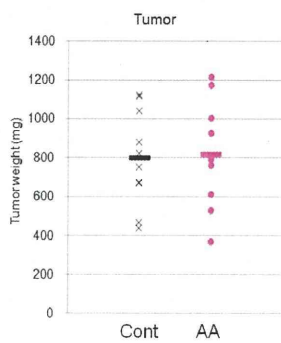
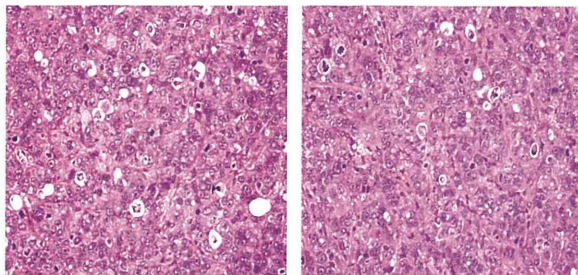


(図2-4: 腫瘍重量)



病理組織学的検査: 移植した乳癌組織の組織型には、群による違いは認めなかった(図2-5)。乳癌組織内・周囲の炎症についても群間に差は認めなかった。さらに、所属リンパ節の検査では、対照群で1/10例、ARA群で2/10例に転移巣が観察されたものの、群間に差はみられなかった。

(図2-5: 各群の乳腺内移植腫瘍(腺癌)の組織像)



左が対照群、右がARA群

腫瘍細胞のBrdU陽性率: 1 mm<sup>2</sup>あたりの陽性細胞数は、対照群で539個に対して、ARA群では502個であった。統計学的に差はみられないことから、ARA群では腫瘍細胞の増殖活性に影響を及ぼさないと判断した。

腫瘍細胞のTUNEL陽性率: 1 mm<sup>2</sup>あたりの陽性細胞数は、対照群で83個に対して、ARA群では100個であり、若干の増加をみたが、統計学的に差はみられず、ARA群では細胞死発現の増加はみられないと判断した。

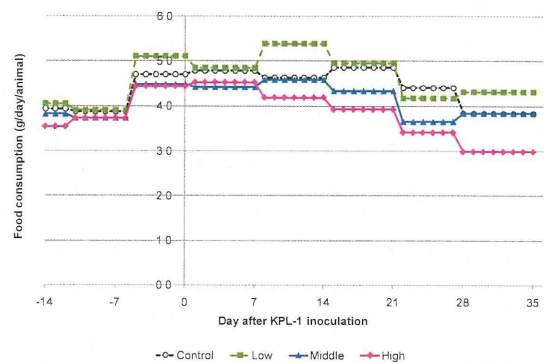
実験③ ARAのヒト乳癌細胞株移植動物での腫瘍増殖に対する影響(食餌暴露):

一般状態および生死: 試験期間中、何れの群

とも異常ならびに死亡は観察されなかった。

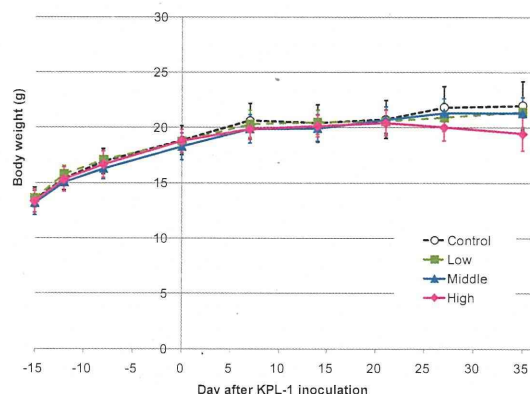
摂餌量・ARA摂取量: 1匹あたりの1日摂餌量は、移植2週間後から、ARA 2.01%添加食群では他の群に比べ減少傾向がみられ、移植35日後では基礎食群(Control)で3.8g、ARA 0.13%添加食群で4.3g、ARA 0.50%添加食群で3.8gであったのに対し、ARA 2.01%添加食群で3.0gと減少が顕著であった(図3-2)。試験期間中のARA摂取量(投与量)はARA 0.13%添加食群で306 mg/kg、ARA 0.50%添加食群で1070 mg/kg、ARA 2.01%添加食群で4033 mg/kgとなり、公比3~4倍であった。なお、基礎食群(Control)においてもARAが含有されており、その投与量は18 mg/kgであった。

(図3-2: 1匹あたりの1日摂餌量)



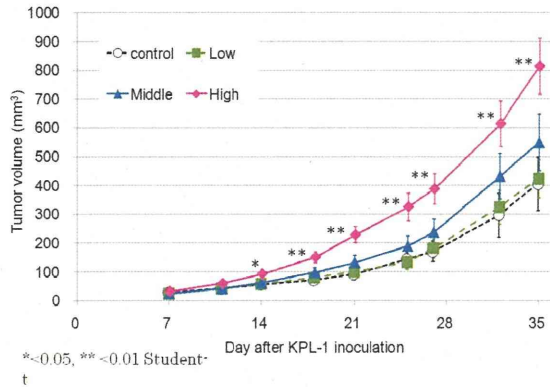
体重: 移植4週間後から、ARA 2.01%添加食群では減少し、移植35日後では基礎食群(Control)で22.0g、ARA 0.13%添加食群で21.4g、ARA 0.50%添加食群で21.3gであったのに対し、ARA 2.01%添加食群で19.5gと低値を示した(図2-3)

(図3-3: 体重の推移)



腫瘍体積の推移： 移植2週間後から、ARA2.01%添加食群では腫瘍体積が他群に比べて有意に増加し、移植35日後では基礎食群(Control)で405mm<sup>3</sup>、ARA0.13%添加食群で423mm<sup>3</sup>、ARA 0.50%添加食群で549mm<sup>3</sup>であったのに対し、ARA2.01%添加食群で813mm<sup>3</sup>と有意に増加した(図3-4、図3-5)。

(図3-4： 腫瘍体積)



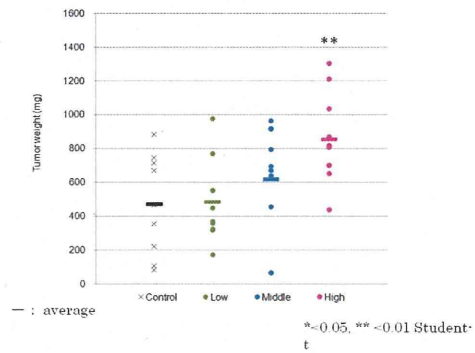
(図3-5： 腫瘍細胞移植35日後の腫瘍塊の肉眼写真)



左が基礎食群、右がARA 2.01%添加食群

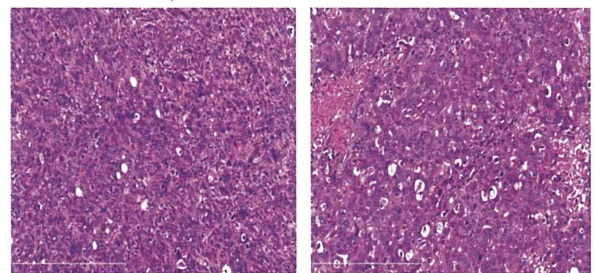
腫瘍重量： 解剖時の移植塊の重量は、基礎食群(Control)で470mg、ARA0.13%添加食群で483mg、ARA0.50%添加食群で616mgであったのに対し、ARA2.01%添加食群で852mgと有意に増加した(図3-6)。

(図3-6： 腫瘍重量)



病理組織学的検査： 移植した乳癌組織の組織型には、群による違いは認めなかった(図3-7)。乳癌組織内・周囲の炎症についても群間に差は認めなかった。さらに、所属リンパ節の検査では基礎食群で1/9例、ARA 0.13%添加食群で0/10例、ARA 0.50%添加食群で0/10例、ARA 2.01%添加食群で1/9例に転移巣が観察されたものの、群間に差はみられなかった。

(図3-7： 各群の乳腺内移植腫瘍(腺癌)の組織像)



左が基礎食群、右がARA 2.01%添加食群

腫瘍細胞のBrdU陽性率： 基礎食群で12.4%、ARA0.13%添加群で12.6%、ARA 0.50%添加群で11.5%、ARA2.01%添加群で15.1%であり、ARA2.01%添加群では基礎食群に比べて有意に増加した。

腫瘍細胞のTUNEL陽性率： 1mm<sup>2</sup>あたりの陽性細胞数は、基礎食群で155個、ARA 0.13%添加食群で166個、ARA0.50%添加食群で127個、ARA2.01%添加食群で147個であり、統計学的に差はみられないことから、ARA添加食群では細胞死発現の増加はみられないと判断した。以上、ARA2.01%添加食群では移植乳

癌の発育促進が観察された。この作用メカニズムについては不明であるが、①乳癌細胞に対するARAによる増殖促進作用は認めなかったこと(実験①)、②ARA添加により移植乳癌細胞の増殖活性は増加しなかったこと(実験②)から、ARAによる腫瘍細胞への直接的な作用というよりは、血管新生に対する作用など他の間接的なメカニズムが関与しているのかもしれない。

#### 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：

一般状態および生死： 乳腺腫瘍を持つ動物では、各群の数例で乳腺腫瘍部位の潰瘍、そこからの失血に起因する貧血(眼球退色)が観察された。乳腺腫瘍を持つ動物のうちARA0.50%添加食群の1例が、20週齢時に状態悪化により死亡した。

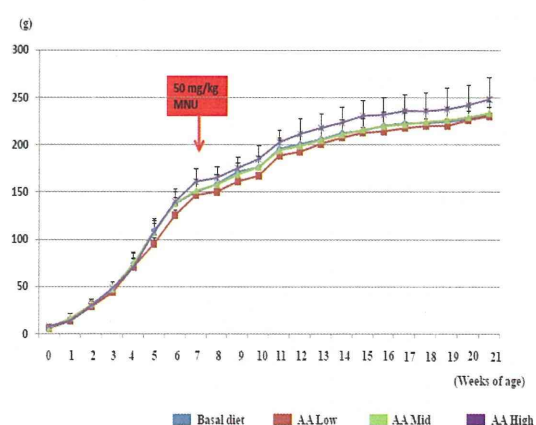
摂餌量・ARA摂取量： 母親の1匹あたりの摂餌量は各群に特に差は認めず、哺乳期間中の摂餌量が交配期や妊娠期の約3倍を示した。ARA摂取量は、交配期ならびに妊娠期では、基礎食群で4.7 - 5.2 mg/kg、ARA0.13%添加食群で77.7 - 83.5 mg/kg、ARA0.50%添加食群で261.8 - 332.7mg/kg、ARA2.01%添加食群で1075.1 - 1226.6mg/kgであった(表4-1)。これに対し、授乳期では各群とも摂餌量にともない、ARA摂取量が増加し、基礎食群で9.4mg/kg、ARA 0.13%添加食群で242.6mg/kg、ARA0.50%添加食群で874.0mg/kg、ARA 2.01%添加食群で3058.5m g/kgを示した。ARA添加食群におけるARA摂取量(投与量)は公比3~4倍であった。

(表4-1：ARA摂取量)

Period	Dose of arachidonic acid (mg/kg)			
	Basal	Low	Mid	High
Mating (1 week)	5.2	83.5	332.7	1226.6
Pregnancy (3 weeks)	4.7	77.7	261.8	1075.1
Nursing (3 weeks)	9.4	242.6	874.0	3058.5
Estimated dose		60	250	1000

体重： ARA摂取終了時の3週齢では、基礎食群45g、ARA0.13%添加食群44g、ARA0.50%添加食群48g、ARA2.01%添加食群48gであり、群間に差はみられなかった。21週齢の最終体重は、基礎食群233g、ARA0.13%添加食群230g、ARA0.50%添加食群234g、ARA2.01%添加食群248gであり、ARA2.01%添加食群で、基礎食群に比べて有意に増加した。しかし、ARA摂取終了時の3週齢では群間に差はみられないことから、この体重の変化がARA摂取による影響ではないと判断した。

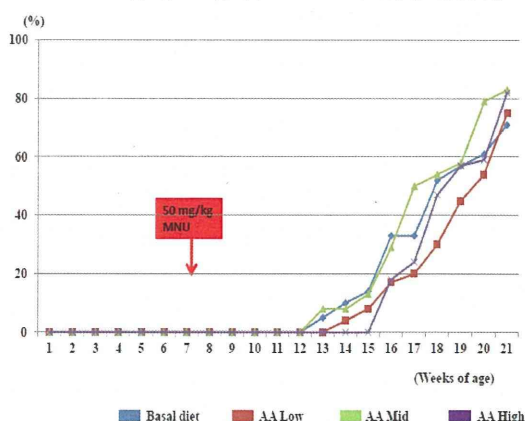
(図4-2：体重の推移)



#### 触診：

基礎食群ならびにARA0.50%添加食群では13週齢から、ARA0.13%添加食群では14週齢から、ARA0.50%添加食群では16週齢から、乳腺腫瘍発生が観察された(図4-3)。21週齢時での発生頻度は、基礎食群で71%、ARA0.13%添加食群で75%、ARA0.50%添加食群で83%、ARA 2.01%添加食群で82%であり、群間に差はみられなかった。

(図4-3：触診で触知された乳腺腫瘍塊)



乳腺の肉眼的観察・乳腺腫瘍塊の重量測定：

剖検時に乳腺腫瘍が観察された頻度は、基礎食群で15 / 21例(71%、腫瘍数33個)、ARA0.13%添加食群で18 / 24例(75%、腫瘍数33個)、ARA0.50%添加食群で20 / 24例(83%、腫瘍数53個)、ARA2.01%添加食群で14 / 17例(82%、腫瘍数32個)であり、1匹あたりの乳腺腫瘍数は、基礎食群で2.1個、ARA0.13%添加食群で1.8個、ARA0.50%添加食群で2.7個、ARA2.01%添加食群で2.3個であり、何れのパラメータも群間に有意な差はみられなかった(表4-2)。さらに、剖検時に認められた乳腺腫瘍の重量に関しては、ばらつきが大きく、群間に有意な差はみられなかった。

(表4-2：1匹あたりの乳腺腫瘍数・重量)

	Basal	Arachidonic acid		
		Low	Mid	High
Multiplicity (tumors/rat)	2.1	1.8	2.7	2.3
Tumor weight				
Average (mg)	2067	1052	1353	699
SE	5251	2612	2672	1394

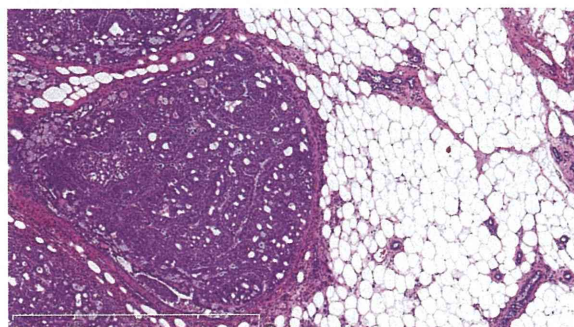
病理組織学的検査：

剖検で観察された乳腺腫瘍は、病理組織学的に乳腺腺癌であり、病理組織学的に検出された乳癌も含めた集計では、基礎食群で20 / 21例(95%、腫瘍数67個)に、ARA0.13%添加食群で21 / 24例(88%、腫瘍数78個)に、ARA0.50%添加食群で23 / 24例(96%、腫瘍数93個)に、ARA2.01%添加食群で17 / 17例(100%、腫瘍数68個)に乳腺腺癌を認めた。さらに、1匹あたりの乳腺腺癌数は、基礎食群で3.2個、ARA0.13%添加食群で3.3個、ARA0.50%添加食群で3.9個、ARA2.01%添加食群で4.0個であった。何れのパラメータも群間に有意な差はみられず(表4-3)、各群の正常乳腺および乳癌組織について、組織学的に差は認めなかった(図4-4)。さらに、乳癌組織内・周囲の炎症の程度に関しても群間に差はみとめなかった。

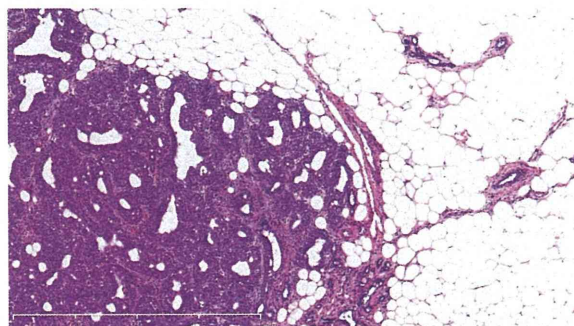
(表4-3：1匹あたりの乳腺腫瘍数・重量)

Group	Incidence	Multiplicity (tumors / rat)
Basal	20/21 (95%)	3.2 +/- 1.8
AA Low	21/24 (88%)	3.3 +/- 1.9
AA Mid	23/24 (96%)	3.9 +/- 2.2
AA High	17/17 (100%)	4.0 +/- 2.1

(図4-4：各群の乳腺腺癌の組織像)



基礎食群：左が乳癌組織、右が正常乳腺



ARA2.01%添加食群：左が乳癌組織、右が正常乳腺

**D. 結論**

ヒト乳癌細胞株(KPL-1)を用いた実験において、200μMという高濃度において、乳癌細胞の成長に対するARAによる直接作用(抑制効果)をみとめた。ただし、この高濃度は生体内では再現できないほどの非生理条件と考えられた。

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の直接作用をみたところ、何ら影響を認めなかった。一方、同じモデルを用いてARA添加食の影響をみたところ、ARA2.01%添加食では、移植乳癌の発育が促進された。この作用メカニ

ズムについては不明であるが、乳癌細胞に対する直接作用以外のメカニズムが関与している可能性があり、今後の検討課題と思われる。

雌仔ラットに母親を通じてARAを暴露させ(交配期・妊娠期・授乳期にARA添加食を摂取)、MNU誘発乳癌の発生状況について観察したところ、乳腺腫瘍発生時期・数・重量・組織型には差は認めなかった。

よって、胎児期・新生仔期のARA投与は乳癌発生には影響はみないものの、成人期暴露では乳癌の進展を促す可能性が示唆された。

以上の結果から、ARA補給が乳がん発症に及ぼす影響については、その暴露時期が重要であり、交配期から授乳期暴露は乳癌発生に影響を及ぼさないと考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記せず。

#### G. 研究発表

(学会発表)

1. 義澤克彦、佐々木 朋、木村彩子、三城弥範、木下勇一、上原範久、垺 貴司、守口 徹、螺良愛郎. アラキドン酸の妊娠期・授乳期投与によるMNU誘発ラット乳癌発生への影響. 第101回日本病理学会総会(東京)、平成24年4月(予定).
2. 佐々木 朋、義澤克彦、木村彩子、三城弥範、木下勇一、上原範久、垺 貴司、守口 徹、螺良愛郎. アラキドン酸のヒト乳癌細胞株移植動物での腫瘍増殖に対する影響. 第101回日本病理学会総会(東京)、平成24年4月(予定).

#### 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（食品の安全確保推進研究事業） 総合研究報告書

「アラキドン酸等の脂肪酸摂取がラット炎症病態やマウス眼組織形成に及ぼす影響について」

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、細胞内の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注目されている。しかし、最新の質量分析装置を用いた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。

本研究の初年度は、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、 $\omega$ 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、 $\omega$ 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で、各種脂質関連分子の変動から裏付けられた。

アラキドン酸（ARA）を過剰摂取すると、特定系統の雌性マウス胎仔において眼組織の発達異常が高頻度で発生することが報告されている。本研究の2年目では、その機構を明らかにするために、眼組織の発達異常が起こりやすい系統であるC57BL/6マウスを用いて各種脂肪酸補給食で飼育し、その胎仔の眼組織中のリン脂質分子種について質量分析装置を用いたメタボローム解析を適用した。その結果、交配2週間前から普通食にARAを4%添加した食餌で飼育したマウスの♀胎仔（E16.5）では、普通食のみや4%ドコサヘキサエン酸を添加した群に比べて、眼組織中のリゾリン脂質（リゾホスファチジルコリンとリゾホスファチジルエタノールアミン）の顕著な蓄積が認められた。一方、これは♀胎仔に特徴的な現象であり、♂胎仔ではリゾリン脂質の蓄積は見られず、眼組織形体異常が♂よりも♀で顕著であることと一致していた。以上より、ARA強化食によるマウス胎仔眼組織でのリゾリン脂質蓄積が、眼の発生や形体形成と関わっていることが示唆された。

## 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（リピドミクス）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（ARA）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。まず初年

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。

理化学研究所脳科学総合研究センターの前川らは、ARAを過剰摂取すると特定系統の雌性マウス胎仔において、ある程度の頻度で眼組織の発達異常が発生することを見出した (Maekawa *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 402: 431-437, 2010)。我々は、本研究の2年目では前川らと共同研究を行い、これらマウス胎仔の眼組織における脂質分子の変動を詳細に解析することにより、ARAの過剰摂取が雌性マウス胎仔の眼組織の発達異常に及ぼす機構について検討した。

## B. 研究方法

### B-1. 経腸栄養剤投与によるラットへの脂肪

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。

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 3 $\mu$ m 2.1  $\times$  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<sup>TM</sup>LC/MS/MS system (AB SCIEX) で行った。溶媒の送液は 200  $\mu$  l/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)

Table I. 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(18:1cis)	29.7	50.2
エライジン酸(18:1trans)	2.0	1.9
リノール酸(18:2 $\omega$ 6)	18.3	24.7
$\gamma$ -リノレン酸(18:3 $\omega$ 6)	6.0	-
$\alpha$ -リノレン酸(18:3 $\omega$ 3)	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 $\omega$ 3)	6.5	-
ドコサヘキサエン酸(22:6 $\omega$ 3)	2.7	-

(%)

### 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、 $\gamma$ -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) 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 $^{\circ}$ 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 面積で割った補正值を用い、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  $-80^{\circ}\text{C}$  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。

### B-3. 高度不飽和脂肪酸補給食を与えたマウス胎仔眼組織の脂質抽出

眼組織の発達異常が起りやすい系統である C57BL/6 マウスに対して、交配 2 週間前から、普通食、普通食に 4% ARA を強化した食餌、普通食に 4% ドコサヘキサエン酸 (DHA) を強化した食餌、あるいは 4% ARA と 4% DHA の両方を強化した食餌、以上の 4 種類の餌を投与した (Table II)。各食餌群のマウス胎仔 (E16.5, n=4) の眼組織を摘出し、Bligh and Dyer 法により総脂質を抽出した後、リン定量によりリン脂質の定量を行った。

### B-4. マウス眼組織の脂質メタボローム解析

これら総脂質画分を用いて、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 3 $\mu\text{m}$  2.1  $\times$  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 TMLC/MS/MS system (AB SCIEX) で行った。溶媒の送液は 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  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。カーテンガス 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



Table II. 食餌の脂肪酸組成

脂肪酸	食餌群 (ARA/DHA)			
	(-/-)	(+/-)	(-/+)	(+/+)
16:0    パルミチン酸	11.5	11.3	11.6	11.6
18:0    ステアリン酸	2.2	2.9	2.4	2.9
18:1 n-9    オレイン酸	28.8	26.8	28.6	26.6
18:2 n-6    リノール酸	54.7	50.3	50.4	46.1
18:3 n-3 $\alpha$ -リノレン酸	0.9	0.9	0.9	0.8
20:3 n-6    ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸	0.0	0.3	0.0	0.3
20:4 n-6    アラキドン酸 (ARA)	0.0	4.0	0.0	4.0
22:6 n-3    ドコサヘキサエン酸 (DHA)	0.0	0.0	4.0	4.0
その他	1.9	3.5	2.1	3.7
合計 (%)	100	100	100	100

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。サンプル面積を内部標準脂質のピーク面積で割った補正値を縦軸にプロットし、各リン脂質分子種プロフィールを食餌群間で比較した。

### C. 研究結果

#### 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。

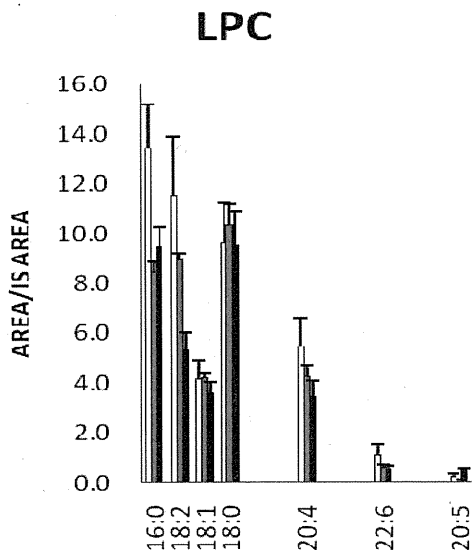
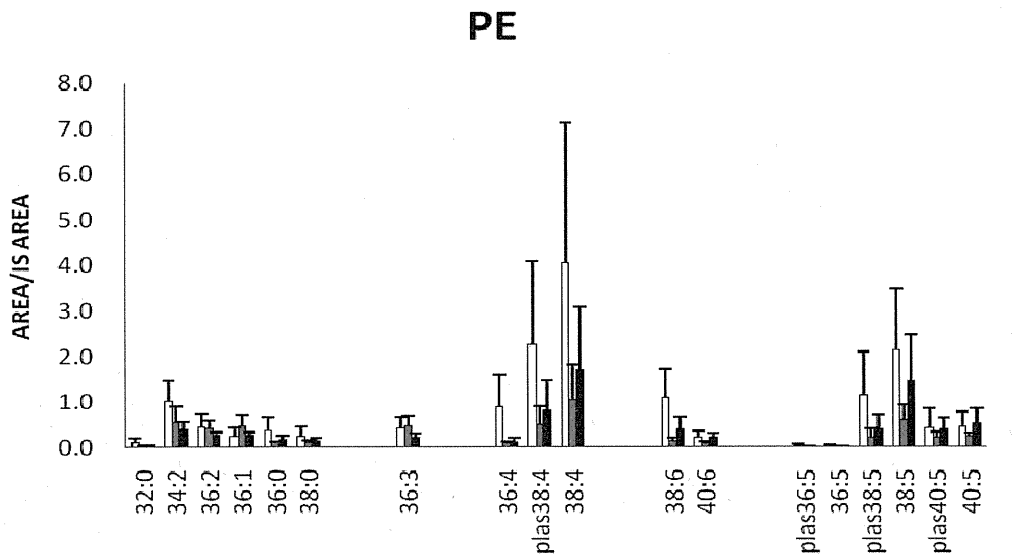
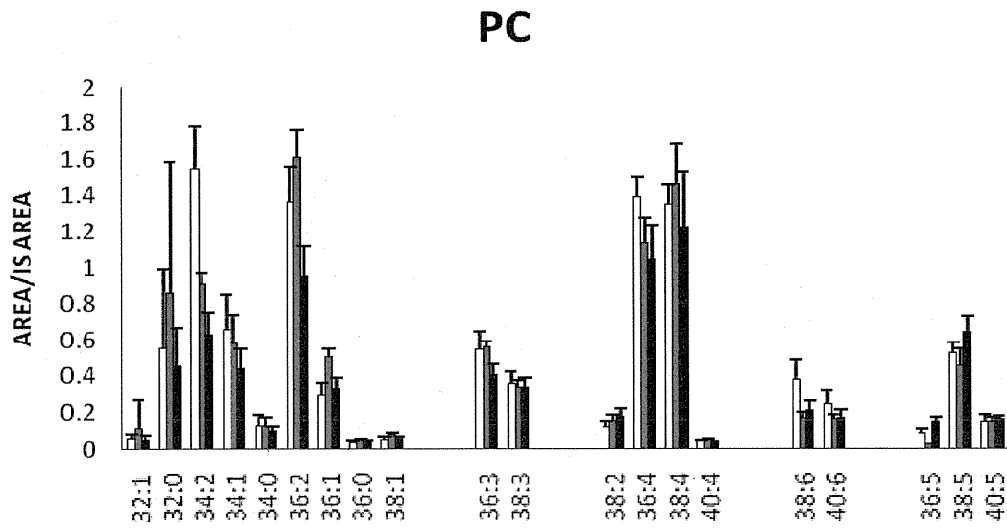


Fig 1. 質量分析装置によるラット血漿リン脂質分子種分析

(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。

plasma noEN vs. Oxepa

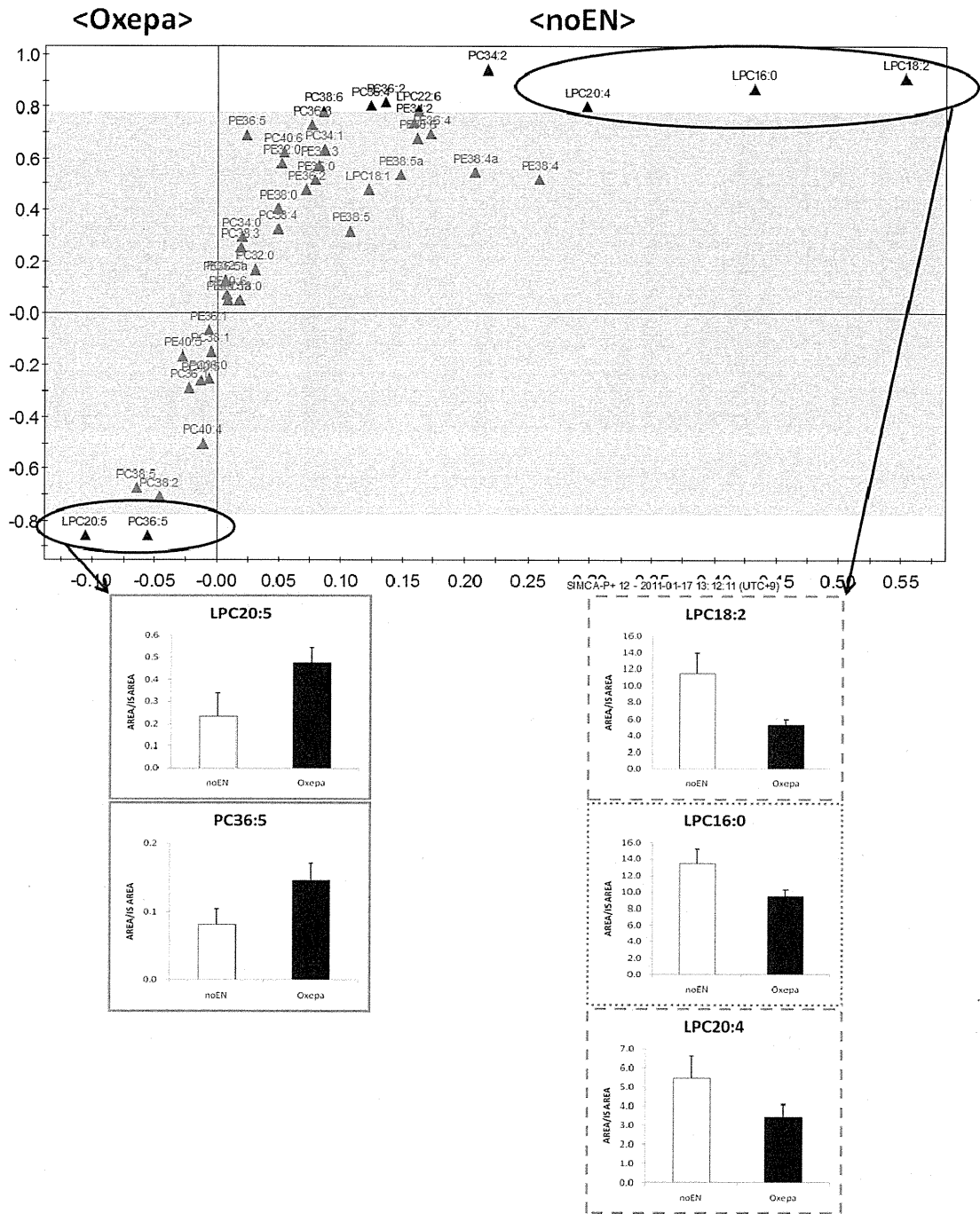


Fig. 1 質量分析装置によるラット血漿リン脂質分子種分析

(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  $|y| > 0.8$  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。±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)

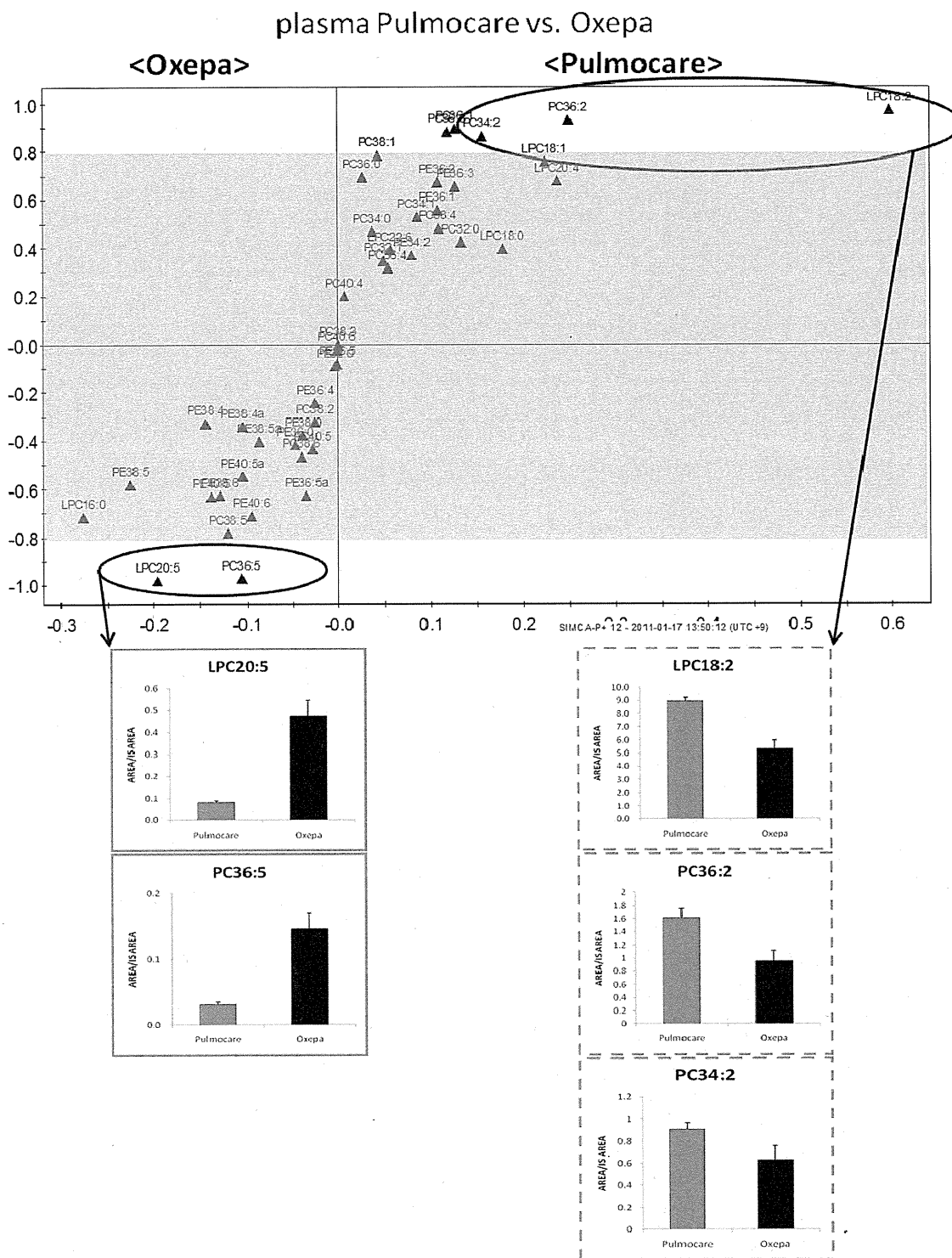


Fig. 1 質量分析装置によるラット血漿リン脂質分子種分析

(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)

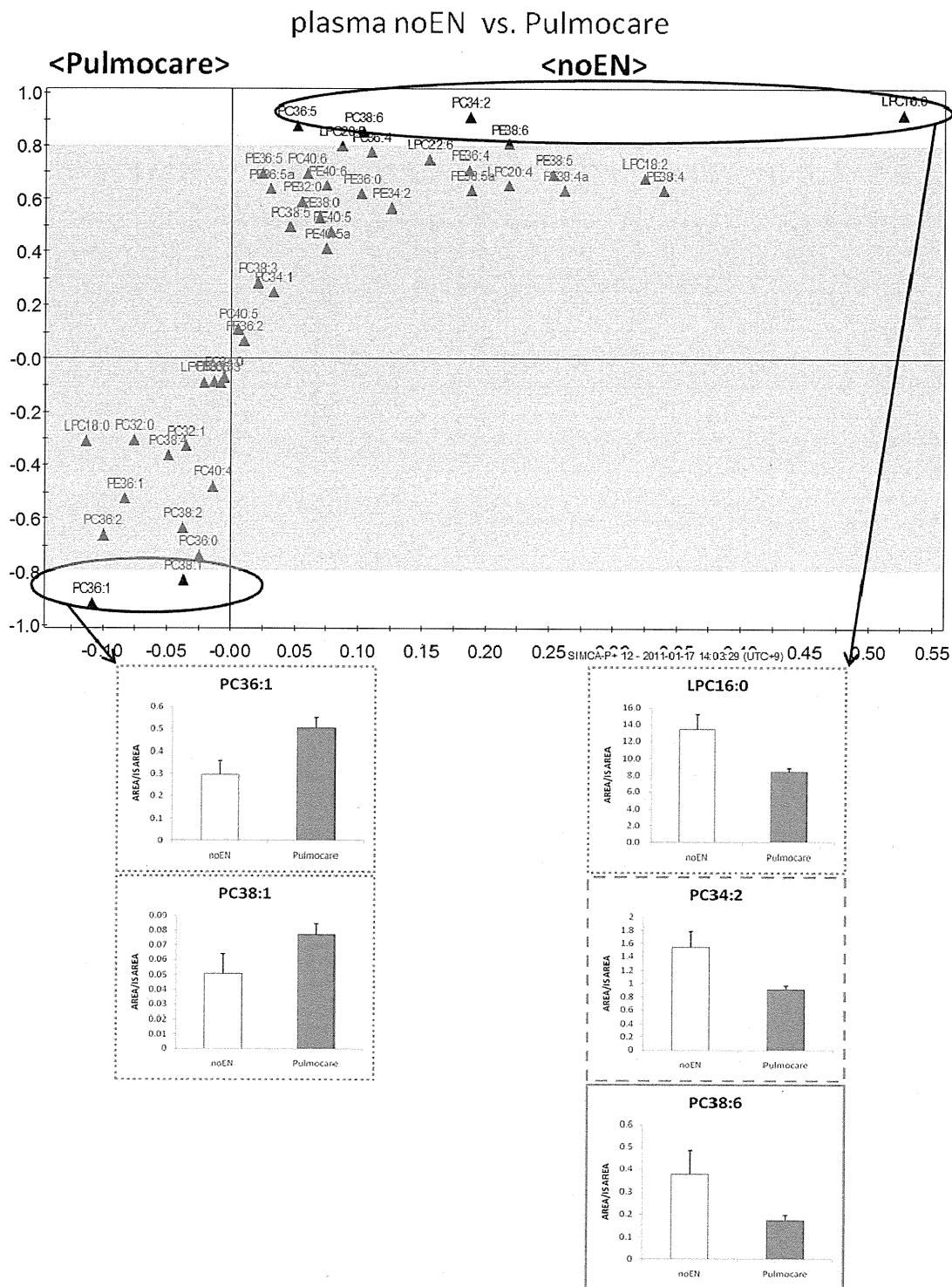


Fig. 1 質量分析装置によるラット血漿リン脂質分子種分析

(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。

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 $\omega$ 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、ARA 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。

Pulmocare vs. Oxypa

	飽和 & -価		$\omega$ 5		$\omega$ 3		$\omega$ 6 & $\omega$ 3	
	0	1	2	4	5	6	3	
plasma		PC36	LPG18 PC34 PC36		LPC20 PC36			PC36
blood cells		LPG18	LPG18	LPG20	LPC20 PC36			
intestine	LPG18 LPG18 PC32 PC34	LPG18 PC34		PEplas38	LPC20 PEplas40 PE40	PE40		
lymph node			PE38 PE34 PC34 PC38	PEplas38 PC38	LPC20 PEplas40 PC36 PE36	PE42		PE38
liver			PC36 PE34 PE36	PC38 PE38	LPC20 PC36	PE40		
lung					LPC20 PC36 PEplas36			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 Oxypa 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 Oxypa 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 ARA 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)

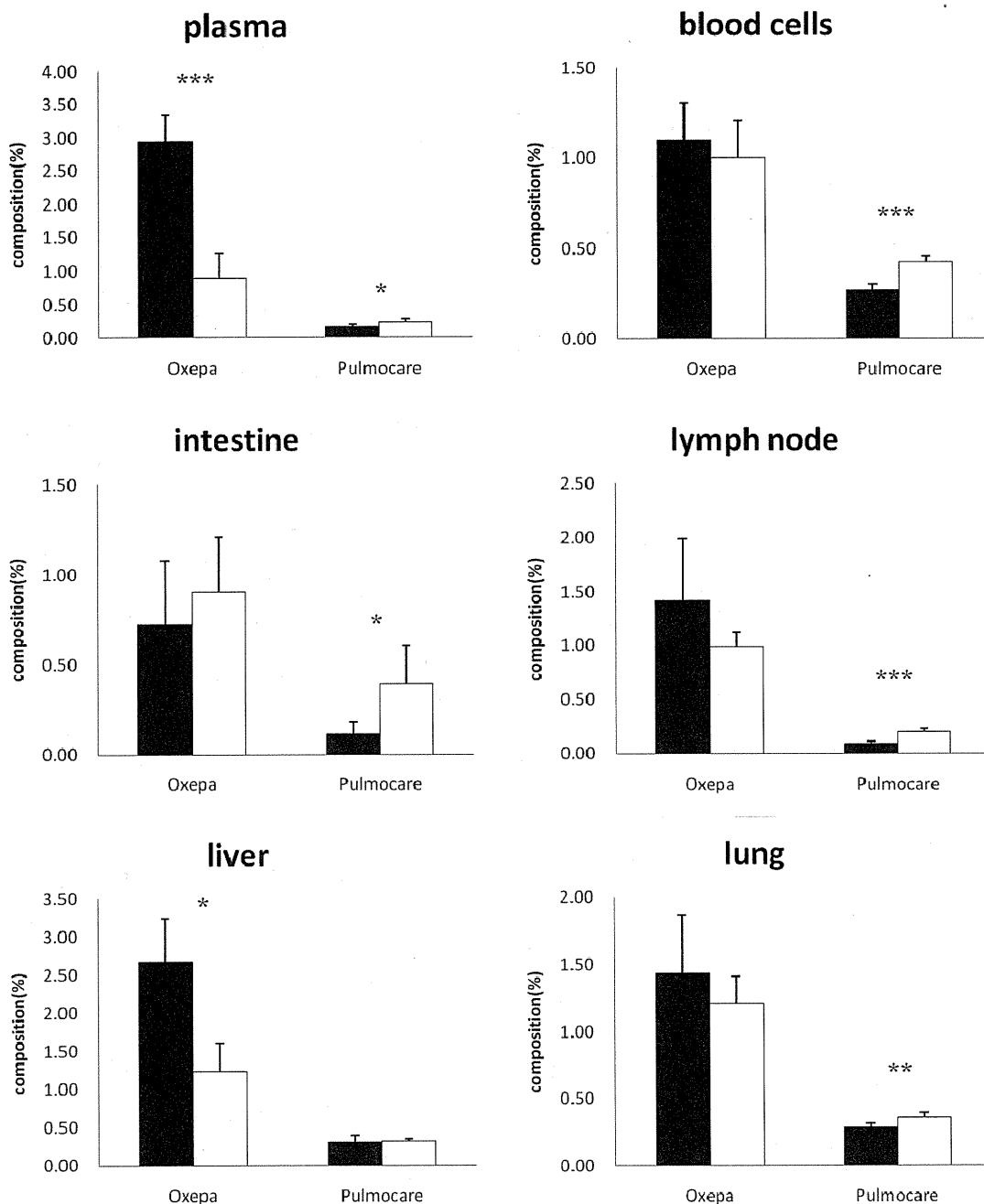


Fig. 3 腸管虚血再灌流モデルラットにおける各器官・組織リン脂質脂肪酸組成の変動

(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)

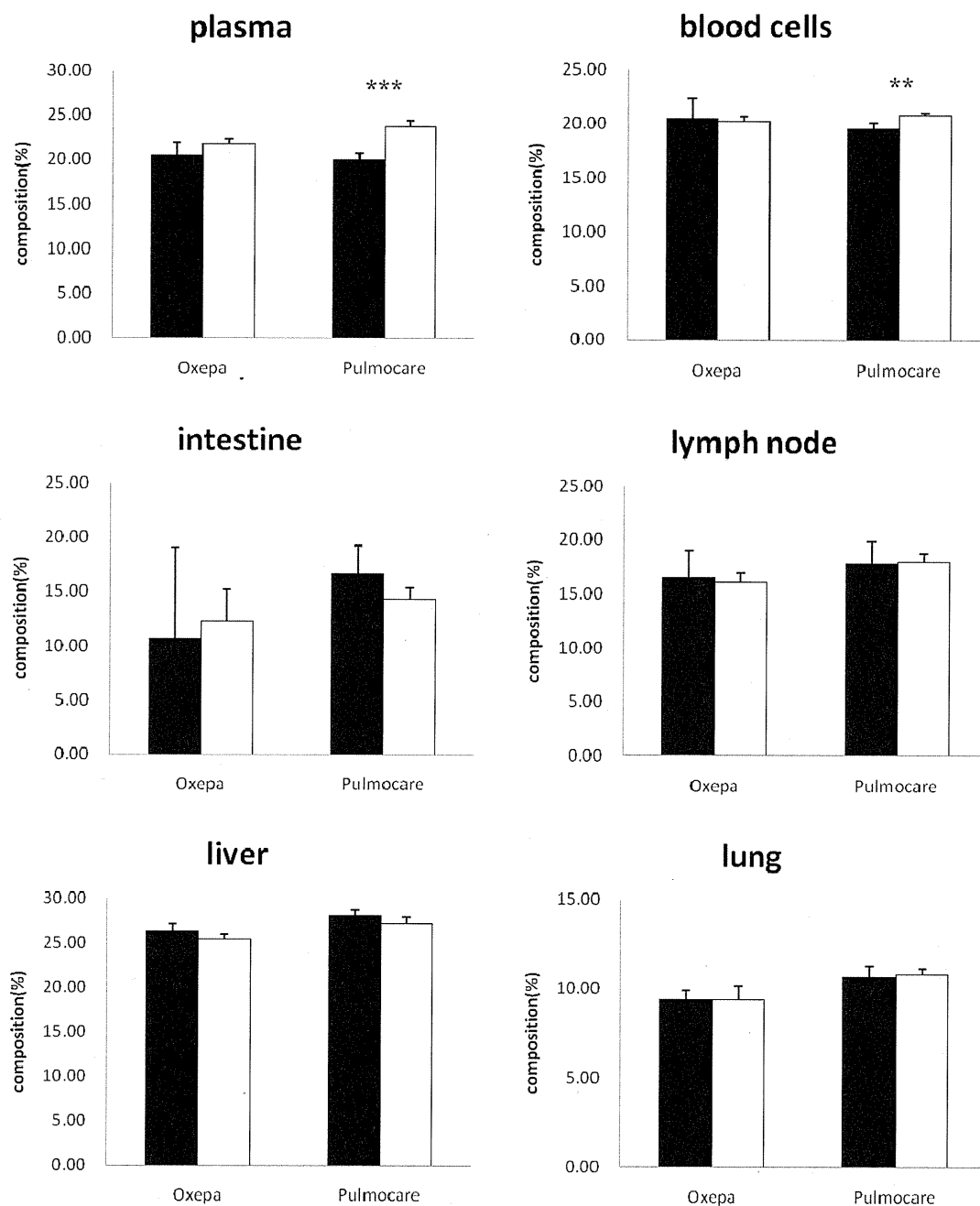


Fig. 3 腸管虚血再灌流モデルラットにおける各器官・組織リン脂質脂肪酸組成の変動

(B) 各器官・組織におけるARA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 ARA 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)

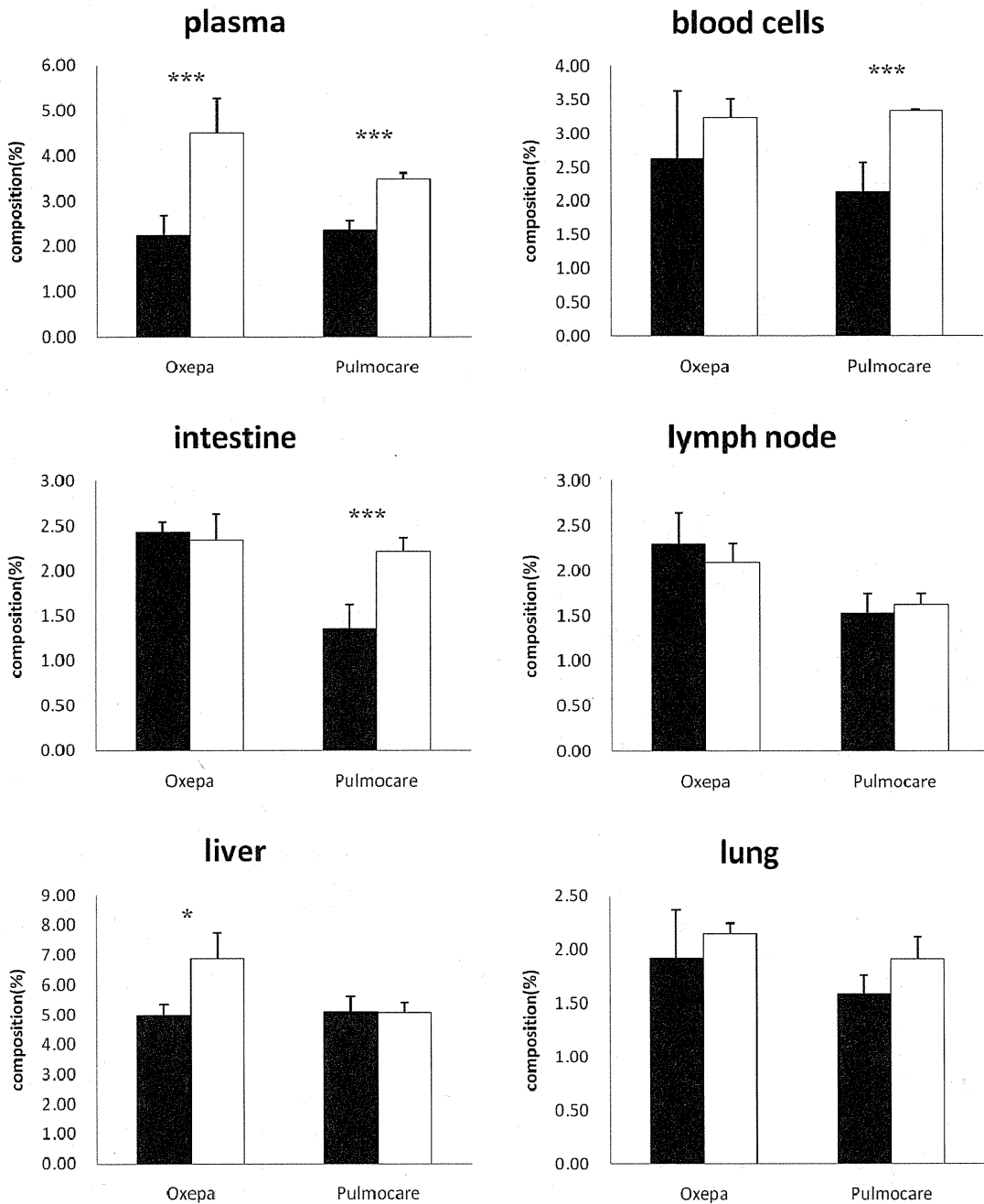


Fig. 3 腸管虚血再灌流モデルラットにおける各器官・組織リン脂質脂肪酸組成の変動

(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、ARA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、ARA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、ARA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、ARA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)

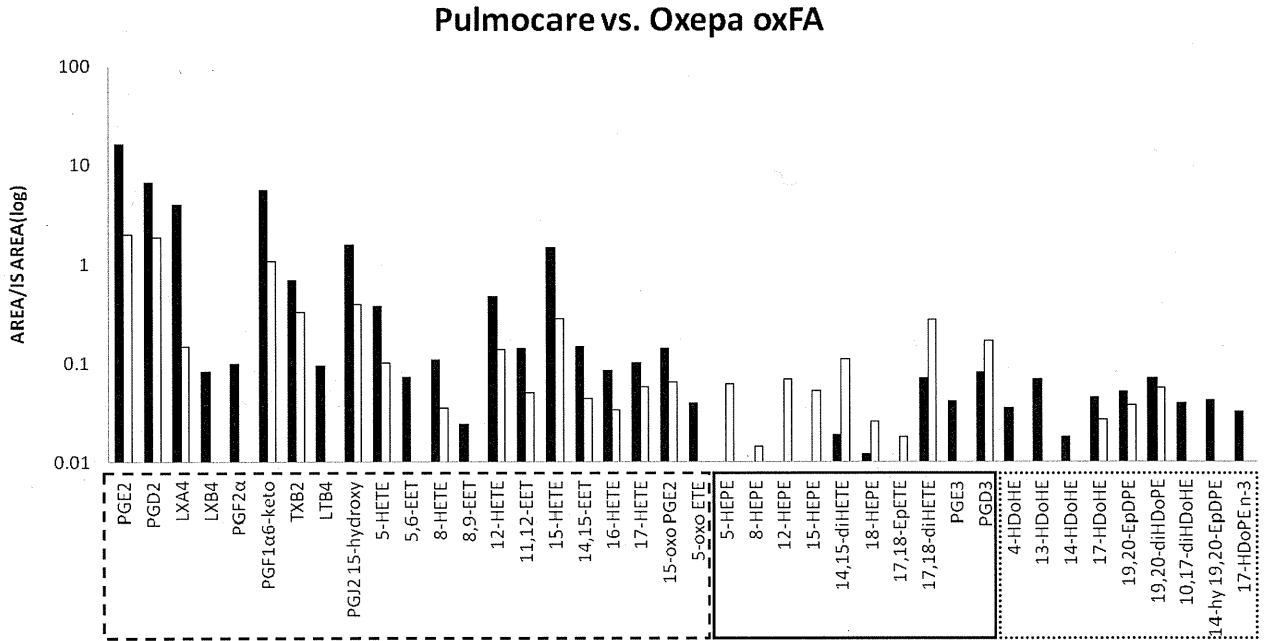


Fig. 4 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

(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 ARA 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。