

平成 15 年度

健康食品等に係わる試験検査の実施について

「ジアシルグリセロール (DAG) の大腸がん促進作用試験」

機関名及び所属

国立がんセンター研究所
がん予防基礎研究プロジェクト

研究者氏名

若林 敬二

1. 目的

1,2-ジアシルグリセロールはプロテインキナーゼ C を活性化することから発がんを促進する可能性が考えられるが、大腸発がんに対する in vivo での作用はまだ明らかではない。一方、1,3-体及び 1,2-体の混合比が 7:3 であるジアシルグリセロール(DAG)を含む食品が市販されている。従って、これらの食品を日常の食生活において摂取することが安全であるかどうかを確認する必要がある。そこで、DAG の大腸発がん促進作用の有無を、アゾキシメタンによって誘発されるラットの大腸アベラントクリプト形成及び Apc ノックアウトマウスにおける腸ポリープ形成に対する影響を指標として検討した。

2. 実験方法

1) DAG のアゾキシメタン誘発ラット大腸アベラントクリプトフォーカス(ACF)形成に対する影響

図 1 に示した実験プロトコールのとおり、雄性 F344 ラットに大腸発がん物質 Azoxymethane (AOM)を 15mg/kg 体重で 2 回皮下注射した。被験物質である DAG を AOM 投与の前日より実験終了まで 4 週間、0、1.375、2.75、5.5%の濃度で混餌投与し、大腸をホルマリン固定後、メチレンブルー染色し、顕微鏡下で ACF を観察し、計測した。基礎飼料は AIN-93G を用いた。AIN-93G は通常大豆油を 7%含有するが、本実験では、脂質として大豆油(トリグリセリド、TG)を 5.5%含み、残りはコーンスターチで置き換えた改変 AIN-93G を用いた。DAG 投与群では、DAG の分だけ TG を差し引き、合計で脂質が 5.5%となるようにした。また、当研究室で通常用いている基礎飼料 AIN-76A (脂質はコーン油 5%)との比較も行なった。

実験群

Group A-1 (n=12):	AOM + AIN-76A
Group A-2 (n=12):	AOM + AIN-93G
Group A-3 (n=12):	AOM + AIN-93G-1.375% DAG
Group A-4 (n=12):	AOM + AIN-93G-2.75 % DAG
Group A-5 (n=12):	AOM + AIN-93G-5.5 % DAG

Group B-1 (n=6): Saline + AIN-76A

Group B-2 (n=6): Saline + AIN-93G

Group B-3 (n=6): Saline + AIN-93G-1.35% DAG

Group B-4 (n=6): Saline + AIN-93G-2.75 % DAG

Group B-5 (n=6): Saline + AIN-93G-5.5 % DAG

各群 3 匹は、大腸粘膜を凍結保存。残りはホルマリン固定。

合計 60+30=90 匹 (30 ケージ)

2) DAG の Apc ノックアウトマウスにおける腸ポリープ形成に対する影響

ヒトの家族性大腸腺腫症のモデルマウスであり、Apc 遺伝子に変異を持つ Min マウスは、加齢とともに高トリグリセリド血症を発症する一方、腸にはポリープが自然発生する。Min マウスを用い、腸ポリープ発生に対する DAG の混餌投与 (6 週齢から 15 週齢まで 9 週間) の影響を検討した。また、野生型 (wild-type, WT) のマウスにも同様に DAG の混餌投与を行ない、コントロールとした。

実験群

飼料

Group 1 (male, Min, n=12, WT, n=6): AIN-76A

Group 2 (male, Min, n=12, WT, n=6): AIN-93G

Group 3 (male, Min, n=12, WT, n=6): AIN-93G-1.375% DAG

Group 4 (male, Min, n=12, WT, n=6): AIN-93G-2.75 % DAG

Group 5 (male, Min, n=12, WT, n=6): AIN-93G-5.5 % DAG

3. 実験成績

1) DAG のアゾキシメタン誘発ラット大腸アベラントクリプトフォーカス (ACF) 形成に対する影響

予定どおり、4 週間の動物実験を終了した。

図 2 に実験期間中の摂餌量のグラフを示す。AOM の投与の有無にかかわらず、AIN-76A に比べ AIN-93G の方が摂餌量が多かった。DAG の濃度による差は AOM 非投与群では明らかではなかったが、AOM 投与群では DAG の濃度の高い方が摂餌量が多い傾向がみられた。

体重は図 3 に示すように、AOM 投与群では非投与群より低くなった。また、AOM の投与の有無にかかわらず、AIN-76A に比べ AIN-93G の方が体重が高くなった。DAG の濃度による差はほとんどみられなかったが、AOM 投与群のなかでは高濃度 DAG 群の体重が多い傾向がみられた。DAG による毒性等は特に認められなかった。

解剖時に大腸を摘出し、拡げてホルマリンで固定した。また、血液サンプルを採取し保存した。血清脂質の測定は SRL (株) に依頼した。

1) -1. 大腸の ACF の解析

ホルマリン固定した大腸を 0.2 % メチレンブルー-PBS 溶液で染色し、光学顕微鏡下(x 40)で ACF のカウントを行なった。結果を表 1 に示す。基礎飼料を AIN-93G にした場合、AIN-76A の時よりも、ラット 1 匹当たりの ACF 数は約 2 割減少し、フォーカス当たりの平均アベラントクリプト数も少なかった。AIN-93G を基礎飼料として DAG を 1.375%、2.75%、5.5% の用量で TG と置き換えた場合、ラット 1 匹当たりの ACF 数には有意な変化は認められなかった。ラット 1 匹当たりの総 ACF 数にも有意差は認められなかったが、5.5%DAG 投与群では減少する傾向がみられた。フォーカス当たりの平均アベラントクリプト数は、5.5%DAG 投与群で有意に減少していた。

ACF の発生部位を図 4 に示す。AIN-76A 基礎飼料群で、遠位大腸における ACF の発生が多い傾向がみられた。

フォーカスを構成するアベラントクリプトの数を横軸にとり、ACF のサイズ分布を図 5 に示した。AIN-76A 基礎飼料群は、AIN-93G 基礎飼料群と比較してすべてのサイズにおいて ACF 数が多かった。1.375%、2.75%、5.5%DAG 投与群では、AIN-93G 基礎飼料群に比べ、サイズ 1 の ACF 数は多かったが、サイズ 2 以上の ACF 数は少ない傾向がみられた。

1) -2. 血中脂質の測定

血清中のトリグリセリド、総コレステロール、リン脂質、及び、遊離脂肪酸のレベルを測定した結果を表 2 及び図 6 に示す。

トリグリセリドレベルは、AIN-76A 基礎飼料群で、AIN-93G 基礎飼料群よりも高い傾向がみられた。AOM 処理 AIN-93G 基礎飼料群に比べ、AOM 処理 1.375%

及び 5.5%DAG 投与群ではトリグリセリドレベルの有意な減少がみられた。

総コレステロールレベルは、AOM 処理の有無にかかわらず、AIN-76A 基礎飼料群で、AIN-93G 基礎飼料群よりも有意に高かった。AIN-93G 基礎飼料群に比べ、1.375%及び 5.5%DAG 投与群では総コレステロールレベルがやや低かった。

リン脂質レベルも、AIN-76A 基礎飼料群で、AIN-93G 基礎飼料群よりも高い傾向がみられた。また、AIN-93G 基礎飼料群に比べ、1.375%及び 5.5%DAG 投与群で低かった。

遊離脂肪酸レベルは、AIN-76A 基礎飼料群及び AIN-93G 基礎飼料群で、AOM 処理により無処理に比べて高くなっていた。また、DAG 投与により、AOM 処理群の遊離脂肪酸レベルは減少し、2.75%及び 5.5%DAG 投与では、AOM 処理群のレベルは、無処理群と変わらなかった。

2) DAG の Apc ノックアウトマウスにおける腸ポリープ形成に対する影響

図 7 に示すように、Min マウスの体重は AIN-76A に比べ AIN-93G の方が低く、さらに低濃度及び中濃度 DAG 投与群では 12 週齢より体重減少が認められた。高濃度 DAG 投与群では 10 週齢以降、ほとんど体重増加が見られなかった。また、DAG 非投与 AIN-93G 群でも 11 週齢以降体重が増えず、14 週齢で低下の傾向がみられた。そこで、当初は 20 週齢まで DAG の混餌投与を行なう予定であったが、15 週齢で実験を終了した。解剖時に小腸及び大腸を摘出し、拵げてホルマリンで固定した。また、血液サンプルを採取し保存した。血清脂質の測定は SRL (株) に依頼した。

2) -1. 腸ポリープ数の測定

ホルマリン固定した小腸及び大腸サンプルを実体顕微鏡下で観察し、発生ポリープ数をカウントした。結果を表 3 及び図 8 に示す。AIN-76A 基礎飼料群と AIN-93G 基礎飼料群では、腸ポリープ数に変化はみられなかった。また、1.375%、2.75%、5.5%DAG 投与群では、AIN-93G 基礎飼料群に比べ、腸ポリープの発生数がやや多かったが、用量相関性や有意差は認められなかった。

2) -2. 血中脂質の測定

血清中のトリグリセリド、総コレステロール、及び、遊離脂肪酸のレベルを測定した結果を表 2 に示す。また、コレステロール分画を測定した結果を図 9 に示す。

Min マウスのトリグリセリドレベルは、野生型マウスに比べ、AIN-76A 基礎飼料群で 4.4 倍、AIN-93G 基礎飼料群で 9 倍高かった。また、1.375% 及び 5.5% DAG 投与群で、トリグリセリドレベルの平均値が 3、4 割高かったが、ばらつきが大きく有意差は認められなかった。

総コレステロールレベルは、野生型マウスに比べ Min マウスで 2、3 割高く、また、5.5% DAG 投与群で、約 25% 高かったが、有意差はみとめられなかった。遊離脂肪酸レベルも、野生型マウスに比べ Min マウスでやや高く、また、5.5% DAG 投与で、やや増加したが、有意差はみとめられなかった。

コレステロール分画を測定した結果、AIN-76A 基礎飼料群と同様に AIN-93G 基礎飼料群でも、Min マウスでは野生型マウスに比べ、VLDL コレステロールと LDL コレステロールの割合が高く、HDL コレステロールの割合が低かった。また、DAG 投与は、野生型マウスのコレステロール分画値に影響を与えなかったが、Min マウスでは VLDL コレステロールの割合を上げる傾向がみられた。

4. 考察

DAG のアゾキシメタン誘発ラット大腸アベラントクリプトフォーカス (ACF) 形成に対する影響を調べた結果、ラット 1 匹当たりの ACF 数には有意な変化は認められなかった。ACF 数はどの用量でも増えてはおらず、1.375% と 5.5% ではやや少なかった。5.5% DAG 投与群では、ラット 1 匹当たりの総 ACF 数も、少ない傾向がみられ、フォーカス当たりの平均アベラントクリプト数も有意に減少していた。これらの結果から、DAG はラット大腸 ACF 形成を促進せず、むしろ ACF の増殖を抑制すると考えられ、大腸発がんに対して抑制的に作用する可能性が示唆された。

一方、DAG の Apc ノックアウトマウスである Min マウスにおける腸ポリープ形成に対する影響を調べた結果、用量相関性や有意差は認められなかったものの、腸ポリープの発生数がやや多かった。よって、DAG は Min マウスにおける腸ポリープ形成に対し、少なくとも抑制作用はもたず、かえって促進する可能性が示唆された。

以上のように、大腸発がんへの影響を調べるこれら 2 つの実験系において、

異なった結果が得られた。興味深いことに、これらの実験において DAG は、血清中のトリグリセリドレベルに対しても、異なる影響を示した。ラットの実験では 1.375% 及び 5.5% DAG 投与によりトリグリセリドレベルが低下したのに対し、マウスの実験では逆にやや高かった。これまでに、トリグリセリドレベルと大腸がんのリスクが相関するという疫学的研究の報告があり^{1), 2)}、また、Min マウスでは、PPAR- α や γ のリガンドの投与によって、トリグリセリドレベルが抑えられるとともに、腸ポリープの発生も抑制された^{3), 4)}。その観点では、今回の 2 つの実験はどちらも、トリグリセリドレベルと ACF 又は腸ポリープへの影響に相関性があると考えられた。

今回、ラットとマウスでどうして DAG の影響が異なったのかは不明であるが、種差による違いや Apc 遺伝子ヘテロ欠損による脂質代謝への影響などが関与している可能性が考えられる。今後、マウスにおいても DAG 投与によりアゾキシメタン誘発大腸 ACF の発生・増殖が抑制されるのか、それとも促進されるかどうかを検討する必要があると思われる。

5. 結論

アゾキシメタン (AOM) 誘発ラット大腸アベラントクリプトフォーカス (ACF) 形成に対し、DAG 投与は促進作用を示さず、5.5% DAG 投与では、ACF の増殖をやや抑制することがわかった。また、5.5% DAG 投与は血清中のトリグリセリドレベルを減少させ、AOM 処理による遊離脂肪酸の上昇も抑えた。これらの脂質レベルの低下が ACF の増殖抑制に関与している可能性が考えられる。

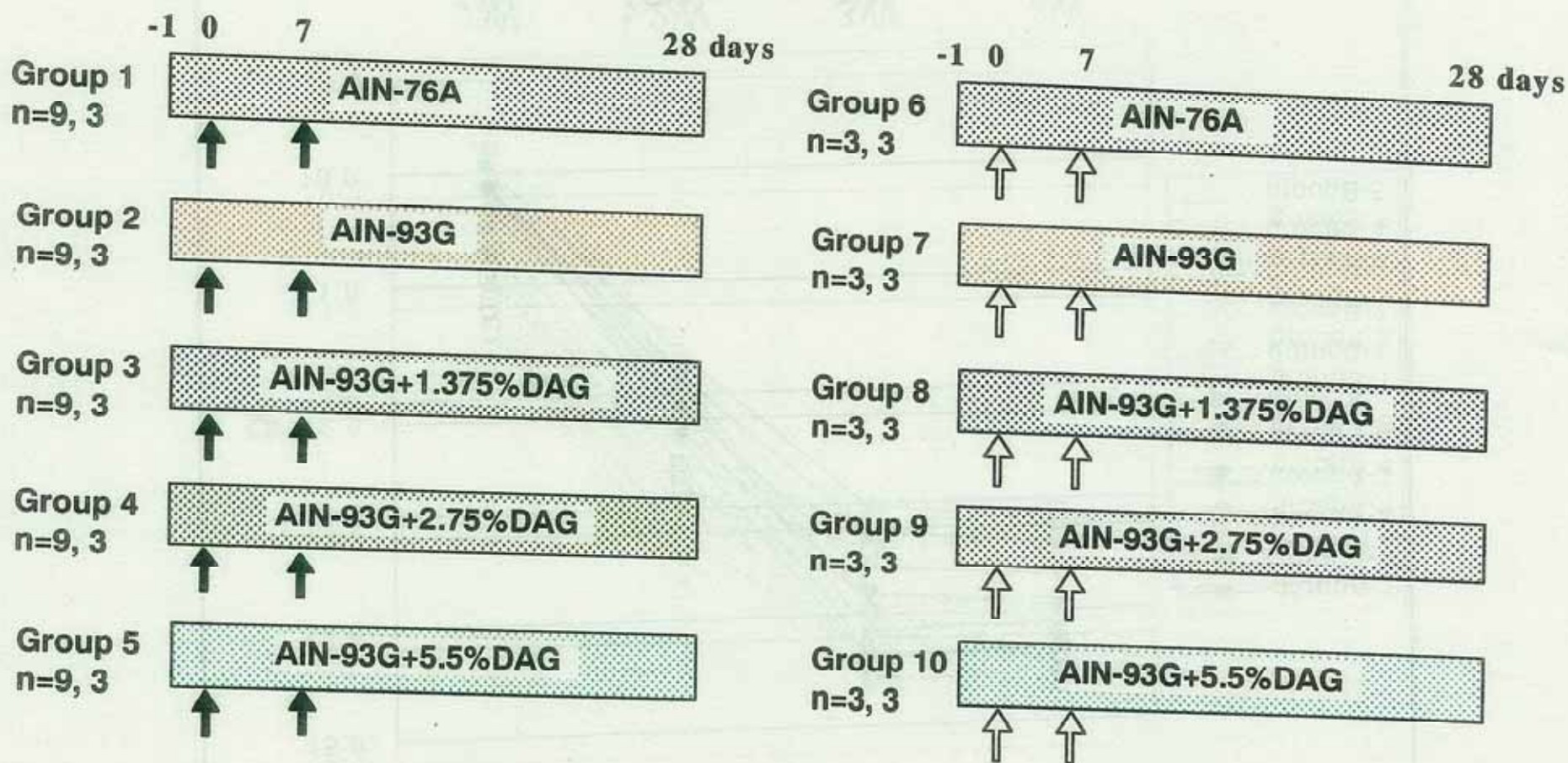
一方、Apc ノックアウトマウスにおける腸ポリープ形成に対しては、DAG 投与は抑制作用を示さず、1.375% 及び 5.5% DAG 投与でポリープ数をやや増加させた。また、1.375% 及び 5.5% DAG 投与で、ラットの場合とは逆に血清中のトリグリセリドレベルはやや高く、さらに、5.5% DAG 投与は総コレステロール値及び VLDL コレステロールの割合を上げる傾向がみられた。

これら 2 つの実験系において、相反する結果が得られたことから、DAG の大腸発がんへの影響について結論するには至らなかった。しかしながら、血清中のトリグリセリドレベルへの影響と前がん病変への影響には相関があると考えられた。ラットとマウスで DAG の影響が異なることより、今後、さらなる検討が必要であると思われる。

6. 引用文献

- 1) McKeown-Eyssen G. (1994) Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 3: 687-695.
- 2) Yamada, K., Araki, S., Tamura, M., Sakai, I., Takahashi, Y., Kashiwara, H., Kono, S. (1998) Relation of serum cholesterol, serum triglycerides and fasting plasma glucose to colorectal carcinoma *in situ*. *Int. J. Epidemiol.*, 27: 794-798.
- 3) Niho, N., Takahashi, M., Kitamura, T., Shoji, Y., Itoh, M., Noda, T., Sugimura, T., Wakabayashi K. (2003) Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Apc deficient mice by PPAR ligands. *Cancer Res.*, 63: 6090-6095.
- 4) Niho, N., Takahashi, M., Shoji, Y., Takeuchi, Y., Matsubara, S., Sugimura, T., Wakabayashi K. (2003) Dose-dependent suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Min mice by pioglitazone, a PPAR γ ligand. *Cancer Sci.*, 94: 960-964.

Experimental Design

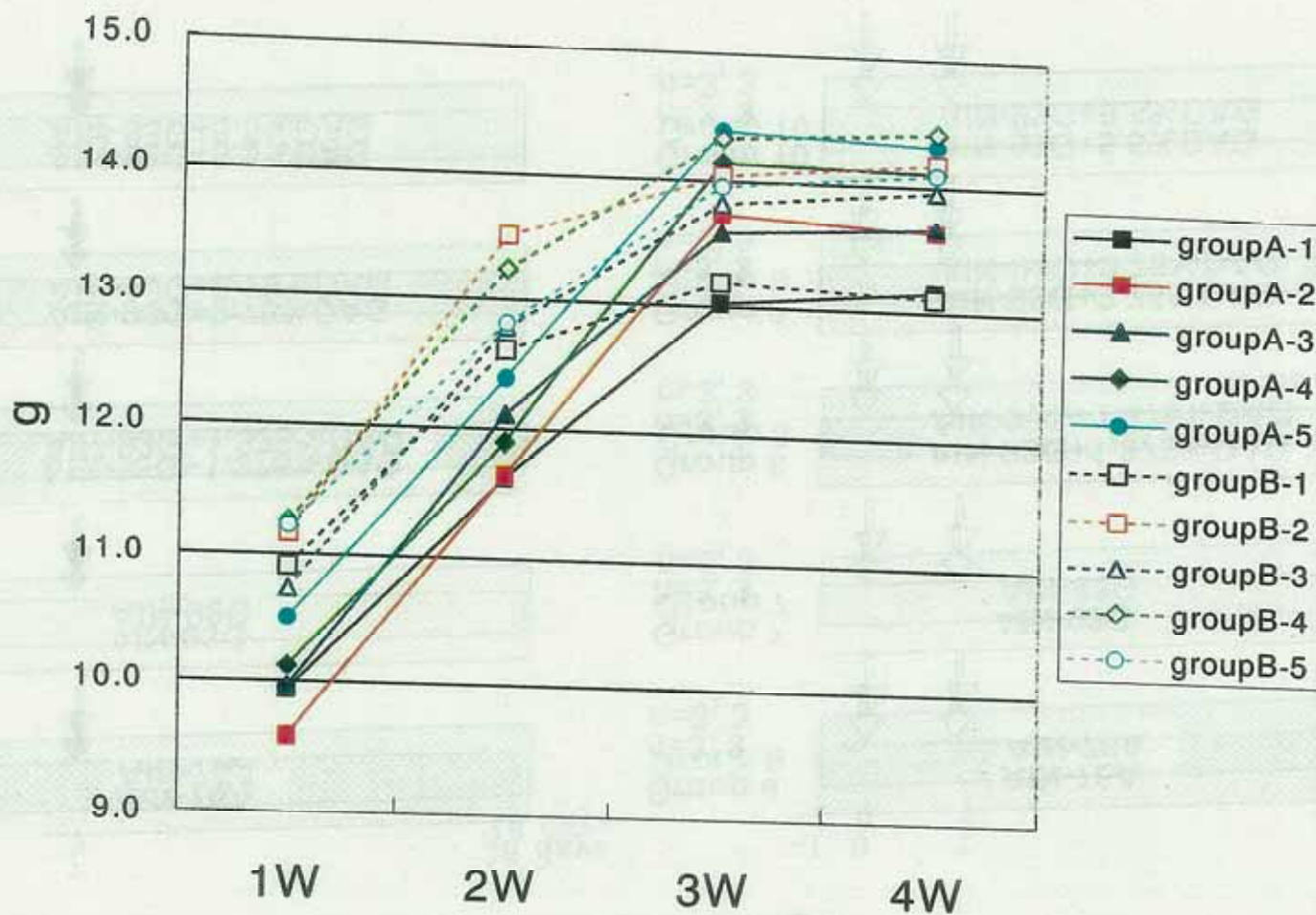


Animals: A total of 90 male F344 rats, 6-weeks old

↑ : 15 mg/kg b.w. of AOM, s.c.

↑ : Saline, s.c.

Food Intake



BW

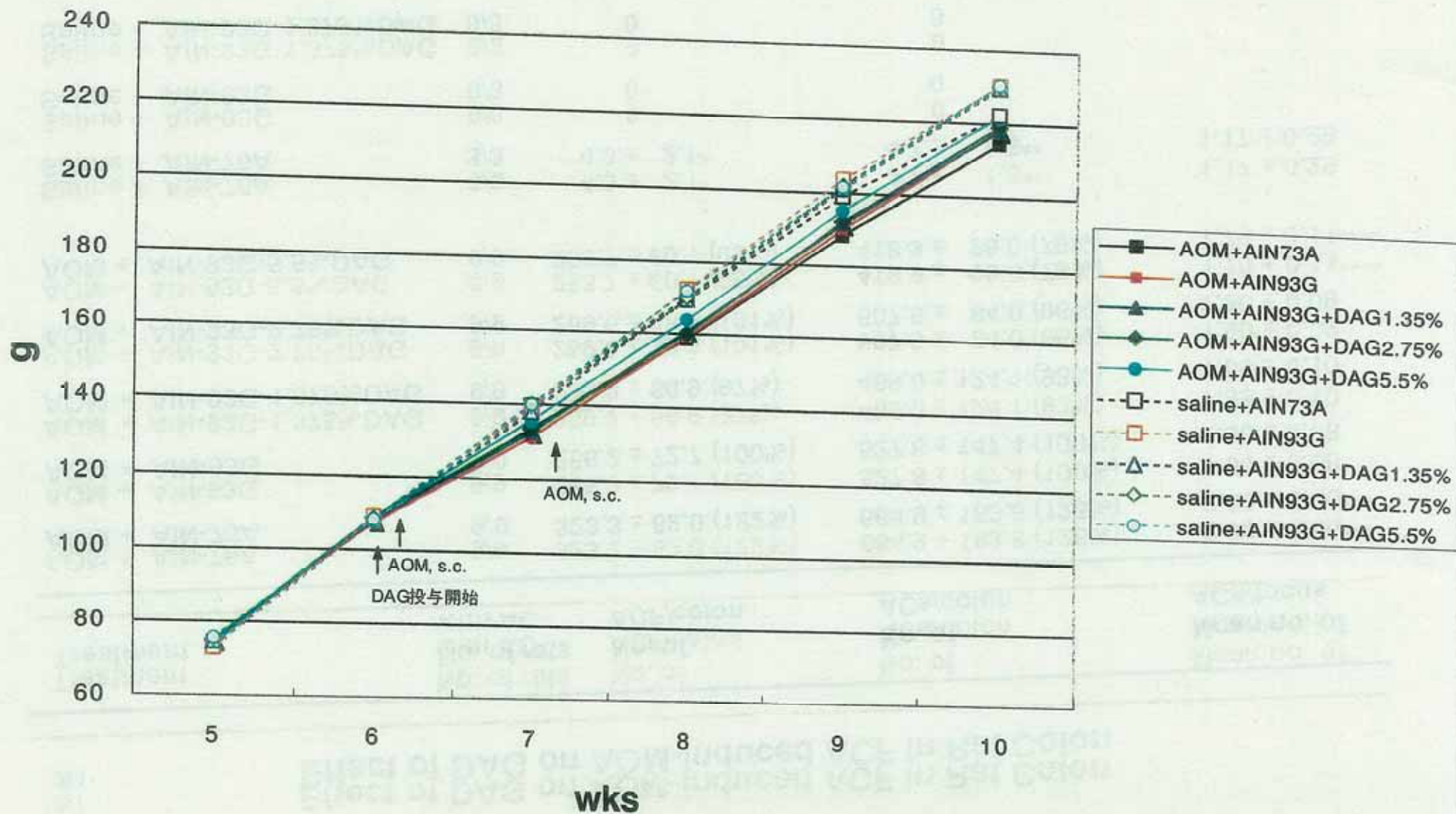


表1

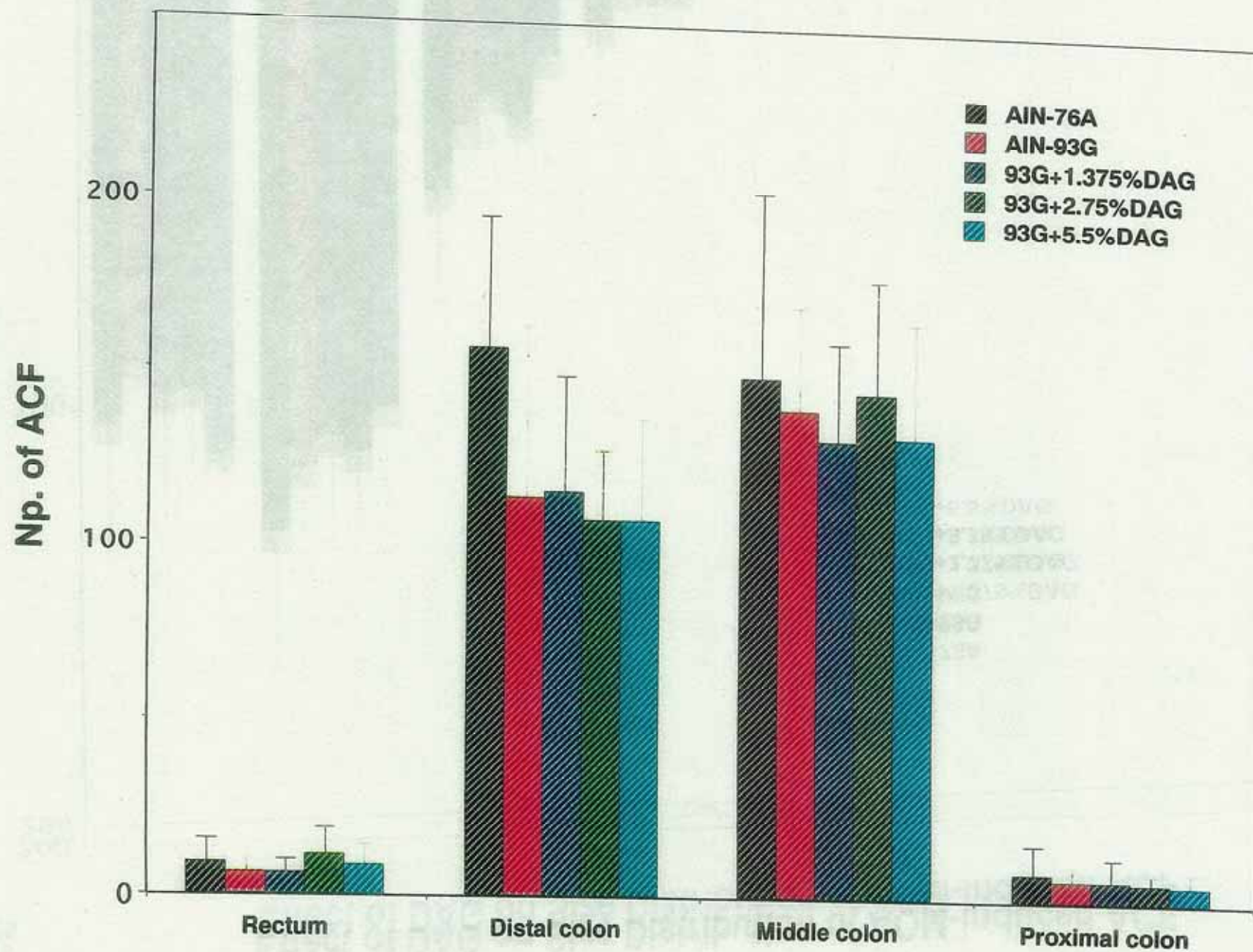
Effect of DAG on AOM-induced ACF in Rat Colon

Treatment	No. of rats with AC	No. of ACF/colon	No. of ACs/colon	Mean no. of ACs/focus
AOM + AIN-76A	9/9	323.3 ± 82.0 (122%)	664.9 ± 183.5 (126%)	2.02 ± 0.06***
AOM + AIN-93G	9/9	266.2 ± 72.7 (100%)	527.8 ± 147.4 (100%)	1.90 ± 0.08
AOM + AIN-93G-1.375%DAG	9/9	259.2 ± 60.9 (97%)	489.0 ± 124.1 (93%)	1.85 ± 0.10
AOM + AIN-93G-2.75%DAG	9/9	269.6 ± 38.3 (101%)	507.5 ± 84.0 (96%)	1.90 ± 0.09
AOM + AIN-93G-5.5%DAG	9/9	253.7 ± 60.1 (95%)	418.9 ± 98.0 (79%)	1.70 ± 0.11****
Saline + AIN-76A	3/3	4.3 ± 2.1*	4.7 ± 1.5**	1.17 ± 0.29
Saline + AIN-93G	0/3	0	0	-
Saline + AIN-93G-1.375%DAG	0/3	0	0	-
Saline + AIN-93G-2.75%DAG	1/3	0.3 ± 0.6	0.3 ± 0.6	1.00
Saline + AIN-93G-5.5%DAG	0/3	0	0	-

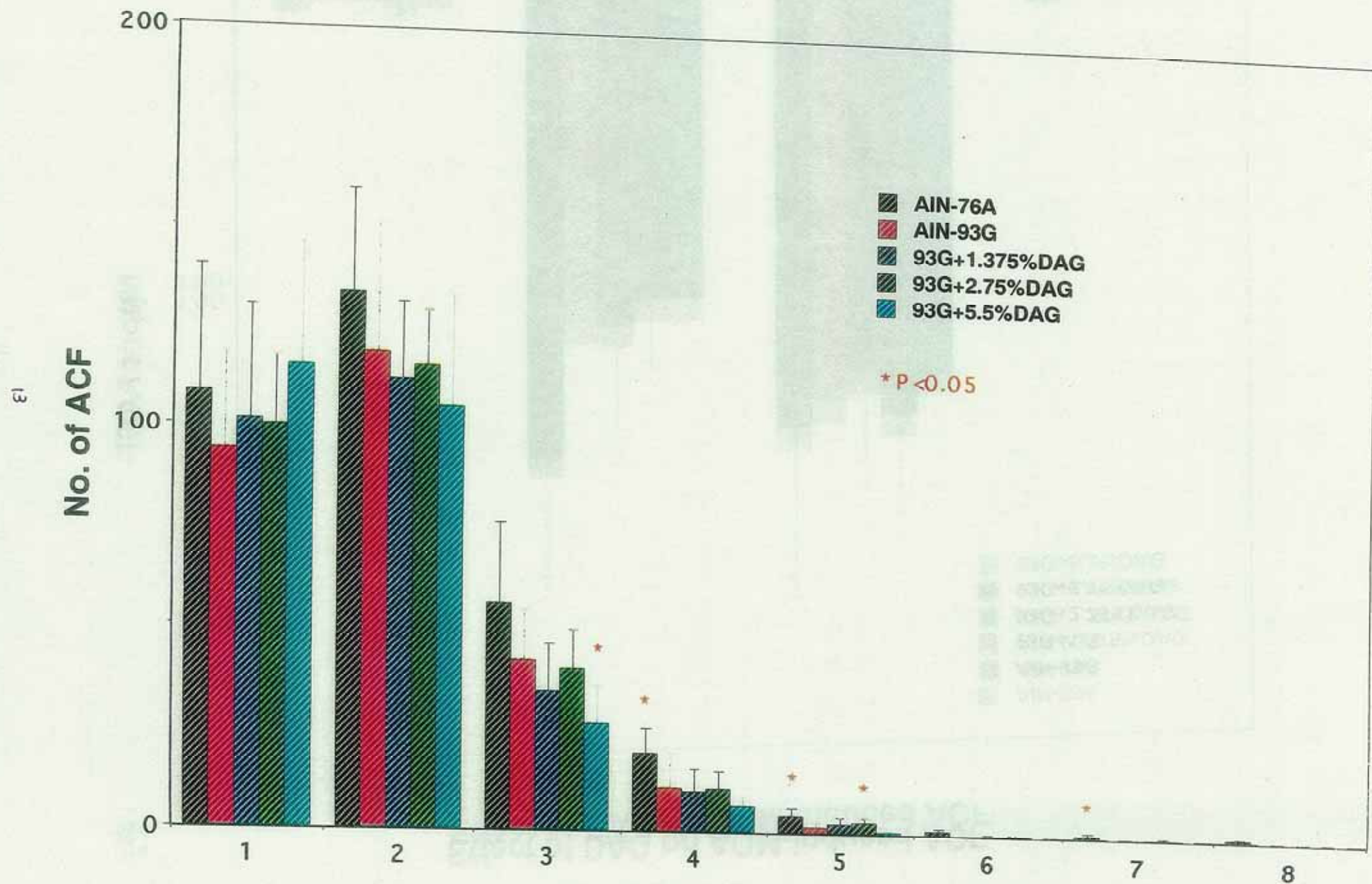
Average ± SD * , ** , *** , ****: P<0.05, P<0.001, P<0.005, P<0.001.

Fig 4

Effect of DAG on AOM-induced ACF



Effect of DAG on Size Distribution of AOM-induced ACF



Effect of DAG on Serum Lipid Levels in Rats

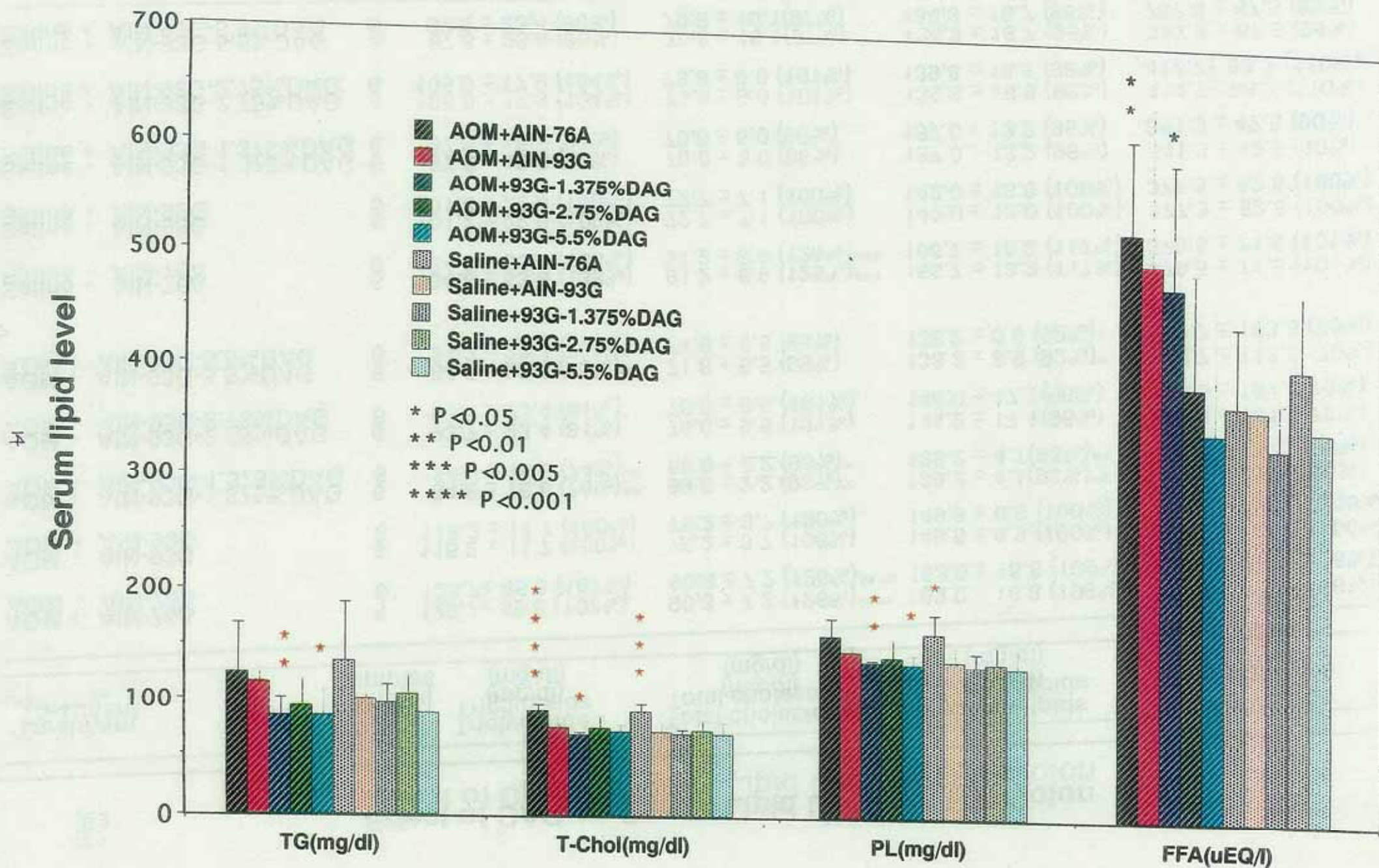


表2

Effect of DAG on Serum Lipid Levels in Rat Colon

Treatment	No. of samples	Triglyceride (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Phospholipids (mg/dl)	Free fatty acids (μ EQ/l)
AOM + AIN-76A	6	123.7 $\pm$ 45.8 (107%)	90.3 $\pm$ 7.2 (126%)****	163.0 $\pm$ 16.8 (109%)	530.8 $\pm$ 87.1 (106%)
AOM + AIN-93G	6	115.2 $\pm$ 11.7 (100%)	75.2 $\pm$ 3.7 (100%)	149.5 $\pm$ 6.5 (100%)	501.8 $\pm$ 146.3 (100%)
AOM + AIN-93G-1.375%DAG	6	84.8 $\pm$ 16.6 (74%)**	69.8 $\pm$ 2.2 (93%)*	139.2 $\pm$ 4.1(93%)**	481.2 $\pm$ 117.2(96%)
AOM + AIN-93G-2.75%DAG	6	93.7 $\pm$ 23.4 (81%)	76.0 $\pm$ 9.9 (101%)	144.0 $\pm$ 17.1(96%)	394.8 $\pm$ 101.0(79%)
AOM + AIN-93G-5.5%DAG	6	84.3 $\pm$ 23.4 (73%)*	71.8 $\pm$ 6.5 (95%)	138.2 $\pm$ 8.9 (92%)*	352.7 $\pm$ 113.5 (70%)
Saline + AIN-76A	6	134.8 $\pm$ 53.6 (133%)	91.2 $\pm$ 6.9 (125%)***	166.7 $\pm$ 18.2 (117%)*	379.5 $\pm$ 71.5 (101%)
Saline + AIN-93G	6	101.2 $\pm$ 22.6 (100%)	72.7 $\pm$ 7.1 (100%)	142.0 $\pm$ 13.0 (100%)	377.3 $\pm$ 82.5 (100%)
Saline + AIN-93G-1.375%DAG	6	97.5 $\pm$ 16.6 (96%)	70.0 $\pm$ 6.0 (96%)	137.0 $\pm$ 13.2 (96%)	341.3 $\pm$ 42.5 (90%)
Saline + AIN-93G-2.75%DAG	6	105.0 $\pm$ 17.9 (104%)	73.8 $\pm$ 9.0 (101%)	139.8 $\pm$ 16.8 (98%)	414.7 $\pm$ 66.3 (110%)
Saline + AIN-93G-5.5%DAG	6	87.5 $\pm$ 23.4 (86%)	70.8 $\pm$ 10.1(97%)	134.3 $\pm$ 18.7 (95%)	357.8 $\pm$ 67.5 (99%)

Average $\pm$ SD

*, **, ***, ****: P<0.05, P<0.001, P<0.005, P<0.001.

Body Weight Change

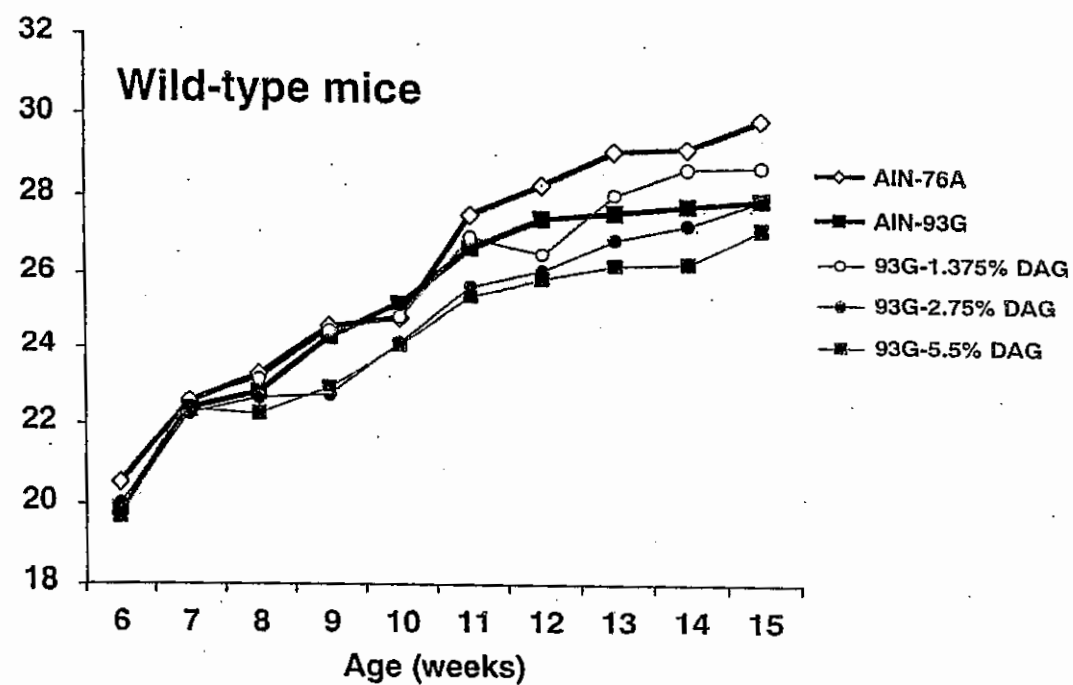
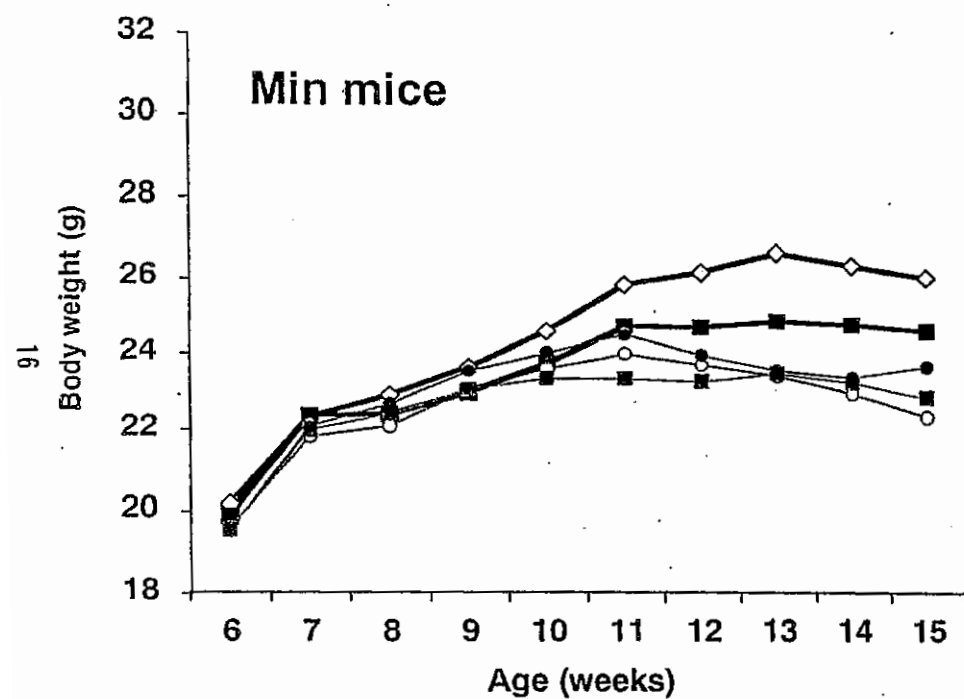


表 3

Effect of DAG on Intestinal Polyp Development in Min Mice

Treatment	No. of mice	No. of polyps/mouse				
		Small intestine			Colon	Total
		Proximal	Middle	Distal		
AIN-76A	9	9.4 ± 1.4 ^a	24.0 ± 4.4	50.0 ± 8.9	1.3 ± 0.3	84.8 ± 13.8
AIN-93G	9	9.9 ± 1.1	27.1 ± 4.3	47.0 ± 6.5	0.9 ± 0.4	84.9 ± 10.7 (100%)
93G-1.375% DAG	9	11.2 ± 2.0	33.3 ± 5.3	52.2 ± 7.0	1.0 ± 0.2	97.8 ± 14.0 (115%)
93G-2.75% DAG	8	13.4 ± 2.0	26.3 ± 3.5	51.8 ± 7.7	0.9 ± 0.4	92.3 ± 10.0 (108%)
93G-5.5% DAG	9	12.2 ± 3.5	28.2 ± 8.5	54.6 ± 11.5	1.0 ± 0.3	96.0 ± 22.8 (113%)

^a Mean ± SE.

Effect of DAG on Intestinal Polyp Development in Min Mice

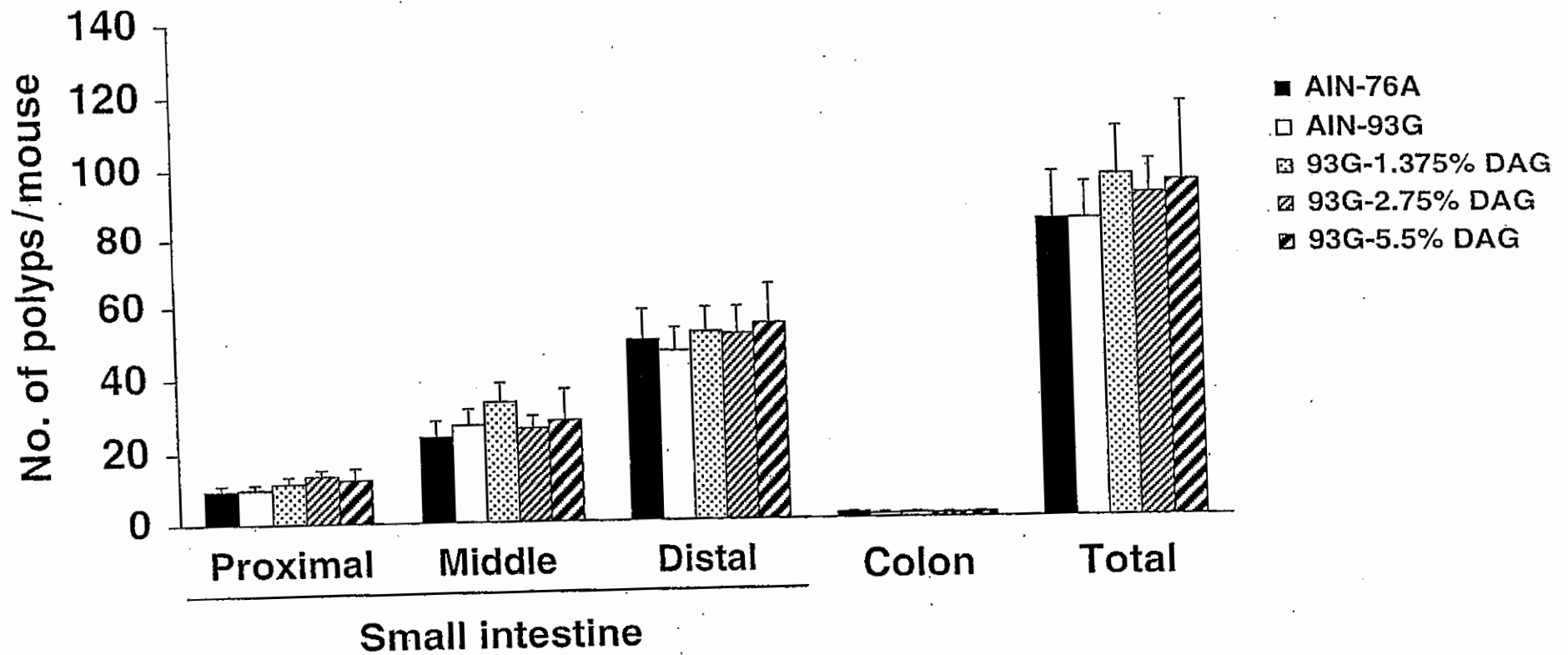


表 4

Effect of DAG on Serum Lipid Levels in Min Mice

Genotype	Treatment	No. of mice	Triglyceride (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Free fatty acids (μ EQ/l)
Min	AIN-76A	12	196.9 $\pm$ 52.7 ^a	99.8 $\pm$ 9.0	893.3 $\pm$ 117.3
	AIN-93G	12	239.5 $\pm$ 64.7 (100%)	96.3 $\pm$ 9.1 (100%)	786.3 $\pm$ 122.1 (100%)
	93G-1.375% DAG	12	354.8 $\pm$ 77.5 (148%)	104.7 $\pm$ 6.4 (109%)	791.4 $\pm$ 73.3 (101%)
	93G-2.75% DAG	11	285.4 $\pm$ 91.1 (119%)	99.1 $\pm$ 10.2 (103%)	766.3 $\pm$ 89.9 (98%)
	93G-5.5% DAG	11	328.9 $\pm$ 95.6 (137%)	119.1 $\pm$ 9.9 (124%)	817.0 $\pm$ 89.4 (104%)
Wild-type	AIN-76A	6	45.2 $\pm$ 15.0	83.2 $\pm$ 26.8	737.5 $\pm$ 169.6
	AIN-93G	6	26.7 $\pm$ 6.9 (100%)	70.8 $\pm$ 17.7 (100%)	691.0 $\pm$ 127.5 (100%)
	93G-1.375% DAG	6	35.8 $\pm$ 10.7 (134%)	65.2 $\pm$ 15.8 (92%)	529.8 $\pm$ 112.6 (77%)
	93G-2.75% DAG	6	27.3 $\pm$ 7.5 (103%)	72.2 $\pm$ 18.8 (102%)	737.0 $\pm$ 129.5 (107%)
	93G-5.5% DAG	6	36.2 $\pm$ 8.4 (136%)	88.3 $\pm$ 18.6 (125%)	815.7 $\pm$ 196.3 (118%)

^a Mean $\pm$ SE.

The Ratios of Cholesterol Lipoproteins

