

Figure 3 Body weight of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

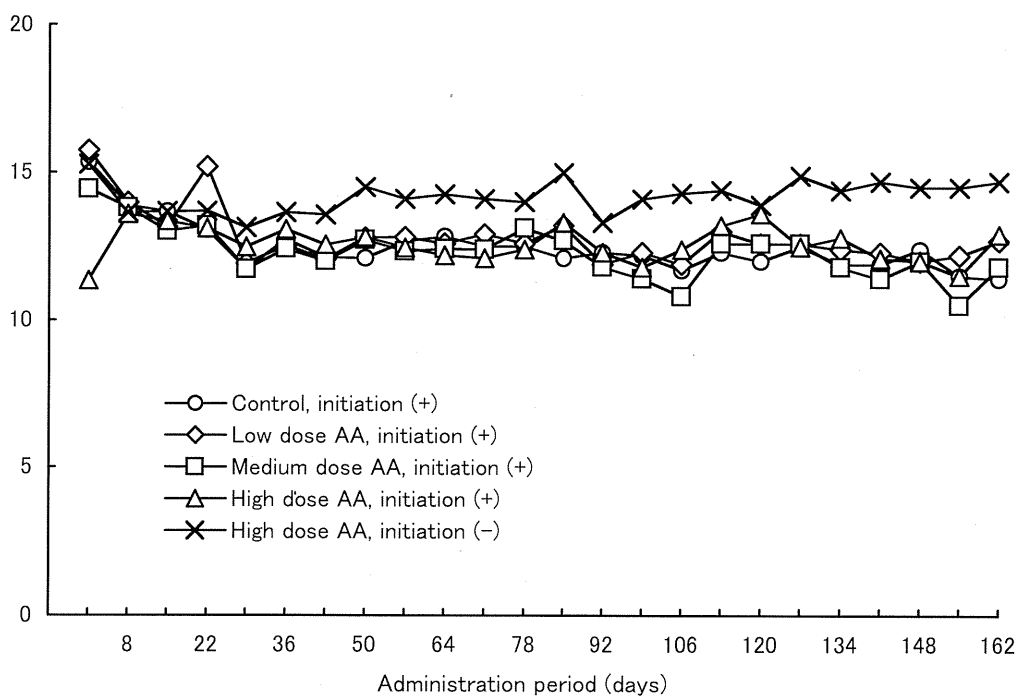


Figure 4 Food intake of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Table 1-1 Body weight (g) of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group	Initiation	Initiation period (days)									
		1	4	7	11	14	18	21	25	28	35
Control	+	116.9	118.1	126.6	138.8	148.7	150.2	146.5	147.0	145.7	157.7
		±4.1	±4.8	±5.7	±5.5	±6.1	±6.6	±7.0	±8.2	±8.3	±11.7
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)
Low	+	118.6	119.8	127.9	139.4	148.1	151.0	147.4	148.5	147.0	160.0
		±4.7	±5.3	±8.7	±7.6	±7.5	±7.5	±6.7	±8.3	±8.2	±12.6
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)
Medium	+	117.5	118.7	127.4	139.2	148.6	151.0	147.0	147.0	146.6	157.5
		±4.5	±5.2	±5.9	±6.5	±6.5	±7.4	±7.6	±9.1	±9.9	±13.7
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)
High	+	116.5	117.0	125.6	137.0	146.9	150.5	147.1	148.4	147.7	159.4
		±5.4	±5.7	±6.1	±7.1	±7.1	±7.3	±8.9	±8.9	±9.6	±14.6
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)
High	-	116.6	127.5 **	142.9 **	160.8 **	174.7 **	189.9 **	199.1 **	210.5 **	215.9 **	233.1 **
		±4.8	±4.8	±5.9	±6.8	±7.5	±8.4	±8.5	±8.9	±10.3	±9.9
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

*, significant difference from the control, p<0.05

** , significant difference from the control, p<0.01

Table 1-2 Body weight (g) of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group	Initiation	Administration period (days)								
		1	8	15	22	29	36	43	50	64
Control	+	161.2	191.4	213.3	227.2	238.2	248.6	255.1	262.8	274.6
		±12.9 (20)	±11.9 (20)	±10.2 (20)	±9.5 (20)	±10.2 (20)	±10.0 (20)	±10.6 (20)	±10.9 (20)	±12.1 (20)
Low	+	164.1	192.3	212.7	225.6	237.4	247.0	253.8	260.5	271.1
		±12.7 (20)	±12.0 (20)	±10.6 (20)	±9.5 (20)	±9.9 (20)	±9.9 (20)	±10.6 (20)	±10.7 (20)	±10.6 (20)
Medium	+	160.7	189.9	211.2	224.1	235.5	245.6	250.8	257.7	269.0
		±14.0 (20)	±12.2 (20)	±12.0 (20)	±11.8 (20)	±11.5 (20)	±11.7 (20)	±12.1 (20)	±12.0 (20)	±14.5 (20)
High	+	163.2	185.0	205.8	220.8	232.4	242.7	248.6	255.5	267.2
		±14.2 (20)	±15.0 (20)	±13.0 (20)	±11.7 (20)	±10.8 (20)	±9.7 (20)	±9.5 (20)	±8.8 (20)	±8.8 (20)
High	-	234.8 **	249.9 **	266.2 **	278.7 **	288.6 **	297.6 **	304.7 **	313.4 **	325.7 **
		±10.1 (20)	±11.3 (20)	±12.3 (20)	±12.7 (20)	±13.6 (20)	±12.6 (20)	±12.9 (20)	±12.7 (20)	±12.7 (20)

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

*, significant difference from the control, p<0.05

** , significant difference from the control, p<0.01

Table 1-3 Body weight (g) of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group	Initiation	Administration period (days)							
		78	92	106	120	134	148	162	168
Control	+	283.1	290.6	296.2	300.9	306.2	306.5	310.7	309.6
		±14.3	±14.8	±16.5	±19.3	±19.1	±22.4	±18.6	±20.2
		(20)	(20)	(20)	(19)	(18)	(18)	(16)	(16)
Low	+	279.9	288.8	293.3	300.0	308.4	311.1	311.9	318.0
		±12.0	±13.1	±15.1	±15.5	±13.3	±16.2	±20.0	±12.5
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(18)	(17)
Medium	+	280.5	286.8	291.4	297.7	300.4	299.3	310.8	317.3
		±14.9	±16.6	±18.2	±17.0	±22.0	±36.6	±26.9	±18.5
		(20)	(20)	(19)	(17)	(17)	(16)	(13)	(12)
High	+	274.1	285.3	291.4	299.0	304.2	306.4	306.9	312.6
		±16.8	±11.1	±11.9	±11.6	±13.8	±18.9	±23.7	±16.3
		(20)	(19)	(18)	(18)	(18)	(18)	(16)	(15)
High	-	335.9 **	344.7 **	352.3 **	359.5 **	367.3 **	374.8 **	378.3 **	381.6 **
		±13.4	±13.1	±13.7	±13.8	±13.8	±14.0	±14.3	±13.9
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

*, significant difference from the control, p<0.05

** , significant difference from the control, p<0.01

Table 2 Water intake (mL/day) of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group	Initiation	Initiation period (days)									
		1	4	7	11	14	18	21	25	28	
Control	+	13.6	15.1	14.7	17.7	18.4	14.6	18.8	19.6	20.6	
		±6.8	±2.2	±2.6	±2.5	±2.5	±4.9	±4.8	±4.6	±4.7	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	
Low	+	15.7	16.5	16.1	17.9	19.0	16.8	18.5	19.5	22.0	
		±4.6	±8.0	±2.8	±2.6	±4.0	±5.6	±4.7	±4.5	±4.4	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	
Medium	+	14.4	13.8	15.1	18.3	19.9	16.3	20.3	21.2	20.1	
		±3.6	±3.4	±2.3	±2.7	±2.5	±5.5	±4.6	±6.1	±3.4	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	
High	+	12.0	13.4	14.2	18.3	18.6	15.7	19.2	20.3	20.9	
		±5.0	±2.6	±2.8	±5.3	±2.3	±4.3	±3.7	±4.2	±3.8	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	
High	-	19.2 **	17.2 **	18.3 **	20.1 **	20.7 **	22.1 **	22.1 **	22.7	25.4 **	
		±9.2	±3.1	±2.6	±2.0	±1.6	±1.4	±1.8	±2.3	±3.3	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

* , significant difference from the control, p<0.05

** , significant difference from the control, p<0.01

Table 3-1 Food intake (g/day) of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group	Initiation	Administration period (days)								
		1	8	15	22	29	36	43	50	
Control	+	15.4 ±2.0 (20)	13.9 ±1.3 (20)	13.7 ±1.0 (20)	13.0 ±1.1 (20)	11.7 ±0.9 (20)	12.7 ±1.2 (20)	12.1 ±1.0 (20)	12.1 ±0.9 (20)	
Low	+	15.7 ±2.2 (20)	14.0 ±1.0 (20)	13.2 ±1.1 (20)	15.2 ±6.1 (20)	11.9 ±1.0 (20)	12.5 ±0.9 (20)	12.1 ±1.0 (20)	12.8 ±0.9 (20)	
Medium	+	14.4 ±1.5 (20)	13.8 ±1.2 (20)	13.0 ±0.8 (20)	13.2 ±1.0 (20)	11.7 ±0.9 (20)	12.4 ±1.0 (20)	12.0 ±1.2 (20)	12.7 ±1.1 (20)	
High	+	11.3 ** ±2.1 (20)	13.6 ±1.7 (20)	13.3 ±1.4 (20)	13.1 ±1.1 (20)	12.5 ±1.2 (20)	13.1 ±1.2 (20)	12.5 ±1.2 (20)	12.8 ±1.3 (20)	
High	-	15.3 ±1.8 (20)	13.6 ±1.3 (20)	13.7 ±0.9 (20)	13.7 ±0.8 (20)	13.1 ** ±1.0 (20)	13.6 * ±1.1 (20)	13.6 ** ±0.7 (20)	14.5 ** ±1.0 (20)	

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

* , significant difference from the control, p<0.05

** , significant difference from the control, p<0.01

Table 3-2 Food intake (g/day) of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group	Initiation	Administration period (days)									
		57	64	71	78	85	92	99	106		
Control	+	12.7 ±1.1 (20)	12.8 ±2.8 (20)	12.5 ±0.9 (20)	12.5 ±0.8 (20)	12.1 ±2.0 (20)	12.3 ±0.9 (20)	12.2 ±1.2 (20)	11.7 ±0.7 (20)		
Low	+	12.8 ±1.2 (20)	12.6 ±0.9 (20)	12.9 ±1.1 (20)	12.6 ±1.1 (20)	13.2 ±1.1 (20)	11.9 ±1.0 (20)	12.3 ±0.9 (20)	11.9 ±1.5 (20)		
Medium	+	12.3 ±1.1 (20)	12.4 ±1.0 (20)	12.4 ±1.5 (20)	13.1 ±1.1 (20)	12.7 ±1.4 (20)	11.8 ±1.0 (20)	11.4 ±3.0 (20)	10.8 ±3.5 (19)		
High	+	12.5 ±1.2 (20)	12.2 ±1.3 (20)	12.1 ±1.7 (20)	12.4 ±1.4 (20)	13.3 ±1.2 (19)	12.3 ±1.2 (19)	11.8 ±2.9 (19)	12.4 ±1.0 (18)		
High	-	14.1 ** ±1.2 (20)	14.3 ** ±0.8 (20)	14.1 ** ±1.1 (20)	14.0 ** ±0.9 (20)	15.0 ** ±1.0 (20)	13.3 ** ±0.9 (20)	14.1 ** ±0.9 (20)	14.3 ** ±0.9 (20)		

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

** , significant difference from the control, p<0.01

Table 4-1 Intake of arachidonic acid (mg/kg/day) in the medium term multi-organ carcinogenesis study in rats

Dose group	Initiation	Administration period (days)									
		1	8	15	22	29	36	43	50	64	
Control	+	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)
Low	+	133.2	101.2	86.0	94.1	69.8	70.4	66.2	68.3	64.6	
		±15.1	±6.5	±7.1	±40.1	±4.9	±5.2	±5.9	±5.3	±4.2	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	
Medium	+	526.9	424.8	359.3	343.0	289.9	294.6	278.8	287.7	268.6	
		±75.6	±44.1	±30.6	±25.6	±24.9	±23.2	±30.3	±25.7	±19.9	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	
High	+	1616.0	1717.2	1519.3	1390.9	1257.4	1258.8	1180.0	1171.9	1066.3	
		±224.0	±202.6	±167.5	±144.8	±149.2	±112.4	±115.5	±121.8	±120.5	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	
High	-	1519.2	1273.3	1198.5	1147.8	1063.2	1070.2	1040.4	1081.1	1023.3	
		±159.5	±98.2	±61.7	±62.4	±69.5	±81.9	±55.0	±67.0	±62.9	
		(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

Table 4-2 Intake of arachidonic acid (mg/kg/day) in the medium term multi-organ carcinogenesis study in rats

Dose group	Initiation	Administration period (days)							Total intake (mg/ animal)	Average intake (mg/kg/day)
		78	92	106	120	134	148	162		
Control	+	0.0 ±0.0 (20)	0.0 ±0.0 (20)	0.0 ±0.0 (20)	0.0 ±0.0 (19)	0.0 ±0.0 (18)	0.0 ±0.0 (18)	0.0 ±0.0 (16)	0.0 ±0.0 (16)	0.0
Low	+	62.7 ±4.6 (20)	57.0 ±4.4 (20)	56.3 ±5.3 (20)	58.3 ±5.5 (20)	56.0 ±4.6 (20)	53.5 ±4.1 (20)	53.0 ±13.8 (18)	3043.8 ±129.5 (18)	70.2
Medium	+	271.5 ±23.9 (20)	239.6 ±18.8 (20)	214.2 ±67.9 (19)	246.3 ±19.8 (17)	228.3 ±37.2 (17)	230.2 ±37.2 (16)	216.7 ±66.0 (13)	12423.6 ±725.9 (13)	291.9
High	+	1056.7 ±84.4 (20)	1003.8 ±87.2 (19)	993.4 ±73.5 (18)	1064.4 ±103.3 (18)	982.8 ±126.2 (18)	910.8 ±170.7 (18)	979.4 ±112.8 (16)	49578.3 ±3369.3 (16)	1182.8
High	-	972.8 ±75.1 (20)	903.8 ±60.2 (20)	950.0 ±64.7 (20)	903.0 ±62.7 (20)	918.2 ±76.8 (20)	905.2 ±61.7 (20)	908.4 ±69.4 (20)	55640.5 ±2158.8 (20)	1060.2

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

Table 5-1 Hematological analysis of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group	Initiation	RBC (10 ⁴ /uL)	HCT (%)	HGB (g/dL)	RET% (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
Control	+	784 ±174 (16)	37.5 ±5.6 (16)	12.5 ±2.5 (16)	8.62 ±9.21 (16)	49.1 ±7.3 (16)	16.1 ±1.3 (16)	33.0 ±2.5 (16)
Low	+	836 ±118 (17)	38.9 ±4.8 (17)	13.1 ±1.8 (17)	4.79 ±2.42 (17)	46.7 ±1.5 (17)	15.7 ±0.5 (17)	33.8 ±1.1 (17)
Medium	+	834 ±102 (12)	38.7 ±4.1 (12)	12.9 ±1.9 (12)	6.54 ±5.16 (12)	46.5 ±1.5 (12)	15.5 ±0.9 (12)	33.3 ±1.9 (12)
High	+	818 ±127 (15)	39.4 ±4.5 (15)	13.0 ±1.8 (15)	6.79 ±5.96 (15)	48.7 ±3.9 (15)	15.9 ±0.8 (15)	32.8 ±1.6 (15)
High	-	927 ** ±58 (20)	43.1 ** ±1.5 (20)	14.8 ** ±0.5 (20)	3.28 * ±0.49 (20)	46.6 ±1.7 (20)	16.0 ±0.7 (20)	34.4 ** ±1.0 (20)

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

* , significant difference from the control, p<0.05

** , significant difference from the control, p<0.01

Table 5-2 Hematological analysis of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group	Initiation	WBC (10 ² /uL)	NEUT% (%)	LYMPH% (%)	MONO% (%)	EOSI% (%)	BASO% (%)	PLT (10 ⁴ /uL)
Control	+	54.6 ±38.1 (16)	37.8 ±10.7 (15)	58.5 ±10.7 (15)	2.6 ±0.7 (16)	1.1 ±0.5 (16)	0.0 ±0.1 (16)	53.0 ±15.7 (16)
Low	+	42.2 ±12.9 (17)	32.8 ±8.0 (17)	63.5 ±7.6 (17)	2.6 ±1.2 (17)	1.1 ±0.3 (17)	0.0 ±0.2 (17)	54.4 ±7.1 (17)
Medium	+	50.2 ±26.2 (12)	38.6 ±9.9 (12)	57.5 ±10.2 (12)	2.7 ±0.9 (12)	1.2 ±0.3 (12)	0.0 ±0.1 (12)	61.0 ±19.7 (12)
High	+	44.5 ±8.9 (15)	41.1 ±10.7 (15)	55.1 ±10.9 (15)	2.7 ±1.3 (15)	1.1 ±0.5 (15)	0.0 ±0.1 (15)	55.6 ±19.1 (15)
High	-	56.5 ** ±12.2 (20)	35.6 ±7.6 (20)	60.9 ±8.3 (20)	2.3 ±0.7 (20)	1.1 ±0.4 (20)	0.0 ±0.0 (20)	57.8 ±16.3 (20)

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

* , significant difference from the control, p<0.05

** , significant difference from the control, p<0.01

Table 6 Absolute organ weight of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group		Control	Low	Medium	High	High	
Initiation		+	+	+	+	-	
Number of animals		16	17	12	15	20	
Body weight	(g)	291.5 ± 18.9	298.8 ± 12.1	297.6 ± 18.4	293.3 ± 15.5	362.0 ± 14.5	**
Brain	(mg)	1868.8 ± 52.1	1872.7 ± 43.3	1866.8 ± 45.2	1874.6 ± 38.6	1951.2 ± 34.5	**
Thymus	(mg)	127.7 ± 171.8	289.8 ± 890.3	83.0 ± 41.8	682.0 ± 2282.9	89.0 ± 8.9	(19)
Heart	(mg)	861.3 ± 77.6	874.1 ± 43.7	900.5 ± 51.9	941.5 ± 48.2	1011.9 ± 46.6	**
Lungs	(mg)	1079.2 ± 67.5	1083.9 ± 60.8	1069.3 ± 68.1	1141.4 ± 207.8	974.1 ± 35.6	**
Liver	(mg)	7385.7 ± 704.0	7253.7 ± 634.5	7556.6 ± 536.3	8264.9 ± 646.8	9155.5 ± 449.7	**
Kidneys	(mg)	2206.0 ± 576.3 (15)	2145.7 ± 248.7	2416.7 ± 831.1 (11)	2128.8 ± 266.1	2059.1 ± 108.1	
Spleen	(mg)	982.3 ± 392.4	826.5 ± 96.5	966.2 ± 260.5	934.2 ± 228.2	743.2 ± 38.3	**
Testes	(mg)	2242.0 ± 297.8	2179.3 ± 451.5	2161.4 ± 259.7	2299.7 ± 239.2	3164.8 ± 85.1	**
Epididymides	(mg)	606.0 ± 104.7	642.2 ± 105.6	647.0 ± 68.1	659.4 ± 67.8	959.2 ± 38.2	**
Prostate	(mg)	231.1 ± 50.0	228.6 ± 62.1 (16)	225.3 ± 48.0	239.6 ± 74.5	307.5 ± 68.5	**
Submandibular glands	(mg)	451.2 ± 49.6	488.2 ± 27.1	499.8 ± 34.3 *	501.7 ± 28.3 *	544.3 ± 24.0	**
Pituitary gland	(mg)	6.9 ± 0.8	7.7 ± 3.8	7.0 ± 0.6	6.7 ± 0.6	8.0 ± 0.7	**
Thyroid gland	(mg)	19.8 ± 7.0	31.5 ± 43.1	30.1 ± 27.2	30.3 ± 20.6	15.0 ± 1.7	*
Adrenal glands	(mg)	38.5 ± 8.4	35.7 ± 2.4	36.2 ± 2.9	40.8 ± 6.7	38.1 ± 3.3	

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

* , significant difference from the control, p<0.05

** , significant difference from the control, p<0.01

Table 7 Relative organ weight (mg%) of rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group		Control		Low		Medium		High		High						
Initiation		+		+		+		+		-						
Number of animals		16		17		12		15		20						
Body weight	(g)	291.5	± 18.9	298.8	± 12.1	297.6	± 18.4	293.3	± 15.5	362.0	± 14.5	**				
Brain	(mg%)	643.59	± 43.56	627.68	± 26.50	629.62	± 43.76	640.60	± 33.26	539.70	± 19.69	**				
Thymus	(mg%)	43.40	± 56.66	97.18	± 298.45	27.90	± 14.18	235.60	± 788.30	24.52	± 2.54	(19)				
Heart	(mg%)	296.47	± 30.92	292.72	± 12.97	303.23	± 20.20	321.56	± 19.20	*	279.61	± 8.58	**			
Lungs	(mg%)	371.37	± 28.95	363.00	± 19.40	359.67	± 18.69	389.96	± 73.37		269.36	± 11.12	**			
Liver	(mg%)	2547.41	± 345.02	2427.29	± 175.70	2539.74	± 100.72	2826.62	± 304.61	**	2530.25	± 101.31				
Kidneys	(mg%)	765.98	± 253.32	(15)	718.62	± 82.47	812.68	± 291.51	(11)	730.25	± 129.35	569.17	± 27.81	**		
Spleen	(mg%)	344.94	± 166.63		276.51	± 28.83	324.51	± 82.95		319.55	± 80.91	205.48	± 10.45	**		
Testes	(mg%)	769.48	± 89.96		729.96	± 151.54	728.26	± 91.18		785.67	± 88.96	875.53	± 40.03	**		
Epididymides	(mg%)	207.85	± 32.21		215.01	± 34.80	217.80	± 23.05		225.29	± 25.99	265.29	± 12.82	**		
Prostate	(mg%)	79.08	± 15.61		76.58	± 19.87	(16)	75.90	± 16.34		81.74	± 25.11	84.82	± 17.54		
Submandibular glands	(mg%)	155.13	± 17.23		163.42	± 6.26		168.3	± 13.02		171.38	± 11.75	**	150.49	± 6.84	
Pituitary gland	(mg%)	2.35	± 0.22		2.58	± 1.20		2.36	± 0.24		2.28	± 0.21		2.20	± 0.19	
Thyroid gland	(mg%)	6.79	± 2.26		10.46	± 13.95		9.92	± 8.39		10.27	± 6.92		4.14	± 0.49	**
Adrenal glands	(mg%)	13.34	± 3.37		11.94	± 0.55		12.20	± 1.34		13.96	± 2.56		10.52	± 0.90	**

Parameter: mean±S.D.

(): number of animal

* , significant difference from the control, p<0.05

** , significant difference from the control, p<0.01

Table 8 Neoplastic changes of died and sacrificed rats in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

Dose group	Animal no.	Day	Fate	Main tumor or cause of death
Control	M01008	163	D	Schwannoma, malignant (hydrothorax, hemorrhagic)
	M01014	117	D	Mesothelioma, malignant (ascites, hemorrhagic)
	M01015	135	D	Schwannoma, malignant
	M01017	160	S	Nephroblastoma
Low AA	M02025	160	S	Schwannoma, malignant (subcutaneous)
	M02029	165	D	Schwannoma, malignant (abdominal cavity)
	M02035	165	D	Mesothelioma, malignant (thoracic cavity)
Medium AA	M03041	111	D	Adenocarcinoma (small intestine), Nephroblastoma
	M03044	153	S	Adenocarcinoma (large intestine), Nephroblastoma
	M03046	145	S	Lymphoma, malignant
	M03047	168	S	Lymphoma, malignant
	M03048	160	S	Nephroblastoma
	M03052	110	D	Lymphoma, malignant
	M03057	105	D	Adenocarcinoma (small intestine)
High AA	M04063	86	D	Schwannoma, malignant (abdominal cavity)
	M04064	160	S	Sarcoma (abdominal cavity)
	M04069	109	D	Lymphoma, malignant
	M04072	168	D	Keratoacanthoma
	M04077	153	D	Lymphoma, malignant

AA, arachidonic acid; D, died; S, sacrificed at moribund condition

Table 9 Incidence of primary tumors in the medium term multi-organ carcinogenesis study of arachidonic acid

	Effective cases				Terminal sacrifice			
	Control	Low AA	Medium AA	High AA	Control	Low AA	Medium AA	High AA
Tumor bearing animals	20 / 20 (100 %)	20 / 20 (100 %)	20 / 20 (100 %)	20 / 20 (100 %)	16 / 16 (100 %)	17 / 17 (100 %)	12 / 12 (100 %)	15 / 15 (100 %)
Benign	20 / 20 (100 %)	17 / 20 (85 %)	17 / 20 (85 %)	18 / 20 (90 %)	16 / 16 (100 %)	15 / 17 (88 %)	10 / 12 (83 %)	15 / 15 (100 %)
Malignant	18 / 20 (90 %)	13 / 20 (65 %)	16 / 20 (80 %)	18 / 20 (90 %)	15 / 16 (94 %)	10 / 17 (59 %)	10 / 12 (83 %)	14 / 15 (93 %)
(Hemopoietic system, thymus)								
Malignant lymphoma	2 / 20 (10 %)	1 / 20 (5 %)	2 / 20 (10 %)	4 / 20 (20 %)	1 / 16 (6 %)	1 / 17 (6 %)	0 / 13 (0 %)	2 / 15 (13 %)
Hyperplasia, lymphocyte	8 / 20 (40 %)	5 / 20 (25 %)	2 / 20 (10 %)	7 / 20 (35 %)	8 / 16 (50 %)	5 / 17 (29 %)	7 / 13 (54 %)	7 / 15 (47 %)
Tumor bearing animal	2 / 20 (10 %)	1 / 20 (5 %)	2 / 20 (10 %)	4 / 20 (20 %)	1 / 16 (6 %)	1 / 17 (6 %)	0 / 13 (0 %)	2 / 15 (13 %)
(Lung)								
Adenocarcinoma	2 / 20 (10 %)	1 / 20 (5 %)	1 / 20 (5 %)	2 / 20 (10 %)	2 / 16 (13 %)	1 / 17 (6 %)	1 / 13 (8 %)	1 / 15 (7 %)
Adenoma	9 / 20 (45 %)	9 / 20 (45 %)	3 / 20 (15 %)*	11 / 20 (55 %)	8 / 16 (50 %)	8 / 17 (47 %)	1 / 13 (8 %)*	10 / 15 (67 %)
Hyperplasia, alveolar/bronchiolar	19 / 20 (95 %)	10 / 20 (50 %)**	15 / 20 (75 %)	18 / 20 (90 %)	16 / 16 (100 %)	9 / 17 (53 %)**	11 / 13 (85 %)	15 / 15 (100 %)
Tumor bearing animal	9 / 20 (45 %)	10 / 20 (50 %)	4 / 20 (20 %)	13 / 20 (65 %)	8 / 16 (50 %)	9 / 17 (53 %)	2 / 13 (15 %)	11 / 15 (73 %)
(Thyroid gland)								
Adenocarcinoma, follicular cell	4 / 20 (20 %)	2 / 20 (10 %)	3 / 20 (15 %)	8 / 20 (40 %)	4 / 16 (25 %)	2 / 17 (12 %)	2 / 13 (15 %)	7 / 15 (47 %)
Adenoma, follicular cell	13 / 20 (65 %)	12 / 20 (60 %)	6 / 20 (30 %)*	9 / 20 (45 %)	11 / 16 (69 %)	11 / 17 (65 %)	5 / 13 (38 %)	6 / 15 (40 %)
Hyperplasia, follicular cell	14 / 20 (70 %)	8 / 20 (40 %)	9 / 20 (45 %)	19 / 20 (95 %)**	11 / 16 (69 %)	6 / 17 (35 %)	6 / 13 (46 %)	15 / 15 (100 %)*, #
Tumor bearing animal	14 / 20 (70 %)	14 / 20 (70 %)	9 / 20 (45 %)	17 / 20 (85 %)	12 / 16 (75 %)	13 / 17 (76 %)	7 / 13 (54 %)	13 / 15 (87 %)
(Kidney)								
Nephroblastoma	11 / 20 (55 %)	10 / 20 (50 %)	8 / 20 (40 %)	10 / 20 (50 %)	10 / 16 (63 %)	8 / 17 (47 %)	5 / 13 (38 %)	9 / 15 (60 %)
Papilloma, transitional cell	0 / 20 (0 %)	2 / 20 (10 %)	2 / 20 (10 %)	3 / 20 (15 %)	0 / 16 (0 %)	2 / 17 (12 %)	2 / 13 (15 %)	3 / 15 (20 %)#
Hyperplasia, transitional cell	5 / 20 (25 %)	4 / 20 (20 %)	3 / 20 (15 %)	9 / 20 (45 %)	3 / 16 (19 %)	4 / 17 (24 %)	2 / 13 (15 %)	6 / 15 (40 %)
Tumor bearing animal	12 / 20 (60 %)	12 / 20 (60 %)	9 / 20 (45 %)	11 / 20 (55 %)	11 / 16 (69 %)	10 / 17 (59 %)	6 / 13 (46 %)	10 / 15 (67 %)
(Urinary bladder)								
Papilloma	1 / 20 (5 %)	3 / 20 (15 %)	5 / 20 (25 %)	7 / 20 (35 %)*, ##	1 / 16 (6 %)	3 / 17 (18 %)	3 / 13 (23 %)	7 / 15 (47 %)**, ##
Hyperplasia, transitional cell	12 / 20 (60 %)	6 / 20 (30 %)	3 / 20 (15 %)	6 / 20 (30 %)	10 / 16 (63 %)	6 / 17 (35 %)	2 / 13 (15 %)	5 / 15 (33 %)
Tumor bearing animal	1 / 20 (5 %)	4 / 20 (20 %)	5 / 20 (25 %)	7 / 20 (35 %)*, #	1 / 16 (6 %)	4 / 17 (24 %)	3 / 13 (23 %)	7 / 15 (47 %)**, ##
(Small intestine)								
Adenocarcinoma	2 / 20 (10 %)	3 / 20 (15 %)	4 / 20 (20 %)	3 / 20 (15 %)	2 / 16 (13 %)	0 / 17 (0 %)	1 / 13 (8 %)	3 / 15 (20 %)
(Large intestine)								
Adenocarcinoma	4 / 20 (20 %)	3 / 20 (15 %)	5 / 20 (25 %)	4 / 20 (20 %)	4 / 16 (25 %)	3 / 17 (18 %)	4 / 13 (31 %)	4 / 15 (27 %)
Adenoma	2 / 20 (10 %)	2 / 20 (10 %)	1 / 20 (5 %)	0 / 20 (0 %)	2 / 16 (13 %)	2 / 17 (12 %)	1 / 13 (8 %)	0 / 15 (0 %)
Tumor bearing animal	6 / 20 (30 %)	5 / 20 (25 %)	7 / 20 (35 %)	5 / 20 (25 %)	6 / 16 (38 %)	5 / 17 (29 %)	5 / 13 (38 %)	5 / 15 (33 %)

*, p<0.05, **, p<0.01: significant difference from the control by Fisher's exact probability test.

#, p<0.05, ##, p<0.01: Cochran-Armitage trend test.

AA, arachidonic acid

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

「ラットの認知機能、網膜機能、免疫能、骨格筋に及ぼすアラキドン酸長期投与の影響に関する研究」

研究分担者 橋本 道男 島根大学医学部生理学講座環境生理学 准教授
研究協力者 片倉 賢紀 島根大学医学部生理学講座環境生理学 助教
田邊 洋子 同大学総合科学研究支援センター 技術専門職員
井上 隆之 同大学医学部解剖学講座発生生物学 大学院生
谷戸 正樹 同学部眼科学講座 講師
海津 幸子 同講座 助教
三木 和博 武庫川女子大学薬学部病態生理学講座 教授
十万佐知子 同講座 非常勤助教

研究要旨

魚油抜き飼料で2世代にわたり飼育した若齢ラットあるいは老齢ラットに13週間にわたりアラキドン酸（ARA）を長期投与（240 mg/kg BW/day）し、1）脳機能として空間認知機能、2）網膜機能として網膜電図（ERG s）、3）免疫能としてNK細胞活性、さらには4）下腿骨格筋脂肪酸組成への影響を検討した。

1）空間認知機能の評価指標である参照記憶や作業記憶には有意な影響は認められなかったが、ARA投与ラットでは、すべての報酬餌をとりきるに要した時間（摂取所要時間）がコントロール群に比べて有意に低値を示した。ARA投与ラットでは、大脳皮質のARAが有意に増加し、リノール酸が低下した。

ARA摂取は、加齢ラットの大脳皮質のARAを増加させ行動パターンに影響を及ぼす可能性が示唆された。

2）若齢ラットへARAを投与する前と投与1ヶ月後の網膜電図には影響は認められなかった。3ヶ月後の網膜電図は、コントロール群、ドコサヘキサエン酸（DHA）群共に加齢に伴い振幅の低下が認められたが、ARA群では右目だけではあるが加齢に伴う振幅の低下が抑制された。目下投与継続中である。

3）若齢ラットのNK細胞活性は、ARA群ではコントロール群、DHA群に比べて有意に低下したことから、ARA長期投与による免疫能の低下が示唆された。

4）ARA投与老齢ラット下腿骨格筋の速筋のARAが有意に増加し、リノール酸とDHA/ARA比が低下した。また速筋の活性酸素種（ROS）が増加した。一方、遅筋のARA量には変化が認められなかったが、DHAとDHA/ARA比は有意に低下し、過酸化脂質量が増加した。ARAの長期摂取は下腿骨格筋の酸化ストレスを増大させる可能性が示唆された。

実験1) 加齢ラットの空間認知機能に及ぼすアラキドン酸長期投与の影響に関する研究

担当協力研究者：井上隆之、田邊洋子

A. 研究目的

脳内の代表的な n-6 系脂肪酸であるアラキドン酸 (ARA) は総脂肪酸の約 10% を占め、少量では ARA カスケードを介して生成される生理活性物質が正常な脳機能を営む上で重要な役割を果たしていることがよく知られている。しかしながら、長期的に給与された ARA による脳機能への影響についてはほとんど報告されていない。ARA による老齢ラット認知機能への影響をを検証した。

B. 研究方法

B-1. 加齢ラットと ARA 投与

F-1 魚粉抜き固形飼料 (フナバシファーム、船橋市) で 2 世代飼育した加齢 Wistar 系雄ラット (21 カ月齢) を、ARA (240 mg/kg BW/day) と対照基礎混合油 (牛脂:大豆油:菜種油 = 2:1:1) を其々経口投与する ARA 群 (n=15) とコントロール群 (n=15) との 2 群に分け、投与期間中に放射状迷路法により各ラットの空間認知機能を評価した。総投与期間は 13 週間である。

表 1 には投与した ARA 豊富油と対照基礎混合油の脂肪酸組成が示されている。ARA 豊富油は CABIO 社 (中国) から輸入され、ARA 豊富油は対照基礎混合油に比べて、ARA が多く、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸が少ない組成である。

表 1 給油脂肪酸組成

	アラキドン酸油	対照基礎混合油
PLA(mol%)	6.95±0.00	13.8±0.01
STA(mol%)	5.91±0.00	13.8±0.01
OLA(mol%)	5.31±0.00	42.5±0.03
LA(mol%)	9.38±0.01	20.0±0.02
ARA(mol%)	45.1±0.04	ND
EPA(mol%)	0.52±0.00	0.13±0.01
DPA(mol%)	ND	ND
DHA(mol%)	ND	ND

B-2. 空間認知機能評価法

ARA 群とコントロール群のラットを其々 10 匹から行動実験を開始した。評価法としては 8 走路放射状迷路法を用い、投与開始 6 週間後から給餌制限 (平均体重の 77.4%) を行い、2 週間の馴化期間の後に 8 走路のうちの 4 走路に報酬餌を置き、評価を行った。このとき、放射状迷路法で得られる評価項目としては、Total Time (TT: 摂取所要時間)、Reference Memory Error (RME: 参照記憶エラー) ならびに Working Memory Error (WME: 作業記憶エラー) があり、RME は長期記憶、WME は短期記憶の指標としてそれぞれ扱われている。

B-3. 血液生化学一般検査項目測定法

- 1) 血液生化学一般検査項目: 医療法人仁寿会加藤病院に検査を依頼。主に酵素法により測定。
- 2) 血漿と脳の脂肪酸測定: ガスクロマトグラフ法

C. 研究結果

C-1. 体重と血液生化学一般検査項目への影響

- ・体重には 2 群間で有意差は認められなかった。
- ・ARA 群ではコントロール群に比べて、血漿の総コレステロールは増加傾向が認められ ($P=0.055$)、HDL コレステロールと LDL コレステロールは有意に増加した ($P<0.05$) (表 2)。その他の測定項目 (GOT、GTP、 γ -GTP、アルブミン、中性脂肪、血液尿素窒素、クレアチニン、ならびに空腹時血糖) には ARA 投与の影響は認められなかった。

表2 体重・血液生化学一般検査項目

	Control 群 (n=15)	ARA 群 (n=15)
体重 (g)	422±10	457±10
GOT (IU/L)	93.7±7.1	96.6±8.8
GTP (IU/L)	52.3±4.3	52.8±4.1
γ-GTP (IU/L)	1.9±0.2	1.6±0.2
ALB(mg/dL)	2.7±0.0	2.8±0.1
Total-C (mg/dL)	105.8±5.8	120.2±4.4*
TG ((mg/dL)	61.6±9.8	68.1±8.6
BUN(mg/dL)	17.2±0.6	18.4±0.6
CRE(mg/dL)	0.30±0.0	0.33±0.0*
BS(mg/dL)	128.9±4.6	140.2±7.3
HDL-C(mg/dL)	60.1±2.7	69.6±2.6**
LDL-C(mg/dL)	30.1±1.6	35.9±2.1**

数値は平均値±標準誤差で表している。

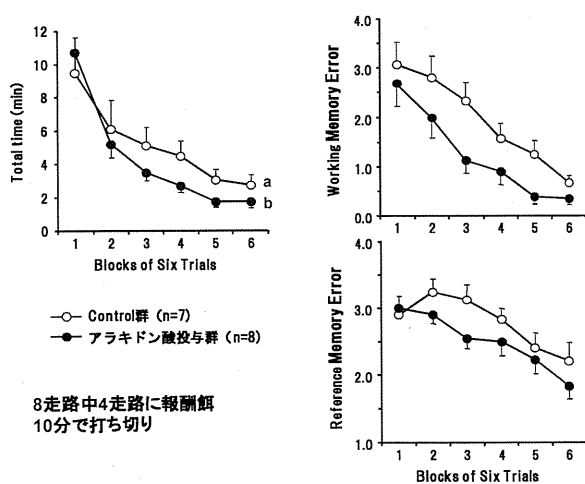
*0.05<P<0.1, **P<0.05.

C-2. 空間認知機能への影響 (図1)

・参照記憶、作業記憶は、群間とブロック間でそれぞれ有意差はあるものの、相互作用には有意差が認められなかった。

・ARA 投与ラットではコントロールラットに比べて摂取所要時間が有意に低値を示した (p=0.0011)。

図1 空間認知機能に及ぼす影響



C-3. 血漿の脂肪酸組成への影響

ARA 群はコントロール群にくらべて、ARA と n-6/n-3 比、ならびに脂肪酸不飽和度 (USI) が有意に増加し、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、エイコサペンタエン酸が有意に低下した (P<0.05) (表3)。

表3 血漿脂肪酸組成

	Control 群(n=7)	ARA 群(n=8)
PLA(mol%)	24.3±0.5	22.7±0.3*
STA(mol%)	14.2±0.2	14.6±0.3
OLA(mol%)	10.3±0.6	8.6±0.5*
LA(mol%)	18.0±1.0	14.0±0.7*
ARA(mol%)	28.6±1.6	36.7±1.3*
EPA(mol%)	0.71±0.1	0.35±0.1*
DPA(mol%)	0.53±0.0	0.44±0.1
DHA(mol%)	1.78±0.2	1.27±0.2
n-6/n-3	15.5±2.4	24.6±2.7*
USI	179.1±3.6	195.8±2.8*

数値は平均値±標準誤差で表している。*P<0.05

C-4. 大脳皮質・海馬の脂肪酸組成への影響

ARA 群はコントロール群にくらべて、大脳皮質と海馬では、ともにリノール酸が有意に減少した。ARA は大脳皮質のみ有意に増加した (P<0.05) (表4、5)。海馬では n-6/n-3 比は有意に増加し、DHA/ARA 比が有意に減少した (表5)。大脳皮質では有意差は認められないものの、海馬と同様に、n-6/n-3 比は増加し、DHA/ARA 比が減少する傾向が認められた (0.05<P<0.1) (表4)。

表4 大脳皮質の脂肪酸組成

	Control群(n=7)	ARA群(n=8)
PLA(mol%)	26.6±0.47	27.0±0.30
STA(mol%)	27.7±0.29	28.0±0.12
OLA(mol%)	19.0±0.71	18.1±0.51
LA(mol%)	0.80±0.05	0.58±0.05**
ARA(mol%)	11.6±0.37	12.7±0.35**
EPA(mol%)	0.07±0.01	0.06±0.00
DPA(mol%)	0.11±0.01	0.09±0.01
C24:0(mol%)	0.41±0.07	0.35±0.05
DHA(mol%)	13.0±0.45	12.5±0.20
C24:1(mol%)	0.70±0.13	0.60±0.07
n-6/n-3	0.94±0.05	1.06±0.04*
DHA/AFA	1.13±0.06	0.99±0.04*
USI	146.8±2.1	146.4±0.7

数値は平均値±標準誤差で表している。

*0.05<P<0.1, **P<0.05

表5 海馬の脂肪酸組成

	Control群(n=7)	ARA群(n=8)
PLA(mol%)	25.4±0.34	25.3±0.22
STA(mol%)	26.5±0.14	26.4±0.33
OLA(mol%)	20.9±0.46	20.2±0.39
LA(mol%)	0.63±0.04	0.48±0.02**
ARA(mol%)	12.8±0.20	13.2±0.18
EPA(mol%)	0.09±0.00	0.08±0.01
DPA(mol%)	0.12±0.01	0.11±0.01
C24:0(mol%)	0.66±0.07	0.67±0.04
DHA(mol%)	11.8±0.20	11.4±0.19
C24:1(mol%)	1.06±0.13	1.08±0.08
n-6/n-3	1.11±0.02	1.18±0.02**
DHA/ARA	0.93±0.02	0.86±0.01**
USI	146.5±1.2	145.7±1.0

数値は平均値±標準誤差で表している。 **P<0.05

D. 考察

脳内の代表的な n-6 系脂肪酸である ARA は総脂肪酸の約 10% を占め、DHA と同様に主要な細胞膜構成脂肪酸である。ホスホリパーゼ A2 により細胞膜から遊離された ARA は、ARA カスケードを介して各種エイコサノイドとなるが、少量のエイコサノイドは正常な脳機能を営む上では重要な役割を果たしていることがよく知られている。しかしながら、長期的に給与された外因性 ARA による脳機能への影響についてはほとんど未解決のままである。本研究では、空間認知機能に及ぼす ARA 長期投与の影響について検討が行われた。

体重、血液の肝・腎機能指数、ならびに空腹時血糖には ARA 投与による影響が認められなかったことから、13 週間の投与により毒性などは認められない事が示唆された。

本実験で使用した ARA 豊富油と対照基準混合油の脂肪酸組成を比べた場合、ARA 豊富油では ARA が 40% 増加する代わりに、オレイン酸とリノール酸がそれぞれ極端に低下している(表1)。摂取する餌中のリノール酸の増加は血中総コレステロールを減らすことが報告されていることから、ARA 投与ラットで観察された血漿の総コレステロールや HDL・LDL コレステロールの増加の原因の一つとして、ARA 豊富飼料中の低リノール酸含有量の低下が示唆される。

本研究はまだ中途であり、血漿・脳内の各種生理活性物質と ARA 摂取との関連性について検討を行っていない。老齢ラットでは、ARA の長期投与により学習・記憶機能には影響が認められなかった。しかし、報酬餌を摂取するために要する時間(摂取所要時間)は ARA 投与により有意に低下した。神経細胞膜に増加した ARA はリパーゼ A2 により遊離型となり、ARA カスケード由来各種エイコサノイドが産生される。これらのエイコサノイドが神経細胞の可塑性などに作用する可能性があり、今後の検討が待たれる。

E. 結論

ARA 投与により、血漿 ARA 組成の増加と共に、大脳皮質の ARA は増加し、海馬の DHA/ARA 比が低下した。これらの変化は、ARA 投与ラットでの摂取所要時間の短縮に影響を及ぼす可能性があり、今後の検討課題である。

実験2) ラット網膜の機能と脂肪酸組成に及ぼすアラキドン酸長期投与の影響に関する研究

担当協力研究者：谷戸正樹、海津幸子、片倉賢紀、井上隆之、田邊洋子

A. 研究目的

網膜に光が当たることによって生じる網膜光障害の原因の一つは酸化ストレスである。網膜には不飽和脂肪酸が多く含まれるので、他の組織と比較して酸化ストレスを受けやすく、Hydroxynonenal (HNE) や Hydroxyhexenal (HHE) などの脂質過酸化物質 (アルデヒド) が多く生成されている。その一方で、不飽和脂肪酸であるARA やドコサヘキサエン酸 (DHA) が必須脂肪酸としてサプリメントや食品添加物に使用されている現実がある。しかしながらARA 長期投与の影響はほとんど報告されていない。

最近、ARA を過剰摂取したマウス雌胎仔の眼の発達異常が報告されたことから、ARA の長期投与ラットの網膜機能への影響が示唆される。しかしながら、ARA やDHA を長期摂取した場合、網膜機能に如何なる影響が出るかについては報告がない。本研究では、長期に渡って経口摂取したARA とDHA がどの程度網膜に移行するのか、そして網膜機能に如何なる影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

B-1. ラットとARA 投与

F-1 魚粉抜き固形飼料 (フナバシファーム、船橋市) で2世代飼育した若齢Wistar系雄ラット (5週齢) を、ARA 中性脂肪型 (240 mg/kg BW/day) とDHA 中性脂肪型 (240 mg/kg BW/day) ならびに対照基礎混合油 (牛脂：大豆油：菜種油 = 2：1：1) をそれぞれ経口投与するARA群 (n=10)、DHA群 (n=10)、コントロール群 (n=10) の3群に分け、網膜機能への影響が観察されるまで、3カ月毎に網膜電図を測定する。

表1には投与したARA 豊富油と対照基礎混合油ならびにDHA 豊富油の脂肪酸組成が示されている。ARA 豊富油はCABIO社 (中国) から輸入され、ARA 豊富油は対照基礎混合油に比べて、ARA が多く、パルミチン酸 (PLA)、ステアリン酸 (STA)、オレイン酸 (OLA)、リノール酸 (LA) が少ない組成である。DHA 豊富油はマルハニチロフォールディングス中央研究所から提供された。対照混合油に比べて、DHA、PLA、EPA が多く、STA、LA、が少ない組成である。

表1 給油脂肪酸組成

	ARA 油	対照基礎混合油	DHA 豊富油
PLA(mol%)	6.95±0.00	13.8±0.01	29.8±0.03
STA(mol%)	5.91±0.00	13.8±0.01	8.10±0.04
OLA(mol%)	5.31±0.00	42.5±0.03	16.3±0.01
LA(mol%)	9.38±0.01	20.0±0.02	1.96±0.01
ARA(mol%)	45.1±0.04	ND	2.49±0.02
EPA(mol%)	0.52±0.00	0.13±0.01	6.61±0.00
DPA(mol%)	ND	ND	1.17±0.01
DHA(mol%)	ND	ND	32.6±0.03