

厚生労働科学研究費補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業

アラキドン酸補給の安全性に関する研究

(H 22 - 食品 - 一般 - 002)

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浜崎 智仁

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- アラキドン酸補給の安全性に関する研究…………… 1
浜崎 智仁・奥山 治美

II. 分担研究報告

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

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 66

- IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 67

I. 総括研究報告

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

「アラキドン酸補給の安全性に関する研究」

研究代表者 浜崎 智仁 富山大学和漢医薬学総合研究所 教授
研究分担者 奥山 治美 金城学院大学脂質栄養オープンリサーチセンター 教授
研究協力者 鈴木 平光 女子栄養大学栄養学部 教授

研究要旨

アラキドン酸補給の安全性に関する研究の結果は、次の四項目に大別できる。

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

A. 研究目的

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

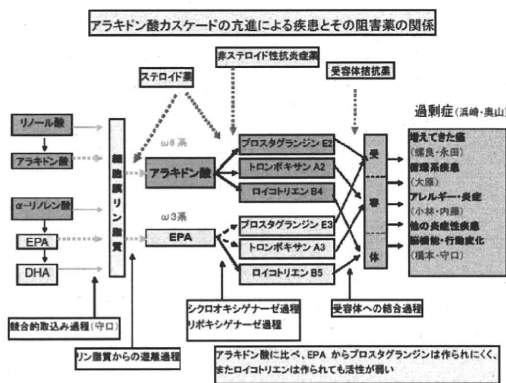
ARA を未熟児用粉ミルクに添加することの安全性に関しては、世界的なコンセンサスがある。しかし、成人に摂取量を2倍にするほど多量のARAをサプリメントとして補給することの安全性については、ARAの組織での濃度あるいは摂取量とガンの死亡率に相関があることが知られており、また心疾患死亡率との相関があること

からも疑問がある。そこで、当研究班はARAの安全性を再評価し、結果を公表する必要性を強く感じている。

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

具体的には、当研究班では、すでに日本でサプリメントとして市販され、また育児用ミルクに添加が検討されている発酵ARA油と同製法

によるアラキドン酸油を輸入し、市販品と脂肪酸組成・含量がほぼ同等であることを確認する。次に輸入されたARA油を含む餌で動物実験を開始し、炎症性、発癌のプロモーション過程、加齢ラットにおける脳機能などに及ぼす影響を広範囲に評価する事を目的とする。



B. 研究方法

1. ARA 補給の安全性に関する研究（総括）・・・浜崎・奥山

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

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

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

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

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

1) 経腸栄養剤投与によるラットへの脂肪酸取り込みの評価

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

2) ラット腸管虚血再灌流炎症モデルを用いた抗炎症作用の評価

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

4. ARA 補給の炎症への影響の評価・・・内藤

雄性 Wistar ラット 1 群 10 匹 6 群に分け、それぞれ、ARA 0、5、35、240 mg/kg、大腸炎誘導なし ARA 0 および 240 mg/kg 群とした。5%混合

油 (2.5%ラード、1.25%カノーラ油、1.25%大豆油、植田製油) 含有食および水道水を自由摂取させた。ARA 投与第 8 週に (7 日間)、3%DSS 溶液を給水ビンで自由摂取させた。週 1 回体重および摂餌量を測定した。さらに DSS 投与期間中は毎日、摂水量を測定した。

5. 胎仔期のARA投与が乳がん発症に及ぼす影響の評価・・・・螺良

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

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

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

6. 発がんプロモーション過程への影響評価・・・・永田

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

オジン染色標本を作製し、光学顕微鏡下に観察を実施する。

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

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

8. 老若マウスの脳機能に及ぼすARAの比較検討・・・・守口

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

9. 我国の女子学生及び中高年女性の食生活と血液中のアラキドン酸等多価不飽和脂肪酸の割合について・・・・鈴木

1) 女子大生の食生活と血液中ARAのレベルについて

魚油添加DHA含有ヨーグルトあるいは対照ヨーグルトを、二重盲検法にて学生に3ヵ月間投与した。摂取前及び1、2、3ヵ月目に血漿中の

脂肪酸組成などの測定を行なった。

2) 漁村及び農村地域の中高年女性の食生活と血漿中 ARA レベルについて

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

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

C. 研究結果

1. ARA 補給の安全性に関する研究（総括）・・・・・浜崎・奥山

全体のバランスと今後さらに加える研究等を検討した。特に前川論文（BBRC 2010;402:431）では、ARA で小眼症が見られたことから、班員の小林と共同でさらに研究を進める事になった。また、すでに終了しているヒトでの横断的研究を見直し、ARA が活動性あるいは皮膚の問題点（シミ、シワ）と関連している可能性があるため、この点を検討することとした（浜崎）。

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

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

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

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。

4. ARA 補給の炎症への影響の評価・・・・・内藤

ARA 0 mg/kg と比較し、投与第 7 週まで一般症状（体重・摂餌量を含む）には、異常が認められなかった。投与第 8 週の DSS 投与第 3 日以降、軟便～下痢便、赤褐色～赤色便等が全例で観察された。これまでの結果からは、ARA 補給が、薬物誘導炎症性大腸炎を増悪する作用は認められなかった。平成 23 年 4 月時点で、投与期間が終了したところである。今後実施する、病理学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、大腸炎の指標を調べる検査（便の状態解析、大腸重量比、大腸 myeloperoxidase 活性、大腸粘膜培養上清 GRO/CINC-1 量）の結果とあわせて、炎症性疾患への影響を総合的に解析する。

5. 胎仔期の ARA 投与が乳がん発症に及ぼす影響の評価・・・・・螺良

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

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

3) 現在、MNU 投与を終了し、経過観察中である。

6. 発がんプロモーション過程への影響評価

・・・・永田

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

7. 加齢ラットの空間認知機能に及ぼす ARA 長期投与の影響・・・・橋本

体重は両群間で有意な変化が認められなかった。空間認知機能の評価指標である参照記憶や作業記憶には有意な影響は認められなかったが、ARA 投与ラットではすべての報酬餌をとりきるに要した時間（摂取所要時間）がコントロール群に比べて有意に低値を示した。ARA 投与ラットでは、血漿の HDL・LDL コレステロール、ARA、ならびに n-6/n-3 比は増加し、パルミチン酸、オレイン酸、ならびにリノール酸は有意に低下した。ARA 投与ラットでは、大脳皮質の ARA が有意に増加し、リノール酸が低下した。海馬では ARA の摂取により、リノール酸と DHA/AA 比の低下と n-6/n-3 比の増加が認められた。ARA を摂取した加齢ラットでは、脳内の ARA が増加し、行動機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

8. 老若マウスの脳機能に及ぼす ARA の比較検討・・・・守口

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

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

9. 我国の女子学生及び中高年女性の食生活と血液中のアラキドン酸等多価不飽和脂肪酸の割合について・・・・鈴木

1) 魚油含有 (DHA リッチ) ヨーグルトを摂取後では、ARA $5.9 \pm 0.8\%$ ($P < 0.05$)、EPA $2.1 \pm 1.3\%$ ($P < 0.01$)、DHA $5.2 \pm 1.7\%$ ($P < 0.01$) で有意に高い値を示した。一方、リノール酸においては、魚油含有ヨーグルト群の方が $27.7 \pm 2.3\%$ ($P < 0.01$) と有意に低い値を示した。

2) 漁村地域では、農村地域に比べて、肥満の人が多かった。おかずの調査では、魚をメインに食べるという人は漁村では 71% と高く、農村では半数の 50% であった。血液の脂肪酸構成は、農村地域と比較して漁村地域ではリノール酸が有意に低く、血漿 EPA および DHA が高かった。また、血球においては、リノール酸 ($13.1 \pm 0.2\%$) は血漿と同様の傾向が見られ、EPA は漁村地域で有意に高かった。血漿および血球の ARA については、地域差が見られなかった。

3) 漁村地域 (15 名) 及び農村地域 (16 名) の平均年齢はそれぞれ 66.6 ± 2.0 および 60.5 ± 2.4 歳の女性であり、BMI がほぼ同様で 21.6 であり、漁村地域の女性の方が農村地域の女性よりも、1 週間での魚介類摂取頻度が多い人々を選別した。血漿脂質の脂肪酸組成では、農村地域よりも漁村地域の方が、ARA、EPA および DHA が高い傾向にあり、特に、DHA は 5.9 ± 0.2 で有意に高かった。リノール酸は農村地域の人 (27.4 ± 1.1) が漁村地域の人 (24.4 ± 1.8) より高かった。

D. 考察

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

これまでの結果をまとめると以下ようになる。

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

○発癌と発癌プロモーションへの影響： ヒト乳癌細胞株を移植したヌードマウスでは ARA 投与により、乳癌細胞の増殖が促進された(螺良)。他の発癌と発癌プロモーションモデルでは、研究が進行中である (螺良、永田)。

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

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

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

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

G. 研究発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

II. 分担研究報告

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

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

研究分担者 大原 直樹 金城学院大学薬学部 教授
研究協力者 内藤 由紀子 国立循環器病研究センター研究所 病態ゲノム医学部 室長
立花 滋博 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 毒性部

研究要旨

アラキドン酸（AA）投与が炎症性病態（高血圧、血管傷害、脳出血等）を増悪するか否かを評価する目的で、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）を用いた13週間（90日間）反復投与毒性試験を実施した（本実験は、平成23年4月25日現在、進行中である）。

雌雄それぞれ32匹のSHRSPを4群に分け、AA 0、5、35および240mg/kgに該当するAA含有油を1日1回経口投与した。アラキドン酸含有サプリメントに目安として設定されている1日摂取量（AAで240mg）とほぼ同量を低用量、その約50倍を高用量とした。

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

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

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

A. 研究目的

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）を用いた13週間（90日間）反復投与毒性試験を実施し、アラキドン酸（AA）投与がSHRSPにおける炎症性病態（高血圧、血管傷害、脳出血等）を増悪するか否かを評価する。

B. 研究方法

雌雄それぞれ32匹のSHRSPを4群に分け、AA 0、5、35および240mg/kgに該当するAA含有油を1日1回90日間経口投与する。アラキドン酸含有サプリメントが目安として設定している1日摂取量（AAで240mg）とほぼ同じ量を低用量、その約50倍を高用量とした。

1) 一般状態の観察

投与期間中毎日、投与前後に一般状態を観察する。剖検日は搬出前に観察する。

2) 体重測定

投与初日に体重を測定し、以後投与期間終了週まで毎週1回の頻度で投与前に測定する。投与期間終了日および剖検日ならびに死亡時および切迫屠殺時にも測定する。

3) 摂餌量測定

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

4) 血圧測定

投与前、投与第4週、8週および12週にtail-cuff

法で血圧を測定する。測定週は変更する可能性がある。

5) 採血

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

①血液学的検査用採血（抗凝固剤：EDTA 2K）

②血液生化学的検査用採血（抗凝固剤：ヘパリン）

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

一般症状および体重

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

れた。

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

血压

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

D. 考察

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

E. 結論

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

(参考文献)

Takeichi S, Nakajima Y, Yukawa N, Saito T, Seto Y, Huang XL, Kusakabe T, Jin ZB, Hasegawa I, Nakano T, Saniabadi A, Adachi M, Ohara N, Wang T, Nakajima K. 2001. Plasma triglyceride-rich lipoprotein remnants as a risk factor of 'Pokkuri disease'. Leg Med (Tokyo). 3(2), 84-94.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

未発表。

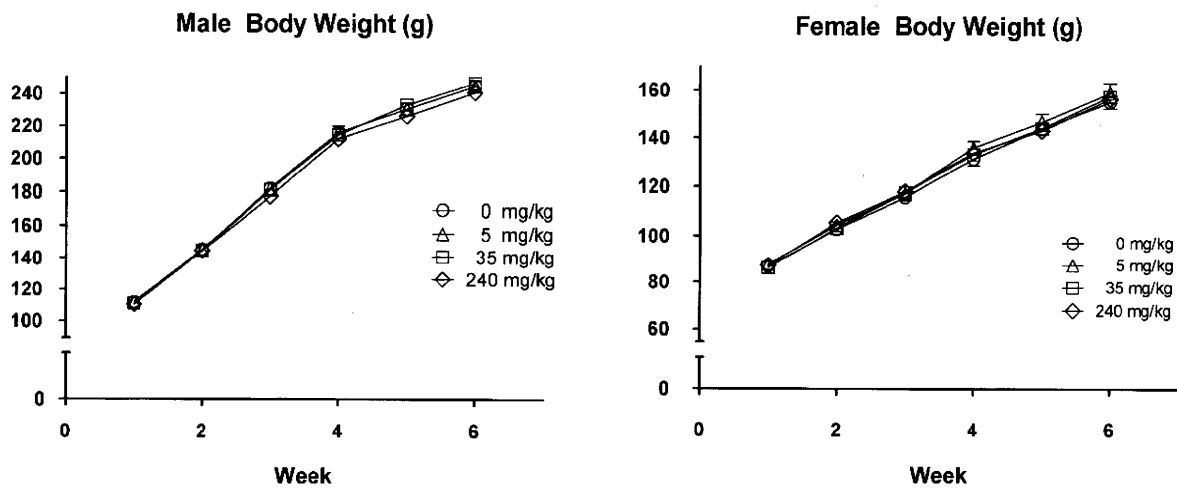


図 1 投与第6週までの観察では、体重推移摂餌量にAA投与の影響は認められない。

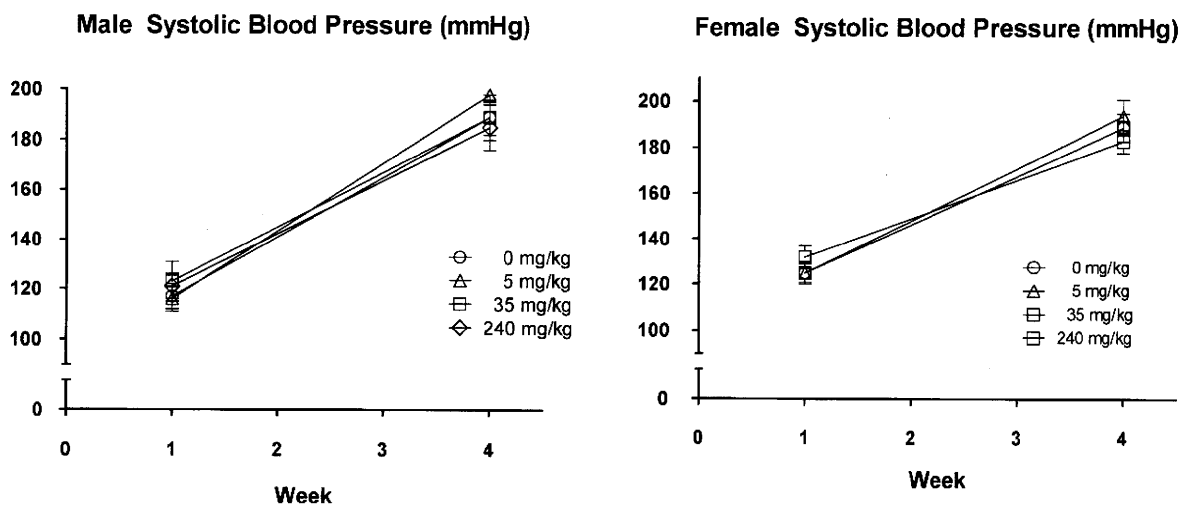


図 2 第1および4週の収縮期血圧雌雄ともに群間差は認められない。

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

「アラキドン酸補給の炎症への影響の評価」

研究分担者 内藤 由紀子 独立行政法人国立循環器病研究センター・室長

研究要旨

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

投与第 7 週までの全動物の一般症状には、異常が認められなかった。また、アラキドン酸投与群の体重および摂餌量は、対照群（アラキドン酸 0 mg/kg）と比較して有意差は認められなかった。投与第 8 週の DSS 投与第 3 日以降、軟便～下痢便、赤褐色～赤色便等が全例で観察された。本実験は平成 23 年 4 月現在、進行中である。

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

A. 研究目的

アラキドン酸の補給が、炎症性疾患に影響を与えるか否か調べることを目的とし、アラキドン酸を投与したラットに炎症性大腸炎を誘導するデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）を経口投与し、誘導された大腸炎の程度や頻度等を評価した。また、DSS を投与しない群も設定し、正常動物への影響の有無を評価することも目的とした。

B. 研究方法

1. 動物

雄性 Wistar ラット (Slc:Wistar, 4 週齢、日本エスエルシー、静岡) 60 匹を購入し、1 週間の検疫・馴化後、1 群 10 匹 6 群に分けた。それぞれ、アラキドン酸 0、5、35、240 mg/kg、大腸炎誘導なしアラキドン酸 0 および 240 mg/kg 群とした。動物は、温度 21.0～25.0℃、湿度 40.0～75.0%、換気設定約 15 回/時間および明暗サイクル 12 時間（7～19 時：点灯、19～7 時：消灯）の条

件で管理された飼育室内で飼育した〔飼育密度は1匹/ケージ（金属製金網床ケージ、220 w×270 d×190 h mm）〕。また、5%混合油（2.5%ラード、1.25%カノーラ油、1.25%大豆油、植田製油）含有CE-2（日本クレア、東京）および水道水（秦野市水道局給水）を自由摂取させた。

2. 投与

アラキドン酸含有油（Lot No. 10050701、CABIO、中国）を7倍公比で混合油と混合し、アラキドン酸0、5、35および240 mg/kg（投与容量0.6 mL/kg）を、8週間毎日強制経口投与した。なお投与量は、アラキドン酸含有サプリメントが目安として設定している1日摂取量とほぼ同量を低用量、約50倍を高用量とした。

3. DSS誘導炎症性大腸炎の作製

アラキドン酸投与第8週に（7日間）、3% DSS溶液（和光純薬工業、東京）を給水ビンで自由摂取させた。

4. 検査および測定

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

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

（倫理面への配慮）

「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和48年10月1日、法律第105号、平成18年6月2日一部改正）、「実験動物の飼養及

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

C. 研究結果

投与第7週まで、全動物の一般症状には異常は認められなかった。しかし、DSS投与が開始した投与第8週は、DSS投与群の動物に貧血が散見された。また、投与第7週までの全例の体重は、順調に増加し、群間差は認められなかった（図1）。DSS無投与群の全例の体重は、その後引き続き投与終了時まで順調に増加した一方、DSS投与群では、投与最終日（投与第56日）の体重はその前回の体重（投与第50日）よりも減少した。アラキドン酸投与群（5、35および240 mg/kg群）の摂餌量は、対照群（アラキドン酸0 mg/kg）と比較して有意差は認められなかった（図2）。DSS投与期間中の便は、DSS投与第3日以降、軟便～下痢便、赤褐色～赤色便、肛門周囲の赤褐色便付着等が観察された（程度および頻度の解析は、今後実施する予定）。なお、240 mg/kg投与群で、摂水量の低い動物が1例認められた。この動物では、DSS投与最終日に軟便が観察されたのみであった。

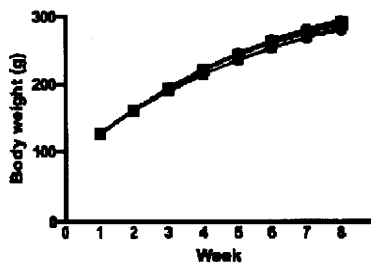


図1 体重の推移

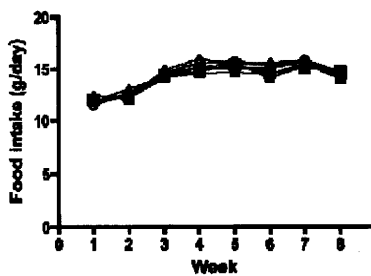


図2 摂餌量の推移

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

D. 考察

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

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

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

(記載せず)

G. 研究発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

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

「乳癌に対するアラキドン酸の影響」

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

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

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

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

C. 研究結果

①アラキドン酸を直接腫瘍塊に投与した場合、

腫瘍塊の体積ならびに組織像には非投与群と差はみられなかった。

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

③現在、MNU 投与を終了し、経過観察中である。

D. 考察

特記せず。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特記せず。

G. 研究発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

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

「脂質メタボロームを用いたラット炎症病態と必須脂肪酸バランスの解析」

研究分担者 小林 哲幸 お茶の水女子大学大学院 教授

研究要旨：

最近のポストゲノムサイエンスにおいて、細胞内にある脂質代謝物を一斉に解析する手法である脂質メタボローム解析がたいへん注目されている。しかし、最新の質量分析装置を基盤としたその解析技術は未だ確立されてから日が浅く、病態研究への適用例は少ない。本研究では、必須脂肪酸バランスの異なる経腸栄養剤を投与したラットの腸管虚血再灌流炎症モデル実験系を用いて、脂質メタボローム解析の手法を確立し、その有効性を検証した。その結果、 ω 3 系列脂肪酸を豊富に含む経腸栄養剤の投与は、各種脂質メディエーターやその前駆体分子レベルにおいても抗炎症作用を裏付ける変動が観察されたのに対し、 ω 6 系列脂肪酸に富む経腸栄養剤は炎症を増悪する分子群が多くなることから、各種脂質関連分子の変動から裏付けられた。

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

B-1. 経腸栄養剤投与によるラットへの脂肪酸取り込みの評価

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

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

	Oxepa	Pulmocare
ミリスチン酸(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(18:1 cis)	29.7	50.2
エライジン酸(18:1 trans)	2.0	1.9
リノール酸(18:2 ω6)	18.3	24.7
γ-リノレン酸(18:3 ω6)	6.0	-
α-リノレン酸(18:3 ω3)	4.0	5.1
エイコセン酸(20:1)	1.6	0.6
エイコサペンタエン酸(20:5 ω3)	6.5	-
ドコサヘキサエン酸(22:6 ω3)	2.7	-

(%)

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

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

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

B-2. ラット腸管虚血再灌流炎症モデルを用いた抗炎症作用の評価

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

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

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

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

C. D. 研究結果と考察

C-1. 経腸栄養剤投与によるラット血漿、組織への脂肪酸の取り込み

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

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

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

血漿以外の組織・臓器での分子種変動について、Pulmocare と 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、AA を持つ二重結合数 4 の分子種については、Pulmocare 投与で多いことが確認された。特に、多くの器官・臓器で変動が見られた分子種は、二重結合数 2 の分子種では、LPC18:2、PC34:2、PC36:2 であり、二重結合数 4 の分子種では、LPC20:4 であった。飽和と二重結合数 1 の分子種については、Pulmocare 投与により、血漿・血球成分・腸管・腸間膜リンパ節で増加が見られた。