

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 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。

(C)

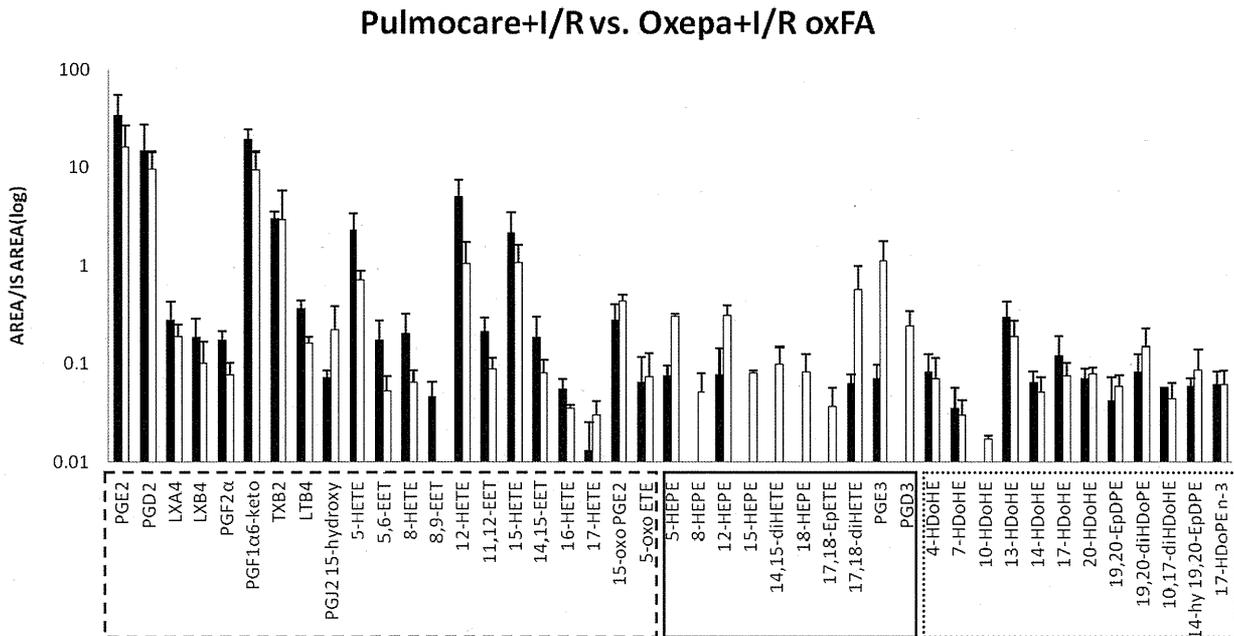


Fig. 4 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

(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(□)  $\pm$  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 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.

(D)

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

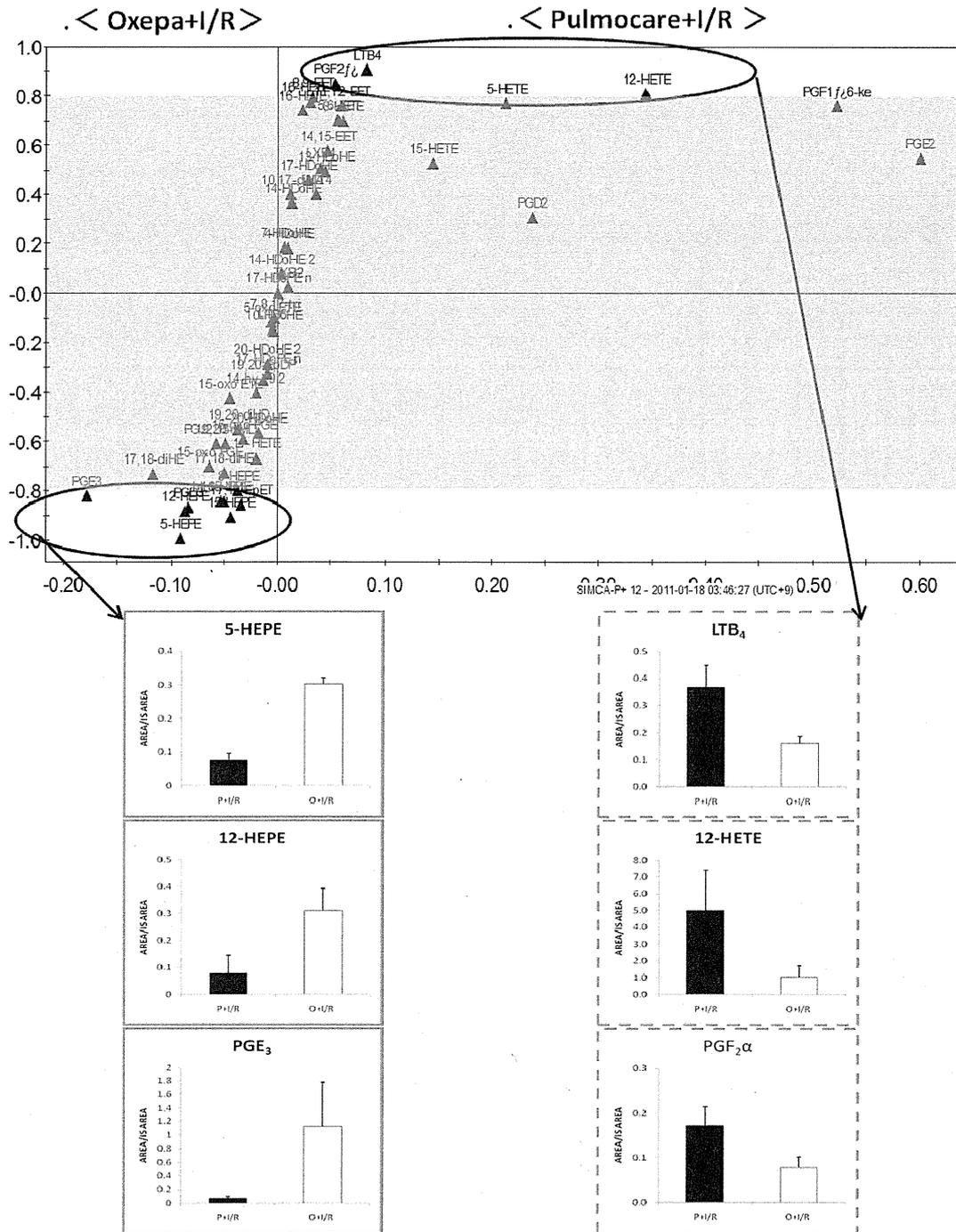


Fig. 4 腸管虚再灌流モデルラット腸管における酸化脂肪酸変動

(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。

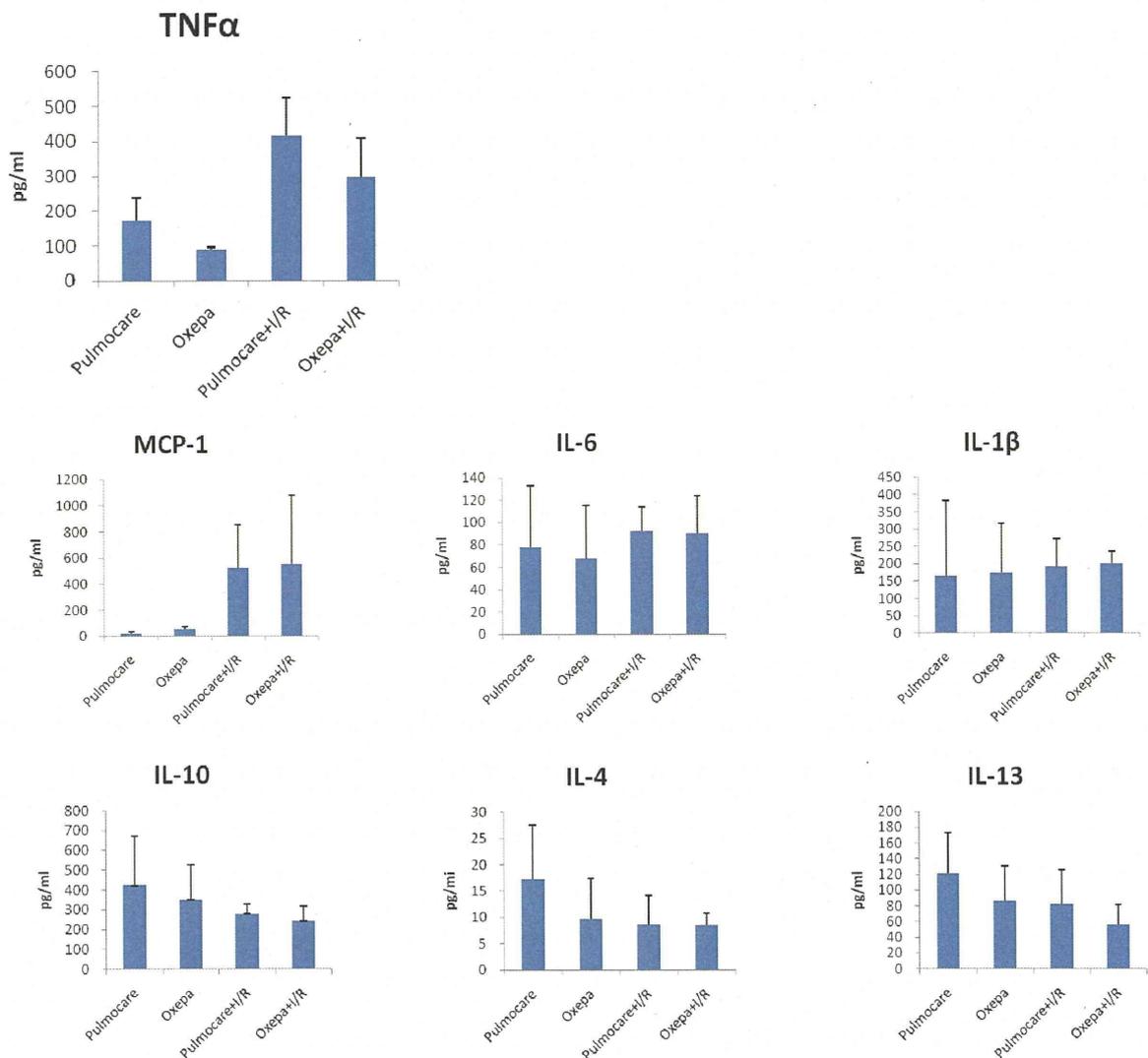


Fig. 5 腸管虚再灌流モデルラット腸管におけるサイトカイン変動

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。

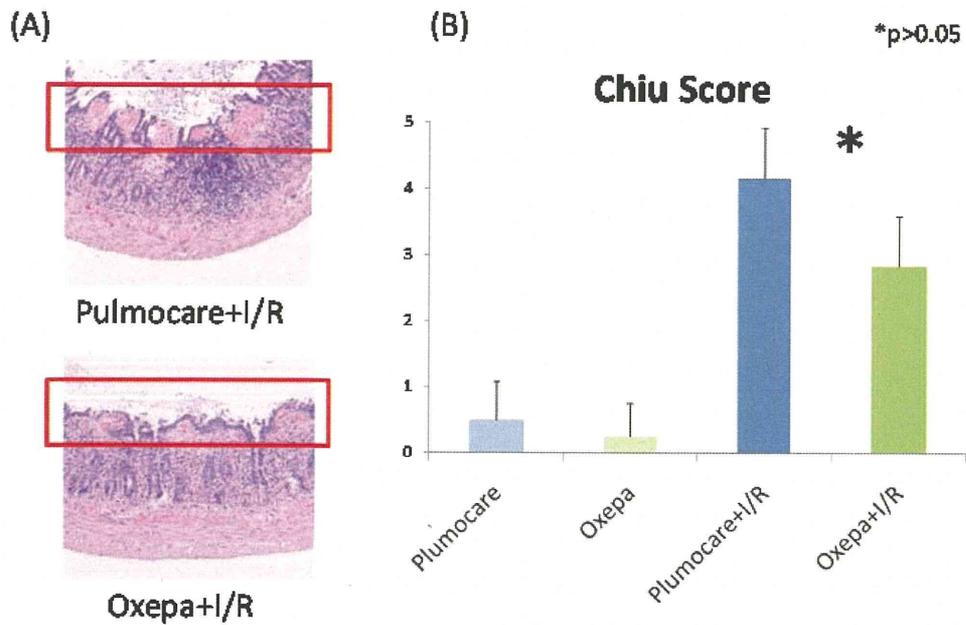


Fig. 6 腸管虚血再灌流モデルラット腸管の組織染色

(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

#### C-6. ARA 強化食を摂取したマウス胎仔の眼組織リン脂質のメタボローム解析

交配2週間前から高度不飽和脂肪酸含量の異なった4種類の食餌（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）で飼育したC57BL/6マウスから、E16.5胎仔（♀と♂、各n=4）の眼組織を摘出して総脂質を抽出した。質量分析装置を用いてリン脂質のメタボローム解析を行った結果、以下のことが明らかとなった。

眼組織でも主要なリン脂質であるホスファチジルコリンの分子種組成は、♀、♂とも各食餌群間で大きな違いは認められなかった（Fig. 7A, 7B）。このことから、普通食に4%のARAやDHAを添加しても眼組織の主要リン脂質であるホスファチジルコリンの分子種にはほとんど影響しないことが示された。

ホスファチジルコリンに次いで主要なホスファチジルエタノールアミンの分子種については、ホスファチジルコリンの場合と同様に、食餌群間での違いは見られなかった（Fig. 8A, 8B）。

ホスファチジルセリンはホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンに比べると眼組織での含量は少ないが、ARAやDHAなどの高度不飽和脂肪酸を比較的多く結合していることが知られている。Fig. 9Aに示すように、♀の胎仔ではそれぞれの補給を反映してARA補給食では普通食に比べてPS38:4やPS40:4が増加し、DHA補給食ではPS40:6が増えていた。♂においても類似の傾向が認められたが♀に比べて影響は少なかった（Fig. 9B）。

#### C-7. ARA 強化食を摂取したマウス胎仔の眼組織リゾリン脂質のメタボローム解析

リゾホスファチジルコリンの分子種については、♀のARA強化群でLPC18:1、LPC18:0、LPC16:0、およびLPC20:4の含量が約5から9

倍高かった（Fig. 10A, 10B）。しかし、♂胎仔ではそのような特徴は見られなかった。一方、DHA強化食群は、♂♀胎仔とも普通食と比べて変化がなかった。さらに、ARAとDHAの両方を添加した食餌群ではリゾホスファチジルコリンの蓄積は見られなかった。

リゾホスファチジルエタノールアミンの分子種は、リゾホスファチジルコリンの場合と同様に、♀胎仔のARA強化群でLPE18:1、LPE18:0、LPE22:6、およびLPE20:4の含量が特徴的に高かった（Fig. 11A, 11B）。一方、DHA強化食群やDHAとARAの両方を添加した食餌群では、♂♀胎仔とも普通食に比べてリゾホスファチジルエタノールアミン分子種の変化は認められなかった。

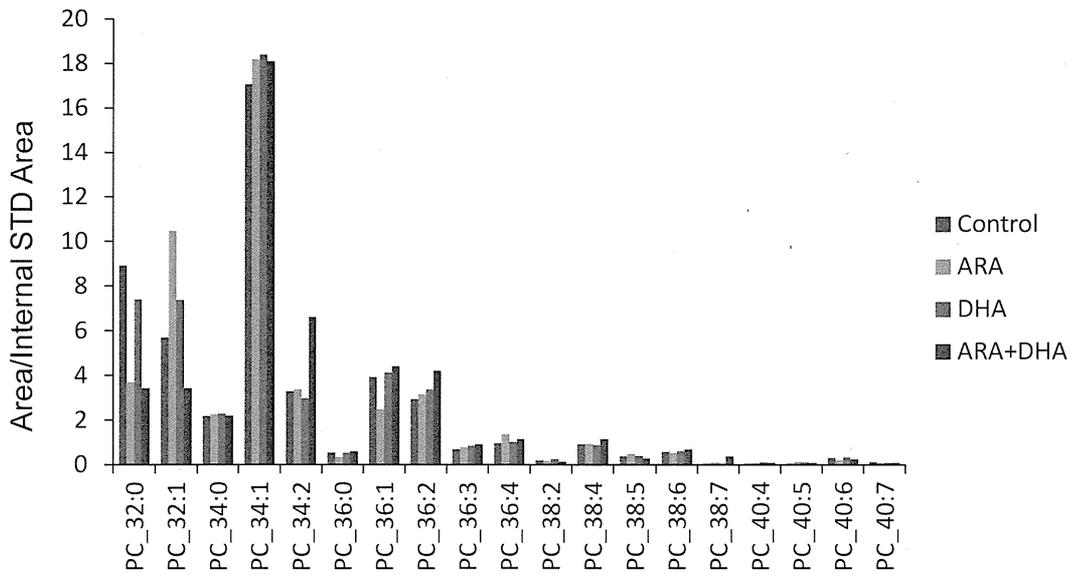


Fig. 7A 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♀)眼組織のホスファチジルコリン分子種分析

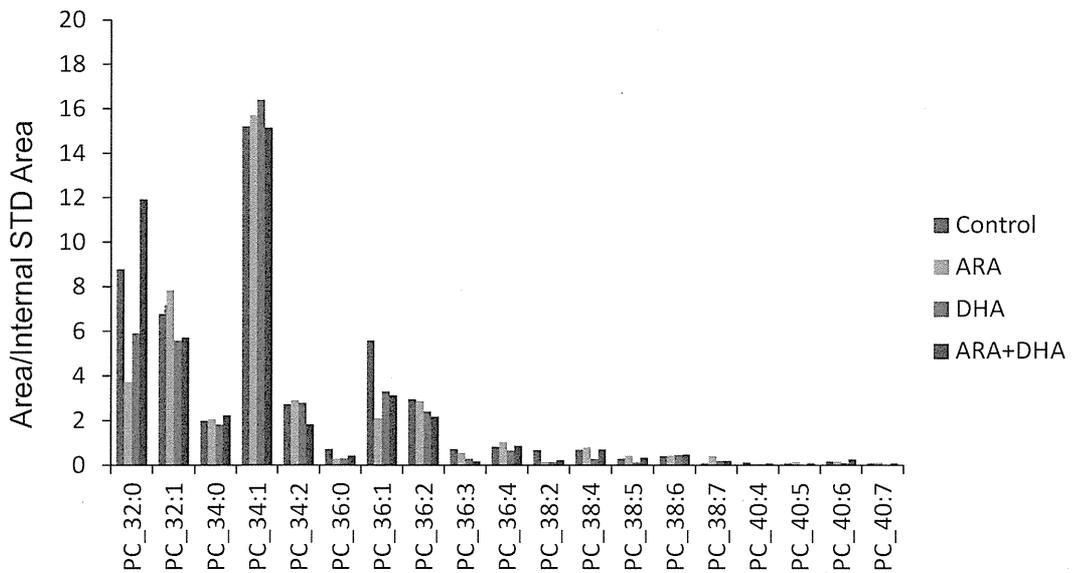


Fig. 7B 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♂)眼組織のホスファチジルコリン分子種分析

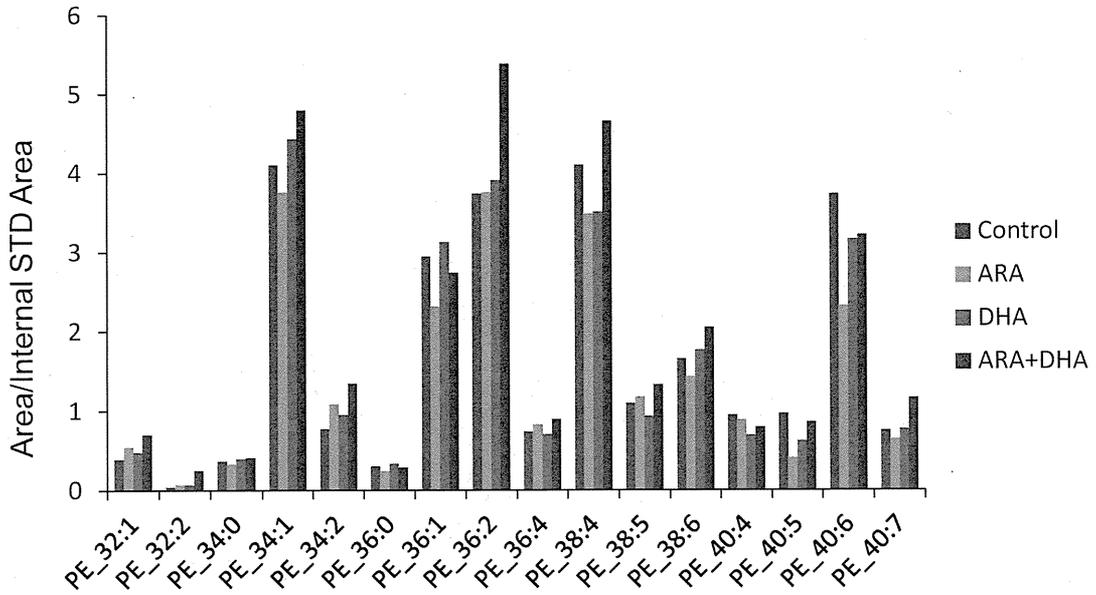


Fig. 8A 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♀)眼組織のホスファチジルエタノールアミン分子種分析

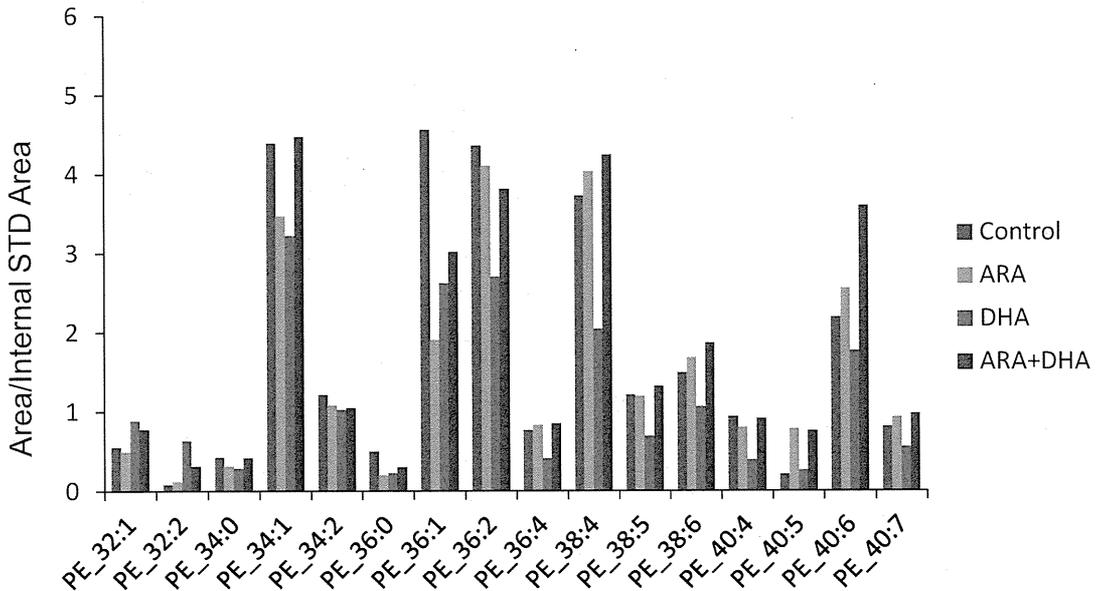


Fig. 8B 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♂)眼組織のホスファチジルエタノールアミン分子種分析

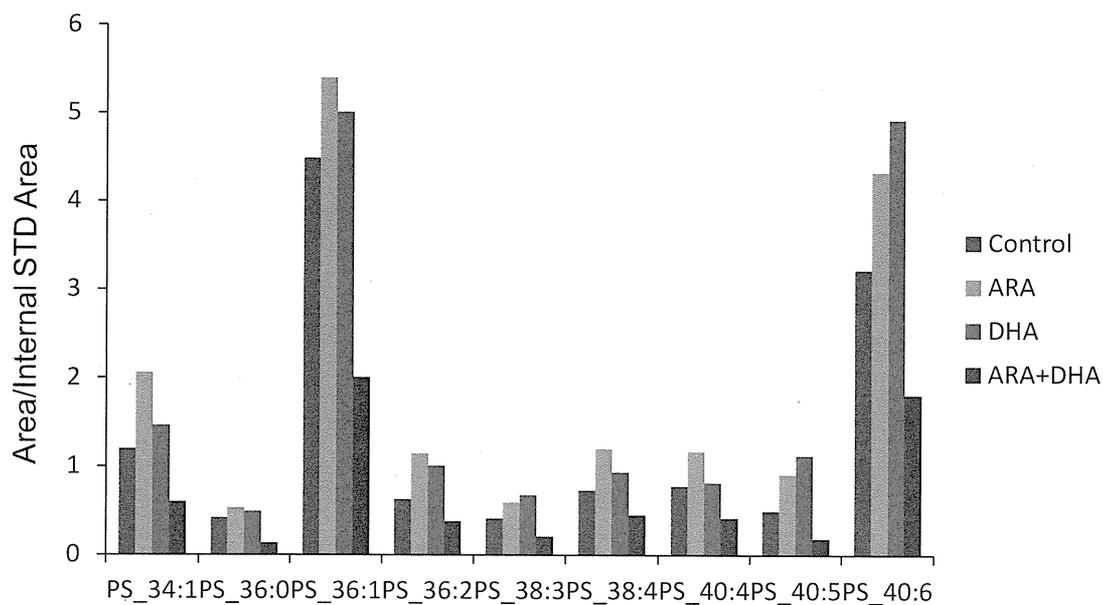


Fig. 9A 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♀)眼組織のホスファチジルセリン分子種分析

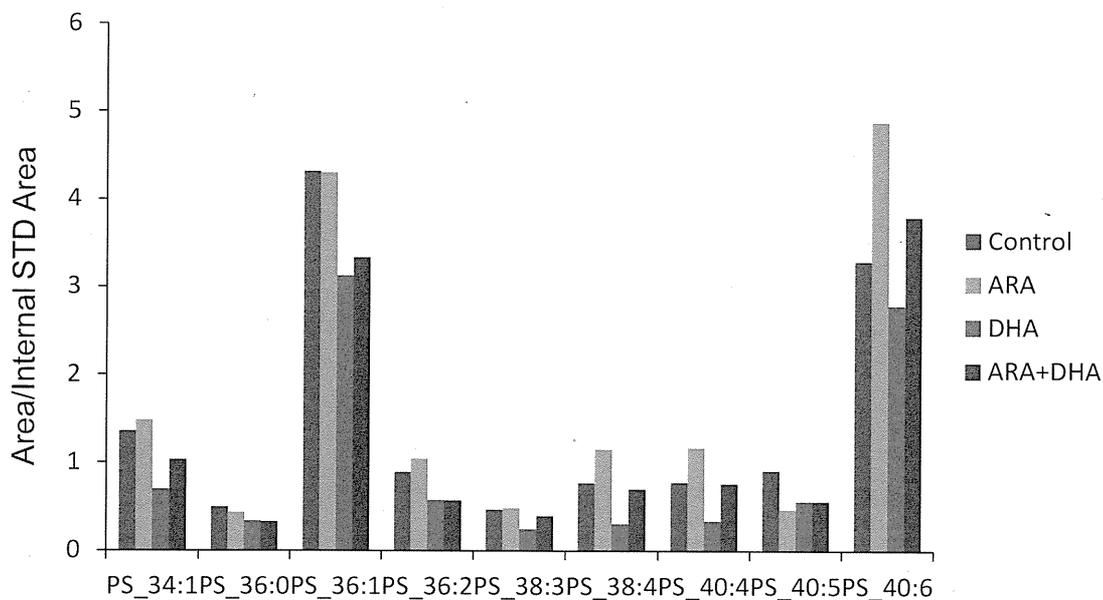


Fig. 9B 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♂)眼組織のホスファチジルセリン分子種分析

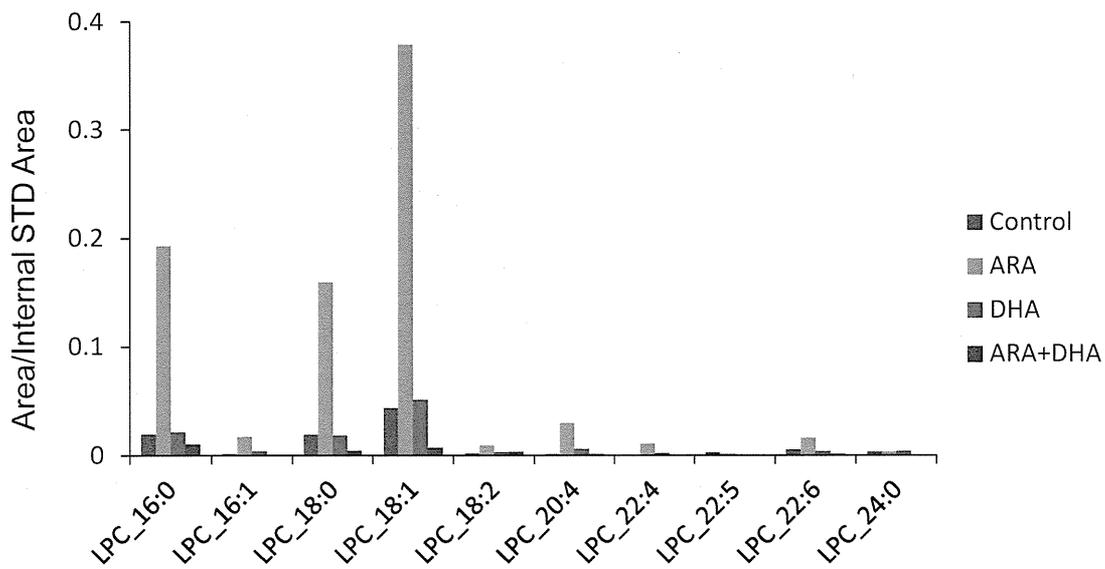


Fig. 10A 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔 (E16.5、♀) 眼組織のリゾホスファチジルコリン分子種分析

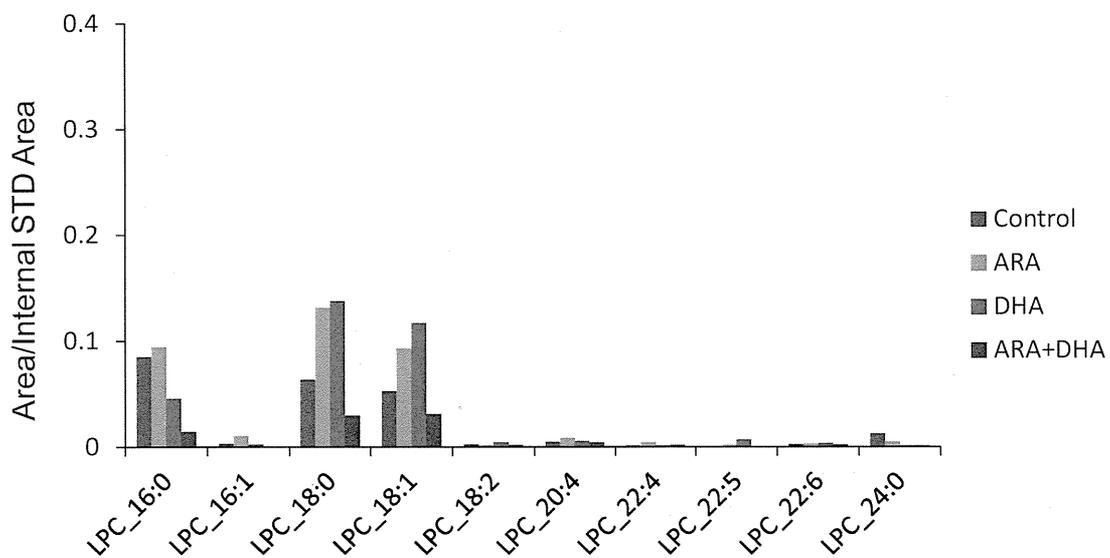


Fig. 10B 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔 (E16.5、♂) 眼組織のリゾホスファチジルコリン分子種分析

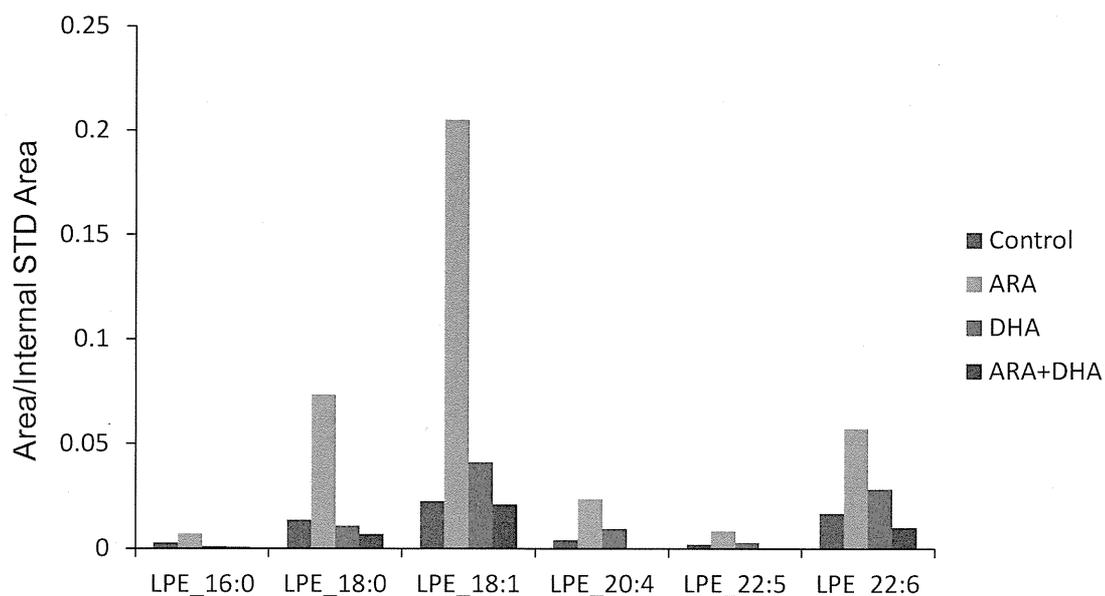


Fig. 11A 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♀)眼組織のリゾホスファチジルエタノールアミン分子種分析

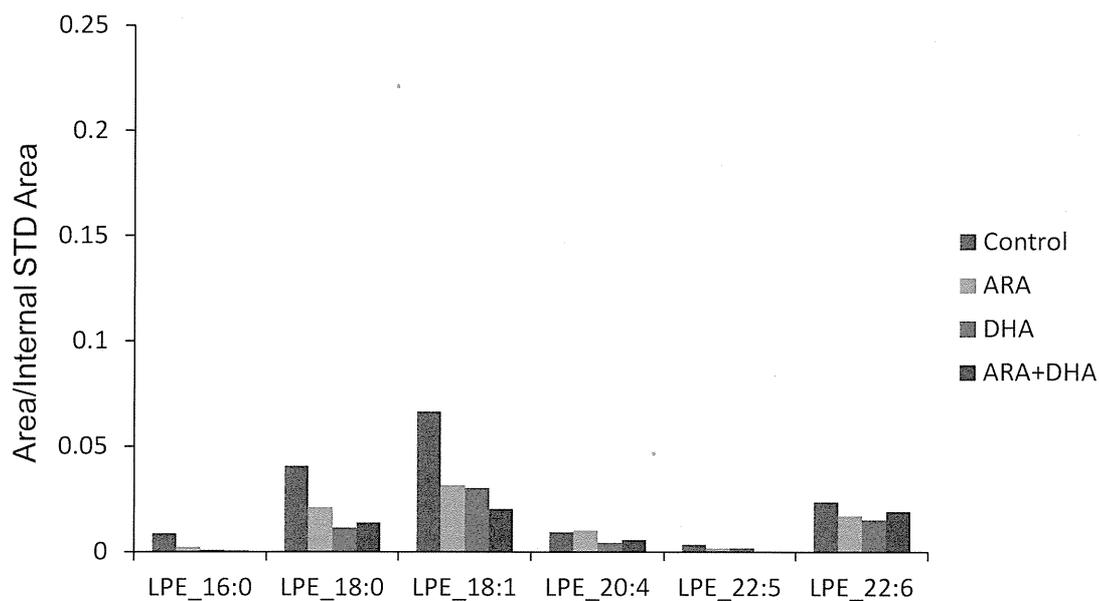


Fig.11B 食餌高度不飽和脂肪酸摂取の異なるマウス胎仔(E16.5、♂)眼組織のリゾホスファチジルエタノールアミン分子種分析

## D. 考察

### D-1. 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での脂質メタボローム解析

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。ARA・DHAに関しては横ばい、もしくは減少の傾向を示し、ARA/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。ARA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ARA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、炎症収束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系列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ARA

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。

### D-2. マウス眼組織形成へのARA補給の影響

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週間前から普通食にARAを4%添加した食餌で飼育した場合、E16.5♀胎仔の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)が高かった。♂においてはこのような違いは見られず、♀に特徴的な現象であった。ARA強化食によるC57BL/6マウスの眼組織形成異常は、♀において顕著であることが報告されており(Maekawa et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 402: 431-437, 2010)、今回の結果はたいへん興味深い。C57BL/6マウス以外の眼組織形成異常が起りにくいマウス系統との比較検討も今後行われる必要がある。

一方、DHA添加ではリゾリン脂質の蓄積はなく、さらにARAと一緒にDHAを添加することによりリゾリン脂質の蓄積が見られなくなった。したがって、DHAはARAの効果打ち消す作用を有していると考えられる。

飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸を含有したリゾリン脂質分子種が増加していることから、ARA強化食によって♀マウス胎仔の眼組織においてある種のホスホリパーゼA<sub>2</sub>が活性化されていることが考えられる。最近我々は、リゾホスファチジルコリンやリゾホスファチジルエタノールアミンが、ラットでの出血性ショック時にリンパ液中に蓄積して炎症を増悪していることを明らかにした。その際には、Ca<sup>2+</sup>-非依存的ホスホリパーゼA<sub>2</sub> $\gamma$ が関わっている。本研究テーマである眼組織形成におけるリゾリン脂質の蓄積に関しても、今後、各種ホスホリパー

ゼ A<sub>2</sub> 遺伝子の発現量や酵素タンパク質量を解析する必要がある。

一方で、眼組織の形成に関わる各種遺伝子の発現については、前川らが詳しく解析しているが、これら *Pitx3* や *Pax6* 遺伝子の発現にリゾリン脂質の蓄積がどのように関わっているかも形成異常の機構を探る上で興味深い。

本研究ではリン脂質に焦点を当てて解析したが、ARA をはじめとする遊離脂肪酸やその他の脂質を定量解析することにより、眼組織形成と ARA 強化食の関係をさらに明らかにすることができる。また、眼組織以外の組織、臓器中のリン脂質メタボローム解析もメカニズムを探る上での残された課題である。

#### E. 結論

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から、各種脂質関連分子の変動から裏付けられた。

第二年度は、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 週間前から普通食に ARA を 4% 添加した食餌で飼育し、眼組織の脂質分子種について脂質メタボローム解析を行った。その結果、E16.5 胎仔の眼組織中においてリゾリン脂質（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）の蓄積が認められた。♂ではリゾリン脂質の蓄積は見られず、♀に特徴的な現象であり、眼組織の形体異常が♂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。

#### F. 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 A<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.
- F) 佐藤 格夫、遠藤 奈保子、鈴木 崇生、朝倉隆之、朱 然、西山 慶、大鶴 繁、加藤 源太、趙 晃濟、小林 哲幸、小池 薫：EPA,  $\gamma$ -リノレン酸を強化した栄養剤投与による侵襲下での脂肪酸代謝動態の影響。日本外科代謝栄養学会第 48 回学術集会（名古屋国際会議場）、2011.7.7-8
- G) 三上さおり、森下幸治、横山友里、小林哲幸、大友康裕：ヒト好中球の生理活性の発現にカルシウム非依存的ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> が関与する。第 26 回日本 Shock 学会総会（アクトシティ浜松コンgresセンター）、平成 23 年 5 月 20-21 日
- H) 横山友里、三上さおり、森下幸治、相星惇一、大友康裕、小林哲幸：ラット出血性ショックにおけるカルシウム非依存性ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の関与。第 84 回日本生化学会大会（国立京都国際会館）、平成 23 年 9 月 21 - 24 日
- I) 下華奈子、武富芳隆、三木寿美、小島卓巳、小林哲幸、山本圭、村上誠：アトピー性皮膚炎モデルにおける分泌性ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 分子群の機能解析。第 84 回日本生化学会大会（国立京都国際会館）、平成 23 年 9 月 21 - 24 日

# 厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進事業） 総合研究報告書

「発癌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）食品薬品安全センター 秦野研究所副所長

## 研究要旨

アラキドン酸（ARA）の発癌プロモーション効果を評価する目的で中期多臓器発癌試験による発癌性評価実験を実施した。F344 雄ラット 100 匹を 1 群 20 匹の 5 群に分け、4 群は多臓器発癌イニシエーション（Init）処置のため *N*-diethylnitrosamine (100 mg/kg, i.p.)、*N*-methyl-*N*-nitrosourea (20 mg/kg, i.p.) を第 1、2 週に 4 回、1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (40mg/kg, i.s.c) を第 3、4 週に 4 回、第 1、2 週に飲水に混じた *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (0.05%) を、Dihydroxy-di-*N*-propylnitrosamine は 0.1% 濃度で飲水に混じて第 3、4 週に投与し、ARA 摂取量が 0、60、250 および 1000 mg/kg 体重となるように ARA 含有油を混じた粉末飼料を、Init 無処置群には媒体を投与し、高用量 ARA 混餌飼料を第 6 から 24 週間自由摂取させた。投与期間中は定期的に一般状態観察、体重および摂餌量を測定し、投与期間終了後、血液学的検査、剖検、器官重量測定および組織学的検査を実施した。1 日当り ARA 摂取量は低、中、高用量群でそれぞれ 70、292、1183 mg/kg 体重、Init 無処置群では 1060 mg/kg 体重であった。Init 処置した対照群と各 ARA 投与群間では一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査結果、生存率、担癌動物発生率に差はなかったが、器官別腫瘍発生率では膀胱の乳頭腫が対照、低、中、高用量群でそれぞれ 1、3、5、7 例と高用量群で有意に発生頻度 ( $p < 0.05$ ) が高く、投与用量に応じて増加傾向もみられた ( $p < 0.01$ )。以上の結果から、本実験下において、ARA は膀胱粘膜における乳頭腫発生を促進させる作用を有することが明らかになった。

## A. 研究目的

アラキドン酸（ARA）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* 評価系において変異原性がな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、ARA 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（F344/DuCrIjCrlj、日本チャールス・リバー）100 匹を 1 群 20 匹

の 5 群に分け、このうち 4 群には ARA 投与に先立ち、以下の 5 種類のイニシエータを投与した。イニシエーション（Init）処置は *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 回皮下投与した。また、*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine を 0.05% 濃度で飲料水に混じて第 1 および 2 週に、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 (Figure 1)。Init 処置期間中は摂水量を測定した (Table 2)。Init 処置後1週間から対照、低用量、中用量、高用量の4群に、ARA 投与量が0、60、250 および 1000 mg/kg 体重、公比4となるように、ARA 油 (Lot No.10050701、CABIO、中国) を0、3.2、13.4 および 53.8 g/kg の濃度で混ぜた CE-2 粉末飼料 (日本クレア) を各群に実験第6週から第29週までの24週間自由摂取させた。Init 無処置群20匹には Init 処置に用いた媒体を投与したのち、高用量群と同じ ARA 油濃度 53.8 g/kg の飼料を与えた。各群の飼料中の総油脂量は混合油 (2.5% ラード、1.25% カノーラ油、1.25% 大豆油) で同一となるように調整した。なお、ARA 油は 434.3 mg/g の ARA を含有していた。

ARA 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。24週間の投与終了後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部後大静脈より採血して血液学的検査 (赤血球数、ヘマトクリット値、血色素量、網状赤血球比率、MCV、MCH、MCHC、白血球数、白血球分類、血小板数: XT-2000iV、シスメックス) を実施した。その後、全例を剖検し、器官重量 (脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体、前立腺、顎下腺、下垂体、甲状腺、副腎) を測定し、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した。

対照群に対する各被験物質投与群の有意差検定は以下の方法で行った。生存時間は Log-rank 検定、腫瘍発生率は Fisher's exact probability test (片側、有意水準 1%、5%)、腫瘍発生の用量依存性については Cochran-Armitage 検定を実施した。体重、摂餌量、摂水量、血液学検査および器官重量は群毎に平均値、標準偏差を算出し、Bartlett の方法に

より分散の一様性について検定を行った。分散が一様であった場合は一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められる場合は、Dunnett 法により多重比較を行った。一方、分散が一様でなかった場合は Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意性が認められた場合は、Dunnett 型の検定法で多重比較を行った。

(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

### 生存率 (Figure 2) および一般状態

ARA 投与期間中、Init 処置した対照、低、中および高用量群で、それぞれ4、3、8および5例の死亡および瀕死屠殺例がみられた。最初の死亡例は投与第86日の高用量群の1例であり、投与第10週から立毛、被毛の汚れおよび削瘦が認められた。その他の Init 処置対照、低、中用量群では、それぞれ投与第17、23および15週以降に死亡あるいは切迫屠殺動物が認められた。投与期間終了時の Init 処置対照、低、中、高用量群の生存率はそれぞれ80、85、60および75%であったが、対照群との間に生存率の差はなかった。

一般状態の変化として、貧血は Init 処置対照、低および高用量群でも、それぞれ投与第17、22および23週以降に認められ、投与期間中、Init 処置各群で、それぞれ3、1、4および2例で観察された。また、Init 処置群では、赤色尿がそれぞれ投与第17、18、11および14週以降に4、6、6および11例で観察された。赤色便あるいは黒色便がそれぞれ投与第21、17、14および15週以降に4、2、4および6例で認

められた。軟便あるいは下痢便がそれぞれ投与第 23、17、13 および 15 週以降に 4、1、4 および 3 例で観察された。その他、腹部の膨隆が対照および低用量群の各 1 例に、頭部の浮腫が低、中、高用量群各 1 例、後肢麻痺が対照、中、高用量群の各 1 例で観察された。さらに、Init 処置群では触診により腫瘤が確認され、それぞれ投与第 16、18、16 および 14 週以降に腫瘤が観察された。

Init 無処置群では一般状態の変化は認められなかった。

#### 体重 (Table 1-1 ~ 1-2, Figure 3)

Init 処置群では、観察期間を通じて対照と ARA 投与各群の間に有意な体重の差はみられなかった。Init 無処置群の体重は Init 処置対照群と比較して有意に高かった。

#### 摂餌量 (Table 2-1 ~ 2-2, Figure 4)

Init 処置群では、投与第 1 日に高用量群で対照群に比較して有意な摂餌量減少が観察されたが、以後、投与終了時まで有意な摂餌量の差はみられなかった。観察第 29 日以降、Init 無処置群の摂餌量は Init 処置対照群と比較して有意に高かった。

#### ARA 摂取量 (Table 4-1 ~ 4-2)

体重および摂餌量から算出された Init 処置群の ARA 摂取量は、投与第 1 あるいは第 8 日に最大摂取量を示したのち漸減し、低用量群では第 162 日、中用量群では第 106 日、高用量群では第 148 日に最小摂取量となった。1 日平均 ARA 摂取量は、低用量群が 70.2 mg/kg、中用量群が 291.9 mg/kg、高用量群では 1182.8 mg/kg、Init 無処置群では 1060.2 mg/kg となった。投与期間終了時生存例における 1 匹当たり平均総 ARA 摂取量は、低用量群では 3043.8 mg、中用量群では 12423.6 mg、高用量群では 49578.3 mg、Init 無処置群では 55640.5 mg であった。

#### 血液学的検査 (Table 5)

Init 処置対照と低、中、高用量群間では有意な差は認められなかった。Init 無処置群と Init 処置対照群を比較すると、Init 無処置対照群では赤血球数、ヘマトクリット値、血色素量、MCHC および白血球数の有意な増加、網状赤血球比率の有意な低下がみられた。

#### 器官重量 (Table 6 ~ 7)

Init 処置高用量群では対照群に比較して、心臓、肝臓および顎下腺の実重量および比体重重量の有意な増加がみられ、顎下腺の実重量の有意な増加は中用量群においても認められた。Init 無処置対照群の多くの器官では表に示したように Init 処置対照群と比較し実重量および比体重重量ともに有意差がみられた。

#### 剖検所見

Init 無処置群では全例のいずれの器官においても肉眼的に結節あるいは腫瘤性変化は認められなかった。

Init 処置群では胸水の貯留が各群の 1 ~ 3 例に、腹水の貯留が対照群、低および中用量群のそれぞれ 3 例に観察された。結節あるいは腫瘤性変化は、主として肺、甲状腺、消化管、腎臓に対照群を含む各投与群に観察された。肝臓には表面の粗造化、微小変色点が多く例に観察された。

#### 組織学所見 (Table 8 ~ 9)

投与期間中の死亡あるいは瀕死例では全例に腫瘍が認められたことから、偶発死亡例はなく全群の全例が有効例と判断された (Table 8)。

造血系組織、肺、甲状腺、腎臓、膀胱、小腸、大腸に観察された代表的腫瘍、過形成、これらの器官における腫瘍の発生頻度を、有効例数に対する腫瘍性変化発生数とその百分比、投与終了時生存例数に対するそれらの発生数および百分比として Table 9 に示した。有効例のうち、全身に何らかの腫瘍を有していた例数は、Init

処置群の全群全例であった。良性、悪性腫瘍別に Init 処置した対照群と各 ARA 投与群を比較した結果においても腫瘍発生頻度に差はなかった。さらに、投与終了時生存例で良性、悪性腫瘍別に比較した場合にも、対照群と各 ARA 投与群の間に発生頻度の差はなかった。

Init 処置動物の器官別腫瘍発生率を有効例で比較した場合、膀胱の乳頭腫が対照、低、中、高用量群でそれぞれ 1、3、5、7 例と高用量群での発生例数が対照群に比較して有意に高く ( $p < 0.05$ )、用量とともに発生頻度も増加し ( $p < 0.01$ )、投与終了時生存例における発生頻度も高用量群で有意に高かった ( $p < 0.01$ )。さらに、投与終了時生存例における腎臓移行上皮から発生した乳頭腫は、対照、低、中、高用量群でそれぞれ 0、2、2、3 例であり、投与終了時生存例で比較すると用量相関性がみられた ( $p < 0.05$ )。

肺では、中用量群で腺腫、低用量群では肺胞・細気管支上皮の過形成の発生頻度がそれぞれ対照群と比較して低下した。

甲状腺ではろ胞上皮細胞由来の腺腫の発生頻度が対照群と比較して中用量群で低下し、ろ胞上皮細胞の過形成は高用量群で発生頻度が有意に高かった。

このほか、造血系組織では胸腺から発生した悪性リンパ腫および過形成、腎臓の腎芽腫、小および大腸粘膜上皮から発生した腺腫、腺癌などの発生例数を表に示したが、いずれも対照群との間に発生頻度の差は認められなかった。肝臓には肝細胞由来腺腫が Init 処置対照群 1 例、高用量群 2 例に見られたほか、全例に多数の変異細胞巣が観察された。

また、皮膚、皮下組織、舌、ジンバル腺を含めた観察器官・組織には散発的に少数例で腫瘍発生が見られた。

Init 無処置群では腫瘍発生はなかった。

非腫瘍性病変では、Init 処置対照群と高用量群の間で発生頻度および変化の程度に有意差のみられる所見はなかった。

#### D. 考察

ARA 摂取の安全性評価として、非遺伝毒性物質の発癌プロモーション活性を比較的短期間に評価できる試験法であり、医薬品非臨床試験ガイドラインにおいても推奨されている中期多臓器発癌試験を実施した。

組織学的検索結果から、Init 処置した動物の 80 匹全例に何らかの腫瘍の発生が確認され、Init 非処置動物には腫瘍発生はなかったことから、発癌プロモーション作用を評価する試験系として適切に実施された試験と考えられる。

用量設定は、1 日当りの ARA 摂取量を 1000 mg/kg 体重を高用量とし、以下は公比 4 とし、中用量は 250 mg/kg に、低用量は 60 mg/kg を想定し混餌検体を調製したが、体重および摂餌量から算出した ARA 平均摂取量は約 70、300、1200 mg/kg と予想摂取量を上回る結果となった。Init 無処置群での ARA 摂取量は約 1060 mg/kg であった、Init 処置した対照群と ARA 投与群間では体重、摂餌量に有意差は認められなかったことから、Init 処置に関連した体重、摂餌量の低下に起因するものと考えられる。

血液学的検査で Init 無処置対照群にみられた赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、平均赤血球血色素量濃度の有意な増加は、これらの値自体は正常値範囲にあることから、逆に Init 処置対照群の赤血球系各測定値が低いことから生じた有意差と判断される。Init 無処置対照群のその他の血液学的検査結果を背景値と比較すると白血球の増加、好中球比率低下、リンパ球比率増加、血小板数低下が伺えた。器官重量についても同様で、Init 無処置対照群に観察された多くの有意差は Init 処置対照群での値が低いことを示すものと考えられる。

Init 処置で飲水投与した N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosoamine (BBN) は膀胱に癌を誘発させる化学物質として知られている。Init 処置期間中の飲水量に群間差はなかったこ

とから、BBN 摂取量にも群間差はなかったと考えられる。Init 処置対照群では乳頭腫が1例と発生数は少なかったが、前癌病変として膀胱粘膜上皮である移行上皮細胞の過形成が12例に観察されている。さらに、移行上皮の過形成は低用量群6例、中用量群3例と発生が減少、一方、乳頭腫はそれぞれ3、5例と増加した。これらの結果は、ARA 投与により過形成から乳頭腫への発癌過程が促進された可能性を示すものと考えられる。さらに、膀胱粘膜と同じく移行上皮で覆われている腎臓腎盂から発生した乳頭腫においても、対照群に発生はなく、低および中用量群2例、高用量群3例と統計学的な有意差はないが、ARA 投与用量増加とともに乳頭腫の発生が増え、移行上皮の過形成は対照群5例、低用量群4例、中用量群3例と膀胱移行上皮の過形成と同様に減少が認められた。これら膀胱および腎臓の乳頭腫、過形成の結果から、膀胱に観察された用量に関連した乳頭腫の増加は、対照群での乳頭腫の発生頻度が低いことに起因した偶発的な統計学的有意差ではなく、ARA 投与に関連した生物学的意味を反映した結果と考えられる。

今回、Init 処置群では対照を含め各 ARA 投与群に大腸腺癌の発生が見られたが、対照と ARA 投与群の間で発生頻度に差はなかった。自然発生性消化管腫瘍は、今回使用した F344 系ラットでは発生がまれなことが知られている。ARA はシクロオキシゲナーゼ (COX) によりプロスタノイドに代謝されるが、COX 阻害剤であるアスピリンを代表とする非ステロイド系抗炎症剤投与が大腸癌発生を抑制することは疫学的にも明らかにされている。さらに、ラットを用いたブチルニトロソアミン誘発膀胱腫瘍では COX-2 阻害剤投与により腫瘍発生が抑制されるという報告がある。これら COX 阻害剤の抗癌効果を考慮すると、今回 ARA 投与下に得られた膀胱腫瘍発生に用量相関性がみられたことは妥当な結果と考えられる。一方、腸管粘膜から発生した腺癌の結果は ARA 用量に関連

がみられなかったことは、消化管粘膜上皮と移行上皮という細胞の違いに起因する可能性など、少なくとも COX のみでは説明できない興味ある所見と考えられる。

#### E. 結論

中期多臓器発癌試験による ARA の発癌プロモーション作用を評価し、ARA は膀胱粘膜から発生する乳頭腫発生を促進することが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

学会発表

立花滋博、青木聡子、安藤栄里子、斉藤義明、関剛幸、古谷真美、立松憲次郎、大原直樹、永田伴子：アラキドン酸のラットにおける中期多臓器発癌試験。日本脂質栄養学会第20回大会(2011年9月2、3日、坂戸市)。

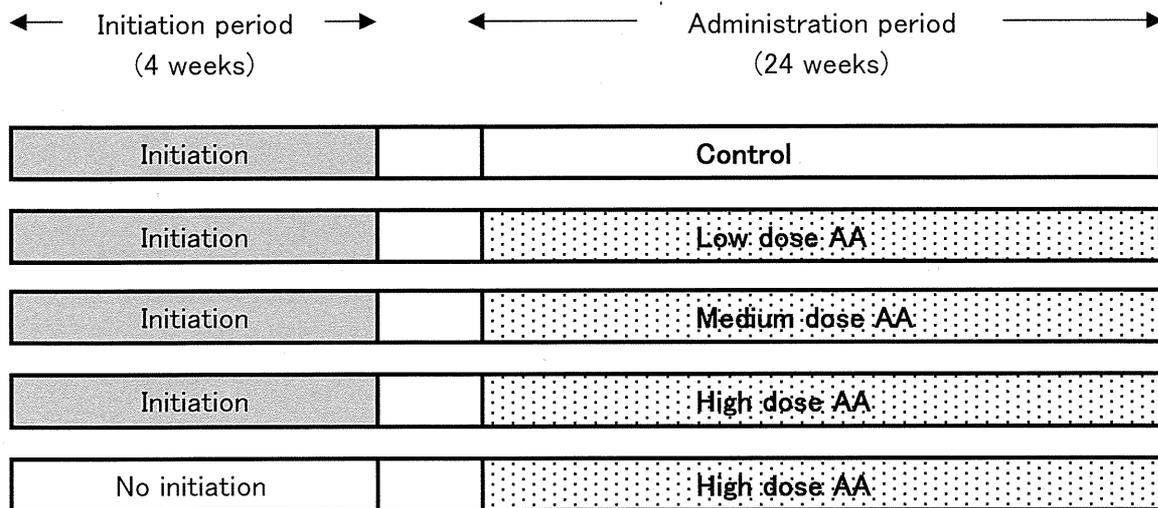


Figure 1 Experimental design of medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid in rats

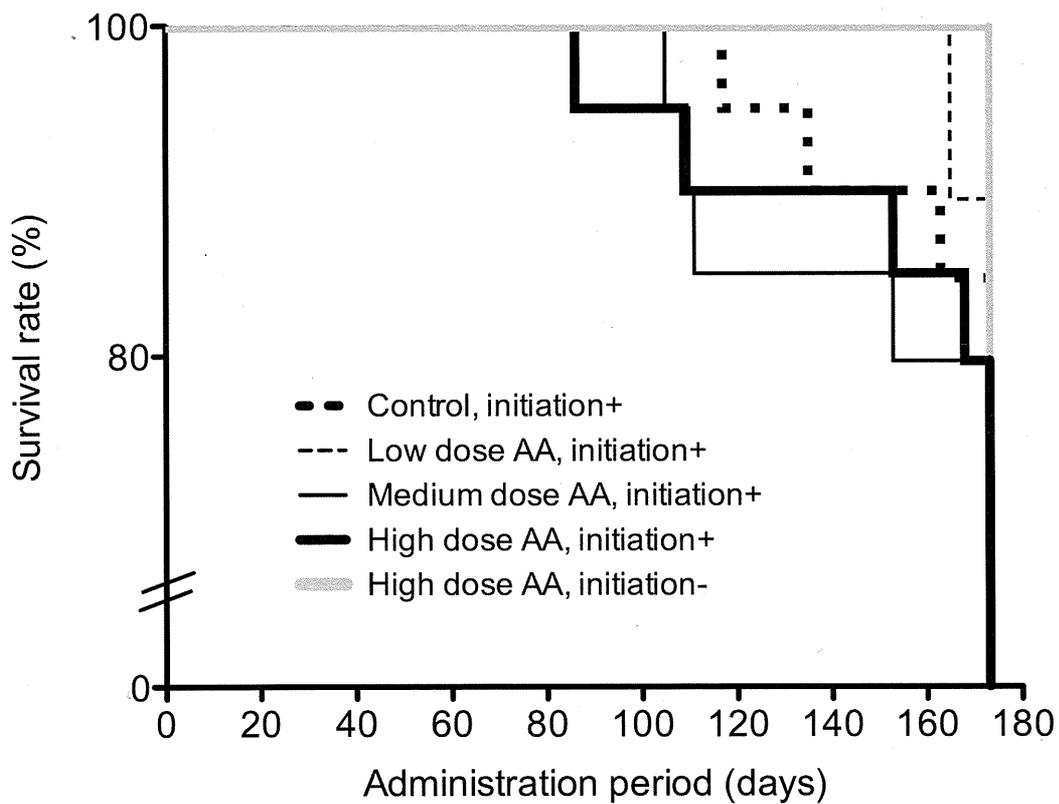


Figure 2 Survival rate of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid