

(A)

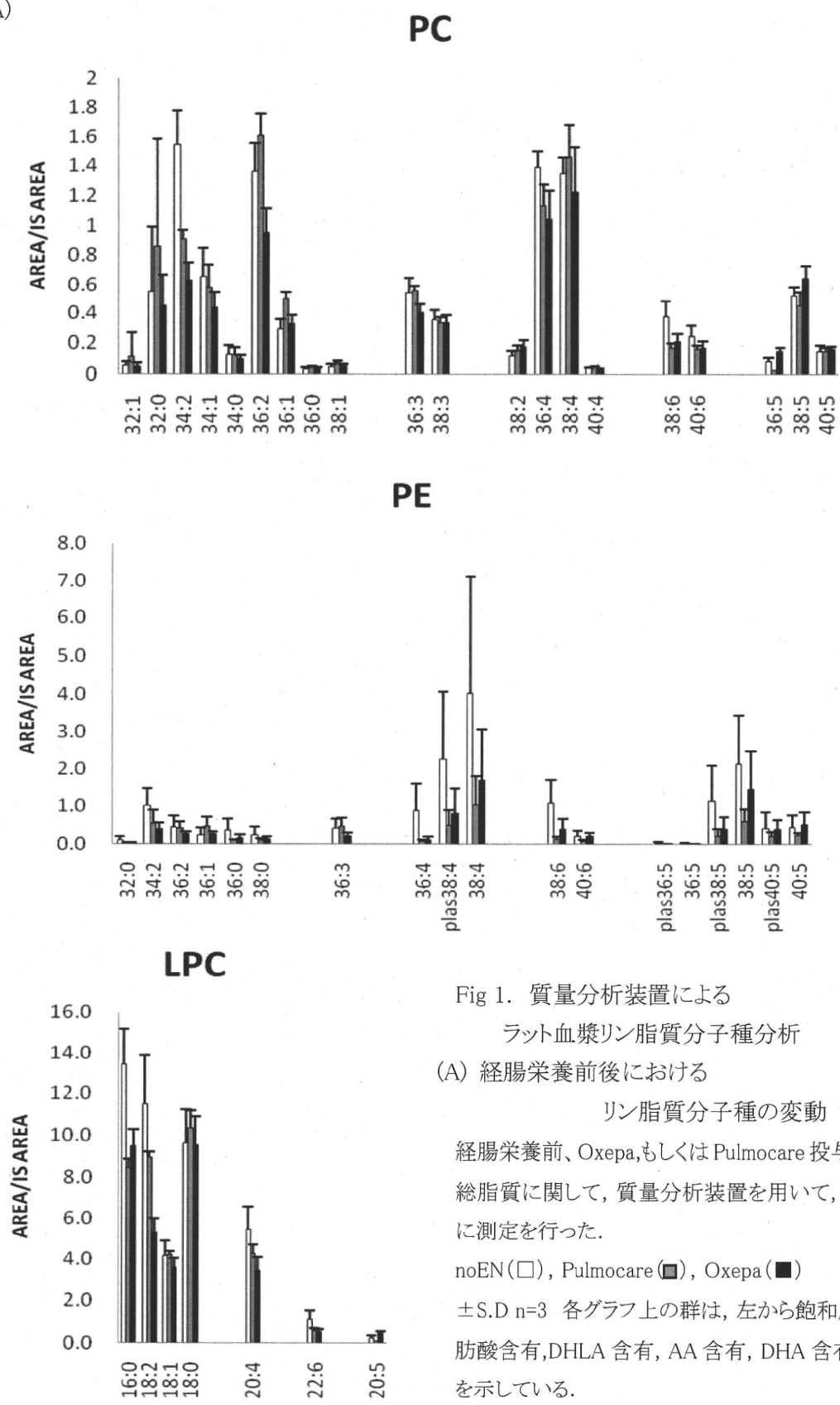


Fig 1. 質量分析装置による  
ラット血漿リン脂質分子種分析  
(A) 経腸栄養前後における  
リン脂質分子種の変動

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

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

(B)

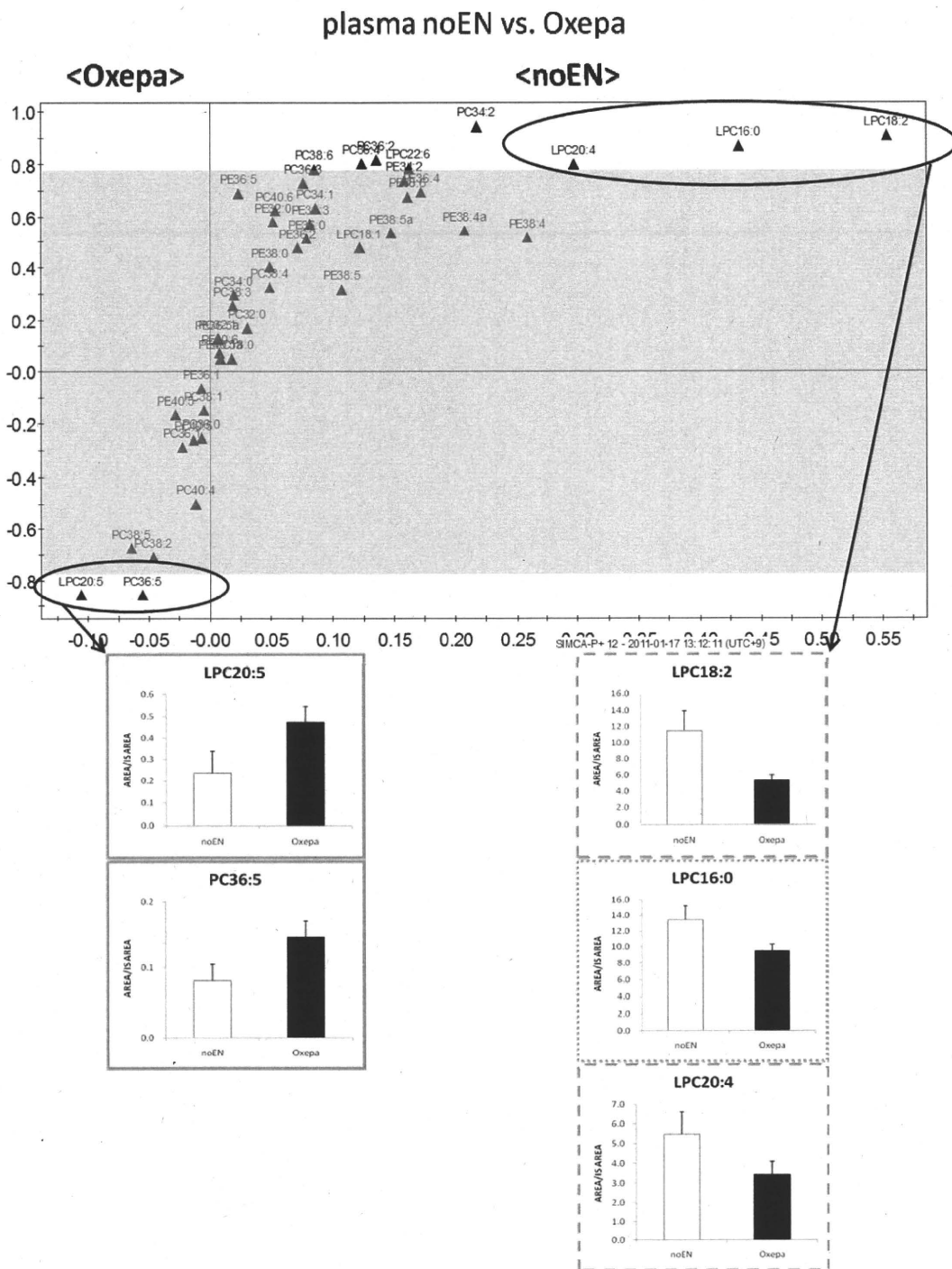


Fig. 1 質量分析装置によるラット血漿リン脂質分子種分析

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

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

(C)

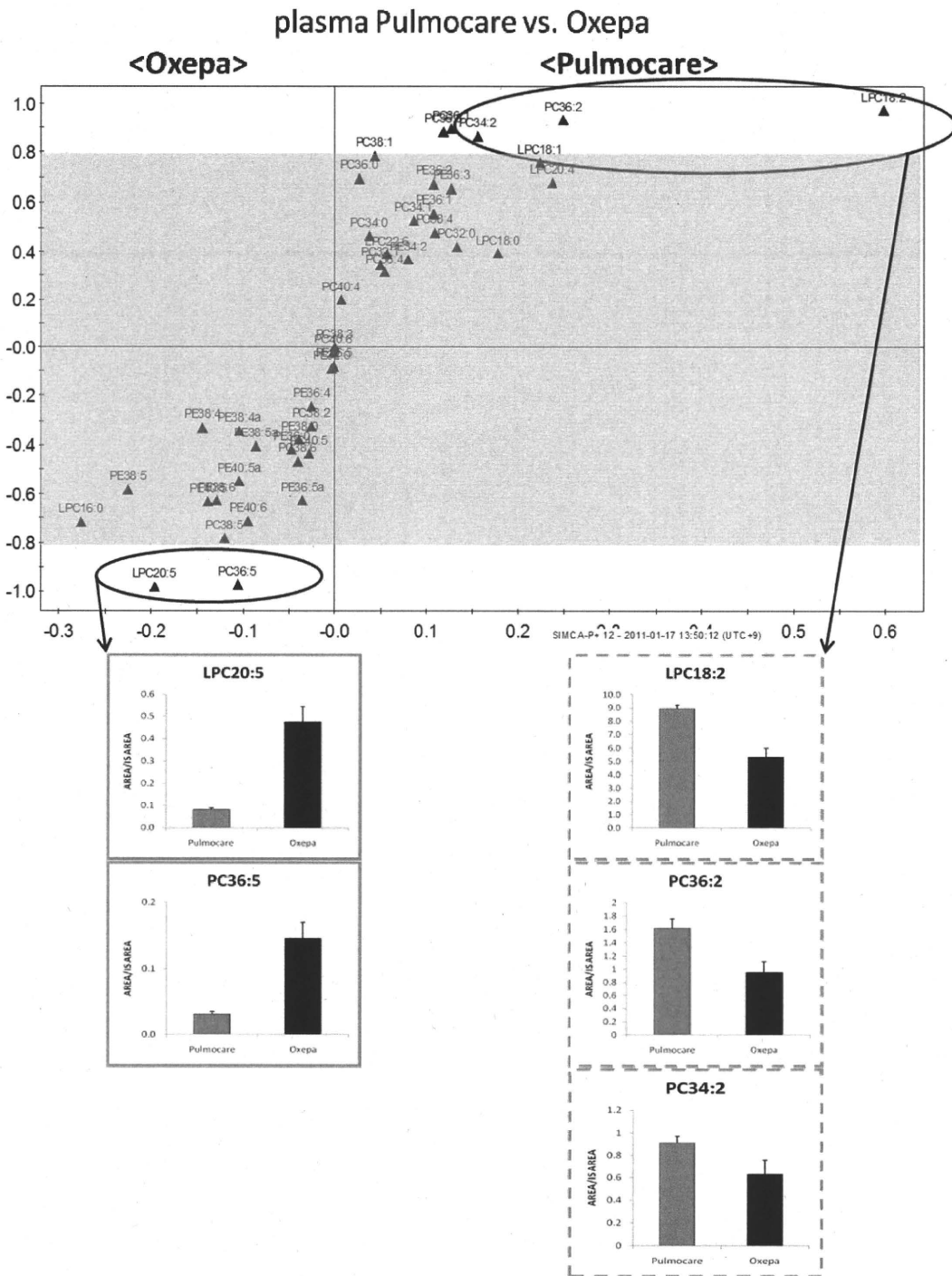


Fig. 1 質量分析装置によるラット血漿リン脂質分子種分析

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

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

代表して、LPC20:5, PC36:5, LPC18:2, PC36:2, PC34:2 について、グラフを示した。

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

(D)

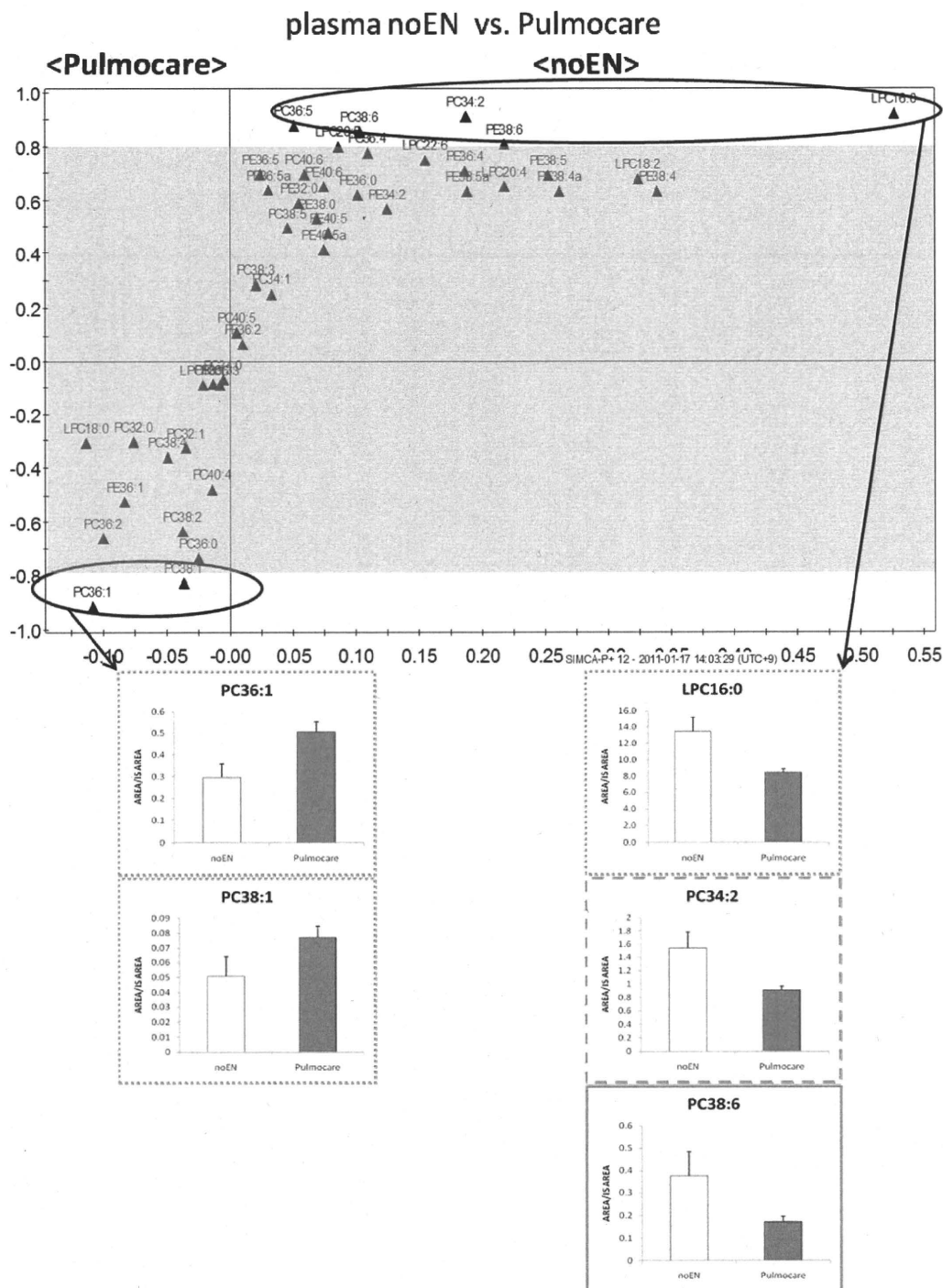


Fig. 1 質量分析装置によるラット血漿リン脂質分子種分析

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

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

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

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

Pulmocare vs. Oxepa

	飽和 & 一価		ω5		ω3		ω5 & ω3	
	0	1	2	4	5	6	3	
plasma		PC36	LPC18 PC34 PC36		LPC20 PC36		PC36	
blood cells		LPC18	LPC18	LPC20	LPC20 PC36			
intestine	LPC18 LPC18 PC32 PC34	LPC18 PC34		PEplac38	LPC20 PEplac40 PE40	PE40		
lymph node			PE38 PE34 PC34 PC38	PEplac38 PC38	LPC20 PEplac40 PC36 PE36	PE42	PE38	
liver			PC36 PE34 PE36	PC38 PE38	LPC20 PC36	PE40		
lung					LPC20 PC36 PEplac36		PE36	

Fig. 2 ラット各器官・臓器リン脂質分子種分析まとめ

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

※OPLS 分析 $>0.6$ で集計した分子種については、細字で表している。

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

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

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

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

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

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

(A)

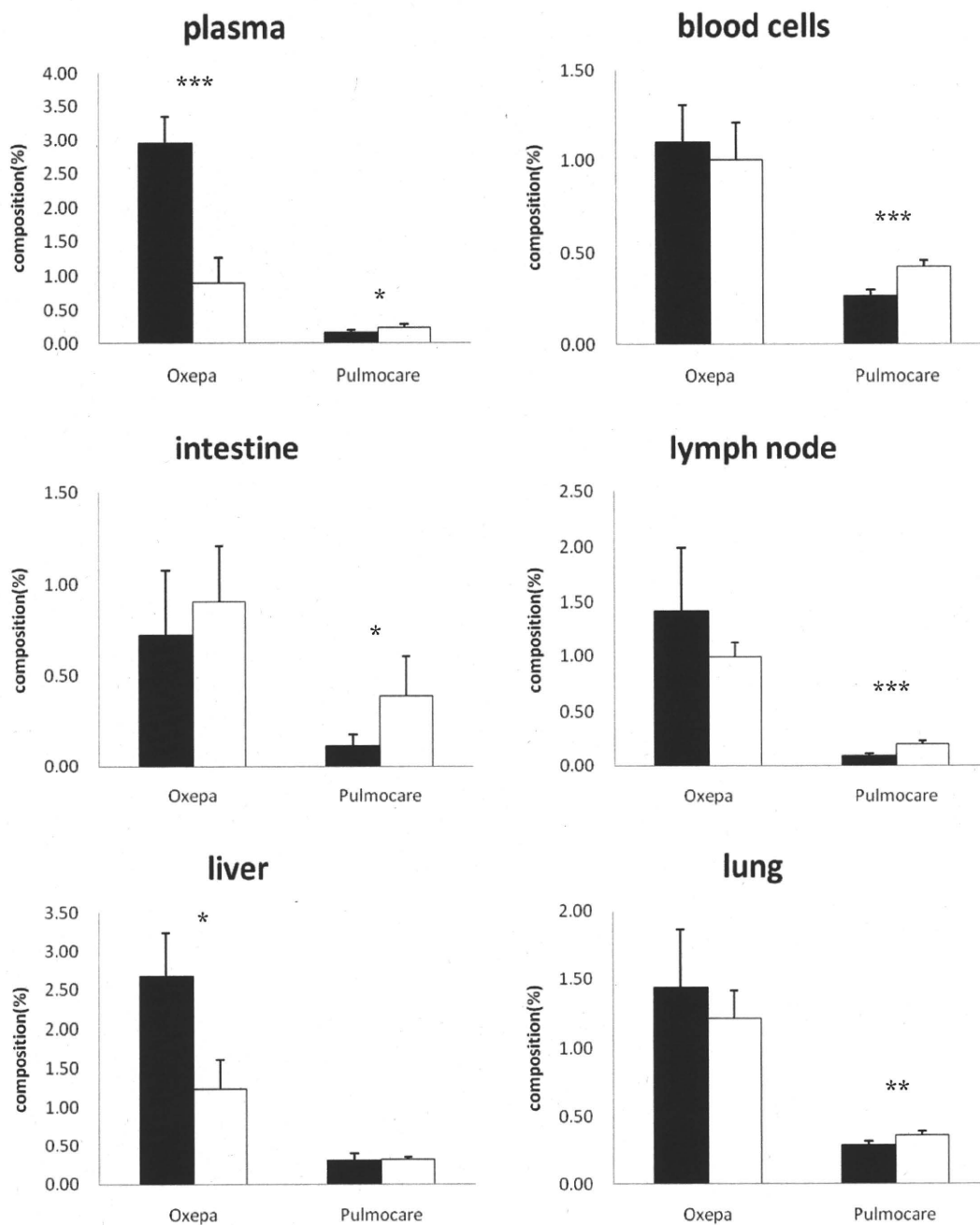


Fig. 3 腸管虚血再灌流モデルラットにおける各器官・組織リン脂質脂肪酸組成の変動

(A) 各器官・組織におけるEPAの変動

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

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

(B)

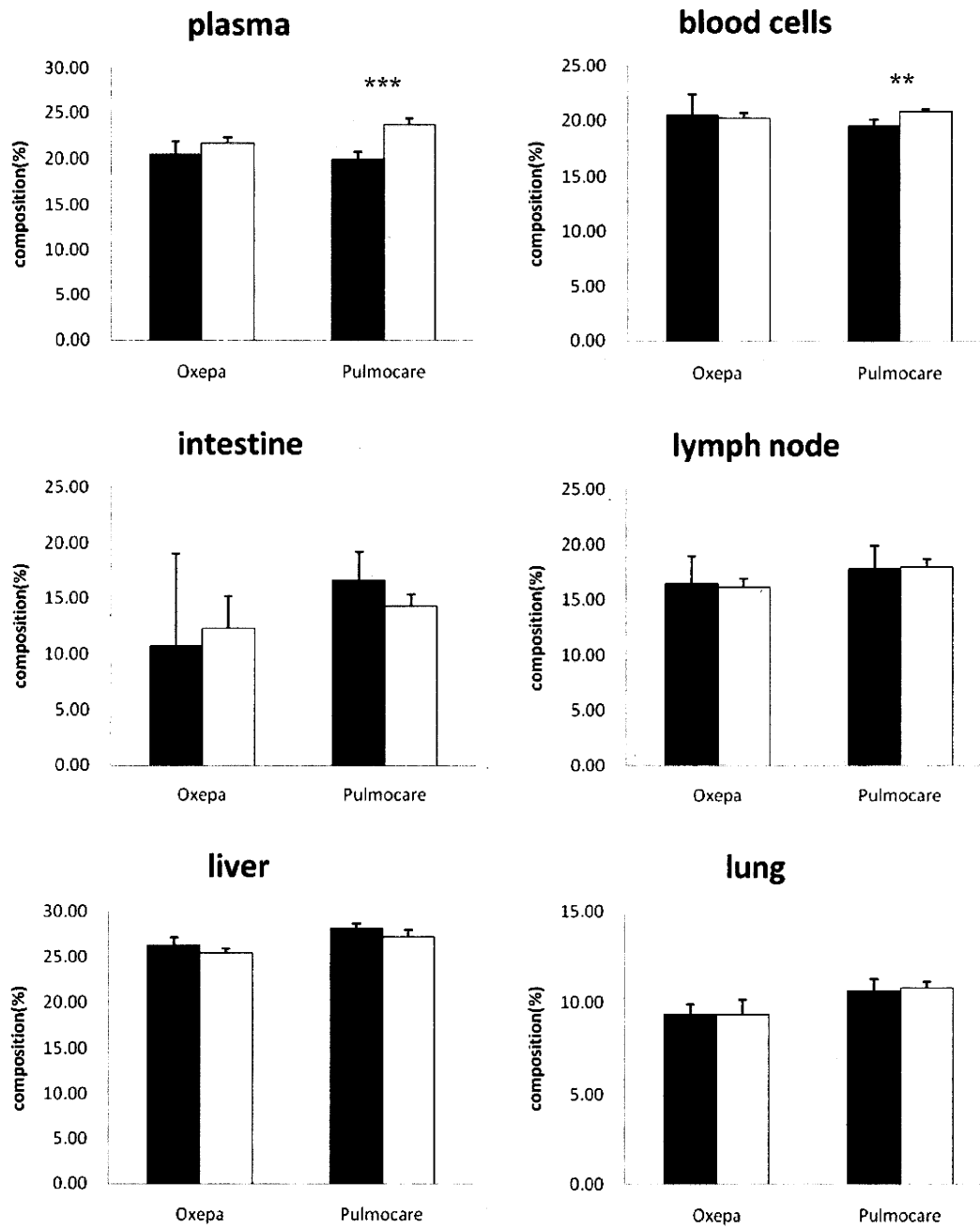


Fig. 3 腸管虚血再灌流モデルラットにおける各器官・組織リン脂質脂肪酸組成の変動

(B) 各器官・組織における AA の変動

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

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

(C)

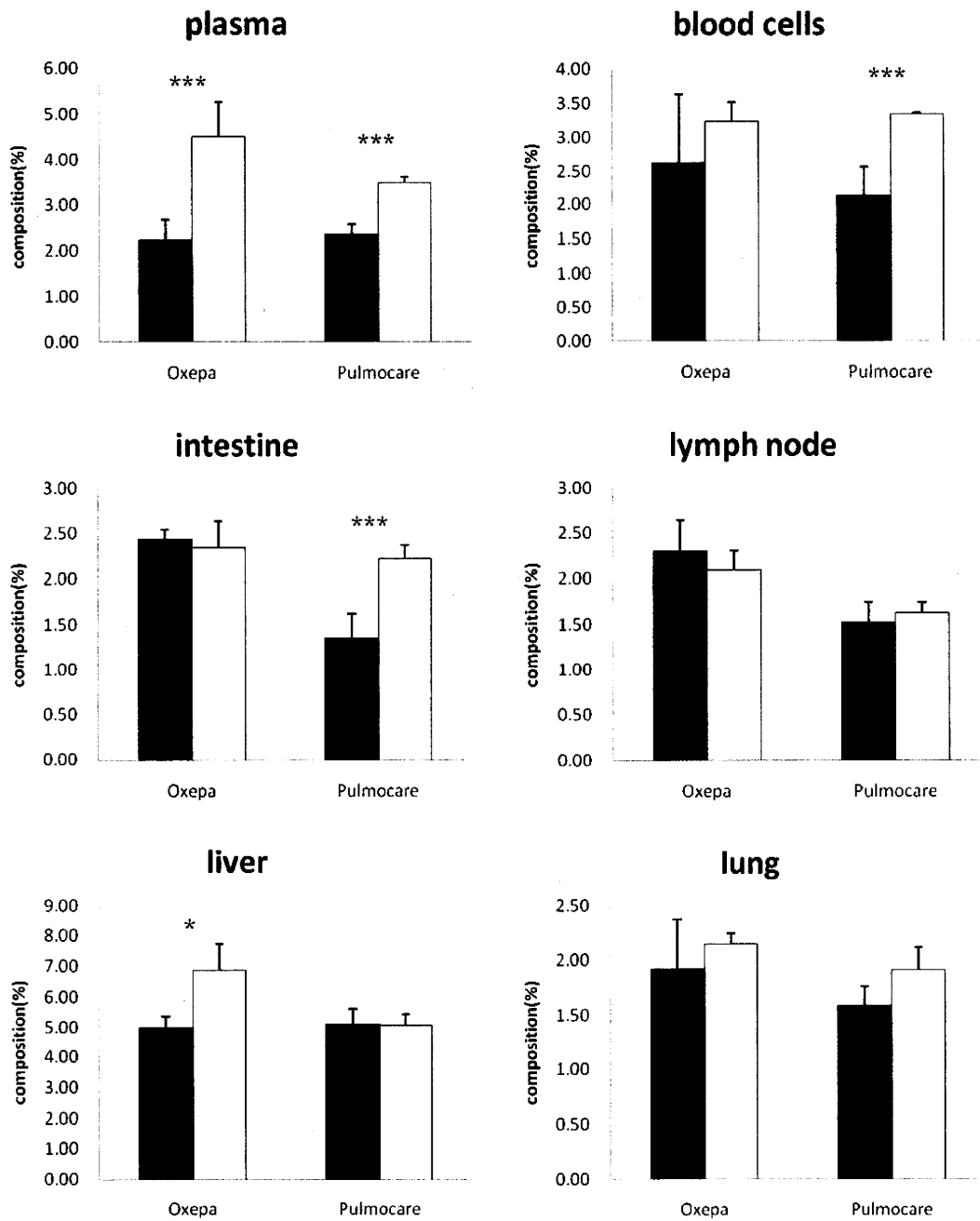


Fig. 3 腸管虚血再灌流モデルラットにおける各器官・組織リン脂質脂肪酸組成の変動

(C) 各器官・組織における DHA の変動

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

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



### C-3. 腸管虚血再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

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

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

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

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

関して、どちらの群とも大きな差異は見られなかった。

Fig. 4 (C)の結果をSIMCA P+によるOPLS分析で解析した結果をFig. 4 (D)に示した。y軸 $>|0.8|$ であった、主な酸化脂肪酸について、平均で算出したグラフを下図に示した。Pulmocare投与群では、Oxepa投与群に比べ、AA由来の炎症性脂質メディエーターであるLTB<sub>4</sub>が有意に多く産生された。また、PGF<sub>2</sub> $\alpha$ 、12-HETEもPulmocare投与群で多い傾向が見られた。一方、Oxepa投与群では、Pulmocare投与群に比べ、5-HEPE、12-HEPEが有意に多い傾向が見られた。また、PGE<sub>3</sub>についても多い傾向が見られた。他に、Pulmocare投与群が検出限界以下で、統計学的な評価はできないが、Oxepa投与群で多く見られた酸化脂肪酸として、PGD<sub>3</sub>、15-HEPE、レゾルビンEシリーズの前駆体である18-HEPEが見出された。

(A)

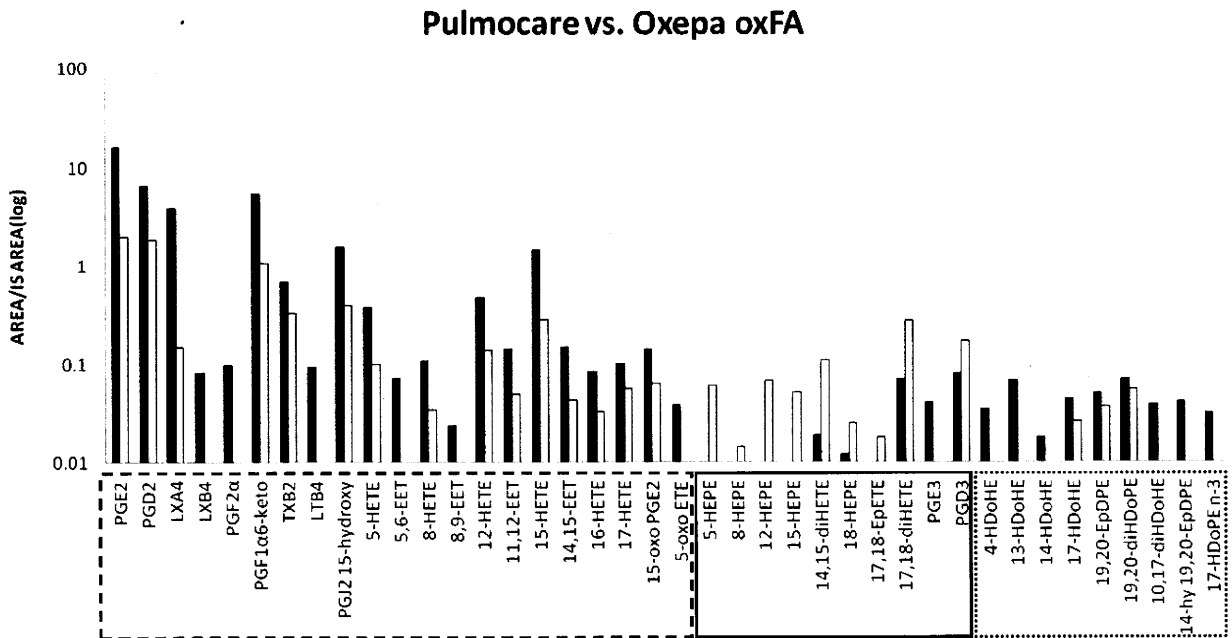


Fig. 4 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

(A) Oxepa, Pulmocare 投与による腸管の酸化脂肪酸変動

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

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

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

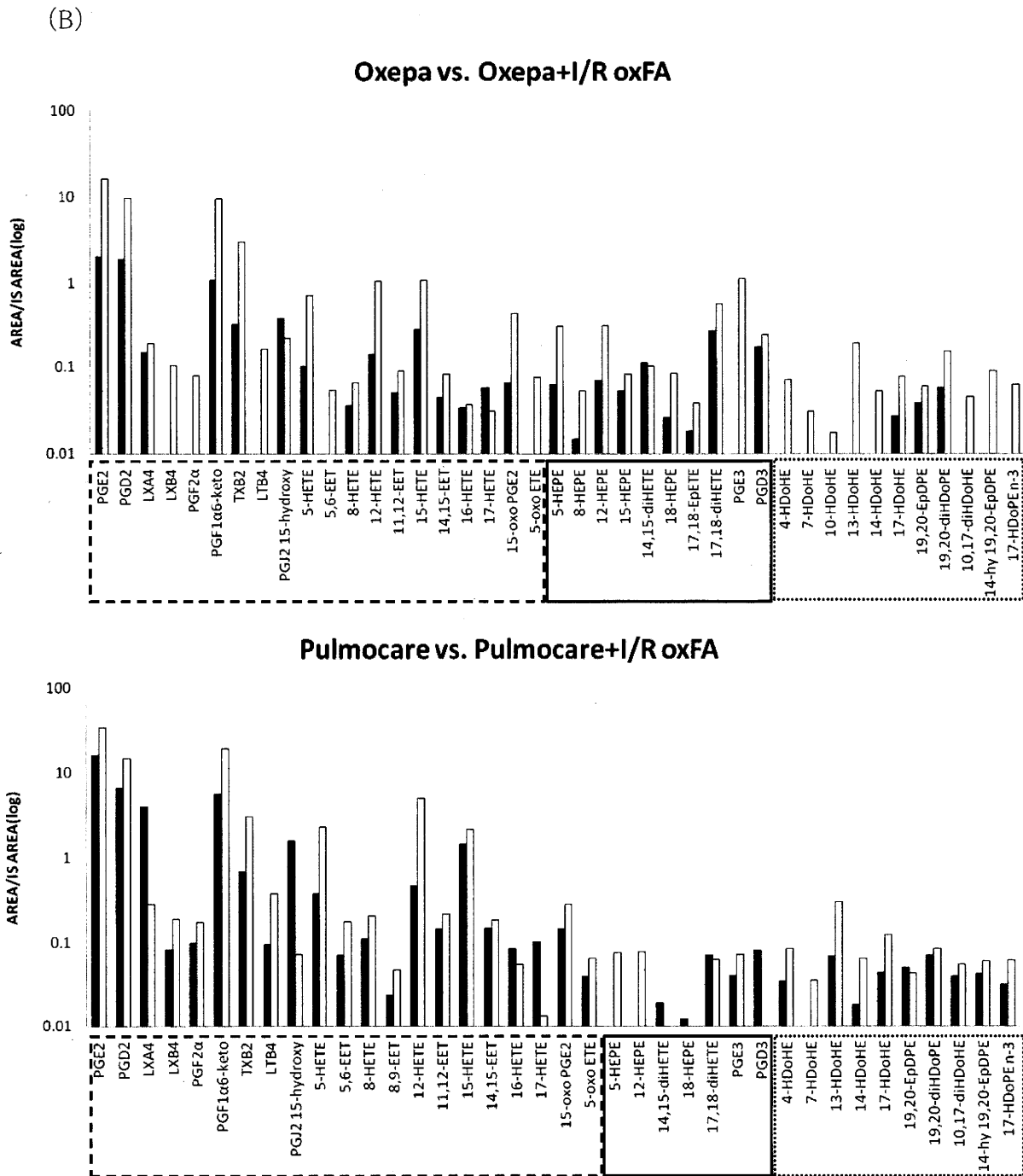


Fig. 4 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

(B) 腸管虚血再灌流処置によるラット腸管の酸化脂肪酸変動

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

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

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

(C)

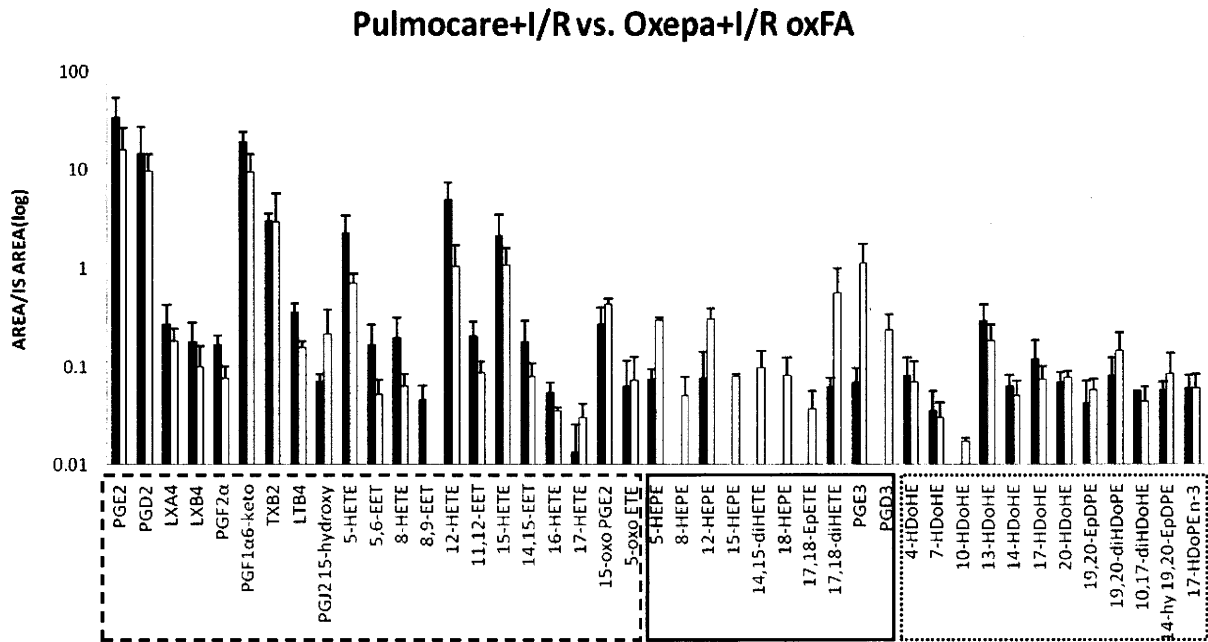


Fig. 4 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

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

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

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

(D)

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

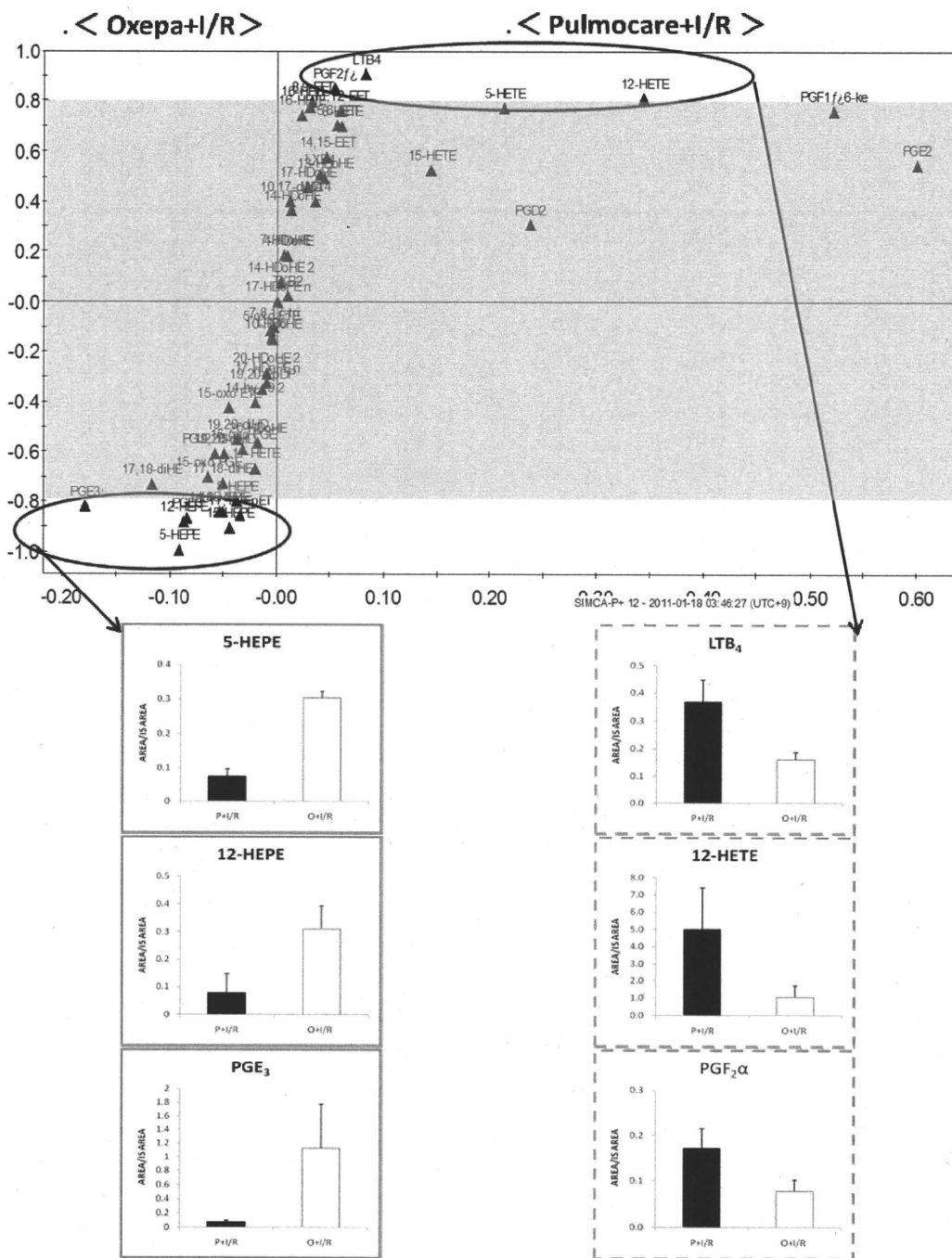


Fig. 4 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

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

Fig. 4 (C)のグラフで示した, Oxepa+I/R vs. Pulmocare+I/R でみられる腸管の酸化脂肪酸変動の傾向を, SIMCA P+ により解析した. 上図が S-plot で, y 軸より左が Oxepa+I/R, 右が Pulmocare+I/R で変動した分子種を示す. y 軸における>0.8は OPLS 分析で有効な範囲. 代表して, 5-HEPE, 12-HEPE, PGE<sub>3</sub>, LTB<sub>4</sub>, 12-HETE, PGF<sub>2</sub>α について, グラフを示した. --- は AA 由来の酸化脂肪酸, — は EPA 由来の酸化脂肪酸群. ±S.D \* p<0.05, \*\*\*p<0.005 n=3

#### C-4. 腸管虚血再灌流モデルラット腸管におけるサイトカイン変動

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

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

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

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

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

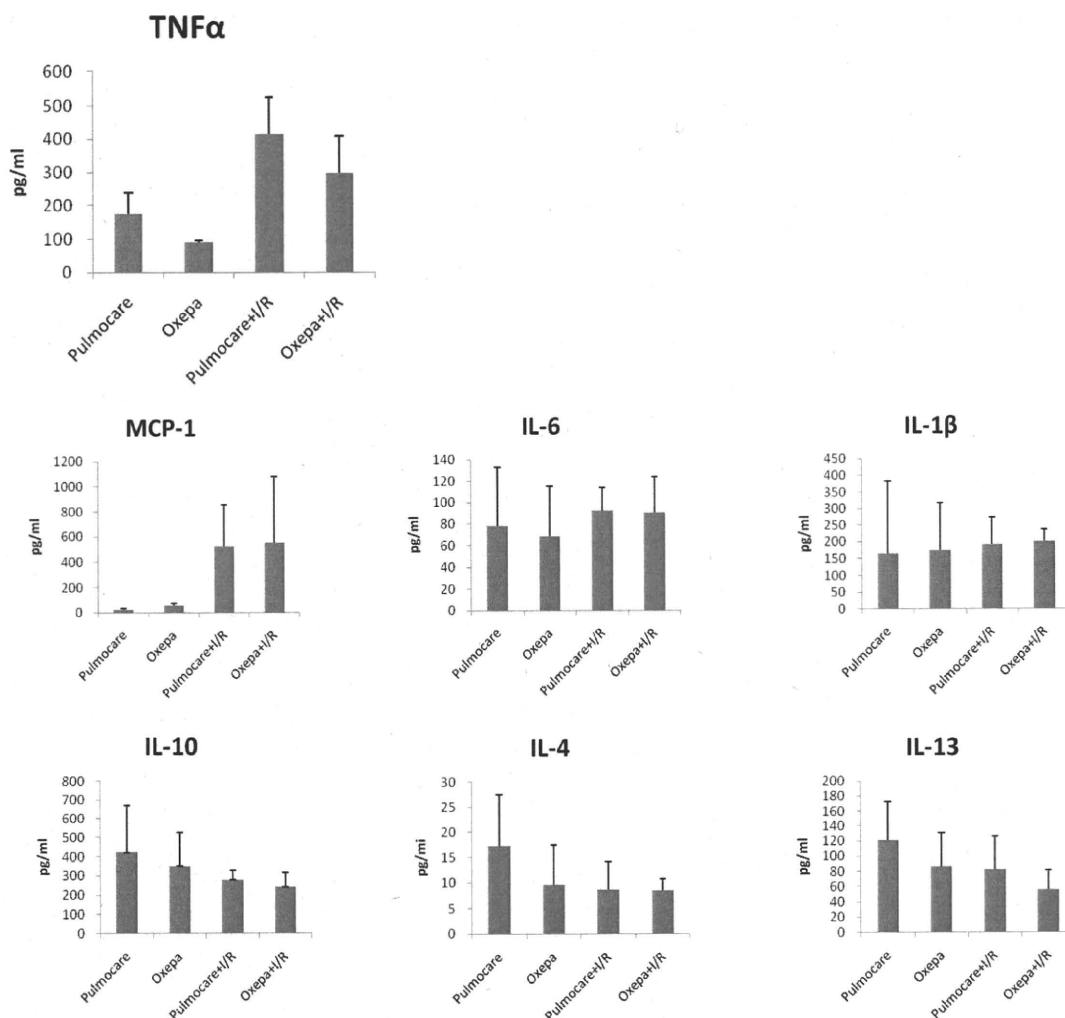


Fig. 5 腸管虚再灌流モデルラット腸管におけるサイトカイン変動

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

±S.D EN群 n=3~4, EN+I/R群 n=6

### C-5. 腸管虚再灌流モデルラット腸管の組織染色

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

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

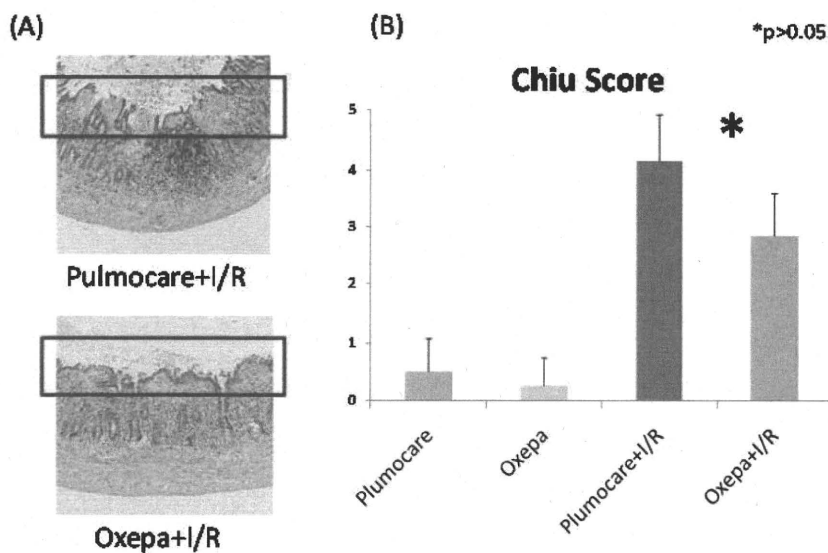


Fig. 6 腸管虚血再灌流モデルラット腸管の組織染色

(A) 組織染色写真

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

### E. 結論

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

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

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

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

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

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

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

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- A) Hiroyasu Sato, Yoshitaka Taketomi, Yuki Isogai, Yoshimi Miki, Kei Yamamoto, Tomohiko Hosono, Satoru Arata, Yukio Ishikawa, Toshiharu Ishii, Tetsuyuki Kobayashi, Hiroki Nakanishi, Kazutaka Ikeda, Ryo Taguchi, Shuntaro Hara, Ichiro Kudo, and Makoto Murakami. Group III Secreted Phospholipase A2 Regulates Epididymal Sperm Maturation and Fertility. *J. Clin. Invest.*, 120(5): 1400-1414 (2010)
- B) Tamotsu Tsukahara, Shuwa Hanazawa, Tetsuyuki Kobayashi, and Kimiko Murakami-Murofushi. Cyclic Phosphatidic Acid Decreases Proliferation and Survival of Colon Cancer Cells through Inhibition of Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 93 (3-4): 126-133 (2010)
- C) Masako Fukushima, Emiko Takeyama, Seigo Shiga, Masao Takeuchi and Tetsuyuki Kobayashi. Dietary intake of green nut oil decreases levels of oxidative stress biomarkers. *J. Lipid Nutr.*, 19 (1): 111-119 (2010)
- D) Hiroyasu Sato, Yoshitaka Taketomi, Yuki Isogai, Seiko Masuda, Tetsuyuki Kobayashi, Kei Yamamoto, and Makoto Murakami. Group III Secreted Phospholipase A<sub>2</sub> Transgenic Mice Spontaneously Develop Inflammation. *Biochem J.*, 421 (1): 17-27 (2009)
- E) 小林哲幸、求められる、油脂製品の安全性とリスク評価、*ファルマシア*、Vol.47, No.4, 317-321 (2011)
- ## 2. 学会発表
- A) 佐藤弘泰、磯貝有紀、武富芳隆、山本圭、石川由起雄、石井嘉晴、小林哲幸、中西広樹、池田和貴、田口良、原 俊太郎、村上誠：Ⅲ型分泌性ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の欠損はメタボリックシンドロームを改善する。第52回日本脂質生化学会（森秋旅館（群馬県渋川市））平成22年6月14, 15日
- B) 橋本 由佳、河辺 眞由美、中西 広樹、池田和貴、小林 哲幸、田口 良：ApoEノックアウトマウスにおける動脈硬化症の脂質メタボロミクス。第35回医用マスペクトル学会（金城学院大学）平成22年9月9, 10日
- C) Koji Morishita, Saori Mikami, Junichi Aiboshi, Tetsuyuki Kobayashi, Yasuhiro Otomo: GROUP VIB Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> is associated with acute lung injury after intestinal ischemia/reperfusion in mice, 69<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association for the Surgery of Trauma in Boston at Marriott Copley Place, 2010.9.22



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

E) Koji Morishita, Junichi Aiboshi, Saori Mikami, Yasuhiro Otomo, Yuri Yokoyama, Tetsuyuki Kobayashi: Group VIB Phospholipase<sub>A</sub><sub>2</sub> is Associated with Acute Lung Injury Following Trauma and Hemorrhagic Shock. The Society of Critical Care Medicine's (SCCM) 40th Critical Care Congress, San Diego, CA, USA, 2011.1.15-19.

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

「発がんプロモーション過程への影響評価」

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

## 研究要旨

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

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

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

## A. 研究目的

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

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

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

## B. 研究方法

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

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

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

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### 一般状態

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

### 体重 (Table 1-1~1-2、Appendix 1-1~1-5、Figure 2)

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

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

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

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

#### AA摂取量 (Table 4, Appendix 4-1~4-5)

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

#### D. 考察

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

#### E. 結論

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

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

未発表。