

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（平成24年度）

グリシドールおよび3-MCPDの脂肪酸エステルの乳腺発がん修飾作用に関する研究

研究代表者 チョウ ヨンマン 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究要旨：本研究では、*N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) 誘発ラット乳腺発がんモデルを用いて3-クロロ-1,2-プロパンジオール(3-MCPD)脂肪酸エステル(3-MCPDEs)である3-MCPDパルミチン酸ジエステル、3-MCPDパルミチン酸モノエステル及び3-MCPDオレイン酸ジエステルの乳腺発がん修飾作用の解析を行った。MNUによるイニシエーション後、週5回、25週間の強制経口投与期間中に死亡/切迫屠殺例は各投与群で1-5例が認められ、生存率には被験物質の投与による有意な変化はみられなかった。3-MCPDEsの加水分解物である3-MCPD投与群では、乳腺部腫瘍の発生以前に腎毒性による4例の死亡例が認められ、そのデータは乳腺腫瘍発生分析より削除した。解剖後、病変の病理組織学的検討を行った結果、乳腺腺腫/腺癌の発生数および体積について、溶媒対照群及び3-MCPD群で無処置対照群に比べ減少傾向が認められた。3-MCPDオレイン酸ジエステル群では、体積の増加傾向を示したものの、溶媒対照群と比較して統計学的に有意差は認められなかった。また、3-MCPDパルミチン酸ジエステルおよび3-MCPDパルミチン酸モノエステル群でも有意な変化はみられなかった。以上の結果より、3-MCPDEsによるラット乳腺発がん修飾作用は認められなかった。

A. 研究目的

グリシドール脂肪酸エステル(GEs)は、食用油の精製・脱臭過程で形成される副産物であるが、その毒性や体内動態は明確ではなく、生体内で加水分解され、発がん性が懸念されるグリシドールに変換される可能性がある。1999年に特定保健用食品とされたジアシルグリセロール(DAG)を主成分とする食用油「エコナ」に、2009年GEsが高濃度に含まれるとの報告を受け、GEsの安全性に関する正確な情報が求められるが、生体への影響を検討した報告はほとんどない。一方、その加水分解産物であるグリシドールは、グルタチオンとの反応性を持つアルキル化剤であり、F344ラットでは雄の精巣漿膜中皮腫、雌の乳腺線維腺腫および腺癌、雌雄の前胃乳頭腫および脳神経膠腫などを誘発し、B6C3F₁マウスでは雌雄のハーダー腺、雄の前胃および雌の乳腺腫瘍の発生を増加させた(1996; Irwin et. al.)。3-クロロ-1,2-プロパンジオール(3-MCPD)脂肪酸エステル(3-MCPDEs)も食用油の精製・脱臭過程で形成される

副産物であるが、その毒性データは十分に得られていない。一方、その加水分解産物である3-MCPDはSDラットで雄の腎癌および精巣間細胞腫、雌の腎腺腫が有意に増加させた(2008; Cho et. al.)。GEsが3-MCPDの前駆物質となる可能性や3-MCPDがグリシドールに代謝される可能性も指摘されている。

食用油の汎用性を考慮すると、これら脂肪酸エステルの生体に対する毒性評価及び発がん性評価は急務であり、我々は*gpt delta*ラットを用いた生体内での遺伝毒性について現在検討を行っている。日本の乳腺がんの発生率は近年急速に増加しており、食生活の欧米化による脂肪の摂取量増加が一因とされている。脂肪酸の種類による乳腺発がん修飾作用に関する研究は多くされてきたが、食用油中の副産物に関する研究は殆んどない。本研究では、*N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) 誘発ラット乳腺発がんモデルを用いてGEs及び3-MCPDEsの乳腺発がん修飾作用の解析を行った。

平成24年度は、3-MCPDEsの3-MCPDパルミチン酸

ジエステル、3-MCPD パルミチン酸モノエステル及び3-MCPD オレイン酸ジエステルについて、乳腺発がん修飾作用の有無を病理組織学的に検討した。

B . 研究方法

7週齢の雌性SDラット1群20匹に、MNU(50 mg/kg 体重)の単回腹腔内投与後、被験物質を週5回、25週間強制経口投与した。3-MCPDは発癌用量の40 mg/kg 体重を、3-MCPD パルミチン酸ジエステル、3-MCPD パルミチン酸モノエステル及び3-MCPD オレイン酸ジエステルはほぼ同等のモル数になるよう各々220、130および240 mg/kg 体重を投与濃度とした。また溶媒(オリーブオイル、5 ml/kg 体重)対照群および無処置対照群を設けた。投与期間中、体重、摂餌量、触診可能な乳腺部結節の発生率、発生数及び体積の測定を行った。投与終了後、深麻酔下でラットを屠殺解剖し、全身の乳腺及び諸臓器を採取し、結節性病変の病理組織標本作製し、腫瘍性病変の発生率、発生数及び体積について、病理組織学的に検討した。

(倫理面への配慮)

投与実験は熟練した実験者による強制経口投与が主体であり、短時間で終了させることで動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルランの吸入麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物実験、飼育および管理に当たっては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行った。

C . 研究結果

25週間の実験期間中に死亡/切迫屠殺例は無処置対照群、溶媒対照群、3-MCPD群、3-MCPD パルミチ

ン酸ジエステル群、3-MCPD パルミチン酸モノエステル群及び3-MCPD オレイン酸ジエステル群で1、1、4、1、2、5例が認められ、生存率には被験物質の投与による有意な変化はみられなかった(Fig. 1-a)。

3-MCPD 投与群では、乳腺部腫瘍の発生以前に腎毒性による4例の死亡例が認められ、そのデータは乳腺腫瘍発生分析より削除された。また、溶媒対照群と比較して投与開始2、4、6週目に有意な($p < 0.05$ 又は $p < 0.01$)体重増加抑制を示し、摂餌量の減少傾向が試験期間の前半で認められた(Fig. 1-b,c)。

3-MCPD パルミチン酸モノエステル群で実験開始2週目にのみ有意な体重増加抑制が認められた(Fig. 1-b)。

3-MCPD群及び3-MCPDEs群の腎臓実重量及び相対重量において、有意な($p < 0.01$)増加が認められた(Table 1)。3-MCPDEs群の肝臓実重量又は相対重量において、有意な($p < 0.05$ 又は $p < 0.01$)増加が認められた(Table 1)。

触診可能な乳腺部結節は無処置対照群、溶媒対照群、3-MCPD群、3-MCPD パルミチン酸ジエステル群、3-MCPD パルミチン酸モノエステル群及び3-MCPD オレイン酸ジエステル群で、投与開始10、10、13、7、8、8週目より認められた(Fig. 2)。経時的発生率の変化について、実験開始18週目から21週目まで3-MCPD パルミチン酸モノエステル群で溶媒対照群に比べ有意な発生率の増加が認められた(Fig. 2-a)。また、結節の経時的発生数及び体積の変化について、溶媒対照群及び3-MCPD群で無処置対照群に比べ各々発生数と体積、及び体積の減少傾向が認められた。3-MCPD パルミチン酸モノエステル群の発生数及び3-MCPD オレイン酸ジエステルの体積で増加傾向が示されたが、統計学的な有意差はなかった(Fig. 2-b,c)。

解剖後、病変の病理組織学的検討を行った結果、発生した腫瘍は殆どが乳腺腺腫/腺癌であり、線維腺腫は無処置対照群、3-MCPD パルミチン酸モノエステル群及び3-MCPD オレイン酸ジエステル群で1例ずつ認められた。乳腺腺腫/腺癌の発生数および体積について、溶媒対照群及び3-MCPD 群で無処置対照群に比べ減少傾向が認められた(Table 2)。3-MCPD オレイン酸ジエステル群で体積の増加傾向が示されたものの、対照群と比較して統計学的に有意差は認められなかった。また、3-MCPD パルミチン酸ジエステル群及び3-MCPD パルミチン酸モノエステル群でも有意な変化はみられなかった(Table 2)。

D . 考察

食用油中に多く含有される3-MCPDEsについて、MNU 誘発ラット乳腺発がんにおける発がん修飾作用の有無を検討した。

溶媒対照群及び3-MCPD 群で、無処置対照群に比べ乳腺腺腫/腺癌の発生数及び体積の減少傾向が認められた。3-MCPD オレイン酸ジエステル群では体積の増加傾向を示したものの、溶媒対照群と比較して統計学的に有意差は認められなかった。また、3-MCPD パルミチン酸ジエステル及び3-MCPD パルミチン酸モノエステル群でも有意な変化はみられなかった。本研究において、3-MCPDEs によるラット乳腺発がん修飾作用は認められなかった。

3-MCPD の飲水投与による腎毒性及び強制経口投与による死亡例の発生についてすでに報告があり、死因は3-MCPD 代謝産物の急激な血中濃度上昇による急性腎毒性であった(2001;Barocelli et.al.)。

FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(JECFA)は、3-MCPD について生体内では遺伝毒性を認められな

いとし、腎臓の尿細管過形成という毒性指標の増加

結果から暫定最大一日耐容摂取量(PMTDI)を2ug/kg 体重/日とした。

ラットを用いた発がん性試験においては、3-MCPD の飲水投与により、雌雄の腎臓、雄の精巣及び乳腺における良性腫瘍の増加が観察された(1993;Sunahara et.al.)。しかし、Choらによる報告には雄の乳腺腫瘍発生の報告はなかった(2008;Cho et.al.)。また、雌の乳腺に及ぼす3-MCPD の影響は報告されていない。3-MCPD の発がんメカニズムとしては(1)3-MCPD の遺伝毒性発がん物質であるグリシドールへの代謝、(2)DNA 修復、細胞死、細胞周期調節及び mRNA 安定性に関わる glyceraldehydes-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH)の抑制及び(3)3-MCPD のホルモン様作用などが考えられるが、まだ明らかになっていない。

今後、3-MCPD の発がんメカニズムの解明と共に、ヒト及びラットにおける3-MCPDEs から3-MCPD への変換率についての詳細な検討が必要と考えられた。

E . 結論

MNU 誘発ラット乳腺発がんモデルを用いて3-MCPDEs である3-MCPD パルミチン酸ジエステル、3-MCPD パルミチン酸モノエステル及び3-MCPD オレイン酸ジエステルの乳腺発がん修飾作用の解析を行った。本研究において、3-MCPDEs による明らかな乳腺発がん促進作用は示さなかった。

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

曹 永晩、水田 保子、豊田 武士、大波 冴子、
小川 久美子：グリシドール及びグリシドール脂肪
酸エステルによるラット乳腺腫瘍発生修飾作用の
検討.第 39 回日本毒性学会学術年会，仙台，7 月，
2012 年

曹 永晩、豊田 武士、大波 冴子、水田 保子、
西川 秋佳、小川 久美子：グリシドール脂肪酸エ
ステルによるラット乳腺発がん修飾作用，第 71 回
日本癌学会学術総会学術年会，札幌，10 月，2012
年

Young-Man Cho, Takeshi Toyoda, Saeko Onami,
Yasuko Mizuta, Akiyoshi Nishikawa, and Kumiko
Ogawa : Modifying effect of glycidol fatty acid
esters on N-methyl-N-nitrosourea induced
mammary carcinogenesis in SD rats , 韓国毒性病
理学会 2012 , 原州 , 11 月 , 2012 年

曹 永晩、水田保子、豊田武士、大波冴子、赤木純
一、鈴木勇、西川 秋佳秋佳、小川久美子：グリシ
ドール脂肪酸エステルによるラット乳腺腫瘍発生
修飾作用の検討，第 29 回日本毒性病理学会，つく
ば，1 月，2013 年

Young-Man Cho, Takeshi Toyoda, Saeko Onami,
Yasuko Mizuta, Akiyoshi Nishikawa, and Kumiko
Ogawa : Modifying effect of glycidol fatty acid
esters on N-methyl-N-nitrosourea induced
mammary carcinogenesis in rats , 第 52 回米国毒
性学会，サンアントニオ，3 月，2013 年

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

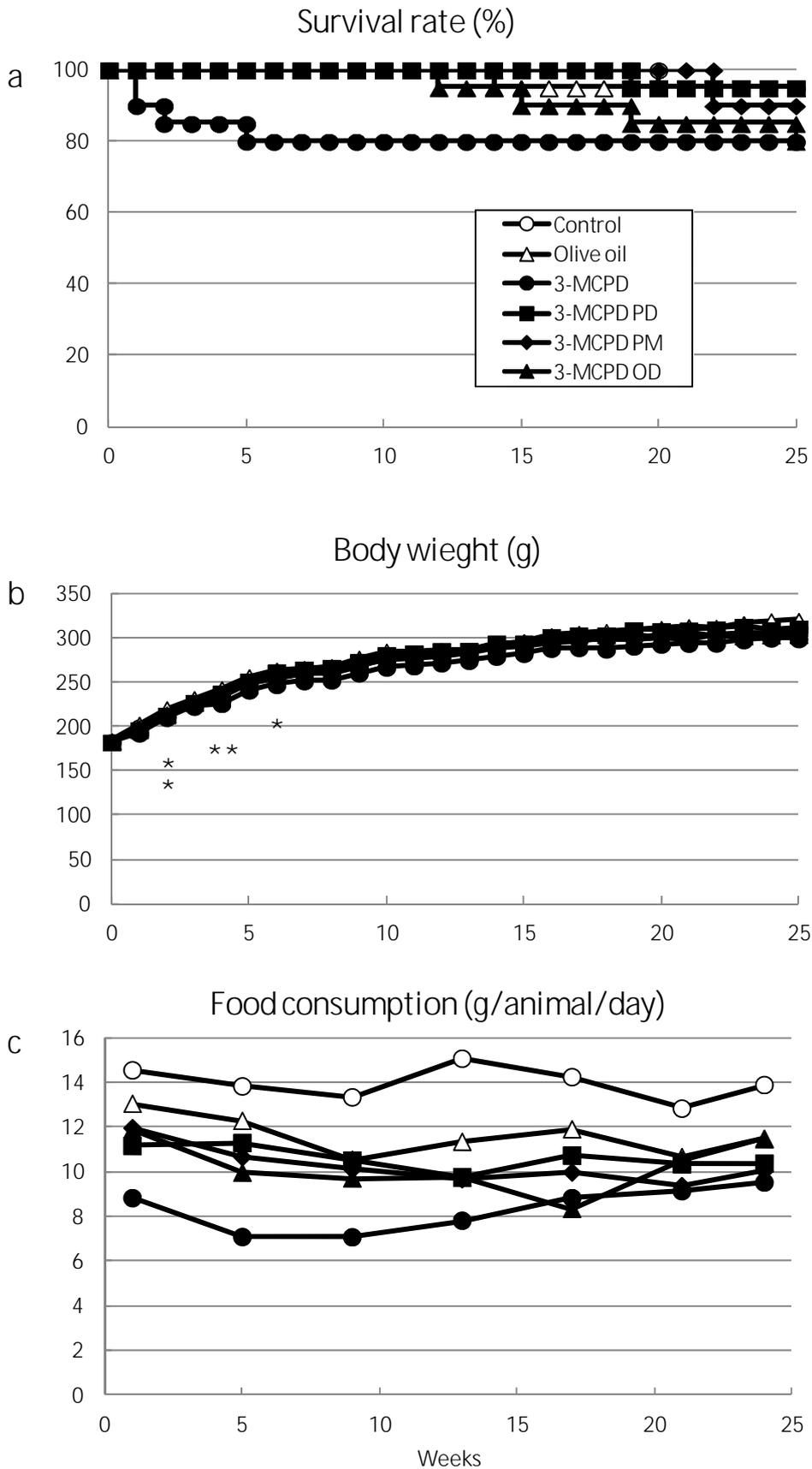
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



*, **: p<0.05 and p<0.01 vs. olive oil, respectively

Figure 1 Survival rate, body weight and food consumption of SD rats treated with MNU followed by 3-MCPD or 3-MCPDEs administration

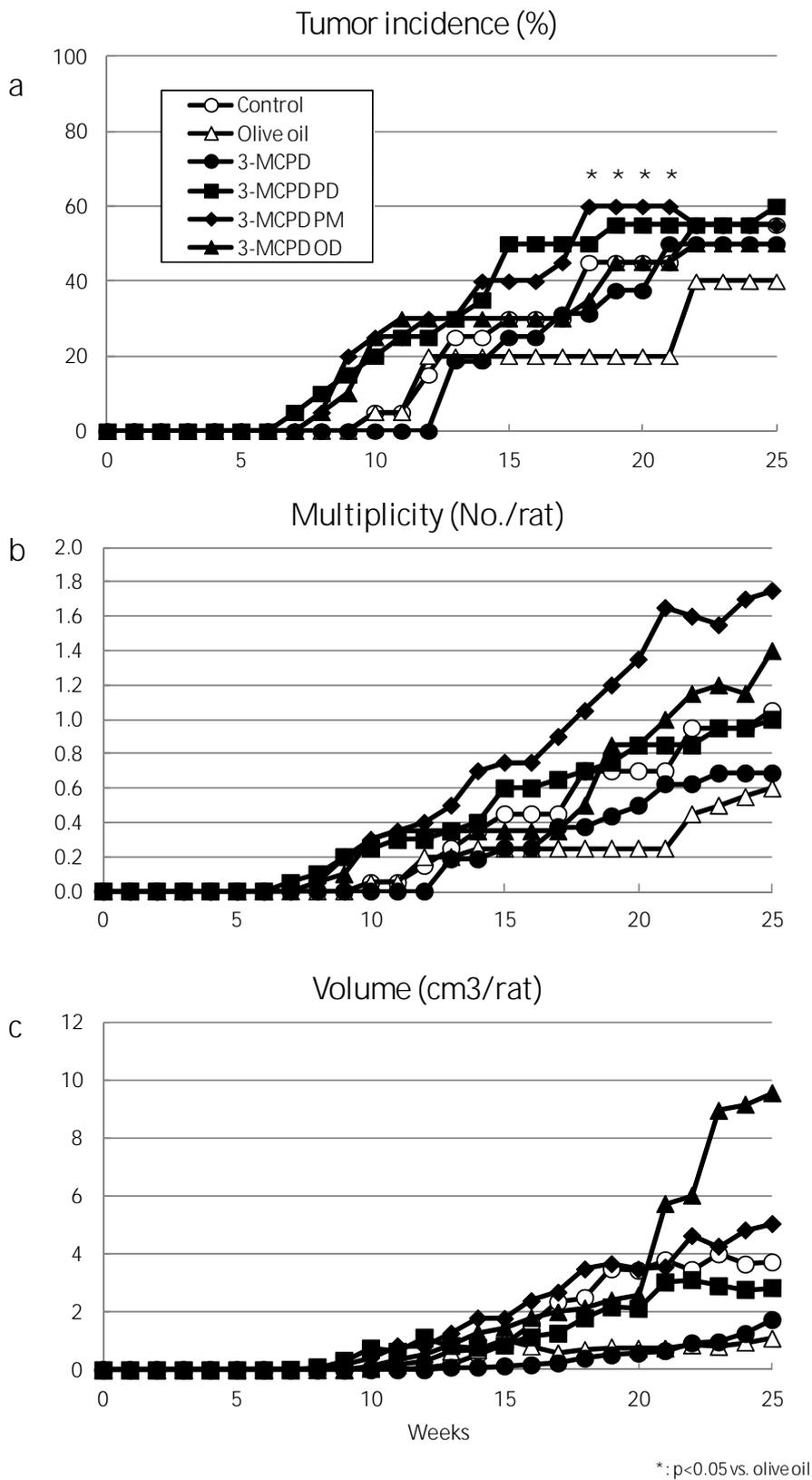


Figure 2 Sequential changes in the incidence, multiplicity and volume of palpable mammary tumors of SD rats treated with MNU followed by 3-MCPD or 3-MCPDEs administration

Table 1 Final body weight and organ weights of SD rats treated with MNU followed by 3-MCPD or 3-MCPDEs administration

	Control	Olive oil	3-MCPD	3-MCPD PD	3-MCPD PM	3-MCPD OD
No. of animals	19	19	16	19	18	15
Body weight (g)	310 ± 35	321 ± 27	297 ± 24	310 ± 28	306 ± 13	301 ± 30
Absolute						
Liver (g)	10 ± 2	10 ± 1	10 ± 1	11 ± 1 [#]	12 ± 5 [#]	11 ± 1
Kidneys (g)	2.1 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.8 ± 0.3 ^{##**}	3.4 ± 0.4 ^{####}	3.1 ± 0.3 ^{####}	3.1 ± 0.3 ^{####}
Spleen (g)	0.73 ± 0.52	0.54 ± 0.11	0.56 ± 0.22	0.58 ± 0.21	1.12 ± 2.11	0.49 ± 0.09
Relative						
Liver (g%)	3.2 ± 0.5	3.2 ± 0.3	3.5 ± 0.4	3.6 ± 0.3 ^{####}	4.0 ± 1.7 ^{####}	3.5 ± 0.4 [*]
Kidneys (g%)	0.69 ± 0.11	0.64 ± 0.07	0.94 ± 0.09 ^{####}	1.09 ± 0.12 ^{####}	1.02 ± 0.11 ^{####}	1.03 ± 0.13 ^{####}
Spleen (g%)	0.24 ± 0.19	0.17 ± 0.03	0.19 ± 0.07	0.19 ± 0.08	0.38 ± 0.74	0.16 ± 0.03

Each value represents the mean±S.D.

^{*}, ^{**}: Significantly different from the control at p<0.05 and p<0.01, respectively

[#], ^{##}: Significantly different from the olive oil at p<0.05 and p<0.01, respectively

Table 2 Incidence, multiplicity and volume of histopathologically diagnosed mammary tumors of SD rats treated with MNU followed by 3-MCPD or 3-MCPDEs administration

Treatment	No. of animal	Incidence (%)	Multiplicity (No./rat)	Volume (cm ³ /rat)
Control	20	12 (60)	2.1 ± 2.3 ^a	3.3 ± 5.0
Olive oil	20	12 (60)	1.2 ± 1.3	1.2 ± 2.6
3-MCPD	16	11 (69)	1.3 ± 1.3	1.7 ± 2.8
3-MCPD PD	20	13 (65)	1.8 ± 1.8	2.9 ± 4.8
3-MCPD PM	20	13 (65)	2.2 ± 3.0	4.6 ± 8.6
3-MCPD OD	20	14 (70)	2.3 ± 3.0	10.2 ± 26.7

^a: Mean ± SD.