

## 第61回 名古屋市立大学医学会総会

### 特別講演 V

# ジアシルグリセロール (DAG) 食用油と グリシドール脂肪酸エステル of ラット乳腺発がんへの影響

酒々井 眞 澄

名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学

Effects of diacylglycerol edible oil and glycidol fatty acid ester  
on rat mammary carcinogenesis

MASUMI SUZUI

Department of Molecular Toxicology,  
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

### 要 約

ジアシルグリセロール (DAG) 食用油をヒト *c-Ha-ras* 遺伝子導入ラット (Hras128) に14週間口腔内滴下投与した結果, 暴露部位から離れた乳腺に発がんプロモーション作用が認められた。乳がん組織において PKC の誘導がみられた。また, 5 週間の DAG 食用油短期暴露試験でも乳腺組織において PKC 発現が誘導された。よって, DAG は PKC 誘導により Hras128 乳腺発がんを促進する可能性がある。インシリコ解析ではグリシドール脂肪酸エステルおよびグリシドールと PKC タンパクとの結合性が予測された。私達の研究グループで新規に開発したカラムスイッチング HPLC /MS 法を用いたグリシドール脂肪酸エステルの定量についても紹介する。本研究は北海道大学水産科学研究院板橋豊教授との共同研究を含む。

### 1 はじめに

本稿は平成22年12月に開催された名古屋市立大学医学会総会での講演を簡潔にレビューしたものです。脂肪酸の体内動態解析には高速液体クロマトグラフィーと質量分析法を用いた定量法 (HPLC/MS) が不可欠であるので今回はこれについても若干のデータと共に述べます。本研究は北海道大学水産科学研究院板橋豊教授との共同研究を含みます。

DAG は天然植物油中に数パーセントの割合で含有されている。DAG はグリセロールを基本骨格とし高級脂肪酸がエステル結合している。構造中の-CO-R 原子団 (R は高級脂肪酸を表す) をアシル基と呼ぶためアシルグリセロー

ルと言う。DAG にはグリセロールの1位と2位あるいは1位と3位の炭素にエステル結合が存在するので構造的に1, 2-DAG と1, 3-DAG がある (図1)。これらは自然界ではそれぞれ3 :

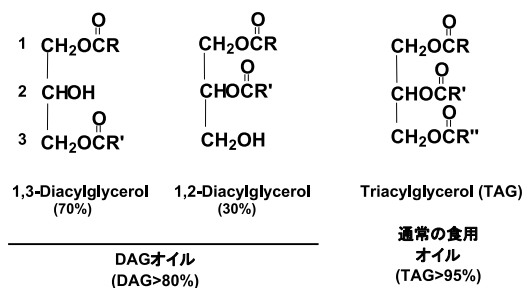


図1

7の比で存在する。DAG油は体に脂肪がつきにくいとして各国で広く販売されている。DAG油に結合している主な高級脂肪酸にはリノール酸 (C18:2), オレイン酸 (C18:1), リノレン酸 (C18:3) パルミチン酸 (C18:0) などがある。大豆油などの通常の食用油では1位から3位までの炭素全てに高級脂肪酸がエステル結合し, トリアシルグリセロール (TAG) の構造をとっている (図1)。DAG油は30%の割合で1,2-DAGを含み, 70%の割合で1,3-DAGを含む<sup>1)</sup>。DAGでは構造中に含まれる高級脂肪酸の数が1個少ないことにより脂肪がつきにくい理由とされる。1,2-DAGは生体内で phospholipase C の作用で phosphatidyl inositol bisphosphate から生成し, 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) を活性化する物質であり, 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<sup>2)</sup>。

グリシドールは図2のようにグリセロールの2つの炭素が3員環のエーテル構造 (エポキシド) を示すものである。グリシドール脂肪酸エステルは残存するひとつのアシル基にリノール酸などの高級脂肪酸が結合した構造である。グリシドール脂肪酸エステルは体内で, WHO 国際がん研究機関 (IARC) が「ヒト発がん物質の可能性が高い群 (probably carcinogenic to humans, Group 2A)<sup>3)</sup>」に分類しているグリシドールに代謝変換される可能性がある。グリシドール脂肪酸エステルは加工食用油の脱臭工程で発生するため, 精製油脂を含有する全ての食品に

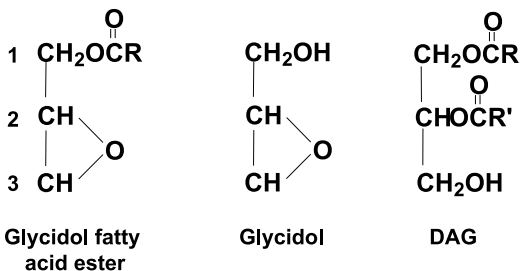


図2

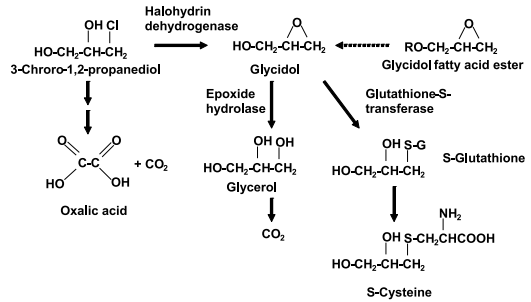


図3

含まれている可能性がある。乳児食もこれらの食品に属する。DAG油には他の食用油に比べて約100~1,000倍のグリシドール脂肪酸エステルが含まれている。図3にはグリシドールとその関連化合物の代謝過程を示した。3-Chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) はDAG油に高濃度で含有していると報告された物質であり, 体内でグリシドールに代謝される可能性が懸念されている。

## 2 DAGの動物発がん試験

5.5%DAGは4-Nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) 誘発SDラット口腔発がん試験でプロモーション作用を示さず<sup>4)</sup>, 同用量のDAGはF344ラットにおいて各臓器に対する発がん性は認められないことが報告された<sup>5)</sup>。これとは対照的に, ヒト c-Ha-ras 遺伝子導入ラット (Hras128) を用いた4-NQO 誘発舌発がん試験では市販のDAG油が腫瘍発生頻度と数に促進作用を示し<sup>1)</sup>, 7,12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) によるマウス皮膚2段階発がん試験では発がんプロモーション作用が認められた<sup>2)</sup>。これまでのところDAGの動物個体レベルでの発がん性については一定の結論が得られていないのが現状である。私達の研究グループではDAG油のヒトへの暴露状況をよく反映した動物実験システムでの発がん性を検証した。化学発がん剤に対する高感受性形質を持つHras128<sup>6)</sup>を用いて口腔内にヒト暴露量に近い用量で14週間直接滴下投与した実験を行い, 暴露部位から離れた乳腺に発がんプロモーション作用が見出された。乳腺がん組織において1,

2-DAGの標的分子であるPKCの誘導がみられたことは発がん機序の解明につながると考えられる。また、5週間の市販DAG油短期暴露試験でも乳腺組織においてPKC発現が誘導されたことは局所暴露(口腔)と遠隔暴露(乳腺)を結びつけるエビデンスの蓄積が重要であることを示している。これらの実験結果は、使用した動物が乳腺発がん高感受性形質であったために観察されたのか、ある条件下でヒトに外挿可能であるかについては今後のさらなる検証が必要である<sup>7,8)</sup>。発がんへのエストロゲンの影響に関しては、Hras128のN-methyl-N-nitrosourea誘発乳腺発がんはエストロゲン非依存性であることが報告されている<sup>9)</sup>。しかし、DAG油暴露とエストロゲンなどのホルモンとの関連については今のところデータがない。また、現状ではグリシドール脂肪酸エステルの発がん性に関する科学的エビデンスは国内外に存在しない。例えば、グリシドールオレイン酸エステルはIARCの発がんリスク評価においてヒトに対する発がん性が分類できない群(not classifiable as to carcinogenicity to humans, Group 3)<sup>3)</sup>である。よって、今後はグリシドール脂肪酸エステルの体内動態も含めてエビデンスの蓄積が必要である。

### 3 グリシドール脂肪酸エステルの微量定量法

現在利用可能な手法で食用油中の微量のグリシドール脂肪酸エステルを正確に定量することは容易でない。2009年にシュトゥットガルト化学獣医学検査局(CUVA)は精製パーム油から1桁のppmの3-MCPDおよびグリシドール脂肪酸エステルを検出した。ここで使われた分析法はドイツの公定法であるMCPD-FS法である<sup>10)</sup>。グリシドール脂肪酸エステルやグリシドールの微量分析法は、国内外においてまだ確立しておらずこれまでにHPLC/MSシングルイオンモニタリング(SIM)法が実施されている<sup>11)</sup>。信頼性できるリスク評価のためには、グリシドール脂肪酸エステルやグリシドールに適した分析法の開発およびバリデーションが緊急

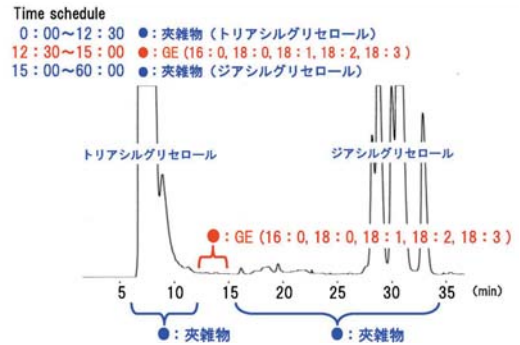


図4

を要する課題である。これまでに、固相抽出でグリシドール脂肪酸エステルを単離し逆相HPLC/MSで定量する方法やゲルろ過で前処理(精製)後、ガスクロマトグラフィーと質量分析法を用いた定量法(GC/MS)でグリシドール脂肪酸エステルを定量する方法が報告されている<sup>10,12)</sup>。私達の研究グループが新規に開発したカラムスイッチングHPLC/MS法はHPLCカラムの入れ替え後に引き続きMS分析を行うシステムである<sup>13)</sup>。他のシステムにない利点としてグリシドール脂肪酸エステルに複数存在する光学異性体を一回の分析でそれぞれ定量できる点である。図4は市販のDAG油に含まれるグリシドール脂肪酸エステル(GE), DAG, TAGの時間軸(横軸)でのHPLC分離を示す。時間をずらしてカラムを入れ替えることにより目的の物質をそれぞれ分離可能である。図のGE部分を試料としてMSを行う。図5(DAG油)

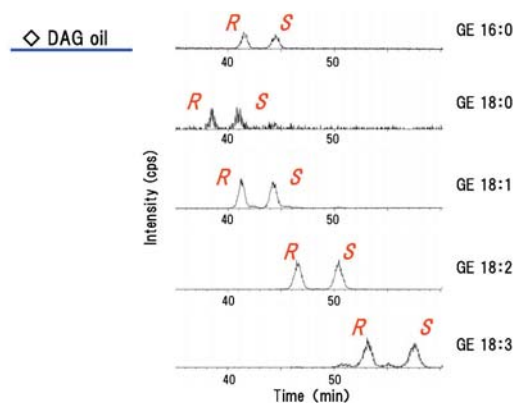


図5



リシドールに分解することなくそれ自体で発がん性を発揮する可能性について検証を進める必要がある。

#### 参考文献等

- 1) Tsuda H, Iigo M, Takasuka N, et al. Possible enhancing activity of diacylglycerol on 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis of the tongue in human c-Ha-*ras* protooncogene transgenic rats. *Food Chem Toxicol* 45: 1013-1019, 2007.
- 2) Takasuka N, Takahashi M, Hori Y, et al. Promotion of mouse two-stage skin carcinogenesis by diacylglycerol-rich edible oil. *Cancer Lett* 275: 150-157, 2009.
- 3) <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
- 4) Uemura T, Maeda M, Kijima A, et al. Lack of promotion activity of diacylglycerol oil on 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis in the oral cavity of SD rats. *Food Chem Toxicol* 46: 3206-3212, 2008.
- 5) Ichihara T, Yoshino H, Doi Y, et al. No enhancing effects of diacylglycerol oil on tumor development in a medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay using male F344 rats. *Food Chem Toxicol* 46: 157-167, 2008.
- 6) Naoi K, Sunagawa N, Morioka T, et al. Enhancement of tongue carcinogenesis in Hras 128 transgenic rats treated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oncol Rep* 23: 337-344, 2010.
- 7) [www.fsc.go.jp/fscis/meetingMaterial/show/kai20090213sh1](http://www.fsc.go.jp/fscis/meetingMaterial/show/kai20090213sh1) 内閣府食品安全委員会第5回新開発食品・添加物専門調査会合同ワーキンググループ会議資料
- 8) Suzui M, Yoshida I, Ishihara M, et al. Increased PKC expression in diacylglycerol induced mammary carcinogenesis in the human c-Ha-*ras* protooncogene transgenic rat. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 51: 600, 2010.
- 9) Asamoto M, Ota T, Toriyama-Baba H, et al. Mammary carcinomas induced in human c-Ha-*ras* proto-oncogene transgenic rats are estrogen-independent, but responsive to d-limonene treatment. *Jpn J Cancer Res* 93: 32-35, 2002.
- 10) [www.dgfett.de/methods/c\\_iii\\_18\(09\)\\_e\\_3mcpd\\_ester.pdf](http://www.dgfett.de/methods/c_iii_18(09)_e_3mcpd_ester.pdf) Ester-bound 3-chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) and 3-MCPD forming substances determination in fats and oils by GC-MS. In: DGF Standard Methods Section C-Fats C-III18 (2009).
- 11) Masukawa Y, Shiro H, Nakamura S, et al. A new analytical method for the quantification of glycidol fatty acid esters in edible oils. *J Oleo Sci* 59: 81-88, 2010.
- 12) Weishaar R, Perz R. Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils. *Eur J Lipid Sci Tech* 112: 158-165, 2010.
- 13) 吉田智史, 西村一彦, 鈴木敏夫, et al. 食用油に含まれるグリシドール脂肪酸エステル光学異性体のカラムスイッチングHPLC/MS分析. *Chromatography*, 31suppl: 53-54, 2010.