.1 (20)	12.7 ±1.4 (20)	11.8 ±1.0 (20)	11.4 ±3.0 (20)	10.8 ±3.5 (19)	
High	+	12.5 ±1.2 (20)	12.2 ±1.3 (20)	12.1 ±1.7 (20)	12.4 ±1.4 (20)	13.3 ±1.2 (19)	12.3 ±1.2 (19)	11.8 ±2.9 (19)	12.4 ±1.0 (18)	
High	-	14.1 ** ±1.2 (20)	14.3 ** ±0.8 (20)	14.1 ** ±1.1 (20)	14.0 ** ±0.9 (20)	15.0 ** ±1.0 (20)	13.3 ** ±0.9 (20)	14.1 ** ±0.9 (20)	14.3 ** ±0.9 (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 <sup>4</sup> /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 <sup>2</sup> /uL)	NEUT% (%)	LYMPH% (%)	MONO% (%)	EOSI% (%)	BASO% (%)	PLT (10 <sup>4</sup> /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 %)
(Hemopoietic system, thymus)								
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 %)
(Lung)								
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 %)
(Thyroid gland)								
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 %)
(Kidney)								
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 %)
(Urinary bladder)								
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 %)*, ##
(Small intestine)								
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 %)
(Large intestine)								
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

# 平成 23 年度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

「ラットの網膜、NK 細胞活性、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	島根大学総合科学研究支援センター	技術専門職員
	井上 隆之	島根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	同学部講座	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	同学部講座	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、網膜機能として網膜電図 (ERG s)、免疫能としてNK細胞活性、さらには骨格筋脂肪酸組成への影響を検討した。

若齢ラットへARAを投与する前、投与1ヶ月後の網膜電図は3群間で有意差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振幅の低下が抑制された。網膜電図への影響を明らかにするために投与を継続中である。

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長期投与によりラットの免疫能の低下が示唆された。

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。

## 1) ラット網膜の機能と脂肪酸組成に及ぼすアラキドン酸長期投与の影響に関する研究

担当協力研究者：谷戸正樹、海津幸子、片倉賢紀、井上隆之、田邊洋子

### A. 研究目的

網膜に光が当たることによって生じる網膜光障害の原因の一つは酸化ストレスである。網膜には不飽和脂肪酸が多く含まれるので、他の組織と比較して酸化ストレスを受けやすく、Hydroxynonenal (HNE) や Hydroxyhexenal (HHE) などの脂質過酸化物 (アルデヒド) が

多く生成されている。その一方で、不飽和脂肪酸であるアラキドン酸 (ARA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) が必須脂肪酸としてサプリメントや食品添加物に使用されている現実がある。しかしながらARA長期投与の影響はほとんど報告されていない。

最近、ARAを過剰摂取したマウス雌胎仔の

眼の発達異常が報告されたことから、ARAの長期投与ラットの網膜機能への影響が示唆される。しかしながら、ARAやDHAを長期摂取した場合、網膜機能に如何なる影響が出るかについては報告がない。本研究では、長期に渡って経口摂取したARAとDHAがどの程度網膜に移行するのか、そして網膜機能に如何なる影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### B-1. ラットとARA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世代飼育した若齢Wistar系雄ラット(5週齢)を、ARA中性脂肪型(240 mg/kg BW/day)とDHA中性脂肪型(240 mg/kg BW/day)ならびに対照基礎混合油(牛脂:大

豆油:菜種油=2:1:1)をそれぞれ経口投与するARA群(n=10)、DHA群(n=10)、コントロール群(n=10)の3群に分け、網膜機能への影響が観察されるまで、3カ月毎に網膜電図を測定する。

表1には投与したARA豊富油と対照基礎混合油ならびにDHA豊富油の脂肪酸組成が示されている。ARA豊富油はCABIO社(中国)から輸入され、ARA豊富油は対照基礎混合油に比べて、ARAが多く、パルミチン酸(PLA)、ステアリン酸(STA)、オレイン酸(OLA)、リノール酸(LA)が少ない組成である。DHA豊富油はマルハニチロフオールディングス中央研究所から提供された。対照混合油に比べて、DHA、PLA、EPAが多く、STA、LA、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	DHA豊富油
PLA(mol%)	6.95±0.00	13.8±0.01	29.8±0.03
STA(mol%)	5.91±0.00	13.8±0.01	8.10±0.04
OLA(mol%)	5.31±0.00	42.5±0.03	16.3±0.01
LA(mol%)	9.38±0.01	20.0±0.02	1.96±0.01
AA(mol%)	45.1±0.04	ND	2.49±0.02
EPA(mol%)	0.52±0.00	0.13±0.01	6.61±0.00
DPA(mol%)	ND	ND	1.17±0.01
DHA(mol%)	ND	ND	32.6±0.03

### B-2. 網膜電図測定法:

ラットを麻酔後、谷戸らの論文(J. Lipid Res. 2009, 50: 807-819)に従って網膜電図の測定を行った。

B-3. 網膜の脂肪酸組成と酸化ストレスの測定  
網膜電図に有意差が認められたのちにラットを屠殺し、網膜を剥離し、網膜と色素上皮の脂肪酸組成と酸化ストレス指標であるHydroxynonenal(HNE)やHydroxyhexenal(HHE)などの脂質過酸化物を測定する。

## C. 途中成果

ARAによる体重への影響は認められなかった(図1)。

ARAの投与前、投与1カ月月後の網膜電図は3群間において有意差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、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振幅の低下が抑制された(図2)。網膜電図への影響を明らかにするためにさらなる投与を継続中である。

図1 体重変化

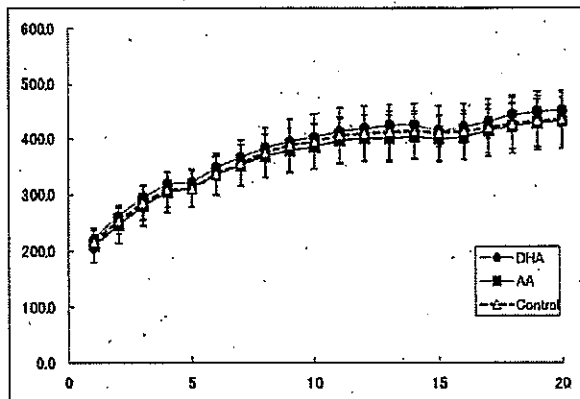
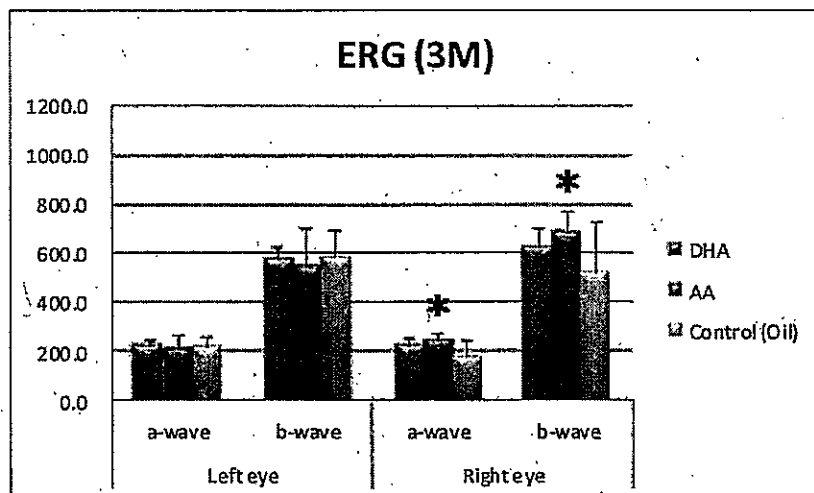


図2 投与3カ月度の網膜電図



## 2) ラットのNK細胞活性に及ぼすアラキドン酸長期投与の影響

担当協力者：十萬佐知子、三木和博、片倉賢紀、井上隆之、田邊洋子

### B-1. ラットとARA投与

実験1)と同様に、F-1魚粉抜き固形飼料で2世代飼育した若齢Wistar系雄ラット(5週齢)を、ARA中性脂肪型(240 mg/kg BW/day)とDHA中性脂肪型(240 mg/kg BW/day)ならびに対照基礎混合油(牛脂：大豆油：菜種油 = 2:1:1)を其々経口投与するARA群(n=6)、DHA群(n=6)、コントロール群(n=6)の3群に分け、NK細胞活性を測定した。

### B-2. NK細胞活性の測定

ラットから脾臓を摘出した後、単一細胞に

なるようにすりつぶし、リンパ球精製試薬(Lympholyte-Rat; Cedarlane社)を用いて、リンパ球層を回収した。リンパ球とマウスリンパ腫由来細胞(YAC-1)の割合を変えて24時間共培養し、24時間後にリンパ球中のNK細胞によって傷害されたYAC-1から放出されたLDHを測定することで、細胞傷害を検討した。細胞傷害率の算出；

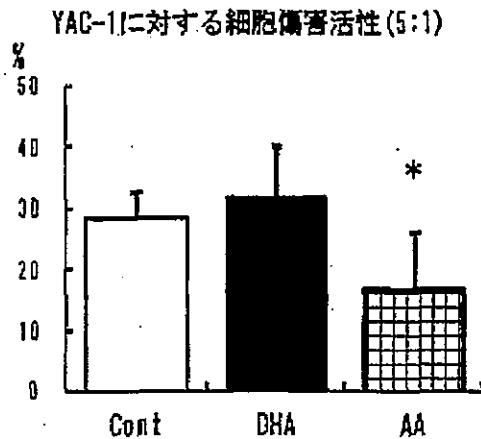
$$\left[ \frac{(\text{リンパ球} + \text{YAC-1}) \text{ 吸光度} - \text{リンパ球のみの吸光度}}{(\text{YAC-1} + \text{TritonX-100}) \text{ 吸光度} - \text{YAC-1のみの吸光度}} \right] \times 100$$

### C 結果

ARA 投与ラットのNK細胞活性は、コントロー

ル群、DHA群に比べて有意に低下した(図3)。

図3 NK細胞活性



目下、血漿の炎症マーカーを測定中である。

### 3) 加齢ラットの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

担当協力者：井上隆之、片倉賢紀、田邊洋子

#### A. 研究目的

加齢に伴う骨格筋、とりわけ速筋の萎縮が身体活動を低下させることが報告されている。この萎縮の要因は不明であるが、加齢に伴う骨格筋への酸化ストレスの増加も要因の一つとして推察される。そのために、ARAを長期投与した老齢ラットの下腿骨格筋の脂肪酸組成と過酸化脂質量を測定した。

成は平成22年度報告書と同一である。

#### B. 研究方法

##### B-1. ラットとARA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、ARA中性脂肪型(240mg/kg BW/day)と対照基礎混合油(牛脂：大豆油：菜種油=2：1：1)をそれぞれ経口投与するARA群(n=6)、コントロール群(n=6)の2群に分け、13週間にわたる経口投与後に屠殺して下腿骨格筋中の速筋と遅筋を摘出した。ARA豊富油と対照基礎混合油の脂肪酸組

##### B-2. 脂肪酸と過酸化脂質：

1)脂肪酸測定：ガスクロマトグラフ法

2)過酸化脂質は大川法

#### C. 結果

C-1. 体重と血漿脂肪酸・過酸化脂質への影響  
体重は両群間で有意な変化が認められなかった。

血漿の脂肪酸組成に関しては、ARA投与ラットではコントロールラットに比べて、ARAと不飽和度指数(USI)は増加し、n-6/n-3比は増加傾向を示した。一方、パルミチン酸、リノール酸、およびエイコサペンタエン酸(EPA)は有意に低下した(表2)。過酸化脂質量(LPO)はARA群ではコントロール群に比べて有意に増加した(表2)。



表2 血漿の脂肪酸組成と過酸化脂質

	Control group (n=6)	AA group (n=6)
PLA(mol%)	24.3±0.5	22.7±0.5**
STA(mol%)	14.1±0.3	14.6±0.4
OLA(mol%)	10.2±0.7	8.7±0.6
LA(mol%)	18.1±1.2	14.2±0.9**
ARA(mol%)	28.7±1.9	36.3±1.7**
EPA(mol%)	0.69±0.1	0.36±0.1**
DPA(mol%)	0.51±0.1	0.44±0.1
DHA(mol%)	1.79±0.3	1.33±0.2
n-6/n-3	15.9±2.8	24.1±3.6*
USI	179.5±4.3	195.3±3.8**
LPO (nmol/mL)	9.4±0.6	13.7±0.7**

Data are the mean±SEM. \*\*P < 0.05, \*0.05 < P < 0.1

C-2. 骨格筋の脂肪酸・過酸化脂質および活性酸素種への影響

骨格筋の脂肪酸組成について、ARA 投与老齡ラット骨格筋の速筋の 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/AA 比は有意に低下し、過酸化脂質量 (LPO) が増加した (表3)。

目下、組織学的に形態変化など観察中である。

表3 骨格筋の遅筋と速筋の脂肪酸組成と過酸化脂質 (LPO) と活性酸素種 (ROS)

	Slow twitch muscle		Fast twitch muscle	
	Control group (n=6)	AA group (n=6)	Control group (n=6)	AA group (n=6)
PLA(mol%)	19.4±0.96	21.31±0.68	26.30±0.67	27.50±0.55
STA(mol%)	18.38±1.28	16.15±1.67	13.68±0.59	14.12±0.38
OLA(mol%)	12.54±2.32	15.87±2.54	12.31±0.91	10.23±0.57*
LA(mol%)	27.36±0.53	24.54±1.45*	25.61±0.50	20.30±0.79**
ARA(mol%)	15.16±1.44	17.07±2.26	11.63±0.64	18.40±0.71**
EPA(mol%)	0.10±0.00	0.08±0.01	0.10±0.00	0.09±0.02
DPA(mol%)	1.19±0.13	0.93±0.15	1.43±0.06	1.48±0.03
C24:0(mol%)	0.33±0.04	0.32±0.03	0.28±0.04	0.31±0.02
DHA(mol%)	5.20±0.54	3.39±0.50**	8.31±0.81	7.34±0.38
C24:1(mol%)	0.13±0.02	0.08±0.01**	0.10±0.02	0.09±0.01
n-6/n-3	6.61±0.57	9.46±0.91**	3.80±0.28	4.31±0.19
DHA/ARA	0.35±0.02	0.20±0.01**	0.71±0.04	0.40±0.01**
USI	166.3±6.6	159.5±7.1	168.4±5.4	145.7±1.0
LPO (nmol/mg protein)	1.37±0.21	2.83±0.57**	3.44±0.84	3.99±0.19
ROS (nmol/min·mg protein)	3.88±0.49	4.52±1.52	2.84±0.71	5.86±0.68**

Data are the mean±SEM. \*\*P < 0.05, \*0.05 < P < 0.1

C. 結語

加齢ラットへの ARA の長期投与は骨格筋の速筋の過酸化脂質量を増加させることから、酸化ストレスを増加させることが示唆された。酸化

ストレスの増大は細胞膜障害をひき起こすことが推察されることから、ARA の長期摂取は運動機能を低下させる可能性が示唆される。

今後、速筋と遅筋への ARA 長期投与の形態

学的影響の差異を明らかにする。

#### 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) Michio Hashimoto, Masanori Katakura, Shahdat Hossain, Azizur Rahman, Toshio Shimada, Osamu Shido. Docosahexaenoic acid withstands the A $\beta$ <sub>25-35</sub>-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *Journal of Nutrition Biochemistry* 22: 22-29, 2011
- 2) Michio Hashimoto, Ryuichi Tozawa, Masanori Katakura, Hossain Shahdat, Abdul Md. Haque, Yoko Tanabe, Shuji Gamoh, Osamu Shido. Protective effects of prescription n-3 fatty acids against impairment of spatial cognitive learning ability in amyloid  $\beta$ -infused rats. *Food and Function* 2: 386-394, 2011.
- 3) Toshiyuki Okui, Michio Hashimoto, Masanori Katakura, Osamu Shido. *Cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid promotes neuronal differentiation through regulation of Hes6 mRNA and cell cycle in cultured neural stem cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 85: 163-169, 2011.
- 4) Michio Hashimoto, Masanori Katakura, Toru Nabika, Yoko Tanabe, Shahdat Hossain, Satoru Tsuchikura, Osamu Shido. Effects of hydrogen-rich water on abnormalities in SHR.Cg-*Lepr*<sup>cp</sup>/NDmcr rat-a metabolic syndrome model rat. *Medical Gas Research* 2011 *in press*
- 5) Seisho Tobinaga, Michio Hashimoto, Iku Utsunomiya, Kyoji Taguchi, Morihiko Nakamura, Tokugoro Tsunematsu. Chronic administration of cardanol (Ginkgol) extracted from *Ginkgo biloba* leaves and

cashew nutshell liquid improves reference memory-related learning in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2011 *in press*

- 6) Kunitsugu I., Okuda M, Murakami N, Hashimoto M, Yamaniishi R, Bando N, Sasaki S, Terao J, Sugiyama S, Hobara T. Self-reported seafood intake and atopy in Japanese school-aged children. *Pediatrics International* 2011 *in press*
- 7) 蒲生修治、橋本道男 認知症予防に向けた食生活の工夫およびサプリメントの活用. *老年医学* 49 (6)、683-687、2011.
- 8) 橋本道男 アミロイド $\beta$ タンパク質の脳室内注入アルツハイマー病モデル動物. *日本臨床増刊号 認知症学* 上、241-246、2011
- 9) 橋本道男 イチョウ葉エキス・魚油・その他の代替医療. *日本臨床 増刊号 認知症学* 下、70-76、2011

#### 著書

- 1) Shahdat Hossain and Michio Hashimoto. Mechanism of neurotoxicity of amyloid-beta peptide and the protective effects of docosahexaenoic acid. Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011 *in press*
- 2) 橋本道男 ドコサヘキサエン酸によるアルツハイマー型認知症の予防、アンチエイジングをめざした水産物の利用、日本水産学会監修 水産学シリーズ 171、恒星社厚生、pp61-73、2011
- 3) Michio Hashimoto, Haque Md Abdul, Yukihiko Hara. Effects of green tea catechins on cognitive learning ability and dementia. In: *Tea in Health and Disease Prevention*, Editor: V. R. Preedy, Springer, New York, 2011 (*in press*)

# 平成 23 年度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

－ 老若マウスの脳機能に及ぼすアラキドン酸の比較検討 －

守口 徹 麻布大学 生命・環境科学部 教授

## 研究要旨

昨年度、我々は n-3 系脂肪酸欠乏 (n-3 Def) ならびに n-3 系脂肪酸正常 (n-3 Adq) の老齢マウスを用いて、アラキドン酸 (ARA) の長期投与後の記憶学習ならびに情動行動、運動協調性等へ及ぼす影響を検討し、ARA の投与が自発運動量の上昇を伴った運動機能の低下を示す結果を得た。今年度は、これら行動試験に用いた動物から採取した血液、脳組織の脂肪酸分析を行ない、行動試験との関連性を考察した。ARA の長期投与は、血液および脳組織中の ARA を中心とした n-6 系脂肪酸の上昇と共に DHA を有意に減少させていた。また、若齢の n-3 系脂肪酸欠乏マウスに ARA を投与すると 3 週目から、自発運動の有意な上昇が観察された。これらのことから、ARA 投与は、n-3 系脂肪酸欠乏状態を亢進させて、n-3 系脂肪酸欠乏特有の症状である自発運動を上昇させ、運動機能を低下させていることが考えられた。

## A. 研究目的

- A-1. 昨年度、我々は n-3 系脂肪酸欠乏 (n-3 Def) ならびに n-3 系脂肪酸正常 (n-3 Adq) の老齢マウスを用いて、アラキドン酸 (ARA) の長期投与後の記憶学習ならびに情動行動、運動協調性等へ及ぼす影響を検討した。n-3 Def マウスに長期間 ARA を投与すると自発運動量の上昇を伴った運動機能の低下が観察されている (昨年度の報告書参照のこと)。本年度は、これら実験に用いた動物から採取した血液 (血漿と赤血球)、脳組織中の脂肪酸組成を測定し、行動試験との関連性を考察する。
- A-2. 昨年度、得られた ARA の長期投与による自発運動の上昇を詳細に検討するために、n-3 Def ならびに n-3 Adq 飼料で、飼育・繁殖した 16 週齢のマウスに ARA を連続投与して、自発運動量の変化を経時的に測定し、運動協調性 (ロータロッド) 試験を実施する。

## B. 研究方法

### B-1. 各組織中の脂肪酸組成分析

一連の行動試験に用いたマウスから、血液 (血漿と赤血球) と脳組織を採取し、各試料もしくは脳組織のホモジネートをねじ付の試験管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 (血漿、トリエン酸メチル, 23:0; 脳, ドコサトリエン酸メチル, 22:3n-3) と共に加え、塩化アセチルの添加、攪拌の後に、100℃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中和・分配し、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。各油脂における ARA、総脂肪酸の含有量を各内標から算出した。

## B-2. ARA の投与による自発運動量の変化

### B-2-1. ARA の投与

n-3 Def ならびに n-3 Adq 飼料(表 1)で飼育・繁殖した n-3 Def ならびに n-3 Adq マウスの 16 週齢時より、ARA 油を毎日定時に、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。対照群としては、昨年度と同様に、混合油(豚脂:大豆油:ナタネ油 = 2:1:1)を脂肪酸量が等量になるよう投与した。各投与液の脂肪酸組成は、表 2 に示した。最初の 1 週間は、投与前に毎日、2 週目からは、1 週毎に自発運動量を測定した(B-2-2 を参照のこと)。投与 6 週間後に、運動協調性試験(ロータロッド試験, B-2-3 を参照のこと)を行ない、終了後に血液、肝臓、脳組織等を採取した。これらの組織は、脂肪酸組成を測定するために -80℃ で保存した。

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 Def 飼料	n-3 Adq 飼料
脂質 (g/100g diet)	5	5
ココナツ油(硬化)	4.05	3.88
サフラワー油	0.95	0.89
亜麻仁油	-	0.24
脂肪酸組成(%)		
飽和脂肪酸	78.1	75.1
一価不飽和脂肪酸	4.7	5.4
多価不飽和脂肪酸		
総 n-6 系脂肪酸	14.6	14.6
総 n-3 系脂肪酸	0.3	2.5

### B-2-2. 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。

表 2. ARA 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	ARA 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
ARA 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)

### B-2-3. 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。本試験の前日に20 rpmのローターにマウスを乗せ5分間の走行練習を行ない、翌日、本試験を実施した。本試験でのローターの回転数は、5分間の測定時間内に4 rpmから40 rpmまで加速するように設定した。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。

### B-2-4. 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。

## C. 研究結果と考察

### C-1. 各組織中の脂肪酸組成分析

行動試験終了後に採取し、-80℃で保存していた血液(血漿と赤血球)、脳組織中の脂肪酸組成の解析結果を以下に示す。

#### C-1-1. ARA投与後の血液中の脂肪酸組成

n-3系脂肪酸欠乏ならびに正常マウス共に、混合油(豚脂:大豆油:ナタネ油 = 2:1:1)を投与していた対照群では、ARA投与群と比較して血漿中ならびに赤血球膜中の飽和脂肪酸(24:0)や一価不飽和脂肪酸(18:1n-9)の含有量が上昇していた。一方、ARA投与群では、ARAとそれよりも長鎖のn-6系脂肪酸が、10~20%上昇し、DHAを中心とした30~50%のn-3系総脂肪酸の有意な低下が観察された。(表3-4)。

#### C-1-2. ARA投与後の脳組織の脂肪酸組成

脳組織においても対照群の飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸の含有量の上昇が観察されたが、その程度は、血漿や赤血球膜のそれよりも低いものであった。また、ARA投与群では、ARAとそれよりも長鎖のn-6

系脂肪酸の有意な上昇とDHAを中心としたn-3系総脂肪酸の有意な低下が観察された(表5)。

### C-1-3. 行動試験結果と脂肪酸組成の関連性

一般に血漿中と赤血球膜中の脂肪酸組成変化には、時差を生じることが知られているが、今回の結果では、両試料の脂肪酸組成の変化とその量は、大同小異で、投与期間が長期であったために脂肪酸の変化としては安定した状態になっていたと考えられた。脳組織も含め、各群の脂肪酸組成は、その投与液の脂肪酸組成に影響を受け、対照群では、一価不飽和脂肪酸が、ARA投与群では、n-6系脂肪酸がそれぞれ増加することは、至極当然であるが、ARA投与により、n-3系脂肪酸が有意に減少したことは特記すべき点と考えている。これまで我々は、n-3系脂肪酸欠乏動物の一般行動、脳機能等を測定しているが、n-3系脂肪酸欠乏動物は集中力に欠き、自発運動量が上昇することが認められている。昨年度の行動試験で観察された自発運動の上昇は、ARAの長期投与による脳内のARAの上昇よりもそれに伴って生じたDHAなどn-3系脂肪酸の低下によって、n-3系脂肪酸欠乏状態が充進して生じたものと考えられた。

昨年度に得られた行動試験結果と本年度の脂肪酸組成の解析により、水迷路試験のプローブテスト等でARAが脳機能を改善しているように見られた結果は、自発運動の上昇による見かけ上の改善作用の可能性が高いと判断された。

### C-2. ARA投与による自発運動量と行動変化

n-3 Defならびにn-3 Adqマウスの16週齢時より、ARA油を毎日、強制経口投与し、経時的な自発運動量の変化と運動協調性試験の結果を以下に述べる。

#### C-2-1. 自発運動量の変化

n-3 Defマウスにおいて、薬液の投与開始

から1週間目までは、対照群は、ARA投与群よりも高値を示した。その後、対照群は、測定の変動性により見られる自発運動量の低下が観察されたが、ARA投与群は、緩やかに上昇し続け、投与3週目以降、有意な自発運動の上昇を示した(図1)。一方、n-3 Adqマウスに薬液を投与した場合、投与期間を通じて、自発運動量に顕著な差は認められなかった。

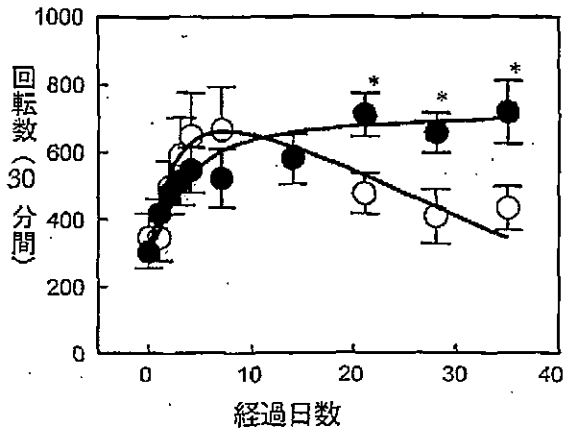


図1. ARA投与による自発運動量の経時的変化 (n-3 Def群)  
○, n-3 Def-Cont (n=10); ●, n-3 Def-ARA (n=10)  
(\*P<0.05 vs n-3 Def-Cont, t-test)

### C-2-2. 運動協調性試験

実験最終日に行なった運動協調性試験(ロータロッド試験)の結果を図2に示す。ARA投与により、落下時間の低下が観察されたが、有意差を得るまでには至っていない。

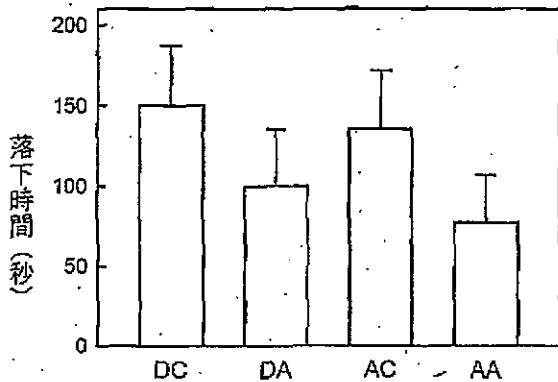


図2. 運動協調性試験におけるARA投与の影響群名については、図2を参照のこと。

### C-2-3. 昨年度の行動試験との比較と再現性

ARA投与6週目における各群の自発運動量を図3に示した。昨年度の自発運動量の測定結果と比較すると、ARA投与による自発運動上昇傾向は変わらないが、有意な差として得られた群間が、昨年度は、n-3 Adq群間であったのに対して、本年度はn-3 Def群間と異なっている。これは、測定時のマウスの週齢が、昨年度65週齢であったのに対して、本年度は、22週齢と大きく異なることによるものと考えられる。また、運動協調性試験の結果についても同様に再現性は得られたが、有意差は得られていない。これは、自発運動における回転数や、ロータロッド試験における落下時間からわかるように週齢差(老齢と成獣)による運動能力の違いによる、各試験の課題負荷量が異なっているために、ARA投与による差異が生じたものと考えている。今後、さらに検討するには、作用を検出できる至適条件を考慮する必要があると考えられた。

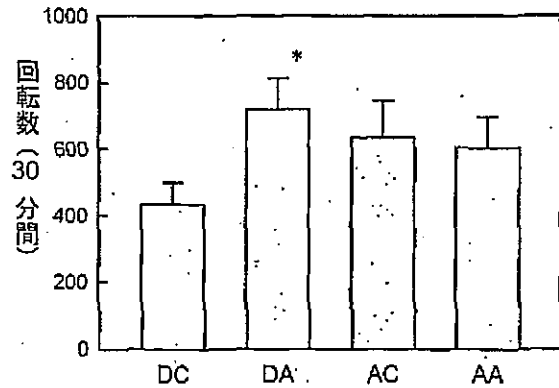


図3. ARA投与6週目の各群の自発運動量  
DC, n-3 Def-Cont (n=10); DA, n-3 Def-ARA (n=10); AC, n-3 Adq-Cont (n=11); AA, n-3 Adq-ARA (n=8)を示す。(\*P<0.05 vs DC, t-test)

### D. 結論

昨年ならびに本年度を通じて、ARAの長期投与における脳機能ならびに一般行動に与える影響を検討した。ARAの長期投与は、自発運動

量を顕著に上昇させ、行動試験結果に影響を与えることがわかった。また、n-3系脂肪酸欠乏マウスへのARAの長期投与は、脳内のARA量の上昇のみならず、DHAの減少を引き起こし、n-3系脂肪酸欠乏状態を亢進させることから、ARAの単独もしくは長期的な摂取には注意する必要があると考えられた。

#### E. 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。

##### E-1. 学会発表

1. Toru Moriguchi. Role of polyunsaturated fatty acids in murine emotional behavior. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society - Neuroscience of the Mind -, Symposium S3-E-1: Basic biology and clinical implications of lipids, Sep. 16, Yokohama (2011)

守口 徹, マウスの情動行動における多価不飽和脂肪酸の役割, 第34回日本神経科学会(こころの脳科学), S3-E-1: 脂質の基礎生物学および精神機能との関連, プログラムP86, Sep. 16, パシフィコ横浜(神奈川県)

2. 原馬 明子, 齊藤 純平, 渡邊 芳剛, 川端 二功, 守口 徹, n-3系脂肪酸欠乏マウスを用いたドライアイに関する検討, 日本脂質栄養学会第20回大会, 抄録集P145, Sep. 2, 女子栄養大学(埼玉県)

表 3 ARA 油長期投与による血漿中の脂肪酸組成の変化

	n-3 Def		n-3 Adq	
	Control (n=10)	ARA (n=12)	Control (n=10)	ARA (n=11)
10:0	0.11 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.09 ± 0.03
12:0	2.12 ± 0.24	1.22 ± 0.14	1.54 ± 0.23	1.88 ± 0.35
14:0	1.61 ± 0.15	1.10 ± 0.07	1.28 ± 0.13	1.47 ± 0.20
16:0 DMA	0.34 ± 0.04	0.33 ± 0.02	0.37 ± 0.05	0.40 ± 0.04
16:0	19.41 ± 0.34	18.29 ± 0.41	19.39 ± 0.37	18.22 ± 0.36
18:0 DMA	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01
18:0	10.20 ± 0.43	10.81 ± 0.22	9.77 ± 0.39	10.20 ± 0.24
20:0	0.29 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.29 ± 0.03
22:0	0.36 ± 0.03	0.39 ± 0.02	0.35 ± 0.04	0.39 ± 0.04
24:0	0.22 ± 0.01	0.31 ± 0.02**	0.23 ± 0.03	0.33 ± 0.02**
Total sat.	34.72 ± 0.62	32.82 ± 0.64	33.28 ± 0.59	33.33 ± 0.82
16:1n7	2.26 ± 0.13	2.06 ± 0.15	2.15 ± 0.18	1.60 ± 0.09*
18:1 DMA	0.06 ± 0.02	0.13 ± 0.01**	0.08 ± 0.02	0.14 ± 0.01*
18:1n9	14.46 ± 0.61	11.37 ± 0.43**	13.99 ± 0.94	10.84 ± 0.56**
18:1n7	2.72 ± 0.15	2.23 ± 0.11	2.55 ± 0.29	1.68 ± 0.11**
20:1n9	0.51 ± 0.04	0.34 ± 0.02**	0.45 ± 0.05	0.34 ± 0.02
22:1n9	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01
24:1	0.50 ± 0.08	0.41 ± 0.03	0.49 ± 0.05	0.39 ± 0.04
Total mono.	20.56 ± 0.73	16.57 ± 0.60**	19.73 ± 1.31	15.03 ± 0.67**
18:2n6	17.87 ± 0.66	12.80 ± 0.41**	19.29 ± 0.70	14.07 ± 0.46**
18:3n6	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.03	0.20 ± 0.01
20:2n6	0.17 ± 0.01	0.10 ± 0.003**	0.19 ± 0.01	0.10 ± 0.01**
20:3n6	1.48 ± 0.07	0.79 ± 0.04**	1.41 ± 0.08	0.73 ± 0.03**
20:4n6	15.89 ± 0.83	27.66 ± 0.63**	13.64 ± 0.67	25.19 ± 0.94**
22:4n6	0.22 ± 0.01	0.56 ± 0.03**	0.13 ± 0.02 <sup>#</sup>	0.33 ± 0.02 <sup>##</sup> **
22:5n6	1.50 ± 0.18	2.14 ± 0.12**	0.38 ± 0.05 <sup>##</sup>	0.70 ± 0.04 <sup>##</sup>
Total n-6	37.35 ± 0.94	44.26 ± 0.62**	35.25 ± 1.24	41.31 ± 0.73**
18:3n3	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.004	0.37 ± 0.03 <sup>##</sup>	0.36 ± 0.03 <sup>##</sup>
20:5n3	0.07 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.50 ± 0.03 <sup>##</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>##</sup> **
22:5n3	0.03 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.24 ± 0.02 <sup>##</sup>	0.31 ± 0.01 <sup>##</sup> **
22:6n3	1.59 ± 0.10	0.79 ± 0.03**	5.12 ± 0.22 <sup>##</sup>	3.45 ± 0.17 <sup>##</sup> **
Total n-3	1.71 ± 0.09	0.90 ± 0.02**	6.23 ± 0.19 <sup>##</sup>	4.34 ± 0.14 <sup>##</sup> **
Total FA (µg/100µl)	448.50 ± 39.32	452.49 ± 30.28	408.12 ± 33.80	402.08 ± 20.05

数値は、平均値 ± 標準誤差で示した。(ND: 未検出)

\*P<0.05, \*\*P<0.01, 同一飼料内の Control と ARA 群間の比較,

<sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01, Control 群, ARA 群における飼料間の比較.



表 4 ARA 油長期投与による赤血球膜中の脂肪酸組成の変化

	n-3 Def		n-3 Adq	
	Control (n=10)	ARA (n=12)	Control (n=10)	ARA (n=11)
12:0	0.15 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.03
14:0	0.49 ± 0.03	0.49 ± 0.03	0.48 ± 0.02	0.49 ± 0.03
16:0 DMA	1.45 ± 0.04	1.48 ± 0.06	1.48 ± 0.05	1.64 ± 0.05
16:0	23.88 ± 0.24	23.69 ± 0.20	24.28 ± 0.20	24.57 ± 0.12 <sup>#</sup>
18:0 DMA	0.69 ± 0.02	0.82 ± 0.04*	0.77 ± 0.02	0.87 ± 0.03
18:0	11.93 ± 0.21	13.38 ± 0.13**	12.10 ± 0.35	13.38 ± 0.18**
20:0	0.36 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.37 ± 0.02
22:0	1.01 ± 0.02	1.15 ± 0.03**	1.00 ± 0.01	1.07 ± 0.03
23:0	0.18 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.01
24:0	1.73 ± 0.05	2.08 ± 0.07**	1.91 ± 0.08	2.27 ± 0.05**
Total sat.	42.01 ± 0.27	43.93 ± 0.32**	42.86 ± 0.37	45.14 ± 0.18 <sup>#**</sup>
16:1n7	0.77 ± 0.06	0.80 ± 0.07	0.71 ± 0.05	0.56 ± 0.02*
18:1 DMA	0.42 ± 0.02	0.33 ± 0.01**	0.42 ± 0.03	0.33 ± 0.02**
18:1n9	12.14 ± 0.26	9.81 ± 0.14**	11.67 ± 0.34	9.88 ± 0.26**
18:1n7	2.85 ± 0.07	2.19 ± 0.06**	2.66 ± 0.17	1.86 ± 0.09**
20:1n9	0.57 ± 0.04	0.34 ± 0.02**	0.49 ± 0.02	0.30 ± 0.01**
22:1n9	0.11 ± 0.01	0.05 ± 0.02*	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.01*
24:1	2.08 ± 0.05	1.58 ± 0.06**	1.96 ± 0.06	1.45 ± 0.04**
Total mono.	18.94 ± 0.32	15.10 ± 0.20**	18.02 ± 0.43	14.42 ± 0.36**
18:2n6	6.41 ± 0.22	4.75 ± 0.14**	6.75 ± 0.28	4.85 ± 0.13**
20:2n6	0.16 ± 0.01	0.05 ± 0.01**	0.18 ± 0.01	0.09 ± 0.01 <sup>#**</sup>
20:3n6	1.52 ± 0.06	0.81 ± 0.02**	1.45 ± 0.05	0.73 ± 0.02**
20:4n6	20.82 ± 0.17	25.54 ± 0.24**	18.58 ± 0.30 <sup>#</sup>	24.32 ± 0.23 <sup>#**</sup>
22:4n6	2.00 ± 0.06	3.09 ± 0.09**	1.61 ± 0.04 <sup>#</sup>	2.64 ± 0.04 <sup>#**</sup>
22:5n6	3.20 ± 0.22	3.45 ± 0.17	0.80 ± 0.06 <sup>#</sup>	1.44 ± 0.06 <sup>#**</sup>
Total n-6	34.12 ± 0.22	37.71 ± 0.21**	29.37 ± 0.33 <sup>#</sup>	34.08 ± 0.22 <sup>#**</sup>
18:3n3	ND	ND	0.07 ± 0.02 <sup>#</sup>	0.03 ± 0.01
20:5n3	0.02 ± 0.02	ND	0.40 ± 0.02 <sup>#</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>#**</sup>
22:5n3	0.18 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.67 ± 0.05 <sup>#</sup>	0.56 ± 0.02 <sup>#**</sup>
22:6n3	1.95 ± 0.06	0.85 ± 0.02**	5.84 ± 0.17 <sup>#</sup>	3.60 ± 0.07 <sup>#**</sup>
Total n-3	2.16 ± 0.05	0.98 ± 0.03**	6.98 ± 0.19 <sup>#</sup>	4.33 ± 0.06 <sup>#**</sup>
Total FA (µg/100µl)	307.94 ± 9.93	300.24 ± 8.05	296.30 ± 4.48	276.76 ± 3.44

数値は、平均値 ± 標準誤差で示した。

\*P<0.05, \*\*P<0.01, 同一飼料内の Control と ARA 群間の比較。

<sup>#</sup>P<0.05, <sup>#</sup>#P<0.01, Control 群における飼料間の比較。

表 5 ARA 油長期投与による脳内脂肪酸組成の変化

	n-3 Def		n-3 Adq	
	Control (n=10)	ARA (n=12)	Control (n=10)	ARA (n=11)
14:0	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01
16:0 DMA	2.02 ± 0.06	1.93 ± 0.02	1.92 ± 0.02	1.92 ± 0.01
16:0	16.01 ± 0.07	16.21 ± 0.08	15.94 ± 0.06	15.99 ± 0.07
18:0 DMA	3.31 ± 0.03	3.28 ± 0.03	3.46 ± 0.03 <sup>##</sup>	3.42 ± 0.03 <sup>#</sup>
18:0	18.34 ± 0.05	18.57 ± 0.09	18.31 ± 0.10	18.40 ± 0.05
20:0	0.49 ± 0.01	0.47 ± 0.01	0.47 ± 0.01	0.46 ± 0.01
22:0	0.63 ± 0.02	0.64 ± 0.02	0.65 ± 0.02	0.72 ± 0.04
23:0	0.36 ± 0.02	0.37 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.01
24:0	0.99 ± 0.06	0.97 ± 0.04	0.96 ± 0.03	0.93 ± 0.04
<b>Total sat.</b>	<b>42.27 ± 0.07</b>	<b>42.58 ± 0.10</b>	<b>42.22 ± 0.10</b>	<b>42.31 ± 0.10</b>
16:1n7	0.51 ± 0.02	0.52 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.50 ± 0.01
18:1 DMA	1.40 ± 0.02	1.39 ± 0.02	1.43 ± 0.02	1.41 ± 0.02
18:1n9	15.36 ± 0.12	14.80 ± 0.08 <sup>**</sup>	15.67 ± 0.06	15.29 ± 0.08 <sup>##,*</sup>
18:1n7	3.60 ± 0.03	3.65 ± 0.02	3.45 ± 0.02 <sup>##</sup>	3.41 ± 0.02 <sup>##</sup>
20:1n9	2.41 ± 0.02	2.30 ± 0.02	2.42 ± 0.04	2.35 ± 0.04
22:1n9	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01
24:1	3.66 ± 0.05	3.60 ± 0.10	3.71 ± 0.07	3.71 ± 0.05
<b>Total mono.</b>	<b>27.18 ± 0.13</b>	<b>26.48 ± 0.17</b>	<b>27.45 ± 0.13</b>	<b>26.92 ± 0.16</b>
18:2n6	0.30 ± 0.01	0.24 ± 0.01 <sup>**</sup>	0.37 ± 0.02 <sup>##</sup>	0.27 ± 0.01 <sup>**</sup>
20:2n6	0.08 ± 0.002	0.07 ± 0.002 <sup>**</sup>	0.09 ± 0.004	0.07 ± 0.002 <sup>**</sup>
20:3n6	0.26 ± 0.02	0.17 ± 0.01 <sup>**</sup>	0.35 ± 0.03 <sup>#</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>**</sup>
20:4n6	7.96 ± 0.04	8.34 ± 0.07 <sup>**</sup>	7.43 ± 0.06 <sup>##</sup>	7.96 ± 0.06 <sup>##,*</sup>
22:2n6	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.005	0.07 ± 0.01	0.11 ± 0.005 <sup>##,**</sup>
22:4n6	3.02 ± 0.03	3.45 ± 0.03 <sup>**</sup>	2.47 ± 0.03 <sup>##</sup>	2.82 ± 0.04 <sup>##,*</sup>
22:5n6	2.82 ± 0.14	4.20 ± 0.14 <sup>**</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>##</sup>	0.55 ± 0.02 <sup>##</sup>
<b>Total n-6</b>	<b>14.53 ± 0.16</b>	<b>16.53 ± 0.13<sup>**</sup></b>	<b>11.08 ± 0.08<sup>##</sup></b>	<b>11.97 ± 0.08<sup>##,**</sup></b>
22:5n3	0.06 ± 0.004	0.06 ± 0.003	0.14 ± 0.004 <sup>##</sup>	0.12 ± 0.003 <sup>##,**</sup>
22:6n3	10.13 ± 0.15	8.51 ± 0.12 <sup>**</sup>	13.39 ± 0.05 <sup>##</sup>	13.01 ± 0.08 <sup>##</sup>
<b>Total n-3</b>	<b>10.18 ± 0.15</b>	<b>8.57 ± 0.13<sup>**</sup></b>	<b>13.53 ± 0.05<sup>##</sup></b>	<b>13.13 ± 0.08<sup>##</sup></b>
<b>Total FA</b>	<b>44.91 ± 1.31</b>	<b>43.03 ± 0.28</b>	<b>42.51 ± 0.45</b>	<b>42.80 ± 0.47</b>

数値は、平均値 ± 標準誤差で示した。(ND: 未検出)

\*P<0.05, \*\*P<0.01, 同一飼料内の Control と ARA 群間の比較,

<sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01, Control 群における飼料間の比較.

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
鈴木平光	DHA・EPAによるメタボリックシンドロームと認知症の予防・改善	アクアネット	13巻5号	26-31	2010年

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

# DHA・EPAによる メタボリックシンドロームと 認知症の予防・改善



## 鈴木 平光 (すずき ひらみつ)

女子栄養大学栄養学部教授。1949年埼玉県生まれ。東京水産大学、群馬大学大学院修了、博士(医学)。2006年より現職。専門は水産食品栄養学および衛生学。90年世界初のDHAシンポジウムでコーディネーターを務めた後、一貫してDHAの脳機能維持改善効果に関する研究に従事する。主な著書に「魚を食べると頭が良くなる」(KKベストセラーズ)、「水産食品栄養学」(技報堂出版)など。

東京都内の事業所に勤務する40歳以上の男女への魚油摂取試験の様子。魚油カプセルか、対照カプセルかを選択し、腹囲や血圧測定、採血を行う。

今や、わが国は超高齢社会になりつつあり、これからの20年間は高齢者が益々増える社会になる。私たちの体は加齢に伴い、メタボリックシンドローム(メタボ)や認知症になりやすくなる。メタボは動脈硬化症、心臓病、脳卒中などの循環器系の疾患を起こしやすくする。魚食と循環器系疾患との関係については、本誌2007年7月号「魚食と循環器系疾患の関係～『血液サラサラ効果』の実際」でもまとめたように、欧米人のデータが多く、日本人のデータは限られている。また、認知症は高齢者の多くが最も嫌う病気だが、魚食と認知症との関係については、データが少ないのが現状である。

そこで以下では、魚食や魚油の摂取が日本人のメタボ危険因子や認知症に及ぼす影響を検討した研究の一部を紹介し、さらに、これらの疾患の予防・改善のためには、どのように魚を食べたら良いのかを解説する。

## メタボリックシンドロームの予防・改善

### メタボリックシンドローム(メタボ)とは?

メタボとは内臓脂肪症候群のことで、皮下脂肪よりも内臓脂肪が多くなるのに加えて、血液中の中性脂肪(エネルギーを体内に貯蔵する形態。皮下脂肪はほぼ中性脂肪からできている)が高かったり、HDL-コレステロール(いわゆる善玉コレステロールで、コレステロールを末梢組織から肝臓へ運ぶ。逆に、コレステロールを肝臓から末梢組織へ運ぶのが、いわゆる悪玉コレステロールと呼ばれるLDL-コレステロールである)が低かったり、血圧や血糖値が高いという危険因子が2項目以上ある場合を

言う。メタボでは、動脈硬化症、心筋梗塞、狭心症、脳梗塞などの循環器系の疾患になりやすい体質になる。内臓脂肪もこれらの危険因子も、ともに食生活と深い関係がある。

メタボの診断基準は表1に示した通り(女性の腹囲については90cm以上で良いか否か検討中)であり、現在、わが国の40歳以上の男性の2人に1人が、また、女性の5人に1人がメタボまたはその予備軍である。このような現状をふまえて、40～74歳の公的医療保険加入者全員を対象とした特定健診・特定保健指導が



2008年4月より行われている。

### 魚食(DHA・EPA)とメタボ危険因子<sup>1)</sup>

メタボと食生活との関係では、日本型食生活の特徴になっている魚介類には、内臓脂肪と関係がある体重や腹囲に影響する成分は認められない。しかし、その脂肪(魚油)には、ドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)が豊富に含まれており、これらの脂肪酸の摂取と血漿(血液に含まれる液体成分で、黄色く透明で血液の55%を占める)脂質、血圧、血糖との関係については、かなり多くの研究成果が発表されている。特に、動物実験の結果が多く、ヒトを対象とした研究では主として欧米での疫学調査や介入(摂取)試験の結果が知られている。

マウスを用いて、DHAやEPAと血漿脂質との関係を調べた実験では、DHAやEPAの摂取により、血漿中の中性脂肪、総コレステロールおよびリン脂質濃度の低下が認められている<sup>2)</sup>。

ヒトを対象とした疫学研究でも魚食や魚油の摂取と血液中的中性脂肪やHDL-コレステロール濃度との関係が報告されている。例えば、南インド沿岸の住民の調査では、魚を食べる人は食べない人に比べ、血清(血液凝固成分が消失または著しく減少した血漿)中性脂肪や総コレステロール濃度が低い<sup>3)</sup>。また、その他の調査でも、魚を食べる人は食べない人に比べ、LDL-コレステロール/HDL-コレステロールの比や総コレステロール/HDL-コレステロールの比が明らかに低いことやHDL-コレステロール濃度が高いことが明らかにされている<sup>4)</sup>。

魚食と血圧との関係についても、比較的多くの研究発表があり、動物実験では収縮期(心臓が血液を送出した時。これに対し、血液を吸入した時を拡張期という)血圧の低下が多く認められている<sup>5-8)</sup>。疫学研究では、魚食の頻度と血圧との間に相関関係が無いという結果が見られるが、魚油やDHA・EPA エチルエステルを高血圧症患者に多めに与えた試験では、収縮期およ

表1 メタボリックシンドロームの診断基準

必須項目	内臓脂肪蓄積 ウエストサイズ (内臓脂肪面積 男女とも $\geq 100\text{cm}^2$ に相当)	男性 $\geq 85\text{cm}$ 女性 $\geq 90\text{cm}$
選択項目 (これらの項目のうち2項目以上)	① 高中性脂肪血症 かつ/または 低HDLコレステロール血症	$\geq 150\text{mg/dL}$ $< 40\text{mg/dL}$
	② 収縮期(最大)血圧 かつ/または 拡張期(最小)血圧	$\geq 130\text{mmHg}$ $\geq 85\text{mmHg}$
	③ 空腹時高血糖	$\geq 110\text{mg/dL}$

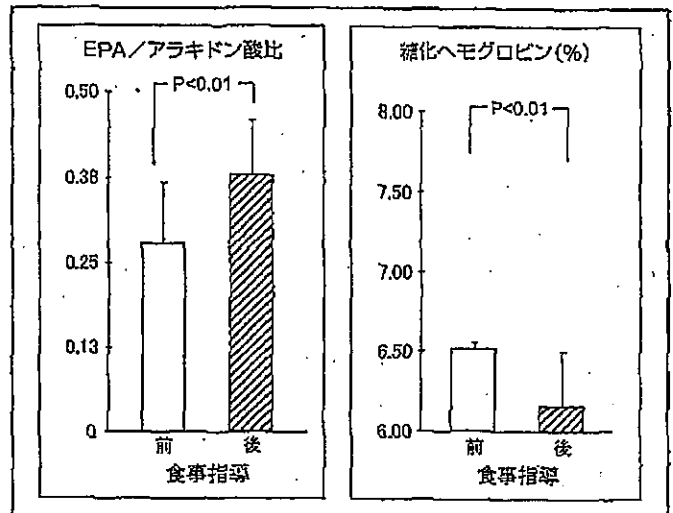


図1 日本人のⅡ型糖尿病患者の血清脂肪酸および糖化ヘモグロビンに及ぼす食事指導の影響<sup>10)</sup>

び拡張期の血圧の低下が認められている<sup>9)</sup>。

さらに、魚油と血糖との関係についても多くの動物実験が行われ、魚油の摂取により、血糖が低下することが明らかになっている<sup>9)</sup>。ところが、魚食や魚油摂取と血糖に関する疫学研究は少なく、魚を食べる人では食べない人に比べ、耐糖能異常(糖尿病など、血液中のブドウ糖=血糖を一定に保つ能力の異常)の頻度が低いことや、魚の摂取頻度と糖化ヘモグロビン(ヘモグロビンに糖が結合したもので、高血糖が続くと増え、一度結合すると離れないので、糖尿病の指標に使われる)の割合との間に負の相関があったとの発表が見られるのみである<sup>9)</sup>。しかし、魚を多く含む日本の伝統食を4ヵ月間摂取するという食事指導により、糖化ヘモグロビンの割合が減少したとの発表がある(図1)<sup>10)</sup>。

以上のように、魚食や魚油(DHA・EPA)摂取とメタボ危険因子との関係については、多くの研究が行われており、魚食(DHA・EPA)の頻度が高い場合には、血液中の中性脂肪の低下やHDL-コレステロールの増加と血圧の低下傾向が期待できる。しかし、ヒトの血糖については、未だ不明な点が多い。

### 漁村住民と農村住民の比較

わが国の漁村と農村住民の健康状態を比較した最初の疫学研究は、千葉大学医学部の研究グループにより約30年前に行われている(本誌2007年7月号参照)<sup>1)</sup>。この研究では、農村住民に比べ、漁村住民の方が魚食の頻度が高く、血液中のDHAやEPAの割合が極端に多くなっており、循環器系疾患での死亡率も少ないことが明らかにされている。最近、筆者らは、漁村住民として銚子市およびその近隣の住民を、農村住民として前橋市の住民を選び健康状態の比較を行ってみた。その結果、前述の千葉大学による研究結果ほど明確な差は見られなかったが、漁村住民の方が農村住民よりも、1週当たり1回程度魚食が多く、統計的な差が認められている。また、漁村住民の方が血液中のDHAやEPAの割合は高く、中性脂肪等の脂質成分は少ない傾向が認められている<sup>2)</sup>。この結果は、近年の経済発展や食品の流通システムの改善などにより、漁村や農村の住民の食生活が変化し、漁村では魚食の頻度が低下し、農村では魚食の頻度が上昇したためと考えられる。

そこで、次に、漁村住民の中から1日1回以上魚を摂取する人を選び、また、農村住民の中から魚の摂取頻度が低い人を選んで、耐糖能試験を行った。耐糖能試験とは、空腹時に、75gのブドウ糖が入った水溶液を飲み、その前から2時間後までの間に血糖値がどのように変化したかを測定して、糖の処理能力を見るものである。すなわち、血糖が正常域を超えて高ければ、糖の処理能力が悪く、糖尿病と診断される。漁村および農村住民での耐糖能試験の結果は、両者とも正常域にあったが、魚食の多い漁村住民の方が魚食の少ない農村住民よりも血糖値が低い傾向を示し、血糖の処理能力が高かった(図2)<sup>3)</sup>。このことは、魚食の頻度が高いほうが、血糖上昇抑制能が高く、糖尿病や

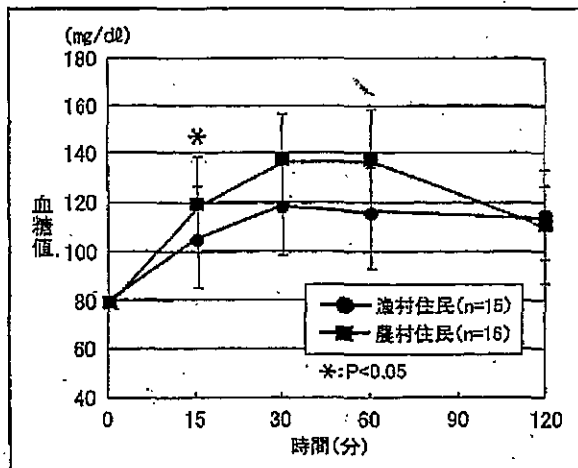


図2 漁村住民(平均8.8回/週の魚食)および農村住民(平均4.4回/週の魚食)の耐糖能試験の結果<sup>12)</sup>

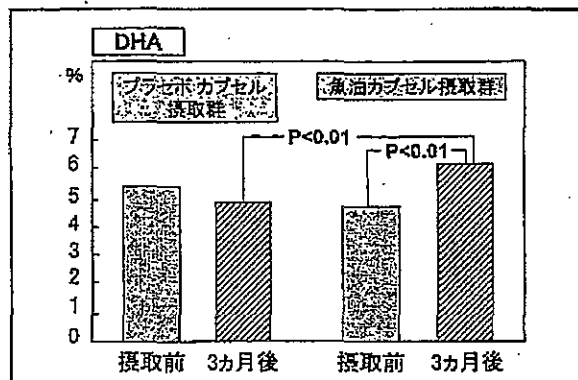


図3 魚油またはプラセボカプセルを摂取した被験者の血漿総脂質中に占めるDHAの割合<sup>13)</sup>

メタボになりにくいことを示している。

これらの調査研究から、日本人においても、魚食の頻度が高い人では、メタボになりやすく、循環器系の疾患にもなりやすいと思われる。

### メタボ危険因子に及ぼす魚油摂取の影響

魚油の摂取は、メタボの危険因子である高脂血、高血圧、高血糖の予防・改善に役立つ可能性が、魚食の少ない欧米人による介入試験で示されている。しかし、欧米人に比べて、魚食の多い日本人での介入試験はほとんど行われておらず、日本人においては魚油の摂取がメタボの予防・改善に有効か否か不明であった。そこで筆者らは、東京都内の事業所に勤務する40歳以上の男女49名の協力を得て、魚油(DHA約700mg



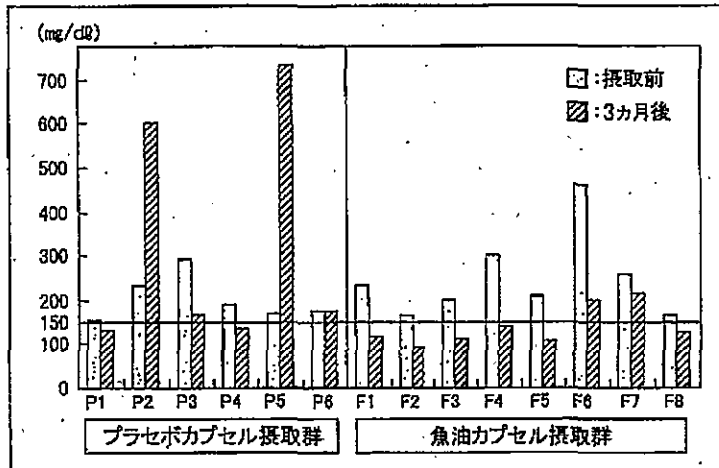


図4 摂取前の血漿中性脂肪濃度が150mg/dL以上の方の3ヵ月後の変化(P1~6:プラセボ群の被験者、F1~8:魚油群の被験者)<sup>13)</sup>

およびEPA約200mg含有)またはプラセボ(ハイオレインサフラワー油)カプセルを用いた二重盲検法(摂取している被験者の方も、与えている方も、検査する方も、どちらのカプセルを摂取しているかわからないようにして行い、先入観を除く方法)による3ヵ月の介入試験を行った<sup>13)</sup>(26頁写真)。まず初めに、被験者の食事内容を調査したところ、魚油カプセル群の方々もプラセボカプセル群の方々も、ともに魚食は週に6~7回で差がなかった。また、血漿中のDHAやEPAの割合についても、摂取前は差が認められなかった。しかし、介入試験終了時には、魚油カプセル摂取群でDHAもEPAも、その割合が明らかに上昇していた(図3)。両群を比較したとき、魚油カプセル群で血漿中の中性脂肪、総コレステロールおよびリン脂質が低下傾向を示していたが、統計的な差としては認められなかった。この理由

として、血漿脂質の測定項目は、個人差が大きいため、その影響が大きく出ていると考えられた。そこで、次に、各個人の変化を数値化し、魚油とプラセボカプセル摂取群間で比較してみた。その結果、魚油カプセル群で中性脂肪およびリン脂質濃度の低下が認められたのみならず、肝機能の指標も改善傾向にあることがわかった。また、魚油カプセル摂取群では、試験開始時に中性脂肪が基準値(150mg/dL)以上の方が8名いたが、そのすべてで低下し、6名は基準値以内に改善した(図4)。さらに、肝機能が悪い人では中性脂肪の濃度も高い傾向にあった。総合的には、メタボの人は魚油カプセル群で6名おり、そのうち4名が改善したが、プラセボカプセル群では、メタボの人(4名)の改善は認められなかった(表2)。これらのことから、魚油のDHAやEPAは、肝機能を改善することにより、高脂血を改善し、メタボの予防・改善に役立つことが考えられる。

以上の介入試験からも、魚食の頻度が高いほど、日本人もメタボになりにくく、循環器系疾患にもなりにくいと思われる。

表2 メタボリックシンドロームと診断された人数の変化<sup>13)</sup>

	摂取前	3ヵ月後
プラセボカプセル群	4人	4人
DHAカプセル群	6人	2人

## 認知症の予防と進行抑制

### 認知症と超高齢社会

現在、わが国の65歳以上の人口は20%を超え、高齢社会から超高齢社会に突入しつつある。西暦2050年には、高齢化率が35.7%になると予測されており、日本人の3人に1人は65歳以上と言われている。また、これからの20年間は75歳以上の人口が倍増する時代であると考えられている。このような超高齢化により、現在約180万人と言われている認知症の患者数は、

2020年には300万人に増えると推測されている。

筆者が平均年齢70歳の方々に前に講演したとき、加齢に伴いなりやすくなる病気はいろいろあるが、一番なりたくない病気は何かと尋ねると、80~90%の方が「老人性認知症」と答える。その理由は、家族に迷惑をかけたくないということである。

老人性認知症の原因を大きく2つに分けると、脳血管型とアルツハイマー型になる。脳血管型の認知症に

については、脳梗塞や脳出血の予防、すなわち、メタボの予防・改善ができれば脳血管疾患になりにくくなるので、ある程度予防が可能である。しかし、アルツハイマー型や原因不明の認知症の場合、予防法や治療法がないのが現状である。筆者らは、脳の栄養という面からの抗認知症研究に二十数年前に着手した。そして、現在までに、動物を用いた基礎実験からヒト介入試験まで行ってきたので、次に、その一部を紹介しながら、魚食と認知症について解説する。

### 魚油(DHA)と脳の健康

魚油に豊富に含まれるDHAは、ヒトや動物の脳にも比較的多く含まれている。そして、ヒトや動物が魚油を摂取した場合、DHAは消化吸収過程で分解したり、変化することはなく、そのまま吸収され、血液中を介して脳神経細胞内にも取り込まれ、その細胞内の膜を形成する成分となる。さらに、DHAは脳神経細胞の維持においても必要であり大切な成分である<sup>14)</sup>。

したがって、DHAは子供の脳神経系の発達にとって重要であるだけでなく、高齢者の脳神経系機能の維持・増進にも大切なものである。一方、高齢動物やアルツハイマー型認知症の人では脳内のDHAの割合が減少する傾向にあるとの報告がある<sup>15)</sup>。そこで、高齢動物を用いた魚油摂取試験を行ってみた結果、脳内でのDHAの増加、脳細胞膜の流動性の向上、酸化ストレスの低下を伴う記憶学習能の改善が認められている<sup>16-17)</sup>。このように、DHAには、老人性認知症の予防および症状の改善効果がある可能性が動物実験により示されている。

### 魚油摂取と認知症の予防および症状改善

魚食と認知症との関係については、魚食が多いほど老人性認知症になりにくいという平山による疫学調査がある<sup>18)</sup>。また、最近でも、海外で同様な結果が発表されている<sup>19)</sup>。

この10年間に、老人性認知症患者や高齢者での魚油摂取試験がわずかではあるが行われている。筆者らは、特別養護老人ホームでボランティア(平均年齢78歳)を募集し、魚油の摂取試験を行ってみた。このとき、30名(認知症22名、非認知症8名)に、魚油約

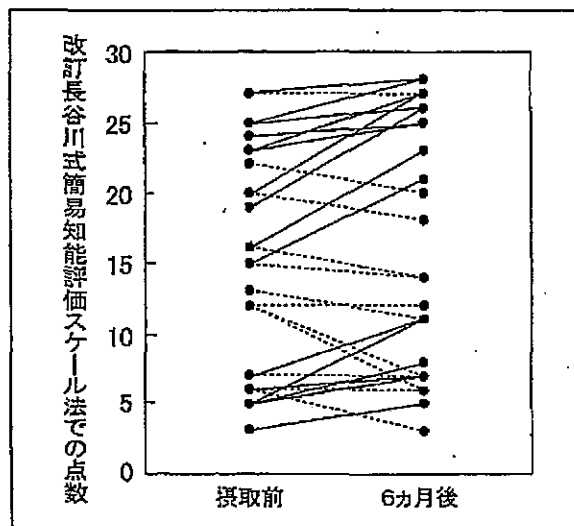


図5 魚油摂取による高齢者の認知度の変化<sup>20)</sup>

3g(DHAを640~800mg含有)を毎日、6ヵ月間、味噌汁に入れて摂取してもらい、摂取前と6ヵ月後に改訂長谷川式簡易知能評価スケール法で認知度を測定した。その結果、この6ヵ月の間に、知能評価スケール法による点数(30点満点)が上昇した人は18名、変わらなかった人が3名、低下した人が9名で、7点以上上昇した人が3名、5~6点以上上昇した人が5名であった(図5)<sup>20)</sup>。すなわち、特別養護老人ホームに入居している高齢者の場合、6ヵ月の間に認知度が低下する人が多いが、このように約3gの魚油を通常の食事にプラスすることで30名中21名に認知度の改善および低下の抑制が見られた。また、この結果は、魚油(DHA)の摂取が老人性認知症の予防にも役立つ可能性を示している。

最近では、魚油を約3g含むヨーグルト(内容量100g/個、DHAを600mg含有)を用いた、特別養護老人ホームのボランティア(平均86歳)による摂取試験も行っている。このときは、魚油含有ヨーグルトとプラセボ(ハイオレインサフラワー油含有)ヨーグルトを使って、6ヵ月間の摂取試験を二重盲検法により行った。魚油ヨーグルトを食べた方々のDHA源は、通常の食事から得られるもの+ヨーグルト摂取によるもの(約1440mg)であり、プラセボヨーグルトを食べた方々では、通常の食事から得られるもの(約840mg)だけである。この違いがどの程度、認知度に影響するのであろうか。

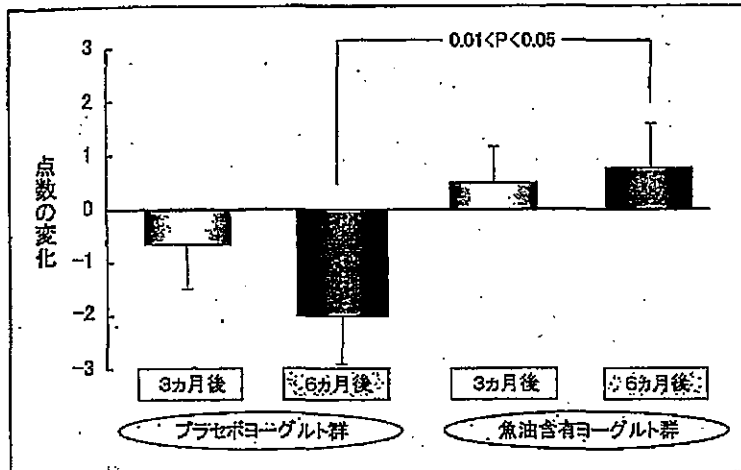


図6 高齢者の認知度に及ぼす魚油含有ヨーグルト摂取の影響(改訂長谷川式簡易知能評価スケール法による点数の変化)<sup>21)</sup>

以前と同様に、改訂長谷川式簡易知能評価スケール法を用いて、摂取前、3ヵ月目、6ヵ月目に認知度の測定を行った。その結果、3ヵ月目までは魚油ヨーグルトの人たちとプラセボヨーグルトの人たちとの間には明確な差がなかったが、6ヵ月目には魚油ヨーグルト摂取の人たちは点数の上昇が認められるのに対し、プラセボヨーグルト摂取の人たちは点数が低下し、認知症状が進む傾向が認められた(図6)<sup>21)</sup>。この結果から、魚油ヨーグルトを毎日1個摂取すること(通常の食事からのDHAに600mgのDHAを強化)により、認知症の症状が若干改善されるとともに、その進行が抑制でき、認知症の予防にもつながると考えられる。

さらに、アルツハイマー型および脳血管型の認知症患者に、1日当たり700~1400mgのDHAを与えた群馬大学の宮永らによる介入試験においても、18名中10名に認知症の症状改善が見られている<sup>22)</sup>。また、日本型食生活の特徴である魚(魚油)と緑茶の摂取を多めにするだけでも認知症の症状改善が認められている<sup>23)</sup>。

### メタボや認知症を防ぐ魚の食べ方

DHAやEPAを豊富に含む魚としては、本誌2007年7月号<sup>1)</sup>の表2で示した通り、アンコウの肝、マグロの脂身、ブリ、サバ、サンマ、イワシ等が挙げられる。もちろん、生で食べれば、DHAやEPAを100%摂れるが、調理しても80%以上は摂れる。また、缶詰や干物等の

加工品でも80%以上摂ることができる。さらに、DHAやEPAは非常に吸収率が良いことがその特徴である。

従来、DHAやEPAについての公の摂取基準は示されて来なかった。しかし、厚生労働省「日本人の食事摂取基準」2010年版(本年4月から適用)では、初めて公に魚食(DHA・EPA)について言及し、18歳以上の人については、1日当たりDHA+EPAで1000mg以上、魚で約90g以上が望ましいとしている。筆者らは、20年ほど前から、1日1度の魚食、すなわち、1日当たりDHAを1000mg以上摂取することを勧めており、「日本人の食事摂

取基準」はほぼ同様の内容となっている。しかし、前述の日本人での抗メタボや認知症予防に関する試験結果からすると、DHAやEPAの有効性を早期に期待したい場合には、その1.5倍程度摂取した方が良いと思われる。

### 参考文献

- 1) 鈴木平光(2007):魚食と循環器系疾患の関係―「血液サラサラ効果」の実際―、*アクアネット* 10(7), 32-36.
- 2) H. Suzuki, et al. (1995): *Fish. Sci.*, 61(3), 525-526.
- 3) G. Bulliyya (2000): *Clin. Nutr.*, 19(3), 165-170.
- 4) G. Bulliyya (2002): *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 11(2), 104-111.
- 5) A.H. Lichtenstein and A.V. Chobanian (1990): *Arteriosclerosis*, 10(4), 597-606.
- 6) S.L. Pfister, et al. (1989): *Eur. J. Pharmacol.*, 161(1), 85-89.
- 7) H.R. Knapp and G.A. FitzGerald (1989): *N. Engl. J. Med.*, 320(16), 1037-1043.
- 8) T. Higuchi, et al. (2006): *Ann. Nutr. Metab.*, 50(2), 147-154.
- 9) E.J. Feskens, et al. (1991): *Diabetes Care*, 14(11), 935-941.
- 10) T. Hasegawa and M. Oshima (1999): *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 46(2), 115-120.
- 11) 鈴木平光ら(2008): *脂質栄養学*, 17(2), 140.
- 12) 鈴木平光ら(2008): *日本油化学会第47回年会講演要旨集*, p.223.
- 13) 鈴木平光ら(2010): *脂質栄養学*, 19(2), 印刷中.
- 14) 鈴木平光・和田 俊・三浦理代編(2004): *水産食品栄養学*, 技報堂出版, p.135-137.
- 15) M. Söderberg, et al. (1991): *Lipids*, 26(6), 421-425.
- 16) H. Suzuki, et al. (1989): *Mech. Aging Dev.*, 50(1), 17-25.
- 17) S. Gemoh, et al. (2001): *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 28(4), 266-270.
- 18) 平山 雄(1992): *中外医薬*, 45, 157-162.
- 19) E. Albanese, et al. (2009): *Am. J. Clin. Nutr.*, 90(2), 392-400.
- 20) H. Suzuki, et al. (2001): *World Rev. Nutr. Diet.*, 88, 68-71.
- 21) 鈴木平光ら(2007): *脂質栄養学*, 16(2), 156.
- 22) 宮永和夫ら(1995): *臨床医薬*, 11(4), 881-901.
- 23) 鈴木平光, 森川洋一(2005): *脂質栄養学*, 14(2), 155.

