

B-9 病理学的検査

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、精巣上体、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：精巣および精巣上体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。

B-10 大腸重量測定

大腸を摘出して、長さおよび重量を測定し、単位長さ当たりの重量比を算出した。

B-11 免疫組織化学法による大腸粘膜の CD68 陽性細胞発現

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。

B-12 びらん部位の測定

大腸のびらんを評価するため、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4cm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。

B-13 myeloperoxidase（MPO）活性測定

大腸組織をホモジネートし、炎症性マーカーである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

C-1 一般状態、体重、摂餌量、摂水量

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投与群の各群6～9例で貧血が認められたが群間差はなかった。

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。

ARA投与群（5、35および240 mg/kg群）の摂餌量は、対照群（ARA0mg/kg）と比較して有意差は認められなかった（図1）。

DSS投与期間中の摂水量は、群間差は認められなかった。

C-2 便の性状

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（表1）。ARA240 mg/kg群での発現時期は早い傾向がみられたが、症状の程度には群間差がなかった。

C-3 血液学的検査

対照群と比較して、240mg/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2）。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）。

C-3 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2）。

C-4 血漿脂肪酸組成

DSS誘導大腸炎モデルにおいては、ARA240 mg/kg群の血漿中ARA濃度は、ARA0mg/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3）。しかし、大腸炎を誘導していない正常動物においては、ARA240mg/kg群のARA濃度および割合のどちらも、ARA0mg/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。

C-5 器官重量

群間差が認められなかった（表3）。

C-6 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240mg/kg群においてそれぞれ7および6例であった（表4）。

C-7 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、240mg/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5および写真1および2）。

C-8 大腸重量比

群間差が認められなかった（表6）。

C-9 大腸粘膜におけるCD68陽性細胞の発現

ARA240mg/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ARA0mg/kg群と比較して有意に多かった（図4および写真1および2）。

C-10 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240mg/kg投与により大きい傾向が認められたが有意差はなかった（図5）。

C-11 MPO活性

ARA240mg/kg群の大腸MPO活性は、ARA0 mg/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6）。

D. 考察

本研究の結果から、ARA補給したDSS誘導炎症性大腸炎ラットにおいて、現在市販されているARA補給剤の1日摂取目安量に相当する低用量（5mg/kg）および中用量（35mg/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、高用量として設定したARA 240mg/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、ARA240mg/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、ARA0mg/kg 群と比較して、ARA240mg/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 ARA5 および 35mg/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 240mg/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. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

内藤由紀子、立花滋博、安藤栄里子、青木聡子、古谷真美、田面義之、永田伴子、岩井直温、薬物誘導大腸炎モデルラットにおけるアラキドン酸補給の影響、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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

表 1 便の性状

| Group | Animal No. | Day | | | | | | | |
|-------------|---------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| ARA 0 mg/kg | 1 | | | | | | 1 | 2 | 4 |
| DSS+ | 2 | | | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 3 | | | | | | 2 | 4 | 4 |
| | 4 | | | | | | 2 | 2 | 3 |
| | 5 | | | | | | 2 | 2 | 2 |
| | 6 | | | | | 1 | 2 | 2 | 2 |
| | 7 | | | | | | 2 | 2 | 2 |
| | 8 | | | | | | 1 | 2 | 2 |
| | 9 | | | | | | | 2 | 3 |
| | 10 | | | | | | | 2 | 2 |
| | ARA 5 mg/kg | 11 | | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| DSS+ | 12 | | | | | 1 | 2 | 2 | |
| | 13 | | | | | | 2 | 2 | 4 |
| | 14 | | | | | | 2 | 2 | 2 |
| | 15 | | | | | | 1 | 2 | 4 |
| | 16 | | | | | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 17 | | | | | | 4 | 4 | 4 |
| | 18 | | | | | 1 | 2 | 2 | 4 |
| | 19 | | | | | 2 | 4 | 4 | 4 |
| | 20 | | | | | | 2 | 2 | 2 |
| | ARA 35 mg/kg | 21 | | | | | | 1 | 2 |
| DSS+ | 22 | | | | | | 2 | 2 | 2 |
| | 23 | | | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 4 |
| | 24 | | | | | | 2 | 2 | 4 |
| | 25 | | | | | | | 2 | 2 |
| | 26 | | | | | | 2 | 2 | 2 |
| | 27 | | | | | | | 2 | 2 |
| | 28 | | | | | | 2 | 2 | 2 |
| | 29 | | | | | | | 2 | 2 |
| | 30 | | | | | | | 2 | 2 |
| | ARA 240 mg/kg | 31 | | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| DSS+ | 32 | | | | | | 1 | 1 | 2 |
| | 33 | | | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| | 34 | | | | | | 2 | 2 | 2 |
| | *35 | | | | | | | | 1 |
| | 36 | | | | | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 37 | | | | | | 1 | 2 | 2 |
| | 38 | | | | | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 39 | | | | | 1 | 1 | 2 | 2 |
| | 40 | | | | | 2 | 4 | 4 | 4 |

*, poor water supply

| Group | Animal No. | Day | | | | | | | |
|-------------|---------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| ARA 0 mg/kg | 41 | | | | | | | | |
| DSS- | 42 | | | | | | | | |
| | 43 | | | | | | | | |
| | 44 | | | | | | | | |
| | 45 | | | | | | | | |
| | 46 | | | | | | | | |
| | 47 | | | | | | | | |
| | 48 | | | | | | | | |
| | 49 | | | | | | | | |
| | 50 | | | | | | | | |
| | ARA 240 mg/kg | 51 | | | | | | | |
| DSS- | 52 | | | | | | | | |
| | 53 | | | | | | | | |
| | 54 | | | | | | | | |
| | 55 | | | | | | | | |
| | 56 | | | | | | | | |
| | 57 | | | | | | | | |
| | 58 | | | | | | | | |
| | 59 | | | | | | | | |
| | 60 | | | | | | | | |

1, loose
 2, brown-red colored
 3, red colored
 4, diarrhea

Slight
 ↑
 ↓
 Severe

表 2 血液生化学検査

| Dose | TP (g/dL) | rALB (g/dL) | rA/B | Glc (mg/dL) | TC (mg/dL) | TG (mg/dL) | PL (mg/dL) | NEFA (mEq/L) | tbil (mg/dL) | BUN (mg/dL) |
|--------------|--------------|----------------|------|----------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|----------------|
| AA 0 mg/kg | 5.0 | 3.3 | 2.0 | 133.0 | 61.0 | 20.0 | 108.0 | 0.9 | 0.0 | 24.0 |
| DSS+ | ±0.1 | ±0.1 | ±0.1 | ±5.0 | ±2.0 | ±6.0 | ±7.0 | ±0.2 | ±0.0 | ±2.0 |
| AA 5 mg/kg | 4.9 | 3.2 | 1.8 | 136.0 | 57.0 | 30.0 | 113.0 | 1.0 | 0.0 | 25.0 |
| DSS+ | ±0.1 | ±0.1 | ±0.1 | ±4.0 | ±4.0 | ±6.0 | ±9.0 | ±0.1 | ±0.0 | ±1.0 |
| AA 35 mg/kg | 5.1 | 3.4 | 2.0 | 132.0 | 55.0 | 29.0 | 105.0 | 0.9 | 0.0 | 23.0 |
| DSS+ | ±0.1 | ±0.1 | ±0.1 | ±5.0 | ±2.0 | ±13.0 | ±7.0 | ±0.2 | ±0.0 | ±1.0 |
| AA 240 mg/kg | 5.0 | 3.2 | 1.8 | 138.0 | 59.0 | 24.0 | 109.0 | 1.0 | 0.0 | 23.0 |
| DSS+ | ±0.1 | ±0.1 | ±0.1 | ±3.0 | ±2.0 | ±5.0 | ±4.0 | ±0.1 | ±0.0 | ±1.0 |
| AA 0 mg/kg | 5.7 | 3.9 | 2.2 | 153.0 | 51.0 | 49.0 | 95.0 | 0.6 | 0.0 | 18.0 |
| | ±0.1 | ±0.0 | ±0.1 | ±4.0 | ±3.0 | ±3.0 | ±3.0 | ±0.0 | ±0.0 | ±1.0 |
| AA 240 mg/kg | 5.5 | 3.8 | 2.2 | 156.0 | 55.0 | 47.0 | 94.0 | 0.4 | 0.0 | 19.0 |
| | ±0.1 | ±0.0 | ±0.1 | ±7.0 | ±2.0 | ±4.0 | ±2.0 | ±0.1 | ±0.0 | ±1.0 |

Values represent as mean ± SE (N=10)

| Dose | Cre (mg/dL) | Ca (mg/dL) | IP (mg/dL) | ALP (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 | 0.5 | 9.4 | 6.6 | 444.0 | 71 | 48 | 1 | 141.9 | 5.22 | 105.9 |
| DSS+ | ±0.0 | ±0.1 | ±0.2 | ±21.0 | 8 | 5 | 0 | 0.5 | 0.51 | 0.5 |
| AA 5 mg/kg | 0.5 | 9.3 | 6.4 | 481.0 | 68 | 56 | 2 | 141.5 | 5.62 | 106.2 |
| DSS+ | ±0.0 | ±0.1 | ±0.2 | ±31.0 | 7 | 8 | 1 | 0.3 | 0.36 | 0.6 |
| AA 35 mg/kg | 0.5 | 9.4 | 6.5 | 487.0 | 82 | 67 | 1 | 141.5 | 4.98 | 105.6 |
| DSS+ | ±0.0 | ±0.1 | ±0.2 | ±24.0 | 16 | 19 | 1 | 0.5 | 0.44 | 0.6 |
| AA 240 mg/kg | 0.6 | 9.4 | 6.4 | 453.0 | 60 | 47 | 1 | 141.4 | 5.2 | 105.7 |
| DSS+ | ±0.0 | ±0.1 | ±0.2 | ±20.0 | 5 | 7 | 0 | 0.3 | 0.36 | 0.5 |
| AA 0 mg/kg | 0.5 | 9.5 | 6.8 | 464.0 | 65 | 43 | 0 | 142.5 | 3.78 | 104.8 |
| | ±0.0 | ±0.1 | ±0.1 | ±11.0 | 1 | 2 | 0 | 0.1 | 0.15 | 0.3 |
| AA 240 mg/kg | 0.5 | 9.3 | 6.8 | 483.0 | 69 | 41 | 0 | 142.8 | 3.64 | 105.6 |
| | ±0.0 | ±0.1 | ±0.2 | ±19.0 | 3 | 2 | 0 | 0.3 | 0.08 | 0.3 |

Values represent as mean ± SE (N=10)

表 3 相对器官重量 (比体重)

| Group | BW (g) | Brain (g/kg BW) | Heart (g/kg BW) | Liver (g/kg BW) | Kidneys (g/kg BW) | Spleen (g/kg BW) | Testes (g/kg BW) | Adrenal glands (g/kg BW) |
|--------------|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|
| AA 0 mg/kg | 272.8 | 6.58 | 2.81 | 28.35 | 6.75 | 3.11 | 9.95 | 152.05 |
| DSS+ | ±6.8 | ±0.17 | ±0.06 | ±0.33 | ±0.22 | ±0.15 | ±0.18 | ±9.49 |
| AA 5 mg/kg | 246.1 | 7.11 | 2.97 | 27.87 | 7.01 | 3.88 | 10.62 | 156.40 |
| DSS+ | ±5.0 | ±0.16 | ±0.06 | ±0.53 | ±0.12 | ±0.20 | ±0.20 | ±9.67 |
| AA 35 mg/kg | 263.7 | 6.71 | 2.88 | 27.72 | 6.57 | 3.46 | 10.30 | 137.13 |
| DSS+ | ±5.3 | ±0.11 | ±0.09 | ±0.36 | ±0.12 | ±0.29 | ±0.22 | ±3.20 |
| AA 240 mg/kg | 267.8 | 6.63 | 2.85 | 28.94 | 6.68 | 3.54 | 10.07 | 152.36 |
| DSS+ | ±7.9 | ±0.18 | ±0.05 | ±0.20 | ±0.13 | ±0.18 | ±0.20 | ±5.56 |
| AA 0 mg/kg | 284.4 | 6.35 | 2.77 | 27.75 | 6.14 | 2.47 | 9.97 | 141.56 |
| DSS- | ±6.1 | ±0.12 | ±0.03 | ±0.35 | ±0.06 | ±0.06 | ±0.17 | ±8.55 |
| AA 240 mg/kg | 277.4 | 6.39 | 2.74 | 28.06 | 5.89 | 2.35 | 9.73 | 145.99 |
| DSS- | ±6.5 | ±0.13 | ±0.02 | ±0.28 | ±0.05 | ±0.08 | ±0.22 | ±8.52 |

Values represent as mean ± SE (N=10)

表 4 肉眼觀察所見

| Group | 0 mg/kg +DSS | 5 mg/kg +DSS | 35 mg/kg +DSS | 240 mg/kg +DSS | 0 mg/kg | 240 mg/kg |
|--------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|---------|-----------|
| (Liver) | | | | | | |
| Pale | 5 | 8 | 6 | 7 | 0 | 0 |
| (Kidney) | | | | | | |
| Pale | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| (Adrenal gland) | | | | | | |
| Small | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| (Spleen) | | | | | | |
| Enlargement | 3 | 7 | 3 | 7 | 0 | 0 |
| (Pancreas) | | | | | | |
| Pale | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| (Femur, Bone marrow) | | | | | | |
| Pale | 4 | 7 | 3 | 6 | 0 | 0 |
| (Ileum) | | | | | | |
| Blackish contents | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| (Cecum) | | | | | | |
| Dark red | 1 | 7 | 2 | 6 | 0 | 0 |
| Dilated | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Loose contents | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Blackish contents | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| (Colon) | | | | | | |
| Dilated | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Loose contents | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Blackish contents | 2 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| (Rectum) | | | | | | |
| Loose contents | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Blackish contents | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| (Whole body) | | | | | | |
| Pale | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Soiled perineal region | 3 | 5 | 4 | 4 | 0 | 0 |
| Smudge around eyes | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Smudge of perinasal area | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Animal numbers which positive findings were observed in.

表 5-1 組織学的観察所見

| Group | AA 0 mg/kg+DSS | | AA 240 mg/kg+DSS | | AA 0 mg/kg | | AA 240 mg/kg | |
|---|----------------|----|------------------|---|------------|----|--------------|----|
| | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Findings | | | | | | | | |
| Liver | | | | | | | | |
| Hematopoiesis, extramedullary | 0 | 10 | 2 | 7 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| Microgranuloma | 10 | 0 | 7 | 2 | 10 | 0 | 9 | 1 |
| Proliferation, bile duct | 10 | 0 | 9 | 0 | 9 | 1 | 10 | 0 |
| Kidney | | | | | | | | |
| Hyaline droplet, tubular epithelium | 2 | 8 | 0 | 9 | 0 | 10 | 0 | 10 |
| Basophilic tubular epithelium, proximal | 8 | 2 | 7 | 2 | 8 | 2 | 5 | 5 |
| Spleen | | | | | | | | |
| Hematopoiesis, extramedullary | 0 | 10 | 0 | 9 | 0 | 10 | 0 | 10 |
| Congestion, acute | 10 | 0 | 9 | 0 | 4 | 6 | 7 | 3 |
| Colon/Cecum | | | | | | | | |
| Erosion/ulcer, epithelium | 5 | 5 | 4 | 5 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| Edema, submucosa | 6 | 4 | 2 | 7 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| Cellular infiltration, inflammatory | 5 | 5 | 2 | 7 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| Hemorrhage, fresh, submucosa | 9 | 1 | 8 | 1 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| Heart | | | | | | | | |
| Degeneration/fibrosis, myocardium | 9 | 1 | 8 | 1 | 8 | 2 | 6 | 4 |
| Lung | | | | | | | | |
| Cellular infiltration, neutrophil | 9 | 1 | 9 | 0 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| Hemorrhage, alveolar | 9 | 1 | 9 | 0 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| Fibrin thrombus | 10 | 0 | 8 | 1 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| Accumulation, foamy cell | 10 | 0 | 8 | 1 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| Thyroid gland | | | | | | | | |
| Ectopic thymus | 9 | 1 | 7 | 2 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| Ultimobranchial body | 10 | 0 | 8 | 1 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| Pancreas | | | | | | | | |
| Increase, Zymogen granules, exocrine cell | 7 | 3 | 6 | 3 | 8 | 2 | 8 | 2 |

-, negative; +, positive

表 5-2 組織学的観察所見 (結腸および盲腸)

| | AA 0 mg/kg DSS (+) | | | | | | AA 240 mg/kg DSS (+) | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------|---|---|----|----|-----|----------------------|---|---|----|----|-----|
| | - | ± | + | 2+ | 3+ | Pos | - | ± | + | 2+ | 3+ | Pos |
| Colon/Cecum | | | | | | | | | | | | |
| Erosion/ulcer, epithelium | 5 | 2 | 3 | 0 | 0 | 5 | 4 | 1 | 3 | 1 | 0 | 5 |
| Edema, submucosa | 6 | 0 | 3 | 1 | 0 | 4 | 2 | 0 | 1 | 6 | 0* | 7 |
| Cellular infiltration, inflammatory | 5 | 1 | 3 | 1 | 0 | 5 | 2 | 4 | 2 | 1 | 0 | 7 |
| Hemorrhage, fresh, submucosa | 9 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 8 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |

*, p<0.05 by Mann-Whitney's U-test

-, negative; ±, minimal; +, slight; 2+, moderate; 3+, marked; Pos, total of positive grades

表 6 大腸重量比 (単位長さ当たりの重量)

| Dose | relative weight (mg/cm) |
|--------------------|----------------------------|
| ARA 0 mg/kg +DSS | 123.1 ± 5.1 |
| ARA 5 mg/kg +DSS | 118.0 ± 7.6 |
| ARA 35 mg/kg +DSS | 124.9 ± 6.7 |
| ARA 240 mg/kg +DSS | 123.2 ± 4.3 |
| ARA 0 mg/kg | 91.1 ± 3.5 |
| ARA 240 mg/kg | 92.6 ± 2.7 |

Values represent as mean ± SE (N)

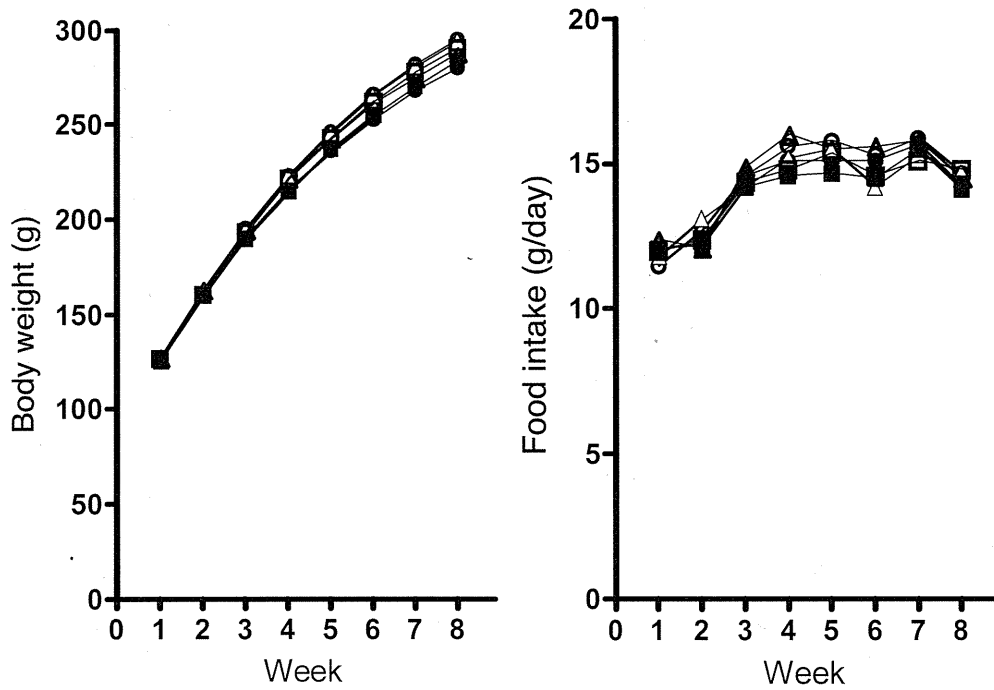


図1 体重 (左) および摂餌量 (右) の推移

○ ARA 0 mg/kg、● ARA 5 mg/kg、△ ARA 35 mg/kg、▲ ARA 240 mg/kg、□ ARA 0 mg/kg (DSS 投与なし)、■ ARA 240 mg/kg (DSS 投与なし)

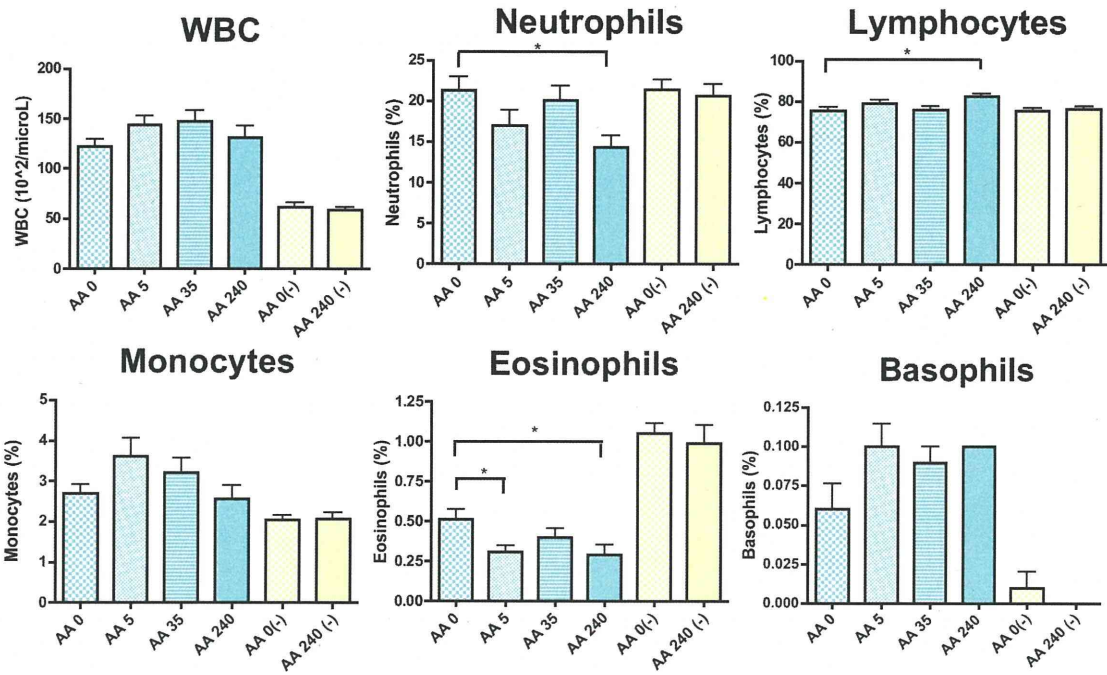


図2 血液学的検査（白血球数および白血球百分比）

*p<0.05, significantly different from the values of AA 0 mg/kg group (Dunnett t-test)

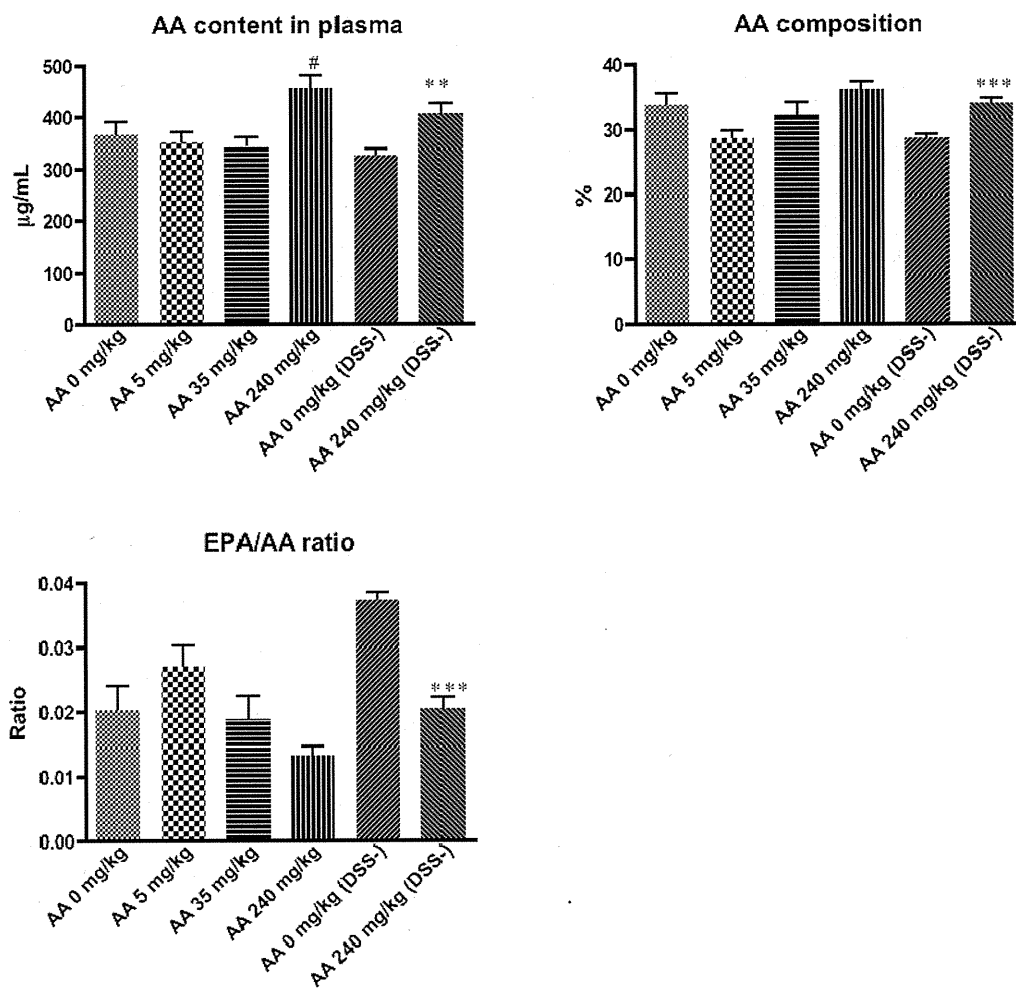


图 3 血浆中脂肪酸量

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, significantly different from the values of AA 0 mg/kg (DSS-) group (unpaired t-test)

$p < 0.05$, significantly different from the value of AA 0 mg/kg group (Dunnett t-test)

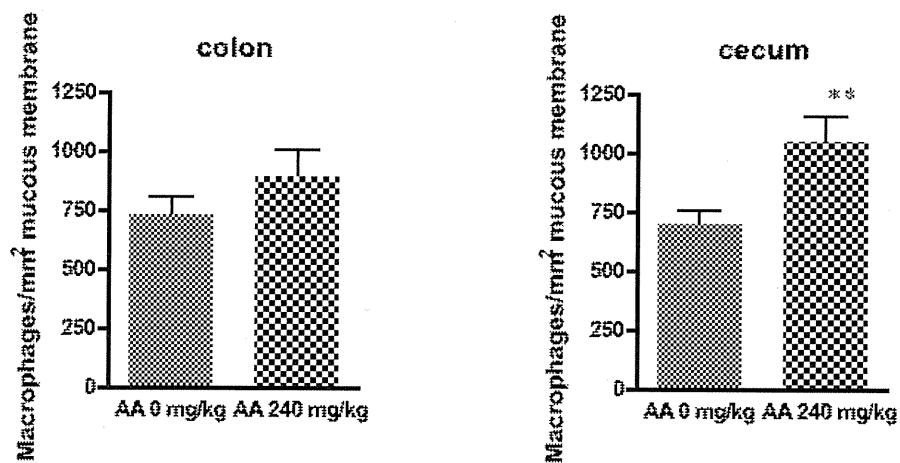


図4 大腸組織におけるマクロファージ浸潤

大腸の単位粘膜面積当たりの CD-68 陽性細胞数

**p<0.01, significantly different from the value of AA 0 mg/kg group (Unpaired t-test)

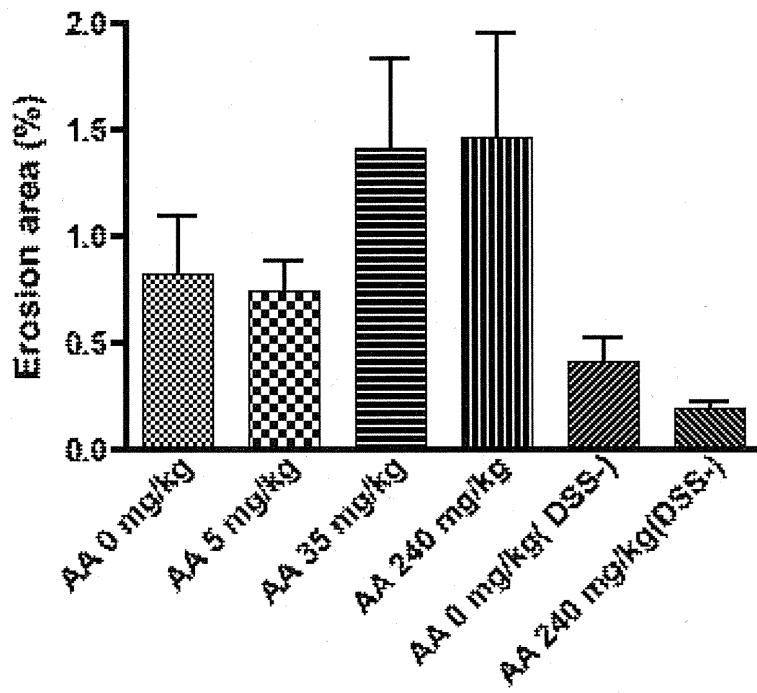


図5 大腸びらん部位（大腸粘膜におけるびらん面積の割合）

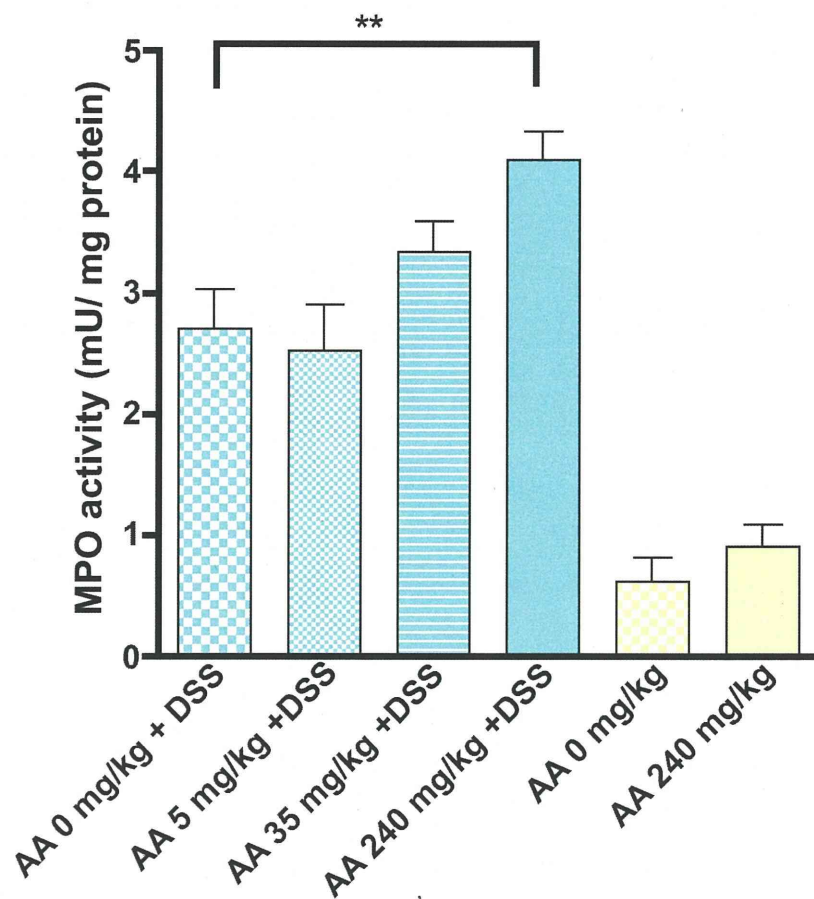


図 6 大腸組織 Myeloperoxidase (MPO) 活性

**p<0.01, significantly different from the value of AA 0 mg/kg group (Dunnett t-test)

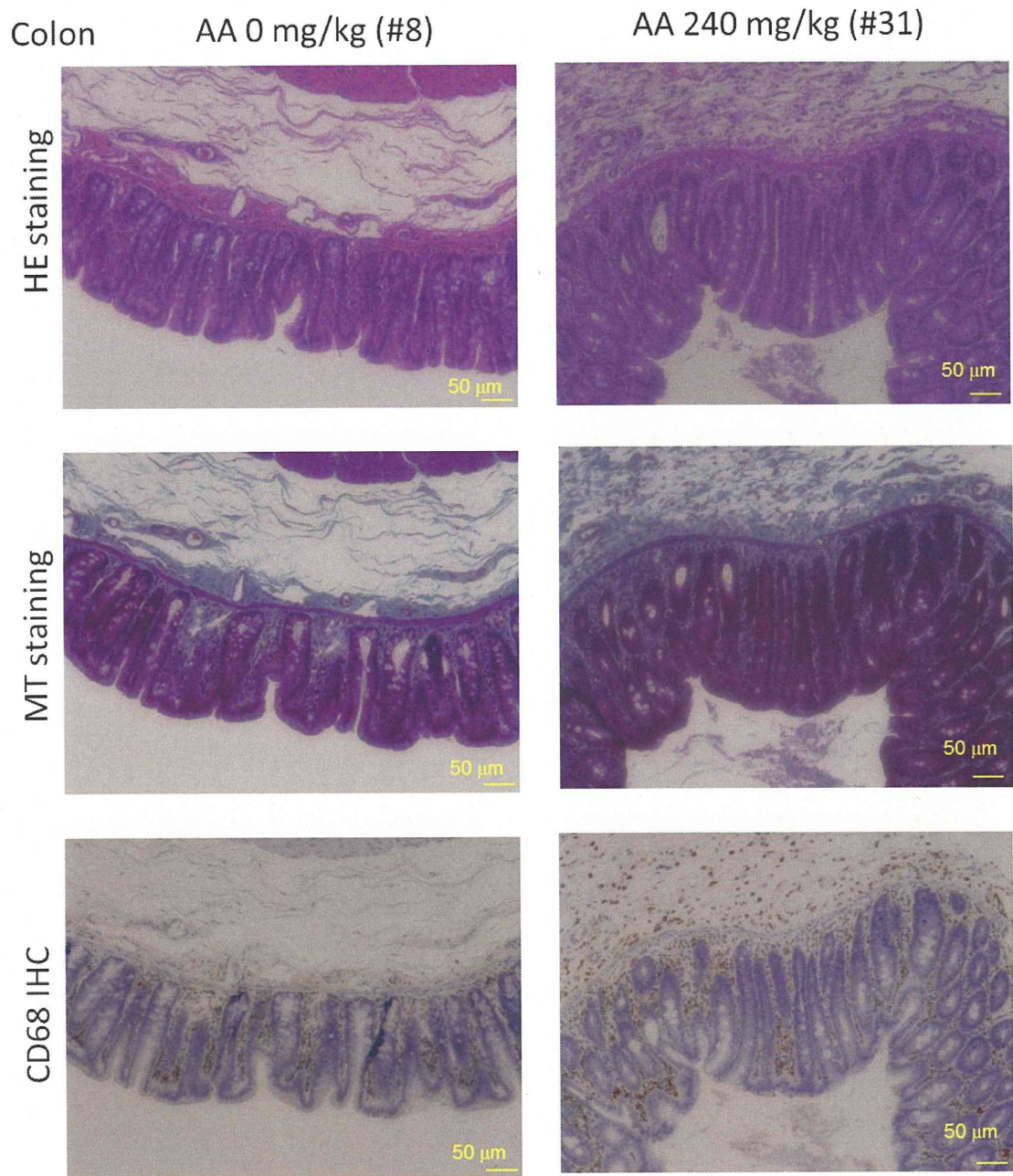


写真1 結腸組織写真（典型例）

左：AA 0 mg/kg 群（動物番号 8）、右：AA 240 mg/kg 群（動物番号 31）、上：ヘマトキシリン・エオジン染色、中：マッソントリクローム染色、下：CD-68 免疫染色

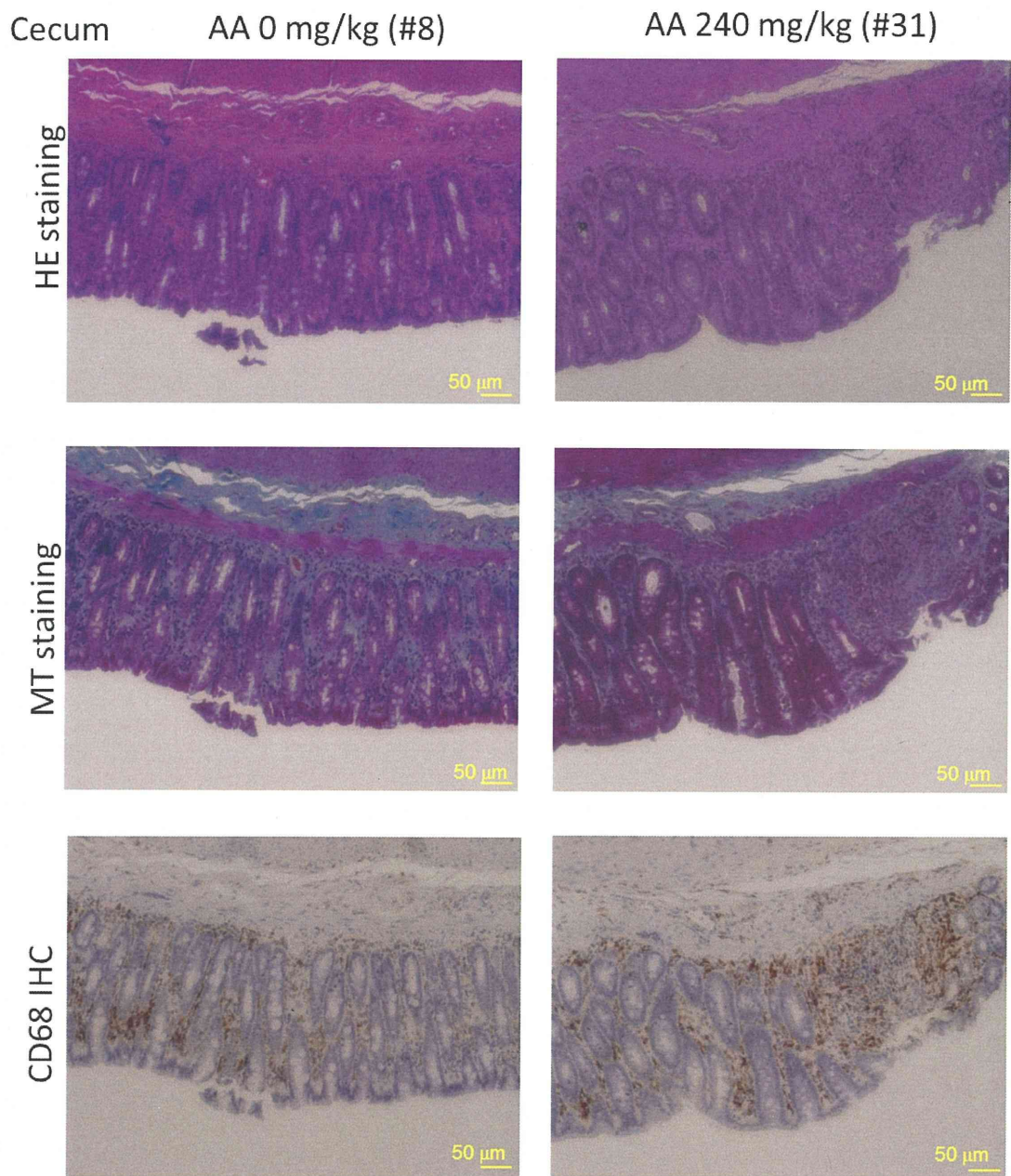


写真2 盲腸組織写真（典型例）

左：AA 0 mg/kg 群（動物番号 8）、右：AA 240 mg/kg 群（動物番号 31）、上：ヘマトキシリン・エオジン染色、中：マッソントリクローム染色、下：CD-68 免疫染色

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 螺良 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癌発症ラットモデルを用いて、アラキドン酸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。

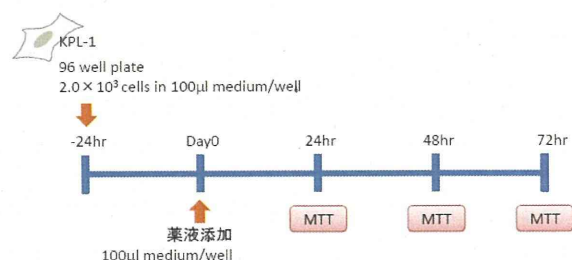
B. 研究方法

実験① ARAのヒト乳癌細胞株に対する増殖活性への影響：

ヒト乳癌細胞株であるKPL-1(エストロゲン受容体陽性)をphenol red (-)の10%ウシ胎仔血清とグルタミンを添加したDMEMD/5921培地で24時間培養し、その後10, 50, 100, 150および200 μ MのARA溶液(100%エタノー

ル溶解)を24, 48および72時間連続暴露し、MTTアッセイを実施した。なお、本実験を4回繰り返し、細胞増殖促進/抑制効果を判定した(図1-1)。

(図1-1：実験プロトコール)

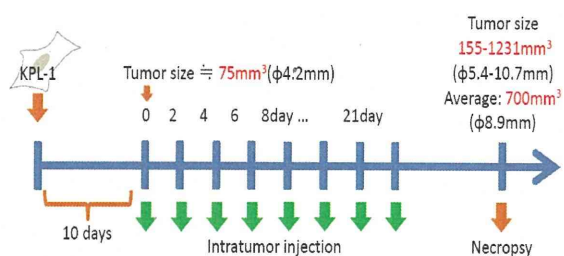


実験② ARAのヒト乳癌細胞株移植動物での腫瘍増殖に対する影響(直接暴露)：雌BALB/c-nu/nu系マウスを日本チャールスリバーから購入し、6週齢時に2.5x10⁶cells/animalのKPL-1ヒト乳癌細胞株を右腋窩乳腺組織内に移植した。10日後に腫瘍体積が約75 mm³に成長したのを確認した後、ARA10 μ L(30 μ g/mL in EtOH + PBS)を1日おきに原発腫瘍塊内に直接投与した(図2-1)。対照群として、同様に乳癌細胞株を移植した動物に、0.2% EtOH (PBS溶解)を投与した群を設定した。なお、飼料は市販固形餌(CMF 30Gy、オリエン

タル酵母)を自由摂取させた。下記の項目について観察し、腫瘍細胞移植後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(2日毎)
- ・体重測定(5日毎)
- ・触診・腫瘍塊サイズ測定(5日毎)：腫瘍塊の長さ・幅を測定し、(長さ) x (幅)² x 0.5の計算式により、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染色標本を作製し、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、50mg/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、Image Jを用いて1mm²あたりの陽性細胞数をカウントした。
- ・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1mm²あたりの陽性細胞数をカウントした。

(図2-1：実験プロトコル)



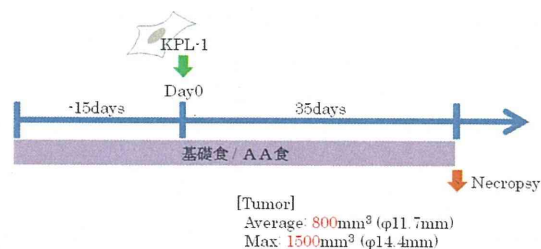
実験③ ARAのヒト乳癌細胞株移植動物での腫瘍増殖に対する影響(食餌暴露)：

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2.5x10⁶cells/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3-1)。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：実験②と同様の方法で検査した。
- ・乳腺腫瘍のBrdU陽性率：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：実験②と同じ方法で1mm²あたりの陽性細胞数をカウントした。

(図3-1：実験プロトコル)

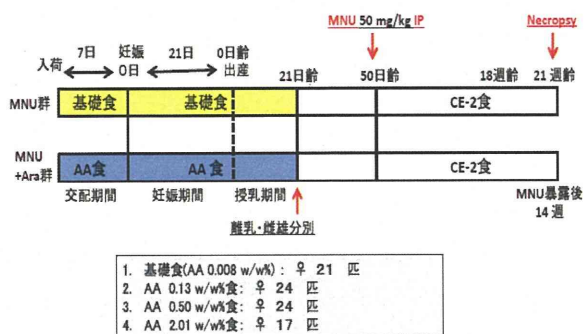


実験④ ARAの妊娠期・授乳期投与によるMNU誘発ラット乳癌発生への影響：

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)を摂取させた。出生した雌仔ラットの50日齢時に50mg/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4-1)。

- ・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4-1：実験プロトコル)



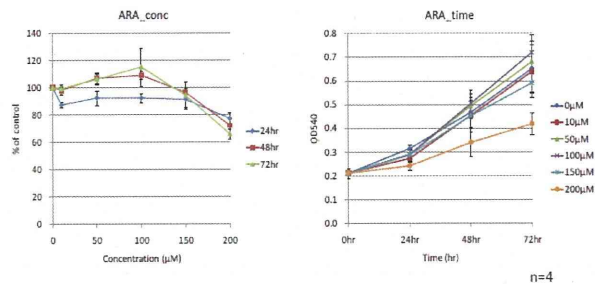
なお、全ての動物実験は本学動物実験委員会の承認を得て、本学動物センターにおいて実施した。動物は温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ 、照明1日12時間の環境下で飼育し、照射(30Gy)飼料は使用時まで冷蔵・遮光保存、飼料と滅菌水を自由摂取させた。

C. 研究結果および考察

実験① ARA のヒト乳癌細胞株に対する増殖活性への影響：

何れの暴露時間においても、 $200 \mu\text{M}$ で低値傾向がみられた。

(図1-1：MTTアッセイ)



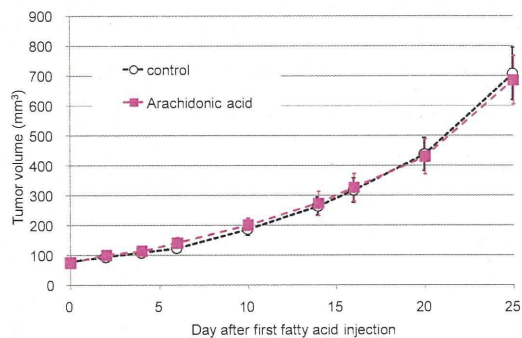
実験② ARA のヒト乳癌細胞株移植動物での腫瘍増殖に対する影響(直接暴露)：

一般状態および生死：試験期間中、両群とも異常ならびに死亡は観察されなかった。

体重：試験期間中、対照群に比べてARA群で有意な差はみられなかった。

腫瘍体積の推移：試験期間中、ARA群の腫瘍体積は、対照群のそれとほぼ同様の発育を示し、腫瘍体積に有意な差はみられなかった(図2-2、2-3)。

(図2-2：腫瘍体積)



(図2-3：腫瘍細胞移植35日後の腫瘍塊の肉眼写真)



左が対照群、右がARA群

腫瘍重量：解剖時の移植塊の重量は、対照群が $799 \pm 78 \text{ mg}$ 、ARA群が $819 \pm 86 \text{ mg}$ であり、統計学的に有意な差を認めなかった(図2-4)。