

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

ジアシルグリセロールの発がんプロモーション作用に関する
研究

平成 15 年度 総合研究報告書

主任研究者 飯郷正明

平成 17 (2005) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告

ジアシルグリセロールの発がんプロモーション作用に関する

研究----- 1

飯郷正明

II. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 42

III. 研究成果の刊行物・別刷----- 46

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
総合研究報告書

ジアシルグリセロールの発がんプロモーション作用に関する研究

主任研究者 飯郷 正明 国立がんセンター・研究所
がん予防基礎研究プロジェクト・室長

研究要旨 「体に脂肪が付きにくい食用油」ジアシルグリセロール（“DAG”）に含まれる 1,2-DAG は、細胞内でプロテインキナーゼ（protein kinase）C を活性化させる物質であり、発がんプロモーターである可能性が指摘されている。本研究では舌、食道、胃、乳腺および他の臓器における“DAG”の発がん亢進・プロモーション作用に対する影響を、舌、乳腺などの発がん高感受性ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニック（Hras 128）ラット（Tg）およびその同腹野生型ラットを用いて検討した。これら雌雄ラットを用い、発がんイニシエーション処置として 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) 10 ppm を実験開始時より 10 週間飲水投与した。このイニシエーション期間およびその後の 10 週間のポストイニシエーション期間の合計 20 週間、“DAG”を高用量（5.5% “DAG” + 0% トリアシルグリセロール {TAG}）、中用量（2.75% “DAG”+2.75% TAG）、低用量（1.375% “DAG” + 4.125% TAG）の 3 用量で自由摂取させた。体重、摂餌量、摂水量とも全ての群で顕著な差は見られなかった。腫瘍発生においては、雄 Tg ラットの舌の扁平上皮がんの頻度および数の傾向解析において、亢進・プロモーション作用が示唆された。雌 Tg および雌雄の野生型では有意差は認められなかった。この結果を確認するために当トランスジェニックおよび野生型ラットを用いた今回よりも高用量、長期間の実験が必要と考えられる。

A. 研究目的

一般の食用油成分は triacylglycerole

(TAG)、つまり三つの脂肪酸がグリセリンとエステル結合した形で存在する。しかし、その三つの脂肪酸のうち一つを欠く

diacylglycerol (DAG)は植物油成分中に数%存在し、二つの脂肪酸とグリセリンとのエステル結合の位置が異なる1,2-および1,3-DAGが存在する。それらは自然界では3:7の比で存在する。通常食べる油TAGは、小腸で脂肪分解酵素リパーゼによって2-モノアシルグリセロールと脂肪酸に分解、そして吸収される。吸収された脂肪酸と2-モノアシルグリセロールはまた小腸上皮細胞においてTAGに再合成され体内に運搬されて利用される。一方、1,3-DAGは小腸で消化分解を受けると、2-モノアシルグリセロールが生成されないために、吸収後にTAGへの再合成がほとんど行われな。そのために中性脂肪への転化が少ないと考えられ、これを主成分とした「体に脂肪がつきにくい食用油」(“DAG”)が市販され広く使われている。脂肪酸組成の大きな違いはないが(表1)、“DAG”には1,3-DAGの他、脂肪酸の置換部位の異なる1,2-DAGが30%程含まれている。1,2-DAGは、生体内では phospholipase C (PLC)により phosphatidyl inositol bisphosphate (PIP₂)から生成され、発がんプロモーターである12-*o*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)と同様に細胞内で protein kinase C (PKC)を活性化させる物質であり、TPAタイプの発がんプロモーターとして作用する可能性が危惧されている。さらに1,2-DAGは細胞内では Ras guanyl nucleotide-releasing protein (Ras-GRP)を活性化し、Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase (MAPK)カスケードに関わることが明らか

になっている。5.3%“DAG”はSDラットにおける2年間の慢性毒性試験で発がん性は認められておらず (M.G. Soni, et al. Food and Chemical Toxicology, 39, 317-329, 2001)、またSDラットのDMBA誘発乳がんに対し、7.0%“DAG”の混餌投与90日間の実験では、プロモーション作用を示さないことが報告されている (M. Sugano, et al. J. Oleo Sci., 51, 583-588, 2002)。本研究では、“DAG”のRas活性化作用との関連から、津田らによって作製された舌、食道、乳腺発がん高感受性ヒトプロト型c-Ha-ras遺伝子トランスジェニック (Tg)ラットを用いて、“DAG”の発がん亢進(4NQOと同時投与)およびプロモーション(4NQO投与後に投与)について、特に“DAG”が代謝分解されることなく直接暴露されると考えられる舌、食道および前胃に注目し、発がん亢進・プロモーション作用について検討し、リスク評価に対するより具体的な情報を提供することを目的とした。

B. 研究方法

化学発がん高感受性であるTgとその同腹の野生型ラットを用いた。6週齢雌雄に4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)を10ppmの用量で10週間飲水投与による発がんイニシエーション処置を行った。このイニシエーション期間とその後のポストイニシエーション期間(10週間)に“DAG”含有基礎飼料を計20週間自由に摂取させた後、屠殺し、主として舌、食道、乳腺及び他の臓器における腫瘍発生

におけるプロモーション作用の有無について検討した(図1)。“DAG”の基礎食中濃度は5.5%、2.75%および1.375%の3用量とし、総脂質量を5.5%に統一するために、2.75%および1.375%群では残りの脂肪酸を大豆油:菜種油(7:3)で調整し、すべての群で脂肪酸組成をほぼ一定になるようにした。対照群は4NQO投与後通常の基礎食(改変AIN-93G, 5.5%TAG)投与群とし、屠殺後肉眼的に病変の有無を観察し、舌、食道、胃(前胃、腺胃)、小腸、大腸、肝、腎を採取、固定し、舌、食道、胃、乳腺については全動物より、他は肉眼的に病変のある臓器より病理標本を作製した。また、“DAG”自体のこの系における毒性をみるために、“DAG”5.5%単独群とTAG5.5%群を併設した。雌雄のTgおよび野生型の各群構成は15(雌)および16(雄)匹とした(合計24群、372匹)。また主要臓器の毒性評価のために定期的な体重測定、屠殺時の血清生化学的検査を行った。

(倫理面への配慮)動物実験を実施するにあたり、国立がんセンター研究所実験動物取扱規程を遵守し適切な処置を行った。特に屠殺の際には、最大限に動物の苦痛軽減に努め、動物愛護の精神を充分考慮に入れて行った。

C. 結果

C-1.“DAG”摂取による体重、摂餌量および摂水量に対する影響

雌雄ラットに対し実験開始時より4NQO 10 ppmを飲水投与し同時に“DAG”混餌試料を高用量(5.5%“DAG”+0%TAG)、中用量(2.75%“DAG”+2.75%TAG)、低用量(1.375%“DAG”+4.125%TAG)の3用量で自由摂取させた。体重、摂餌量、摂水量とも全ての群で顕著な差は見られなかった(前年度報告済み)。

C-2.“DAG”による血液生化学性状への影響

血液生化学性状に対するDAGの影響を、4NQO投与群間では4NQO+0%“DAG”すなわち5.5%TAG(対照群)と比較し、4NQO非投与群間では5.5%“DAG”のみ投与した群と無処置群(5.5%TAG)とを比較した。血清トリグリセライド(TG)値は、雄Tgの4NQO+5.5%“DAG”投与群が4NQOのみ投与群に比し有意に低下した。4NQO非投与群間では無処置群に比し5.5%“DAG”投与群で有意に増加した。遊離脂肪酸(FFA)は、雌野生型で4NQO+2.75%“DAG”投与群が4NQO+0%“DAG”(対照群)に比し有意に高かった。肝機能では雄Tgで4NQO+5.5%“DAG”群が対照群に比しGOTが有意に高かった。雌野生型でも4NQO+5.5%“DAG”群が対照群に比し有意に高かった。またこの群はGPT値も有意に高かった(表2)。

C-3. 発がん

C-3-1. 舌

4NQOの舌発がん発生に対する“DAG”

の影響を、対照の 4NQO+0% “DAG”すなわち 5.5%TAG 群と比較した (表 3~10)。Tg ラット雄において、どの“DAG”群においても扁平上皮乳頭腫 (乳頭腫) の発生率 (図 2) は、対照群と比較して、有意差は見られなかった。扁平上皮がん発生率は (図 3)、5.5% “DAG”で 43.8%であり 4NQO のみ投与した対照群の 12.3%と比べ 3.6 倍に増加したが、有意差はみられなかった。しかし、発生頻度の用量相関の傾向検定において、有意な用量相関が認められた(コクラン・アミテージ傾向検定、 $P=0.0352$) (表 3)。この結果から、用量に相関して扁平上皮がんの発生率が増加することが考えられた。さらにラット 1 匹当たりの扁平上皮がんおよび乳頭腫と扁平上皮がんの合計の個数においても、用量に相関した有意な増加がみられた (線形回帰分析、各々 $P=0.0184$ 、 $P=0.0259$) (表 4)。しかし、雄ラットの野生型では 4NQO と“DAG”の投与群 (第 1、2、3 群) で腫瘍が少数発生したが有意な増加ではなかった (表 5、6)。一方、雌においては、Tg および野生型共に “DAG”の影響は見出せなかった (表 7~10)。

C-3-2. 胃

4NQO 投与群の前胃に扁平上皮乳頭腫とがんが少数の個体に発生し、“DAG”投与群 (第 1 - 3 群) に増加する傾向が見られたが、群間に有意差は見られなかった (表 11~18)。また Tg 群において“DAG”

のみの投与群で 1 匹(1/16)に乳頭腫の発生を見たが有意ではなかった。従って前胃に対する発がん亢進・プロモーション作用は見られなかった。腺胃では腫瘍の発生はなかった。

C-3-3. 乳腺

雌雄において、4NQO の投与による腺腫、腺がんおよび少数の肉腫の発生が見られたが、4NQO のみの群と比較して有意差はなかった (表 19~26)。野生型ではがんの発生はなかった。

C-3-4. 食道

どの群においても 4NQO による食道腫瘍の発生は見られなかった。従って腫瘍発生に対する影響の評価はできなかった。

C-3-5. その他の臓器

その他、小腸、大腸、肝、脾、腎、肺、脾などの臓器では、どの群においても腫瘍発生は見られなかったため評価はできなかった。

D. 考察

“DAG”投与後の血液生化学性状に対する影響としては、トリグリセライド、遊離脂肪酸、GOT、GPT 値に有意な差がみられたが、これらはいずれも用量依存性のない変化か、あるいは正常範囲を大きく逸脱しない変化であり、生理的変動範囲内の変化と判断した。また、トリグリセライドについて雌では Tg 及び野生型共