

機関番号：84404
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21700780
 研究課題名（和文） 食用植物油による生活習慣病進展に関わる機序の解析研究
 研究課題名（英文） Study for the mechanism indevelopment of lifestyle-related disease
 by intake of dietary vegetable oil
 研究代表者
 内藤 由紀子 (NAITO YUKIKO)
 独立行政法人国立循環器病研究センター・病態ゲノム医学部・室長
 研究者番号：80426428

研究成果の概要（和文）：生活習慣病疾患モデル動物の一種である脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）にカノーラ油を摂取させると生存日数が短縮するメカニズムの一部に、血漿脂質上昇が関与することが明らかとなった。この変化は、カノーラ油摂取初期以降に認められるが、PPAR α 作動薬のクロフィブラートを併用投与することによって抑制され、死亡例および慢性腎症の減少が認められた。クロフィブラートの詳細な作用機序も含め、さらに解析が必要である。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that increase in plasma lipids was involved in a part of mechanism in the shortening of lifespan of stroke prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP), one animal model of lifestyle-related disease, fed diet containing 10 w/w% canola oil. This increase, which was observed on and after the early intake period, was inhibited by the combined administration of clofibrate, a PPAR alpha agonist. Additionally, incidences of death and chronic nephropathy were attenuated by the administration. Further studies are needed to elucidate the mechanism of short lifespan induced by canola oil intake, involving the detailed mode of action of clofibrate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：食生活学・

キーワード：薬理学、脂質、循環器・高血圧、食品

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病患者の増加に伴って、その予防や改善に注目が集まっている。また、日常的に摂取する食用油に対する関心の高まりとも関連して、特定保健用食品としての食用油が増加している。その一方で、生活習慣病モデルラットの一種である脳卒中易発

症高血圧自然発症ラット（stroke prone spontaneously hypertensive rats, SHRSP）に、日本での摂取量の多いカノーラ油を唯一の脂肪源として摂取させると、生存日数が短縮することが報告されている。われわれはこれに注目し、SHRSP のほかに、SHRSP の起源動物である高血圧自然発症ラット（SHR）や

正常血圧 Wistar-Kyoto (WKY) ラットも用いてカノーラ油摂取による病態生理学的変化を観察し、血圧上昇促進、高血圧関連疾患の進行促進、血中脂質量増加および心臓および腎臓の血管内膜肥厚等の炎症が認められることをこれまでに報告している。また、カノーラ油を摂取した SHRSP で、酸化ストレスマーカーの増加、血圧調節に大きく関与する腎臓 cyclooxygenase-2 (COX-2) や内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) たんぱく質の発現が亢進していることを確認している。

これらの結果をそのままヒトに当てはめることはできないが、カノーラ油は心臓発作や脳卒中を予防するオメガ3 脂肪酸を豊富に含有する健康維持に良い食用油として知られているにもかかわらず、この疾患モデル動物では、生存日数短縮や、それに関連すると考えられる上記の作用が認められたことから、この原因を解明する研究は、生活習慣病患者に対して社会的および医学的に食生活を指導する上で、また、一般消費者に対して安心して安全な食品を摂取する上で、重要な情報源となる。

研究計画当初においても、終了した現在においても、カノーラ油を摂取した動物での病態生理学的変化を時系列で確認する研究や、薬物投与によってカノーラ油摂取の影響が抑制されるかどうかを調べる研究の報告はない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、カノーラ油を摂取した SHRSP で認められた生存日数短縮のメカニズムを解明することを目的とし、摂取による種々の生理学的変化の発現時期のずれに注目して病理組織学および生化学的に解析した。さらにその結果から、これらの変化の起点を推察し、それに対する適切な薬物 (受容体拮抗薬、酵素阻害薬等) の投与により、作用が抑制されるかどうかを薬理的に確認した。

これまでに、カノーラ油を摂取した SHRSP では、血圧上昇促進、高血圧関連疾患の進行促進、血中脂質量増加、心臓および腎臓での炎症を確認している。これらは全て、心血管機能不全に関与する変化であるが、どのようなメカニズムで誘導されるのかは明らかではない。そこで本研究では、まず、これらの生理学的変化の発現がどのような順に現れるか (発現時期のずれ) を観察して作用の起点を推察し、薬理的手法で実証することでメカニズムを解明することとした。実験では、まず、異なった投与期間で SHRSP にカノーラ油を与え、投与期間の違いによる影響の差を病理組織学および生化学的手法を用いて詳細な検討を行い、それぞれの作用の発現時期のずれを確認した。次に、この実験で得ら

れた結果をもとに、適切な阻害薬 (抗高脂血症薬を選択) の投与によって作用が抑制されることを確認する実験 (薬理的手法) を実施し、実証した。

3. 研究の方法

(1) 投与期間の違いによる影響の解析

①使用動物および群

SHRSP、7 週齢、60 匹を 1 群 30 匹 2 群に分け、カノーラ油群および大豆油群 (対照群) とした。さらに各群を、6、8、8 および 8 匹に分け、それぞれ 2、4、6 および 8 週間投与群とした。

②食用油

カノーラ油および大豆油 (日本植物油協会) を使用した。なお、対照とした大豆油は、ラットの通常飼料の主要脂肪源であること、および日本ではカノーラ油に次いで 2 番目に多く消費される食用植物油であることから選択した。

③飼料および投与方法

10w/w%カノーラ油または大豆油含有無脂肪精製粉末飼料 (AIN-93G、オリエンタル酵母工業) を自由摂取させた。

④一般症状観察、体重および摂餌量 (全群)

1 日 1 回の頻度で一般状態を観察し、1 週間に 1 回の頻度で体重および摂餌量を測定した。

⑤尿検査 (8 週間投与群)

代謝ケージを用い、3 週間に 1 回の頻度で尿量、摂水量、比重、電解質量 (Na^+ 、 K^+ および Cl^-) を測定した (EA05、A&T)。

⑥血圧測定 (8 週間投与群)

2 週間に 1 回の頻度で測定した (tail-cuff 法、MK-2000ST、室町機械)。

⑦血液生化学検査 (全群)

投与期間終了後、ペントバルビタールナトリウムを動物に腹腔内投与して麻酔し、ヘパリンを抗凝固薬として用いて腹部大静脈から採血した。遠心分離により血漿を得、オートアナライザ (JCA-BM6010、JECL) で各種血液生化学検査項目 (ALP、AST、ALT、 γ -GTP、LDH、BUN、creatinine、glucose、calcium、triglyceride、total cholesterol、bilirubin、inorganic phosphate、phospholipid、total protein、albumin、A/G、HDL-cholesterol、LDL-cholesterol、 Na^+ 、 K^+ および Cl^-) を測定した。また、血漿アルドステロンおよびアンジオテンシノーゲンレベルは EIA 法で測定した (Enzo Life Sciences および IBL)。

⑧病理組織学的検査 (全群)

採血後、動物を放血により安楽死させて解剖した。観察後、脳、心臓、大動脈、肺、脾臓、肝臓、腎臓および副腎の重量を測定した。またこれらをホルマリン固定し、パラフィン包埋後薄切して、ヘマトキシリン-エオジン染色して観察した。

(2) 抗高脂血症薬投与によるカノーラ油摂取 SHRSP への影響の解析

①使用動物および群

SHRSP、7 週齢、40 匹を 1 群 10 匹 4 群に分け、大豆油群 (対照群)、カノーラ油群、大豆油+クロフィブラート群およびカノーラ油+クロフィブラート群とした。

②食用油

(1) の②と同様。

③投与薬物

PPAR α アゴニストで抗高脂血症薬であるクロフィブラート (和光純薬工業) 300 mg/kg を、食用油摂取期間中、1 日 1 回強制経口投与した。

④飼料および投与方法

(1) の③と同様。

⑤一般症状観察、体重および摂餌量

(1) の④と同様。

⑥尿検査

代謝ケージを用い、投与最終週に尿量、摂水量および比重を測定した。

⑦血液生化学検査

投与期間終了後、ペントバルビタールナトリウムを動物に腹腔内投与して麻酔し、ヘパリンを抗凝固薬として用いて腹部大静脈から採血した。遠心分離により血漿を得、オートアナライザ (JCA-BM6010、JECL) で各種血液生化学検査項目 [(1) の⑦の項目と同様] を測定した。

⑧病理組織学的検査

(1) の⑧と同様。

なおすべての動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105 号、平成 18 年 6 月 2 日一部改正)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年 4 月 28 日、環境省告示第 88 号) および「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年 6 月 1 日、科発第 0601001 号) を遵守し、「財団法人食品薬品安全センター秦野研究所動物実験に関する指針」(平成 2 年 10 月 1 日) に基づく研究計画書を作成し、同研究所動物実験委員会による審査が行われ、実験動物に対する動物愛護上の配慮等、倫理的配慮が適正であることが確認されている。

4. 研究成果

(1) 投与期間の違いによる影響

①一般状態、体重、摂餌量、腎機能および血圧

一般症状観察では、投与第 5 週以降、大豆油群の 3 例、カノーラ油群の 6 例で自発運動の減少、痙攣または四肢の麻痺等が認められた。しかし、体重、摂餌量、腎機能および血圧にはほとんど群間差は認められなかった。

②血液生化学検査

カノーラ油群の血漿中総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質および遊離コレステロールレベルは、投与第 2 週以降、大豆油群と比較して有意に高値を示した。その他、アルブミン (投与第 8 週)、グルコース (投与第 4 週)、LDL-コレステロール (投与第 4 および 6 週) レベルが高かった。血漿中アンジオテンシノーゲンレベルは、投与期間を通してほとんど差が認められなかった。一方、血漿中アルドステロンレベルは、大豆油群では投与第 6 週で上昇し、第 8 週では減少に転じたが、カノーラ油群では投与第 4 週で増加、第 6 週以降減少した。

③病理学的検査

剖検では、投与第 4 週まで全例で異常が認められなかったが、大豆油群では第 6 および 8 週に心臓または腎臓の白色斑が各 1 例認められた一方、カノーラ油群の第 6 週の 4 例に、第 8 週の 7 例にこれらの異常が認められた。組織学的検査でも、心臓および腎臓の異常所見の程度および頻度に群間差が認められた。腎臓の動脈硬化は、カノーラ油で第 6 週に 6 例、第 8 週に 8 例 (大豆油群でそれぞれ 3 および 6 例)、タンパク円柱は第 8 週で 8 例 (大豆油群で 0 例) であった。第 8 週の動脈硬化は、大豆油群の 6 例全例軽度であったのに対し、カノーラ油群は、2 例が軽度、6 例が中程度であった。第 8 週で、心臓の冠動脈の中・内膜肥厚および心筋繊維化がカノーラ油群にのみ観察された (それぞれ 3 および 5 例)。その他、脳、大動脈、肺、肝臓、脾臓および副腎には著明な影響は認められなかった。

(2) 抗高脂血症薬クロフィブラート投与によるカノーラ油摂取 SHRSP への影響

①一般状態、体重、摂餌量および腎機能

カノーラ油群では投与第 35 日以降に 4 例、大豆油群では第 42 日以降に 2 例、死亡が確認された。また脳卒中症状 (自発運動減少、過敏等) は、カノーラ油群および大豆油群で、それぞれ 8 および 5 例観察された。両クロフィブラート群の一般状態に、異常は認められなかった。体重および摂餌量および腎機能に群間差は認められなかった。

②血液生化学検査

カノーラ油群の血漿中トリグリセリド、リン脂質および LDL-コレステロールレベルは、大豆油群と比較して高値を示した。また、カノーラ油+クロフィブラート群は、カノーラ油群と比較して低値を示した (図)。

③病理学的検査

剖検時の脳の観察では、カノーラ油群の 7 例に出血が認められたのに対し、大豆油群では 3 例であった。組織学的検査では、カノーラ油群と大豆油群間および両クロフィブラート群間で、異常所見の頻度および程度に差は認められなかった。食用油単独群の肝臓には異常が認められなかった一方、クロフィブ

ラット併用群の肝臓では、門脈周囲の肝細胞肥大（カノーラ油群＋クロフィブラート群および大豆油＋クロフィブラート群でそれぞれ10例）、胆管増殖（カノーラ油群＋クロフィブラート群および大豆油＋クロフィブラート群でそれぞれ6および7例）および肝細胞壊死（カノーラ油群＋クロフィブラート群で6例）が認められた。

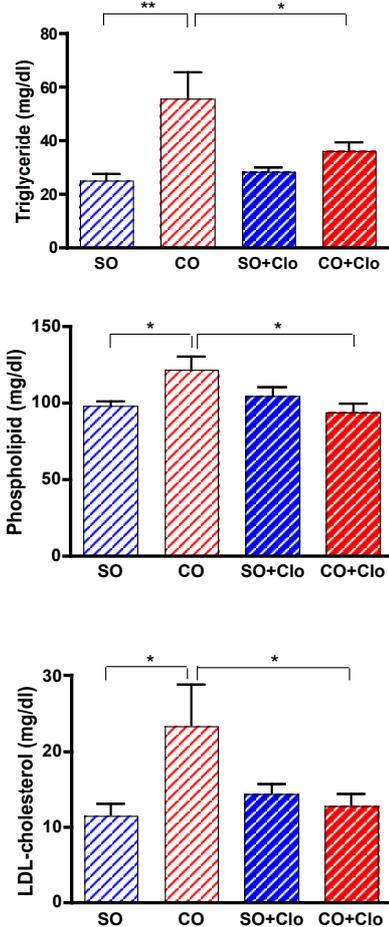


図 カノーラ油摂取による血漿脂質の変化およびクロフィブラート併用投与による影響
SO：大豆油群、CO：カノーラ油群、SO+Clo：大豆油＋クロフィブラート群、CO+Clo：カノーラ油＋クロフィブラート群

(3) まとめ

生活習慣病モデル動物の一つである SHRSP に、10w/w%カノーラ油または大豆油含有無脂肪精製粉末飼料を摂取させると、摂取初期（投与第2週）以降に血漿脂質が上昇すること、また、冠動脈の中・内膜肥厚および心筋繊維化や腎機能障害を伴わない腎傷害が第6週以降に観察された。そこで、血漿脂質レベルの上昇を抑制することにより、引き続いて

起こる心臓や腎臓での組織学的変化や、生存日数短縮を防ぐ可能性を調べることにした。血漿脂質レベルの上昇を抑制する方法として、PPAR α アゴニストで抗高脂血症薬であるクロフィブラートをカノーラ油または大豆油と併用投与することとした。その結果、7週間の投与期間中、大豆油群の死亡例は2例であったのに対し、カノーラ油群で4例死亡例が認められた。一方、大豆油およびカノーラ油にクロフィブラートを併用投与すると、死亡例はみられないことが明らかとなった。また、カノーラ油群の血漿中脂質レベルは、大豆油群と比較して高値を示した。しかしカノーラ油＋クロフィブラート群は、カノーラ油群と比較して低値を示した。以上の結果から、クロフィブラート併用投与により、カノーラ油摂取によって誘導される血漿脂質上昇および脳卒中の発症が抑制されることが明らかとなった。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究で得られた結果は、国内外に関わらずこれまでに報告されていない。また、カノーラ油と薬物を併用投与する方法によって、病態生理学的変化のメカニズムを調べた研究もない。ヒトが単一の食用油のみを摂取することは、通常考えにくいことから、本研究データをそのままヒトに外挿することはできない。しかし本研究結果は、カノーラ油等の食用植物油を、生活習慣病患者だけでなく一般消費者が安全に摂取していくうえで必要な情報源となると考える。

(5) 今後の展望

本研究で、PPAR α アゴニストであるクロフィブラートの効果が示された。今後、この薬物の作用メカニズムを詳細に解明することによって、カノーラ油摂取による SHRSP の生存日数の短縮の原因が明らかになると考えられる。

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1件）

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ージヒドロビタミンK1 様物質の関与の可能性ー、Journal of Lipid Nutrition 20, 9-22, 2011年、査読有り

〔学会発表〕（計2件）

① 内藤由紀子ら、カノーラ油摂取による SHRSP の病態生理学的変化への摂取期間の影響、日本脂質栄養学会第19回大会、2010年9月3～4日、愛知県犬山市

② 内藤由紀子ら、Pathophysiological

effects of canola oil intake in SHRSP、
第84回日本薬理学会年会、2011年3月22～
24日、誌上開催（神奈川県横浜市の予定が中
止）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 由紀子 (NAITO YUKIKO)

独立行政法人国立循環器病研究センタ

ー・病態ゲノム医学部・室長

研究者番号：80426428

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し