

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

数種の食用油に含まれる微量有害因子  
に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 奥 山 治 美

平成 16 (2004) 年 4 月

## 目 次

I	総括研究報告	
	数種の食用油に含まれる微量有害因子に関する研究 -----	1
	奥山 治美	
II	分担研究報告	
1	油脂の分画および微量有害因子の評価 -----	7
	奥山 治美	
2	有害因子の生化学的、生理学的検索 -----	41
	大原 直樹	
3	SHRSPラットの寿命に及ぼす植物ステロールと コレステロールの同時添加の影響 -----	56
	今泉 勝己	
4	プリオン病と菜種油糧飼料に関する研究 -----	58
	小野寄 菊夫	
5	微量有害因子の確定に有用である 生物活性測定系に関する研究 -----	65
	藤井 陽一	
6	菜種油微量成分の化学的解析 -----	67
	永津 明人	
7	ヤキの成長に及ぼすナタネ粕長期給与の影響 -----	69
	大谷 滋	
8	ステリルグルコシトの生理活性に関する研究 -----	73
	小林 哲幸	
9	キャノーラ油の植物エストロゲン様作用の解析 -----	78
	井上 誠	
10	菜種（キャノーラ）油に含まれる 有害因子の分画法に関する研究 -----	80
	門田 重利	
III	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	82
IV	研究成果の刊行物・別刷 -----	83

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
総括研究報告書

数種の食用油に含まれる微量有害因子に関する研究

主任研究者 奥山 治美 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授

研究要旨

数種の食用油は大豆油や紫蘇油に比へて脳卒中易発症性（SHRSP）ラットの寿命を異常に短縮し、微量有害因子の存在が想定されている。この有害因子を探索し、寿命短縮作用を示さない食用油を供給することを目的としている。

CO<sub>2</sub>超臨界流体抽出法、遠心分子蒸留法、分子篩法でキャノーラ油を分画し、寿命短縮活性を評価した。また、キャノーラ油の作用を生殖生理、組織病理の面から評価し、ステロイドホルモン代謝系に及ぼす影響を評価した。

① CO<sub>2</sub>超臨界流体抽出法で分けたキャノーラ油の3画分間に寿命と組織病理像の差がある傾向が示されたか、有意ではなかった。分子蒸留法で分離した2画分とも寿命短縮活性を示さなかった。すなわち大豆油を対照として、寿命短縮活性がほぼ除去された改質キャノーラ油が>90%の収率で得られた。しかし、有害因子の捕集には至らなかった。分子篩法による分画物の活性評価を開始した。

② キャノーラ油のCO<sub>2</sub>超臨界抽出法による3画分、寿命短縮作用と植物ステロール含量との相関は認められなかった。キャノーラ油と同レベルの植物ステロール（キャノーラ油由来）の添加では寿命短縮作用を示さず、キャノーラ油の寿命短縮作用は主要植物ステロール以外の有害因子によることか明確となった。Ratnayake博士調製の精製植物ステロール標品に、植物ステロール以外の成分として5種類の炭化水素を同定した。

③ キャノーラ油により、従来知られていた腎組織障害以外に、脳、心臓、脾臓、精巣、肺、骨髄などに異常が観察された。腎障害（エリスロポエチン低下）→骨髄抑制（巨核球、前骨髄球低下）、髄外造血上昇→血小板減少、赤血球減少傾向というスキームが示唆された。

④ キャノーラ油の有害因子は雌の出生数を減少させ、仔に伝わって仔（雄）の寿命を短縮した。また、血清、精巣のテストステロンレベルを大幅に低下させた。これらはダイオキシンの内分泌攪乱作用と極めてよく似ているか、キャノーラ油食のダイオキシン含量は低いと計算され、それ以外の物質によると考えられた。一方、キャノーラ油群の肝臓で、レトロウィルス遺伝子（HIV-1 LTR）の転写活性化が低下しており、肝臓で免疫細胞機能が失われている可能性が示唆された。

⑤ CO<sub>2</sub>超臨界流体抽出法で寿命短縮活性の最も強い画分、キャノーラ油群、大豆油群の順に脳のHE染色による空胞構造が減少している傾向が示されたか、定量的な評価が必要である。一方、ERストレスによるプリオン様蛋白の異常化について、培養細胞でのアノセイ系がほぼ確立した。他方、ヤキに対する菜種粕の安全性評価が継続しているか、使用菜種粕はヘキササン脱脂粕であると思われ、油分が少ないことの問題点が指摘された。また、油糧種子のステリルクルコントの生理活性評価が進んでいる。

【分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名】

大原 直樹	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所	副部長
今泉 勝己	九州大学・大学院農学研究院	教授
小野 寄菊夫	名古屋市立大学大学院 薬学研究科	教授
藤井 陽一	名古屋市立大学大学院 薬学研究科	助教授
永津 明人	名古屋市立大学大学院 薬学研究科	講師
大谷 滋	岐阜大学応用生物科学部生物資源生産学科	教授
小林 哲幸	お茶の水女子大学理学部生化学	助教授
井上 誠	名古屋市立大学大学院 薬学研究科	助教授
門田 重利	富山医科薬科大学 和漢薬研究所	教授

## A 研究目的

本研究は、数種の食用油に存在か想定されている微量有害因子（脳卒中易発症性ラットの寿命を短縮する因子）を探索・同定し、それを含まない安全性の高い油糧種子を創出・供給することを目的としている。今年度は有害作用を示す菜種油（キャノーラ）と硬化大豆油を選び（大豆油コントロール）、超臨界法、分子蒸留法、分子篩法で分画した画分について、寿命短縮作用を指標として有害因子か分離できる可能性を探ること、病理組織評価を行うこと、植物ステロールの影響を評価すること、マイクロアレイ法による解析結果に基づき、ステロイドホルモン系への影響を評価すること、生殖生理など2世代目への影響を評価すること、キャノーラ種子かプリオン病発症の因子となっている可能性を探ること、などを目標とした。

## B 研究方法

### ① キャノーラ油、硬化大豆油の分画と分画物の評価

C02 超臨界流体抽出法でそれぞれ3画分に分離したキャノーラ油と硬化大豆油について、寿命短縮活性を評価し、病理組織を評価した。分子蒸留法でキャノーラ油を回収油と蒸留油の2画分に分け、寿命短縮活性を評価した。分子篩法でキャノーラ油を分画した（寿命短縮活性の評価を準備中）。

分子蒸留法による分画物の評価に基づき、有害因子の捕集を目的として再度、キャノーラ油を分子蒸留法にかけ、前回の2画分のほか、凝集面付着物とCold Trapでトラップされた物質を回収した（寿命短縮活性の評価を準備中）。また、C02 超臨界流体抽出法によりキャノーラ油を再度、分画する準備を行っている。

### ② 寿命短縮活性への植物ステロールの寄与の評価

分画物の植物ステロール含量と生存率の相関を評価し、植物ステロールの添加効果の評価した。また、親の血清と母乳の植物ステロールを比較し、植物ステロールの仔への影響を推測した。

一方、この事業関連で招聘されたRatnayake博士か調製した「キャノーラ油の脱臭蒸留物（deodorant distillate）由来の植物ステロール」（報文では結晶と記載されたもの）について化学的解析を進めた。

### ③ 病理学的評価

C02 超臨界流体抽出法による分画物を投与し

たSHRSPラット（食塩負荷なしの条件）について、腎、脳、心臓、脾臓、精巣、肺、の組織病理学的評価を行った。

### ④ 内分泌攪乱作用

キャノーラ油の投与か生殖生理に及ぼす影響を評価した。また有害因子か臍帯血、母乳を介して仔に伝わる可能性を評価した。一方、マイクロアレイ法による発現遺伝子の変化に基づきステロイドホルモン代謝系に注目し、組織ステロイドホルモンレヘル、関連酵素活性について評価した。

### ⑤ 菜種粕の安全性

ヤキに対する菜種粕と大豆粕の安全性の評価を継続している（菜種粕群の親1頭か死亡）。また粕の分析をすすめ、ステリルクルコントロールなどの成分の生理活性を評価した。一方、培養細胞、組織でのプリオン蛋白の同定は可能となり、ER ストレスによる異常化を検出する系を確立することとした。

## C 研究結果

### ① キャノーラ油、硬化大豆油の分画と分画物の評価

分子蒸留法により寿命短縮活性か実質的に除かれた改質キャノーラ油か90%以上の収率で得られた（回収油）。しかし、有害因子の捕集はてきなかつた。C02 超臨界法ではキャノーラ油の有害因子か分離される傾向か見られたか、統計的に有意ではなかつた。ただし、脳の空胞構造か寿命と相関する傾向か見られ、再現性を評価する必要かあると考えられた。

### ② 寿命短縮活性への植物ステロールの寄与の評価

SHRSP ラットに大豆油食を与えたときの寿命は、多量の植物ステロール添加で短縮したかキャノーラ油群のレヘルまで短縮せず、またキャノーラ油と同レヘルの植物ステロールの添加では有意な寿命短縮作用はみられなかつた。一方、C02 超臨界抽出法による分画物の間では、植物ステロールと寿命か相関せず、植物ステロール以外の因子か残渣分画中に最も多く含まれていることか示唆された。他方、この事業関連で招聘されたRatnayake博士か調製した「キャノーラ油の脱臭蒸留物（deodorant distillate）由来の植物ステロール」について化学的解析を進めた結果、微量成分として5種の化合物を単離したか、いずれも長鎖アルキルの炭化水素であると同定した。この物質につい

て報文では再結晶標品と記載されているか、植物ステロール混合物であり、他に微量成分を含んでいた。

### ③ 病理学的評価

キャノーラ油、キャノーラ油の超臨界蒸留分画（180bar 分画、350bar 分画、残渣）または大豆油を SHRSP ラットに与えた。キャノーラ油、350bar 分画および残渣群では脳卒中関連症状の発現が早く、キャノーラ油群および残渣群は有意に短命であった。含まれる植物ステロールの総量は、180bar 分画>残渣>キャノーラ油>350bar 分画>大豆油の順に減少した。

上記と同様の飼育を食塩負荷無しに行い、脳卒中関連症状を示す個体が現れた時点で全例を屠殺、解剖した結果、残渣群の脳の傷害が他群に比へて顕著であった。また、残渣群の末梢血では、単球およびリンパ球数の増大を反映した白血球総数の増加がみられた。骨髄像では、キャノーラ油群およびその分画群で、組織球、形質細胞、巨核球の比率の減少または減少傾向が認められ、特に残渣群でみられた変化は著しかった。これらの変化は、骨髄抑制、炎症性病変の存在あるいは免疫系への影響を示唆している。巨核球の比率の減少は、キャノーラ油摂取による末梢血小板数の減少と関連する可能性がある。血液生化学検査では、大豆油群と比較し、キャノーラ油群およびその分画群で脂質パラメータが上昇傾向を示し、特に残渣群ではその程度が強かった。腎障害（エリスロポエチン低下）→骨髄抑制（巨核球、前骨髄球低下）、髄外造血上昇→血小板減少、赤血球減少傾向というスキームが示唆された。

### ④ 内分泌攪乱作用

キャノーラ油食は大豆油食に比へ SHRSP ラット（F0, F1）の出生数を低下させ、仔（F1 雄）の寿命を短縮させた。親の摂取した有害因子が仔に伝わったと解釈できる結果が得られた。一方、キャノーラ油群の親の血清、精巣におけるテストステロンレベルが有意に低下した（対大豆油群）。すなわちダイオキシン類似の内分泌攪乱作用がキャノーラ油に認められたか、餌のダイオキシン含量（計算値）は低く、ダイオキシン以外の有害因子によると考えられた。

日本人のダイオキシン摂取量と動物実験でダイオキシンがテストステロンを低下させる量との間には 60 倍の安全域が存在するか、キャノーラ油の内分泌攪乱作用を示す量は日本人のキャノーラ油摂取量に比へて超大量ではなく、環境中の内分泌攪乱作用物質の中ではキ

ャノーラ油など数種の食用油が最も重要な因子となっている可能性が示された。

### ⑤ 菜種粕の安全性

前年度に牛海綿状脳症（BSE）、羊や山羊のスクレイピーと菜種との関連について調査を行った結果、BSE を発症した牛の飼料中の多くに菜種油粕が含まれていた。菜種は土壌中の硫黄（S）やモリブデン（Mo）やマンガン（Mn）などの重金属を吸収、蓄積しやすく、菜種油粕を過剰に摂取することにより、S や Mo は銅（Cu）と競合し、プリオンを介した細胞内への Cu の取り込みを阻害する可能性がある。Cu 欠乏症になった細胞は Cu/Zn-SOD 活性が低下して酸化ストレスに対し脆弱になり、アポトーシスを起こしやすくなると思われる。Mn は Cu と競合的にプリオンに結合し、プリオンや関連する抗酸化酵素の抗酸化作用を阻害するとともに、Cu 欠乏症を増強する可能性がある。異常プリオンの発現はその結果であるかもしれない。本年度は、その仮説を証明するための研究を開始した。現在、ラットを菜種油粕（油）、大豆油粕（油）を含む飼料で飼育し、発育、生存率などについて観察中である。また、ラットのプリオンを Western blotting 法により検出する系を確立することかてきた。また、飼料、血液や脳などの組織中の Cu, Mn, Mo 含量を定量する系を確立してきた。

ヤキに対する菜種粕と大豆粕給餌の安全性の評価は継続している（菜種粕群の親 1 頭が死亡）。粕を分析した結果、使用中の菜種粕はヘキサノール系脂肪酸であると思われ、圧搾法による粕より油分が少なかった。油中の有害因子も関与しているとすれば、種子の給餌も考えられる（問題点の指摘）。

一方、粕の分析をすすめ、ステリルクルコシトなどの成分の生理活性を評価した。植物ステロールには、遊離型ステロールの他に糖が結合したステリルクルコシトや、糖と脂肪酸が結合したアシルステリルクルコシトなども存在する。本研究では、大豆由来のステリルクルコシトなどを用いて、細胞のストレス応答に関わる新しい生物活性を検討した。具体的には、ラットにステリルクルコシトを経口投与した後、寒冷拘束ストレスを与えて胃潰瘍の発症を定量解析した。その結果、大豆由来ステリルクルコシトの他、 $\alpha$ -コレステリルクルコシトと  $\beta$ -コレステリルクルコシトに強い抗潰瘍作用のあることか明らかとなった。その作用機序として、熱ショックタンパク質（Hsp）の誘導が関わっていることか考えられた。Hsp を介したストレス応答機構を攪乱するステリルクルコシトか

存在する可能性も考えられ、今後、更に検討する必要がある。

(倫理面への配慮)

動物実験は各研究施設の動物実験に関する倫理委員会の承認を得て行われており、実験動物に対する配慮はなされている。

D 考察

現在までのところ、SHRSP ラットの寿命を異常に短縮するものとして、キャノーラ油、オリーブ油以外に数種が見いたされている(表 1)。これらのうち、キャノーラ油と硬化大豆油を選び、大豆油を対照として有害因子を評価し、有害因子の分離を試みた。

表 1 脳卒中易発症性 (SHRSP)ラットの寿命で評価した油脂の安全性

寿命を長く保ち安全なもの	寿命を少し短縮する	寿命を異常に短縮する
紫蘇油 (エゴマ油) フラックス油 DHA魚油	大豆油 ゴマ油 ラート バター 紅花油	菜種油、キャノーラ油 オリーブ油 月見草油、 高オレイン酸紅花油 高オレイン酸ひまわり油 コーン油 硬化大豆油 硬化菜種油

下線の油は高リノール酸油であり 摂りすぎに注意。他の油は調へられていない。

分子蒸留法を用いることにより、寿命短縮活性を示さない改質キャノーラ油が >90%の収率で得られたか、有害因子の捕集と同定の問題が残っている。この改質油製法の再現性、産業化への条件検討、他の食用油への適用性などが今後の課題となる。

数種の食用油の SHRSP ラットに対する寿命短縮作用は、「特殊な動物モデルにおける植物ステロールの作用である」、と一部でされてきた。しかし、今回の一連の研究で、植物ステロール以外の有害因子がより重要であることが明確となった。基本食として用いた精製飼料と普通飼料の差も考察されたか、Ratnayake らが用いた精製飼料を基本食とした場合でも、「キャノーラ油と同じ寿命短縮作用を示すには、キャノーラ油の 5 倍量の植物ステロールが必要である」ことが明らかとされ、寿命短縮作用は、主要植物ステロール以外の有害因子によることが明確となった。(Ogawa et al, (2003) Clin Exp Pharmacol Physiol 30 919-924)。結晶植物ステロールの添加で寿命短縮作用が再現してきたとする報告もあるか、植物ステロールの混合物が結晶を作るとは考えかたく、実際、結

晶植物ステロールとみなされる混合物の中に、炭化水素が混在することか明らかになってきた。

詳細な組織病理学的な評価の結果、多くの臓器がこれらキャノーラ油の影響を受けることが明らかとなった(大豆油対照)。この中で、組織病理学的に認められた腎障害→骨髄障害→巨核球数減少という現象か、別に報告されている“SHRSP ラットや新生豚での血小板数減少”と関連づけられると思われる。

有害因子の仔への移行、出生数の減少、雄/雌比の低下傾向、血清と精巣のテストステロンレベルの低下などかキャノーラ油で認められた(対大豆油)。これらの内分泌攪乱作用はダイオキシンと似ているか、ダイオキシンの植物油への移行は少なく、ダイオキシン以外の因子による作用と考えられる。キャノーラ油の寿命短縮活性は用量依存的であり、餌の 25 重量%のキャノーラ油でも有意に寿命を短縮する。寿命短縮活性と内分泌攪乱作用が相関するとすれば、これら食用油の摂取量(日本人)は動物実験で認められたテストステロンを低下させるレベルを超えており、この面からの安全性評価

か重要となる。

狂牛病（プリオン病）の肉骨粉説には限界があり、北米における多数の野生鹿のプリオン病（慢性疲労症候群）も説明しかたい。菜種粕の安全性を、プリオン病の菜種仮説に関連つけて検証を始めているか、現在のところ、キャノーラ粕を与えたヤキに明確な異常は認められて

いない。最近、菜種油の製造か圧搾法からヘキサノ脱脂法に移行しており、粕の残留油分が少なくなっている。もし有害因子が脂溶性なら、ヘキサノ脱脂粕の安全性が高まっていると思われる。

表2 食用としての菜種(キャノーラ)油・粕の安全性は確立していない(大豆油、紫蘇油対照)

☆ 脳卒中 (SHRSP) ラット	Huangら(1996) Biol Pharm Bull 19 554-557, Miyazakiら(1998) Lipids 33 655-661 腎障害(タンパク尿、糸球体異常、腎血管異常)、血球組成変化、寿命短縮	
☆ 普通 (WKY) ラット/ SHR ラット	Nartoら (2000) Toxicology 146 197 血圧上昇、心・腎組織異常、好中球数上昇、血小板数減少、 血漿脂質上昇	
☆ マウス	Kameyamaら(1996)、Duら(2003) 行動異常、脂肪肝、蛋白尿	
☆ 新生ブタ	Kramer JKら(1994) Lipids 29:859; Innisら(1999) J Nutr 129:1261 血小板数低下、血小板分布幅・容量増加 鉄剤投与で死亡	Sauerら(1997) Nutr Res 17 259-269
☆ 乳牛	Clark Cら(2001) Can Vet J 42 721 菜種油を誤飲した乳牛、9頭中、4頭は死亡、3頭は剖検に付した。死因不詳 Ahlin KAら(1994) Acta Vet Scand 35 37-53 菜種粕で搾乳牛の生殖生理異常、血清TRH値、尿素値変化 (3 kg/日/頭までは安全)	
☆ 産卵鶏	峯苦稔三ら(1975) 全農飼畜中研報告書第3号37-76 菜種粕で大豆粕に対し、肝臓の異常出血を観察	
☆ ヒト(中国女性食堂経営者)	Shieldsら(1995) JNCI 87 836 肺臓癌増加(?)	

## E 結論

### 1 分子蒸留法、CO<sub>2</sub>超臨界流体抽出法によるキャノーラ油の分画

CO<sub>2</sub>超臨界流体抽出法によりキャノーラ油の寿命短縮活性の分離は不完全であった。しかし、組織病理変化と寿命に相関かみとめられる可能性があり、再度、分画を行う必要がある。

分子蒸留法で寿命短縮活性かほぼ除去された改質キャノーラ油か>90%の収率で得られた。しかし、有害因子の捕集には至らなかった。未回収部分の評価か必要であると考える。また、再現性を評価した上で、産業化の可能性を調べる必要がある。

### 2 寿命短縮作用に対する植物ステロールの寄与の評価

キャノーラ油の寿命短縮作用は、主要植物ステロール以外の有害因子によることかほぼ明確となった。分子蒸留実験の結果から、寿命短縮因子は低揮発性であるかもしれない。

### 3 キャノーラ油の内分泌攪乱作用

キャノーラ油は大豆油に比へ、ダイオキシン様の内分泌攪乱作用を示すことか明らかとなった。キャノーラ油食のダイオキシン含量は低いと計算され、それ以外の内分泌攪乱作用物質か存在すると考えられた。環境ホルモンの中て数種の食用油か最も重要な因子である可能性か指摘された。

### 4 組織病理学的評価

従未知られていた腎組織障害以外に、脳、心

臓、脾臓、精巣、肺、骨髄などに異常が観察された。腎障害(エリスロポエチン低下)→骨髄抑制(巨核球、前骨髄球低下)、髄外造血上昇→血小板減少、赤血球減少傾向というスキームが示唆された。

#### 5 菜種粕の安全性評価

ERストレスによるプリオン様蛋白について、細胞レベルでのアノセイ系が確立してきた。ヤキに対する菜種粕の安全性評価が継続しているか、使用菜種粕はヘキサノ脱脂粕であると思われ、油分が少くないことの問題点が指摘された。

#### F 健康危険情報

大豆油を対照としたときのキャノーラ油の有害性は、SHRSP ラットに対する腎障害、寿命短縮、内分泌攪乱作用の他、高血圧ラット、マウス、鶏、新生豚、乳牛などに対しても血小板異常、出血傾向あるいは死亡率増大などが報告されている。人に対する有害性を示すデータは

無いが安全性を示すデータも無い。動物実験で有害作用を示す量が現在の食環境における平均摂取量と大差がないこと、食用油中のキャノーラ油の占める割合が増加傾向にあることから、これら食用油の摂りすぎの害についての広報活動を進めるべきである。

#### G 研究発表

各分担者の項に記載

#### H 知的財産権の出願、登録状況

特許 PCT 出願 (PCT/JP03/16589)

「安全性を高めた食用油およびその製法」

#### 1 特許取得

なし

#### 2 実用新案登録

なし

#### 3 その他

なし



厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
分担研究報告書

油脂の分画および微量有害因子の評価

分担研究者 奥山治美 名古屋市立大学薬学研究科 予防薬食学分野 教授  
研究協力者 立松憲次郎、夫馬慎弥、伊藤真文、市川祐子

研究要旨

SHRSP ラットに大豆油食を与えたときの寿命は、多量の植物ステロール添加で短縮したかキャノーラ油食のレヘルまで短縮せず、キャノーラ油と同レヘルの植物ステロールでは短縮しなかった。すなわち寿命短縮作用は、主要植物ステロール以外の有害因子によることか、より明確となった。

キャノーラ油 10%食は大豆油食に比へ SHRSP ラット (F0, F1) の出生数を低下させ、仔 (F1 雄) の寿命を短縮させた。親の摂取した有害因子か仔に伝ると解釈できる結果か得られた。一方、親の血清、精巣におけるテストステロンレヘルか有意に低下した。すなわちダイオキシン類似の内分秘攪乱作用かキャノーラ油に認められたか、餌のダイオキシン含量(計算値)は低く、ダイオキシン以外の有害因子によると思われる。キャノーラ油の内分秘攪乱作用を示す量はヒトの摂取量に比へて超大量ではないか、これらの結果かヒトに適用できるかとうかは不明である。病的には、血小板減少、脳出血などにかかわる変化か脾臓、脳などで認められた。

分子蒸留法により寿命短縮活性か実質的に除かれたキャノーラ油か>90%以上の収率で得られた。しかし、有害因子の捕集はできなかつた。有害因子の捕集と同定、寿命短縮作用を示さない改質油製法の産業化への条件検討、なとか今後の課題となる。

A	研究目的	7
B	研究方法	7
C	実験結果	
	Ⅰ 生殖生理に及ぼす影響の評価(キャノーラ油と大豆油の比較)	8
	Ⅱ 内分秘攪乱作用(キャノーラ油と大豆油の比較)	14
	Ⅲ 組織変化の病理学的評価	22
	Ⅳ 分子蒸留法によるキャノーラ油の分画—有害因子の除去	25
	Ⅴ 寿命短縮因子としての植物ステロール(PS)の評価	29
	Ⅵ 実験方法の詳細	32
	Ⅶ 引用文献	36
D	考察(分担課題全体)	39
E	結論	39
F	健康危険情報	39
G	研究発表	40
H	知的財産権出願・登録状況	40

A 研究目的

菜種油(キャノーラ油)の長期投与か SHRSP ラットの親 (F0 雌) と仔 (F1 雌) の出生数、仔 (F1 雄) の寿命に及ぼす影響を評価し、F0 のステロイドホルモン代謝系、組織病理に及ぼす影響を評価することを一つの目的とした(大豆油対照)。一方、分子蒸留法により分画されたキャノーラ油画分の寿命短縮活性を評価することを、もう一つの目的とした。

B 研究方法

ラット普通食(CE-2、日本クレア、東京)と油脂を9:1の比で混ぜ実験食とした。とくに記載のない限り、餌はペレット化したもの(日本クレア)を与え、2日ごとにとりかえた。脳卒中易発症性高血圧自然発症(SHRSP)ラットはセアノク吉富(株)由来のものであり、SPF条件で飼育繁殖した。とくに指定のない限り、飲用水として0.5%食塩水をもちいた。他の実験の詳細は、6章にまとめた。

## C 実験結果

### I 生殖生理に及ぼす影響の評価 (キャノーラ油と大豆油の比較)

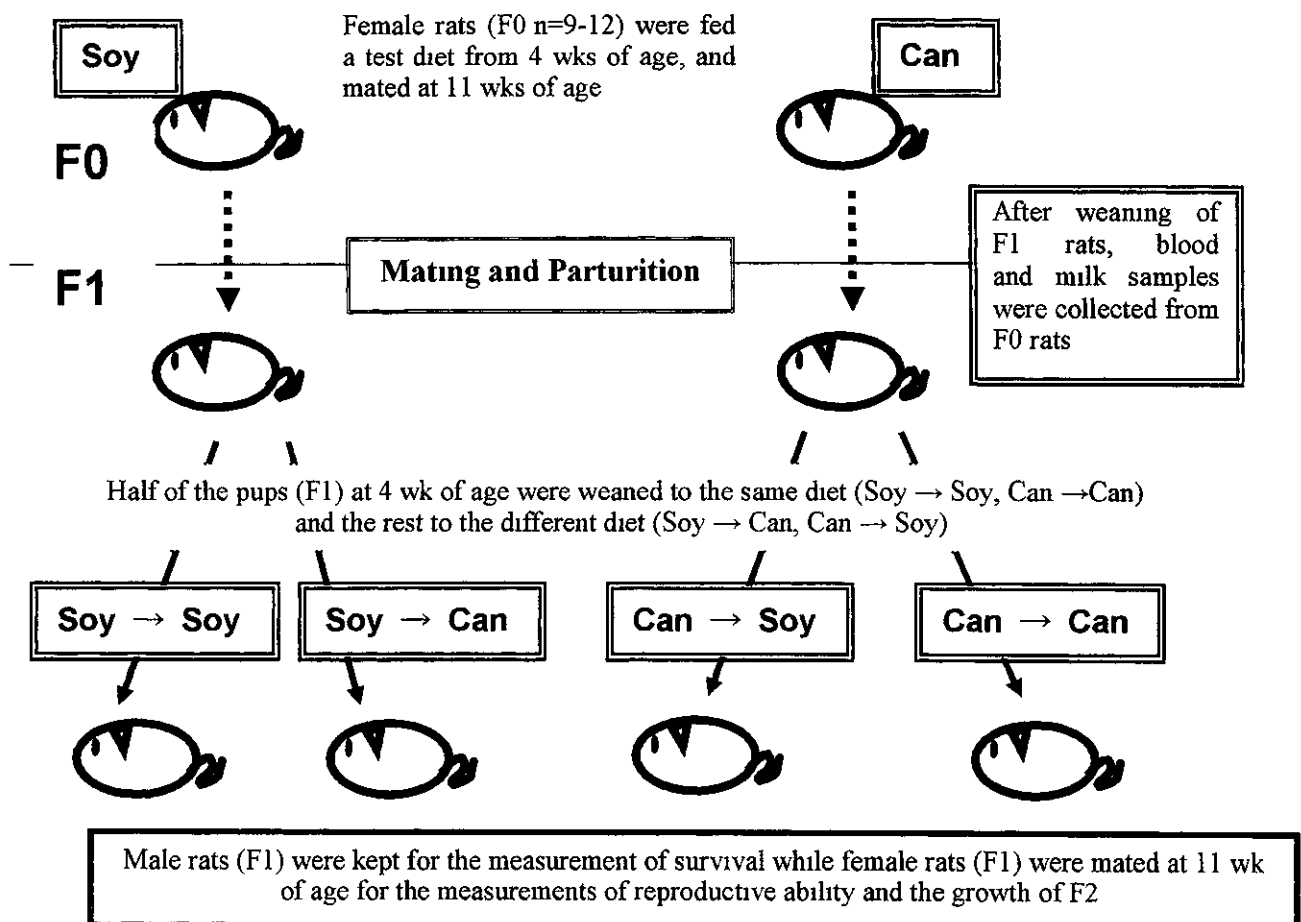
#### 【序および実験スケジュール】

哺乳類は母体から仔へ、胎盤や授乳を通して栄養分の他、抗体などを授受している。血液-胎盤関門は血液-脳関門と同様に脂溶性成分を通過させやすいため、脂溶性薬剤やダイオキシンのような環境ホルモンも、このルートで親から仔へと伝わる [1-3]。油脂中には種々の脂溶性微量成分が存在する。例えば胡麻のセサミンやセサモールは抗酸化作用を持つことが知られており [4]、大豆にはイソフラボン類が多く含まれており、エストロゲン様作用を示す [5]。植物ステロールもそのような微量脂溶性成分のひとつである。このような脂溶性成分も、母体を介して胎児や乳児へと伝わる可能性を含んでいる。キャノーラ油をはじめとするいくつかの油脂が SHRSP ラットの寿命を異常に短縮するか、この作用は脂肪酸組成や主要植物ステロール含量のみからでは説明がつかず、何らかの微量有害因子が含まれている可能性が示唆されている [6, 7]。もし、このような因子が存在するならば脂溶性であり、胎盤、授乳を介して親から仔へと

伝わる可能性が考えられる。SHRSP ラットの生殖能力はもとの WKY や SHR に比べて劣ることが知られている [8]。そのメカニズムはわかっているか、SHRSP ラットか ADHD (attention-deficit, hyperactive disorder) のモデル動物とみなされるように [9]、行動異常が関わっているかも知れない。そこで、雌性ラット (F0) に寿命短縮活性を有するキャノーラ油を摂取させ (大豆油対照)、交配させて仔 (F1) の成長、寿命 (F1、雄)、出生数 (F0、F1 雌) を評価することとした (図 1)。

F1 ラットは 3 週齢で離乳後、4 週齢より引き続き同じ飼料を与えた群 (Can → Can, Soy → Soy) と、飼料をもう一方の飼料に変えた群 (Can → Soy, Soy → Can) の計 4 群を設定した。雌性ラット (F1) は 11 週齢で交配し、妊娠・出産を観察した。雄性ラット (F1) は食塩水負荷条件下で寿命を測定した。一方、仔を引き離した F0 ラットは、離乳直後乳汁を採取し、その 3 週間後に採血した。

図 1 Schedule for two generational studies



**【結果】**

1) 出産数および成長率に対する影響

F0 の飼育、交配、出産にいたる期間中に、両群間で主たる異常は認められなかった。出産した雌/交配した雌の比 (F0) は Can 群と Soy 群で変わらなかったか (Can 群、30/41, Soy 群、30/39)、Can 群の出産数 (F1) は Soy 群の出産数より有意に少なかった (Can 群、236, Soy 群、266)。交配させた F0 雌あたりの出産数の平均 (28 日齢まで生存した F1 の匹数) は、Can 群で 7.9 匹、Soy 群で 8.9 匹であり、この差は統計的に有意であった。また、有意な差はなかったか、Soy 群の方が Can 群より雄性ラットが生まれる確率が低い傾向が認められた (表 1)。

仔ラット (F1) はほとんどの個体が無事に成長し、特に異常の見られた個体はどちらの群にも見られなかった。しかし、F1 ラットの体重増加を出生後離乳期まで 1 週間毎に追った結果、

Can 群の F1 ラットは Soy 群に比べて、雌性、雄性ラットともに有意に体重増加が遅れていた (表 2)。このような体重差は今までの油脂摂取の実験や本実験での F0 ラットには見られなかった (データ示さず)。

仔ラット (F1, 雌) の生殖生理については、4 群のうち Can→Can 群 (F1) のみ、出産した雌 (F0) /交配した雌の比 (17/27) が他群より小さかった。得られた仔ラット (F2) の数は Can→Can 群 < Soy→Can 群 < Can→Soy 群 Soy→Soy 群の順に多かったか、Can→Soy 群と Soy→Soy 群との間には差がなかった。統計解析の結果、仔の数は、F1 の食餌で有意な影響が見られ、Can 食で減少したか (大豆油食に比べ)、F0 の食餌は有意な影響を与えなかった (表 1)。

表 1 Effect of dietary oils fed to dams on delivery and nursing of pups in SHRSP rats.

Generation	F0		F1			
	Can	Soy	Can → Can	Soy → Can	Can → Soy	Soy → Soy
Dietary group						
Diet for F0	Can	Soy	Can	Soy	Can	Soy
Diet for F1			Can		Soy	
Number of delivered dams /mated female	30/41	30/39	17/27	22/25	22/27	23/25
Number of male pups	106	140	57	85	107	100
Number of female pups	130	126	84	94	106	113
Total number of pups	236	266	141	179	213	213
Number of pups/dam	7.9	8.9 <sup>1</sup>	8.2	8.1	9.7 <sup>2</sup>	9.3 <sup>2</sup>

1 In the F0 groups (Can group vs Soy group),  $P=0.037$  by Student's *t*-test

2 In the F1 groups, effect of F0 diet,  $P=0.409$ , effect of F1 diet,  $P=0.016$ , interaction between F0 diet and F1 diet  $P=0.801$  by two-way ANOVA

表 2 Weight gain of F1 rats before weaning at 4 wks of age

Age	Male		Female		Statistics	
	Can (n=53)	Soy (n=67)	Can (n=65)	Soy (n=59)	sex	diet
7 d	12.1 ± 0.2	12.4 ± 0.2	11.6 ± 0.2	12.2 ± 0.2	*	**
14 d	22.6 ± 0.2	23.7 ± 0.2	21.6 ± 0.2	23.1 ± 0.2	**	**
21 d	33.8 ± 0.4	36.6 ± 0.4	32.5 ± 0.3	35.3 ± 0.4	**	**
28 d	49.7 ± 0.7	55.0 ± 0.6	46.6 ± 0.5	51.2 ± 0.7	**	**

Data from two separate experiments were combined. Significance of differences was analyzed by two-way ANOVA (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ )

2) 親 (F0) の食餌が仔 (F1) の寿命に及ぼす影響  
 キャノーラ油食 (Can) あるいは大豆油食 (Soy) で育てた雄性 F1 ラットを、離乳期より親と同じ餌で飼育した群 (Can→Can 群、Soy→Soy 群) と、餌を変換した群 (Can→Soy 群、Soy→Can 群)

とに分け、4 群の寿命を 0.5% 食塩水負荷条件下で測定した。各群のラットの体重差 (表 2) は F0 の食餌の影響を引き続き受けたか (データ示さず)、それ以外には 12 週齢時まで群間の差は観察されなかった。

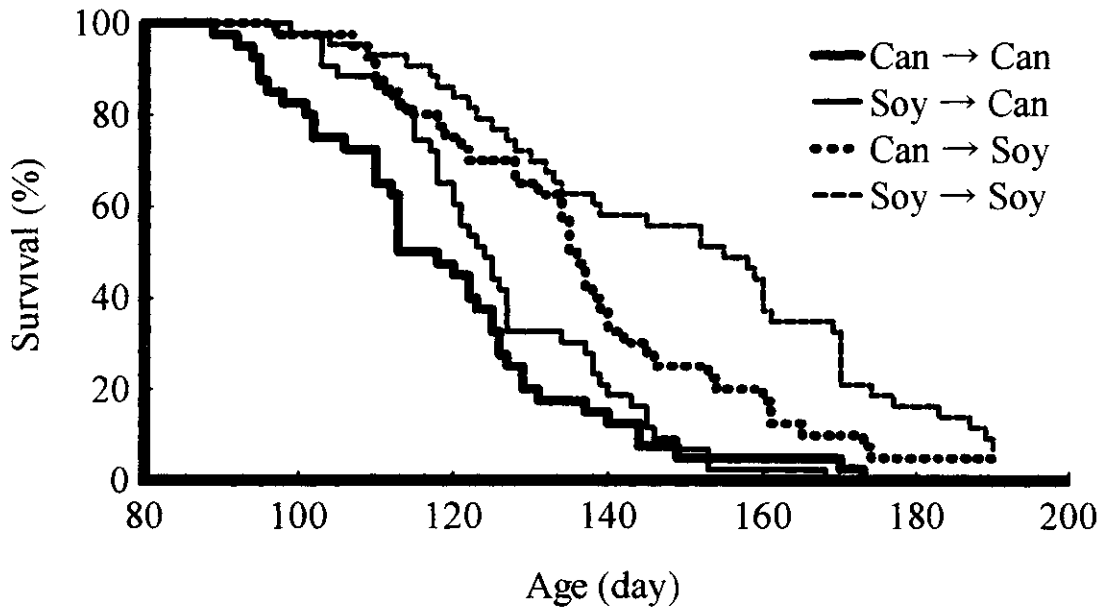


図 2 Effect of dietary oils fed to F0 female rats on survival of male F1 rats

Pups (F1) from the Soy and Can groups (F0) were divided randomly into two groups, one group was weaned to the same diet as their dams (Can→Can group and Soy→Soy group) and the other was weaned to a different diet (Can→Soy group and Soy→Can group) Survival was monitored under 0.5% NaCl loading

表 3 Statistical analysis of survival rate of male F1 rats

Dietary group		Can→Can	Soy→Can	Can→Soy	Soy→Soy
Mean survival time (Day)		119±3	126±2	134±4	150±4
v s Can-Can	Log-rank		0.251	0.002	0.000
	Wilcoxon		0.033	0.001	0.000
v s Soy-Can	Log-rank			0.023	0.000
	Wilcoxon			0.067	0.000
v s Can-Soy	Log-rank				0.003
	Wilcoxon				0.012

Values are means ± SEM (n=36-38) Significance of differences was evaluated by two statistical test (Log-rank test and Wilcoxon test)

平均生存期間は Can→Can 群、Soy→Can 群、Can→Soy 群、Soy→Soy 群の順に長くなり、各群間で有意な寿命の差が見られた(図2、表3)。すなわち、F1 でキャノーラ油を摂取した群(Can→Can, Soy→Can) が大豆油を摂取した群(Can→Soy, Soy→Soy) に比べて寿命が短縮しただけでなく、F0 でキャノーラ油を摂取した群は (Can→Can, Can→Soy) は大豆油を摂取した群に比べて (Soy→Can, Soy→Soy) 、それぞれ有意に寿命が短縮した。F1 の食餌の影響だけでなく、F0 の食餌の影響が F1 に現れたことを示している。

### 3) 乳汁・血清の脂肪酸・ステロール分析

親から仔へと有害因子が移行する原因を検討するため、血清および乳汁中の脂質パラメーターを測定した。実験飼料、血清、乳汁のステロール含量を表4に示した。実験飼料中には Can 群の植物ステロールが Soy 群より多いか、それに対応して血清、乳汁中の植物ステロールも Can 群が多かった。しかし、血清のコレステロールに対する植物ステロールの含量比は、実験飼料のその比よりも小さく、乳汁ではさらに小さかった。すなわち、親から仔へ乳汁を介して植物ステロールは移行しているか、胎盤、乳汁を通して植物ステロールの相対的な寄与は

飼料と比較すると小さくなっていた。さらに餌 100kcal 当りの植物ステロール含量に対し、乳汁 100kcal 当りの植物ステロール含量は 1/4 となっていた(ラット乳汁の容積当りのエネルギー含量を牛乳や人乳とほぼ同じであると仮定して計算した)。

実験飼料、血清、乳汁中の脂肪酸組成を表5に示す。キャノーラ油食はオレイン酸(18:1 n-9)の含量が、大豆油食はリノール酸(18:2 n-6)の含量が相対的に高く、血清や乳汁の脂肪酸も定性的にそれらを反映していた。しかし乳汁には乳腺で合成される短鎖、および中鎖脂肪酸が存在するか、両食餌群間でこれらの量に差は見られなかった。また、血清や乳汁での総脂肪酸量に有意な差が見られず、F1 における体重差は摂取する食餌、乳汁の脂質含量の差ではないといえる。

血清においてはアラキドン酸(20:4 n-6)の量も Can 群で有意に多く、実験飼料中の n-6 系脂肪酸が大豆油に比べて少ないことと対応しない。また、n-3 系脂肪酸の多い Can 食よりも Soy 食のほうが EPA(20:5 n-3)や DHA(22:6 n-3)の量が多かった。ただしこれらは、比較的小さな差であり、乳汁ではそのような差は認められなかった。

表4 Sterol compositions of diet, serum and dams' milk

Values are means ± SEM (serum, n=18 in each group, milk, n=10 in each group) Test diet was prepared by mixing the basal diet (CE-2) with test oil at 9:1 ratio Milk samples were collected immediately after weaning under oxytocin stimulation Blood samples were collected after 3 wk Significance of differences between the two dietary groups was evaluated by Student's *t*-test

Dietary Group	Diet μmol/g diet		Serum mmol/L serum		Milk mmol/L milk	
	Can	Soy	Can	Soy	Can	Soy
Cholesterol	177	169	170 ± 0.21	152 ± 0.22	125 ± 0.14	126 ± 0.19
Brassicasterol	0.18	ND	ND	ND	ND	ND
Campesterol	1.28	0.42	0.22 ± 0.03	0.13 ± 0.03 *	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.01
Stigmasterol	0.12	0.17	ND	ND	ND	ND
β-Sitosterol	2.40	1.72	0.21 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Total phytosterol	1.63	0.95	0.47 ± 0.03	0.33 ± 0.04 *	0.20 ± 0.02	0.15 ± 0.02
Total sterol	2.31	1.61	2.36 ± 0.11	2.04 ± 0.16	1.57 ± 0.10	1.54 ± 0.17
Phytosterol/Cholesterol	2.38	1.46	0.25 ± 0.01	0.19 ± 0.01 **	0.15 ± 0.01	0.11 ± 0.01

表5 Fatty acid compositions of diet, dams' serum and dams' milk

	Diet <sup>3</sup>		Serum		Milk	
	Can	Soy	Can	Soy	Can	Soy
g/100g total fatty acids						
Saturated fatty acids						
10 0	- <sup>4</sup>	-	-	-	63 ± 10	62 ± 13
12 0	-	-	-	-	42 ± 06	37 ± 06
14 0	03	03	-	-	27 ± 04	22 ± 03
16 0	93	132	145 ± 04	164 ± 03**	115 ± 16	138 ± 23
18 0 (dimethylacetal)	-	-	03 ± 01	03 ± 01	18 ± 04	34 ± 07
18 0	21	41	127 ± 03	120 ± 06	02 ± 00	01 ± 00
20 0	05	03	04 ± 01	01 ± 00	01 ± 00	01 ± 00
22 0	02	03	-	-	-	-
24 0	-	-	03 ± 01	- <sup>*</sup>	-	-
Monounsaturated fatty acids						
14 1	-	01	-	-	-	-
16 1	05	04	00 ± 00	03 ± 01**	06 ± 01	06 ± 01
18 1(n-9)	493	241	224 ± 06	128 ± 09**	485 ± 69	244 ± 46**
18 1(n-7)	-	-	11 ± 03	05 ± 01 <sup>*</sup>	-	-
20 1	13	05	-	-	10 ± 01	04 ± 01**
22 1	-	-	-	-	01 ± 00	01 ± 00
24 1	-	-	08 ± 01	07 ± 02	-	-
(n-6) Polyunsaturated fatty acids						
18 2(n-6)	278	494	205 ± 04	337 ± 08**	241 ± 33	451 ± 79 <sup>*</sup>
18 3(n-6)	06	00	04 ± 01	06 ± 00 <sup>*</sup>	03 ± 01	05 ± 01
20 3(n-6)	-	-	-	-	02 ± 00	04 ± 01
20 4(n-6)	-	-	209 ± 05	174 ± 11 <sup>*</sup>	07 ± 01	10 ± 02
22 4(n-6)	-	-	-	-	01 ± 00	01 ± 00
(n-3) Polyunsaturated fatty acids						
18 3(n-3)	66	57	14 ± 01	20 ± 02**	55 ± 07	48 ± 08
20 5(n-3)	-	-	15 ± 01	10 ± 00**	04 ± 00	04 ± 01
22 5(n-3)	09	08	-	-	02 ± 00	02 ± 01
22 6(n-3)	08	07	28 ± 01	23 ± 01**	04 ± 01	05 ± 01
<b>Total FA (mg/mL)</b>			<b>533 ± 035</b>	<b>599 ± 032</b>	<b>1089 ± 145</b>	<b>1081 ± 188</b>

Values are means ± SEM (serum, n=18 in each group, milk n=10 in each group) Test diet was prepared by mixing the basal diet (CE-2) with test oil at 9:1 ratio. Long chain fatty acids (20:5n-3 and 22:6n-3) were derived from fish meal in the basal diet. Milk samples were collected immediately after weaning under oxytocin stimulation, and blood samples were collected after 3 weeks. Significance of differences between the two dietary groups were evaluated by Student's *t*-test. N D, not detected.

### 【考察】

Soy 群に比べて Can 群の出産数は有意に少なく (表 1)、仔 (F1) の成長は遅れ (表 2)、その寿命は短縮した (図 1、表 3)。これらの結果は、Can 食に含まれる微量有害因子が仔に伝わった結果を示していると理解できる。しかし逆の可能性も考えられる。すなわち、大豆には daidzein や genistein などのイソフラボンが多く含まれている。これらは構造がエストロゲンと似ておりエストロゲン受容体 (ER) を介して、エストロゲン様作用を示すことから、植物エストロゲンとも呼ばれている [5, 10]。これらが雌性ラットの生殖機能に有効的に働き、出産数を増加させたとも考えられる [11]。しかし、基本飼料である CE-2 食群の出産数 (8.7 / dam, n=18) や寿命が Soy 群と差がないことから (既報)、これらの CE-2 群や Soy 群に対し、Can 群が有害因子の作用を受けていると考えられる。

F0 の血清および乳汁中の脂肪酸組成およびステロール組成は定性的に実験飼料の組成を反映していた。しかし母体 (F0) で作られる飽

和・一価不飽和脂肪酸やコレステロールの影響を受け、実験飼料よりも両食餌群乳汁における差は少ない傾向にあった (表 4, 5)。そのため、今回認められた仔への影響は、脂肪酸や植物ステロール以外の有害因子によると推測しやすい。寿命短縮活性を示す有害因子と出産数を減少させる因子が同一のものかどうかはわからない。

血清の脂肪酸組成に実験飼料の脂肪酸組成から予測できない変化があったことは興味深い。例えば、アラキトン酸 (20:4n-6) の量は前駆体のリノール酸の少ない Can 群の方が多かった。アラキトン酸をはじめとする多価不飽和脂肪酸は必須脂肪酸であり動物生体内では作られない。アラキトン酸はシクロオキシゲナーゼ (COX) の反応を受け、プロスタグランジン類 (PG) に変換されるか、これらのいくつかは生殖生理の維持に必須である [12]。今回われわれが観察した Can 群の「出産数の減少」、「成長の遅延」、「仔の寿命短縮」等は、プロスタグランジン類前駆体 (アラキトン酸) の減少によるものではないといえる。

## II 内分泌攪乱作用（キャノーラ油と大豆油の比較）

### 【序】

SHRSP ラットは WKY ラット、SHR ラットより派生した系統である [13-15]。異常な高血圧はそれに先立って起こる腎障害により、renin-angiotensin-aldosterone 系が異常亢進することによって引き起こされ [16-18]、脳出血の原因は脳血管をはしめとする各種血管か他のラットに比べて脆弱であり、破綻しやすいこと [19]、に起因するとされている。SHRSP ラットは他の系統に比べ、各臓器でのコレステロール量が低く、これはコレステロール合成系酵素活性が落ちていることに起因し [20]、脂質合成系の転写因子である SREBP-1c に変異を持つことと関連すると思われる [21]。

前章に示した植物ステロールの異常蓄積性も WKY, SHR, SHRSP ラットの特徴の一つであり、ABC (ATP-binding cassette) トランスポーター遺伝子 (abcg5/8) の変異に起因するとされている [22-25]。しかし、同様に変異のある SHR ラットは植物ステロールの高蓄積性を示さず [26]、マウス系統間の植物ステロール蓄積性の解析では ABCG5/8 以外のターゲット分子の存在も示唆されている [27]。SHRSP ラットはこれらのほかにも Angiotensin II や  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 1, anti-natriuretic peptide (ANP)、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) リセプターなどの分子に変異があること [28-31]、糖質、脂質代謝の異常からインスリン抵抗性を示すこと [32] などが報告されている。

われわれのグループでは SHRSP ラットに数種の食用油を摂取させると、その寿命が異常に短縮することを見出した（紫蘇油、大豆油などを対照として） [6, 7, 33-36]。この寿命短縮作用かどのようなメカニズムによるかはいまのところわかっていない。しかし、それに付随するいくつかの生理的現象は明らかになってきた。比較的若齢における血小板数の減少や腎障害の促進 [37]、赤血球膜の脆弱性 [38-40]、

各臓器における  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase 活性の上昇、血圧の上昇などが報告されている [41-44]。ただしこれらの指標と寿命短縮という指標を総合的に結びつけた解釈はなされていない。

そこで、多くの可能性を最大限検討するために DNA マイクロアレイ法により、脳および肝臓での遺伝子発現の差を網羅的に追うこととした。得られた情報に基づきステロイドホルモン代謝系に注目して生化学的解析を行い、組織変化を病的に解析することとした。

### 【実験結果】

#### 1) マイクロアレイ法による解析結果

雄性 SHRSP ラット（4 週齢）に Can 食および Soy 食を 16 週齢まで与えた。脳および肝臓を採取し、total RNA を抽出した。6 匹分のサンプルを等量混合して、プールしたものを duplicate で解析した。その後の解析は日本レーサ(株)(名古屋)に委託した。

得られた total RNA について、指定のプライマーにより逆転写反応で cDNA を合成後、Cy3 (Can 群) および Cy5 (Soy 群) で蛍光標識し、これを 1 枚のチップに 3757 個の遺伝子が載っている Atlas™ Glass Rat 3 8I にハイブリタイスさせて蛍光強度を測定した。Cy3 と Cy5 の標準化にはいくつかの方法があるが、推奨されている内部標準を元にした標準化法でデータをまとめた (Cy3')。Cy3' /Cy5 の比が 2 以上、0.5 以下の遺伝子で、duplicate のデータかほぼ合っているもの、相当量の標識蛍光量があるものをピックアップした。脳と肝臓の 2 種類で遺伝子発現量を比較したか、両食餌群で差のあった遺伝子の数は肝臓の方が多かった (表 6)。

脳で遺伝子発現量の差があったものの一部を表 7 に示した。全体として Can 群で発現が上昇した遺伝子が多かった。

表 6 Number of genes with <2-fold difference between the Can and Soy groups

	Liver	Bran
Can > Soy	33(177)* <sup>1</sup>	107
Soy > Can	892(252)	22

Values in parentheses represent those obtained after global normalization of labeling efficacy of the two fluorescent probes



表 7 List of brain genes exhibiting <2-fold difference in expression between the two dietary groups

	Can/Soy
<i>synaptogynn 2</i>	× 2.98
<i>lipoprotein-binding protein</i>	× 2.36
<i>Interleukin 1 beta</i>	× 2.60
<i>Fibronectin 1</i>	× 2.90
<i>Interleukin 2 receptor, beta chain</i>	× 2.77
<i>c-fos induced growth factor</i>	× 2.85
<i>hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 3</i>	× 3.23
<i>7-dehydrocholesterol reductase</i>	× 3.45
<i>ubiquitin-conjugating enzyme UBC7</i>	× 4.30
<i>fibrillin-1</i>	× 3.78
<i>PAF acetylhydrolase beta subunit</i>	× 3.99
<i>Smoothened</i>	× 3.77
<i>Retinol-binding protein 1</i>	× 6.97
<i>HCN4</i>	× 7.70
<i>Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2C</i>	× 8.72
<i>gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter 2</i>	× 11.08
<i>metabotropic glutamate receptor subtype</i>	× 15.18
<i>CFTR/MRP member 1</i>	× 20.26
	Can/Soy
<i>UDP-GalNAc polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase T5</i>	× 0.29
<i>postsynaptic density protein (citron)</i>	× 0.31
<i>Gamma-aminobutyric acid receptor beta 2</i>	× 0.40
<i>thyroid hormone receptor alpha</i>	× 0.41
<i>GTP-binding protein (G-alpha-i2)</i>	× 0.45
<i>insulin receptor substrate-3</i>	× 0.47
<i>malate dehydrogenase mitochondrial</i>	× 0.48
<i>platelet factor 4 (PF4)</i>	× 0.49

Averages of duplicate determinations are presented. Those interpreted to be associated with brain functions are picked up.

次に肝臓での遺伝子発現の差を検討した。内部標準法と Global normalization 法で標準化し、両方の標準化法で差のあった遺伝子の一部を表 8 に示した。Can 群で発現が上昇したものは

は薬物代謝関連やイオンチャネル群か、Soy 群で発現が上昇したものはホルモン関連や脂質代謝関連の遺伝子群が多かった。

表 8 List of genes with altered expression in liver of SHRSP rats

Hormone	Can/Soy	Drug metabolism	Can/Soy
<i>Androgen-binding protein</i>	x 0 16	<i>aldehyde dehydrogenase 1, subfamily A1</i>	x 2 25
<i>Hydroxysteroid 17-β dehydrogenase 7</i>	x 0 16	<i>UDP-glucose ceramide glycosyltransferase</i>	x 1 73
<i>Hydroxysteroid 17-β dehydrogenase 2</i>	x 0 26	<i>cytochrome P450 2D18</i>	x 1 61
<i>Hydroxysteroid 3-β dehydrogenase</i>	x 0 20	<b>Aryl hydrocarbon receptor</b>	
<i>CYP2A1</i>	x 0 16	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>	x 1 56
<b>Transcription factor</b>		<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like</i>	x 1 95
<i>PPAR δ</i>	x 0 21	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2</i>	x 1 61
<i>Constitutive androstane receptor (CAR)</i>	x 0 20	<b>Channel</b>	
<b>Retinol</b>		<i>chloride channel 7</i>	x 1 41
<i>Retinol-binding protein (RBP)</i>	x 0 28	<i>potassium channel subunit (Slack)</i>	x 2 11
<i>Retinoic acid receptor, alpha</i>	x 0 11	<i>potassium channel subfamily K, member 9 (Task-3)</i>	x 124
<b>Lipid metabolism</b>		<b>Transcription factor</b>	
<i>Lysophospholipase</i>	x 0 17	<i>PGC-1</i>	x 1 61
<i>Stearyl-CoA desaturase, liver</i>	x 0 21	<b>Prostaglandin receptor</b>	
<b>Cholesterol metabolism</b>		<i>prostaglandin F receptor</i>	x 2 22
<i>HMG-CoA synthase</i>	x 0 22	<b>Acetylcholine</b>	
<b>β-oxidation</b>		<i>acetylcholine receptor beta</i>	x 1 89
<i>LC 3-ketoacyl-CoA thiolase</i>	x 0 17	<i>acetylcholinesterase glycolipid-anchored form</i>	x 2 38
<b>Channel</b>		<b>Receptor</b>	
<i>Potassium large conductance Ca-activated channel</i>	x 0 26	<i>calcitonin receptor</i>	x 1 85
<i>Potassium channel modulatory protein 2</i>	x 0 26	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2 A</i>	x 1 75

Averages of duplicate determinations are presented

Those interpreted to be associated with liver functions are picked up

## 2) 臓器中のホルモンレベルの定量

マイクロアレイの結果より、SHRSP ラットにおいて多くの遺伝子発現が食餌の違いによって変化することかわかった。このような変化はすべてか同時におこると考えるよりは、何らかの制御因子に変化がおき、その下流が影響を受けるといったように、一部の遺伝子が標的になっている可能性が高い。

第2章、第3章の結果を含め、表8の結果から、「ステロイド代謝に変化があり、その下流

の代謝系が影響を受けて生殖生理などに影響を及ぼした」、という作業仮説を考えた。そこで、遺伝子発現を測定したときと同じ条件でSHRSP ラットを飼育し（食塩負荷なし）、各種ステロイドホルモンレベル、および関連酵素の活性を測定した。

組織重量を表9に示した。雄性ラットの精巣重量はCan群で低い傾向が見られ、前立腺重量はCan群で有意に低かった。

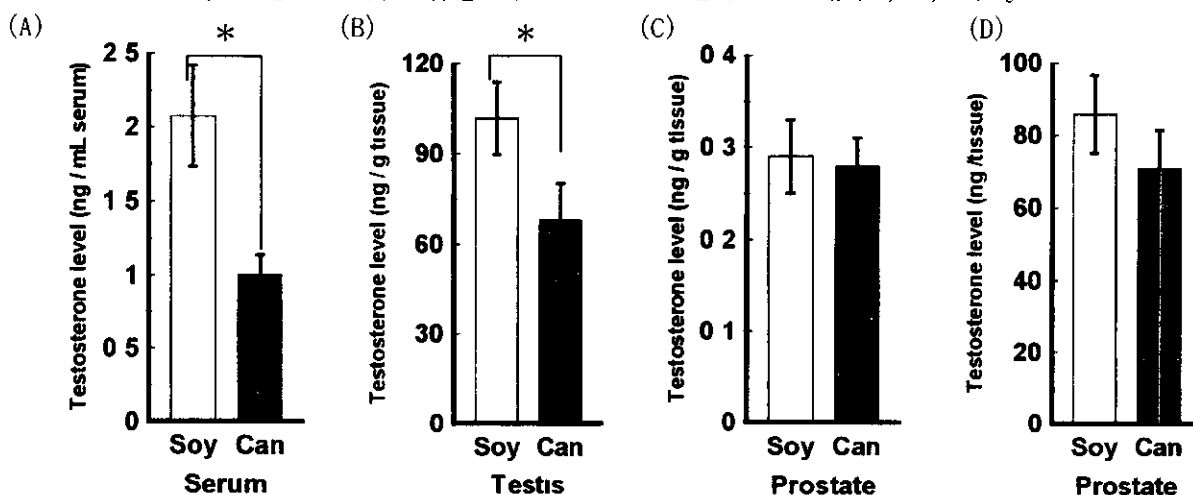
表9 Tissue weight (g) of SHRSP rats fed a test diet for 12 wk.

	Can	Soy
<b>&lt;MALE&gt;</b>		
Body weight	270.5 ± 10.8	303.2 ± 14.0
Prostate	0.250 ± 0.017	0.303 ± 0.017 *
Adrenal gland	0.048 ± 0.004	0.046 ± 0.003
Testis(right)	1.402 ± 0.151	1.603 ± 0.041
(left)	1.611 ± 0.030	1.730 ± 0.118
<b>&lt;FEMALE&gt;</b>		
Body weight	195.1 ± 4.9	201.5 ± 4.6
Ovary	0.100 ± 0.005	0.101 ± 0.006
Adrenal gland	0.053 ± 0.001	0.056 ± 0.001

Values are means ± SEM. Significance of the differences was evaluated by Student's *t*-test (\*  $p < 0.05$ )

血清、精巣、卵巣、副腎、前立腺における各種ステロイドホルモンの量を測定した（帝国臓器メテikal株、東京に委託）。血清のtestosterone含量は、Can群がSoy群に比べて有意に低く（Soy, 2.08 ± 0.34 ng/g tissue, Can, 1.01 ± 0.13 ng/g tissue）、精巣中testosterone含量もCan群で有意に低かった

（Soy, 101.7 ± 12.1 ng/g tissue, Can, 68.2 ± 12.9 ng/g tissue, 図3）。前立腺においては両食餌群間に差は見られなかった。しかし、前立腺重量に差があるため、前立腺あたりの値で換算するとtestosteroneおよびdihydrotestosterone含量はSoy群で高い傾向を示した（図3, D, F）。



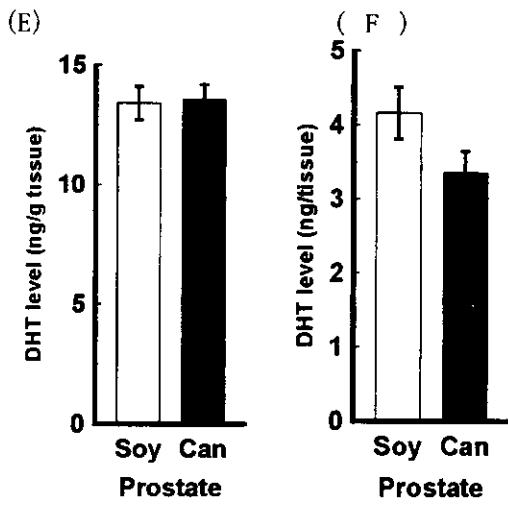


図 3 Tissue testosterone and dihydrotestosterone (DHT) levels in 16-wk-old SHRSP rats fed Can diet or Soy diet.

Testosterone levels in serum (A), testis (B), prostate (per g tissue) (C), and prostate (per prostate) (D), DHT levels in prostate (per g tissue) (E) and prostate (per prostate) (F) Values represent means  $\pm$  SEM (n=6) Significance of the differences was analyzed by Student's *t*-test (\*,  $p < 0.05$ )

Corticosterone の量は雌雄どちらに関しても血清、副腎ともに差が見られなかった。また、雌性ラットにおける卵巣での estradiol 含量も Can 群の方が高い傾向がみられたが、ハラつきが大きく有意な差ではなかった (図 4)。

ステロイド合成の初期段階に関与する  $3\beta$

-hydroxysteroid dehydrogenase ( $3\beta$ -HSD) の活性を測定した。測定には dehydro-epiandrosterone (DHEA) より androstenedione を産生する反応系を利用した。その結果、両食餌群間に有意な差は見られなかったが、副腎においては雌雄ともに Can 群の活性が少し低い傾向にあった ( $\sigma$   $p = 0.095$ ,  $\text{♀}$   $p = 0.1134$ , 図 5)。

図 4 Corticosterone levels in serum (A) and adrenal gland (B), and ovary estradiol level (C) in the Can and Soy groups.

The differences between the two groups were not significant

