

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

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 病理部室長

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グリシドール脂肪酸エステル (GEs、グリシドールオレイン酸エステルおよびグリシドールリノール酸エステル) 及び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、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、GEs 及び3-MCPDEs 投与群において、各々26又は25週間の飲水及び強制経口投与期間中に死亡/切迫屠殺例は2-4例及び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。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、グリシドール投与群で有意な増加が認められたが、何れのGEs 及び3-MCPDEs 投与群においても、有意な変化はみられなかった。以上の結果より、グリシドールは強い乳腺腫瘍発生促進作用が明らかになったが、GEs及び3-MCPDEsによる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23年度は、GEsのグリシドールオレイン酸エステルおよびグリシドールリノール酸エステルについて、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

< GEs の乳腺発がん修飾作用 >

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、26 週間被験物質を飲水投与した。グリシドールは発癌用量の 800 ppm、グリシドールオレイン酸エステルおよびグリシドールリノール酸エステル投与はほぼ同等のモル数の 3600 ppm を投与濃度とした。また溶媒 (300 ppm Tween 80) 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、飲水量、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。

< 3-MCPDEs の乳腺発がん修飾作用 >

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)

投与実験は飲水による経口投与及び熟練した実験者による強制経口投与が主体であり、強制経口投与を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

< GEs の乳腺発がん修飾作用 >

26 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、グリシドール群、グリシドールオレイン酸エステル群およびグリシドールリノール酸エステル群で 3、2、3、4、3 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)。グリシドール投与開始後 2 週目より実験期間を通して無処置対照群および溶媒対照群と比較して有意な ($p < 0.05$ 又は $p < 0.01$) 体重増加抑制を示し、飲水量の著しい減少が認められたが、グリシドールリノール酸エステル及びグリシドールオレイン酸エステル群では群間に差はなかった (Table 1、Fig. 1-b,c)。グリシドール群、グリシドールオレイン酸エステルおよびグリシドールリノール酸エステル群の投与期間における被験物質の一日平均摂取量は 43、427 及び 334 mg/kg

体重であり、グリシドールは2年間の強制胃内投与によって腫瘍性病変の発生が報告されている37.5mg/kg体重に達した(Table 1)。また、グリシドールオレイン酸エステル及びグリシドールリノール酸エステルの全量がグリシドールに変化したと仮定すると93.4及び73.5 mg/kg体重相当であった。

グリシドール群の甲状腺実重量及び腎臓相対重量において、それぞれ有意な($p < 0.05$ 又は $p < 0.01$)減少及び増加が認められた(Table 2)。

触診可能な乳腺部結節の経時的発生率、発生数及び体積の変化について、全投与群で、投与開始8週目より結節が認められ、グリシドール投与群で、投与開始後12週目より有意な($p < 0.05$ 又は $p < 0.01$)増加及び増加意傾向が認められた(Fig. 2)。グリシドールオレイン酸エステル群で、発生数及び体積の増加傾向を示したが、統計学的な有意差はなく、グリシドールリノール酸エステル群でも有意な変化はみられなかった(Fig. 2)。

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、グリシドール投与群で有意な($p < 0.05$ 又は $p < 0.01$)増加が認められた(Table 3)。グリシドールオレイン酸エステル群では、増加傾向を示したものの、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、グリシドールリノール酸エステル群でも有意な変化はみられなかった。その他、対照群および投与群の諸臓器に種々の所見がみられたが、その発生に群間の明らかな差は認められなかった。

< 3-MCPDEsの乳腺発がん修飾作用 >

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. 3-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. 3-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. 3-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 4)。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 4)。

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. 4)。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. 4-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. 4-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 5)。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 5)。

D . 考察

< GEs の乳腺発がん修飾作用 >

DAG 製造中に多く含有される GEs について、グリシドールと比較しながら、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。

グリシドール投与群で、乳腺腺腫/腺癌の発生数および体積の有意な増加が認められたが、グリシドールオレイン酸エステル群で、増加傾向を示したものの、対照群と比較して統計学的に有意差は認められなく、グリシドールリノール酸エステル群でも変化はみられなかった。乳腺に発がん性を示すグリシドール投与群では、乳腺腫瘍発生促進作用が明らかになったが、GEs については、本研究において、明らかな乳腺発がん促進作用は示さなかった。

グリシドール投与群では飲水量の著しい減少による体重増加抑制が認められた。グリシドールによる忌避性が原因と考えられるが、グリシドールの一日平均摂取量は 43 mg/kg 体重で、2 年間の強制胃内投与による発がん用量である 37.5mg/kg 体重に達していた。グリシドールオレイン酸エステルおよび

グリシドールリノール酸エステルの一平均摂取量は 427 及び 334 mg/kg 体重で、体内で全量がグリシドールに変化したと仮定すると 93.4 及び 73.5 mg/kg 体重相当であり、投与量は充分であった。しかし、今後、ヒト及びラットにおける GEs からグリシドールへの変換率についての詳細な検討が必要と考えられた。

本モデルでは、グリシドール投与により体重増加抑制が認められたにもかかわらず、乳腺腫瘍発生促進作用が明らかになったことから、感受性が高く、グリシドール様物質である3-MCPD脂肪酸エステルについても本モデルで検討することは妥当と考えられた。

グリシドール群で甲状腺実重量の減少及び腎臓相対重量の増加が認められたが、病理組織学的に変化はなかったことから、体重増加抑制による影響と考えられた。

< 3-MCPDEs の乳腺発がん修飾作用 >

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 glycerinaldehydes-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 GEs 及び 3-MCPDEs の乳腺発がん修飾作用の解析を行った。GEs の加水分解物、グリシドール投与群では体重増加抑制が認められたにもかかわらず、乳腺腫瘍の発生数と体積が増加しており、乳腺腫瘍発生促進作用が明らかになった。一方、本研究において、GEs 及び 3-MCPDEs の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

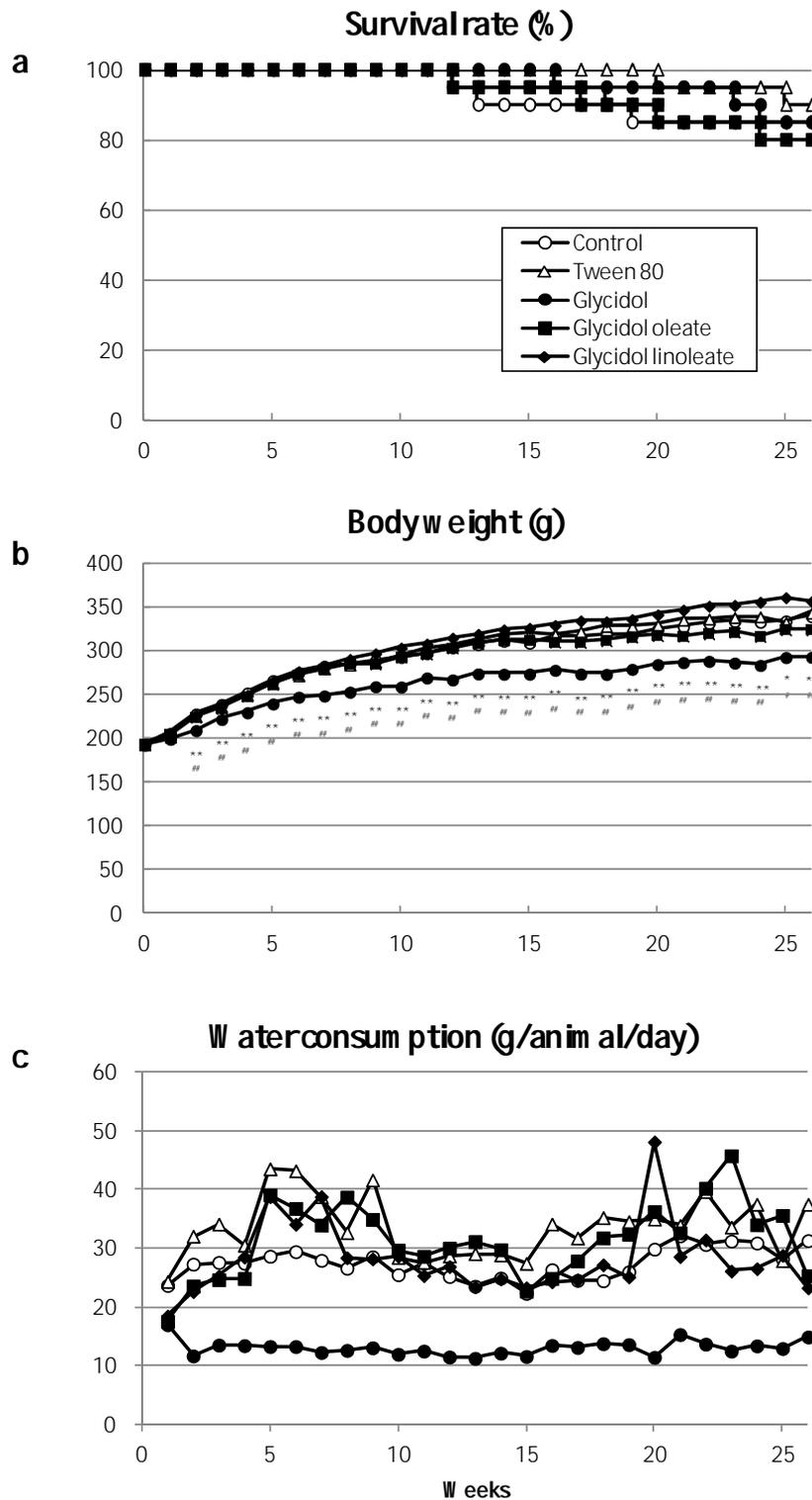
なし

2 . 実用新案登録

なし

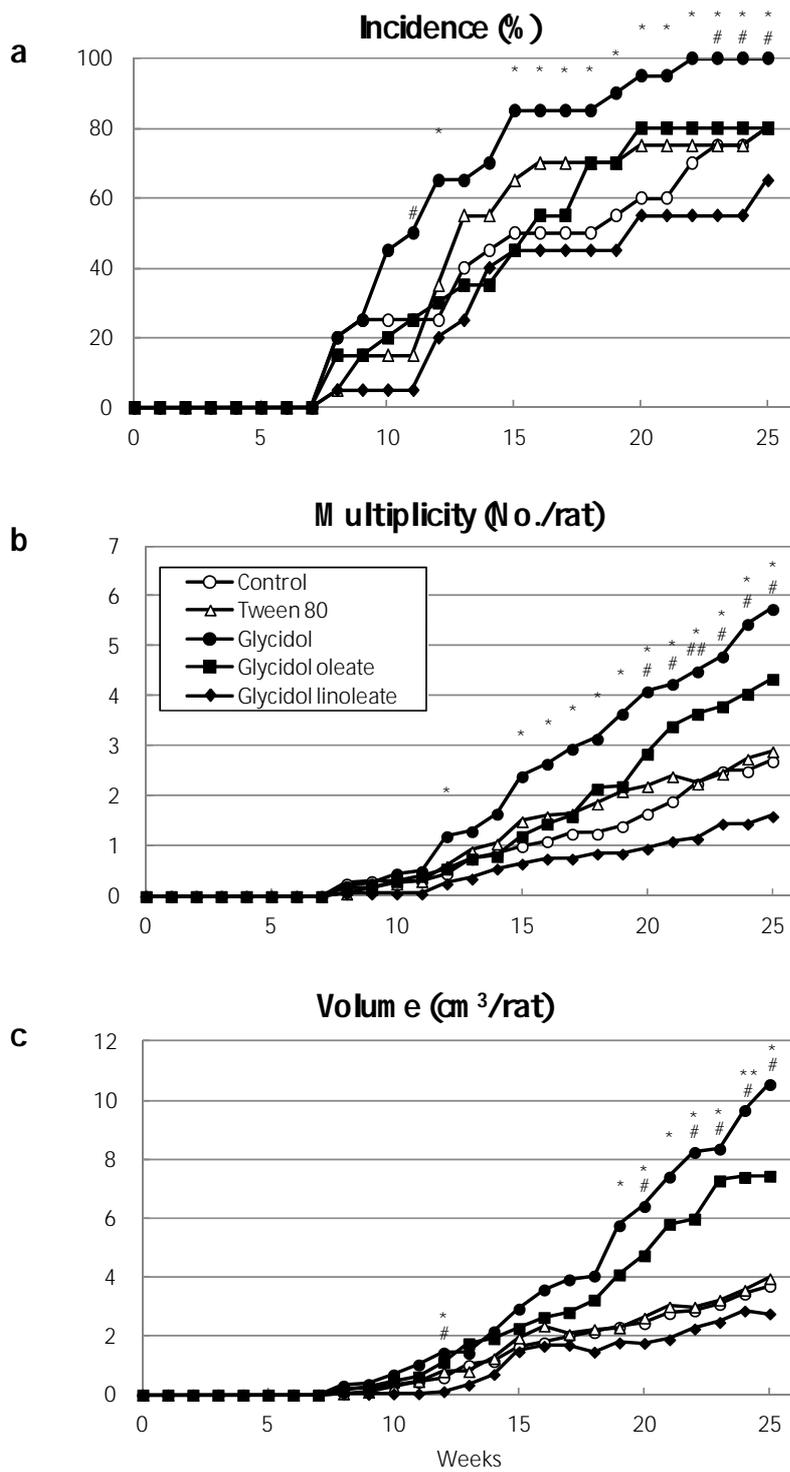
3 . その他

なし



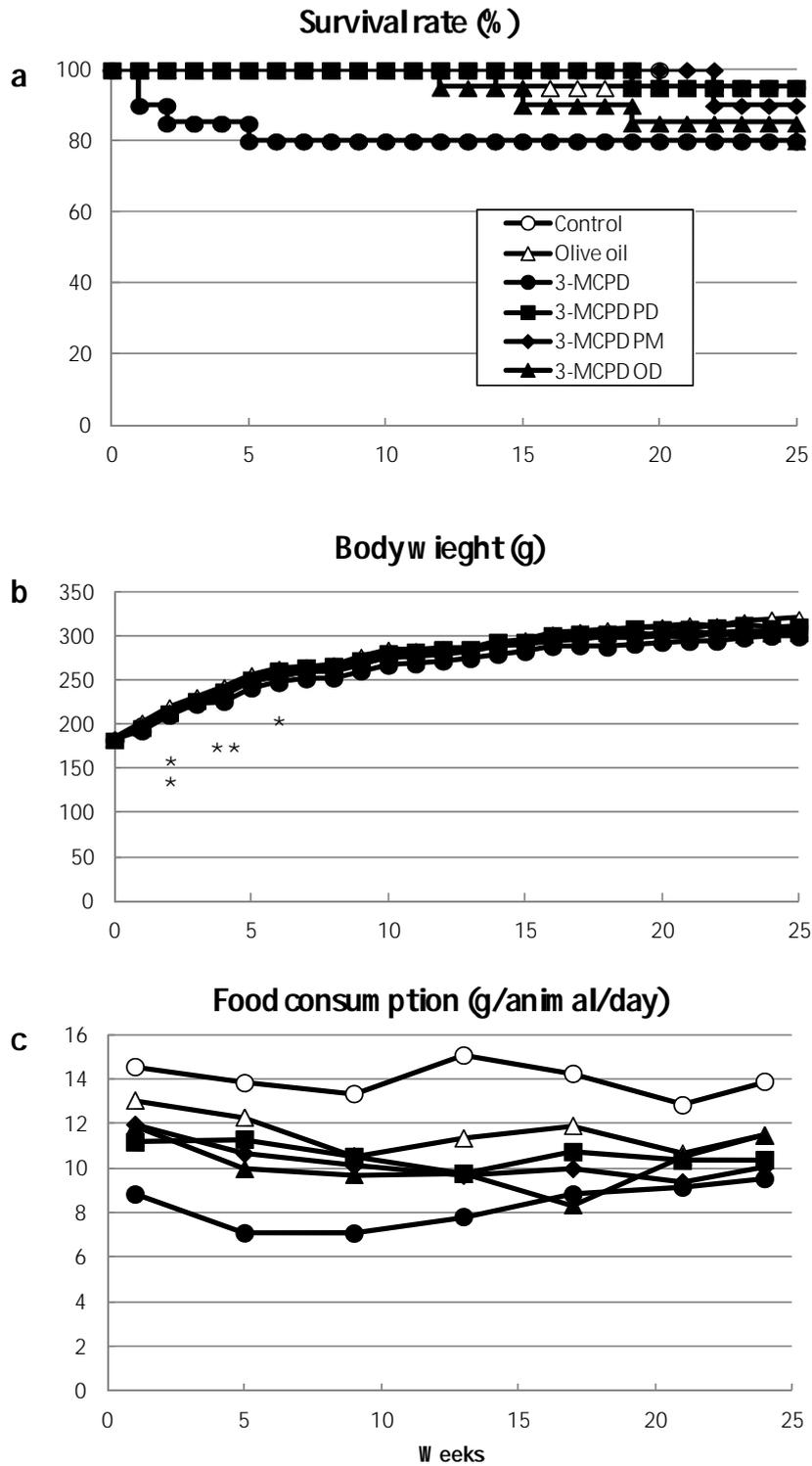
***: p<0.05 and p<0.01 vs. control, respectively
 #, ##: p<0.05 and p<0.01 vs. tween 80, respectively

Figure 1 Survival rate, body weight and water consumption of SD rats treated with MNU followed by glycidol or GEs administration



*, **: p<0.05 and p<0.01 vs. control, respectively
 #, ##: p<0.05 and p<0.01 vs. tween 80, respectively

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



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

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

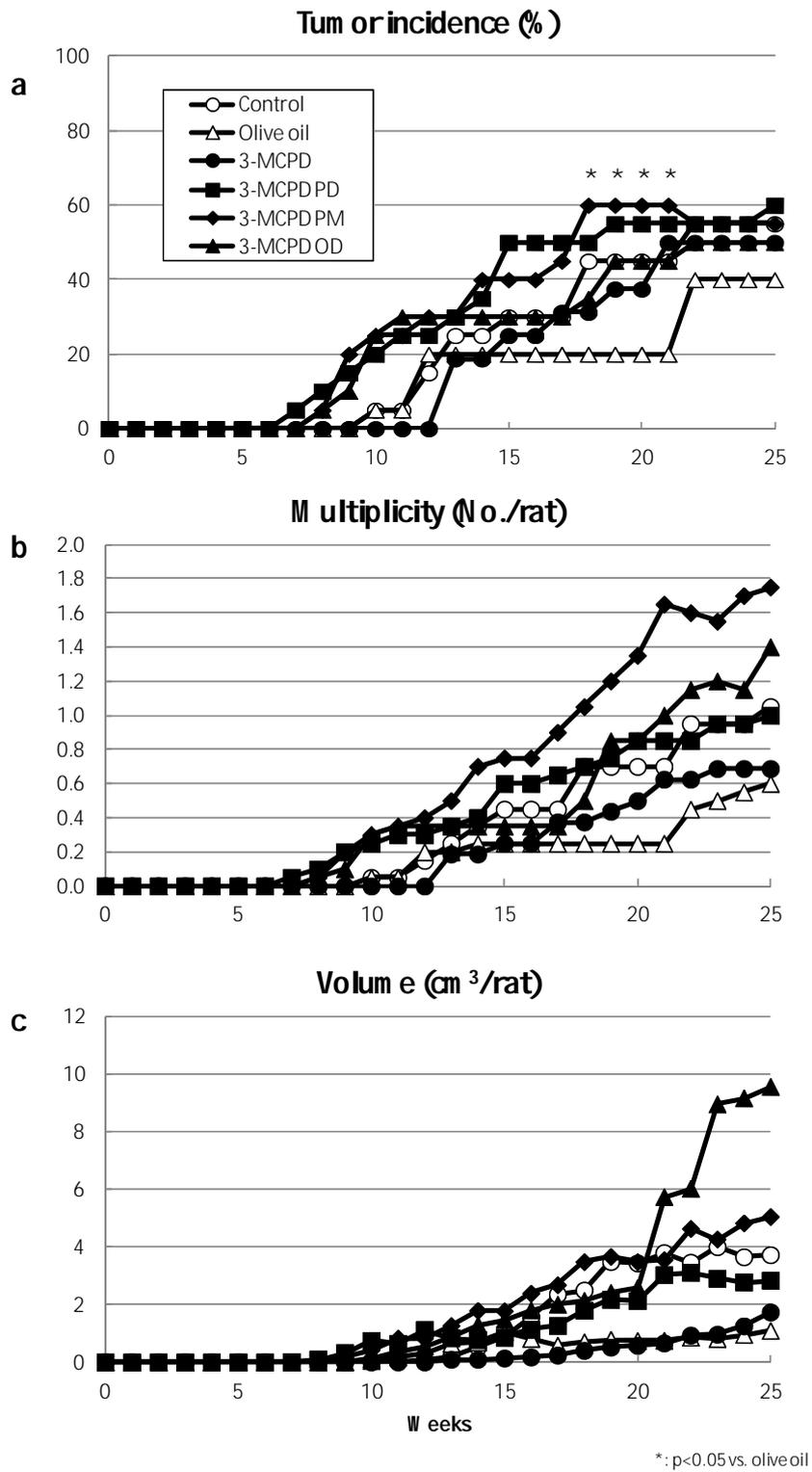


Figure 4 Sequential changes in the incidence, multiplicity and volume of palpable mammary tumors of SD rats treated with MNU followed by 3-MCPD or 3-MCPDEs administration

Table 1 Water consumption and test chemical intake of FSD rats treated for 26 weeks after MNU administration

Group	Water consumption (g/kg/day)	Test chemical intake (µg/kg/day)
Control	142	-
Tween 80	172	-
Glycidol	73	43
Glycidol oleate	159	427
Glycidol linoleate	145	334

Each value represents the mean throughout the experimental period

Table 2 Final body weight and organ weights of FSD rats treated with MNU followed by glycidol or GE administration

	Control	Tween 80	Glycidol	Glycidol oleate	Glycidol linoleate
No. of animal	17	18	17	16	17
Body weight (g)	340 ± 30 ^a	344 ± 40	293 ± 31 ^{**#}	324 ± 48	357 ± 44
Absolute					
Liver (g)	12 ± 3	12 ± 1	11 ± 2	14 ± 10	11 ± 1
Kidneys (g)	2.5 ± 1.0	2.3 ± 0.2	2.5 ± 0.4	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.3
Thyroids (mg)	28 ± 6	29 ± 4	24 ± 5 [#]	27 ± 5	28 ± 4
Relative					
Liver (%)	3.5 ± 0.7	3.4 ± 0.4	3.7 ± 0.6	4.2 ± 2.7	3.2 ± 0.4
Kidneys (%)	0.72 ± 0.21	0.67 ± 0.07	0.85 ± 0.16 [#]	0.73 ± 0.11	0.69 ± 0.10
Thyroids (%)	8.1 ± 1.4	8.4 ± 1.3	8.1 ± 1.7	8.5 ± 1.6	7.8 ± 1.2

^a: Mean ± SD.

^{*}, ^{**}: p<0.05 and p<0.01 vs. control, respectively

[#]: p<0.01 vs. tween 80

Table 3 Incidence, multiplicity and volume of histopathologically diagnosed mammary tumors of FSD rats treated with MNU followed by glycidol or GE administration

Treatment	No. of animal	Incidence (%)	Multiplicity (No./rat)	Volume (cm ³ /rat)
Control	20	16 (80)	4.6 ± 4.3 ^a	6.5 ± 10.4
Tween 80	20	17 (85)	4.9 ± 4.5	7.1 ± 9.2
Glycidol	20	20 (100)	10.5 ± 6.8 ^{**#}	19.9 ± 19.8 ^{**#}
Glycidol oleate	20	18 (90)	7.7 ± 5.6	12.2 ± 12.8
Glycidol linoleate	20	18 (90)	3.3 ± 2.4	4.0 ± 5.9

^a: Mean ± SD.

^{*}, ^{**}: p<0.05 and 0.01 vs. control, respectively

[#]: p<0.05 vs. tween 80

Table 4 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 5 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.