

した。投与期間終了日、剖検日および死亡時にも測定した。

### 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した。

### 4) 血圧測定

投与開始前、投与第4週および10週に tail-cuff 法で血圧を測定した。

### 5) 採血・剖検

定期解剖例全例を屠殺剖検前18時間絶食させた。続いて、ペントバルビタール麻酔下に、腹部大動脈から下記の順序で採血した後、剖検した。

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 Na）

肉眼的観察の後、器官重量を測定し、主な器官、組織をホルマリン固定後、薄切した切片をヘマトキシリン・エオジン染色して組織観察を行った。

なお、雄は症状の悪化が見られたため、11週に剖検した。

切迫屠殺例は雌雄ともに240mg/kg群で1例あった。死亡例からは採血しなかった。

### （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」に基づき、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ARA 0mg/kg群の2例で

鼻からの出血が、雌の35mg/kg群の1例で眼内出血によるとみられる片眼球の変色が認められた。以降、脳卒中を疑わせる症状は、雄では、投与期間中に全例で認められた。雌では異常な症状が全く認められなかった個体が、0、5、35および240mg/kg群で、それぞれ、2、2、3および1例あった。また、第6週に雄の5mg/kg群の1例が死亡し、以降、投与期間終了までに、雄の0、5、35および240mg/kg群で、それぞれ、3、4、1および2例が死亡した。雌では、投与期間終了までに、5、35および240mg/kg群で、それぞれ1例が死亡した。剖検の結果、雄の0、5および240mg/kg群の死亡例では、脳出血が見られた。またこれらの途中死亡例の全例で肺のうっ血が認められた。雌の途中死亡例では、5および35mg/kg群のそれぞれ1例で脳出血が認められた。

体重は、雄では、脳卒中症状の発症頻度が増した8週以降でバラツキが大きくなったが、群間差は見られなかった。雌では9週まで体重が増大し、プラトーに達した（Figure 1、Table 1）。摂餌量は、雄では投与4週までは増大したが、その後低下に転じた。脳卒中症状を示す個体が増えるにつれて低下し、かつ、バラツキが大きくなった。雌では投与7週までは概ね増大し、8週以降はバラツキが大きくなった。8週のARA 240mg/kg群では対照群と比較して有意に大きくなった。その他の時点では両性ともに群間差が認められなかった（Figure 2、Table 2）。

### 血圧

第1、4および10週の収縮期および拡張期血圧には、加齢による経時的上昇が認められたが、雌雄ともに、各測定時点における群間差は認められなかった（Figure 3、Table 3）。心拍数にも影響は認められなかった（Table 3）。

### 血液学および血液生化学的検査結果

血液学的検査では、雌雄ともに異常所見は認

められなかった。血液生化学的検査では、雌の血漿中リン脂質濃度がARAの用量に依存して低下し、240mg/kgでは対照群と比較して有意な低値を示した。他の項目には、雌雄ともにARAの影響は認められなかった (Table 4, Table 5)。

器官重量、解剖所見および病理組織観察結果いずれの器官においても、器官重量およびその体重相対重量には影響が認められなかった。雌の副腎重量は、ARA 35 および 240mg/kg 投与群で低下する傾向が見られた (Table 6)。病理学的検査では、雄の脳出血、浮腫、梗塞の頻度が雌に比べ高かったが、群間差はなかった。一方、昇圧によると考えられる血管の肥厚、心肥大は性差無く認められたが、これにも群間差はなかった。病理組織観察の結果では、肝の小肉芽腫および細動脈中膜肥厚の頻度に有意差が認められる場合があったが、用量依存性は認められなかった (Table 7)。

#### D. 考察

今回の実験は、非臨床試験ガイドラインに準じた13週間連続強制経口投与毒性試験を、SHRSPを用いて実施したものである。観察期間中に脳卒中による死亡があり、雄ではその頻度が高かったが、ARAの用量とは関連が無かった。ARAは、サプリメントとしての推奨用量の約50倍を高用量に設定したが、この用量までARAの有害効果は認められなかった。

今回の実験条件下における無毒性量は、雄では240mg/kg、雌では血漿中リン脂質濃度への有意な影響を有害効果と考えれば、35mg/kgと判断できる。

雄の0.5および240mg/kg群で、それぞれ1、2および1例が、実験初期に、脳卒中症状が先行せず突然死亡した。これらの個体では、肺水腫がみられ、心不全が示唆された。全例の胃内に飼料が残存していた。脳卒中症状の悪化で死亡した例では、胃内が空であった。死亡は早朝

が多く、血漿中レムナントレベルの持続的上昇と、それに伴うRhoキナーゼの活性化による血管の攣縮が原因の一つであると考えられている、ヒトのポックリ病<sup>1, 2)</sup>との関連を疑わせた。この知見は、筆者がSHRSPを用いた安全性試験を実施した際に、全ての実験で認められている。ARAの安全性とは関連が無いが、SHRSPがもつ病態には、冠動脈の攣縮による心不全死が一定頻度で含まれているものとする。

ARAはp38 MAPK経路を刺激することによって、インスリンによるG6PD mRNA産生増大を阻害し、それによってインスリン情報伝達を阻害する<sup>3)</sup>。一方、SHRSPは末梢組織へのグルコースの取り込みに障害があり<sup>4)</sup>、糖尿病モデル動物の一つと考えられる。高用量のARAはSHRSPの背景病態を悪化させると推測したが、今回の用量では全く影響が認められなかった。ARA含有サプリメントの1日摂取量の50倍の用量でも病態悪化が認められなかったことから、ARAはSHRSPにおいてインスリン情報伝達を阻害する可能性があるとしても、血圧上昇や血管傷害を増悪させることは無いと考えられた。

また、今回の結果から、SHRSPの病態が顕われる時期には性差があり、雄は雌より早く重症化することが確認された。この経過にもARAは影響を及ぼさなかった。

#### E. 結論

最大240mg/kg/dayのARAを13週間経口投与したSHRSPでは、ARAの有害効果が認められなかった。この実験条件下における無毒性量は、雄では240mg/kg、雌では35mg/kgと判断できる。

#### (参考文献)

1. 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, 84-94.

2. Oi K, Shimokawa H, Hiroki J, Uwatoku T, Abe K, Matsumoto Y, Nakajima Y, Nakajima K, Takeichi S, Takeshita A. 2004. Remnant lipoproteins from patients with sudden cardiac death enhance coronary vasospastic activity through upregulation of Rho-kinase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 918-922.

3. Talukdar I, Szeszel-Fedorowicz W, Salati LM. 2005. Arachidonic acid inhibits the insulin induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase via p38 MAP kinase, 2005. *J. Biol. Chem.* 280, 40660-40667.

4. Collison M, James DJ, Graham D, Holman DG, Connell JMC, Dominiczak AF, Gould GW, Salt IP. 2005. Reduced insulin-stimulated GLUT4 bioavailability in stroke-prone

spontaneously hypertensive rats. *Diabetologia* 48, 539-546.

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

青木聡子、立花滋博、安藤栄里子、田面喜之、古谷真美、永田伴子、内藤由紀子、大原直樹。

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。

脂質栄養学 20 (2) 154 (2011)。日本脂質栄養学会第 20 回大会 (2011 年 9 月 2、3 日、坂戸市)。

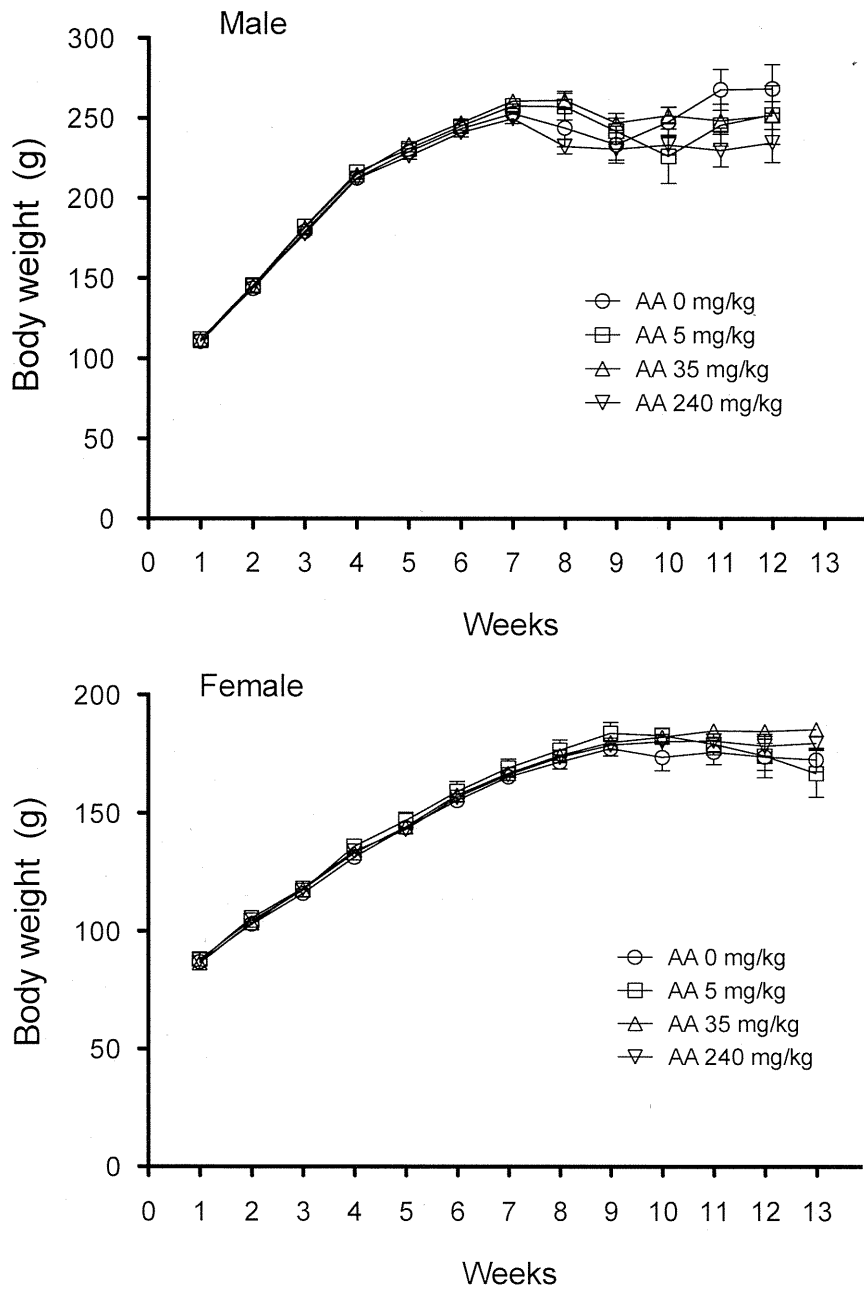


Figure 1 Body weight gains of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Symbols with vertical bars are means with SEM of 4~8 animals (See Table 1).

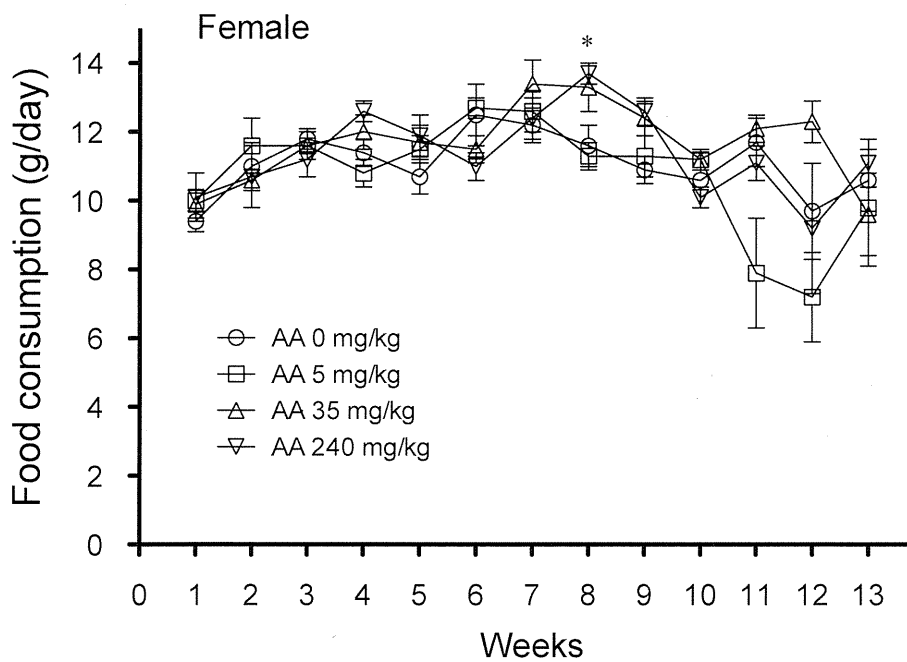
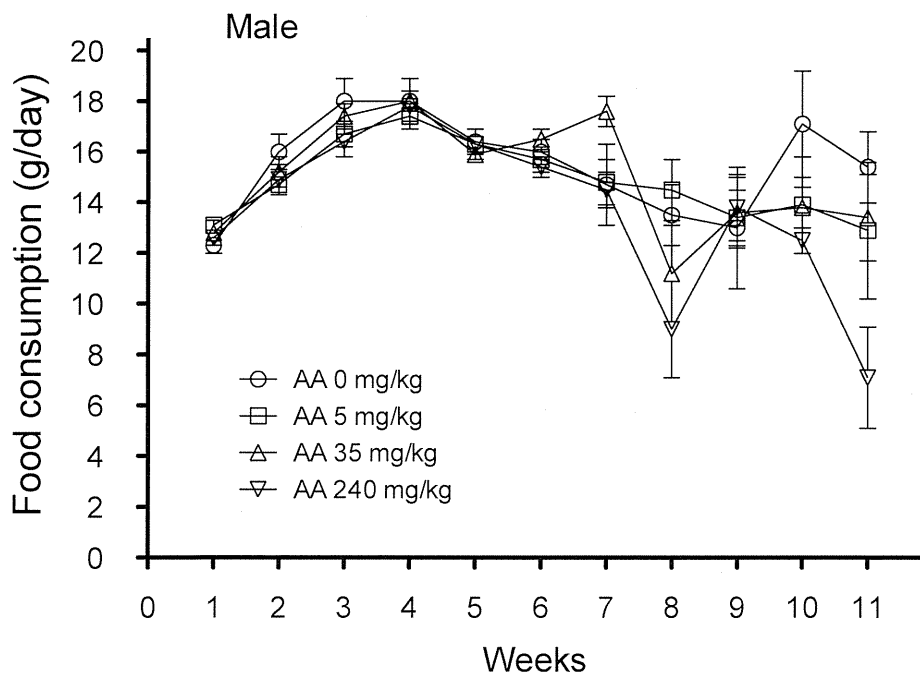


Figure 2 Food consumptions of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Symbols with vertical bars are means with SEM of 4~8 animals (See Table 2).

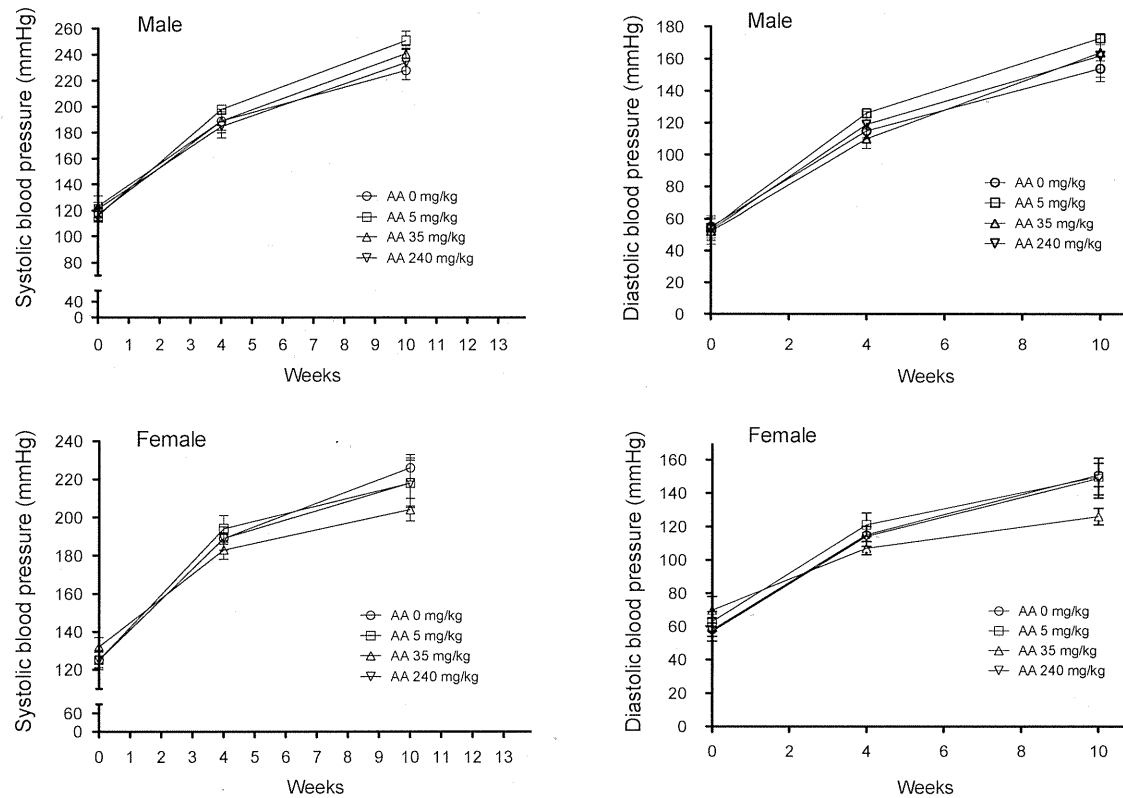


Figure 3 Changes in systolic and diastolic blood pressure of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Symbols with vertical bars are means with SEM of 4~8 animals (see Table 3).

Table 1 Changes in body weights of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Male

Dose	Administration period (weeks)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AA 0 mg/kg	110.6 ±2.6 (8)	143.6 ±3.2 (8)	179.2 ±3.8 (8)	212.6 ±4.2 (8)	229.0 ±4.9 (8)	243.3 ±5.2 (8)	252.7 ±6.2 (8)	243.8 ±11.8 (8)	233.4 ±11.6 (7)	247.6 ±9.4 (6)	267.8 ±12.8 (5)	268.4 ±15.2 (5)
AA 5 mg/kg	111.8 ±2.6 (8)	145.6 ±2.8 (8)	182.1 ±3.5 (8)	216.1 ±3.8 (8)	230.8 ±4.0 (8)	244.9 ±3.9 (8)	257.6 ±4.4 (7)	257.1 ±8.4 (6)	241.9 ±8.1 (6)	226.1 ±17.0 (5)	245.6 ±13.0 (4)	252.0 ±18.3 (4)
AA 35 mg/kg	111.0 ±2.4 (8)	145.0 ±3.1 (8)	181.4 ±3.4 (8)	214.6 ±3.2 (8)	233.3 ±3.6 (8)	246.8 ±4.1 (8)	260.5 ±3.7 (8)	261.0 ±5.7 (8)	246.9 ±6.1 (8)	251.7 ±5.2 (8)	248.4 ±6.5 (8)	251.6 ±8.7 (8)
AA 240 mg/kg	110.3 ±2.1 (8)	144.8 ±3.1 (8)	177.6 ±3.1 (8)	212.1 ±2.5 (8)	226.3 ±3.0 (8)	241.0 ±2.6 (8)	249.6 ±1.7 (8)	232.2 ±4.6 (7)	230.6 ±6.8 (7)	233.2 ±6.2 (7)	229.7 ±10.2 (7)	234.6 ±12.6 (6)

Values represent as mean ± SE (N)

Female

Dose	Administration period (weeks)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
AA 0 mg/kg	86.9 ±2.1 (8)	102.9 ±2.5 (8)	115.9 ±2.4 (8)	131.3 ±2.6 (8)	143.9 ±2.4 (8)	155.3 ±2.7 (8)	165.4 ±2.8 (8)	171.7 ±3.0 (8)	177.3 ±3.1 (8)	173.7 ±5.7 (8)	175.8 ±5.2 (8)	173.9 ±5.7 (8)	172.5 ±5.0 (8)
AA 5 mg/kg	87.9 ±1.6 (8)	104.6 ±2.1 (8)	117.3 ±2.2 (8)	135.9 ±2.8 (8)	146.8 ±3.5 (8)	159.1 ±4.2 (8)	169.0 ±3.9 (8)	176.7 ±4.3 (8)	183.8 ±4.6 (8)	182.8 ±3.4 (8)	179.1 ±4.4 (8)	174.2 ±9.1 (8)	166.9 ±10.1 (8)
AA 35 mg/kg	86.4 ±2.7 (8)	103.4 ±2.0 (8)	117.7 ±1.9 (8)	133.2 ±2.1 (8)	144.2 ±1.7 (8)	157.6 ±1.9 (8)	166.9 ±2.1 (8)	174.4 ±2.0 (8)	179.8 ±1.9 (8)	182.1 ±2.3 (8)	184.8 ±2.5 (8)	184.5 ±2.1 (8)	185.3 ±2.5 (8)
AA 240 mg/kg	87.5 ±1.6 (8)	105.5 ±1.8 (8)	118.1 ±1.9 (8)	133.9 ±1.3 (8)	143.1 ±1.2 (8)	156.6 ±1.3 (8)	166.2 ±1.6 (8)	173.6 ±1.9 (8)	178.8 ±1.3 (8)	180.4 ±1.8 (8)	180.7 ±2.9 (8)	178.3 ±4.2 (7)	179.7 ±3.0 (7)

Values represent as mean ± SE (N)

Table 2 Food consumptions of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Male

Dose	Administration period (weeks)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
AA 0 mg/kg	12.3 ±0.3 (8)	16.0 ±0.7 (8)	18.0 ±0.9 (8)	18.0 ±0.4 (8)	16.4 ±0.5 (8)	16.0 ±0.5 (8)	14.7 ±1.6 (8)	13.5 ±1.2 (8)	13.0 ±2.4 (7)	17.1 ±2.1 (6)	15.4 ±1.4 (5)
AA 5 mg/kg	13.1 ±0.3 (8)	14.7 ±0.3 (8)	16.7 ±0.5 (8)	17.4 ±0.5 (8)	16.3 ±0.6 (8)	15.7 ±0.5 (8)	14.8 ±0.9 (7)	14.5 ±1.2 (6)	13.4 ±1.1 (6)	13.9 ±1.9 (5)	12.9 ±2.7 (4)
AA 35 mg/kg	12.8 ±0.5 (8)	15.2 ±0.6 (8)	17.4 ±0.5 (8)	18.0 ±0.9 (8)	15.9 ±0.3 (8)	16.5 ±0.4 (8)	17.6 ±0.6 (8)	11.2 ±1.9 (8)	13.6 ±1.4 (8)	13.8 ±0.8 (8)	13.4 ±1.7 (8)
AA 240 mg/kg	12.6 ±0.3 (8)	14.9 ±0.6 (8)	16.4 ±0.6 (8)	17.8 ±0.6 (8)	16.3 ±0.3 (8)	15.4 ±0.4 (8)	14.5 ±0.7 (8)	9.0 ±1.9 (7)	13.8 ±1.3 (7)	12.5 ±0.5 (7)	7.1 ±2.0 (7)

Values represent as mean ± SE (N)

Female

Dose	Administration period (weeks)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
AA 0 mg/kg	9.4 ±0.3 (8)	11.0 ±0.7 (8)	11.8 ±0.3 (8)	11.4 ±0.4 (8)	10.7 ±0.5 (8)	12.5 ±0.9 (8)	12.2 ±0.5 (8)	11.6 ±0.6 (8)	10.9 ±0.4 (8)	10.6 ±0.8 (8)	11.7 ±0.7 (8)	9.7 ±1.4 (8)	10.6 ±0.9 (8)
AA 5 mg/kg	10.0 ±0.3 (8)	11.6 ±0.8 (8)	11.6 ±0.4 (8)	10.8 ±0.4 (8)	11.5 ±0.4 (8)	12.7 ±0.3 (8)	12.6 ±0.6 (8)	11.3 ±0.4 (8)	11.3 ±0.6 (8)	11.2 ±0.2 (8)	7.9 ±1.6 (8)	7.2 ±1.3 (8)	9.8 ±1.7 (8)
AA 35 mg/kg	9.9 ±0.4 (8)	10.6 ±0.3 (8)	11.6 ±0.2 (8)	12.0 ±0.5 (8)	11.7 ±0.5 (8)	11.5 ±0.4 (8)	13.4 ±0.7 (8)	13.3 ±0.7 (8)	12.4 ±0.5 (8)	11.2 ±0.3 (8)	12.1 ±0.4 (8)	12.3 ±0.6 (8)	9.6 ±1.2 (8)
AA 240 mg/kg	10.1 ±0.7 (8)	10.7 ±0.9 (8)	11.2 ±0.5 (8)	12.6 ±0.3 (8)	11.9 ±0.6 (8)	11.0 ±0.4 (8)	12.4 ±0.6 (8)	13.7* ±0.3 (8)	12.6 ±0.4 (8)	10.1 ±0.3 (8)	11.1 ±0.5 (8)	9.2 ±1.9 (7)	11.1 ±0.7 (7)

Values represent as mean ± SE (N)

\*, significantly different from the control group, p<0.05 (Dunnett's test)



Table 3 Blood pressure and heart rate of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Male

Dose	Before administration period				4th week of administration period				10th week of administration period			
	Heart rate (beats/min)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)	Heart rate (mmHg)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)	Heart rate (mmHg)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)
AA 0 mg/kg	554 ±11 (8)	117 ±5 (8)	76 ±6 (8)	55 ±7 (8)	472 ±25 (8)	189 ±7 (8)	140 ±5 (8)	115 ±5 (8)	493 ±17 (6)	228 ±7 (6)	178 ±7 (6)	154 ±8 (6)
AA 5 mg/kg	577 ±8 (8)	116 ±5 (8)	75 ±6 (8)	54 ±7 (8)	498 ±7 (8)	198 ±3 (8)	150 ±2 (8)	126 ±3 (8)	438 ±34 (4)	251 ±7 (4)	199 ±6 (4)	173 ±7 (4)
AA 35 mg/kg	553 ±10 (8)	123 ±8 (8)	76 ±8 (8)	52 ±8 (8)	493 ±8 (8)	189 ±9 (8)	137 ±7 (8)	110 ±6 (8)	489 ±13 (8)	241 ±4 (8)	189 ±4 (8)	164 ±5 (8)
AA 240 mg/kg	564 ±5 (8)	121 ±5 (8)	76 ±6 (8)	53 ±7 (8)	489 ±19 (8)	185 ±9 (8)	141 ±8 (8)	119 ±8 (8)	446 ±24 (7)	234 ±13 (7)	186 ±13 (7)	162 ±13 (7)

Values represent as mean ± SE (N)

Female

Dose	Before administration period				4th week of administration period				10th week of administration period			
	Heart rate (beats/min)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)	Heart rate (mmHg)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)	Heart rate (mmHg)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)
AA 0 mg/kg	559 ±7 (8)	125 ±5 (8)	81 ±6 (8)	58 ±7 (8)	528 ±7 (8)	189 ±3 (8)	140 ±2 (8)	115 ±2 (8)	515 ±8 (8)	226 ±7 (8)	176 ±7 (8)	151 ±7 (8)
AA 5 mg/kg	555 ±7 (8)	125 ±5 (8)	84 ±5 (8)	63 ±6 (8)	526 ±7 (8)	194 ±7 (8)	146 ±7 (8)	121 ±7 (8)	456 ±21 (8)	218 ±13 (8)	173 ±12 (8)	150 ±11 (8)
AA 35 mg/kg	548 ±5 (8)	132 ±5 (8)	91 ±6 (8)	70 ±8 (8)	524 ±7 (8)	183 ±5 (8)	132 ±4 (8)	107 ±4 (8)	475 ±21 (8)	204 ±6 (8)	152 ±5 (8)	126 ±5 (8)
AA 240 mg/kg	560 ±7 (8)	125 ±4 (8)	79 ±4 (8)	57 ±3 (8)	539 ±4 (8)	189 ±6 (8)	139 ±5 (8)	114 ±6 (8)	508 ±18 (8)	218 ±12 (8)	172 ±11 (8)	149 ±12 (8)

Values represent as mean ± SE (N)

SBP, systolic blood pressure; MBP, mean blood pressure; DBP, diastolic blood pressure

Table 4 Hematology of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Male

Dose	RBC (× 10000/μL)	Hct (%)	Hgb (g/dL)	Reticulocyte (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
AA 0 mg/kg	972.6 ±19.0 (5)	46.0 ±1.0 (5)	16.5 ±0.6 (5)	7.5 ±0.3 (5)	47.3 ±0.6 (5)	17.0 ±0.3 (5)	35.9 ±0.7 (5)
AA 5 mg/kg	990.3 ±22.1 (4)	46.9 ±0.9 (4)	16.7 ±0.3 (4)	9.8 * ±1.0 (4)	47.3 ±0.5 (4)	16.9 ±0.1 (4)	35.7 ±0.5 (4)
AA 35 mg/kg	966.7 ±30.4 (7)	45.6 ±1.2 (7)	16.2 ±0.5 (7)	8.3 ±0.2 (7)	47.2 ±0.3 (7)	16.7 ±0.1 (7)	35.4 ±0.3 (7)
AA 240 mg/kg	958.9 ±38.8 (7)	46.8 ±2.3 (7)	16.5 ±0.9 (7)	7.8 ±0.5 (7)	48.7 ±0.4 (7)	17.2 ±0.3 (7)	35.2 ±0.4 (7)

Dose	WBC (× 100/μL)	Neutrophil (%)	Lymphocyte (%)	Monocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Platelet (× 10000/μL)
AA 0 mg/kg	39.7 ±3.2 (5)	40.5 ±1.9 (5)	51.8 ±2.5 (5)	6.7 ±1.0 (5)	1.1 ±0.2 (5)	0.0 ±0.0 (5)	46.3 ±9.2 (5)
AA 5 mg/kg	37.4 ±1.7 (4)	41.9 ±5.4 (4)	50.7 ±6.0 (4)	6.3 ±0.9 (4)	1.1 ±0.1 (4)	0.0 ±0.0 (4)	41.0 ±3.0 (4)
AA 35 mg/kg	42.6 ±3.6 (7)	43.5 ±3.3 (7)	50.6 ±3.0 (7)	5.2 ±0.5 (7)	0.7 ±0.1 (7)	0.0 ±0.0 (7)	40.8 ±4.1 (7)
AA 240 mg/kg	35.6 ±7.6 (7)	52.4 ±7.1 (7)	42.3 ±6.6 (7)	4.5 ±0.7 (7)	0.8 ±0.2 (7)	0.0 ±0.0 (7)	41.2 ±2.6 (7)

Values represent as mean ± SE (N)

MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration

\*, significantly different from the control group p<0.05 (Dunnnett's test)

(continued on next page)

## Female

Dose	RBC (× 10000/ $\mu$ L)	Hct (%)	Hgb (g/dL)	Reticulocyte (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
AA 0 mg/kg	1073.8 ±25.0 (8)	50.3 ±1.2 (8)	17.8 ±0.5 (8)	7.5 ±0.9 (8)	46.8 ±0.4 (8)	16.6 ±0.1 (8)	35.5 ±0.1 (8)
AA 5 mg/kg	1066.1 ±34.1 (7)	49.2 ±1.3 (7)	17.7 ±0.6 (7)	6.9 ±0.9 (7)	46.2 ±0.5 (7)	16.6 ±0.1 (7)	36.0 ±0.3 (7)
AA 35 mg/kg	1040.7 ±17.3 (7)	48.3 ±0.8 (7)	17.1 ±0.3 (7)	6.7 ±0.8 (7)	46.5 ±0.5 (7)	16.4 ±0.1 (7)	35.3 ±0.2 (7)
AA 240 mg/kg	1062.8 ±18.9 (8)	49.2 ±1.2 (8)	17.4 ±0.4 (8)	6.4 ±0.8 (8)	46.2 ±0.4 (8)	16.4 ±0.1 (8)	35.4 ±0.1 (8)

Dose	WBC (× 100/ $\mu$ L)	Neutrophil (%)	Lymphocyte (%)	Monocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Platelet (× 10000/ $\mu$ L)
AA 0 mg/kg	45.2 ±3.1 (8)	38.8 ±6.7 (8)	55.1 ±6.6 (8)	5.1 ±0.5 (8)	1.0 ±0.2 (8)	0.0 ±0.0 (8)	50.2 ±4.8 (8)
AA 5 mg/kg	41.9 ±2.3 (7)	29.9 ±5.1 (7)	62.7 ±4.6 (7)	5.9 ±0.5 (7)	1.5 ±0.3 (7)	0.0 ±0.0 (7)	49.5 ±6.1 (7)
AA 35 mg/kg	37.4 ±2.8 (7)	26.5 ±2.5 (7)	66.8 ±2.4 (7)	5.1 ±0.4 (7)	1.6 ±0.2 (7)	0.0 ±0.0 (7)	50.3 ±9.9 (7)
AA 240 mg/kg	38.8 ±1.9 (8)	34.1 ±6.3 (8)	58.6 ±6.7 (8)	5.9 ±0.9 (8)	1.4 ±0.2 (8)	0.0 ±0.0 (8)	50.4 ±5.9 (8)

Values represent as mean  $\pm$  SE (N)

MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration

Table 5 Blood biochemistry of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Male

Dose	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Phospholipid (mg/dL)	Free fatty acid (mEq/L)	Total bilirubin (mg/dL)	Blood urea nitrogen (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
AA 0 mg/kg	5.8 ±0.1 (5)	3.8 ±0.0 (5)	1.90 ±0.05 (5)	169 ±7 (5)	81 ±6 (5)	31 ±3 (5)	124 ±8 (5)	0.56 ±0.07 (5)	0.10 ±0.01 (5)	35 ±4 (5)	0.7 ±0.0 (5)
AA 5 mg/kg	5.9 ±0.1 (4)	3.8 ±0.1 (4)	1.79 ±0.08 (4)	191 ±14 (4)	93 ±9 (4)	42 ±3 (4)	142 ±10 (4)	0.70 ±0.08 (4)	0.10 ±0.01 (4)	37 ±2 (4)	0.7 ±0.0 (4)
AA 35 mg/kg	5.7 ±0.1 (7)	3.7 ±0.0 (7)	1.91 ±0.05 (7)	174 ±8 (7)	84 ±4 (7)	36 ±4 (7)	125 ±5 (7)	0.55 ±0.04 (7)	0.10 ±0.01 (7)	32 ±4 (7)	0.8 ±0.1 (7)
AA 240 mg/kg	5.6 ±0.1 (6)	3.7 ±0.1 (6)	1.91 ±0.10 (6)	165 ±8 (6)	84 ±3 (6)	24 ±4 (6)	118 ±5 (6)	0.52 ±0.10 (6)	0.09 ±0.02 (6)	40 ±4 (6)	0.8 ±0.1 (6)

Dose	Ca (mg/dL)	Inorganic phosphate (mg/dL)	Alkaline phosphatase (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	γ-GTP (U/L)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
AA 0 mg/kg	10.0 ±0.1 (5)	6.0 ±0.3 (5)	422 ±28 (5)	114 ±32 (5)	71 ±30 (5)	1 ±0 (5)	137.4 ±1.6 (5)	4.21 ±0.37 (5)	99.3 ±2.0 (5)
AA 5 mg/kg	10.1 ±0.1 (4)	6.0 ±0.5 (4)	482 ±46 (4)	83 ±5 (4)	40 ±4 (4)	1 ±0 (4)	137.1 ±1.7 (4)	4.48 ±0.71 (4)	99.0 ±0.9 (4)
AA 35 mg/kg	10.0 ±0.1 (7)	6.8 ±0.4 (7)	395 ±25 (7)	85 ±4 (7)	44 ±4 (7)	1 ±0 (7)	135.8 ±1.8 (7)	3.88 ±0.33 (7)	96.7 ±2.3 (7)
AA 240 mg/kg	9.8 ±0.1 (6)	7.4 ±0.6 (6)	395 ±14 (6)	89 ±4 (6)	41 ±3 (6)	1 ±0 (6)	140.0 ±1.2 (6)	4.19 ±0.57 (6)	102.0 ±1.7 (6)

Values represent as mean ± SE (N)

(continued on next page)

## Female

Dose	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Phospholipid (mg/dL)	Free fatty acid (mEq/L)	Total bilirubin (mg/dL)	Blood urea nitrogen (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
AA 0 mg/kg	5.7 ±0.2 (8)	3.7 ±0.1 (8)	1.76 ±0.05 (8)	163 ±10 (8)	94 ±3 (8)	51 ±12 (8)	151 ±6 (8)	0.74 ±0.09 (8)	0.10 ±0.01 (8)	41 ±10 (8)	0.8 ±0.1 (8)
AA 5 mg/kg	5.7 ±0.1 (7)	3.6 ±0.1 (7)	1.80 ±0.04 (7)	165 ±17 (7)	95 ±10 (7)	56 ±22 (7)	149 ±7 (7)	0.69 ±0.06 (7)	0.09 ±0.01 (7)	29 ±2 (7)	0.7 ±0.0 (7)
AA 35 mg/kg	5.8 ±0.1 (7)	3.7 ±0.0 (7)	1.81 ±0.05 (7)	161 ±5 (7)	83 ±6 (7)	29 ±3 (7)	135 ±6 (7)	0.80 ±0.05 (7)	0.09 ±0.01 (7)	26 ±3 (7)	0.7 ±0.0 (7)
AA 240 mg/kg	5.7 ±0.2 (7)	3.6 ±0.1 (7)	1.76 ±0.06 (7)	141 ±8 (7)	77 ±5 (7)	35 ±4 (7)	126 ±5 (7)	* 0.82 ±0.08 (7)	0.09 ±0.01 (7)	27 ±3 (7)	0.7 ±0.1 (7)

Dose	Ca (mg/dL)	Inorganic phosphate (mg/dL)	Alkaline phosphatase (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	γ-GTP (U/L)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
AA 0 mg/kg	10.2 ±0.1 (8)	5.5 ±0.4 (8)	239 ±18 (8)	85 ±9 (8)	32 ±2 (8)	1 ±0 (8)	136.1 ±1.7 (8)	3.94 ±0.31 (8)	99.7 ±1.7 (8)
AA 5 mg/kg	10.2 ±0.1 (7)	5.7 ±0.2 (7)	252 ±12 (7)	81 ±6 (7)	36 ±5 (7)	1 ±0 (7)	134.3 ±1.5 (7)	3.76 ±0.26 (7)	99.4 ±1.8 (7)
AA 35 mg/kg	10.1 ±0.2 (7)	5.3 ±0.3 (7)	207 ±14 (7)	79 ±2 (7)	33 ±1 (7)	1 ±0 (7)	136.9 ±0.4 (7)	3.48 ±0.20 (7)	103.2 ±0.8 (7)
AA 240 mg/kg	10.0 ±0.1 (7)	6.4 ±0.6 (7)	226 ±23 (7)	79 ±1 (7)	34 ±1 (7)	1 ±0 (7)	137.5 ±0.4 (7)	3.18 ±0.08 (7)	102.2 ±1.1 (7)

Values represent as mean ± SE (N)

\*. significantly different from the control group p<0.05(Dunnett's test)

Table 6 Changes in organ weights of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Male

Dose	Body weight (g)	Brain		Heart		Liver		Kidney (R)		Kidney (L)		Kidney		Spleen		Testis (R)		Testis (L)		Testis		Adrenal gland (R)		Adrenal gland (L)		Adrenal gland	
		(g)	(g%)	(g)	(g%)	(g)	(g%)	(g)	(g%)	(g)	(g%)	(g)	(g%)	(g)	(g%)	(g)	(g%)	(g)	(g%)	(g)	(g%)	(mg)	(mg%)	(mg)	(mg%)	(mg)	(mg%)
AA 0 mg/kg	249.5 ±13.6 (5)	2.1840 ±0.0907 (5)	0.89 ±0.06 (5)	1.3246 ±0.0706 (5)	0.53 ±0.02 (5)	7.9504 ±0.5983 (5)	3.17 ±0.08 (5)	1.0849 ±0.0634 (5)	0.44 ±0.01 (5)	1.0784 ±0.0768 (5)	0.43 ±0.01 (5)	2.1633 ±0.1399 (5)	0.87 ±0.02 (5)	0.7024 ±0.0691 (5)	0.28 ±0.01 (5)	1.4465 ±0.0449 (5)	0.58 ±0.02 (5)	1.4679 ±0.0352 (5)	0.59 ±0.02 (5)	2.9144 ±0.0789 (5)	1.18 ±0.03 (5)	24.3 ±0.7 (5)	9.88 ±0.71 (5)	31.0 ±4.4 (5)	12.22 ±1.04 (5)	55.2 ±3.9 (5)	22.11 ±0.68 (5)
AA 5 mg/kg	229.7 ±18.9 (4)	2.2398 ±0.1602 (4)	1.00 ±0.13 (4)	1.2934 ±0.0594 (4)	0.57 ±0.03 (4)	7.6228 ±0.3441 (4)	3.35 ±0.15 (4)	1.0549 ±0.0817 (4)	0.46 ±0.00 (4)	1.0470 ±0.0822 (4)	0.46 ±0.01 (4)	2.1018 ±0.1637 (4)	0.92 ±0.01 (4)	0.5991 ±0.0981 (4)	0.26 ±0.02 (4)	1.3593 ±0.0750 (4)	0.60 ±0.02 (4)	1.3326 ±0.1197 (4)	0.56 ±0.03 (4)	2.6919 ±0.1943 (4)	1.18 ±0.05 (4)	27.2 ±1.3 (4)	12.11 ±1.32 (4)	27.5 ±1.7 (4)	12.12 ±0.90 (4)	54.7 ±2.8 (4)	24.22 ±2.19 (4)
AA 35 mg/kg	239.7 ±5.3 (7)	2.1254 ±0.0862 (7)	0.89 ±0.03 (7)	1.3277 ±0.0494 (7)	0.55 ±0.01 (7)	7.6562 ±0.2251 (7)	3.19 ±0.05 (7)	1.0958 ±0.0379 (7)	0.46 ±0.01 (7)	1.0766 ±0.0313 (7)	0.45 ±0.01 (7)	2.1724 ±0.0673 (7)	0.91 ±0.01 (7)	0.6673 ±0.0388 (7)	0.28 ±0.01 (7)	1.4281 ±0.0362 (7)	0.60 ±0.01 (7)	1.4698 ±0.0531 (7)	0.61 ±0.02 (7)	2.8979 ±0.0857 (7)	1.21 ±0.02 (7)	24.4 ±1.3 (7)	10.19 ±0.49 (7)	27.1 ±1.1 (7)	11.32 ±0.46 (7)	51.5 ±2.3 (7)	21.51 ±0.91 (7)
AA 240 mg/kg	217.8 ±10.8 (6)	2.2308 ±0.0848 (6)	1.05 ±0.10 (6)	1.2540 ±0.0374 (6)	0.58 ±0.01 (6)	6.9866 ±0.3239 (6)	3.22 ±0.07 (6)	0.9982 ±0.0459 (6)	0.46 ±0.01 (6)	0.9558 ±0.0350 (6)	0.44 ±0.01 (6)	1.9539 ±0.0801 (6)	0.90 ±0.02 (6)	0.5763 ±0.0513 (6)	0.27 ±0.02 (6)	1.3469 ±0.0737 (6)	0.62 ±0.02 (6)	1.1562 ±0.1717 (6)	0.52 ±0.06 (6)	2.5030 ±0.2309 (6)	1.14 ±0.07 (6)	26.7 ±0.7 (6)	12.46 ±0.89 (6)	27.3 ±1.0 (6)	12.71 ±0.89 (6)	54.0 ±1.7 (6)	25.17 ±1.77 (6)

Values represent as mean ± SE (N)

Female

Dose	Body weight (g)	Brain		Heart		Liver		Kidney (R)		Kidney (L)		Kidney		Spleen		Ovary (R)		Ovary (L)		Ovary		Adrenal gland (R)		Adrenal gland (L)		Adrenal gland	
		(g)	(g%)	(g)	(g%)	(g)	(g%)	(g)	(g%)	(g)	(g%)	(g)	(g%)	(g)	(g%)	(mg)	(mg%)	(mg)	(mg%)	(mg)	(mg%)	(mg)	(mg%)	(mg)	(mg%)	(mg)	(mg%)
AA 0 mg/kg	158.0 ±4.4 (8)	1.8432 ±0.0434 (8)	1.18 ±0.06 (8)	1.0222 ±0.0274 (8)	0.65 ±0.01 (8)	5.2437 ±0.2469 (8)	3.32 ±0.12 (8)	0.6752 ±0.0105 (8)	0.43 ±0.01 (8)	0.6459 ±0.0098 (8)	0.41 ±0.01 (8)	1.3211 ±0.0180 (8)	0.84 ±0.02 (8)	0.4086 ±0.0405 (8)	0.26 ±0.02 (8)	29.6 ±1.6 (8)	18.71 ±0.79 (8)	28.8 ±2.4 (8)	18.10 ±1.16 (8)	58.4 ±3.6 (8)	36.81 ±1.62 (8)	28.9 ±1.1 (8)	18.50 ±1.17 (8)	31.5 ±1.2 (8)	20.13 ±1.23 (8)	60.4 ±2.2 (8)	38.63 ±2.37 (8)
AA 5 mg/kg	162.8 ±3.4 (7)	1.8434 ±0.0285 (7)	1.14 ±0.03 (7)	1.0396 ±0.0335 (7)	0.64 ±0.02 (7)	5.3402 ±0.2256 (7)	3.29 ±0.15 (7)	0.7046 ±0.0211 (7)	0.43 ±0.01 (7)	0.6811 ±0.0168 (7)	0.42 ±0.01 (7)	1.3858 ±0.0356 (7)	0.85 ±0.02 (7)	0.4716 ±0.0311 (7)	0.29 ±0.02 (7)	29.1 ±1.9 (7)	17.84 ±0.99 (7)	27.7 ±1.1 (7)	17.00 ±0.60 (7)	56.8 ±2.5 (7)	34.85 ±1.25 (7)	30.9 ±3.7 (7)	19.00 ±2.21 (7)	32.8 ±3.6 (7)	20.15 ±2.13 (7)	63.7 ±7.3 (7)	39.16 ±4.33 (7)
AA 35 mg/kg	169.3 ±4.3 (7)	1.7699 ±0.0288 (7)	1.05 ±0.03 (7)	1.0520 ±0.0285 (7)	0.62 ±0.01 (7)	5.3446 ±0.1813 (7)	3.16 ±0.08 (7)	0.7064 ±0.0201 (7)	0.42 ±0.01 (7)	0.6910 ±0.0303 (7)	0.41 ±0.01 (7)	1.3973 ±0.0467 (7)	0.83 ±0.02 (7)	0.4758 ±0.0216 (7)	0.28 ±0.01 (7)	32.2 ±2.4 (7)	18.92 ±1.10 (7)	32.6 ±1.7 (7)	19.26 ±1.01 (7)	64.8 ±2.8 (7)	38.18 ±1.01 (7)	25.1 ±0.9 (7)	14.82 * ±0.45 (7)	28.8 ±1.1 (7)	17.01 ±0.61 (7)	53.9 ±1.9 (7)	31.83 ±0.99 (7)
AA 240 mg/kg	166.3 ±3.5 (7)	1.8266 ±0.0491 (7)	1.10 ±0.04 (7)	1.0477 ±0.0173 (7)	0.63 ±0.02 (7)	5.3849 ±0.1417 (7)	3.24 ±0.05 (7)	0.6930 ±0.0106 (7)	0.42 ±0.01 (7)	0.6953 ±0.0120 (7)	0.42 ±0.01 (7)	1.3883 ±0.0191 (7)	0.84 ±0.02 (7)	0.4842 ±0.0249 (7)	0.29 ±0.02 (7)	32.2 ±1.6 (7)	19.42 ±0.98 (7)	31.3 ±0.6 (7)	18.83 ±0.45 (7)	63.5 ±1.8 (7)	38.26 ±1.14 (7)	27.5 ±1.1 (7)	16.65 ±0.96 (7)	28.9 ±1.5 (7)	17.50 ±1.13 (7)	56.5 ±2.4 (7)	34.15 ±1.97 (7)

Values represent as mean ± SE (N)

\*, significantly different from the control group p<0.05(Dunnett's test)

Absolute weight and relative weight to body weight are shown

Table 7 Histology of SHRSP given AA for 13 weeks by gavage

Male

Group	AA 0 mg/kg (n=5)						AA 5 mg/kg (n=4)						AA 35 mg/kg (n=8)						AA 240 mg/kg (n=6)					
	-	±	+	2+	3+	Pos	-	±	+	2+	3+	Pos	-	±	+	2+	3+	Pos	-	±	+	2+	3+	Pos
Brain																								
Hemorrhage, cerebrum	2	1	1	1	0	3	3	0	1	0	0	1	4	3	1	0	0	4	3	2	0	1	0	3
Gilosis, cortex	1	1	3	0	0	4	2	0	2	0	0	2	4	0	3	1	0	4	0	0	5	1	0	6
Infarct, recent	2	1	0	2	0	3	2	0	1	1	0	2	5	0	3	0	0	3	3	0	3	0	0	3
Cyst, cortex	5	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	1	4	0	4	0	0	4	6	0	0	0	0	0
Edema	2	0	3	0	0	3	2	0	2	0	0	2	5	1	2	0	0	3	3	0	3	0	0	3
Thickening, media, arteriole	4	0	1	0	0	1	4	0	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1	5	0	1	0	0	1
Infiltration, macrophage with pigment	4	0	1	0	0	1	3	1	0	0	0	1	6	2	0	0	0	2	4	2	0	0	0	2
Venous thrombosis, middle cerebral	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	5	0	1	0	0	1
Fibrin thrombus	5	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	1	7	0	1	0	0	1	6	0	0	0	0	0
Dilatation, ventricle	5	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	1	6	0	2	0	0	2	6	0	0	0	0	0
Thymus																								
atrophy	3	0	2	0	0	2	3	1	0	0	0	1	5	1	1	1	0	3	3	2	1	0	0	3
Hemorrhage	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	7	1	0	0	0	1	6	0	0	0	0	0
Lung																								
Accumulation, foamy cell, alveolus	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Edema	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Congestion	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Heart																								
Thickening, media, arteriole	0	5	0	0	0	5	0	3	1	0	0	4	0	7	1	0	0	8	0	5	1	0	0	6
Myocardial fibrosis/degeneration	3	1	1	0	0	2	1	2	1	0	0	3	4	3	1	0	0	4	2	1	3	0	0	4
Basophilic change, myocardium	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1	6	0	0	0	0	0
Liver																								
Thickening, media, arteriole	0	2	3	0	0	5	3	1	0	0	0	1*	2	4	2	0	0	6	1	3	2	0	0	5
Pigment, greenish, Kupffer cell	1	4	0	0	0	4	1	3	0	0	0	3	5	3	0	0	0	3	3	3	0	0	0	3
Proliferation, bile duct	1	4	0	0	0	4	3	1	0	0	0	1	1	7	0	0	0	7	2	4	0	0	0	4
Necrosis, fresh, focal	4	0	1	0	0	1	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Kidney																								
Nephropathy, chronic	0	0	1	4	0	5	0	0	0	4	0	4	0	0	0	8	0	8	0	0	0	6	0	6
Inflammation, pelvis	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	5	0	1	0	0	1
Spleen																								
Congestion	3	0	2	0	0	2	4	0	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1	3	0	3	0	0	3
Hematopoiesis, extramedullary	1	1	3	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	3	5	0	0	8	1	4	1	0	0	5
Atrophy, follicle	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1	6	0	0	0	0	0
Thickening, media, arteriole	2	2	1	0	0	3	0	3	1	0	0	4	3	4	1	0	0	5	2	4	0	0	0	4
Adrenal gland																								
Necrosis, focal with/without occluded arteriole	4	1	0	0	0	1	3	1	0	0	0	1	8	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Stomach																								
Abnormality	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Testis																								
Atrophy, seminiferous tubule	4	1	0	0	0	1	2	2	0	0	0	2	7	1	0	0	0	1	4	0	2	0	0	2
Epididymis																								
Cell debris, seminiferous tubule	2	2	1	0	0	3	2	1	1	0	0	2	4	4	0	0	0	4	2	2	0	2	0	4
Vasculitis	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	6	0	2	0	0	2	3	0	3	0	0	3
Prostate																								
Prostatitis	5	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	5	0	0	1	0	1
Pancreas																								
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Small intestine																								
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Large intestine																								
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mesenteric lymphnode																								
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pituitary gland																								
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thyroid gland																								
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Parathyroid gland																								
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinary bladder																								
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eye ball																								
No remarkable change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- , negative; ± , very slight; + , slight; 2+ , moderate; 3+ , severe.

Pos, Sum of the number of animals with positive finding.

\*, p<0.05, significantly different from the incidence of animals with positive finding in AA 0 mg/kg group (Fisher's exact test).

(continued on next page)

# Female

Group Grade	AA 0 mg/kg (n=8)					AA 5 mg/kg (n=7)					AA 35 mg/kg (n=7)					AA 240 mg/kg (n=7)									
	-	±	+	2+	3+	Pos	-	±	+	2+	3+	Pos	-	±	+	2+	3+	Pos	-	±	+	2+	3+	Pos	
Brain																									
Gliosis, cortex		5	1	2	0	0	3	4	1	2	0	0	3	5	0	2	0	0	2	4	0	3	0	0	3
Necrosis, focal, white matter		5	1	2	0	0	3	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	6	0	1	0	0	1
Infiltration, macrophage with pigment		6	2	0	0	0	2	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
Cyst, cortex		6	0	2	0	0	2	5	1	1	0	0	2	6	0	1	0	0	1	6	1	0	0	0	1
Edema		6	0	2	0	0	2	5	0	2	0	0	2	5	1	1	0	0	2	5	1	1	0	0	2
Fibrin thrombus		8	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	6	0	1	0	0	1	6	0	1	0	0	1
Thickening, media, arteriole		8	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	1	6	1	0	0	0	1
Hemorrhage		8	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	1	5	2	0	0	0	2	7	0	0	0	0	0
Heart																									
Thickening, media, arteriole		2	6	0	0	0	6	1	6	0	0	0	6	2	5	0	0	0	5	2	5	0	0	0	5
Myocardial fibrosis/degeneration		3	2	3	0	0	5	4	2	1	0	0	3	6	1	0	0	0	1	2	4	1	0	0	5
Lung																									
Metaplasia, osseous		7	1	0	0	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
Mineralization, arterial wall		8	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
Liver																									
Fatty change, periportal		5	3	0	0	0	3	5	2	0	0	0	2	4	3	0	0	0	3	5	2	0	0	0	2
Thickening, media, arteriole		0	7	1	0	0	8	0	5	2	0	0	7	2	5	0	0	0	5	0	7	0	0	0	7
Pigment, greenish, Kupffer cell		4	4	0	0	0	4	6	1	0	0	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
Proliferation, bile duct		4	4	0	0	0	4	3	4	0	0	0	4	1	6	0	0	0	6	3	4	0	0	0	4
Single cell necrosis		6	2	0	0	0	2	3	4	0	0	0	4	3	4	0	0	0	4	6	1	0	0	0	1
Microgranuloma		7	1	0	0	0	1	2	5	0	0	0	5*	4	3	0	0	0	3	7	0	0	0	0	0
Fatty change, zonal		8	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	1	7	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	1
Kidney																									
Nephropathy, chronic		0	0	5	3	0	8	0	0	5	2	0	7	0	0	5	2	0	7	0	0	4	3	0	7
Mineralization		6	2	0	0	0	2	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
Spleen																									
Hematopoiesis, extramedullary		1	5	2	0	0	7	3	2	1	1	0	4	0	4	2	1	0	7	0	6	0	1	0	7
Thickening, media, arteriole		7	1	0	0	0	1	5	1	1	0	0	2	4	3	0	0	0	3	3	3	1	0	0	4
Stomach																									
Erosion, glandular stomach		5	0	3	0	0	3	6	0	1	0	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
Epidermal cyst		7	0	1	0	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
Large intestine (Cecum)																									
Erosion		8	0	0	0	0	0	6	0	1	0	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
Pituitary gland																									
Cyst		7	0	1	0	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
Thymus																									
Atrophy		8	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	1
Harderian gland																									
Cellular infiltration, lymphocyte		8	0	0	0	0	0	6	0	0	1	0	1	7	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
Pancreas																									
No remarkable change		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Small intestine																									
No remarkable change		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Mesenteric lymphnode																									
No remarkable change		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Adrenal gland																									
No remarkable change		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Thyroid gland																									
No remarkable change		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Parathyroid gland																									
No remarkable change		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Ovary																									
No remarkable change		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Uterus																									
No remarkable change		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Urinary bladder																									
No remarkable change		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Eye ball																									
No remarkable change		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Submandibular lymphnode																									
No remarkable change		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Aorta																									
No remarkable change		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

-, negative; ±, very slight; +, slight; 2+, moderate; 3+, severe.

Pos, Sum of the number of animals with positive finding.

\*, p<0.05, significantly different from the incidence of animals with positive finding in AA 0 mg/kg group (Fisher's exact test).



# 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（ARA）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、ARA 投与による影響を調べた。実験では、雄性 Wistar ラットに ARA 0、5、35 または 240 mg/kg を 8 週間混餌投与し、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 ARA 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、ARA 0 または 240 mg/kg のみ投与）も設定した。

前年度に投与が終了した動物を用いた。DSS 投与群においては、ARA5 および 35 mg/kg 投与による影響は、ほとんど認められなかった。一方、240 mg/kg 投与により、好中球比および好酸球比減少とリンパ球比上昇、血漿 ARA 量の増加、大腸の暗赤色化、大腸粘膜下組織の浮腫の発現頻度と程度の増加、大腸組織におけるマクロファージの浸潤の増加、大腸 myeloperoxidase 活性の上昇が認められた。DSS 非投与群においては、ARA 240 mg/kg 投与により、血漿中 ARA 量および ARA 比の上昇、EP/ARA 比の低下が認められたのみで、その他の影響はみられなかった。

以上をまとめると、ラットに ARA 5、35 および 240 mg/kg を 8 週間投与し、その最終週に DSS 投与によって大腸炎を誘導すると、5 および 35 mg/kg 投与による影響はほとんど認められなかった。一方 240 mg/kg 投与によっては、大腸の粘膜下組織の浮腫、MPO 活性の上昇、マクロファージの浸潤の増加等、大腸炎が促進する可能性が示唆されたが、この用量は、ヒトの 1 日摂取目安量の約 50 倍に相当する量であった。また、正常動物においては、240 mg/kg 投与によって血漿 ARA 量増加および EPA/ARA 比低下が認められたことから、これが生体に影響を与えるのか否かについては、さらに研究が必要と考えられる。

## A. 研究目的

アラキドン酸（ARA）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、ARA 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、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。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

ARA 含有油 (Lot No. 10050701、CABIO、中国) を 7 倍公比で混合油と混合し、ARA 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、ARA 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

ARA 投与第 8 週の 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

前年度研究で、投与が終了した動物を用いた。

投与期間終了後、剖検前 18 ~ 24 時間絶食させ、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部大静脈から採血した (凝固剤 : 血液学的検査用は EDTA 2K、血液生化学検査用および脂肪酸組成測定用はヘパリン)。

血液学的検査では、赤血球数、白血球数、白血球分類、網状赤血球比率、血小板数、ヘマトクリット値、血色素量、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度を測定した (血液自動分析装置、XT-2000iV、シスメックス)。

血液生化学的検査では、血液から血漿を得、総タンパク濃度 (TP)、アルブミン濃度 (r ALB)、A/G 比、グルコース濃度 (Glc)、総コレステロール濃度 (TC)、トリグリセライド濃度 (TG)、リン脂質濃度 (PL)、遊離脂肪酸濃度 (NEFA)、総ビリルビン濃度 (tbil)、

尿素窒素濃度 (BUN)、クレアチニン濃度 (Cre)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性 ( $\gamma$ -GTP)、アルカリフォスファターゼ活性 (ALP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性 (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性 (ALT)、カルシウム濃度 (Ca)、無機リン濃度 (IP) (以上、自動分析装置、JCA-BM6010、日本電子)、ナトリウムイオン濃度 (Na)、カリウムイオン濃度 (K)、塩素イオン濃度 (Cl) (以上、全自動電解質分析装置、EA05、エイアンドティー) を測定した。

血漿中脂肪酸の測定では、血液から血漿を得、Bligh and Dyer の方法 1) により血漿から総脂質を抽出した。サンプルには標準物質として、ヘプタデカン酸 (17:0、Sigma、St Louis、MO) を加えた。2 回抽出した溶液を窒素ガス気流下で乾固した。これに 5% HCl-メタノール (東京化成、東京) を 2 mL 加え、100℃、1 時間で脂肪酸メチルエステル誘導体化した。放冷後、水と石油エーテルを 2 mL ずつ加え上層 (石油エーテル層) を分取した。キャピラリーカラム (J&W DB-225、Agilent、Loveland、CO) を装着したガスクロマトグラフ (GC-18A、島津製作所、京都) により血漿中の脂肪酸量を測定した。

病理学的検査では、放血致死後、剖検し、器官、組織の肉眼的観察を実施した。脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎および精巣の器官重量を測定し、併せて比体重値 (相対重量) を算出した。また、脳、下垂体、大動脈、甲状腺 (上皮小体を含む)、胸腺、心臓、肺 (気管支を含む)、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、顎下リンパ節、精巣、精巣上部、前立腺および膀胱を固定保存\*し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を作製して病理組織学的に検査した。検査は、対照群および高用量群の動物について行った (\*固定保存 : 精巣および精巣上部はブアン液に固定し、その他の器官・組織は 0.1 M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液)。さらに大腸については、マッソントリクローム

(MT) 染色を行い、線維化を評価した。また、大腸を摘出して、長さおよび重量を測定し、単位長さ当たりの大腸重量比を算出した。

大腸組織におけるマクロファージの浸潤を評価するため、対照群および高用量群の全例の大腸組織標本を作製し、CD68 の免疫染色を行った。組織切片を脱パラフィン処理し、抗原賦活化および非特異反応のブロッキングの後、一次抗体 (CD68、Serotec、1:500) を添加してインキュベートし (4℃、overnight)、二次抗体 (Simplestain MAX-PO、Nichirei) を添加して室温で 20 分間インキュベートした。次に 3,3-diaminobenzidine (DAB) を適用して発色させた。ランダムな 5 視野中の陽性細胞数を計測し、単位面積当たりの数を算出した。

大腸のびらんの範囲を評価するため、アルシアンブルー染色を行った。病理組織観察部位より上部 4 cm の範囲で、大腸を長軸方向に切開し、3% 酢酸水溶液に 5 分間浸漬した。精製水で洗浄した後、1% アルシアンブルー溶液で 20 分間染色し、酢酸溶液で洗浄して写真撮影した (COOLPIX5700、ニコン)。濃青色部位 (びらん部位) の面積を測定し (Image J 1.44p)、大腸粘膜中の染色部位の割合を算出した。

炎症性マーカーである myeloperoxidase (MPO) 活性を測定した。大腸組織をホモジネートし、市販のキットを用いて MPO 活性を測定した (Myeloperoxidase Activity Assay Kit、Biovision)。

[参考文献]

1) Bligh EG, Dyer WJ, A rapid method for total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917, 1959.

(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

### 血液学的検査

対照群と比較して、240 mg/kg 群の好中球比および好酸球比の低下およびリンパ球比の上昇が認められた (図 1)。しかし用量依存性はみられなかった。赤血球系には影響が認められなかった (結果は示さず)。

### 血液生化学的検査

測定項目において群間差は認められなかった (表 1)。

### 血漿脂肪酸組成

DSS 誘導大腸炎モデルにおいては、ARA 240 mg/kg 群の血漿中 ARA 濃度は、ARA 0 mg/kg 群と比較して、有意に高値を示したが、総脂肪酸に占める ARA の割合は、群間差がなかった (図 2)。しかし、大腸炎を誘導していない正常動物においては、ARA 240 mg/kg 群の ARA 濃度および割合のどちらも、ARA 0 mg/kg 群と比較して高値を示した。また、EPA/ARA 比は、大腸炎モデルにおいては群間差が認められなかったが、正常動物においては ARA 240 mg/kg 群で有意に低値を示した。

### 器官重量

群間差が認められなかった (表 2)。

### 肉眼観察

大腸の暗赤色化は、対照群では 1 例であったのに対し、5 および 240 mg/kg 群においてそれぞれ 7 および 6 例であった (表 3)。

### 組織学的観察

結腸および盲腸の粘膜下組織の浮腫は、対照群と比較して、240 mg/kg 群において高頻度に認められる傾向があり、その程度は高かった(表4および写真1および2)。

#### 大腸重量比

群間差が認められなかった(表5)。

#### 大腸粘膜における CD68 陽性細胞の発現

ARA 240 mg/kg 群の大腸粘膜部分の CD68 陽性細胞(マクロファージ)の発現は、どちらも ARA 0 mg/kg 群と比較して有意に多かった(図3および写真1および2)。

#### びらん面積の比較

アルシアンブルーで染色したびらん部位は、ARA 35 および 240 mg/kg 投与群において大きい傾向が認められたが有意差はなかった(図4)。

#### MPO 活性

ARA 240 mg/kg 群の大腸 MPO 活性は、ARA 0mg/kg(対照)群と比較して有意に高値を示し、用量依存性が認められた(図5)。

#### D. 考察

本研究の結果から、ARA を8週間投与し、最終週に DSS 投与により炎症性大腸炎を誘導したラットにおいて、ARA 5 mg/kg および 35 mg/kg の投与によっては、ほとんど影響が認められなかった。しかし、240 mg/kg 投与が炎症を促進することが認められた。これは市販品の1日摂取目安量の約50倍に相当する量であり、また、比較的感度の高い評価方法によって認められた変化であった。これらのことから、ARA 補給が炎症性大腸炎を顕著に促進する可能性は低いと考えられる。

炎症が関与する疾患は多数存在する。疾患によって、ARA 補給による影響の有無あるいは影響が認められる用量が異なる可能性があるため、炎症性大腸炎以外の炎症性疾患に関しても研究が必要であると考えられる。

血漿中の総脂肪酸に占める ARA の割合は、正常動物においては、ARA 240 mg/kg 投与によって増加したが、大腸炎動物においては増加

しなかった。炎症においては、ARA カスケードの代謝が促進している可能性が示唆された。

血中の EPA/ARA 比は、心血管イベントを予測する新規のリスクファクターとして注目を集めている。EPA に対して ARA が多くなり、EPA/ARA 比が低くなると、疾患リスクが高まると考えられている。本研究での正常動物の血漿 EPA/ARA 比は、ARA 0 mg/kg 群と比較して、ARA 240 mg/kg 群では有意に低値を示した。この差が心血管イベントのリスクを上昇させるものかどうか、EPA(またはDHA)を同時補給した場合はどうなるのか等、本研究では明らかにならなかったが、安全に摂取するための情報提供のためにはさらに研究を進める必要があると考える。医薬品を投薬される場合と異なり、一般消費者が自由に摂取できる食品であるという認識は重要だと考える。

#### E. 結論

8週間の ARA 5 および 35 mg/kg 投与によって、薬物誘導大腸炎モデルラットにおいて、顕著な変化は認められなかった。しかし、市販品の1日摂取目安量の約50倍に相当する240 mg/kg 投与によって、大腸の粘膜下組織の浮腫の増加、炎症性マーカーである MPO 活性の上昇、マクロファージの浸潤促進が認められたことから、この用量においては炎症性大腸炎が促進する可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

(記載せず)

#### G. 研究発表

1. 論文発表 無し

2. 学会発表

日本脂質栄養学会第20回大会, 2011年9月2~3日(埼玉県坂戸市), Journal of lipid Nutrition 20,2,155,2011

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

無し