

Figure 17 Relative testis weights of SHRSP and WKY rats fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 4 weeks

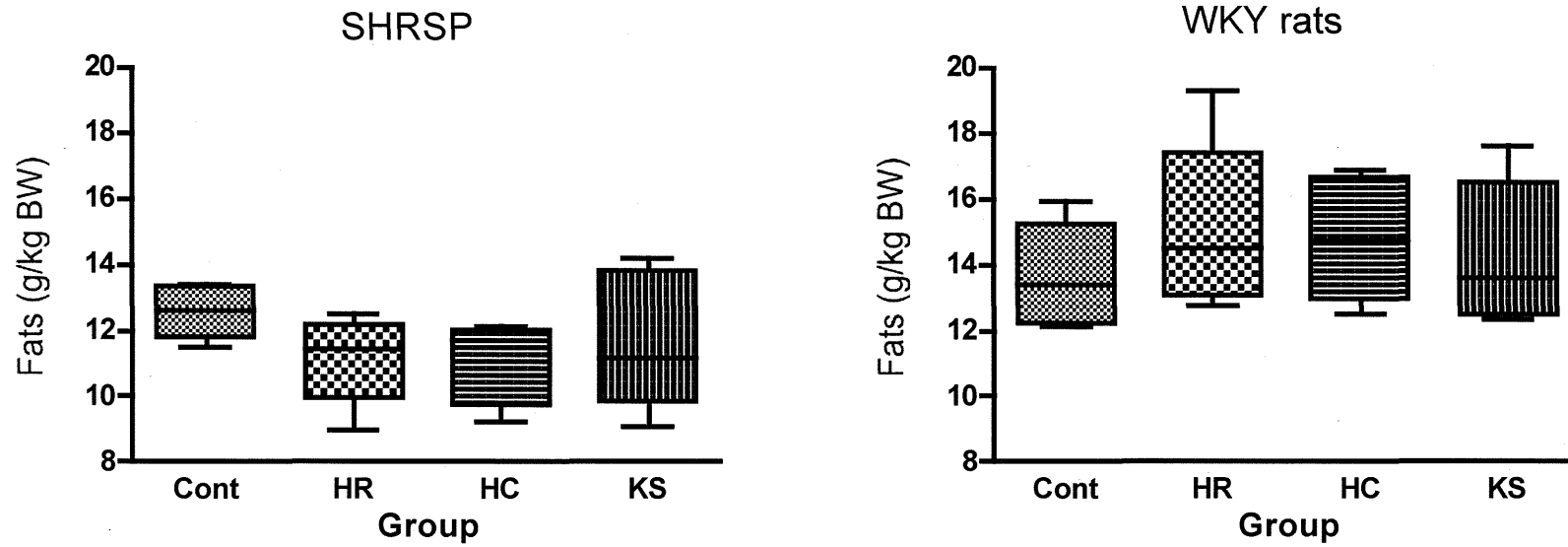


Figure 18 Relative epididymal fat weights of SHRSP and WKY rats fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 4 weeks

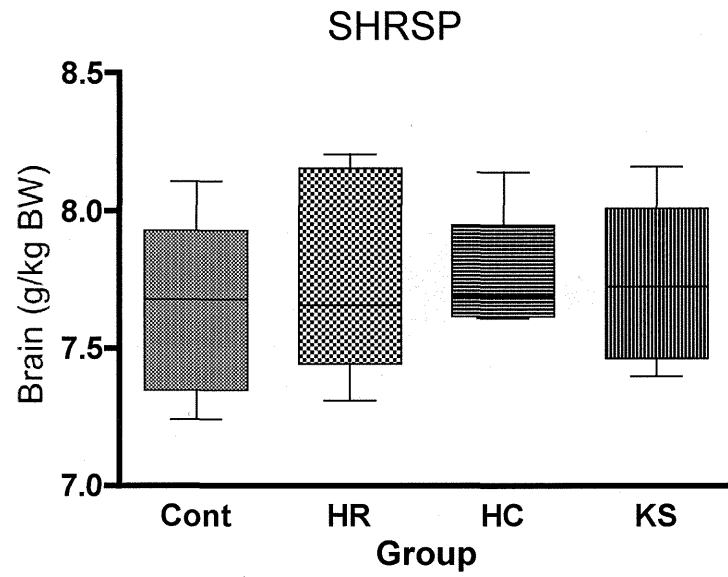


Figure 19 Relative brain weights of SHRSP fed diets containing 7 w/w% Tokuyo oils for 4 weeks

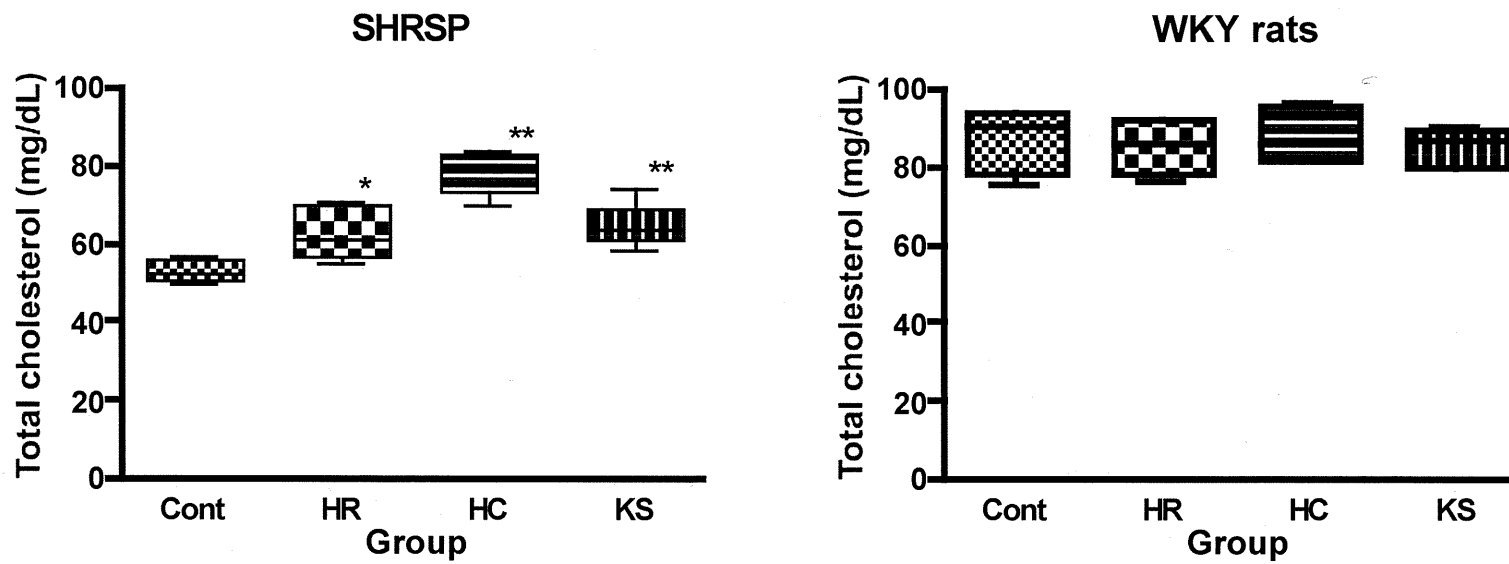


Figure 20 Plasma total cholesterol levels of SHRSP and WKY rats fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 4 weeks
** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, significantly different from the value of Cont group (Dunnett's test)

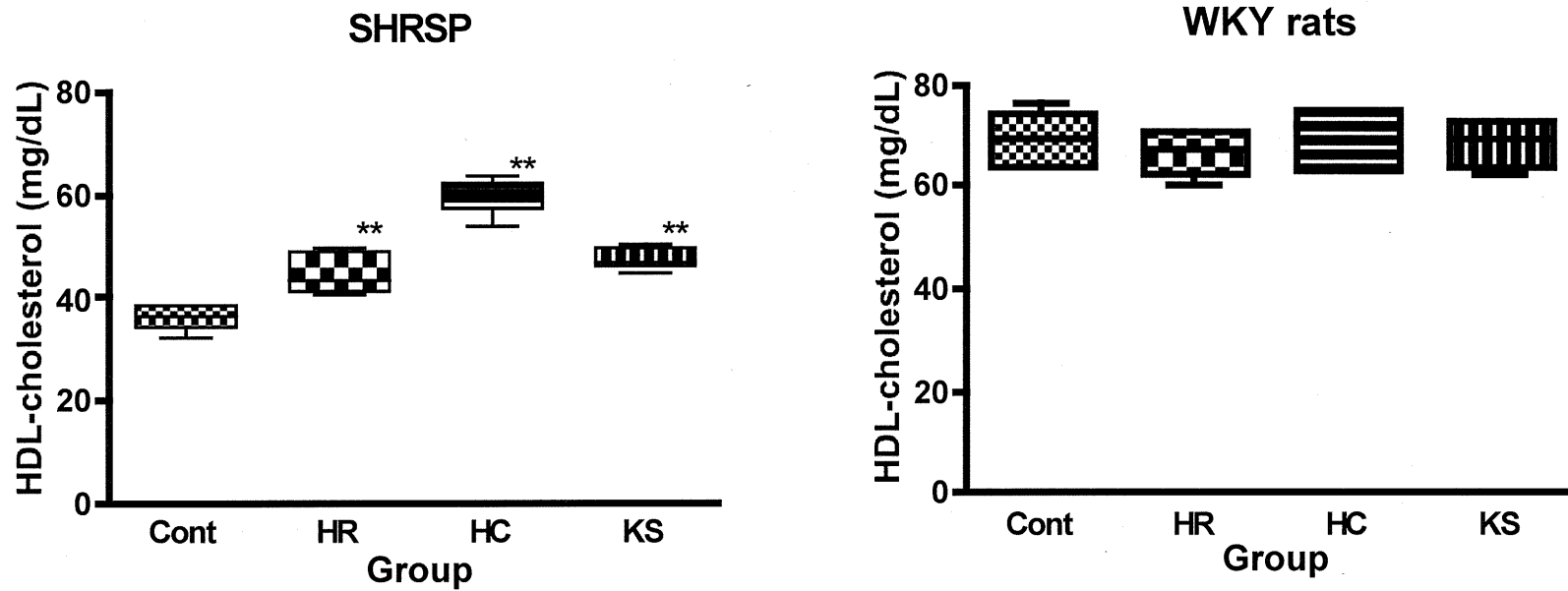


Figure 21 Plasma HDL-cholesterol levels of SHRSP and WKY rats fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 4 weeks
**p<0.01, significantly different from the value of Cont group (Dunnett's test)

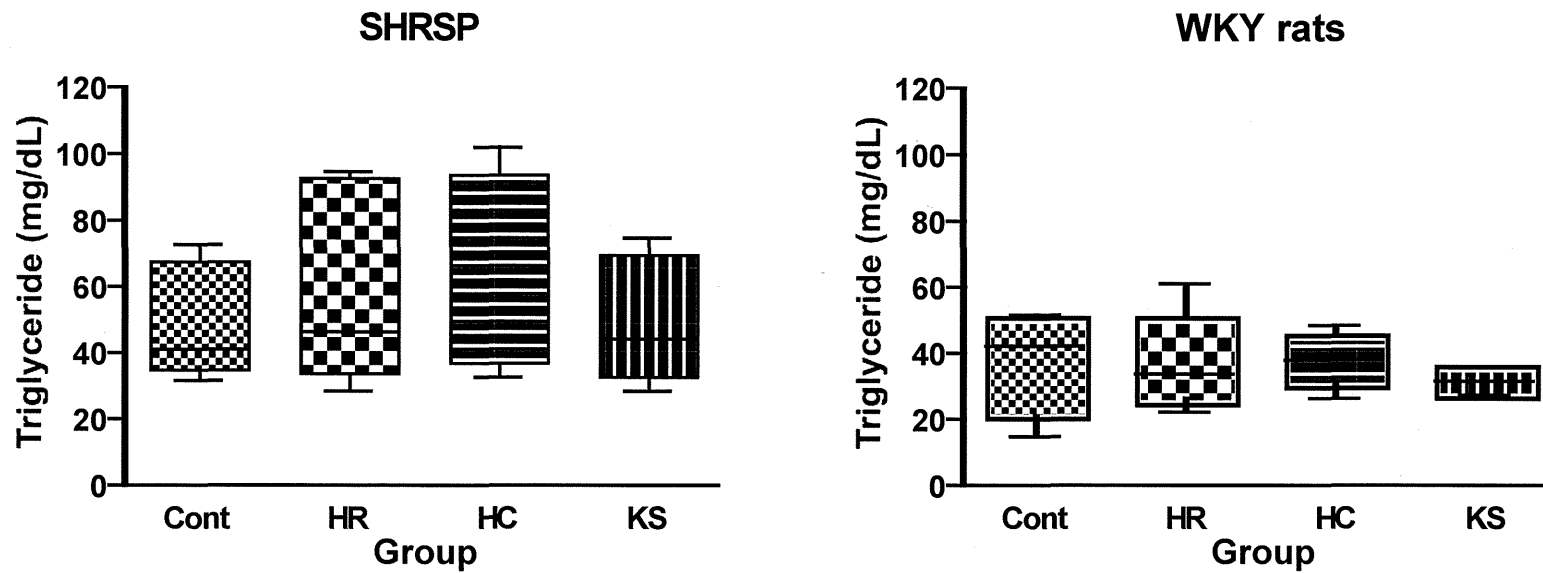


Figure 22 plasma triglyceride levels of SHRSP and WKY rats fed diets containing 7. w/w% Tokuhoo oils for 4 weeks

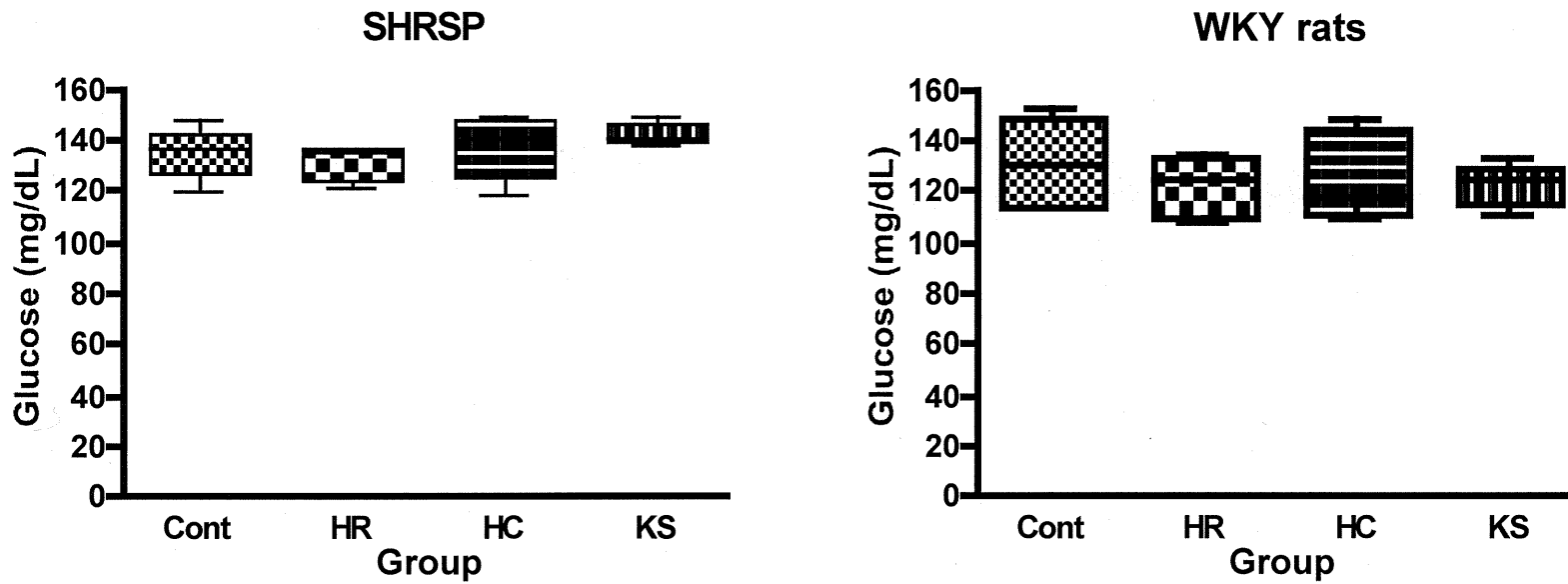


Figure 23 Plasma glucose levels of SHRSP and WKY rats fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 4 weeks

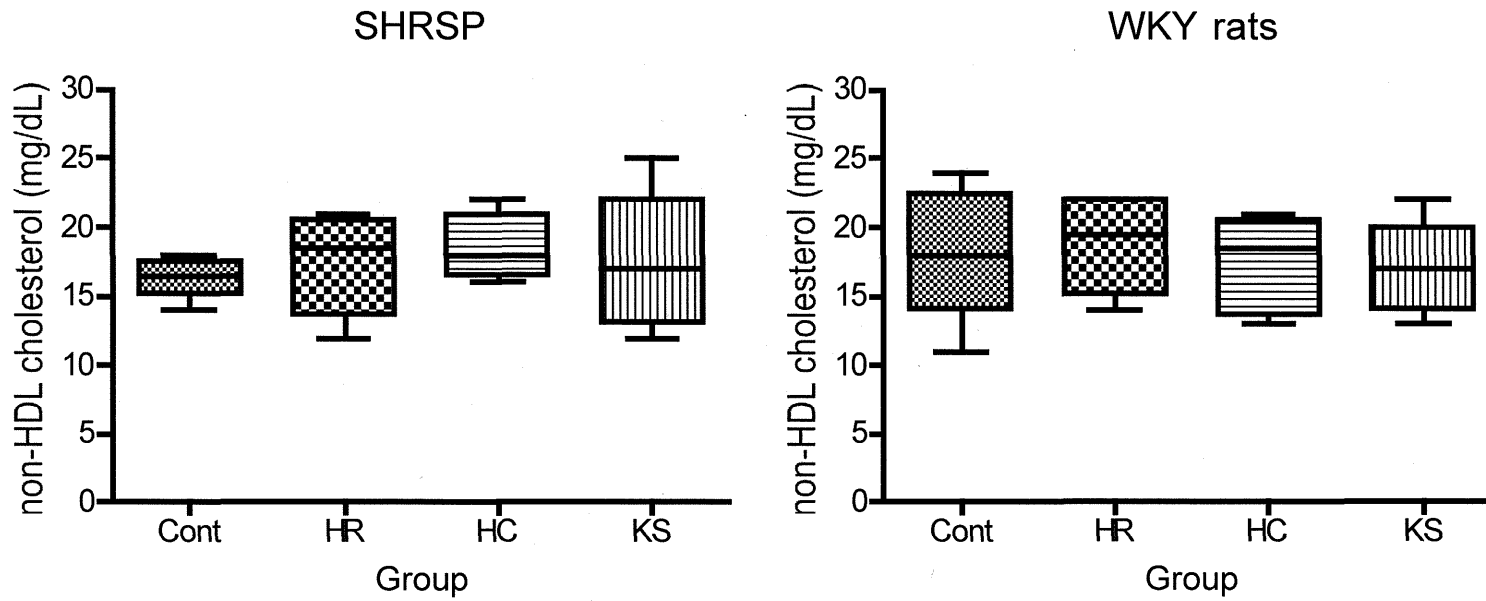


Figure 24 non-HDL cholesterol levels of SHRSP and WKY rats fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 4 weeks

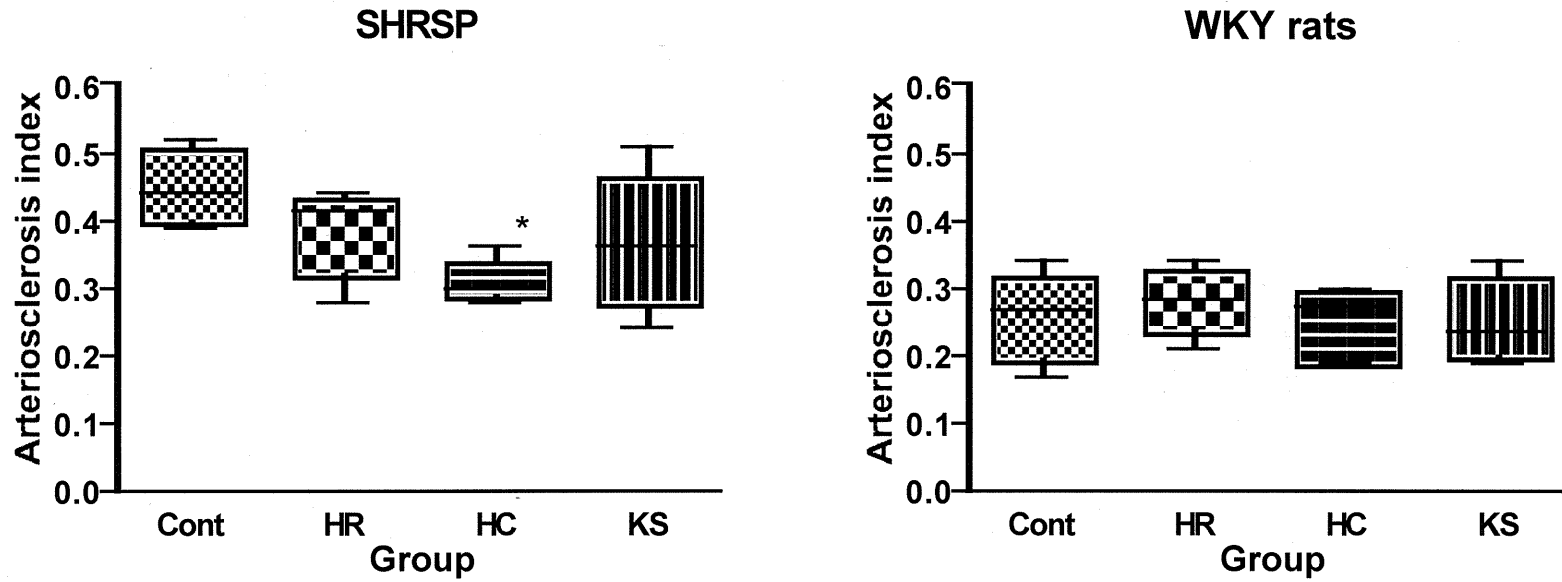


Figure 25 Arteriosclerosis indexes of SHRSP and WKY rats fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 4 weeks
Arteriosclerosis index=(total cholesterol – HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol
*p<0.05, significantly different from the value of Control group (Dunnnett's tset)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

ニュートリゲノミクス解析に基づく機能性食用油の安全性に関する研究

—食用油摂取がステロイドホルモン代謝に及ぼす影響—

研究分担者 大原 直樹 金城学院大学薬学部・教授
研究代表者 内藤 由紀子 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

研究要旨

「コレステロールが高めの方に適する」あるいは「身体に脂肪がつきにくい」という表示が許可された特定保健用食品（トクホ）として現在販売されている植物油製品3品目；ヘルシーリセッタ[®]（日清オイリオ）、ヘルシーコレステ[®]（日清オイリオ）および健康サララ[®]（味の素）のいずれかを唯一の脂肪源として混餌し、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）に摂取させて、これらのトクホ製品が SHRSP のステロイドホルモン代謝に及ぼす影響について検討した。6週齢の雄性 SHRSP 24匹を1群6匹からなる4群に分け、対照群には AIN-93 組成の標準精製飼料を、比較群には標準精製飼料製造時に添加するダイズ油の代わりに、上記トクホ3品目のいずれかを添加した AIN-93 組成の精製飼料を4週間自由摂取させて飼育した。摂取期間後、精巢を摘出して組織中のプレグネノロン、アンドロステンジオンおよびテストステロンを、LC-MS/MS を用いて定量した。その結果、ヘルシーコレステ[®]を摂取した SHRSP のプレグネノロン濃度が対照群と比較して有意に上昇した。ヘルシーリセッタ[®] および健康サララ[®] 摂取群のプレグネノロン濃度にも上昇傾向がみられた。また、トクホ摂取群では、アンドロステンジオンおよびテストステロン濃度にも上昇傾向が認められた。従って、今回の摂取条件（油脂として7w/w%含有した飼料を4週間摂取）では、ステロイドホルモン代謝への影響は明らかではなかったが、その可能性を除外することはできなかった。雄性 SHRSP では、菜種（カノーラ）油摂取による生存期間短縮、昇圧促進、腎傷害促進などの有害効果に加え、血漿中および精巢中テストステロン濃度の低下と血漿中アルドステロン濃度の上昇が認められている。ヘルシーリセッタ[®]はカノーラ油を、ヘルシーコレステ[®]はカノーラ油由来の植物ステロールを含有する。カノーラ油または、カノーラ油由来の物質がステロイドホルモン代謝に影響を及ぼすか否かについては、今後、さらに検討する必要がある。

A. 研究目的

雄性脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) では、カノーラ油摂取によって生存期間が短縮し、このとき、昇圧促進、腎傷害促進などの有害効果に加え、顕著な血漿中および精巢中テストステロン濃度の低下 (1) と血漿中アルドステロン濃度の上昇が認められている (学会報告 1-3)。本研究では、雄性 SHRSP を用い、「コレステロールが高めの方に適する」または「身体に脂肪がつきにくい」という表示が許可された特定保健用食品 (トクホ) である 3 製品、ヘルシーリセッタ[®] (日清オイリオ)、ヘルシーコレステ[®] (日清オイリオ) または健康サララ[®] (味の素) を摂取させた際の安全性を、とくにステロイドホルモンへの影響に注目して検討した。

これまでに、トクホとして承認された植物油製品の安全性を SHRSP のような病態モデルで検討した報告はないが、ヘルシーリセッタ[®] は、菜種油にココナツ油やパーム油を配合することで中鎖脂肪酸含量を増した製品であり、また、ヘルシーコレステは米油に、菜種油や植物胚芽に含まれるステロールを加えた製品であることから、雄性 SHRSP でみられたカノーラ油摂取による有害効果と同様の効果があるか否かを確認すること、また、カノーラ油の有害性の原因物質が植物ステロールの量に依存するという報告があることから (2)、菜種油由来の植物ステロールの影響の有無を確認することは、これらの製品の安全性

を評価するうえで意義があると考えた。健康サララ[®] は、ダイズ油にダイズ胚芽ステロールを添加した製品で、菜種油由来の成分を含まないため、SHRSP におけるカノーラ油摂取による有害効果が大量の植物ステロール摂取によって起こるとする説 (2) の正否を確認できる可能性がある。

B. 研究方法

6週齢の雄性 SHRSP 24匹を 1 群 6 匹からなる 4 群に分け、床敷を敷いた樹脂製ケージに 1 ケージ 3 匹の密度で飼育した。飼育施設の環境設定は温度 20~23°C、湿度 40~55%、12 時間照明とした。それぞれの群に、AIN-93 G 組成の標準精製飼料、AIN-93 G 組成の標準精製飼料の油脂成分をダイズ油に代えて、ヘルシーリセッタ[®] (日清オイリオ)、ヘルシーコレステ[®] (日清オイリオ) または健康サララ[®] (味の素) とした飼料を与え、標準精製飼料摂取群を対照群とした。飼料、飲水はいずれも自由摂取とした。飼料中の油脂量は、7 w/w% とした。

摂取期間終了後、動物をペントバルビタールナトリウム麻酔して精巢を摘出し、リン酸緩衝液中に分散させた組織ホモジネート 1 mL に 3 mL のジエチルエーテルを加えて混和し、エーテル層を遠心分取して蒸発乾固させた後、1 mL アセトニトリル、3 mL ヘキサン中で分配させ、アセトニトリル層を遠心分取して蒸発乾固させた。これを 1 mL 5% 炭酸水素ナトリウム液、0.25 mL エタノール中に溶解し、Bond

Elute C18カラムに載せた。メタノール洗浄後、アセトニトリルで溶出し、これを蒸発乾固して、炭酸水素ナトリウムでアルカリ性とし、試料中のステロイドをLC-MS/MS (API-4000) で同定した。HPLC分析カラムにはCadenza CD-C18 3 μ m 3 \times 250 mmを用い、移動相は0.1% ギ酸溶液/アセトニトリル、カラム温度は45 $^{\circ}$ C、流量は 0.5 mL/minとした。サンプルはアセトニトリル：精製水=40：60 溶液として20 μ Lを注入した。MS/MSのイオン化はESI (Positive)とした。

(倫理面への配慮)

「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日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知、科発第0601001号)」を遵守し、研究開始前に「国立循環器病研究センター動物実験実施規定」に基づく研究計画書を作成し、同実験管理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同総長により承認されている。

C. 研究結果

測定結果を Table 1、Figure 1～3に示す。

精巢中のプレグネノロン、アンドロステンジオンおよびテストステロン濃度は、対照群と比較した場合、いずれの群でも高値を示す傾向がみられたが、統計学的に有意差の認められる群はなかった (Dunnettの多重比較)。

一方、対照群と個々の処置群の2群間でt-検定をすると (Figure 4～6)、ヘルシーコレステ[®]群のプレグネノロンが対照群に比べ有意に高値となった (Figure 5)。

D. 考察

本研究結果から、今回検討した条件下では、ヘルシーリセッタ[®]、ヘルシーコレステ[®]または健康サララ[®]が、雄性SHRSPの精巣ステロイド産生に著しい影響を及ぼさないことが示唆された。ただし、プレグネノロン、アンドロステンジオンおよびテストステロンは、いずれのトクホ摂取群でも上昇する傾向がみられ、ヘルシーコレステ[®]摂取群ではプレグネノロン濃度の有意な上昇が認められたことから、摂取油脂またはその含有物がステロイドホルモンの生合成に影響を及ぼしている可能性は除外できない。

実際、カノーラ油を長期間摂取させたラットおよびミニブタにおけるマイクロアレイ解析では精巣のステロイドホルモン代謝経路に関与する酵素、タンパク質の遺伝子に影響が認められている (ラットについては未発表、ミニブタについては、平成19年度～平成23年度私立大学学術研究高度化推進事業「脂質栄養と性差に関するオープン・リサーチ」研究成果報告書で報告) ため、摂取期間を延長した実験系での再検討も考慮する意義があると考えられる。また、雄性SHRSPにおいて、ダイズ油含有飼料摂取群を対照とし、カノーラ油含有飼料を8週間摂取さ

せた実験では、カノーラ油摂取群の血漿中プレグネノロン濃度および、プロゲステロン、デオキシコルチコステロン、コルチコステロン濃度が上昇傾向を示し、アルドステロン濃度が有意に上昇し、同時にデヒドロエピアンドロステロンおよびアンドロステンジオン濃度が低下傾向を示すとともにテストステロン濃度は有意に低下した。このとき、精巣のデヒドロエピアンドロステロンおよびテストステロン濃度は有意に低下した。これらの結果から、カノーラ油摂取は、雄性SHRSPの精巣におけるアンドロゲン生成に抑制的に働き、また、副腎ではステロイドホルモン産生を促進する働きがあることがわかった（学会発表1-4）。精巣ではプレグネノロン濃度も有意に低下したことから、精巣におけるアンドロゲンの低下には、精巣におけるプレグネノロンの生成またはミトコンドリアへのコレステロール取り込みの抑制が関与することが考えられた。さらに、副腎におけるアルドステロン生成と精巣におけるテストステロン生成の間には、なんらかの調節機構が存在することを推定した。なぜなら、ラット培養副腎皮質細胞では、テストステロンがアルドステロン生成を抑制することが報告されているからである（3）。

このような経緯から、本研究でトクホ3製品の安全性を評価する背景には、これらの製品に使われている油脂がカノーラ油であるか否かによって有害性の顕われ方に差があるか否か

を検討しておく必要性の認識がある。カノーラ油摂取による雄性SHRSPの生存期間短縮の一因は、SHRSPがもつ遺伝的病態の悪化促進にあると考えられ（4）、昇圧促進、腎、心における組織傷害の促進、高血圧自然発症ラット（SHR）、WKYラットでは、血小板数の低下、血脂の上昇が認められている（5-7）。前述の、雄性SHRSPにおけるダイズ油含有飼料摂取群を対照とした8週間摂取実験では、カノーラ油摂取によって血漿中アルドステロン濃度の上昇に加え、糖負荷実験におけるインスリン感受性の低下（学会報告4）が認められたことから、カノーラ油摂取がラット、少なくとも雄性SHRSPにおいて、ステロイドホルモン代謝に影響を及ぼすこと、アルドステロンの上昇に伴うインスリン感受性の低下が、血管傷害の進行、腎機能障害の促進に関与する可能性が強く疑われる。アルドステロン濃度の上昇については、SHRSPのみならず、Wistarラットにおいても確認されている（8）。

カノーラ油または菜種に含有される物質の中に有害効果の原因物質があるとすれば、原料としてカノーラ油あるいは菜種産物を使用する製品の安全性については、カノーラ油の有害性と比較しながら評価、検討することが求められる。この観点から、本研究では、製品による有害効果の差異に注目した。今回は、精巣のプレグネノロン、アンドロステンジオンおよびテストステロン濃度を測定し、対照群と比

較して、いずれも上昇傾向があり、ヘルシーコレステ[®]群では有為な上昇が認められたが、この結果は、先行の8週間摂取実験結果とは異なる。今回の実験条件下で、ステロイドホルモン濃度に顕著な影響が認められなかった点については、これまでの検討での添加油脂量が10 w/w%であったことに対し、今回は通常の飼料に含まれる脂肪量を参考として油脂を7w/w%添加したため、その差が反映していることが考えられる。また、4週間の摂取期間は、本研究の目的とするホルモン代謝への影響の確認には短かった可能性もある。しかし、各トクホ製品摂取群で、プレグネノロン、アンドロステンジオンおよびテストステロン濃度のいずれもが対照群に比べ高値を示す傾向がみられ、一部には有意な差がみられたこと自体は、これらのトクホ摂取によって、ステロイド代謝に影響があることを示唆している。また、これまでの検討から、血圧、血液凝固系および血管平滑筋のNa⁺, K⁺-ATPase活性への影響が、油脂を混餌摂取させた場合の1日油脂摂取量に該当する油量を4週間強制経口投与した実験で確認されていること(9, 10)から、油脂摂取の影響が生体反応に反映されていると考える。油脂摂取の影響が経時的に変化する可能性を考えると、今後、摂取時間を変えて、各時点での影響を検討していくことが、ステロイドホルモン代謝に影響を及ぼす機序の解明に役立つかもしれない。

油脂摂取による有害効果を考える

とき、その原因物質として、油脂に含まれる脂肪酸または脂肪酸組成、植物ステロール、その他の微量物質の関与が考えられる。カノーラ油によるSHRSPの生存期間短縮については、油脂をリパーゼ処理し、そこに含まれる脂肪酸(組成)が生存期間に影響を及ぼすか否かを調べた研究があるが、それによると、SHRSPの生存期間短縮に脂肪酸組成の違いは関係がないことが示されている(11)。一方、ステロール代謝については、いくつかの植物油がSHRSPの生存期間に及ぼす影響を調べ、生存期間の短縮は、油脂中に含まれる植物ステロール量に左右されると結論している報告がある(2)。その報告は、SHRSPには遺伝的にステロール代謝異常があり、摂取した食餌中の植物ステロールが体内に蓄積され易いため、カノーラ油あるいはコーン油のような比較的植物ステロール含量の多い油を摂取すると、植物ステロールによる体内コレステロールの置換が容易に起こり、細胞膜が脆弱化することで、有害効果が顕われると結論している。2000年当時の厚生省も、この説を根拠にカノーラ油の安全性を認めた形になっているが、もともと植物ステロール量が少ないオリーブ油も雄SHRSPの生存日数を短縮すること(2)、植物ステロール量と生存日数の間に相関が認められないことが報告されていること(12, 13)から、カノーラ油の安全性を今一度慎重に評価する必要がある。

本研究では、トランス脂肪酸の関与

については触れていない。植物油精製あるいはトクホ製品の製造過程でトランス脂肪酸が生成する可能性があり、その安全性も考慮する必要があるが、その問題については、別の機会に検討したい。

E. 結論

「コレステロールが高めの方に適する」または「身体に脂肪がつきにくい」という表示が許可されたトクホ3製品、ヘルシーリセッタ[®]、ヘルシーコレステ[®]または健康サララ[®]を唯一の脂肪源として雄SHRSPに4週間与えた結果、精巢のプレグネノロン、アンドロステンジオンおよびテストステロンが、ダイズ油を与えた対照群より高値を示す傾向が見られた。これらの3製品は、今回の実験条件下では、ステロイドホルモン代謝に著しい影響を及ぼすことはなかったが、これらのトクホがステロイドホルモン代謝に影響を及ぼす可能性は除外できない。雄性SHRSPでは、カノーラ油摂取による生存期間短縮、昇圧促進、腎傷害促進などの有害効果に加え、血漿中および精巢中テストステロン濃度の低下と血漿中アルドステロン濃度の上昇が認められている。ヘルシーリセッタ[®]はカノーラ油を、ヘルシーコレステ[®]はカノーラ油由来の植物ステロールを含有する。カノーラ油またはカノーラ油由来の物質がステロイドホルモン代謝に影響を及ぼすか否かについては、今後、検討する必要がある。

(参考文献)

1. Okuyama H, Ohara N, Tatematsu K, Fuma S, Nonogaki T, Yamada K, Ichikawa Y, Miyazawa D, Yasui Y, Honma S. 2010. Testosterone-lowering activity of canola and hydrogenated soybean oil in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J Toxicol Sci.* 35(5): 743-747.
2. Ratnayake WM, L'Abbé MR, Mueller R, Hayward S, Plouffe L, Hollywood R, Trick K. 2000. Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* 130(5): 1166-1178.
3. Kau M-M, Lo M-J, Wang S-W, Tsai S-C, Chen J-J, Chiao Y-C, Yeh J-Y, Lin H, Shum A Y-C, Fang VS, Ho L-T, Wang PS. 1999. Inhibition of Aldosterone Production by Testosterone in Male Rats. *Metabolism* 48(9): 1108-1114.
4. Naito Y, Nagata T, Takano Y, Nagatsu T, Ohara N. 2003. Rapeseed oil ingestion and exacerbation of hypertension-related conditions in stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Toxicology* 187(2-3): 205-216.

5. Naito Y, Yoshida H, Nagata T, Tanaka A, Ono H, Ohara N. 2000. Dietary intake of rapeseed oil or soybean oil as the only fat nutrient in spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats - blood pressure and pathophysiology. *Toxicology* 146(2-3): 197-208.
6. Naito Y, Kasama K, Yoshida H, Ohara N. 2000. Thirteen-week dietary intake of rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat in Wistar Kyoto rats-change in blood pressure. *Food Chem Toxicol.* 38(9): 811-816.
7. Ohara N, Kasama K, Naito Y, Nagata T, Saito Y, Kuwagata M, Okuyama H. 2008. Different effects of 26-week dietary intake of rapeseed oil and soybean oil on plasma lipid levels, glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and cyclooxygenase-2 expression in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem Toxicol.* 46(7): 2573-2579.
8. Ohara N, Naito Y, Nagata T, Tachibana S, Okimoto M, Okuyama H. 2008. Dietary intake of rapeseed oil as the sole fat nutrient in Wistar rats -lack of increase in plasma lipids and renal lesions. *J Toxicol Sci.* 33(5): 641-645.
9. Naito Y, Konishi C, Katsumura H, Ohara N. 2000. Increase in blood pressure with enhanced Na⁺, K⁺-ATPase activity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats after 4-weeks intake of rapeseed oil as the sole dietary fat. *Pharmacol Toxicol.* 87(3): 144-148.
10. Naito Y, Konishi C, Ohara N. 2000. Blood coagulation and osmolar tolerance of erythrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats given rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat. *Toxicol Lett.* 116(3): 209-215.
11. Miyazaki M, Huang MZ, Takemura N, Watanabe S, Okuyama H. 1998. Free fatty acid fractions from some vegetable oils exhibit reduced survival time-shortening activity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipids.* 33 (7): 655-661.
12. Ohara N, Naito Y, Nagata T, Tatematsu K, Fuma SY, Tachibana S, Okuyama H. 2006. Exploration for unknown substances in rapeseed oil that shorten survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Effects of supercritical gas extraction fractions. *Food Chem Toxicol.* 44(7):952-963.

13. Tatematsu K, Fuma SY, Nagase T, Ichikawa Y, Fujii Y, Okuyama H. 2004. Factors other than phytosterols in some vegetable oils affect the survival of SHRSP rats. *Food Chem Toxicol.* 42(9):1443-1451.

F. 健康危険情報
(総括報告書記載事項)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1) 小野田早恵、内藤由紀子、立花滋博、河村さやか、大原直樹、吉川真衣、新美まどか、川口真帆、宮澤大介、安井裕子、山田和代、奥山治美. 菜種(カノーラ)油摂取が脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の病態悪化を促進する機序. 第 39 回日本毒性学会学術年会. 2012 年 7 月 17 日～19 日. 仙台, 要旨集 P121 (7 月 18 日).

2) 立花滋博、鈴木絵梨、西谷清華、斉藤義明、臼見憲司、永田伴子、内藤由紀子、大原直樹、宮澤大介、奥山治美: アラキドン酸摂取が脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の病態進行に及ぼす影響の検討、日本脂質栄養学会第 21 回大会、2012 年 9 月 7 日～8 日、相模原、*Journal of Lipid Nutrition* 21, No.2, 208

3) 河村さやか、内藤由紀子、立花滋博、

小野田早恵、大原直樹、吉川真衣、新美まどか、川口真帆、宮澤大介、安井裕子、山田和代、奥山治美. 植物油摂取が脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の生存日数に及ぼす影響 -カノーラ油による生存日数短縮とその背景 -. 日本薬学会フォーラム 2012 衛生薬学、環境トキシコロジー. 2012 年 10 月 25～26 日. 名古屋, 要旨集 166 (10 月 26 日).

4) Chihiro Amma, Mai Takamatsu, Mai Yoshikawa, Madoka Niimi, Maho Kawaguchi, Yukiko Naito, Shigehiro Tachibana, Naoki Ohara, Harumi Okuyama. Sex difference of the adverse effects induced by canola oil ingestion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). 第 86 回日本薬理学会年会. 2013 年 3 月 21～23 日. 博多、*JPS 121 Suppl.* 238PP3-105 (3 月 23 日).

Table 1 Steroid hormones in the testis of SHRSP

Group	Steroid hormones		
	Pregnenolone (ng/g)	Androstenedione (ng/g)	Testosterone (ng/g)
Control	22.7±2.74	11.2±3.01	100±33.2
HR	26.7±2.61	15.1±3.84	113±26.2
HC	30.5±2.03	12.7±2.52	108±19.8
KS	27.0±1.61	14.7±2.95	104±19.0

HR, Healthy Resetta® ; HC, Healthy Choleste® ; KS, Kenko Sarara®

Values are means ± SEM of 6 animals.

No differences in mean values were found between control group and any other group (One-way ANOVA and Dunnett's test).

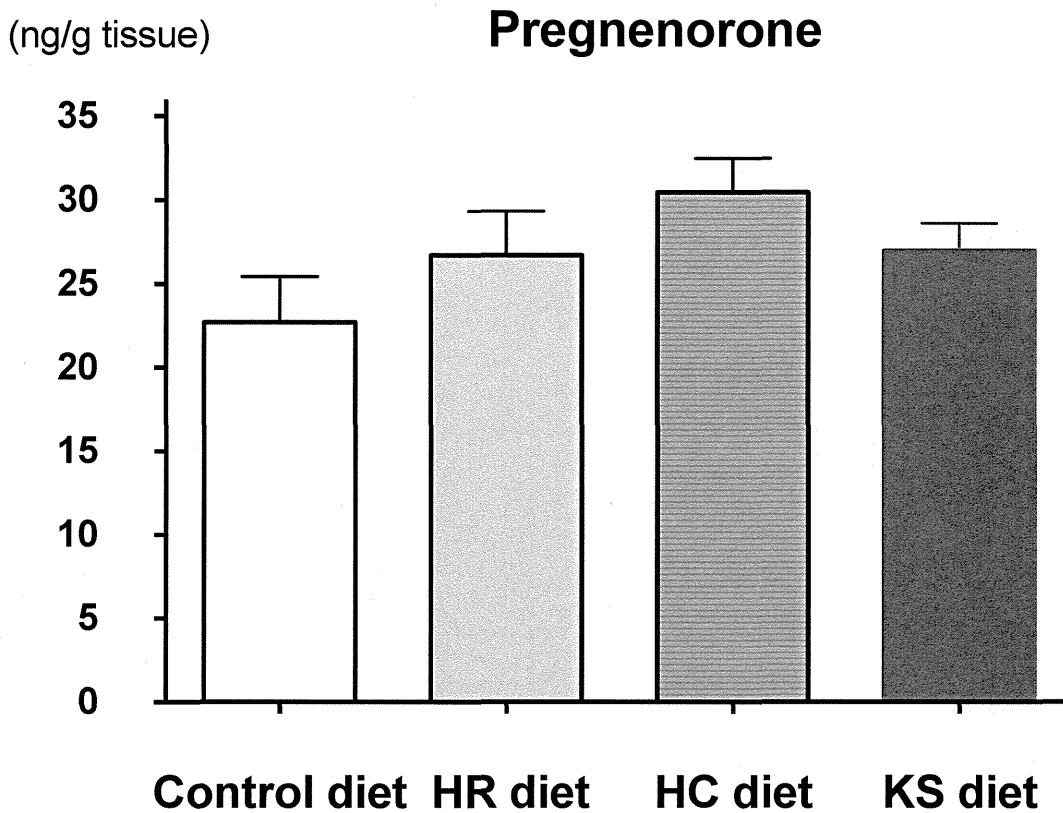


Figure 1 Pregnenorone concentrations in testicular tissue of SHRSP given diet containing soybean oil (Control diet), Healthy Resetta®, Healthy Choleste®, and Kenko Sarara® for 4 weeks.

HR, Healthy Resetta® ; HC, Healthy Choleste® ; KS, Kenko Sarara®

Values are means \pm SEM of 6 animals.

No differences in mean values were found between control group and any other group (One-way ANOVA followed by Dunnett's test).

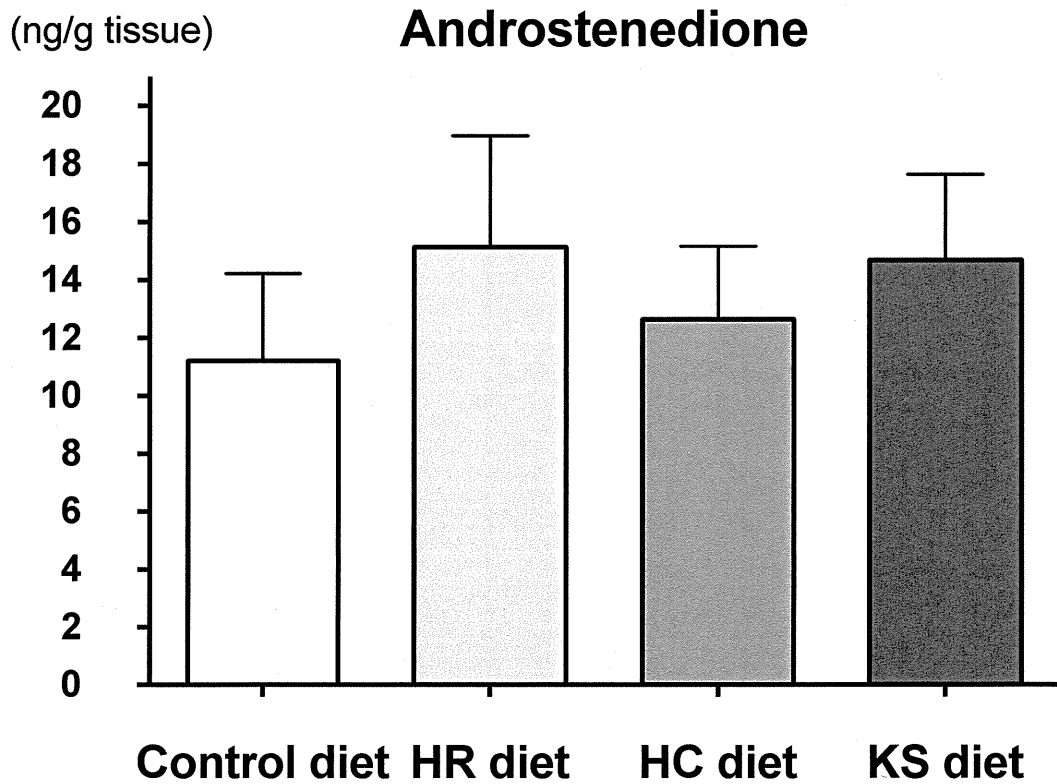


Figure 2 Androstenedione concentrations in testicular tissue of SHRSP given diet containing soybean oil (Control diet), Healthy Resetta®, Healthy Choleste®, and Kenko Sarara® for 4 weeks.

HR, Healthy Resetta® ; HC, Healthy Choleste® ; KS, Kenko Sarara®

Values are means ± SEM of 6 animals.

No differences in mean values were found between control group and any other group (One-way ANOVA followed by Dunnett's test).