

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870606

研究課題名(和文) 食用油摂取による脳卒中ラット寿命短縮での18:1脂肪酸の役割

研究課題名(英文) The role of 18:1 fatty acid in survival shortening of SHRSPs by dietary edible oil

研究代表者

立松 憲次郎(Kenjiro, Tatematsu)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70381720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：特定の食用油摂取による脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHRSP)寿命短縮における18:1脂肪酸の寄与を検討するために、我々はSHRSPに菜種油由来で18:1含量が異なる様々な油脂を摂取させて、その病態の変化を観察した。その結果、18:1脂肪酸のcis-体であるオレイン酸の増加に伴い、血圧上昇、腎障害促進などと共に、寿命が有意に短縮されたのに対し、18:1脂肪酸をほとんど含まない完全水添処理菜種油(FHCO)ではSHRSPの病態が回復し、実験中に死亡個体は観察されなかった。これらの結果より摂取油脂中の18:1脂肪酸含量はSHRSPの病態を促進させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the contribution of 18:1 fatty acid to the survival shortening on spontaneously hypertensive rats stroke-prone (SHRSPs) induced by consumption of edible oils, we examined the survival, biophysical parameters and kinetics of 18:1 fatty acid using by SHRSPs fed the diet containing rapeseed oil which contains various level of 18:1 fatty acid. High intake of oleic acid, which is cis- form of 18:1 fatty acid, induced high blood pressure, renal dysfunction, accumulation of phytosterol in tissues and shorten the life span in SHRSPs. Meanwhile, limitation of 18:1 fatty acid in rapeseed oil (using fully hydrogenated oil) enhanced food intake, suppressed body weight, accumulation of phytosterol and blood pressure, and ameliorate renal disorder and lethal cerebral stroke in SHRSPs. These results indicated that 18:1 fatty acid level in diet affects the pathological conditions in SHRSPs and related with life span shortening by feeding the specific edible oils.

研究分野：脂質栄養学

キーワード：オレイン酸 SHRSP 菜種油 完全水添菜種油

1. 研究開始当初の背景

飽食の時代と言われる中、脂質栄養の重要性はますます大きくなっている。脂質の過剰摂取、脂溶性ビタミンや微量活性物質、n-6/n-3 比のバランスなど、様々な問題が存在する一方で、未知の生理活性や有害作用が残されている可能性も無視できない。

我々のグループは、ヒトの脳卒中モデル動物である脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) に菜種油を摂取させると、大豆油を摂取させた場合と比べて、寿命を 40% 以上も短縮させることを初めて見出した (図 1)。このような寿命短縮活性を有する油脂は菜種油以外にも高オレイン酸紅花油、月見草油、高オレイン酸ヒマワリ油、オリーブ油、コーン油、硬化菜種油、硬化大豆油、マーガリンなどが報告されている。

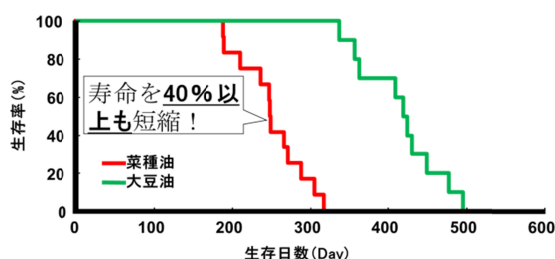


図1 食用油摂取による SHRSP ラットの寿命短縮作用 (Huang *et al.*, 1996 より改変)

特定の油脂摂取による SHRSP 寿命短縮の原因物質として植物ステロールが挙げられた。しかし、その関与は部分的であるため、別の原因物質が存在すると推察された。これらの油脂、特に菜種油摂取による有害作用は、SHRSP の寿命短縮活性以外にも国内外の複数の研究者から報告されている (表 1)。一部の有害作用は、種をこえて認められており、菜種油の世界における消費量を考えると、一刻も早く解決すべき重要な課題であると考えられる。

表 1 報告されている菜種油の有害作用

SHRSPラット	赤血球の異常凝集や赤血球膜の脆弱性、Na ⁺ , K ⁺ ATPase活性の上昇、出産数減少、テストステロン、アルドステロンレベルの低下
WKYラット、SHRラット	血圧上昇
ICRマウス	異常行動、脂肪肝
ミニブタ	新生児の異常出血

2. 研究の目的

SHRSP の寿命を短縮させる油脂の多くは、既に寿命に影響を与えることが報告されているコレステロールや植物ステロール含量が多いものを除き、18:1 脂肪酸 (*cis*-型のオレイン酸および *trans*-型のエライジン酸) の含量が 50% 以上と高い。このことから、18:1 脂肪酸が植物ステロール以外の原因物質であるという仮説を立て、以下の現象を明らかとすることを目的とした。

- (1) 同じ油脂で 18:1 脂肪酸含量が異なるものを用意し、18:1 脂肪酸摂取量の増加に伴い SHRSP の寿命がより短縮されること。
- (2) 18:1 脂肪酸摂取量の増加に従い、SHRSP の病態が進行し、関連する脂質成分の組織蓄積量、遺伝子発現などが変化すること。
- (3) 今まで 18:1 脂肪酸が取り上げられてこなかった理由として、寿命を短縮させる油脂をリパーゼ等で加水分解すると脂肪酸組成は変化しないが、寿命を短縮させないためである。これは加水分解による化学形の変化で、動態が変化した可能性が高い。それを明らかにするため、標識 18:1 脂肪酸の動態を追跡し、化学形により、吸収・排泄速度が変化すること。

これら (1) ~ (3) の検討を元に、最終的には油脂摂取による SHRSP 寿命短縮の一因として 18:1 脂肪酸含量が関わっていることを最終目標として、次に示すような実験を計画した。

3. 研究の方法

すべての動物実験は、岐阜大学動物実験委員会、岐阜薬科大学動物実験委員会の承認を受けてから行った。

(1) SHRSP の寿命測定実験

雄性 SHRSP、4 週齢を用意し、体重差がつかないように均等に群分けした。18:1 脂肪酸の異なる油脂はオレイン酸を多く含む菜種油を選び、品種改良によりオレイン酸含量の多い菜種油 (HOCO)、完全水添処理によりオレイン酸をほとんど含まない菜種油 (FHCO) 及び菜種油を比較した。また、寿命短縮活性を持たないコントロールとして大豆油またはラードを用意し、これらを普通飼料 CE-2 に重量比 10% になるよう混合し、実験飼料とした。実験期間中は実験飼料のうち 1

種類を自由摂取させ、飲料水は、脳卒中の発症頻度を上げるために、0.5 または1%の食塩水を与えた。動物を死亡または安楽死が必要な時点まで飼育し、その寿命を測定した。

(2) SHRSP の生理学的因子の変化

雄性 SHRSP、4 週齢を用意し、寿命測定実験と同様に実験飼料(菜種油、大豆油、FHCO)を自由摂取させた。ただし、油脂の影響を強調するために、食塩水負荷は行わなかった。実験期間中は体重、摂食量、血圧測定を随時行った()。11 及び16 週齢時に動物をサクリファイスし、各種臓器を採取して以下の検討に用いた。

組織病理学的解析

得られた臓器の一部を直ちに中性ホルマリン緩衝液に浸し、組織切片を作成した後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、解析画像を得た。得られた画像は臓器ごとに独自にスコア化し、その値を元にして評価を行った。

脂質成分分析

臓器の一部を用いて、定法に従い、総脂質画分、ステロール画分をそれぞれ抽出した。脂肪酸組成は総脂質画分中の脂肪酸をメチル化させ、脂肪酸メチルエステルを再抽出し、これをガスクロマトグラフィー(GC)にて分析した。ステロール分析はステロール画分に対してトリメチルシリル化反応を行い、同様に GC により分析した。

mRNA 発現

臓器から定法に従い RNA 画分を抽出した後、リアルタイム RT-PCR 法にて定量した。

(3) 18:1 脂肪酸の分子形による動態変化

雄性 SHRSP、7 週齢を用意し、これに C-14 で標識したオレイン酸(FFA)、またはトリオレイン(TG)をラットに胃内投与した。一定時間経過後、動物をサクリファイスし臓器を摘出した後、臓器中の放射能を測定した。

4. 研究成果

(1) 18:1 脂肪酸と SHRSP の寿命との関係

18:1 脂肪酸を含まない油脂を摂取した寿命

18:1 脂肪酸を含まない FHCO を SHRSP に摂取した際の寿命を、寿命短縮活性を持つ菜種油と活性を持たないコントロールであるラードとの比較で検討を行った。この検討では1%の食塩水負荷条件下で実施した。実験飼料の脂肪酸組

成は、FHCO では 18:0 ステアリン酸が 66% で過半数を占めたのに対し、18:1 オレイン酸は 7.6% しか存在せず、そのほとんどが普通飼料由来であった。各群とも 11 週齢時までは目立った病態は確認されなかったが、FHCO 群では他の群と比較して摂食量が多く、体重増加が遅かった。寿命測定の結果は菜種油(94 ± 3 日)、ラード(115 ± 6 日)であったが、FHCO 群では実験期間中、死亡個体は出ず、脳卒中に特有の病態も観察されなかった(図2)。

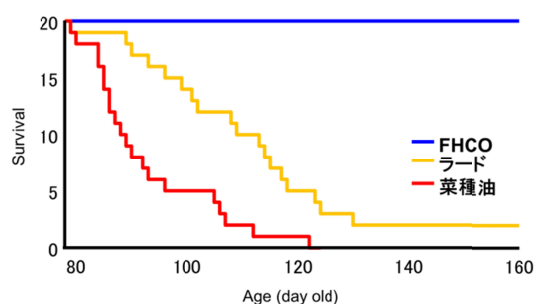


図2 FHCO 摂取における SHRSP 寿命測定実験

18:1 脂肪酸を多く含む油脂を摂取した寿命

つづいて、18:1 脂肪酸を多く含む HOCO を用意して、寿命測定実験を行った。コントロールとしては菜種油と大豆油を用い、FHCO の再現性も併せて検討した。食塩水負荷は 0.5% で行った。HOCO のオレイン酸含量は 64.8% と、菜種油の 51.8% と比べると 13% ほど多かった。寿命短縮への寄与が報告されている植物ステロール含量も測定したところ、HOCO、FHCO ともに菜種油と 10% 以上の違いは認められなかった。これらを摂取した SHRSP は FHCO を除き、体重、摂食量に変化は認められなかったが、その寿命は、菜種油は 112 ± 5 日と大豆油の 123 ± 7 日と比較して短かったのに対し、HOCO 摂取群では 100 ± 4 日と菜種油の群と比較して、更に有意に短くなった。FHCO 群はこの実験においても死亡個体は観察されなかった。

この結果から、18:1 脂肪酸の含量の増減に伴い、それを摂取する SHRSP の寿命も大きく変化する結果が得られ、油脂中の 18:1 脂肪酸含量が直接 SHRSP 寿命短縮に関わる可能性が高いと考えられた。

(2) 18:1脂肪酸による生理学的因子の変化

体重、摂食量及び血圧に及ぼす影響

先の寿命測定実験ではオレイン酸含量の少ない FHCO 摂取群では、摂食量が多く、体重増加が遅れる結果が得られたことから、食塩水負荷をかけない条件でも再検討したところ、摂食量の増加は6~8週齢時に、体重は11週齢時に他の群と比較して、それぞれ有意な差が認められた。菜種油摂取群でも11週齢時においては有意な体重減少が観察されたが、これは病態の進行に伴う二次的なものと推測された。

また、同じ動物を用いて血圧測定を行ったところ、12~16週齢時において、FHCO 群が他の2群と比較して有意に血圧が減少したのに対し、菜種油摂取群では14週齢時において有意な血圧上昇が観察された(図3)。

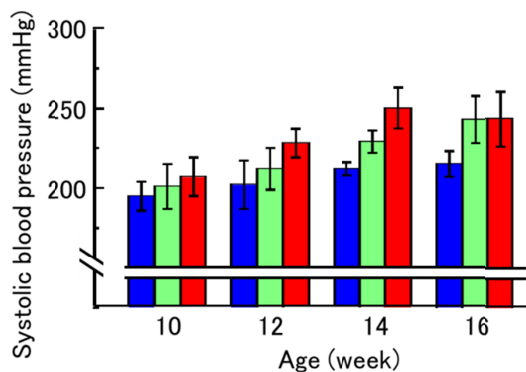


図3 食用油摂取による SHRSP の血圧変化

■; FHCO、■; 大豆油、■; 菜種油

SHRSP の血圧上昇は致死性脳卒中の発生頻度と大きく関わることから、菜種油摂取による血圧上昇と、FHCO 摂取による低下は、それぞれの食事群における病態変化と関連している。

組織病理学的解析

食用油摂取による SHRSP の標的臓器を明らかにするために、実験飼料を摂取したラットの組織の病理学的解析を行った。

サクリファイスした時期が脳卒中発症の直前であったため、脳における変化は、16週齢時において菜種油群で2匹軽い脳出血が観察されたほかは、異常は見当たらなかった。肝臓では、組織重量が FHCO < 大豆油 < 菜種油の順で増加し、菜種油群、大豆油群において顕著な胆管肥大

が観察された。また、腎臓においては、菜種油群で顕著な腎障害が早い段階から観察され、大豆油群でも遅れて観察されたが、FHCO 群ではほとんど観察されなかった(図4)。また、脾臓においては菜種油群のみ16週齢時において髄外造血が観察された。これ以外にも心臓、精巣についても検討を行ったが、顕著な変化は認められなかった。

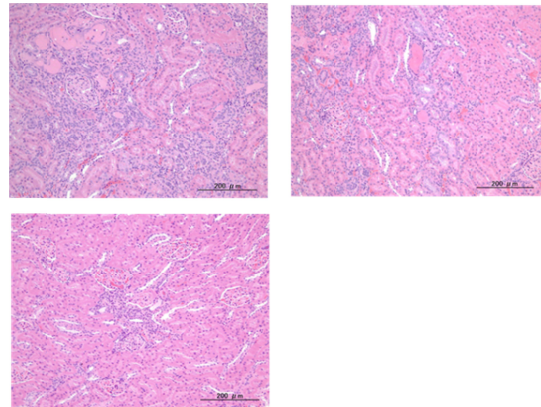


図4 16週齢時での SHRSP 腎臓の組織解析

左上; 菜種、右上; 大豆、左下; FHCO

SHRSP における血圧上昇は腎機能の異常から引き起こされることが知られている。今回の菜種油摂取による腎障害の進行は、血圧上昇を介して寿命短縮につながると推測される。この経路において、オレイン酸の具体的な関与までは、本研究では明らかにできなかったが、油脂摂取により腎障害が促進することが、ヒトの場合でも言えるのであれば、臨床栄養、特に高齢者における栄養指導に貢献できるかもしれない。

組織への脂質成分の蓄積

18:1 脂肪酸の組織における蓄積を調べるため、組織脂肪酸含量とステロール含量を測定した。血清、肝臓並びに腎臓において検討したところ、菜種油、大豆油、FHCO とともに C18 以下の脂肪酸においては、それぞれの実験飼料の脂肪酸組成を反映した結果となった。ところが、22:6 であるドコサヘサエン酸(DHA)は FHCO 群において、3種の組織共に有意に高い結果となった(図5)。DHA は抗炎症作用など、生体防御的な生理機能を多く持つことから、病態改善作用との関わっている可能性が高い。

ステロールに対する蓄積量も検討したところ、

菜種油と大豆油とでは、油脂中の植物ステロール含量は倍近くの差があったのを反映し、組織蓄積量も菜種油群が有意に高かった。一方、FHCO の植物ステロールの含量は菜種油と同程度であるにもかかわらず、これを摂取した群では植物ステロールの蓄積量が 0.35~0.43 倍と有意に低い結果となった(図5)。植物ステロールは SHRSP 寿命短縮の原因物質であることから、この組織蓄積の減少が病態改善作用に関わると考えられ、そこへ 18:1 脂肪酸がどのように関わっているのかが興味を持たれるところである。

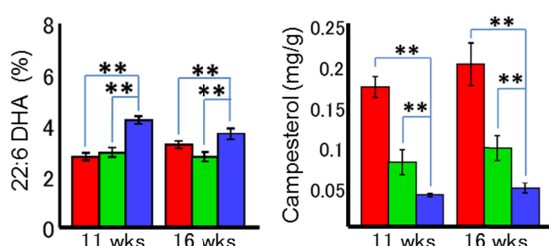


図5 血清中の脂質含量の比較

左; DHA 含量、右; 植物ステロールの一つであるカンペステロール含量

■; 菜種油、■; 大豆油、■; FHCO

肝脂質代謝酵素の遺伝子発現への影響

今まで得られた知見を元に、肝臓における脂質代謝に関連する遺伝子発現を RT-PCR 法により検討を行った。その結果、今回検討した 3 種の遺伝子については、大豆油群と比較して菜種油群、FHCO 群は有意な差はあるものの、両者の間には差が認められず、同様の変化をする傾向にあった。今後は他の遺伝子についても検討を行うとともに、腎臓などの他の臓器についても同様の実験を行うことを予定している。

(3) オレイン酸の分子形による動態変化

寿命短縮活性を持つ油脂を加水分解すると脂肪酸組成は変わらないが、寿命短縮活性が消失する。これは 18:1 脂肪酸がトリアシルグリセロールから遊離脂肪酸に変化することにより、吸収・排泄速度が変化した可能性がある。その可能性を検討するために C-14 で標識したオレイン酸を用いて、その動態をトレーサ法により検討した。

その結果、肝臓、腎臓、脾臓ともに投与後 6 時間において、FFA 投与群よりも、TG 投与群の方

が、オレイン酸の蓄積が観察されたが、24 時間以降では両群間に差は認められなかった。

以上のことから、SHRSP のオレイン酸臓器蓄積量は、少なくとも 6~24 時間後の時点では FFA よりも TG の方が高いことから、加水分解による寿命短縮活性の消失は、オレイン酸取り込みの低下に伴うと推測された。これは油脂摂取による SHRSP 寿命短縮に、オレイン酸が関与することを裏付ける結果である。

(4) 考察・結論

以上の結果より、18:1 脂肪酸のうち、オレイン酸摂取量の増加に伴い、腎障害や血圧上昇といった SHRSP の病態が進行し、寿命が短縮されることが明らかとなった。今回は *trans* 体であるエライジン酸については検討できなかったが、類似の結果が得られると期待される。また、オレイン酸投与による遺伝子発現変化や病態進行のメカニズムは明らかになってはいないため、植物ステロールの影響も含め、更に検討する必要がある。

今回の結果は、あくまで特殊な病態モデルを用いた結果であり、直接ヒトへの影響に関わるわけではない。しかし、薬物の使用、別の疾患、遺伝子多形などにより、この病態モデルに近い状況になり得る可能性はゼロではない。そのような臨床栄養学に貢献するためにも、今後、寿命短縮現象のより詳細なメカニズムを追跡することは非常に重要である。

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 0 件)

(学会発表)(計 8 件)

近藤 佑香、立松 憲次郎、大原直樹: SHRSP 寿命短縮におけるオレイン酸の影響. 日本薬学会第 136 回年会, 横浜(2016, 3/26-29)

近藤 佑香、立松 憲次郎、大原直樹: 18:1 脂肪酸含量の SHRSP 病態に対する影響. 日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2015, 名古屋(2015, 11/1)

近藤 佑香、立松 憲次郎、大原直樹: いくつかの食用油による SHRSP 寿命短縮での 18:1 脂肪酸含量の影響. 日本脂質栄養学会第 24 回大会, 佐賀(2015, 8/28-29)

永田 翔子、**立松 憲次郎**、斉藤 義明、大原直樹:完全水素添加処理した菜種油を摂取することによる SHRSP 病態改善作用 . 日本脂質栄養学会第 24 回大会 , 佐賀 (2015 , 8/28-29)

立松 憲次郎、宮澤 大介、大原 直樹、奥山 治美:高融点油脂の SHRSP 寿命短縮に対する影響について . 日本薬学会 第 135 回年会 , 神戸 (2015 , 3/25-28)

Kenjiro Tatematsu. Full hydrogenation of canola oil did not shorten the life span of SHRSP. 11th Congress of the international society for the study of fatty acids and lipids, Stockholm, Sweden (2014, 6/28-7/1)

立松 憲次郎、宮澤 大介、大原 直樹、奥山 治美:菜種油の脳卒中ラットにおける完全水素添加処理の影響 . 第 4 回機能性食品研究会 , 岐阜 (2013 , 11/30)

立松 憲次郎、宮澤 大介、大原 直樹、奥山 治美:高融点油脂を摂取した脳卒中ラットの寿命短縮効果について . 日本脂質栄養学会第 22 回大会 , 高知 (2013 , 9/6-7)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立松憲次郎 (TATEMATSU, Kenjiro)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 70381720