

平成 22 年 4 月 14 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2007～2008

課題番号：19700611

研究課題名（和文）食用植物油摂取が生活習慣病進展に及ぼす影響の研究

研究課題名（英文）Study for the effects of dietary vegetable oil intake on development of lifestyle-related diseases

研究代表者

内藤 由紀子 (NAITO YUKIKO)

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所・毒性部・薬理学研究室・室長

研究者番号：80426428

研究成果の概要：生活習慣病疾患モデルの一種の脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）にカノーラ油を 6 週間摂取させ、血圧調節に関わる器官である腎臓に対する影響のメカニズムを解明することを目的とした。SHRSP においても、正常血圧 WKY ラットにおいても、脂質酸化依存性の酸化ストレスの増加を伴った血漿脂質レベルの上昇を誘導するが、機能障害をほとんど伴わない腎傷害は SHRSP でのみ認められることが明らかとなった。また同時に、腎臓での COX-2 および e-NOS たんぱく発現が増大することが示唆されたが、高血圧関連疾患の進行促進へのこれらの関与についてはさらに検討が必要であることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	300,000	2,500,000

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：食品、循環器・高血圧、薬理学、脂質

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在日本では、生活習慣病患者が増加し、それに伴い、死亡原因の上位を占めるようになっていたり、若年層でも発症すること等により、生活習慣病への社会的関心が高まっている。

(2) 生活習慣病の予防および治療についての様々な研究が進められているが、その中にはヒトの疾患と遺伝的に類似している疾患モデル動物を用いた研究も含まれている。生活習慣病の発症の原因として、不規則な食生活、運動不足、ストレス等の環境的要因があげられるが、遺伝的要因も発症に大

きく関与していることが最近明らかとなっている。したがって、生活習慣病に関与する遺伝的要因の解明をする際、このような疾患モデル動物を用いることは有意義である。

(3) 脳卒中易発症自然発症高血圧ラット（SHRSP）は、生活習慣病モデル動物の一つである。この動物は、高度な高血圧を発症し、脳血管障害（脳出血および脳梗塞）および心不全を併発するため、生活習慣病の疾患モデル動物として汎用され、その有用性は多数の報告から明らかとなっている。

(4) これらの研究の中には、この疾患モデル

動物にカノーラ油を摂取させると、生存日数が短縮するという報告がある。こ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し、健康に良い食用油として知られており、日本で最も多く消費されている食用植物油であるため、疾患モデル動物で認められた影響の原因を解明することは、生活習慣病患者に対して、社会的、医学的に食生活指導する上で重要な情報となる。また近年、生活習慣病への関心が高いことに加え、食用油は日常生活で身近に摂取するものであることや、種々の特定保健用食品としての食用油が市販されていることから、一般消費者の興味も高いと思われる。

(5) そこでわれわれのグループはこの報告に注目し、SHRSP 等にカノーラ油を摂取させた時の生理学的変化を観察し、主に、血圧上昇促進、高血圧関連疾患の進行促進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。

## 2. 研究の目的

これまでに、カノーラ油を摂取した SHRSP では、高血圧関連疾患の進行促進と、心臓および腎臓での炎症が認められることを確認し、論文報告している。そこで本研究では、生活習慣病疾患モデルの一つである SHRSP にカノーラ油を摂取させ、血圧調節に関わる器官である腎臓に対する影響のメカニズムを解明し、高血圧促進との関連について調べるため、病理組織学および生化学的な方法を用いて詳細な検討を行う。ここでレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系、プロスタノイド等の関与の有無を明らかにすることができる。また、SHRSP の起源系統動物である正常血圧ラット [Wistar-Kyoto (WKY) ラット] を用いて同様の検討を行い、SHRSP で得られた結果を比較する。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用動物および群

雄性 SHRSP および WKY ラット (6 週齢) を各 20 匹 (日本エスエルシー) 購入し、7 日間の検疫馴化期間後、使用した。各系統を 10 匹ずつに分け、1 群 10 匹 4 群とした (SHRSP-大豆油群、SHRSP-カノーラ油群、WKY ラット-大豆油群および WKY ラット-カノーラ油群)。

### (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、対照とする大豆油は、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二番

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

無脂肪精製粉末飼料 (AIN93G、オリエンタル酵母工業) に、10w/w%カノーラ油または大豆油 (対照群) を 6 週間自由摂取させた。

### (4) 体重および摂餌量測定

投与前および 1 週間に 1 回の頻度で測定した。

### (5) 尿検査

投与第 6 週に、動物を代謝ケージで飼育し、24 時間尿を採取した。尿量、比重、摂水量、クレアチニン量および電解質量 ( $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ ) を測定した (EA05、A&T)。また、クレアチニークリアランスおよびナトリウム再吸収率を算出した。

### (6) 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、 $\gamma$ -GTP、LDH、BUN、Creatinine、Glucose、Calcium、Triglyceride、Total cholesterol、Bilirubin、Inorganic phosphate、Phospholipid、Total protein、Albumin、A/G、HDL-cholesterol、LDL-cholesterol、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ ) を測定した。血漿アルドステロン量は、ELISA 法により測定した (Cayman Chemical)。

### (7) 病理学的検査

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、脾臓、肝臓、腎臓および副腎の重量を測定した。また肝臓および腎臓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 (肝臓および腎臓) および Elastic von Gieson 染色 (腎臓) して観察した。免疫組織化学では、腎臓の COX-2 発現を観察した。脱パラフィン処理後賦活化させ、非特異活性をブロックして一次抗体 [COX-2 (1:500、Cayman Chemical)] と反応させた。洗浄後、二次抗体 (ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体、1:200) と反応させ、HRP 標識ストレプトアビジン-ビオチン複合体 (VECTASTAIN<sup>®</sup>ABC kit、Vector Laboratories) と反応させ、3,3-diaminobenzidine 液で染色した (同仁化学)。なお、観察切片中の傍糸球体装置数に対する COX-2 positive 傍糸球体装置数の割合を算出した。

### (8) 尿中酸化ストレスマーカーの測定

非酵素的脂質酸化依存性の酸化ストレスマーカーである尿中 8-isoprostane 量および一酸化窒素依存性ニトロチロシン量を ELISA 法で測定した。

### (9) 腎 eNOS タンパク発現 (Western blotting)

解剖時、摘出した腎臓の一方を PBS(-)で灌

流して HEPES バッファー中でホモジネートを調製した。これをサンプルとし、Western blotting 法 [一次抗体 (抗 eNOS 抗体、1:1000)、Abcam、二次抗体 (抗マウス IgG HRP、1:1000)、Santa Cruz Biotechnology] を用いて化学発光法 (ECL Plus、Amersham Biosciences) で検出した。

#### (10) 動物実験倫理

すべての動物実験は、「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」に基づいて実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 体重および摂餌量の推移

投与期間中、両系統において、カノーラ油群と大豆油群の体重および摂餌量に差は認められなかった。

##### (2) 尿検査

両系統において、カノーラ油群と大豆油群の電解質排泄量およびクレアチニンクリアランスに差は認められなかった。一方、SHRSP において、大豆油群と比較して、カノーラ油群の尿量が増加した (大豆油群で  $75.0 \pm 6.2$ 、カノーラ油群で  $104.2 \pm 11.8$  ml/24 hr/kg body weight, unpaired t-test,  $p < 0.05$ )。

##### (3) 血液生化学検査

両系統において、カノーラ油群で血漿脂質量 (Triglyceride、Total cholesterol、Phospholipid および HDL-cholesterol) 増加が認められた。その程度は、WKY ラットよりも SHRSP でより顕著であった。また両系統において、大豆油群と比較してカノーラ油群の血漿アルドステロン濃度は高値であった (Fig. 1)。その他の測定項目には、両群間でほとんど差が認められなかった。

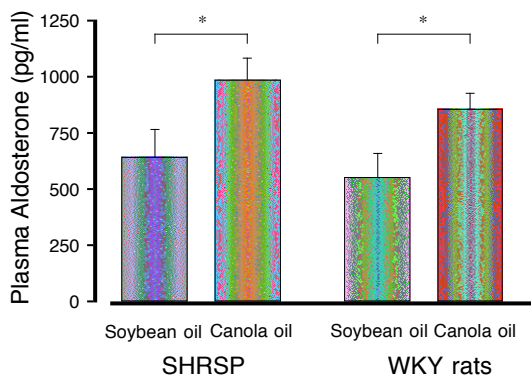


Fig. 1

##### (4) 病理学的検査

両系統において、脳、心臓、脾臓、肝臓、腎臓および副腎の相対重量は、両群間で差は認められなかった。組織学的観察では、両系統において肝臓の所見に大豆油群とカノーラ油群間で差は認められなかった。WKY ラットの腎臓は、両群とも異常所見は認められなかったが、SHRSP のカノーラ油群の腎臓では、皮質の好塩基性尿細管、糸球体

の硬化および小動脈中膜および外膜の肥厚が認められた。

傍糸球体装置の macula densa 細胞には、免疫組織化学染色により COX-2 発現が認められた。観察切片中の全傍糸球体装置数に対する COX-2 タンパクを発現する macula densa を有する傍糸球体装置数の割合は、WKY ラットでは両群間に差は認められなかった (大豆油群およびカノーラ油群でそれぞれ  $9.5 \pm 1.2$  および  $9.1 \pm 1.6\%$ ) が、SHRSP において大豆油群 ( $16.2 \pm 2.1\%$ ) と比較してカノーラ油群 ( $24.7 \pm 3.5\%$ ) で高かった (unpaired t-test,  $p < 0.05$ , Fig. 2)。

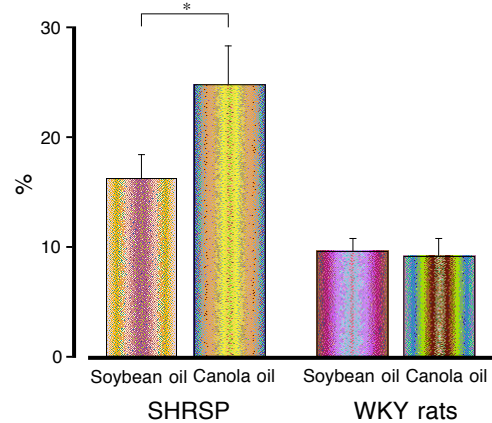


Fig. 2

##### (5) 尿中酸化ストレスマーカーへの影響

尿中 8-isoprostane 量は、両系統とも大豆油群と比較してカノーラ油群で高値を示した (Fig. 3)。

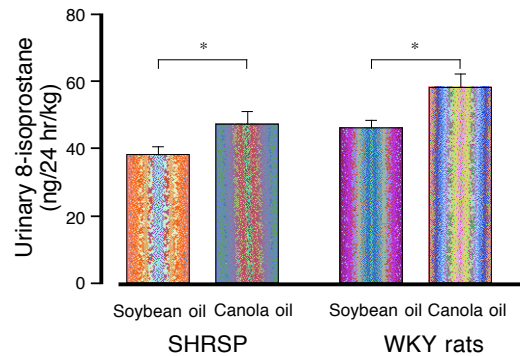


Fig. 3

一方、尿中ニトロロシニン量は、WKY ラットにおいては両群間で差が認められなかったが、SHRSP においては、カノーラ油群で低値を示した。

##### (6) 腎 eNOS タンパク発現

腎臓の eNOS タンパク発現は、SHRSP においてのみ、カノーラ油群で増加していたが、WKY ラットではカノーラ油群と大豆油群で差が認められなかった。

##### (7) まとめ

生活習慣病モデル動物の一つである SHRSP に、10w/w%カノーラ油含有無脂肪精製粉末飼料を 6 週間摂取させると、血漿脂質、アルドステロン濃度および酸化ストレスマーカーである尿中 8-isoprostane 量が上昇した。これらの変化は、起源動物であり、正常血圧の WKY ラットにおいても認められた。一方、腎臓の病理組織学的所見には、WKY ラットでは両群間に差が認められなかったのに対し、SHRSP のカノーラ油群では糸球体硬化、細動脈壁肥厚等が観察され、腎傍糸球体装置の macula densa での COX-2 発現増大が認められた。また、酸化ストレスの関与を検討するため、酸化ストレスマーカーを測定したところ、両系統のカノーラ油群で、非酵素的脂質酸化依存性の酸化ストレスの指標である尿中 8-isoprostane 量の増加、SHRSP においてのみ、一酸化窒素依存性マーカーのニトロチロシン量の減少が認められた。この違いについては明らかにすることができなかったが、カノーラ油摂取群の腎 eNOS タンパク発現の増加が、SHRSP においてのみ認められたこととの関連が考えられた。系統による一酸化窒素産生能の違い等の関与が示唆される。

以上をまとめると、カノーラ油の 6 週間摂取は、生活習慣病モデルとして使用した SHRSP においても、WKY ラットにおいても、脂質酸化依存性の酸化ストレスの増加を伴った血漿脂質レベルの上昇を誘導するが、機能障害をほとんど伴わない腎傷害は SHRSP でのみ認められることが明らかとなった。また同時に、腎臓での COX-2 たんぱく発現が増大することが示唆されたが、高血圧関連疾患の進行促進へのこれらの関与についてはさらに検討が必要である。また、血管傷害とレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系を介した血圧上昇を誘導することが示唆された。SHRSP において認められたカノーラ油摂取による COX-2 発現増加が、どのように病態の進行促進に影響を与えるかについては本研究では明らかとならなかった。しかし、すでに知られている、腎傍糸球体装置の macula densa での COX-2 タンパクは、レニン遊離を誘導し、さらにアンジオテンシン II、アルドステロン産生が導かれることの一部が認められたことから、今後、全体のメカニズムの解明を目指した研究が必要とされる。

(8) 得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

本研究で得られた結果は、これまで、国内外に関わらず、これまでに報告されていない。通常、ヒトでの日常生活で、単一の食用油のみを摂取することは考えにくいこと

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、ヒトが今後引き続き、カノーラ油等の食用油を安全に摂取していく上で、本研究結果はそのための情報源の一つとなりうると考えられる。例えば、生活習慣病患者だけでなく、健常者も、摂取する食用油の種類によっては、血漿脂質濃度が高まる可能性が否定できない。また、健常者と生活習慣病患者が同じ食用油を摂取しても、生活習慣病患者では、より顕著な心血管系疾患が進行する可能性も考えられる。したがって、健常者においては、生活習慣病の予防を、生活習慣病患者においては疾患の進行を促進しないための食餌指導等を目的とし、ある種の実験動物において、カノーラ油摂取によってこれらの影響があるということを確認した上で摂取することは重要である。

## 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)

[学会発表] (計 3 件)

① 内藤由紀子ら、カノーラ油 6 週間混餌摂取による脳卒中易発症高血圧自然発症ラットの腎組織傷害—WKY ラットとの比較—、第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16~18 日、神奈川県横浜市

② 内藤由紀子ら、カノーラ油 6 週間混餌摂取による腎組織傷害 —SHRSP および WKY ラットでの比較—、第 17 回日本脂質栄養学会、2008 年 9 月 5~6 日、大阪府大阪市

③ Yukiko Naito, et al., Canola oil ingestion induces high plasma lipids both in SHRSP and WKY rats but renal injury only in SHRSP, 8th Meeting of the International Society for the Study of Fatty Acids & Lipids, May 17-22, 2008, Kansas City, MO, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内藤 由紀子 (NAITO YUKIKO)  
財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所・毒性部・薬理学研究室・室長  
研究者番号：80426428

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし