

高濃度にジアシルグリセロールを含む食品の食品健康影響評価について

1. 経緯

平成13年10月5日、高濃度にジアシルグリセロール(DAG)を含む食品について、特定保健用食品としての表示の許可申請が厚生労働省に対してなされた。

この申請を受けて、平成13年11月26日以来、薬事・食品衛生審議会の新開発食品評価調査会及び新開発食品調査部会において7回にわたり検討が行われ、平成15年6月27日に、同調査部会より、「特定保健用食品として認めることとして差し支えない」とする審議結果が出された。その際、当該食品については、「発がん性を示す所見は認められないが」、「念のために、(発がん)プロモーション作用を観察するため、より感度の高いラット等を用いた二段階試験を行う」とこととし、その試験結果を同調査部会に報告するよう付記された。

平成15年8月5日には、食品安全委員会に対して、食品健康影響評価を依頼し、同年9月11日に、食品安全委員会より厚生労働大臣に対して、「薬事・食品衛生審議会における(当該食品)の特定保健用食品としての安全性の審査の結果は、当委員会として妥当と考える」旨の評価結果が通知された。その際、DAGに係る「二段階試験については、結果がわかり次第、当委員会にも報告されたい」旨の付記がなされた。

このような薬事・食品衛生審議会及び食品安全委員会での審議や評価の結果を踏まえて、平成15年9月25日に特定保健用食品表示の許可を行った。

その後、本年8月4日に、二段階試験の結果の報告という付記を受けて行われてきた研究等の状況について、その要旨を食品安全委員会に中間報告したところである。このとき、中間報告された研究等のうち、舌、食道、乳腺発がん高感受性ヒトプロト型c-Ha-ras遺伝子組換えラットを用いた試験においては、「(DAGの)発がんプロモーション作用が示唆された」が「本実験からは健康危険情報については結論しえない。追加実験が望まれる」とされた。

この中間報告以降、厚生労働省としては、追加試験を計画する課程において、DAGに関する内外の新たな知見を入手した。同時に、一部の消費者の間では、中間報告された研究結果に対する関心が高まりつつある。中間報告以後のこのような情勢の変化を背景に、今般、新たな知見や8月4日に中間報告した研究等の詳細に基づき、高濃度のDAGを含む食品の食品健康影響評価を依頼することにした。

なお、今後の追加試験計画を立てるにあたり、特殊な遺伝子組換えラットを安全性の評価を目的として用いることの妥当性やそのラットを用いた試験結果の評価方法について、ご意見があれば伺いたい。

2. ジアシルグリセロールについて

ジアシルグリセロール (DAG) とは、グリセリンに 2 本の脂肪酸がエステル結合したもので、ほとんどの一般食用油にも数%程度は含まれている成分である。なお、一般的な食用油の主成分は、グリセリンに 3 本の脂肪酸が結合したトリアシルグリセロール (TAG) である。

DAG には体に脂肪がつきにくい働きが認められており、高濃度の DAG を関与成分とする特定保健用食品が許可され、販売されている。

3. 今後の方向

食品安全委員会の食品健康影響評価を受けて、国民に十分な情報提供を行うほか、適切なリスク管理措置を講じていくこととしている。

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

ジアシルグリセロールの発がんプロモーション作用に関する

研究

平成 15 年度 総合研究報告書

主任研究者 飯郷正明

平成 17 (2005) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告

ジアシルグリセロールの発がんプロモーション作用に関する
研究----- 1

飯郷正明

II. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 42

III. 研究成果の刊行物・別刷----- 46

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
総合研究報告書

ジアシルグリセロールの発がんプロモーション作用に関する研究

主任研究者 飯郷 正明 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・室長

研究要旨 「体に脂肪がつきにくい食用油」ジアシルグリセロール (“DAG”) に含まれる 1,2-DAG は、細胞内でプロテインキナーゼ (protein kinase) C を活性化させる物質であり、発がんプロモーターである可能性が指摘されている。本研究では舌、食道、胃、乳腺および他の臓器における “DAG” の発がん亢進・プロモーション作用に対する影響を、舌、乳腺などの発がん高感受性ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニック (Hras 128) ラット (Tg) およびその同腹野生型ラットを用いて検討した。これら雌雄ラットを用い、発がんイニシエーション処置として 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) 10 ppm を実験開始時より 10 週間飲水投与した。このイニシエーション期間およびその後の 10 週間のポストイニシエーション期間の合計 20 週間、“DAG” を高用量 (5.5% “DAG” + 0% トリアシルグリセロール {TAG})、中用量 (2.75% “DAG” + 2.75% TAG)、低用量 (1.375% “DAG” + 4.125% TAG) の 3 用量で自由摂取させた。体重、摂餌量、摂水量とも全ての群で顕著な差は見られなかった。腫瘍発生においては、雄 Tg ラットの舌の扁平上皮がんの頻度および数の傾向解析において、亢進・プロモーション作用が示唆された。雌 Tg および雌雄の野生型では有意差は認められなかった。この結果を確認するために当トランスジェニックおよび野生型ラットを用いた今回よりも高用量、長期間の実験が必要と考えられる。

A. 研究目的

一般の食用油成分は triacylglycerole

(TAG)、つまり三つの脂肪酸がグリセリンとエステル結合した形で存在する。しかし、その三つの脂肪酸のうち一つを欠く

diacylglycerol (DAG)は植物油成分中に数%存在し、二つの脂肪酸とグリセリンとのエステル結合の位置が異なる 1,2-および 1,3-DAG が存在する。それらは自然界では 3 : 7 の比で存在する。通常食べる油 TAG は、小腸で脂肪分解酵素リパーゼによって 2-モノアシルグリセロールと脂肪酸に分解、そして吸収される。吸収された脂肪酸と 2-モノアシルグリセロールはまた小腸上皮細胞において TAG に再合成され体内に運搬されて利用される。一方、1,3-DAG は小腸で消化分解を受けると、2-モノアシルグリセロールが生成されないために、吸収後に TAG への再合成がほとんど行われない。そのために中性脂肪への転化が少ないと考えられ、これを主成分とした「体に脂肪がつきにくい食用油」("DAG") が市販され広く使われている。脂肪酸組成の大きな違いはないが(表1)、"DAG"には 1,3-DAG の他、脂肪酸の置換部位の異なる 1,2-DAG が 30% 程含まれている。1,2-DAG は、生体内では phospholipase C (PLC) により phosphatidyl inositol bisphosphate (PIP₂) から生成され、発がんプロモーターである 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) と同様に細胞内で protein kinase C (PKC) を活性化させる物質であり、TPA タイプの発がんプロモーターとして作用する可能性が危惧されている。さらに 1,2-DAG は細胞内では Ras guanyl nucleotide-releasing protein (Ras-GRP) を活性化し、Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードに関わることが明らか

になっている。5.3% "DAG" は SD ラットにおける 2 年間の慢性毒性試験で発がん性は認められておらず (M.G. Soni, et al. Food and Chemical Toxicology, 39, 317-329, 2001)、また SD ラットの DMBA 誘発乳がんに対し、7.0% "DAG" の混餌投与 90 日間の実験では、プロモーション作用を示さないことが報告されている (M. Sugano, et al. J. Oleo Sci., 51, 583-588, 2002)。本研究では、"DAG" の Ras 活性化作用との関連から、津田らによって作製された舌、食道、乳腺発がん高感受性ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニック (Tg) ラットを用いて、"DAG" の発がん亢進 (4NQO と同時投与) およびプロモーション (4NQO 投与後に投与) について、特に "DAG" が代謝分解されることなく直接暴露されると考えられる舌、食道および前胃に注目し、発がん亢進・プロモーション作用について検討し、リスク評価に対するより具体的な情報を提供することを目的とした。

B. 研究方法

化学発がん高感受性である Tg とその同腹の野生型ラットを用いた。6 週齢雌雄に 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) を 10 ppm の用量で 10 週間飲水投与による発がんイニシエーション処置を行った。このイニシエーション期間とその後のポストイニシエーション期間 (10 週間) に "DAG" 含有基礎飼料を計 20 週間自由に摂取させた後、屠殺し、主として舌、食道、乳腺及び他の臓器における腫瘍発生

におけるプロモーション作用の有無について検討した(図1)。“DAG”の基礎食中濃度は5.5%、2.75%および1.375%の3用量とし、総脂質量を5.5%に統一するために、2.75%および1.375%群では残りの脂肪酸を大豆油:菜種油(7:3)で調整し、すべての群で脂肪酸組成をほぼ一定になるようにした。対照群は4NQO投与後通常の基礎食(改変AIN-93G, 5.5%TAG)投与群とし、屠殺後肉眼的に病変の有無を観察し、舌、食道、胃(前胃、腺胃)、小腸、大腸、肝、腎を採取、固定し、舌、食道、胃、乳腺については全動物より、他は肉眼的に病変のある臓器より病理標本を作製した。また、“DAG”自体のこの系における毒性をみるために、“DAG”5.5%単独群とTAG5.5%群を併設した。雌雄のTgおよび野生型の各群構成は15(雌)および16(雄)匹とした(合計24群、372匹)。また主要臓器の毒性評価のために定期的な体重測定、屠殺時の血清生化学的検査を行った。

(倫理面への配慮) 動物実験を実施するにあたり、国立がんセンター研究所実験動物取扱規程を遵守し適切な処置を行った。特に屠殺の際には、最大限に動物の苦痛軽減に努め、動物愛護の精神を充分考慮に入れて行った。

C. 結果

C-1.“DAG”摂取による体重、摂餌量および摂水量に対する影響

雌雄ラットに対し実験開始時より4NQO 10 ppm を飲水投与し同時に“DAG”混餌試料を高用量(5.5% “DAG” + 0% TAG)、中用量(2.75% “DAG” + 2.75% TAG)、低用量(1.375% “DAG” + 4.125% TAG)の3用量で自由摂取させた。体重、摂餌量、摂水量とも全ての群で顕著な差は見られなかった(前年度報告済み)。

C-2.“DAG”による血液生化学性状への影響

血液生化学性状に対するDAGの影響を、4NQO投与群間では4NQO+0% “DAG”すなわち5.5%TAG(対照群)と比較し、4NQO非投与群間では5.5% “DAG”のみ投与した群と無処置群(5.5%TAG)とを比較した。血清トリグリセライド(TG)値は、雄Tgの4NQO+5.5% “DAG”投与群が4NQOのみ投与群に比し有意に低下した。4NQO非投与群間では無処置群に比し5.5% “DAG”投与群で有意に増加した。遊離脂肪酸(FFA)は、雌野生型で4NQO+2.75% “DAG”投与群が4NQO+0% “DAG”(対照群)に比し有意に高かった。肝機能では雄Tgで4NQO+5.5% “DAG”群が対照群に比しGOTが有意に高かった。雌野生型でも4NQO+5.5% “DAG”群が対照群に比し有意に高かった。またこの群はGPT値も有意に高かった(表2)。

C-3. 発がん

C-3-1. 舌

4NQOの舌発がん発生に対する“DAG”

の影響を、対照の 4NQO+0% “DAG”すなわち 5.5%TAG 群と比較した（表 3～10）。Tg ラット雄において、どの“DAG”群においても扁平上皮乳頭腫（乳頭腫）の発生率（図 2）は、対照群と比較して、有意差は見られなかった。扁平上皮がん発生率は（図 3）、5.5% “DAG”で 43.8%であり 4NQO のみ投与した対照群の 12.3%と比べ 3.6 倍に増加したが、有意差はみられなかった。しかし、発生頻度の用量相関の傾向検定において、有意な用量相関が認められた（コクラン・アミテージ傾向検定、 $P=0.0352$ ）（表 3）。この結果から、用量に相関して扁平上皮がんの発生率が増加することが考えられた。さらにラット 1 匹当たりの扁平上皮がんおよび乳頭腫と扁平上皮がんの合計の個数においても、用量に相関した有意な増加がみられた（線形回帰分析、各々 $P=0.0184$ 、 $P=0.0259$ ）（表 4）。しかし、雄ラットの野生型では 4NQO と“DAG”的投与群（第 1、2、3 群）で腫瘍が少數発生したが有意な増加ではなかった（表 5、6）。一方、雌においては、Tg および野生型共に“DAG”的影響は見出せなかった（表 7～10）。

C-3-2. 胃

4NQO 投与群の前胃に扁平上皮乳頭腫とがんが少數の個体に発生し、“DAG”投与群（第 1～3 群）に増加する傾向が見られたが、群間に有意差は見られなかった（表 11～18）。また Tg 群において“DAG”

のみの投与群で 1 匹（1/16）に乳頭腫の発生を見たが有意ではなかった。従って前胃に対する発がん亢進・プロモーション作用は見られなかった。腺胃では腫瘍の発生はなかった。

C-3-3. 乳腺

雌雄において、4NQO の投与による腺腫、腺がんおよび少數の肉腫の発生が見られたが、4NQO のみの群と比較して有意差はなかった（表 19～26）。野生型ではがんの発生はなかった。

C-3-4. 食道

どの群においても 4NQO による食道腫瘍の発生は見られなかった。従って腫瘍発生に対する影響の評価はできなかった。

C-3-5. その他の臓器

その他、小腸、大腸、肝、脾、腎、肺、脾などの臓器では、どの群においても腫瘍発生は見られなかったため評価はできなかった。

D. 考察

“DAG”投与後の血液生化学性状に対する影響としては、トリグリセライド、遊離脂肪酸、GOT、GPT 値に有意な差がみられたが、これらはいずれも用量依存性のない変化か、あるいは正常範囲を大きく逸脱しない変化であり、生理的変動範囲内の変化と判断した。また、トリグリセライドについて雌では Tg 及び野生型共

にどの群も正常範囲を上回っているが、Wolford らのデータによる 10 パーセンタイル～90 パーセンタイル値に収まり、特別に異常な値とは見なさなかった。

これらトリグリセライド、総コレステロール、GOT、GPT、尿素窒素、クレアチニンについてはソフトサイエンス社「実験動物の生物学的特性データ」に依った。

4NQO 発がんに対する“DAG”的発がん修飾作用について、脳を除く主要臓器について詳細に検討した結果、雄 Tgにおいて、DAG の用量に相関して舌扁平上皮がんの発生率と個数が、コクラン・アミテージの傾向検定およびロジスティック回帰の検定において有意な増加($p<0.05$)を示すことが明らかになった。この結果は確認が必要であるが、喫煙習慣のある人などの高危険度群において、舌癌がんプロモーション作用の可能性を示唆するものと考えられる。しかし、4NQO 投与の各群間の解析で、乳頭腫と扁平上皮がんを併せた発生頻度に関して、対照群 (5.5% TAG) と 5.5% “DAG”投与群における分散分析では $p=0.058$ 、ノンパラメトリック検定 (クラスカルワリス検定) では $p=0.090$ となり、有意な差はみられなかった。このことは、各群の動物数が少ないと起因すると考えられた。舌を除く他の消化器臓器や乳腺などに対しては、Tg および野生型とも“DAG”的発がん修飾作用は見られなかった。

このように今回の実験において“DAG”による舌癌がんは傾向検定でのみ有意な

結果であった。さらに群間で有意差が見られるかについては、各群の Tg の動物数を 40～50 匹程度に増やし野生型も含めた 40 週程度の実験期間が必要と思われる。また、舌に直接高濃度の“DAG”が接触するような状態で摂取されること、および条件によっては大量摂取する場合を考慮したリスク評価を行うためには、更に高濃度 (7.5 および 11.0%) の“DAG”濃度における影響を検討する必要があると考えられる。この場合、癌がんプロモーション作用の分かっている同用量のトリグリセライド型リノール酸を併設すればプロモーション作用の程度を評価することができる。

本実験において、雄 Tg における舌癌がん亢進・プロモーション作用が比較的短期間に見出された理由の一つに、この Tg が癌がん高感受性であることが挙げられる。田中ら（金沢医大・病理）によると、舌においては、野生型と比較して、その感受性は雄で 5.4 倍、雌で 4.3 倍と試算されている。これは実験期間の短縮を意味しており、この意味で野生型も加えた実験が必要であろう。

“DAG”および TAG に含まれる脂肪酸の種類と含量はほぼ同じであり、脂肪酸の種類による影響ではない。一般的には TAG および“DAG”は小腸上皮において一つずつの脂肪酸およびモノアシルグリセライド(MAG)に分解された後吸収され、生じた 2-モノアシルグリセロールは上皮細胞にてまた TAG に再合成されることが

知られている。口腔内においても TAG を分解するリバーゼが報告されている。しかし、口腔粘膜においては僅かではあるが“DAG”的まま吸収され、さらに細胞内に移行した可能性が考えられる。“DAG”が細胞内に入ると、1,2-DAG は発がんプロモーターである TPA と同様に、細胞内で PKC を活性化、さらに Ras-GRP を活性化し、Ras/Raf/ MAPK カスケードを動かして細胞増殖を亢進させ、発がん物質（この場合 4NQO）によってイニシエーションを受けた細胞では、発がん亢進とプロモーション作用を発揮することになると考えられる。今後この点に関する作用機序に対し詳細に検討する必要がある。

E. 結論

発がん高感受性トランスジェニックラットを用いて、4NQO の発がんに対する“DAG”的発がんプロモーション作用について検討した結果、雄において、“DAG”が直接接触する舌のみにプロモーション作用を示唆する結果であった。

F. 健康危険情報

本実験からは健康危険情報については結論しえない。結果確認のための追加実験が望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 飯郷正明。転移モデル。生物薬科学実

験講座 13。pp205-217。國元武彦、長繩博編集。廣川書店。東京(2003)

2) Nobuko Shindo-Okada and Masaaki Iigo. Expression of the Arp11 gene suppresses the tumorigenicity of PC-14 human lung adenocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 889-896 (2003)

3) Masaaki Iigo, Mariko Shimamura, Eiji Matsuda, Ken-ichi Fujita, Hiroshi Nomoto, Jun Satoh, Shuji Kojima, David B. Alexander, Malcolm A. Moore and Hiroyuki Tsuda. Orally administered bovine lactoferrin induces caspase-1 and interleukin-18 in the mouse intestinal mucosa: a possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis. *Cytokine*, **25** (1), 36-44 (2004)

4) Mariko Shimamura, Yukio Yamamoto, Hiromi Ashino, Tsutomu Oikawa, Tadahiko Hazato, Hiroyuki Tsuda, and Masaaki Iigo. Bovine lactoferrin inhibits tumor-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer*, **111**, 111-116 (2004)

5) Tetsuyuki Takahashi, Nobuo Takasuka, Masaaki Iigo, David B. Alexander, Masaki Baba, Hoyoku Nishino, Hiroyuki Tsuda, and Toru Okuyama. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, reduces prostaglandin E2 and nitric oxide, causes apoptosis, and suppresses

aberrant crypt foci development. *Cancer Science*, **95**, 448-453 (2004)

6) Ken-ichi Fujita, Eiji Matsuda, Kazunori Sekine, Masaaki Iigo, and Hiroyuki Tsuda. Lactoferrin modifies apoptosis-related gene expression in the colon of the azoxymethane-treated rat. *Cancer Lett.*, **213**: 21-29 (2004)

7) Hiroshi Nomoto, Masaaki Iigo, Hiroki Hamada, Shuji Kojima, and Hiroyuki Tsuda. Chemoprevention of colorectal cancer by grape seed proanthocyanidin is accompanied by a decrease in proliferation and increase in apoptosis. *Nutr. & Cancer*, **49**: 81-88 (2004)

8) Ken-ichi Fujita, Eiji Matsuda, Kazunori Sekine, Masaaki Iigo and Hiroyuki Tsuda. Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethane-treated rats. *Carcinogenesis*, **25** :1961-1966 (2004)

9) Hiroyuki Tsuda, Y. Ohshima, Hiroshi Nomoto., Ken-ichi Fujita, Eiji Matsuda, Masaaki Iigo, Nobuo Takasuka and Malcolm A Moore. Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **19**: 245-263 (2004)

Ohkubo, S., Takahashi, T., Nomoto, H., Kunimoto, K., Alexander, D.B., Okada, S. and Kozu, T. Cancer chemoprevention by lactoferrin and analysis on the mechanisms. Sixth International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications, Capri, (May 2003)

2) Iigo, M., Fujita, K., Shimamura, M., Yamamoto, F., Nomoto, H., Alexander, D.B., Sekine, K., Tamura, Y. and Tsuda, H. Induction of cytokines in the intestinal mucosa by oral administration of bovine lactoferrin-A possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis-. Sixth International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications, Capri, (May 2003)

3) Fujita, K., Takahashi, T., Sekine, K., Tamura, Y., Iigo, M. and Tsuda, H. Lactoferrin enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand(trail)-induced apoptosis on human colon carcinoma cell lines. Sixth International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications, Capri, (May 2003)

4) 藤田健一、高橋徹行、関根一則、飯郷正明、津田洋幸、ラクトフェリンによるAOM投与ラット大腸におけるBcl-2関連遺伝子の発現変動、第10回日本がん予防研究会、札幌、(2003年6月)

2.学会発表

1) Tsuda, H., Iigo, M., Fujita, K., Sekine, K.,

- 5) 野本博、飯郷正明、浜田博喜、大谷修一、小島周二、津田洋幸、プロアントシアニジン類緑物質の AOM 誘発ラット大腸 ACFへの修飾作用、第 10 回日本がん予防研究会、札幌、(2003 年 6 月)
- 6) 飯郷正明、藤田健一、野本博、大久保重敏、関根一則、國元武彦、飯沼元、神津隆弘、奥坂拓志、岡田周市、津田洋幸、ウシラクトフェリンを用いた介入研究の基礎と応用、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、(2003 年 9 月)
- 7) 藤田健一、高橋徹行、松田栄治、飯郷正明、津田洋幸、ラクトフェリンによるヒト大腸がん細胞株における TRAIL 誘発細胞死増強作用、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、(2003 年 9 月)
- 8) 高須賀信夫、飯郷正明、Kim, C.K., 津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラット-Hras128-(Tg) の γ-線照射に対する乳腺発がん感受性について、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、(2003 年 9 月)
- 9) 松田栄治、飯郷正明、高須賀信夫、藤田健一、小島周二、矢澤一良、関根一則、津田洋幸、マウス大腸発がんに対するラクトフェリンと不飽和脂肪酸併用による抑制効果の検討、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、(2003 年 9 月)
- 10) 島村真里子、飯郷正明、芦野洋美、山本行男、羽里忠彦、ラクトフェリン関連物質の血管新生阻害作用、日本癌学会総会、名古屋。(2003 年 9 月)
- 11) 飯郷正明、伊崎智子、平野祥子、野本博、津田洋幸、徳武昌一、ブドウ種子成分プロシアニジンによるコロン 26 に対する抗腫瘍効果と肺転移抑制、日本薬学会 124 年会、大阪。(2004 年 3 月)
- 12) 飯郷正明、島村真里子、藤田健一、大久保重敏、津田洋幸、ウシラクトフェリンの免疫能増強、血管新生阻害およびアポトーシス誘導による発がん抑制作用と臨床応用への試み、第 11 回日本がん予防研究会、東京 (2004 年 7 月)
- 13) 藤田健一、松田栄治、飯郷正明、津田洋幸、ヒトラクトフェリンおよびその部分断片ペプチドの細胞内発現と局在の解析、第 11 回日本がん予防研究会、東京 (2004 年 7 月)
- 14) 飯郷正明、野本博、徳武昌一、浜田博喜、津田洋幸、ブドウ種子成分プロシアニジンによる大腸発がん抑制とアポトーシス誘導、第 63 回日本癌学会学術総会、福岡 (2004 年 9 月)
- 15) 上田しのぶ、高須賀信夫、飯郷正明、

竹下文隆、落合孝広、津田洋幸、変異型c-Ha-rasコンディショナルトランスジェニックラットにおける膝発がんの組織発生の検討、第63回日本癌学会学術総会、福岡（2004年9月）

16) 津田洋幸、飯郷正明、高須賀信夫、松田栄治、関根一則、大久保重敏、大島浩、深町勝巳、田中卓二、福島昭治、多機能生理活性物質によるがん予防—ラクトフェリンからのメッセージー、第63回日本癌学会学術総会、福岡（2004年9月）

17) 松田栄治、飯郷正明、高須賀信夫、藤田健一、小島周二、矢澤一良、関根一則、津田洋幸、ラクトフェリンと不飽和脂肪酸併用によるマウス大腸がん抑制効果の増強、第63回日本癌学会学術総会、福岡（2004年9月）

18) 岡田信子、飯郷正明、Arp11遺伝子の発現によるヒト肺腺がん細胞株PC-14の造腫瘍性の抑制、第63回日本癌学会学術総会、福岡（2004年9月）

19) 津田洋幸、深町勝巳、関根一則、大

久保重俊、飯郷正明、高須賀信夫、松田栄治、がん予防—多機能生理活性物質ラクトフェリンからのメッセージー、第1回ラクトフェリンフォーラム、東京（2004年10月）

20) 飯郷正明、島村真里子、若林裕之、大久保重敏、津田洋幸、ウシラクトフェリンによる免疫能増強および血管新生阻害による発がん抑制作用と臨床応用、第1回ラクトフェリンフォーラム、東京（2004年10月）

21) 松田栄治、藤田健一、飯郷正明、津田洋幸、若林敬二、ヒトラクトフェリンおよびその部分断片ペプチドの発現とその細胞内局在、第1回ラクトフェリンフォーラム、東京（2004年10月）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1. 市販食用油の脂肪酸組成

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	他
A油 (“DAG”含有)	3.1	1.1	38.9	46.6	9.0	1.3 (%)
B油	6.8	2.6	44.8	34.6	9.6	1.6
C油	8.5	3.5	33.5	44.2	9.1	1.2
D油	7.2	2.9	42.7	37.0	8.7	1.5
E油	10.9	3.9	20.0	52.9	11.2	1.2
F油	6.7	3.8	17.5	71.0	0.5	0.5
G油	4.2	2.0	60.8	20.2	11.4	1.4
H油	10.1	3.5	77.1	7.0	0.9	1.4

表 2-1. 血液生化性状
(Hras128 Tg 雄)

投与群 (正常範囲)	TG (33~163)	FFA	Tcho (48~113)	LP
1 4NQO+5.5% "DAG" 2 4NQO+2.75% "DAG" 3 4NQO+1.375% "DAG" 4 4NQO+5.5% TAG 5 5.5% "DAG" 6 5.5% TAG	130±80 * 157±48 239±100 302±143 160±66 # 139±35	1084±461 570±170 1119±470 666±168 691±154 836±177	105±17 105±10 110±9 108±17 97±13 121±17	6.0±0.7 5.8±0.4 7.0±0.8 6.6±1.1 6.8±0.8 6.8±0.4

投与群 (正常範囲)	GOT (22~98)	GPT (7~65)	BUN (11.5~19.0)	CR (0.28~0.52)
1 4NQO+5.5% "DAG" 2 4NQO+2.75% "DAG" 3 4NQO+1.375% "DAG" 4 4NQO+5.5% TAG 5 5.5% "DAG" 6 5.5% TAG	126±22 * 77±32 134±31 75±14 104±27 # 126±43	25±18 18±6 35±25 18±4 22±8 28±11	52±77 14±2 20±4 16±1 18±3 17±3	0.48±0.27 0.34±0.03 0.35±0.07 0.31±0.04 0.35±0.04 0.31±0.02

* : p<0.05 as compared to 4NQO + 5.5% TAG group (第4群)

: p<0.05 as compared to 5.5% TAG group (第6群).

表 2-2. 血液生化學性状

(野生型、雄)

投与群	正常範囲	TG	FFA	Tcho	LP
		(33~163)		(48~113)	
1 4NQO+5.5% "DAG"		147±55	571±78	83±19	6.6±0.9
2 4NQO+2.75% "DAG"		191±57	624±151	102±15	6.4±0.5
3 4NQO+1.375% "DAG"		207±61	758±112	112±20	6.8±0.8
4 4 NQO+5.5% TAG		136±52	573±117	88±6	6.4±0.5
5 5.5%"DAG"		165±58 [#]	742±155	109±8	7.0±1.2
6 5.5%TAG		234±104	1266±508	109±24	8.8±5.7

投与群	正常範囲	GOT	GPT	BUN	CR
		(22~98)	(7~65)	(11.5~19.0)	(0.28~0.52)
1 4NQO+5.5% "DAG"		81±29	16±8	17±3	0.36±0.05
2 4NQO+2.75% "DAG"		94±45	42±71	16±1	0.32±0.02
3 4NQO+1.375% "DAG"		105±40	20±8	17±3	0.34±0.06
4 4NQO+5.5% TAG		97±33	21±17	19±2	0.38±0.04
5 5.5%"DAG"		122±43	28±13	23±2	0.33±0.05
6 5.5%TAG		133±63	25±12	20±2	0.40±0.12

: p<0.05 as compared to 5.5%TAG group (第6群)

表 2-3. 血液生化性状
(Hras128 Tg、雌)

投与群		TG	FFA	Tcho	LP
	正常範囲	(23~68)		(55~117)	
1 4NQO+5.5% "DAG"		246±206	1042±389	80±8	7.6±3.1
2 4NQO+2.75% "DAG"		153±93	710±304	87±20	7.0±1.6
3 4NQO+1.375% "DAG"		145±94	393±115	74±9	7.0±1.7
4 4NQO+5.5% TAG		145±106	559±462	75±11	6.4±0.5
5 5.5% "DAG"		173±91	502±222	83±16	6.2±0.8
6 5.5% TAG		164±120	568±129	86±17	6.7±0.6

投与群		GOT	GPT	BUN	CR
	正常範囲	(23~99)	(8~58)	(11.3~21.5)	(0.31~0.54)
1 4NQO+5.5% "DAG"		93±36	16±2	20±1	0.48±0.16
2 4NQO+2.75% "DAG"		68±16	11±4	17±4	0.41±0.12
3 4NQO+1.375% "DAG"		96±66	22±26	17±1	0.37±0.06
4 4NQO+5.5% TAG		74±27	11±4	18±3	0.37±0.05
5 5.5% "DAG"		74±14	12±3	16±2	0.40±0.03
6 5.5% TAG		77±18	14±3	20±3	0.56±0.24

表 2-4. 血液生化性状

(野生型、雌)

投与群 正常範囲	TG (23~78)	FFA	Tcho (55~147)	LP
1 4NQO+5.5% "DAG"	143±126	691±226	102±20	7.0±0.7
2 4NQO+2.75% "DAG"	109±45	870±168*	95±10	6.8±0.4
3 4NQO+1.375% "DAG"	113±87	557±104	94±6	7.0±1.0
4 4NQO+5.5% TAG	124±84	526±118	91±3	7.8±1.3
5 5.5% "DAG"	103±79	600±118	98±9	6.3±0.5
6 5.5% TAG	121±99	538±202	110±32	7.4±0.5
投与群 正常範囲	GOT (21~292)	GPT (7~227)	BUN (10.3~21.6)	CR (0.28~0.51)
1 4NQO+5.5% "DAG"	88±32*	19±6*	20±2	0.47±0.08
2 4NQO+2.75% "DAG"	66±13	14±1	18±2	0.40±0.04
3 4NQO+1.375% "DAG"	59±6	12±3	29±10	0.46±0.09
4 4NQO+5.5% TAG	53±7	12±5	19±3	0.39±0.03
5 5.5% "DAG"	61±9	12±2	22±8	0.41±0.07
6 5.5% TAG	50±3	14±5	28±8	0.40±0.09

*: p<0.05 as compared to 4NQO + 5.5% TAG group (第4群) .

表3. 舌発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (頻度)
(Hras128 Tg ラット, 雄)

投与群	動物数	腫瘍発生動物数 (%)		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
1 4NQO+5.5% "DAG"	16	4 (25.0)	7 (43.8)	9 (56.3)
2 4NQO+2.75% "DAG"	15	6 (40.0)	3 (20.0)	8 (53.3)
3 4NQO+1.375% "DAG"	14	1 (7.1)	2 (14.3)	3 (21.4)
4 4NQO+5.5% TAG	16	3 (18.8)	2 (12.3)	5 (31.3)
5 5.5% "DAG"	16	0	0	0
6 5.5% TAG	16	0	0	0

* P<0.05, コクラン・アミテージの傾向検定

表4. 舌発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (腫瘍数)
(Hras128 Tg ラット, 雄)

投与群	動物数	腫瘍数／ラット		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
1 4NQO+5.5% "DAG"	16	0.25±0.45	0.44±0.51	0.69±0.70
2 4NQO+2.75% "DAG"	15	0.53±0.74	0.20±0.41	# 0.73±0.80
3 4NQO+1.375% "DAG"	14	0.07±0.27	0.14±0.36	# 0.21±0.43
4 4NQO+5.5% TAG	16	0.19±0.40	0.13±0.34	0.31±0.48
5 5.5% "DAG"	16	0	0	0
6 5.5% TAG	16	0	0	0

Mean±SD,

P<0.05, 線形回帰分析

表5. 舌発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (頻度)
(野生型 ラット, 雄)

投与群	動物数	腫瘍発生動物数 (%)		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
7 4NQO+5.5% "DAG"	16	1 (6.3)	1 (6.3)	2 (12.5)
8 4NQO+2.75% "DAG"	15	0	2 (13.3)	2 (13.3)
9 4NQO+1.375% "DAG"	16	0	0	0
10 4NQO+5.5% TAG	16	0	0	0
11 5.5% "DAG"	16	0	0	0
12 5.5% TAG	16	0	0	0

表6. 舌発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (腫瘍数)

(野生型 ラット, 雄)

投与群	動物数	腫瘍数／ラット		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
7 4NQO+5.5% "DAG"	16	0.06±0.25	0.06±0.25	0.13±0.34
8 4NQO+2.75% "DAG"	15	0	0.13±0.35	0.13±0.35
9 4NQO+1.375% "DAG"	16	0	0	0
10 4NQO+5.5% TAG	16	0	0	0
11 5.5% "DAG"	16	0	0	0
12 5.5% TAG	16	0	0	0

Mean±SD

表7. 舌発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (頻度)
(Hras128 Tg ラット, 雌)

投与群	動物数	腫瘍発生動物数 (%)		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
13 4NQO+5.5% "DAG"	15	0	1 (6.7)	1 (6.7)
14 4NQO+2.75% "DAG"	14	0	0	0
15 4NQO+1.375% "DAG"	15	0	1 (6.7)	1 (6.7)
16 4NQO+5.5% TAG	15	0	0	0
17 5.5% "DAG"	12	0	0	0
18 5.5% TAG	14	0	0	0

表8. 舌発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (腫瘍数)

(Hras128 Tg ラット, 雌)

投与群	動物数	腫瘍数／ラット		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
13 4NQO+5.5% "DAG"	15	0	0.07±0.26	0.07±0.26
14 4NQO+2.75% "DAG"	14	0	0	0
15 4NQO+1.375% "DAG"	15	0	0.07±0.26	0.07±0.26
16 4NQO+5.5% TAG	15	0	0	0
17 5.5% "DAG"	12	0	0	0
18 5.5% TAG	14	0	0	0

Mean ±SD

表9. 舌発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (頻度)

(野生型 ラット, 雌)

投与群	動物数	腫瘍発生動物数 (%)		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
19 4NQO+5.5%“DAG”	13	0	0	0
20 4NQO+2.75%“DAG”	14	0	1 (7.1)	1 (7.1)
21 4NQO+1.375%“DAG”	13	0	1 (7.7)	1 (7.7)
22 4NQO+5.5%TAG	15	0	2 (13.3)	2 (13.3)
23 5.5%“DAG”	15	0	0	0
24 5.5%TAG	15	0	0	0

表10. 舌発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (腫瘍数)

(野生型 ラット, 雌)

投与群	動物数	腫瘍数／ラット		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
19 4NQO+5.5% "DAG"	13	0	0	0
20 4NQO+2.75% "DAG"	14	0	0.07±0.27	0.07±0.27
21 4NQO+1.375% "DAG"	13	0	0.08±0.28	0.08±0.28
22 4NQO+5.5% TAG	15	0	0.13±0.35	0.13±0.35
23 5.5% "DAG"	15	0	0	0
24 5.5% TAG	15	0	0	0

Mean±SD

表11. 前胃発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (頻度)
(Hras128 Tg ラット, 雄)

投与群	動物数	腫瘍発生動物数 (%)		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
1 4NQO+5.5% "DAG"	16	2 (12.5)	0	2 (12.5)
2 4NQO+2.75% "DAG"	15	4 (26.7)	0	4 (26.7)
3 4NQO+1.375% "DAG"	14	3 (21.4)	0	3 (21.4)
4 4NQO+5.5% TAG	16	1 (6.3)	0	1 (6.3)
5 5.5% "DAG"	16	1 (6.3)	0	1 (6.3)
6 5.5% TAG	16	0	0	0

表12. 前胃発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響（腫瘍数）
(Hras128 Tg ラット, 雄)

投与群	動物数	腫瘍数／ラット		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
1 4NQO+5.5%“DAG”	16	0.19±0.54	0	0.19±0.54
2 4NQO+2.75%“DAG”	15	0.27±0.46	0	0.27±0.46
3 4NQO+1.375%“DAG”	14	0.21±0.43	0	0.21±0.43
4 4NQO+5.5%TAG	16	0.06±0.25	0	0.06±0.25
5 5.5%“DAG”	16	0.06±0.25	0	0.06±0.25
6 5.5%TAG	16	0	0	0

Mean±SD

表13. 前胃発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (頻度)

(野生型 ラット, 雄)

投与群	動物数	腫瘍発生動物数 (%)		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
7 4NQO+5.5% "DAG"	16	1 (6.3)	1 (6.3)	1 (6.3)
8 4NQO+2.75% "DAG"	15	1 (6.7)	1 (6.7)	2 (13.3)
9 4NQO+1.375% "DAG"	16	0	0	0
10 4NQO+5.5% TAG	16	0	0	0
11 5.5% "DAG"	16	0	0	0
12 5.5% TAG	16	0	0	0

表14. 前胃発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (腫瘍数)
 (野生型 ラット, 雄)

投与群	動物数	腫瘍数／ラット		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
7 4NQO+5.5% "DAG"	16	0.06±0.25	0	0.06±0.25
8 4NQO+2.75% "DAG"	15	0.27±1.03	0.07±0.26	0.33±1.29
9 4NQO+1.375% "DAG"	16	0	0	0
10 4NQO+5.5% TAG	16	0	0	0
11 5.5% "DAG"	16	0	0	0
12 5.5% TAG	16	0	0	0

Mean±SD

表15. 前胃発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響（頻度）
 (Hras128 Tg ラット, 雌)

投与群	動物数	腫瘍発生動物数 (%)		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
13 4NQO+5.5%“DAG”	15	0	0	0
14 4NQO+2.75%“DAG”	14	1 (7.1)	0	1 (7.1)
15 4NQO+1.375%“DAG”	15	0	0	0
16 4NQO+5.5%TAG	15	2 (13.3)	0	2 (13.3)
17 5.5%“DAG”	12	0	0	0
18 5.5%TAG	14	0	0	0

表16. 前胃発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (腫瘍数)

(Hras128 Tg ラット, 雌)

投与群	動物数	腫瘍数／ラット		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
13 4NQO+5.5%“DAG”	15	0	0	0
14 4NQO+2.75%“DAG”	14	0.07±0.27	0	0.07±0.27
15 4NQO+1.375%“DAG”	15	0	0	0
16 4NQO+5.5%TAG	15	0.13±0.35	0	0.13±0.35
17 5.5%“DAG”	12	0	0	0
18 5.5%TAG	14	0	0	0

Mean±SD

表17. 前胃発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (頻度)

(野生型 ラット, 雌)

投与群	動物数	腫瘍発生動物数 (%)		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
19 4NQO+5.5% "DAG"	13	0	0	0
20 4NQO+2.75% "DAG"	14	0	0	0
21 4NQO+1.375% "DAG"	13	0	0	0
22 4NQO+5.5% TAG	15	0	0	0
23 5.5% "DAG"	15	0	0	0
24 5.5% TAG	15	0	0	0

表18. 前胃発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (腫瘍数)
(野生型 ラット, 雌)

投与群	動物数	腫瘍数／ラット		
		乳頭腫	扁平上皮がん	乳頭腫+扁平上皮がん
13 4NQO+5.5% "DAG"	15	0	0	0
14 4NQO+2.75% "DAG"	14	0	0	0
15 4NQO+1.375% "DAG"	15	0	0	0
16 4NQO+5.5% TAG	15	0	0	0
17 5.5% "DAG"	12	0	0	0
18 5.5% TAG	14	0	0	0

表19. 乳腺発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (頻度)
(Hras128 Tg ラット, 雄)

投与群	動物数	腫瘍発生動物数 (%)		
		腺がん	肉腫	腺がん+肉腫
1 4NQO+5.5% "DAG"	16	6 (37.5)	0	6 (37.5)
2 4NQO+2.75% "DAG"	15	4 (26.7)	1 (6.7)	5 (33.3)
3 4NQO+1.375% "DAG"	14	4 (28.6)	0	4 (28.6)
4 4NQO+5.5% TAG	16	5 (31.3)	2 (12.5)	7 (43.8)
5 5.5% "DAG"	16	1 (6.3)	0	1 (6.3)
6 5.5% TAG	16	5 (31.3)	0	5 (31.3)

表20. 乳腺発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (腫瘍数)
(Hras128 Tg ラット, 雄)

投与群	動物数	腫瘍数／ラット		
		腺がん	肉腫	腺がん+肉腫
1 4NQO+5.5% "DAG"	16	0.56±0.81	0	0.56±0.81
2 4NQO+2.75% "DAG"	15	0.33±0.62	0.07±0.26	0.40±0.63
3 4NQO+1.375% "DAG"	14	0.36±0.63	0	0.36±0.63
4 4NQO+5.5% TAG	16	0.31±0.48	0.137±0.34	0.44±0.73
5 5.5% "DAG"	16	0.06±0.25	0	0.06±0.25
6 5.5% TAG	16	0.38±0.62	0	0.38±0.62

Mean±SD

表21. 乳腺発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (頻度)

(野生型 ラット, 雄)

投与群	動物数	腫瘍発生動物数 (%)		
		腺がん	肉腫	腺がん+肉腫
7 4NQO+5.5% "DAG"	16	0	0	0
8 4NQO+2.75% "DAG"	15	1 (6.7)	0	1 (6.7)
9 4NQO+1.375% "DAG"	16	0	0	0
10 4NQO+5.5% TAG	16	0	0	0
11 5.5% "DAG"	16	0	0	0
12 5.5% TAG	16	0	0	0

表22. 乳腺発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (腫瘍数)
(野生型 ラット, 雄)

投与群	動物数	腫瘍数／ラット		
		腺がん	肉腫	腺がん+肉腫
7 4NQO+5.5% "DAG"	16	0	0	0
8 4NQO+2.75% "DAG"	15	0.06±0.25	0	0.06±0.25
9 4NQO+1.375% "DAG"	16	0	0	0
10 4NQO+5.5% TAG	16	0	0	0
11 5.5% "DAG"	16	0	0	0
12 5.5% TAG	16	0	0	0

Mean±SD

表23. 乳癌発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (頻度)
(Hras128 Tg ラット, 雌)

投与群	動物数	腫瘍発生動物数 (%)		
		腺がん	肉腫	腺がん+肉腫
1 4NQO+5.5% "DAG"	15	10 (66.7)	0	10 (66.7)
2 4NQO+2.75% "DAG"	14	9 (64.3)	0	9 (64.3)
3 4NQO+1.375% "DAG"	15	11 (73.3)	0	11 (73.3)
4 4NQO+5.5% TAG	15	11 (73.3)	0	11 (73.3)
5 5.5% "DAG"	12	6 (50.0)	0	6 (50.0)
6 5.5% TAG	14	6 (42.9.)	0	6 (42.9.)

表24. 乳腺発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (腫瘍数)
 (Hras128 Tg ラット, 雌)

投与群	動物数	腫瘍数／ラット		
		腺がん	肉腫	腺がん+肉腫
13 4NQO+5.5% "DAG"	15	1.13±1.10	0	1.13±1.10
14 4NQO+2.75% "DAG"	14	0.79±0.70	0	0.79±0.70
15 4NQO+1.375% "DAG"	15	1.27±0.88	0	1.27±0.88
16 4NQO+5.5% TAG	15	1.07±0.96	0	1.07±0.96
17 5.5% "DAG"	12	0.75±0.87	0	0.75±0.87
18 5.5% TAG	14	0.64±0.93	0	0.64±0.93

Mean±SD

表25. 乳腺発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (頻度)
(野生型 ラット, 雌)

投与群	動物数	腫瘍発生動物数 (%)		
		腺がん	肉腫	腺がん+肉腫
19 4NQO+5.5%“DAG”	13	0	1 (7.7)	1 (7.7)
20 4NQO+2.75%“DAG”	14	0	0	0
21 4NQO+1.375%“DAG”	13	0	0	0
22 4NQO+5.5%TAG	15	0	0	0
23 5.5%“DAG”	15	0	0	0
24 5.5%TAG	15	0	0	0

表26. 乳腺発がんに対する“ジアシルグリセロール”的影響 (腫瘍数)
(野生型 ラット, 雌)

投与群	動物数	腫瘍数／ラット		
		腺がん	肉腫	腺がん+肉腫
13 4NQO+5.5%“DAG”	15	0	0.08±0.28	0.08±0.28
14 4NQO+2.75%“DAG”	14	0	0	0
15 4NQO+1.375%“DAG”	15	0	0	0
16 4NQO+5.5%TAG	15	0	0	0
17 5.5%“DAG”	12	0	0	0
18 5.5%TAG	14	0	0	0

Mean±SD

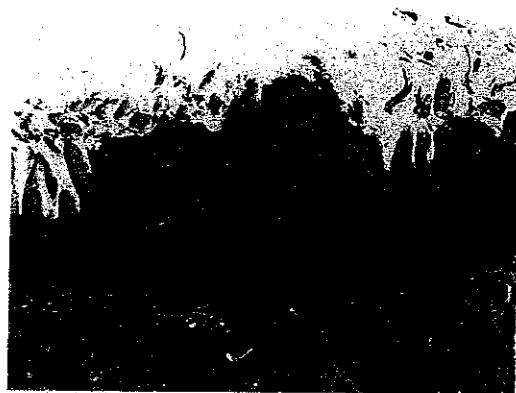
実験計画

群	期間				匹数		性別		
	0	10	12	20週	Tg	野生型	Tg	野生型	
1	4NQO		5.5% "DAG"		16	16	15	15	=62
2	4NQO		2.75% "DAG"		16	16	15	15	=62
3	4NQO		1.375% "DAG"		16	16	15	15	=62
4	4NQO		5.5% TAG		16	16	15	15	=62
5	Water		5.5% "DAG"		16	16	15	15	=62
6	Water		5.5% TAG		16	16	15	15	=62
									計372匹
					解剖 雌 Tg		解剖 雄 Tg, 野生型 雌 野生型		

ラット:Hras-128, Tg 及び野生型
 4NQO:10ppm 飲水投与
 "DAG"、TAG:基礎食に混餌投与

図1. 実験プロトコール

舌：上皮過形成
(Hyperplasia)



舌：乳頭腫
(Papilloma)

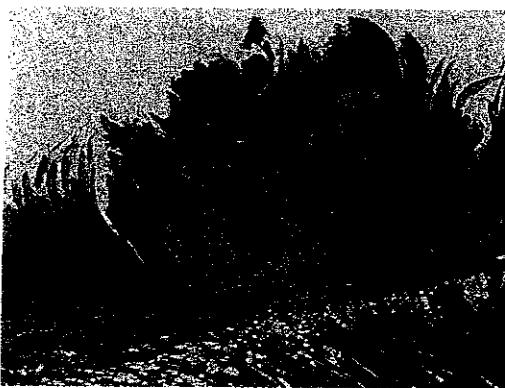
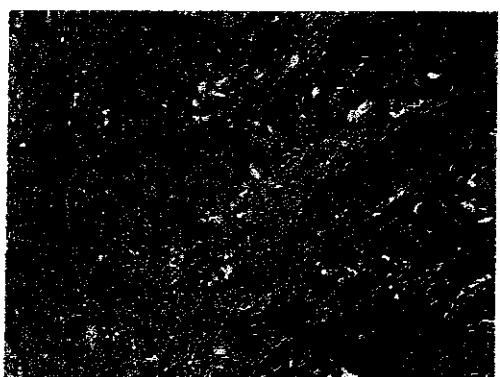
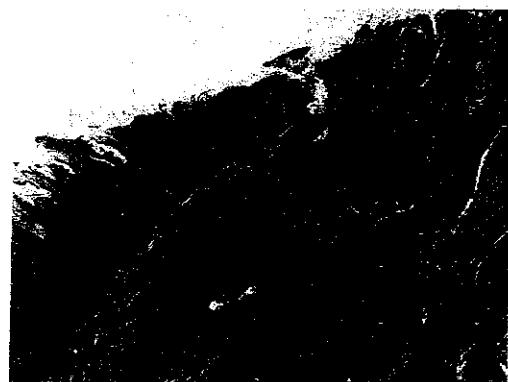


図2. 4NQO+5.5% "DAG"投与群 (Tgラット雄)

舌：扁平上皮がん



(Squamous cell
carcinoma)

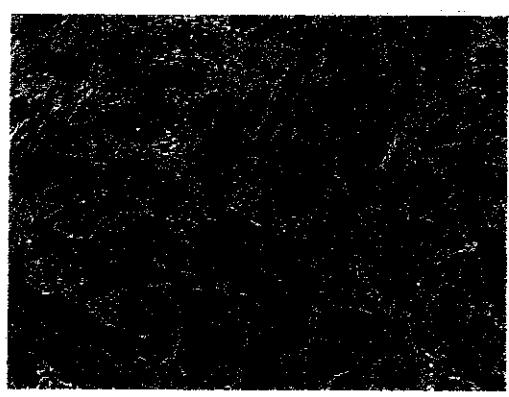


図3. 4NQO+5.5% “DAG”投与群 (Tgラット雄)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
飯郷正明	転移モデル	國元武彦、 長繩博	生物薬科 学実験講 座13	廣川書店	東京	2003	pp205-217

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nobuko Shindo-Okada and Masaaki Iigo	Expression of the Arp11 gene suppresses the tumorigenicity of PC-14 human lung adenocarcinoma cells	Biochem. Biophysic. Res. Commun.	312	889-896	2003
Masaaki Iigo, Mariko Shimamura, Eiji Matsuda, Ken-ichi Fujita, Hiroshi Nomoto, Jun Satoh, Syuji Kojima, David B. Alexander, Malcolm A. Moore and Hiroyuki Tsuda	Orally administered bovine lactoferrin induces caspase-1 and interleukin-18 in the mouse intestinal mucosa: a possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis	Cytokine	25 (1)	36-44	2004
Mariko Shimamura, Yukio Yamamoto, Hiromi Ashino, Tsutomu Oikawa, Tadahiko Hazato, Hiroyuki Tsuda, and <u>Masaaki Iigo</u> .	Bovine lactoferrin inhibits tumor-induced angiogenesis	Int. J. Cancer	111	111-116	2004

Tetsuyuki Takahashi, Nobuo Takasuka, <u>Masaaki Iigo</u> , David B. Alexander, Masaki Baba, Hoyoku Nishino, Hiroyuki Tsuda, and Toru Okuyama.	Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, reduces prostaglandin E2 and nitric oxide, causes apoptosis, and suppresses aberrant crypt foci development.	Cancer Science	95	448-453	2004
Ken-ichi Fujita, Eiji Matsuda, Kazunori Sekine, <u>Masaaki</u> <u>Iigo</u> , and Hiroyuki Tsuda	Lactoferrin modifies apoptosis-related gene expression in the colon of the azoxymethane-treated rat.	Cancer Lett.	213	21-29	2004
Hiroshi Nomoto, <u>Masaaki Iigo</u> , Hiroki Hamada, Shuji Kojima, and Hiroyuki Tsuda	Chemoprevention of colorectal cancer by grape seed proanthocyanidin is accompanied by a decrease in proliferation and increase in apoptosis.	Nutr. & Cancer	49	81-88	2004
Ken-ichi Fujita, Eiji Matsuda, Kazunori Sekine, <u>Masaaki</u> <u>Iigo</u> and Hiroyuki Tsuda	Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethane-treated rats.	Carcinogenesis	25	1961-1966	2004

Hiroyuki Tsuda, Y. Ohshima, Hirosi Nomoto., Ken- ichi Fujita, Eiji Matsuda, <u>Masaaki Iigo</u> , Nobuo Takasuka and Malcolm A Moore	Cancer prevention by natural compounds	Drug Metab. Pharmacokinet	19	245-263	2004
---	---	------------------------------	----	---------	------

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クで置き換えた改変 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 の方が摂餌量が多くかった。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かった。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かった。DAG の濃度による差はほとんどみられなかつたが、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つた。

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 のカウントを行なつた。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つた。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つた。ラット 1 匹当たりの総 ACF 数にも有意差は認められなかつたが、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 数が多かつた。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 数は多かつたが、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つた。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、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。

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つた。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つた。

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ではなく、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 AC 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。

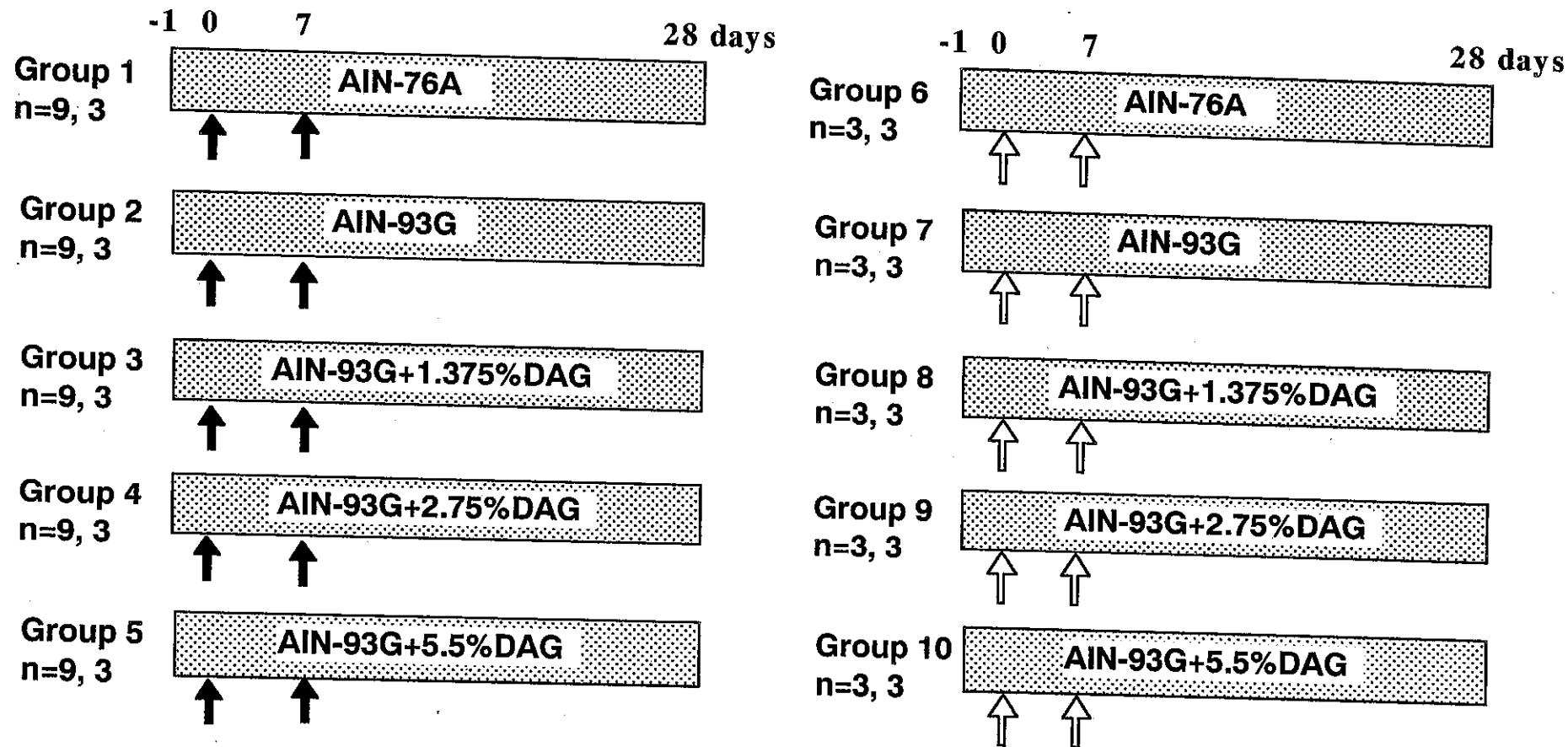
一方、Apc ノックアウトマウスにおける腸ポリープ形成に対しては、DAG 投与は抑制作用を示さず、1.375% 及び 5.5%DAG 投与でポリープ数をやや増加させた。また、1.375% 及び 5.5%DAG 投与で、ラットの場合とは逆に血清中のトリグリセリドレベルはやや高く、さらに、5.5%DAG 投与は総コレステロール値及び VLDL コlestrol の割合を上げる傾向がみられた。

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., Kashihara, 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

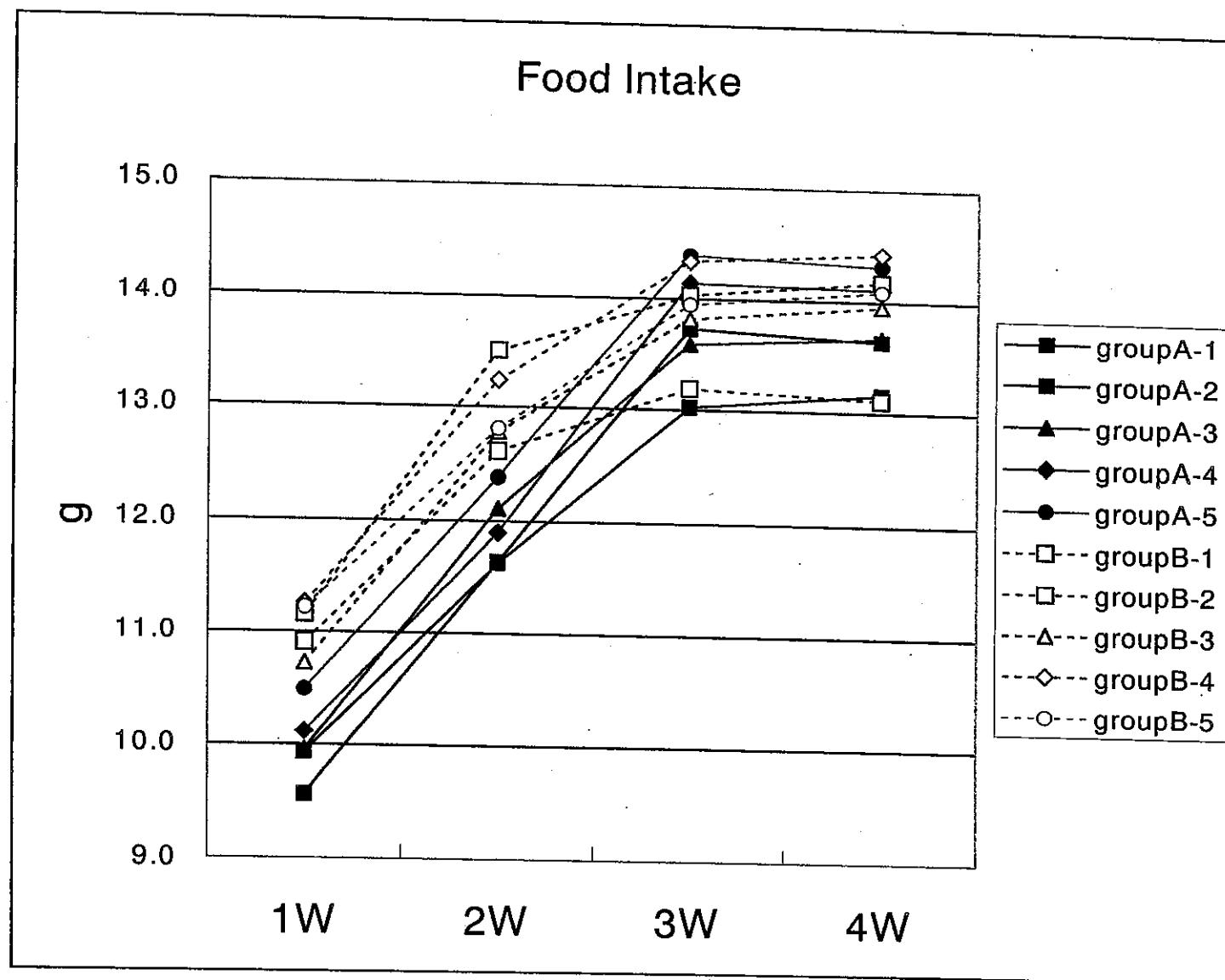


Animals: A total of 90 male F344 rats, 6-weeks old

↑ : 15 mg/kg b.w. of AOM, s.c.

↑ : Saline, s.c.

図2



BW

↑

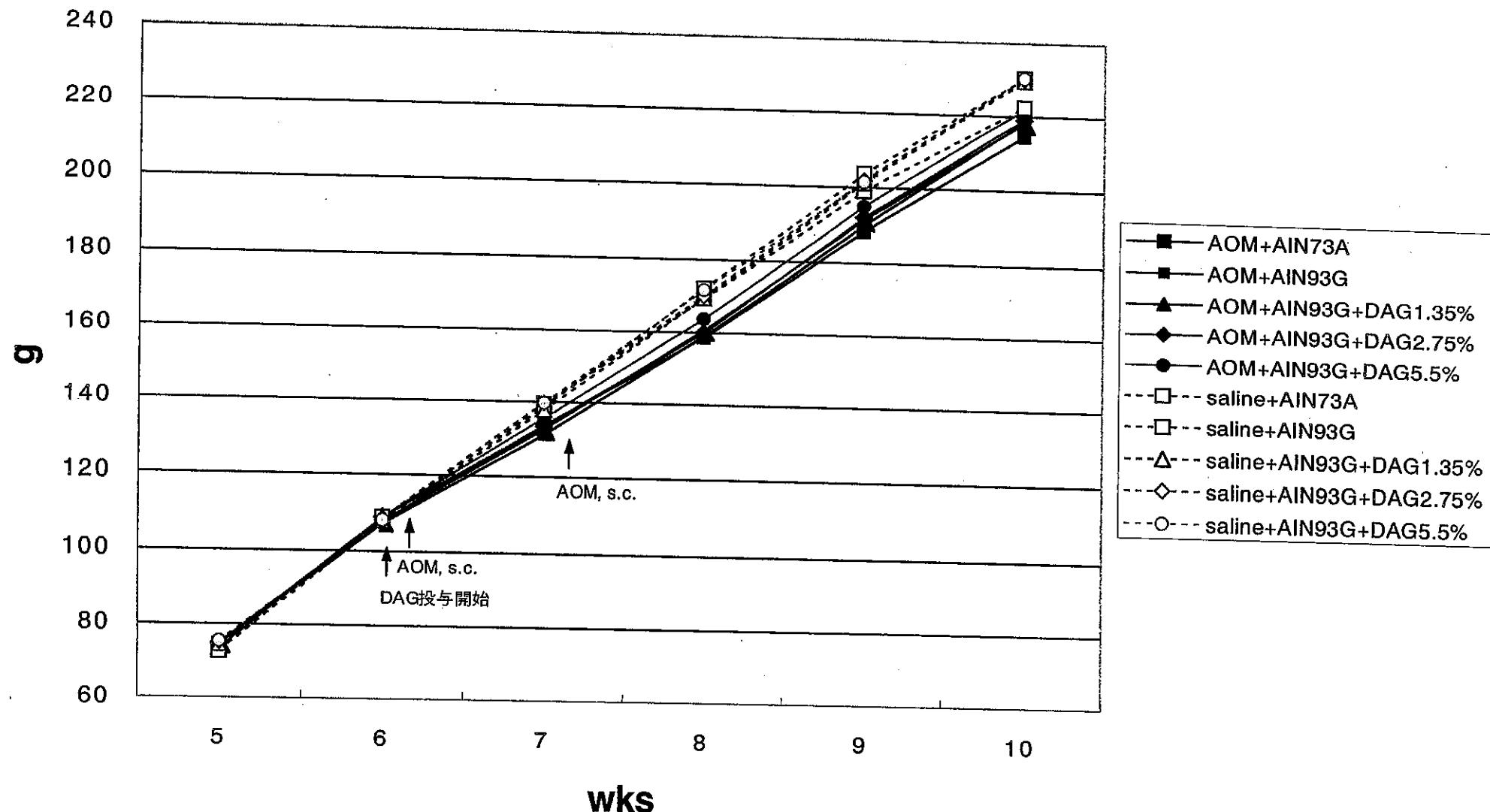


表1

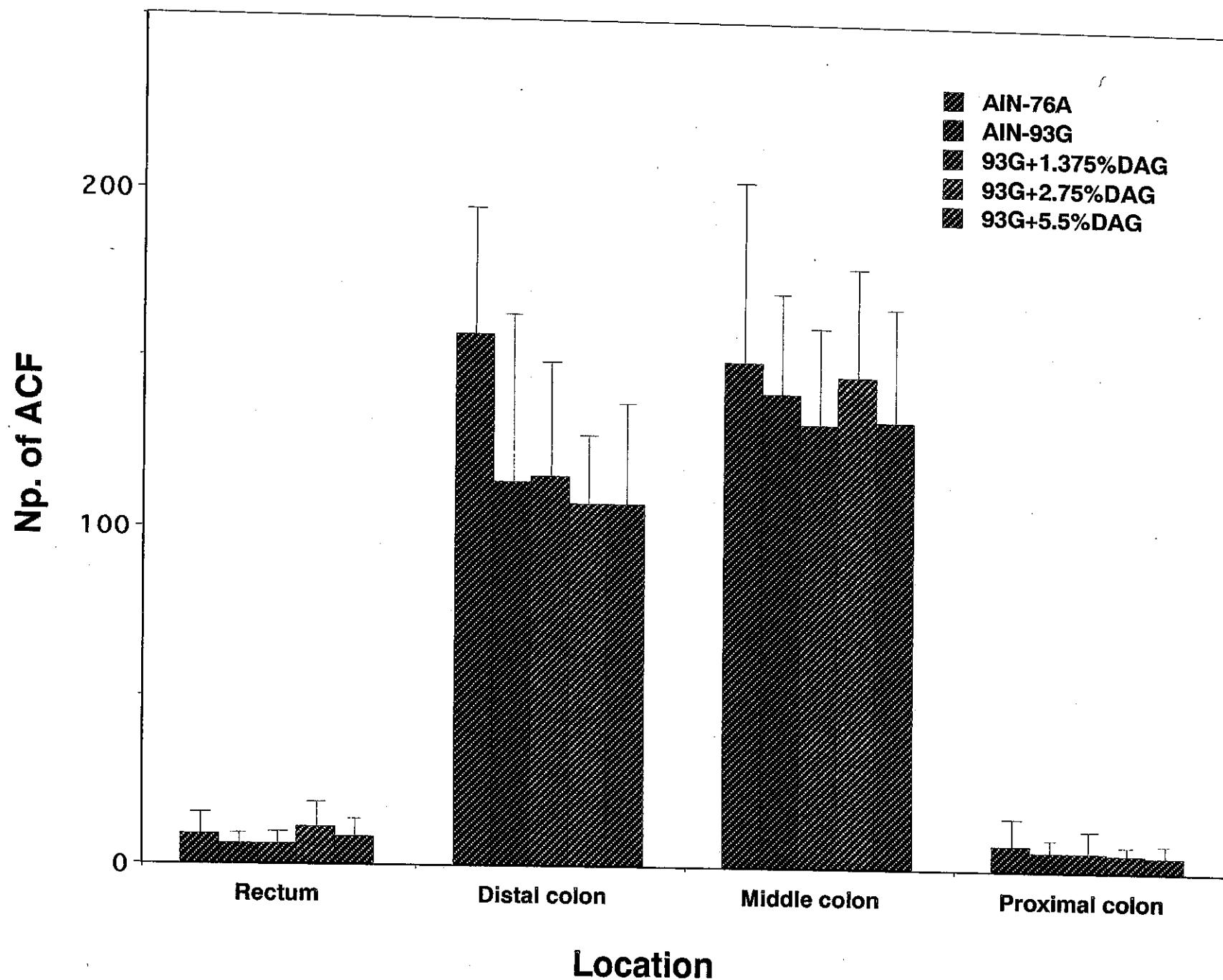
Effect of DAG on AOM-induced ACF in Rat Colon

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	-

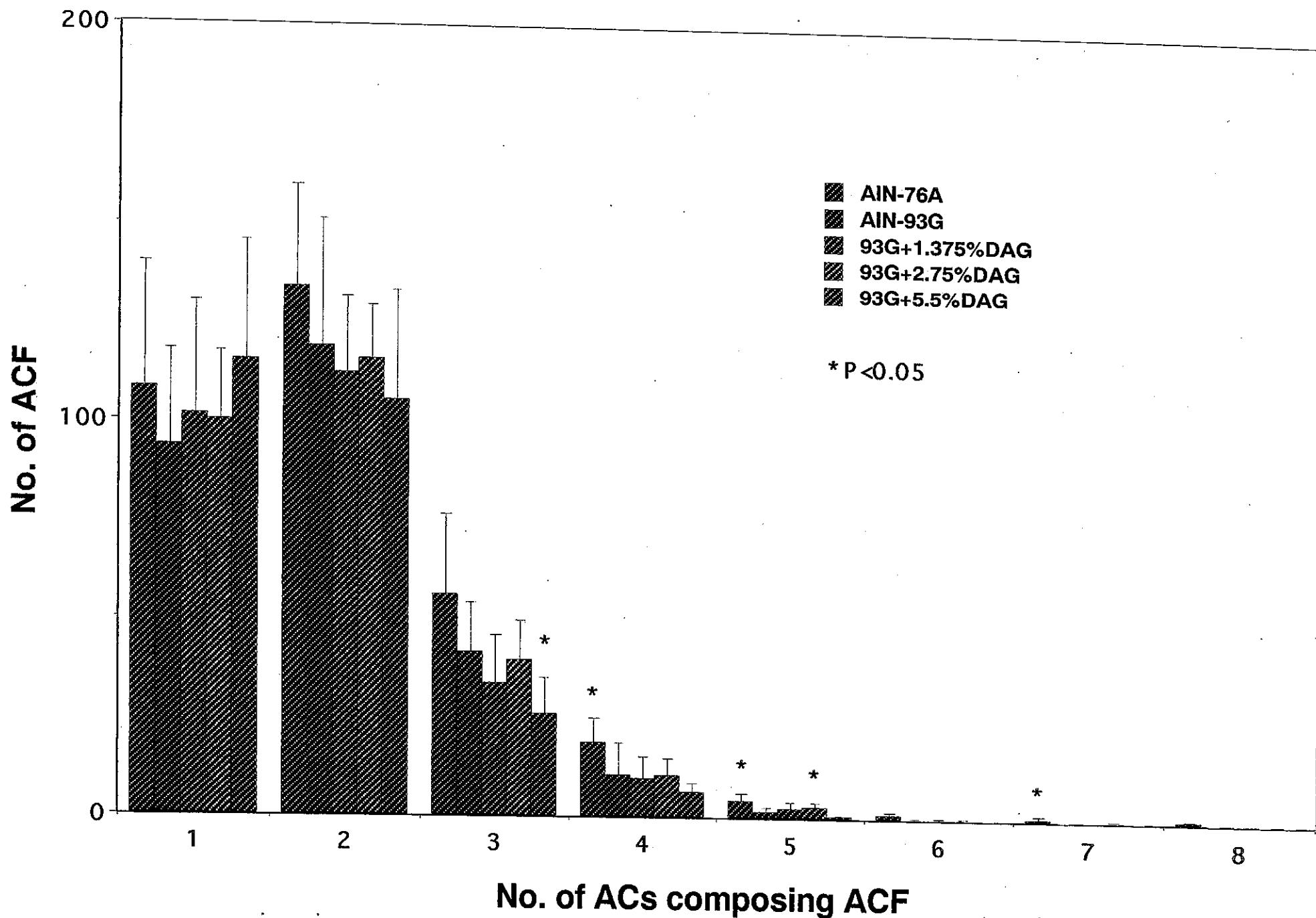
Average ± SD * , **, *** , ****: P<0.05, P<0.001, P<0.005, P<0.001.

図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

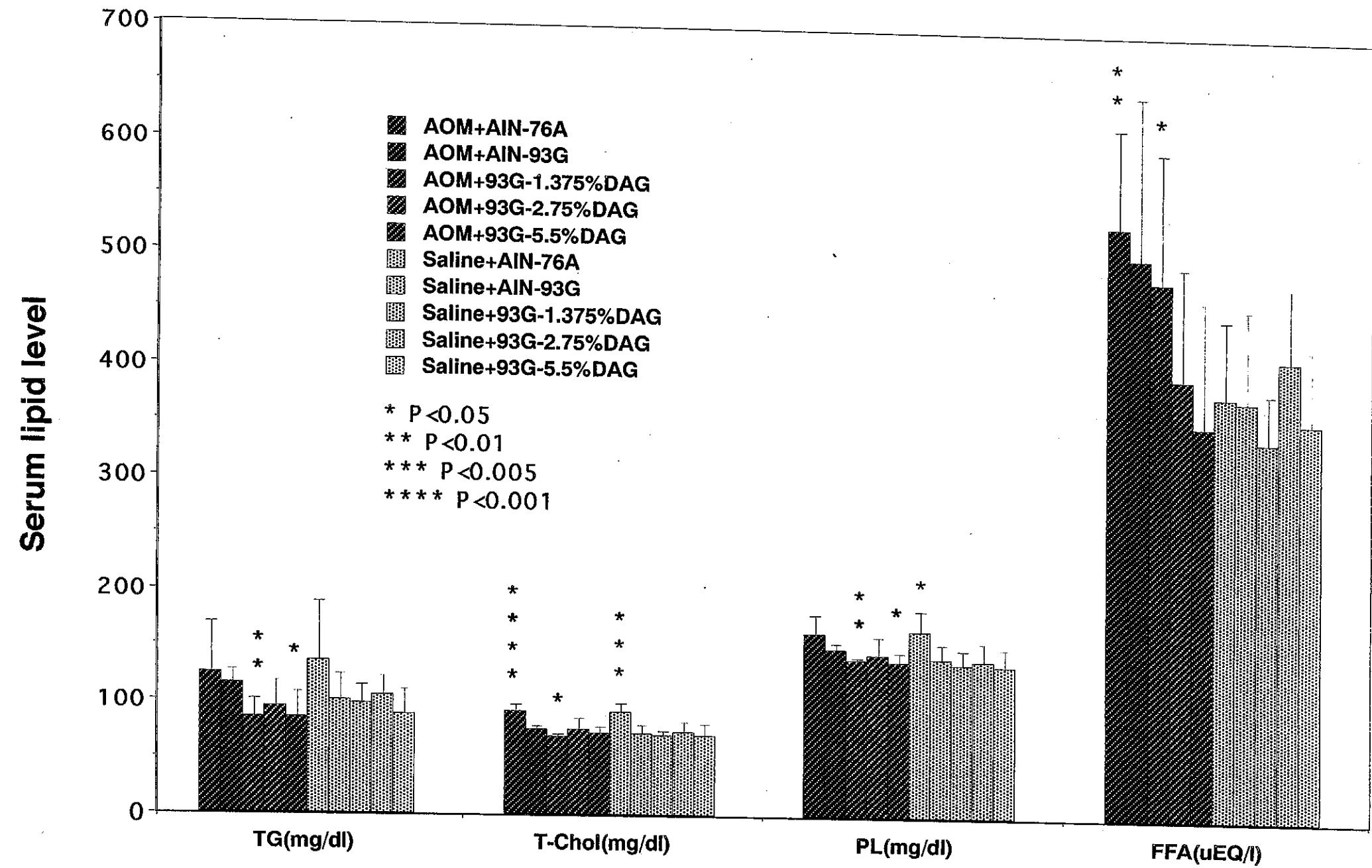


表2

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.

図7

Body Weight Change

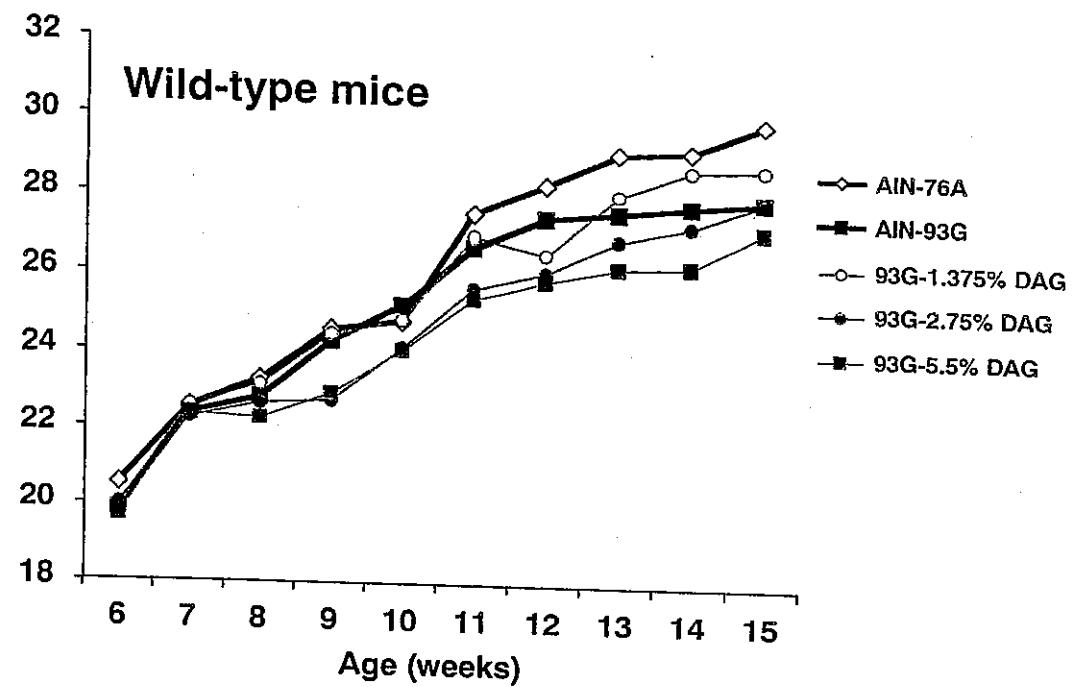
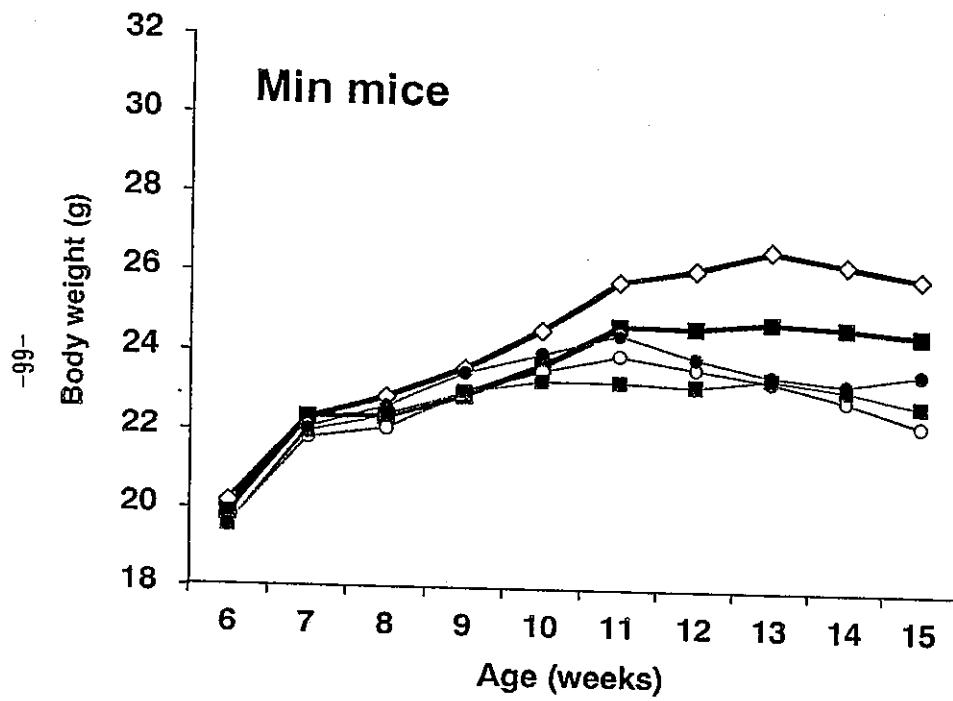


表 3

Effect of DAG on Intestinal Polyp Development in Min Mice

Treatment	No. of mice	No. of polyps/mouse					Total	
		Small intestine			Colon			
		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

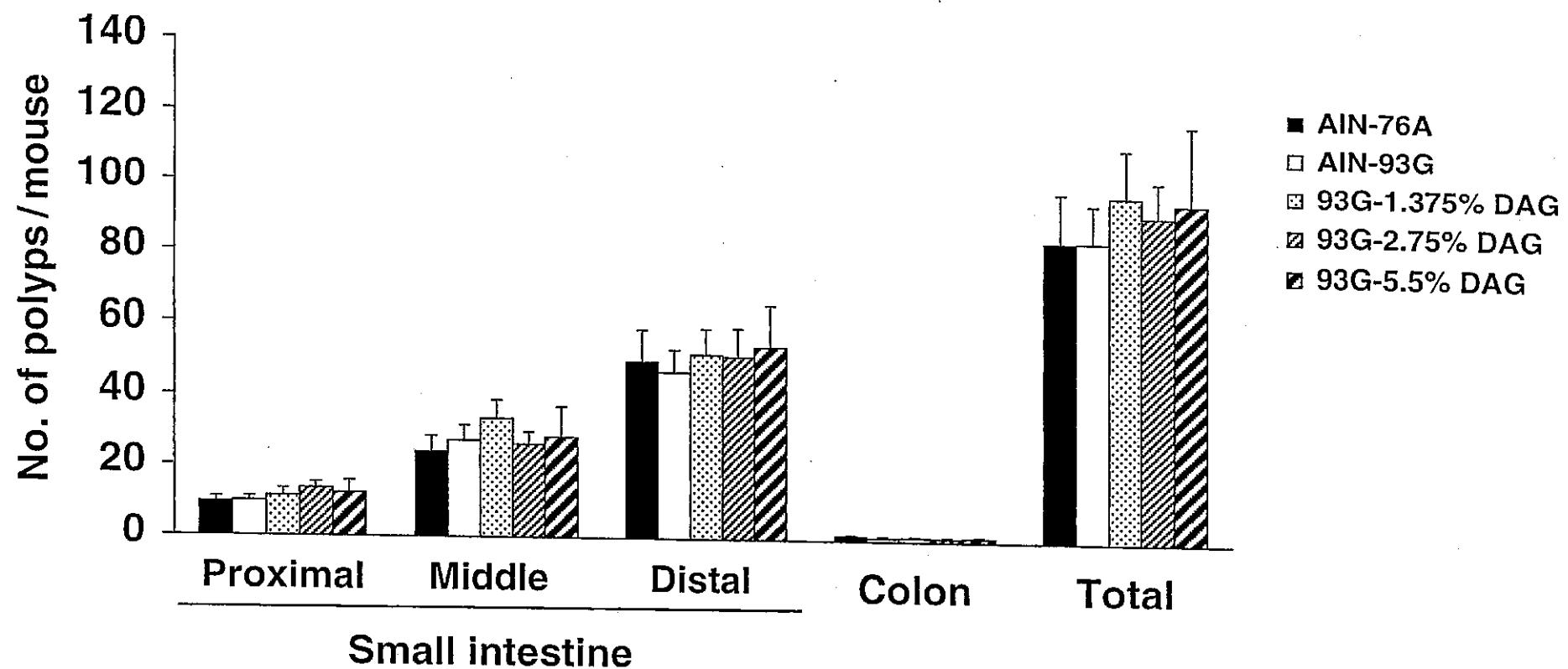


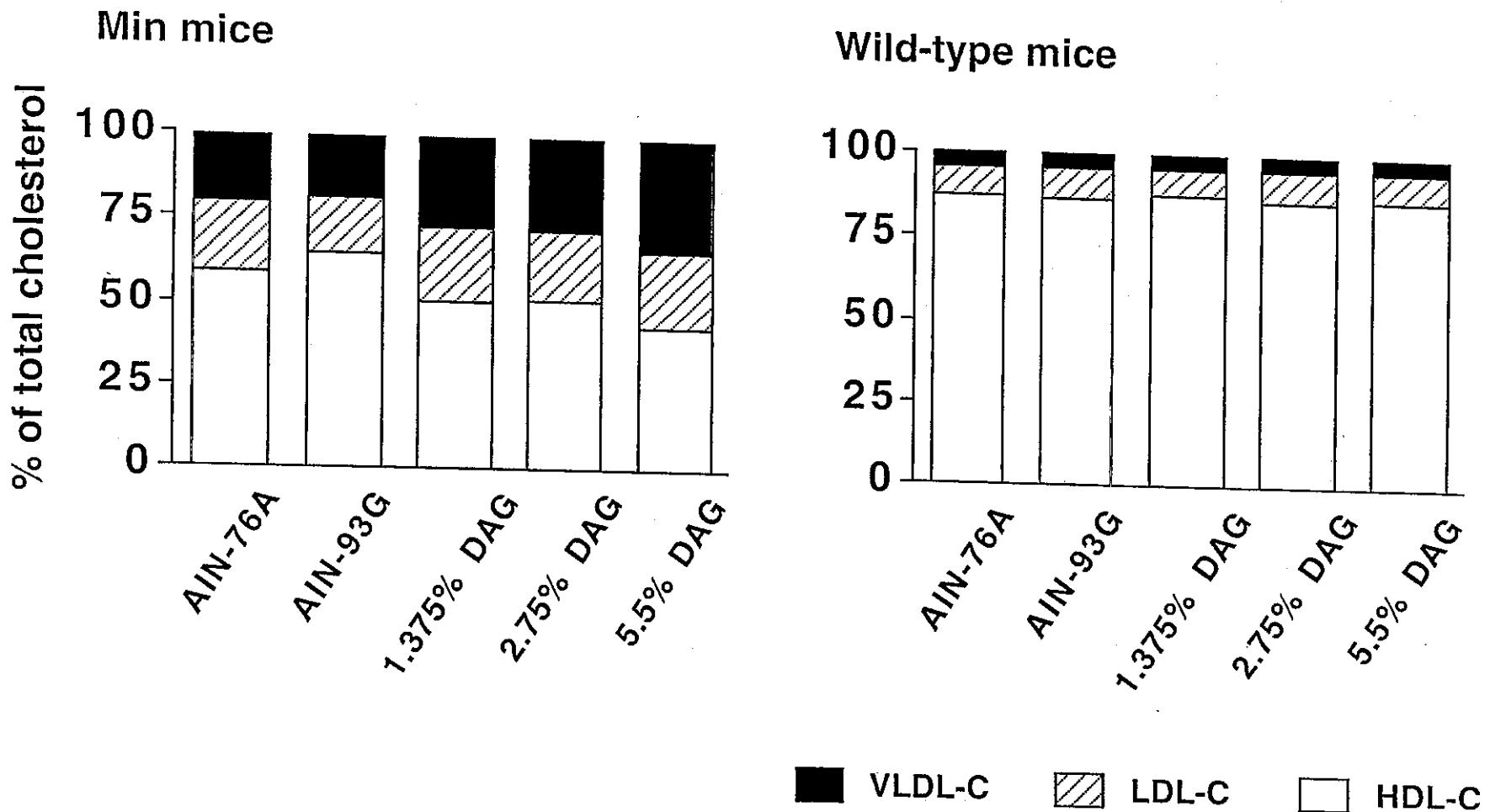
表 4

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



ジアシルグリセロール安全性関連試験－1

試験	雑誌名／報告方法／(試験期間)	著者／試験実施機関名	表題／実験名称／[目的]	対象n(DAG群n/総n) 摂取期間DAG/TAG摂取量	試験方法／項目	結果	引用文献資料番号
急性毒性試験	試験報告書(1996.2)	ボソリサーチセンター	ラットを用いた経口投与による単回投与毒性試験 [対照:ナタネTG]	ラット(SD) 1.5ml/100g	一夜絶食したSD系ラット(雄雌、6週齢、各群5匹)に、DAG(DAG:原料)を経口投与(体重100g当たり1.5mL)し、対照の菜種TAGと比較した。検査項目:死亡および一般状態・体重変化・剖検	死亡および体重異常は見られず、体外表、頭部、胸部及び腹部の臓器・組織の肉眼的観察では、いずれの動物にも異常所見はみられなかった。本試験条件下において、DAGの致死量は雌雄ともに15000mg/kgを上回ると推定された。	3
	試験報告書(1996.2)	ボソリサーチセンター	ラットを用いた経口投与による単回投与毒性試験 [対照:キャノーラサラダ油]	ラット(SD) 1.5ml/100g	一夜絶食したSD系ラット(雄雌、6週齢、各群5匹)に、DAG(DAG油:製品)を経口投与(体重100g当たり1.5mL)し、対照のキャノーラサラダ油と比較した。検査項目:死亡および一般状態・体重変化・剖検	死亡および体重異常は見られず、体外表、頭部、胸部及び腹部の臓器・組織の肉眼的観察では、いずれの動物にも異常所見はみられなかった。本試験条件下において、DAGの致死量は雌雄ともに15000mg/kgを上回ると推定された。	4
変異原性試験	試験報告書(1992.5~1992.8)	ハンチントン・リサーチセンター	微生物を用いる復帰突然変異試験 [DAG変異原性試験]	細菌	塩基対置換型変異株Salmonella typhimurium TA100, TA1535, Escherichia coli WP2uvrA及びフレームシフト型変異株Salmonella typhimurium TA98, TA1537の計5菌株を用い、エタノールを溶媒として、Amesらの方法に準拠したプレート法にて、ラット肝から調製したS9による代謝活性化の存在下および非存在下にて、復帰突然変異誘発能の有無を試験。	代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数を用量相関的に増加させず、溶媒对照と比較して2倍以上のコロニー数の増加も観察されなかった。以上の結果より、本試験条件下においてDAGは復帰突然変異誘発能を有しないと判断された。	5
	Food Chem. Toxicol., 43(2), 253~260, 2005	T. Kasamatsu et al.	Genotoxicity studies on dietary diacylglycerol (DAG) oil	細菌 培養細胞(CHL/IU) マウス(ICR、オス) 500,1000,2000 mg/kg	1) 塩基対置換型変異株及びフレームシフト型変異株計5菌株を用い、DMSOを溶媒として、Amesらの方法に準拠したブレインキュベーション法にて、ラット肝から調製したS9による代謝活性化の存在下および非存在下にて、復帰突然変異誘発能の有無を試験。2) 0.5% CMC-Naを溶媒として用い、DAGのチャイニーズハムスター肺由来細胞株(CHL/IU)に対する染色体異常誘発性を、ラット肝から調製したS9による代謝活性化の存在下および非存在下にて試験した(試験濃度: 1250~2500~5000 μg/mL)。3) DAGを24時間間隔で2回、ICRマウスに強制経口投与した(投与量: 500~1000~2000mg/kg)。最終投与24時間後に骨髄細胞を採取して標本を作製し、小核をもつ多染性赤血球の出現頻度について試験した。	1) 代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数を用量相関的に増加させず、溶媒对照と比較して2倍以上のコロニー数の増加も観察されなかった。以上の結果より、本試験条件下においてDAGは復帰突然変異誘発能を有しないと判断された。 2) 染色体の構造異常ならびに数的異常の出現率は、いずれも5%以下であり、本試験油に染色体異常誘発性はないと判断された。 3) いずれの投与群も陰性対照群と比較して有意な小核の誘発は認められなかった。	6
反復投与毒性	試験報告書(1991.7)	Hazleton Washington, Inc.	ラット28日間反復投与毒性試験 [DAG亜急性毒性試験]	ラット(SD) 餌中DAG0.2~5.0% 28日間混餌投与	総脂質量を10%として、DAGを0.2%, 1.0%, 5.0%に設定し、Corn Oilをそれぞれ9.8%, 9.0%, 5.0%配合した群を設定した。28日間混餌投与し、死亡数、一般状態観、体重、摂餌量、血液学検査、血液生化学、尿検査、眼科学的検査、剖検、臓器重量、病理検査から毒性を評価した。	0.2, 1.0、または5.0% (重量/重量)のDAGを少なくとも連続28日にわたりて混餌投与したラットでは、顕著な毒性の徴候は認められなかった。NOAEL: 混餌濃度5% (最高濃度)	7

ジアシルグリセロール安全性関連試験－2

試験	雑誌名／報告方法／(試験期間)	著者／試験実施機関名	表題／実験名称／[目的]	対象 n(DAG群n/総n) 摂取期間 DAG/TAG摂取量	試験方法／項目	結果	引用文献資料番号
反復投与毒性	試験報告書 (2001.3~2002.3) C. P. Chengelis et al., Food Chem. Toxicol., in press	WIL Research Lab.	幼若イヌを用いたDAGの1年間慢性毒性試験 [成長・発育期長期摂取による慢性毒性試験]	ビーグル犬(8週齢) 餌中DAGO~9.5% 1年間混餌投与	DAG0%・1.5%・5.5%・9.5%を含む脂肪量9.5%の餌を1年間ビーグル犬に摂取させた。死亡、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学検査、血液生化学、眼科学的検査、心電図、剖検、臓器重量、病理検査	DAG摂餌量は雄で326,1227,2541mg/kg/日、雌で348、1487、2300mg/kg/日であった。死亡はなく、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量にDAGの影響はなかった。また、血液学的検査、尿検査項目への影響はなく、毒性所見を示唆する血清生化学検査値の変化も見られなかった。さらに毒性を示唆する眼科的所見、心電図所見もなく、剖検所見、病理組織所見および臓器重量に被験物質に起因する変化は見られなかった。DAGを2.5ヶ月齢から投与してもイヌの正常な成長・発達に影響を及ぼさなかった。 NOEL:混餌濃度9.5%(最高濃度)	8
催奇形性試験	試験報告書 (2003.8~2004.3)	WIL Research Lab.	ラットを用いた催奇形性試験	ラット(SD) 強制経口投与 5mL/kg 妊娠6~17日	DAGをコーン油を溶媒にして、妊娠6日から17日の期間、強制経口投与し、母動物および胎児に対する影響を評価した。投与量は、5mL/kgを最高にして、2.5(コーン油2.5), 1.25(コーン油3.75), 0(コーン油5) mL/kgとした。	一般状態観察においていずれの群においてもDAG投与の影響はみられなかった。DAGを投与した全ての群で母動物体重、体重増加量、摂餌量にDAG投与の影響はみられず、胎児の成長や生存性にも何ら影響はみられなかった。さらに、本試験においてDAG投与に起因すると思われる胎児の奇形及び変異も認められなかった。NOAEL:5mL/kg(最高用量)	9
二世代生殖毒性試験	試験報告書 (2003.8~2004.9)	WIL Research Lab.	ラットを用いた経口投与による二世代生殖毒性試験	ラット(SD) 強制経口投与 5mL/kg	DAGをコーン油を溶媒にして、(F0)交配70日前から、交配期間、哺育期間を通して5mL/kgにて、経口投与した。F1出生児にも同様に投与し、F2出生児の離乳時まで、投与を継続し、生殖機能に対する影響を評価した。	F0およびF1の生殖パラメーター、生存率、一般状態、平均体重、摂餌量、剖検、病理検査、器官重量、出生児の発育、生存にDAG投与による影響は認められなかった。 NOAEL:5mL/kg(4.63g/kg/day:最高用量)	10
長期栄養試験	Food Chem. Toxicol., 39, 317~329(2001)	M.G.Soni et al.	Chronic study of diacylglycerol oil in rats. [ラットを用いたDAG長期栄養試験]	ラット 餌中:最大5.3% 2年間混餌投与	DAGまたはTAGを食餌中に2.65%、及び5.3%含む食餌を105週間与え、30,77,105週での栄養特性および安全性項目を評価。	TAGとの比較において、DAGは途中死亡動物数、体重推移、摂餌効率、尿検査、血液学的検査、病理学的検査において差はなかった(毒性変化なし)。 (本報文はラットを用いた長期栄養試験の内容である。)	11
発がん性試験	試験報告書 (2000.4~2003.4) C. P. Chengelis et al., Food Chem. Toxicol., in press	WIL Research Lab.	ラットを用いた混餌投与による2年間ガン原性試験 [DAG長期摂取時の毒性および発がん性への影響評価]	ラット 餌中:最大5.3% 2年間混餌投与	DAGを最大5.5%配合した飼料を104週間混餌投与した。対照群には1群:脂質4.5%の基礎飼料、2群:TAG5.5%を用い、1~5群は制限給餌(雌雄各50匹)、6, 7群は自由摂取(雌雄各65匹)とし、2年間混餌投与を行ない、死亡、一般状態観察、詳細観察、体重、摂餌量、血液学検査、血液生化学、尿検査、眼科学的検査、剖検、臓器重量、病理検査を実施。	基礎飼料群(1群)に対し、TAG,DAG群ともに、生存率の低下、体重、体脂肪の増加等が認められたが、制限給餌群、自由摂取群とともにTAG,DAGの違いによる差は認められず、DAG投与による一般毒性学的な影響およびガン原性は認められなかった。 NOEL=5.5%混餌濃度	12
	試験報告書 (2000.11~2004.1) C. P. Chengelis et al., Food Chem. Toxicol., in press	WIL Research Lab.	マウスを用いた混餌投与による2年間ガン原性試験 [DAG長期摂取時の毒性および発がん性への影響評価]	マウス 最大9796mg/kg 2年間混餌投与	DAGを最大6.0%配合した飼料を2年間混餌投与した(自由摂取)。餌中配合濃度は 1.5, 3.0, 6.0%とし餌中の脂質含量は脂肪酸組成を合わせたトリアシルグリセロールを用い、6%に統一させた。検査項目: 一般状態、体重、摂餌量、血液検査、剖検、臓器重量、病理検査を実施。	生存率、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、剖検所見、臓器重量、病理組織学的検査にDAGに起因する変化なし。DAGを6.0%まで飼料に配合して2年間投与した結果、DAG投与に起因する毒性所見および腫瘍発生頻度の増加は認められなかった。NOEL=6.0%混餌濃度(最高用量)	13

ジアシルグリセロール安全性関連試験－3

試験	雑誌名／報告方法／(試験期間)	著者／試験実施機関名	表題／実験名称／[目的]	対象n(DAG群n/総n) 摂取期間DAG/TAG摂取量	試験方法／項目	結果	引用文献資料番号
加熱処理DAGの安全性試験	試験報告書(2003.4)	薬物安全性試験センター	TG-5のラットを用いた経口投与による単回投与毒性試験〔加熱劣化油急性毒性試験:対照群(TAG)〕	ラット(SD) 加熱劣化TAG 5000mg/kg	ボテト8時間連続フライ使用油(COV=33、重合物12%程度)TAGを用い、5000mg/kgの用量にて単回の強制経口投与を行った。投与後、一般状態及び体重を、14日間にわたり観察・測定し、また、生存例すべてについて、剖検による全身諸臓器の肉眼的観察を実施した。	投与・観察期間中の死亡例は雌雄共に見られず、外観及び行動等に異常は認められなかった。体重は、雌雄共に観察期間を通じて正常と思われる増加推移を示した。雌雄共に体表に異常は認められず、頭蓋腔、胸腔、腹腔内の器官及び組織の肉眼的観察において異常は認められなかった。以上、本試験条件下において、加熱劣化TAG(TG-5)のLD50値は5000mg/kg用量以上であった。(本試験はDAG oil試験の対照として行ったものである。)	14
	試験報告書(2003.4)	薬物安全性試験センター	DG-5のラットを用いた経口投与による単回投与毒性試験〔加熱劣化油急性毒性試験:(DAG群)〕	ラット(SD) 加熱劣化DAG 5000mg/kg	ボテト8時間連続フライ使用油(COV=31、重合物12%程度)DAGを用い、5000mg/kgの用量にて単回の強制経口投与を行った。投与後、一般状態及び体重を、14日間にわたり観察・測定し、また、生存例すべてについて、剖検による全身諸臓器の肉眼的観察を実施した。	投与・観察期間中の死亡例は雌雄共に見られず、外観及び行動等に異常は認められなかった。体重は、雌雄共に観察期間を通じて正常と思われる増加推移を示した。雌雄共に体表に異常は認められず、頭蓋腔、胸腔、腹腔内の器官及び組織の肉眼的観察において異常は認められなかった。以上、本試験条件下において、加熱劣化DAG(DG-5)のLD50値は5000mg/kg用量以上であった。	15
	Food and Chemical Toxicology (Food Chem Toxicol), 43(2), 253-260, 2005	T. Kasamatsu et al.	Genotoxicity studies on dietary diacylglycerol (DAG) oil	細菌 培養細胞(CHL/IU) マウス(ICR、オス) 500,1000,2000 mg/kg	ボテト8時間×3日連続フライ使用DAG油を用い、 1)塩基対置換型変異株及びフレームシフト型変異株計5菌株を用い、DMSOを溶媒として、Amesらの方法に準拠したプレインキュベーション法にて、ラット肝から調製したS9による代謝活性化の存在下および非存在下にて、復帰突然変異誘発能の有無を試験。2)0.5%CMC-Naを溶媒として用い、DAGのチャイニーズハムスター肺由来細胞株(CHL/IU)に対する染色体異常誘発性を、ラット肝から調製したS9による代謝活性化の存在下および非存在下にて試験した(試験濃度:1250・2500・5000μg/ml)。3)DAGを24時間間隔で2回、ICRマウスに強制経口投与した(投与量:500・1000・2000mg/kg)。最終投与24時間後に骨髄細胞を採取して標本を作製し、小核をもつ多染色赤血球の出現頻度について試験した。	1)代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数を用量相関的に増加させず、溶媒对照と比較して2倍以上のコロニー数の増加も観察されなかった。以上の結果より、本試験条件下においてDAGは復帰突然変異誘発能を有しないと判断された。 2)染色体の構造異常ならびに数的異常の出現率は、いずれも5%以下であり、本試験油に染色体異常誘発性はないと判断された。 3)いずれの投与群も陰性対照群と比較して有意な小核の誘発は認められなかった。 本試験条件下において、加熱した場合に市販のサラダ油と毒性学的な差は認められなかった。	6
	試験報告書(2003.12~2004.9)	WIL Research Lab.	Heated KA-1の混餌投与による90日間反復投与毒性試験	ラット(SD) 餌中DAG5.5% 90日間混餌投与	ボテト8時間×3日連続フライ使用DAG油を用い、加熱処理したDAGを5.5%, 2.75%, 1%, 0%に設定し、加熱処理をしていないDAGをそれぞれ0%, 2.75%, 4.5%配合して、総脂質量を5.5%とした。また、対照として市販のサラダ油(トリアシルグリセロール)を同様に加熱処理した群を設けた。90日間混餌投与し、死亡数、一般状態観、体重、摂餌量、血液学検査、血液生化学、尿検査、眼科学的検査、剖検、臓器重量、病理検査から毒性を評価した。	死亡ではなく、一般状態、体重、摂餌量、臨床検査(血液学、血液生化学、尿検査)項目、自発運動量、臓器重量にDAG投与による影響は認められなかった。本試験条件下において、加熱した場合に市販のサラダ油と毒性学的な差は認められなかった。NOAEL:混餌濃度5.5%(最高用量)	16
発がんプロモーション試験	試験報告書(2004.1~2005.1)	DIMS医科学研究所	DAGの中期多臓器発がん試験	ラット(F344雄) 餌中DAG5.5%	主要各臓器に対する5種類のイニシエーター(DMBDD)をラット[F344/DuCrj系(SPF)雌雄]に投与した後、DAGを24週間最大5.5%混餌投与し、全身諸臓器に対する発がん修飾作用の有無を評価した。	DAG投与に起因すると考えられる腫瘍発生の増加はみられず、DAGは全身諸臓器への発がん修飾作用を有さないことが示された。	17

ジアシルグリセロール安全性関連試験－4

試験	雑誌名／報告方法／(試験期間)	著者／試験実施機関名	表題／実験名称／[目的]	対象n(DAG群n/総n) 摂取期間 DAG/TAG摂取量	試験方法／項目	結果	引用文献番号
消化管内容物および血清、糞便中の1,2-DAG量の測定	Lipids, 40(3), 281–286 (2005)	N. Osaki, et al.	Metabolites of Dietary Triacylglycerol and Diacylglycerol During the Digestion Process in Rats	ラット(Wister雄) 餌中DAG10%	10%DAG油配合食餌もしくは、10%TAG油(DAG油と同脂肪酸組成)配合食餌、を1時間自由摂取させ、胃内容物および小腸内容物中の1(3),2-DAG量を測定した。	DAG投与とTAG投与間で胃及び小腸内容物中の1(3),2-DAG量に差は認められなかった。	18
	社内報告書(2004.2.27)		ラットを用いた血清中の1,2-DAG量の測定	ラット(Wister雄) 餌中DAG10%	10%DAG油配合食餌もしくは、10%TAG油(DAG油と同脂肪酸組成)配合食餌、を1時間自由摂取させ、血清中の1(3),2-DAG量を測定した。	DAG投与とTAG投与間で血清中の1(3),2-DAG量に差は認められなかった。	20
	社内報告書(2004.12.02)		ラットを用いた消化管(盲腸及び大腸)内容物中及び糞便中の1,2-DAG量の測定	ラット(Wister雄) 餌中DAG10%	10%DAG油配合食餌もしくは、10%TAG油(DAG油と同脂肪酸組成)配合食餌、を30日間自由摂取させ、盲腸及び大腸内容物中、糞便中の1(3),2-DAG量を測定した。	DAG投与とTAG投与間で盲腸及び大腸内容物中、糞便中の1(3),2-DAG量に差は認められなかった。	19
消化管粘膜細胞、およびヒト大腸由来細胞を用いたPKC活性測定	社内報告書(2004.12.07)		DAGoilの消化管粘膜組織のプロテインキナーゼC活性化への影響—同脂肪酸組成TAG oilとの比較—	ラット(Wister雄) 餌中DAG5%、23% 培養細胞(Caco-2)	ラット: DAG油(5%、23%)配合食餌もしくはTAG油(5%、23%、DAG油と同脂肪酸組成)配合食餌を30日間自由摂取させ、消化管(食道、胃、小腸、盲腸、大腸)を摘出後、各部位の粘膜を探取し、蛋白抽出、精製後にPKC活性を測定した。 Caco-2細胞: DAG油(50 μg/ml)またはTAG油(50 μg/ml)を、培養したヒト大腸由来細胞に添加60分後に細胞を探取し、蛋白抽出、精製後にPKC活性を測定した。	ラット消化管粘膜: DAG投与とTAG投与間で消化管粘膜のPKC活性に差は認められなかった。 Caco-2細胞: DAG添加とTAG添加でCaco2細胞のPKC活性に差は認められなかった。	21
その他動物を用いた試験	J. Oleo Sci., 51(9), 583–588 (2002)	M. Sugano, et al.	Dimethylbenz(a)anthracene-induced Mammary Tumorigenesis in Sprague-Dawley Rats Fed Saturated and Polyunsaturated Triacylglycerols and Diacylglycerols	ラット(SDメス) 90日 餌中DAG7%	7週令のSDラット(メス)にDMBAを10mg/ラット経口投与し、7%DAG油配合食餌(ナタネ、またはバーム)もしくは、7%TAG油配合食餌(同油)を90日間摂取させ、乳腺腫瘍発生数と食餌摂取量、体重、脂肪細胞数を測定した。	ジアシルグリセロールはトリアシルグリセロールと比べて、腫瘍誘発性に差はなかった。また、前者には卵巣周囲組織の白色脂肪組織重量の減少と血中TGの減少が確認された。	38

ジアシルグリセロール有効性試験(ヒト有効性:長期摂取／過剰摂取安全性)－1

試験	雑誌名／報告方法／(試験期間)	著者／試験実施機関名	表題／実験名称／[目的]	対象 n(DAG群n/総n) 摂取期間 DAG/TAG摂取量	試験方法／項目	結果	引用文献 資料番号
単回摂取	日本油化学会誌, 46(3), 309-314(1997)	渡邊浩幸他	ヒトの脂質代謝に及ぼすジアシルグリセリンの影響[DAG多量単回摂取時の影響評価]	成人男性 17/17(クロスオーバー) 単回投与 44g	体重60kg当たり脂質量44gのDAGまたはTAGをエマルション形態で摂取させ、2時間毎に採血を行ない、血清脂質分析を行った。	脂質エマルション摂取後の血清中性脂肪の上昇は、TAG投与と比較してDAG投与で少なかった。また、血清βリボタンパク質濃度、血清リン脂質濃度もDAG摂取で6時間目及び4,6時間目で有意に低値を示した。一方、血清中遊離脂肪酸濃度、ケトン体濃度血糖値、血清インスリン濃度に有意な差は認められなかった。	22
	J. Am. Coll. Nutr., 19(6), 789-796 (2000)	H. Taguchi et al.	Double-blind controlled study on the effects of dietary diacylglycerol on postprandial serum and chylomicron triacylglycerol responses in healthy humans	成人男性 高摂取群:17/17:44g 中摂取群:10/10:20g 低摂取群:13/13:10g (クロスオーバー)	10g, 20g, 40gの3段階の摂取量でDAGを摂取した場合の食後の血清脂質変動を、脂肪酸組成を同じにしたTAGを対照として観察した。	TAG摂取と比べてDAG摂取で血清TGの上昇抑制が認められた。また、これは血清カロミクロン中のTG量の差に起因することが明白となった。	23
	Clin. Chim. Acta, 311(2), 109-117 (2001)	N. Tada, et al.	Dynamics of postprandial remnant-like lipoprotein particles in serum after loading of diacylglycerols	成人男性 6/6(クロスオーバー) 単回投与:30g/m ² (体表面積当たり)	体表面積当たり30gのDAGまたは脂肪酸組成を同じにしたTAGをエマルション形態で摂取した場合のレムナント様リボタンパクの変動を、食後8時間まで観察した。	単回摂取後の血清レムナント様リボタンパクのレベルは、TAG投与と比較してDAG投与で上昇しにくい。	24
長期摂取(一般)	Ann. Nutr. Metab., 45, 259-264(2001)	H. Watanebe et al.	Fat-soluble vitamin status is not affected by diacylglycerol consumption. [DAG摂取による脂溶性ビタミン吸収性の影響評価]	成人男性 15/27(パラレル) 12週間 1日20g	マヨネーズまたは乳化液形態で、1日20gのDAG/TAGを12週間投与。血清中のビタミンA,E,Dの量を0.4.8.12週で測定。	TAGをコントロールとして血清脂溶性ビタミン濃度の変動について評価した結果、両脂質間での脂溶性ビタミン濃度の違いは認められず、DAGは脂溶性ビタミンの吸収に影響を与えたかった。	25
	Food Chem. Toxicol., 42(9), 1419-1429 (2004)	K. Yasunaga, et al.	健常人に対するDAG大量摂取による安全性の確認[DAG長期多量摂取時の安全性評価]	成人男女 39/81(パラレル) 3ヶ月 1日30g:0.5g/kg体重	DAGまたはTAGを1日0.5g/kg体重、12週間摂取。身体計測、血液検査、食事日誌解析、問診を実施。	問診、血液検査、身体計測の結果、DAGの摂取による悪影響は観察されず、試験担当医師より0.5g/kg体重のDAGの日常的な摂取に問題はないとの見解を受けた。	26
	J. Nutr., 130(4), 792-797(2000)	T. Nagao et al.	Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in men in a double-blind controlled trial. [DAG長期摂取による成人男性への影響評価]	成人男性 19/38(パラレル) 4ヶ月 1日10g	1日の脂質総摂取量を約50gとし、内10gをDAGに置換えて4ヶ月間連続摂取した時の体脂肪、血中脂質動態についてTAGと比較を行なった。	TAG群に比べDAG群で体重および腹部脂肪面積の低下が認められた。またCT値比による肝脂肪量はTAG群で変化しなかったのに対し、DAG群で有意に低下した。血清脂質濃度(TG, Chol, 遊離脂肪酸)や血糖、インスリン、総ケトン体は両群で有意差がなかった(論文中に記載していないが、DAGに起因する有害事象は認められなかった)。	27
	健康・栄養食品研究, 4(3), 89-101 (2001)	武井章ら	ジアシルグリセロール含有マヨネーズのヒト脂質代謝および体脂肪に及ぼす影響	成人男性 単回試験:18/18 (クロスオーバー) 長期試験:23/43 (パラレル) 単回投与:10.5g 長期:4ヶ月: 10g/day	DAG含有マヨネーズ15g摂取後の血清脂質の変動を脂肪酸組成を同じにしたTAG含有マヨネーズを対照として比較測定を行った。さらに、同マヨネーズを16週間に渡り摂取し、4週毎に身体測定、採血および腹部CT断層撮影を行った。	単回摂取ではDAG含有マヨネーズ摂取後3時間目の血清TG増加率とカロミクロンTGの増加量はTAG含有マヨネーズより有意に低値だった。長期摂取ではDAG含有マヨネーズ群の全脂肪面積・内臓脂肪面積はTAG含有マヨネーズ群より有意に低下した。試験を通してDAG含有マヨネーズを摂取することに起因する異常な所見は認められなかった。	28

ジアシルグリセロール有効性試験(ヒト有効性:長期摂取／過剰摂取安全性)－2

試験	雑誌名／報告方法／(試験期間)	著者／試験実施機関名	表題／実験名称／[目的]	対象 n(DAG群n/総n) 摂取期間 DAG/TAG摂取量	試験方法／項目	結果	引用文献番号
長期摂取(一般)	Am. J. Clin. Nutr., 76(6), 1230-1236 (2002)	K. C. Maki, et al.	Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil	米国肥満男女 65/131 (パラレル)6ヶ月 総カロリーの15%	1日の摂取カロリーを2100-3350kJ/d(500-800kcal)減らした制限食事下で、DAGを摂取カロリーの15% (20-40g/日)の割合で6ヶ月間摂取したときの身体測定、採血及びCTとDEXAによる体脂肪量についてTAG摂取群と比較した。	DAG摂取群はTAG摂取群に比べ体重及び体脂肪の低下が有意に促進されることがわかった。本試験で発生した有害事象のほとんどは試験油に起因するものではなく、両群間に有意差はなかった。安全性の指標となる血液検査項目、血圧などもDAG群では異常はなかった。	29
	健康医学(日本医師会誌), 14(3), 258-262(1999)	桂木能久ら	肥満や高脂血症に及ぼす食飴性ジアシルグリセロールの効果 [実使用場面におけるDAG長期使用評価]	成人男女 109/109 (モナディック) 自由摂取	通常家庭で使用している食用油をDAG油(製品)に置換え、普段の食生活で9ヶ月間使用。3ヶ月毎に身体計測と血液検査を実施。	6ヶ月目からウエスト周囲長、3ヶ月目から皮下脂肪厚が初期値に比べ有意に低下した。血清TG濃度は、初期値において高い値を示す被験者で低下効果を示した。HDLコレステロールが6ヶ月目から有意に上昇するとともに、LDLコレステロールは6ヶ月目から有意に低下した。肝機能や安全指標となる項目には変動は認められなかった。	30
	健康医学, 19(1), 29-32, 2004	大月和宣ら	ジアシルグリセロールを主成分とする食用油の2年間の長期摂取試験	成人男女 60/60 (モナディック) 自由摂取	通常家庭で使用している食用油をDAG油(製品)に置換え、普段の食生活で24ヶ月間使用。0,3,6,9,12,18,24ヶ月めに身体計測と血液検査を実施、3ヶ月毎に食事調査を実施。	DAGを主成分とする食用油について、BMI>25または中性脂肪>150mg/dLのいずれか1つ以上を満たし、試験を終了した60名(男51・女9)を対象とする2年間の摂取試験結果をまとめた。BMI・ウエスト・拡張期血圧・HbA1cが低下、HDLは上昇。また高リスク群(リスク数3項目以上)で有意なリスク減少が認められた。安全性や調理性についても一般的のTAGと比較し臨床的に問題もなく利用できた。	31
長期摂取(特定)	小児科, 43(7), 928-933(2002)	松山健	小児肥満患者に対するジアシルグリセロールの有用性 [DAG摂取による小児肥満患者への影響評価]	小児肥満患者 11/11(モナディック) 5ヶ月 自由摂取	小児肥満患者に対し、家庭で使用する食用油をDAG油換える形で、5ヶ月間試験を行なった。試験開始時から1ヶ月毎に身体計測と血液検査を行なうとともに、臍部CTを試験前、3、5ヶ月後および通常油に戻した後4ヶ月後に撮影した。	体重、肥満度、BMIの改善はなかったが、臍部総脂肪面積(特に皮下脂肪面積)が有意に減少し、血清TGの低減効果やHDLchoの増加が認められた。さらに血清レブチンも低下し、脂質代謝の改善が示唆された(論文中に記載していないが、DAGに起因する有害事象は認められなかった)。4ヶ月後の予後調査において腹部脂肪面積は、試験開始時の値に戻る傾向が認められた。	32
	Biochem. Biophys. Res. Commun., 302(4), 743-750 (2003)	Y. Yanagisawa, et al.	若年成人女性に対するDAG摂取による体脂肪と血中脂質への効果検証 [DAG長期摂取による若年女性への影響評価]	若年成人女性 28/56(パラレル) 8週間 1日20g	1日の脂質総摂取量を約50gとし、内20gをDAGに置換えて8週間連続摂取した時の体脂肪、血中脂質動態をTAG摂取と比較検討すると共に、被験者の脂質代謝関連遺伝子との関係も検討した。	DAG摂取による内臓脂肪や血中脂質の改善効果は、高脂血症を発症しやすい遺伝子背景(FABP2やMTPの変異)のヒトに対してより効果的である(論文中に記載していないが、DAGに起因する有害事象は認められなかった)。	33
	J. Nutr., 131(12), 3204-3207 (2001)	K. Yamamoto, et al.	高脂血症を併発した糖尿病患者に対するDAG摂取による血中脂質への効果検証 [DAG長期摂取による糖尿病患者への影響評価]	2型糖尿病患者 8/16(パラレル) 3ヶ月 自由摂取	栄養指導下で1日10gの摂取を目標に、日常使用している食用油を継続使用する群(Cont群)と、その食用油をDAGにおきかえて使用する群(DAG群)の3ヶ月間の血液検査の変化を比較した。	Cont群では、何れの検査項目においても有意な変動は認められなかったのに対し、DAG群では、血清TGとHbA1cに初期値からの有意な低下を示し、血清TGにおいてはCont群との群間差が認められた。	34
	日本臨床栄養学会雑誌, 21(3,4), 35-38 (2000)	寺本民生ら	ジアシルグリセロールの透析患者高脂血症に及ぼす影響	高脂血症透析患者 10/10(モナディック) 3ヶ月:自由摂取	高脂血症の透析患者に対し、家庭で使用する食用油をDAG油に3ヶ月間置き換えて試験を行なった。身体計測、血液検査及び臍部CTを行ない、試験開始時もしくは予後調査の値と比較した。	DAG油の平均摂取量は約9.8g/dであった。またエネルギーと脂質摂取量が試験開始前と比較して増加したにもかかわらず、内臓脂肪面積・VLDL-Lp(a)の減少とHDLの増加が認められた(論文中に記載していないが、DAGに起因する有害事象は認められなかった)。2-3ヶ月後の予後調査においてこれらの効果は、試験開始時の値に戻る傾向が認められた。	35

海外でのDAGの安全性に関する審査状況

2005年9月20日

DAGの食品素材としての利用に関しては、海外でも各国の食品安全性に関する審査制度のもと評価を受けています。これまでに、米国でのFDA（食品医薬品局）「GRAS（一般に安全と認められる食品）」¹⁻⁷⁾、カナダ（Novel Food）⁸⁻¹⁰⁾、オーストラリア（Novel Food）¹¹⁻¹³⁾、ニュージーランド（Novel Food）¹¹⁻¹³⁾、中華民国（健康食品）¹⁴⁻¹⁷⁾に、ジアシルグリセロールのクッキングオイル等への食品使用を申請し、各国の専門家の審査を経て認可を得ています。さらに、EU（欧州）¹⁸⁻²¹⁾とブラジル^{22, 23)}では現在、審査中の状況です（別紙一覧）。

これら海外での食品安全性の審査方法は、米国FDAのGRAS制度、カナダ、オーストラリア、ニュージーランド、EU、ブラジルの新規食品（Novel Foods）制度、および日本の特定保健用食品の制度を参考に作られた中華民国の健康食品制度の大きく3つに大別されます。

以下に、海外の審査方法の概要と経過を記載します。

1. 米国：FDA（食品医薬品局）に対するGRASとしての届出

（審査方法）

米国の食品安全性に関する審査制度で、食品またはその原料を販売する場合には、GRAS（Generally Recognized as Safe：一般に安全と認められる食品）であることが望ましいとされており、1997年より自己確認（Self-Affirmation）による届出制が実施されています。いずれの申請者も、申請品の安全性を第三者に評価を依頼することが求められており、通常、申請者は安全性のエキスパートパネルを設立して、そこに評価を依頼します。申請者は、そのエキスパートパネルから出された安全性に関する見解書を申請書に添付して、FDAに申請品が安全である旨の届出を行います（GRAS Notification）。これに対し、FDAが原則90日以内にコメントを公開するシステムです。

（安全性評価）

DAGの場合は、食品毒物学、脂質栄養学の著名研究者4名から構成されるエキスパートパネルを作成し、評価を依頼しました。その結果、科学的な評価により安全であることが認められ、GRAS申請書類にエキスパートパネルによる見解書「Critical evaluation of DAG」を添付しFDAへの届出を行った結果、FDAからDAGの安全性に関し、「異議なし」のLetterを受け取り、GRASリストに登録されました。さらに、2002年にはDAGの使用用途拡大的ための申請を行い、同様の過程を経て、FDAから「異議なし」のLetterを受け、同様にGRASリストに登録されています。

(DAGの発がんに関する質問)

DAGの安全性評価においてエキスパートパネルの1名から、「DAGによるPKC活性化」特に大腸がんとの関連性についての質問を受けました。本件について、PKCを活性化する可能性が考えられるのは sn-1, 2-DAGであり、その sn-1, 2-DAGは一般的な食用油 (TAG) の消化過程でも生じていること、および長鎖のDAGは細胞膜を透過しないと報告されていることを説明し、エキスパートパネルの理解を得ました。

関連資料一覧	
米国 GRAS, 食用油・マーガリン／スプレッド申請：エキスパートパネルによる DAG oil 安全性に対する見解書 (2000)	1)
米国 GRAS, 食用油・マーガリン／スプレッド申請：GRAS 申請書 (2000)	2)
米国 GRAS, 食用油・マーガリン／スプレッド申請：FDAからの「異議なし」レター； GRN No. 56 (2000)	3)
米国 GRAS, 用途拡大：エキスパートパネルによる DAG oil 安全性に対する見解書 (2002)	4)
米国 GRAS, 用途拡大：GRAS 申請書 (2002)	5)
米国 GRAS, 用途拡大：FDAからの「異議なし」レター； GRN No. 115 (2003)	6)
米国 FDA ウェブサイトに掲載された GRAS リスト (2004) [http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-gras.html#grastop]	7)

2. カナダ、オーストラリア／ニュージーランド、ブラジル： Novel Foods の申請

(審査方法)

カナダ、オーストラリア／ニュージーランド、ブラジルでは、すべての遺伝子組み換え食品や、新規の食品は、それらの国での販売前に各国専門家による安全性の評価と承認を受けることが必要とされています。

(安全性評価と許可)

カナダでは、カナダ政府機関の Health Canada に申請し、2004年に、DAGは Novel Foodとして登録されました。

オーストラリア／ニュージーランドでは、Food Standards Australia New Zealand(FSANZ)によって審査され、パブリックコメントが募集された後に、2004年に FSANZ より Final Assessment が公開になり、Novel Foodとして登録されました。

ブラジルでは、ブラジル政府機関が審査し、現在、健康機能表示に関しての審査が実施されている状況です。

(DAGの発がんに関する質問)

四カ国における安全性審査機関からは、審査の過程でDAGの発がん性に関する質問はありませんでした。

関連資料一覧	
カナダ (Health Canada) への Novel Food 申請書 (2002)	8)
カナダ (Health Canada) からの「異議なし」レター (2002)	9)
Health Canada ウェブサイトに掲載された Novel Food リスト (2004)	10)
Food Standards Australia New Zealand (FSANZ)への Novel Food 申請書 (2003)	11)
FSANZ の Novel Food 最終評価報告書 (2004)	12)
FSANZ ウェブサイトに掲載された Novel Food のリスト (2004)	13)
ブラジルへの Novel Food 申請書—食品素材— (2003)	22)
ブラジルへの Novel Food 申請書—食用油— (2003)	23)

3. EU : Novel foods の申請

(審査方法)

EU (欧州) では、現在、欧州食品安全機関 EFSA (European Food Safety Authority)により、Novel Food の安全性が審査されています。DAGは、E F S Aの前身である、EU Commission working group on Novel Foods (DG SANCO) に申請を行いました。

(安全性評価と見解)

2004年12月に、「DAGは、ヒトの摂取用として安全である」との見解が EFSA から出されています。

なお、この見解には「DAGを新規食用油として通常の植物油に置換えるのであれば、消費者に栄養学的な不利益を与えないように、トランス酸を1%以下にすべきである」とのコメントが記載されています。これに対し、「一般的な食用油のトランス酸レベルが2~3%であるのに対し、1%以下の要求は科学的根拠に乏しい」との意見を提出し、現在審議継続中となっています。現時点DAGのトランス酸含量は、原料や製造工程の見直しにより低減化を図り、日本国内、米国ともに2~3%程度で推移しています。

(発がん性に関する質問)

安全性評価がなされている過程で、スウェーデンから「DAGのPKC活性化作用に関して、安全性の見解を示すように」との質問を受けました。これに対して、1) *in vitro* でPKC活性化を示すのは(*sn*-)1,2-DAGであること。2)構成脂肪酸の鎖長および不飽和度により影響が

異なり、生体内においては 1-stearoyl-2-arachidonyl-glycerol (SAG) が P K C 活性化の主要因子と考えられている、との論文が報告されていることを示しました。その上で、1) 食用の D A G 中には SAG が含まれていないこと、および、2) 最も重要なこととして、2 年間のラット長期試験の結果において、対象群に比べて、口腔内、食道、胃において、腫瘍や組織病変に違いを認めなかったことを 2003 年 4 月に回答しました²¹⁾。その結果、欧州食品安全機関 (EFSA) は、2004 年 12 月に「DAG は、ヒトの摂取用として安全である」との見解を出しています。

関連資料一覧	
EU への Novel Food 申請書 (2004)	18)
European Food Safety Authority (EFSA) の見解 (2004)	19)
EU ウェブサイトに掲載された Novel Food 申請リスト (2004)	20)
スウェーデンの質問に対する回答書 (2003)	21)

4. 中華民国：健康食品制度

(審査方法)

日本における個別認可型の特定保健用食品制度を参考に設けられた表示許可制度です。特定保健用食品と同様に、中華民国衛生署が指名した専門家からなる評価委員会により、商品ごと、表示内容ごとにその有効性と安全性が評価され、許可されます。

(安全性評価と許可)

DAG を利用した食用油は、安全性に関する質問ではなく、「食後の血中中性脂肪低減」と「体に脂肪がつきにくい」の 2 つの表示許可を受けています。

関連資料一覧	
中華民国、健康食品申請書－食後血中中性脂肪の減少－ (2003)	14)
中華民国、健康食品許可証、番号：A00047 号、行政院衛生署	15)
中華民国、健康食品申請書－体に脂肪がつきにくい－ (2004)	16)
中華民国、健康食品許可証、番号：A00057 号、行政院衛生署	17)

引用文献

- 1) 米国 GRAS, 食用油・マーガリン／スプレッド申請：エキスパートパネルによる DAG oil 安全性に対する見解書 (2000)
- 2) 米国 GRAS, 食用油・マーガリン／スプレッド申請：GRAS 申請書 (2000)
- 3) 米国 GRAS, 食用油・マーガリン／スプレッド申請：FDA からの「異議なし」レター (2000)
GRN No. 56, List of the substances that are the subject of each GRAS Notice and the file number that FDA has assigned to the notice, FDA, US.
[<http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g056.html>]
- 4) 米国 GRAS, 用途拡大：エキスパートパネルによる DAG oil 安全性に対する見解書 (2002)
- 5) 米国 GRAS, 用途拡大：GRAS 申請書 (2002)
- 6) 米国 GRAS, 用途拡大：FDA からの「異議なし」レター (2003)
GRN No. 115, List of the substances that are the subject of each GRAS Notice and the file number that FDA has assigned to the notice, FDA, US.
[<http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g115.html>]
- 7) 米国 FDA ウェブサイトに掲載された GRAS リスト (2004)
[<http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-gras.html#grastop>]
- 8) カナダ (Health Canada) への Novel Food 申請書 (2002)
- 9) カナダ (Health Canada) からの「異議なし」レター (2002)
- 10) Health Canada ウェブサイトに掲載された Novel Food リスト (2004)
Health Canada, [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/index_e.html]
- 11) Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) への Novel Food 申請書 (2003)
- 12) FSANZ の Novel Food 最終評価報告書 (2004)
- 13) FSANZ ウェブサイトに掲載された Novel Food のリスト (2004)
Foods Standards Australia New Zealand,
[http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/fsc_1_5_1_Novel_Foods_v78.pdf]
- 14) 中華民国, 健康食品申請書—食後血中中性脂肪の減少— (2003)
- 15) 中華民国, 健康食品許可証, 番号 : A00047 号, 行政院衛生署
- 16) 中華民国, 健康食品申請書—体内に脂肪がつきにくい— (2004)
- 17) 中華民国, 健康食品許可証, 番号 : A00057 号, 行政院衛生署
- 18) EU への Novel Food 申請書 (2004)
- 19) European Food Safety Authority (EFSA) の見解 (2004)
- 20) EU ウェブサイトに掲載された Novel Food 申請リスト (2004)
- 21) EU Novel Food 申請；スウェーデンの質問に対する回答書 (2003)
- 22) ブラジルへの Novel Food 申請書—食品素材— (2003)
- 23) ブラジルへの Novel Food 申請書—食用油— (2003)

海外におけるジアシルグリセロール申請／承認状況一覧

(2005.09.16現在)

国名	対象制度	使用用途	申請日	承認日	販売状況	各国における90%タイルのDAG-oil推定摂取量(g/kg-体重/day)*
アメリカ	GRAS	食用油、マーガリン／スプレッド (DAG oil: 0.38 g/kg 体重/day)	2000/8/11	2000/12/4	地区限定: 2003/01～ 全米販売: 2005/01～	0.3-0.5 (幼児0.49)
		用途拡大:食用油、マーガリン／スプレッド、ドレッシング、マヨネーズ、ベーカリー製品、ピザ、朝食／スナック／パワーバー、スープ／グレイビー、ミール リブレイスマント、冷凍食品 (DAG oil: 0.5 g/kg 体重/day)	2002/8/19	2003/2/24		
カナダ	Novel Food	焼成食品、ピザ、油脂類(食用油、マーガリン、マヨネーズ、ドレッシング)、健康バー、ミール リブレイスマント、冷凍食品、スープ、スープミックス／グレイビー	2002/10/29	2004/9/10	未	ケベック: 0.33 サスカチュワン: 0.33
オーストラリア/ ニュージーランド	Novel Food	食用油、マーガリン、ドレッシング、マヨネーズ、焼成食品(パン、ケーキ、ペストリー、クッキー、クロワッサン、ビスケット、ピザ)、健康バー、ミール リブレイスマント	2003/6/6	2004/10/6	未	AUS: 0.23-0.52 NZ: 男性0.29-0.46 女性0.23-0.38
EU	Novel Food	食用油、スプレッド／マーガリン、ドレッシング／マヨネーズ、ベーカリー製品、健康バー、健康ドリンク(ミール リブレイサー)、ヨーグルト	2002/9/2	審議中 (EFSA: 見解発行済)	未	0.7 (オランダ: 0.50)
ブラジル		食品素材:マーガリン／スプレッド、ドレッシング、マヨネーズ、ベーカリー製品、ピザ、朝食／スナック／パワーバー、スープ／グレイビー、ミール リブレイスマント、冷凍食品	2003/1/13	2004/11/29	未	-
		食用油	2003/1/13	健康機能表示内容について審査中		
台湾	健康食品	食用油 (食後の血中中性脂肪の減少)	2003/7	2004/7/18	未	-
		食用油 (体に脂肪がつきにくい)	2003/7	2005/2/25		

* 各国が推定した、ヘビーユーザーのDAG oil推定摂取量

※ 米国GRASの食用油・マーガリンスプレッド申請、台湾健康食品申請以外の申請はパートナー会社が行っております。