

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21300283

研究課題名（和文）ミニブタにおける内分泌攪乱作用に注目した食用油の安全性研究

研究課題名（英文）A safety evaluation study on dietary fat in the miniature pig.
Focusing on the endocrine disrupting effect.

研究代表者

大原 直樹 (OHARA NAOKI)

金城学院大学・薬学部・教授

研究者番号：20426422

研究成果の概要（和文）：菜種（カノーラ）油を脂肪源として摂取すると、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）の生存日数は短縮する（対照は大豆油摂取群）。本研究では、この有害効果が、ミニブタでも認められるか否かを調べた。雄ミニブタを離乳期より大豆油（対照）またはカノーラ油を 10w/w% 添加した飼料で 18 ヶ月間飼育し、臓器を採取した。大豆油摂取群では精細管内の生殖細胞数が減少していた。精巣および副腎における発現遺伝子のマイクロアレイによる解析では、ステロイドホルモン代謝への影響が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Canola oil ingestion shortens the life-span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). In this study we examined the effects of canola oil ingestion in miniature pigs. Miniature pigs were given canola oil or soybean oil (as the control) at 10w/w% in diet for 18 months from weaning. The animals were then autopsied. Decreased number of germ cells in the seminiferous tubule was found. Gene expression in the testis and the adrenal gland examined by means of DNA microarray technique revealed a possible influence on the metabolism of steroid hormones.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	8,900,000	2,670,000	11,570,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：脂質、ミニブタ、病理学、内分泌攪乱、カノーラ油

1. 研究開始当初の背景

カノーラ油はカナダで開発された低エルシ

ン酸品種菜種から得られる油で、我が国でも消費量が多い食用油である。食用油の栄養

評価は、第一義的には脂肪酸組成に基づいて予測でき、特にリノール酸 (n-6 系) と α -リノレン酸 (n-3 系) のバランスは炎症性疾患と深く関わっており、n-6/n-3 比の低い油脂が炎症性疾患予防に有効であると考えられる。カノーラ油の n-6/n-3 比は 2.5 と低く、炎症性疾患予防には大豆油 (同比=6~7) より有効と考えられたが、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) では、大豆油に比べ生存期間を著しく短縮した (Huang M.-Z.ら, 1996, *Biol Pharm Bull* 19:554)。この現象は、カナダ健康省 (Health Canada) の研究所を含む複数の機関で追試確認され、カノーラ油のほか数種の食用油、水素添加大豆油などに同様の作用が認められている。

カノーラ油の安全性に対する疑問は、日本とカナダの双方にとって重要な問題であったため、Health Canada に共同研究を申し入れ、情報交換を続けた。その後、Health Canada は集中的に研究を進め、短期間のうちに「寿命短縮作用は植物ステロール含量による」、という結論を導き、「カノーラ油の有害性は、特殊な動物モデルでの限られた影響である」、と総括した。これに対し、我が国はカノーラ油の大量消費国であるにもかかわらず、厚生労働省が、実質的には SHRSP の短命化を追試するに足るだけの研究補助事業を短期間実施したに止まり、結果として Health Canada の結論をそのまま受け入れ、産業界が追従し、現在に至っている。しかし、われわれの研究結果は、有害作用が植物ステロールでは説明できないことを示唆した (Tatematsu K.ら, 2004, *Food Chem Toxicol.* 42:1443; 2004, *J Nutr.* 134:1347)。その後、微量有害成分の探索研究から、炭酸ガス超臨界抽出法によって、寿命短縮活性が部分的に分離された (Ohara N.ら, 2006, *Food Chem Tox* 44: 952)、同定には至っていない。

2. 研究の目的

SHRSP で認められた有害効果がヒトでも認められるか否かは不明だが、「食用油の安全性確認と、より良い摂取方法の提案」の必要があり、一歩掘り下げた研究が求められた。これは民間企業においても行政側でも主体的に手をつけることが難しく、第三者研究機関や大学で検討するべき重要な課題と考えられた。本研究では、ラットに比べ生理学的性質がよりヒトに近いミニブタにカノーラ油および水素添加大豆油を長期摂取させ、生理学的、生化学的および病理学的検索から前述の本题に迫ろうとした。

菜種油粕を摂取したブタでは精巣病変が見

られ (Rotkiewicz T.ら, 1997 *Reprod Nutr Dev* 37: 675)、SHRSP では、寿命短縮を起すカノーラ油、水素添加大豆油が、精巣のテストステロン含量を著明に低下させた

(Okuyama ら, 2010, *J Tox Sci.* 35: 743)。この知見は、ラットとブタの双方において同様にステロイドホルモンの代謝に影響を及ぼす有害物質が、これらの油中に共通して存在することを推察させた。

未知因子を作用点から探索するため、マイクロアレイ法でラットにおける発現遺伝子を比較した結果からは、ステロイドホルモン代謝酵素のほか、ビタミン K 依存タンパク質等の遺伝子発現に影響が認められた。これに基づき、水素添加大豆油中のジヒドロ型ビタミン K1 が、脳卒中促進性因子の一つであろうと推定している (Okuyama H.ら, 2007, *Lipids* 42:821)。これらの知見も踏まえ、本研究では、食用油の安全確保を目指し、ミニブタにおいて多面的な検討をしようとした。

3. 研究の方法

(1) ミニブタにおける、臓器特異的病変および内分泌攪乱作用の有無、ステロイド代謝への影響の検討

ほぼ同一日齢の雄ミニブタ (NIBS 系) 18 匹を 6 匹ずつ 3 群に分け、離乳期より、大豆油 (対照)、カノーラ油または水素添加大豆油を 10w/w% 添加した飼料を与えて、18 ヶ月間個別飼育した。基礎飼料 (日生研 NS-BA、NS-B、NS および NS-D) を、成長に応じて制限給餌した。飼料の主原料は、トウモロコシ、マイロ、小麦粉、脱脂米ぬか、フスマ、魚粉、茶葉粉末、ルーサンミールである。また、長期飼育に用いた NS-D は、粗タンパク質 16.5%、粗脂肪 3.3%、粗繊維 10.0%。粗灰分 9.0%、265 kCal/100g である。この基礎飼料に被験油脂を 10w/w% 混餌して固型化したものを 1 日 500 g 与えた。大豆油、カノーラ油は市販のものを用いた。水素添加大豆油にはリノール酸欠乏を防ぐため大豆油を 1w/w% 添加した。基礎飼料の脂肪エネルギー比は 8%、被験油添加飼料は 34% であった。

(2) 組織サンプル

麻酔下に脱血致死させた動物から主要臓器を摘出し、重量を測定した。病理学的検討用の器官・組織はホルマリン固定 (精巣はブアン液固定後、ホルマリン固定)、HE 染色した。一部の臓器は、DHE 染色するため、凍結包埋した。生化学的検討 (ステロイドホルモン測定) 用の組織は凍結し、遺伝子発現解析用サンプルは、RNAlater 中に採った後、

冷却、凍結した。血液はヘパリン採血して遠心し、血漿を凍結保存した。血液生化学パラメータはオートアナライザで測定した。

(3) カノーラ油摂取ブタ腎のDHE染色 (スーパーオキシドの評価)

各群2例の腎臓凍結切片 (10 μ m) に、蛍光プローブであるDHE 42 (Sigma) 2 μ mol/Lで、暗所にて37°C、30分間インキュベートした (MIR-153、三洋電機)。蛍光顕微鏡 (BZ-9000、キーエンス) を用いて観察し (Excitation 488 nm、Emission 574-595 nm)、任意の5視野を写真撮影した (BZ image analyzer II、キーエンス)。それぞれ、視野面積当たりの蛍光染色面積の割合 (%) を算出し、5視野の平均値をその個体の値とした (Image J 1.44p)。

なお、実験系の確認として、PEG-SODの前処置による蛍光阻害を調べた。実験では、PBSまたはPEG-SOD 250 U/mL (Sigma) を添加し、暗所にて37°C、30分間インキュベートした後、上記と同様の方法でDHE染色を行い、蛍光染色が阻害されることを確認した。

(4) 脂質の分析

内部標準としてヘプタデカン酸を添加した。Bligh & Dyer の方法で総脂質を抽出し、5% 塩酸 - メタノール溶液でエステル化して石油エーテル抽出した。抽出した脂質をキャピラリーカラム (DB-225, J&W Scientific, CA) - ガスクロマトグラフ (GC-18A、島津) で分析した。

(5) 血漿、組織中ステロイドの定量

ステロイド定量は、重水素化ステロイドを内部標準とし、LC-MS/MS で測定した。これは、株式会社あすか製薬メディカル (川崎) に委託した。

(6) DNA マイクロアレイ

RNAlater 中で冷蔵した組織サンプルからRNAを抽出し、RNA標品の純度を確認した後、無作為に選んだ各群4例のサンプルをプールして、Affimetrix社のGeneChipを用いて解析した (クラボー株式会社に委託)。

(7) SHRSP での再検討

SHRSPにおける、カノーラ油摂取によるステロイドホルモンレベルへの影響を確認するため、雄SHRSP 20匹を1群10匹から成る2群に分け、大豆油またはカノーラ油10w/w%を添加した飼料を8週間摂取させ、血漿および精巢中ステロイドホルモンレベ

ルをLC-MS/MSで測定した (あすか製薬メディカル株式会社に委託)。

(8) 統計学的方法

群の平均値間の有意差は、一元配置分散分析の後、Dunnettの多重比較を行った。2群間の比較にはunpaired t-testを用いた。統計解析にはPrism 5.0 (Graph Pad, CA) およびエクセル統計 (株式会社社会情報サービス、東京) を用い、P<0.05を以て有意と評価した。

4. 研究成果

体重推移、臓器重量、組織脂質レベルおよび血液学的・血液生化学的検査結果

(1) 体重推移

大豆油摂取群、カノーラ油摂取群および水素添加大豆油摂取群間で差が認められなかった (図-1)。

(2) 臓器重量

脳、下垂体、甲状腺、肺、心、腎、脾、肝、胆のう、膵、精巢および精巢上体の湿重量および相対重量には、統計学的有意差は認められなかった。精巢の相対重量は、大豆油摂取群<カノーラ油摂取群<水素添加大豆油摂取群の順に増す傾向があった (図-2、各臓器の対体重相対重量を示す)。

図-1

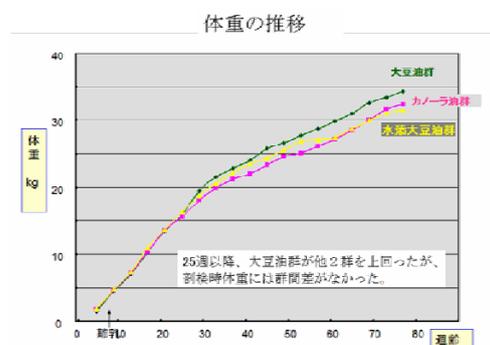
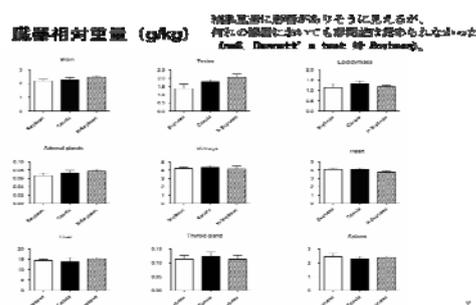


図-2



(3) 精巣組織の脂肪酸組成、ステロール含量

組織中の脂肪酸組成は、摂食飼料中の脂肪酸組成を反映していた。水素添加大豆飼料摂取群ではトランス脂肪酸(18:1t)を検出した。組織中脂肪酸量には群間差が認められなかった。

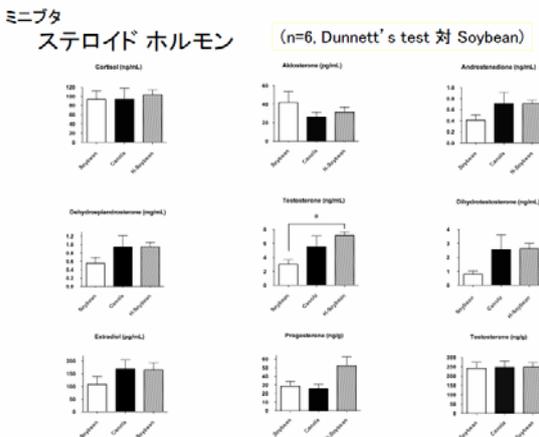
(4) 血液学、血液生化学

飼育期間中6カ月ごとに観察した末梢血中の白血球、赤血球、ヘモグロビン含量、MCV、MCH、MCHC、ヘマトクリット、血小板数には、群間で有意差が認められなかった。SHRSPでは顕著だった血小板数の減少も見られなかった。総タンパク質濃度、アルブミン濃度、A/G、クレアチニン濃度、尿素窒素濃度、無機リン濃度、AST活性、ALT活性、総ビリルビン濃度、尿酸濃度、γ-GTP活性、グルコース濃度、トリグリセリド濃度、総コレステロール濃度、遊離コレステロール濃度、HDLコレステロール濃度、LDLコレステロール濃度、リン脂質濃度、アルカリ性フォスファターゼ活性、Na⁺濃度、K⁺濃度、Cl⁻濃度およびカルシウム濃度には群間差が認められなかった。

(5) 血漿中、精巣組織中ステロイドホルモン

血漿中テストステロンは、大豆油摂取群で低下する傾向が見られ、大豆油摂取群と水素添加大豆油摂取群間には有意差が見られたが、他には有意差が見られなかった。デヒドロエピアンドロステロン、ジヒドロテストステロンも大豆油摂取群で低下する傾向が見られた。精巣組織のテストステロンレベルには有意差が見られなかった(図-3)。

図-3



(6) 病理学的所見

ここでは、参考として通常飼料を与えた群を置いて比較した。精細管の萎縮がカノーラ油群5例、水素添加大豆油群1例および大豆油群5例に認められ、水素添加大豆油群では大豆油群と比較して、頻度、程度ともに低下した(p<0.05)。セルトリ細胞の空胞変性がカノーラ油群3例、水素添加大豆油群2例および大豆油群2例に認められたが、群間差は見られなかった。ライディッヒ細胞の過形成がカノーラ群6例、水素添加大豆油群1例および大豆油群5例で認められ、水素添加大豆油群では大豆油群と比較し、頻度、程度ともに低かった(p<0.05)。電子顕微鏡による観察では、全群でライディッヒ細胞に大型のミトコンドリアが観察された。大型のミトコンドリアは精細管萎縮の強い大豆油群で多く、精細管萎縮の弱い水素添加大豆油群では少なかった。大豆油群で認められた大型のミトコンドリアは、小胞状のクリステを有するものが多かった。

精巣には精細管の萎縮、ライディッヒ細胞の増殖がカノーラ油および大豆油摂取群で認められたが、通常飼料群でも認められ、群間差がなかった。水素添加大豆油摂取群ではそのような所見は見られなかった(表-1)。

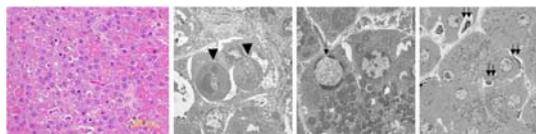
表-1

Group	A (1% Canola (1% Soy))						B (9% H2 Soy + 1% Soy)						C (10% Soy)						D (General Diet, Control)					
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	20	1	2	4	6	19	22	23	24	25	26	27	
Pancreas																								
Single-cell necrosis							2+																	
Infiltration, fat cell, interstitial							=						=						=					
Degeneration, vacuolar, eosinophilic cell							=						=						=					
Testis																								
Anomaly, seminiferous tubule, bilateral	2+						=						=						=					
Hyperplasia, hyperplasia, Leydig cell	=						=						=						=					
Cell atrophy, lumen	=						=						=						=					
Vacuolar degeneration, Sertoli cell	2+						=						=						=					

睪では、外分泌細胞の変性がカノーラ油群及び大豆油群各1例に、間質の脂肪浸潤がカノーラ油群1例、水素添加大豆油群2例および大豆油群1例に認められたが、群間に差はなかった(図-4)。

単細胞壊死がカノーラ油群1例、水素添加大豆油群5例および大豆油群1例に認められ、水素添加大豆油群では大豆油群と比較して、頻度、程度ともに増加した(p<0.05)。単細胞壊死は水素添加大豆油の影響と考えられた。

図-4



水素添加大豆油群：光顕的には外分泌細胞に中等度の単細胞壊死が認められる。電顕的にはアポ

トースス様の細胞を取り込んだ腺房細胞(▼)や核クロマチンが辺縁に凝集した腺房細胞(□)が散見されたほか、腺房の構造の乱れや、細胞間にミエリン様の構造物が観察された(↓↓)。

(7) 腎の DHE 染色

SHRSP では、腎がカノーラ油による傷害の標的器官と考えられた。これまでのデータでは、腎における酸化ストレスの増大が想定されたため、凍結包埋標本を DHE 染色した。しかし、DHE 染色領域に群間差は認められなかった。

(8) DNA マイクロアレイ解析結果

精巣組織から得た RNA を基に、発現遺伝子の比較を行った。20,000 を超える発現遺伝子データのうち、遺伝子タイトルのないもの、発現に群間差が認められないものを除くと、約 2,000 のデータが残った。このうち、機能別に分類ができたのは、およそ 1,000 であった。大豆油摂取群を対照としたとき、カノーラ油摂取群と水素添加大豆油摂取群における遺伝子の発現変化はよく一致していた。大豆油摂取群に対して増減した遺伝子の発現は、カノーラ油摂取群と水素添加大豆油摂取群で 80% 以上一致した。

(9) 精巣に多いタンパク質の遺伝子

カノーラ油摂取群と水素添加大豆油摂取群では、大豆油摂取群と比較し、スペルミン合成酵素の発現は減少したが、スペルミジン合成酵素やオルニチン脱炭酸酵素の発現は増大した。

(10) ステロイドホルモン関連の遺伝子

LH、FSH、HMG-CoA 還元酵素、StAR、CYP11A、CYP17、3 β -HSD、17 β -HSD の遺伝子は、カノーラ油摂取群と水素添加大豆油摂取群で発現抑制傾向が認められた。

副腎での発現遺伝子は、精巣での結果と類似しており、カノーラ油摂取群と水素添加大豆油摂取群で約 60% 一致していた。肝、下垂体、視床下部での解析結果には、一定の傾向が見られなかった。

(11) SHRSP での再検討結果

カノーラ油摂取群では、血漿および精巣の testosterone レベルが低下し、血漿中 aldosterone レベルが上昇した。DHEA も減少する傾向を示した。¹³C-progesterone から ¹³C-17 α -hydroxyprogesterone および ¹³C-androstenedione の生成を指標に調べた精巣

の CYP17 活性は、カノーラ油群で低下した。

カノーラ油摂取によって SHRSP で認められた所見は、ミニブタでは認められなかった。即ち、SHRSP では、腎組織の傷害、血圧上昇、血小板数減少、テストステロンレベルの低下、アルドステロンレベルの上昇、腎 COX-2 発現の増大、肝、腎、赤血球の G6PD 活性増大が認められたが、ミニブタでは、腎組織の傷害は見られず、血小板数、テストステロンレベル、アルドステロンレベルにも影響が認められなかった。SHRSP では、血脂の上昇、腎 COX-2 発現の増大、肝、腎、赤血球の G6PD 活性増大がみとめられ、この G6PD レベル増大による脂質合成の亢進とアルドステロンが関与する末梢血管の傷害等が示唆されたが、同様の変化は、ミニブタでは全く認められなかった。これらの差異が、種差に基づくものか、油脂の摂取量および摂取期間の違いによるものかは、不明であるが、SHRSP においては、油脂摂取の影響が 4 週間で認められることから、種差が著しい可能性が示唆された。しかしながら、SHRSP において、再現性があり、顕著に認められるカノーラ油の有害効果は、その背景機序を解析することが、安全性評価には欠かせない。また、SHRSP ではステロイドホルモンの生合成系に明らかな影響が認められるため、今後は、この有害効果に性差があるか否かを確かめることが必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Daisuke Miyazawa, Yuko Yasui, Kazuyo Yamada, Naoki Ohara, Harumi Okuyama Biochemical responses to dietary alpha-linolenic acid restriction proceed differently among brain regions in mice. *Biochemical Research*, 査読あり, Vol.32, 2011, 237-245.

② 大原直樹, 内藤由紀子, 奥山治美, ラットに対するカノーラ油および水素添加大豆油の有害作用と油中の微量因子ジヒドロビタミン K 1 様物質の関与の可能性。 *J Lipid Nutr* (執筆依頼)、査読なし、Vol.20, 2011 年, 9-22

③ Harumi Okuyama, Naoki Ohara, Kenjiro Tatematsu, Shinya Fuma, Tomoyuki Nonogaki, Kazuyo Yamada, Yuko Ichikawa,

Daisuke Miyazawa, Yuko Yasui and Seiji Honma

Testosterone-lowering activity of canola and hydrogenated soybean oil in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Journal of Toxicological Sciences* 査読あり, Vol.35, 2010, 743-747.

④ Daisuke Miyazawa, Yuko Yasui, Kazuyo Yamada, Naoki Ohara, Harumi Okuyama
Regional differences of the mouse brain in response to an α -linolenic acid-restricted diet: Neurotrophin content and protein kinase activity
Life Sciences, 査読あり, Vol.87, 2010, 490-494.

[学会発表] (計5件)

① 宮澤大介、大原直樹、桜井杏、安井裕子、北森一哉、斉藤義明、臼見憲司、山田和代、今井唯、山田英里、大橋彩乃、水谷友香、野々垣常正、小林身哉、奥山治美、ミニブタ組織のステロイドホルモンに対する植物油脂長期投与の影響、日本脂質栄養学会第20回大会、坂戸、平成23年9月2日～3日

② 斉藤義明、臼見憲司、古谷真美、立花滋博、内藤由紀子、永田伴子、宮澤大介、安井裕子、山田和代、大原直樹、奥山治美、食用油投与によるミニブタの病理組織学的変化、第27回日本毒性病理学会学術年会、大阪、平成23年1月27～28日

③ 宮澤大介、安井裕子、山田和代、大原直樹、奥山治美、高リノール酸食、高 α -リノレン酸食を給餌したマウス脳の神経栄養因子産生とプロテインキナーゼ活性、日本脂質栄養学会第19回大会、犬山、平成22年9月3日～4日

④ 立花滋博、内藤由紀子、永田伴子、斉藤義明、臼見憲司、古谷真美、宮澤大介、安井裕子、北森一哉、山田和代、大原直樹、奥山治美、ミニブタにおけるカノーラ油の長期摂取の影響、日本脂質栄養学会第19回大会、犬山、平成22年9月3～4日

⑤ 大原直樹、内藤由紀子、奥山治美、植物油摂取によってラットで認められる有害効果、日本脂質栄養学会第19回大会、犬山、平成22年9月3日～4日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大原 直樹 (OHARA NAOKI)
金城学院大学・薬学部・教授
研究者番号：20426422

(2) 研究分担者

奥山 治美 (OKUYAMA HARUMI)
金城学院大学・薬学部・特任教授
研究者番号：90080176

山田 和代 (YAMADA KAZUYO)
金城学院大学・薬学部・准教授
研究者番号：90080217

永田 伴子 (NAGATA TOMOKO)
財団法人食品薬品安全センター・秦野研究所・副所長
研究者番号：50426425