

2021 年度 博士論文

キャノーラ油摂取と生活習慣病との関係に関する
脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)を用いた基礎的研究

金城学院大学大学院 人間生活学研究科
博士課程・後期課程 人間生活学専攻
1904002 西川 真衣

目 次

第 1 章	序章	4
1-1	緒言	4
第 2 章	CAN 毒性の性差	7
2-1	序論	7
2-2	方法	7
2-2-1	飼料	7
2-2-2	生存日数測定実験	7
2-2-2-1	動物飼育	7
2-2-2-2	症状観察と体重および摂食量の測定	10
2-2-2-3	血小板数の測定	10
2-2-2-4	病理学的検索	10
2-2-3	8 週間摂取実験	10
2-2-3-1	動物飼育	10
2-2-3-2	血圧および心拍数の測定	10
2-2-3-3	経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)	11
2-2-3-4	剖検, 血液生化学, ステロイドの測定	11
2-2-3-5	mRNA 発現の解析	11
2-2-3-6	血漿中レニンおよびアンジオテンシン II 濃度の測定	12
2-2-4	統計学的方法	12
2-3	結果	13
2-3-1	生存日数測定実験	13
2-3-1-1	BW と FC の推移	13
2-3-1-2	生存日数	13
2-3-1-3	血小板数	18
2-3-1-4	剖検	18
2-3-1-4-1	臓器重量と肉眼的観察所見	18
2-3-1-4-2	病理組織学的的所見	18
2-3-2	8 週間摂取実験	20
2-3-2-1	血圧および心拍数	20
2-3-2-2	OGTT	20

2-3-2-3	血漿中 Glu および脂質濃度	20
2-3-2-4	血漿中ステロイド濃度	25
2-3-2-5	レニン mRNA の発現	25
2-3-2-6	血漿中レニンおよびアンジオテンシン II 濃度	25
2-3-2-7	臓器重量と肉眼的観察所見	28
2-3-2-8	病理組織学的所見	28
2-4	考察	28
2-5	小括	35
第 3 章	CAN 摂取が性腺および副腎のステロイド生成に及ぼす影響	36
3-1	序論	36
3-2	方法	36
3-2-1	飼料	36
3-2-2	動物飼育	36
3-2-3	血液および組織サンプル	37
3-2-4	血漿中 FSH および LH の測定	37
3-2-5	血漿および精巣中のステロイドの測定	37
3-2-6	mRNA 発現の定量的解析	37
3-2-7	ウェスタンブロット法	38
3-2-8	ライディッヒ細胞の計数	38
3-2-9	統計的方法	39
3-3	結果	39
3-3-1	血漿中の FSH および LH	39
3-3-2	血漿および精巣中のステロイド濃度	39
3-3-3	性腺および副腎におけるステロイド代謝に関与するタンパク質の mRNA 発現	40
3-3-4	ステロイド代謝に関わるタンパク質の発現量	40
3-3-5	ライディッヒ細胞数	40
3-4	考察	40
3-5	小括	49
第 4 章	テストステロンがアルドステロン産生に与える影響	50
4-1	序論	50
4-2	方法	50

4-2-1	ZG 細胞の培養	50
4-2-2	H295R 細胞の培養	51
4-2-3	培地中アルドステロン濃度の測定	53
4-2-3	統計学的方法	53
4-3	結果	53
4-4	考察	53
4-5	小括	53
第 5 章	総合考察および結論	56
第 6 章	参考文献	58
謝辞		66

第1章 序章

1-1 緒言

菜種油(キャノーラ油, CAN), コーン油およびオリーブ油は, 調理や食品加工に広く用いられているが, これらの油を含む飼料を摂取させた雄性脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)では, 対照として大豆油(SOY)を含む飼料を与えた動物と比較して生存日数が大幅に減少することが知られている(1-5). この短命化の原因物質は未だに同定されておらず, 有害効果のメカニズムも解明されていないが, 上に挙げた食用植物油脂の中で CAN はその有害効果が比較的良く研究されており(6-11), CAN 含有飼料摂取による雄性 SHRSP の短命化には SHRSP の遺伝的病態(生活習慣病様症状)の増悪, すなわち, 血圧の上昇(6,7), 血漿中脂質の増大(8,9), 抗酸化酵素の阻害(10), 血管傷害の促進(3), 血小板数の減少(8)などが関連すると考えられている. 実際, CAN 含有飼料を8週間摂取させた雄性 SHRSP では, SOY 含有飼料を与えた対照群と比較して高血圧症および脳卒中発症の早期化が認められた(7).

一方, SHRSP に CAN 含有飼料を13週間与えると精巢のテストステロン産生が有意に抑制されることが報じられている(12). ヒトの男性における生活習慣病有病率はアンドロゲンによって影響を受けており, テストステロンレベルの低下は男性の生活習慣病の主要症候であるインスリン抵抗性, 中心性肥満, 脂質異常症, 高血圧症および心血管疾患などを引き起こし(13-14), 高齢男性の総死亡率を増すと報告されている(15). テストステロンレベルの低下と生活習慣病様症候の関係が齧歯類でも同様に観察されることと(16-18), SHRSP が実験用ラットの中でも生活習慣病に類似した症状を起こし易い系統であり, ヒトの生活習慣病のモデル動物としても使用されている(19-21)ことを考えると, CAN 含有飼料摂取によって認められるテストステロン産生の減少が雄性 SHRSP における生活習慣病様症候の早期発現や生存日数減少の一因になっている可能性がある. また, Wistar ラットでは10週間の CAN 含有飼料摂取によって血漿中アルドステロン濃度の増大が認められるので(22), SHRSP でも同様の影響がみられるとすれば, SHRSP における CAN 毒性の標的には, 性腺や副腎皮質など, ステロイドホルモンを産生する器官が含まれる可能性がある.

このように SHRSP における CAN 含有飼料摂取による有害事象は, 昇圧, インスリン抵抗性, 血管傷害およびステロイドホルモン代謝の異常など様々な病態との関連が推測されていたものの, 一貫した解析は為されなかったため, 毒性の標的器官は特定できておらず, テストステロン低下と病態変化の関連についても研究は進んでいなかった. また, これまでの研究は専ら雄性 SHRSP を用いて行われ, 性差の検討もされていなかった.

本研究では SHRSP における CAN の有害効果を毒性学的に解析するとともに有害効果の性差について初めて検討を加えた。第 2 章で述べるように、生存日数や生活習慣病で変化する幾つかのパラメータ(血圧, 血漿中脂質, 血小板数, インスリン感受性および臓器の病理組織学的所見など)への影響を比較し, CAN 毒性の性差およびステロイド産生への影響がみられた。このため, ステロイドホルモン産生系への影響を俯瞰する目的で, 第 3 章で述べるように, 血漿中のゴナドトロピンおよび幾つかのステロイドの濃度, 精巣組織中の性ホルモン濃度を測定した。また, 性腺と副腎のステロイド合成経路で働く StAR および幾つかの酵素の mRNA 発現に加え, mRNA 発現に有意な変化がみられた精巣では, それらがコードするタンパク質量を測定し, さらにライディッヒ細胞を計数した。得られた結果から, 精巣が CAN 毒性の標的であり, テストステロンの減少により副腎のアルドステロン産生が増し, 増大したアルドステロンが生活習慣病様症候を増悪すると考えられたため, 第 4 章で述べるように, ラット副腎皮質球状層細胞およびヒト副腎皮質細胞株を用い, アルドステロン産生に対するテストステロンの影響を両細胞で確認した。詳細は本論文で述べるとおりである。CAN 摂取が男性のテストステロンレベルを低下させるか否かは不明だが, CAN が我が国における代表的な汎用食用油であることを考慮すると, ヒトでの健康被害を避けるために, この有害効果を詳細に研究することには意義がある。

CAN 毒性の原因物質は同定されていないが, CAN 毒性の原因物質の候補としては, これまでにいくつかの物質が挙げられてきた。そもそも菜種油には心臓毒であるエルシン酸や甲状腺毒である glucosinolate が含まれ食用には適さなかったが, 1970 年代前半にカナダで開発されたキャノーラ菜種は低エルシン酸, 低 glucosinolate の品種で, 油は食用油, 油粕は家畜飼料として広く利用されている。1975 年, Minetoma ら(23)は, CAN 粕に含まれる glucosinolate の代謝物である isothiocyanate と oxazolidinethione が用量依存的に鶏の甲状腺腫を引き起こすことを確認した研究報告の中で, CAN 粕が glucosinolate の量とは無関係に肝臓出血を起こし, 死亡例がみられることを報じた。1996 年に Huang らも菜種中の含硫化合物である butyl, phenethyl そして allyl isothiocyanate が CAN 中に残留する濃度では SHRSP の生存日数に影響を及ぼさないことを報じた(1)。また, 食用油として販売されている精製油脂は成分のほぼすべてがトリアシルグリセロールなので, それらの脂肪酸組成と有害効果との関連が当然疑われたが, 1998 年, Miyazaki ら(3)はリパーゼ処理した CAN の脂肪酸画分を摂取させた SHRSP では生存日数の短縮が認められないことを報告した。2000 年に Ratnayake ら(5)は, 食用油脂の中では CAN が比較的多量の植物ステロールを含有することと SHRSP およびその由来系統のラットではこれらの系統に固有のステロール代謝能が原因となって食餌性ステロールが体内に蓄積しやすい事実に着目し(24),

「SHRSP の様に特異なステロール代謝系をもつ動物では、体内に蓄積した植物ステロールまたは植物ステロールによる体内コレステロールの置換が膜の脆弱化を引き起こし、それが出血性傷害を増悪する。」という“植物ステロール説”を提唱した。この“植物ステロール説”は説得力があるかに見えたが、植物ステロール含量が極めて少ないオリーブ油も CAN と同等の短命化を引き起こす事実に加え、飼料中植物ステロール量と生存日数との間には相関がないことが複数の報告によって示されたため(3, 8, 25)、植物ステロールが原因物質であるとは認識されなくなっている。最近になって、「油脂精製工程で生成するジヒドロ型ビタミン K1 またはその類似物質がビタミン K2 の作用を阻害することが CAN をはじめとする幾つかの油脂による SHRSP の短命化に関与する。」とする説も出たが(26)、これまでのところ、原因物質候補として CAN 毒性の研究に使用できる化合物は見つかっていない。したがって、本研究は CAN 毒性の原因物質候補の化合物を用いた有害効果の検討には至っていないが、CAN 毒性の特徴を詳細に調べることで得られる情報が原因物質同定の糸口となるとともに、CAN の安全な摂取量の提案に役立つと考えている。

第2章 CAN 毒性の性差

2-1 序論

生活習慣病の病因を性ホルモンの関与という観点から検討すると、テストステロンの役割には明らかな性差がある。例えば、男性ではアンドロゲン欠乏症が生活習慣病の素因であり、テストステロンを補充することで改善効果が得られる(18)。一方、閉経後の女性におけるテストステロンの増大は、生活習慣病の有病率の上昇と関連している(27)。CAN が生活習慣病の発症を促進する因子であるという視点でその毒性を理解するためには、CAN 摂取の影響における性差を調べるのが不可欠である。しかし、性差がみられる可能性があるにもかかわらず、CAN 摂取の影響に関するこれまでのほぼすべての研究は雄性動物を用いて行われ、雌性動物に対する影響に関する知見が報告されることはなかった。

本研究では、雌雄の SHRSP に CAN 含有飼料を摂取させ、生存日数だけでなく、生活習慣病で変化する幾つかのパラメータ(血圧、血漿中脂質、血小板数、インスリン感受性および臓器の病理組織学的所見など)に及ぼす影響を比較した。また、本研究によって、雄性 SHRSP における CAN 摂取による血漿中テストステロン濃度の減少が血漿中アルドステロン濃度の有意な増大を伴うことを初めて見出し、血漿中アルドステロン濃度の増大が CAN の有害効果にどのように関与するかについて考察した。

2-2 方法

2-2-1 飼料

10 wt/wt% (24.8 エネルギー%) の大豆油 (SOY) を添加した無脂肪 AIN-93G 粉末飼料と、SOY に代えて CAN を 10 wt/wt% 添加した同飼料を CLEA Japan (東京) から購入した。飼料の脂肪酸組成を Table 2-1 に示す。SOY および CAN は、日本植物油協会 (東京) から提供された。

2-2-2 生存日数測定実験

2-2-2-1 動物飼育

4 週齢の脳卒中易発症高血圧自然発症ラット SHRSP (Izm) 48 匹 (雌雄各 24 匹) を日本エスエルシー (静岡) より購入し、ウッドチップを敷いたプラスチックケージに 3 匹ずつ収容し、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50\pm 5\%$ 、照明 8:00-20:00 に環境制御された飼育室で 7 日間馴化させた。馴化後、動物を雌雄それぞれ 1 群 12 匹の 2 群に分けて個別飼育した。各群の動物には、SOY 含有飼料 (対照) または CAN 含有飼料と水道水を自由に摂取させた。飼料は週に 2 回、新しいものと交換した。SOY 含有飼料摂取群を対照群とした根拠は以下のとおりである；

① SHRSF を用いて油脂摂取の影響を調べた研究のほぼすべてが SOY 含有飼料摂取群を対照群としている。② 市販の標準的な齧歯類飼料中の脂肪が主に SOY である、③ 雄性 SHRSF に、幾つかの油脂をそれぞれ唯一の脂肪源として含む飼料のいずれかを与えたとき、SOY 含有飼料を与えた動物の生存日数が中庸である(1)。なお、本論文では対照である SOY 含有飼料をそのまま SOY 含有飼料と表記した。

SHRSF の生存日数を比較したこれまでのほとんどの研究では、血圧上昇を促進するために飲料水に 1%NaCl を添加しているが、本研究では生理的により正常な状態で比較するため水道水を与えた。

本研究の動物実験は、金城学院大学実験動物倫理委員会による実験計画の評価、承認を経て実施した。

Table 2-1 Fatty acid compositions (%) of diets.

Fatty acids		SOY	CAN
14 : 0	Myristic acid	0.14	0.22
16 : 0	Palmitic acid	9.01	4.37
16 : 1	Palmitoleic acid	0.07	0.21
18 : 0	Stearic acid	4.38	1.93
18 : 1	Oleic acid	23.64	63.67
18 : 2 n-6	Linoleic acid	54.50	19.56
18 : 3 n-3	Linolenic acid	7.23	8.00
20 : 0	Arachidic acid	0.39	0.59
20 : 1	Eicosenoic acid	0.20	1.15
22 : 0	Behenic acid	0.45	0.32
n-6 / n-3		7.54	2.45
Total fatty acids (g/100 g diet)		9.88	9.22

SOY, 10 w/w% soybean oil diet (control); CAN, 10 w/w% canola oil diet.

2-2-2-2 症状観察と体重および摂食量の測定

投与開始前日およびその後毎週 1 回、動物の体重(BW)を測定した。摂餌量(FC)も毎週 1 回測定した。すべての動物の全身状態を少なくとも 1 日 1 回観察した。

以下の所見を脳卒中の徴候とし、重度の行動障害、全身衰弱あるいは摂食障害などが認められた場合は安楽死させた。

眼球突出、易刺激性、多動、過敏、運動障害、振戦、痙攣、四肢麻痺および突然死(28,29)

2-2-2-3 血小板数の測定

摂取第 8 週に雌雄すべての動物から、第 16 週には雌動物から尾静脈穿刺によって少量の血液を得、血液 10 μ L 中の血小板数を血球計数器(MEK-5208, 日本光電工業, 東京)で測定した。なお、第 16 週の雄動物からの採血は、その時点で既に CAN 含有飼料摂取群の平均体重(BW)が減少し、1 匹が死亡していたため実施しなかった。

2-2-2-4 病理学的検索

死亡動物は発見された時点で、安楽死させた動物は死亡直後に剖検した。脳、心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上部、卵巣および子宮を摘出して重量を測定した後、肉眼的に観察した。その後、10%ホルマリンを含む 0.1 mol/L リン酸緩衝液中で臓器を固定した。なお、自己融解が激しく、病理検査に適さない臓器は観察を省略した。固定した臓器や組織はパラフィンに包埋し、薄切してプレパラート標本を作製した後、ヘマトキシリン・エオジン染色して鏡検した。

2-2-3 8 週間摂取実験

2-2-3-1 動物飼育

4 週齢の SHRSP (Izm) 40 匹(雌雄各 20 匹)を日本エスエルシー(静岡)より購入し、7 日間馴化させた。馴化後、雌雄それぞれを 1 群 10 匹の 2 群に分け、SOY 含有飼料(対照)または CAN 含有飼料と水道水を自由摂取させて 8 週間飼育した。前述の生存日数を測定した実験と同様の環境で飼育したが、この実験では 1 ケージに 2-3 匹の動物を収容した。

2-2-3-2 血圧および心拍数の測定

摂取第 8 週にテール・カフを用い、すべての動物の尾動脈圧の変化からプレチスモグラフ(MK-2000ST, 東京・室町)で血圧と心拍数を測定した。

2-2-3-3 経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)

摂取第 8 週に 18 時間絶食させた後、経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)を行った。糖負荷前の血漿中グルコース(Glu)濃度を測定するために尾静脈から少量の血液を採取した後、3 g/kg の Glu を経口投与し、続いて投与後 150 分まで 30 分毎に採血した。血漿中 Glu 濃度は、血液サンプル 1 滴を用い、Glu からグルコノラクトンへの酸化を検出するクーロメトリック検出器、FreeStyle Freedom Lite™(ニプロ、大阪)で測定した。残りの血液サンプルは室温で 30 分放置した後、1,200×g で 30 分間遠心して得られた血清中のインスリン濃度を ELISA キット(Ultra Sensitive Rat Insulin kit™, 森永生物科学研究所, 横浜)を用いて測定した。

2-2-3-4 剖検, 血液生化学, ステロイドの測定

摂取期間終了後、剖検前 18 時間動物を絶食させ、続いてセボフルラン(富士フィルム和光純薬, 大阪)吸入で麻酔した後、腹部を正中切開した。抗凝固剤としてヘパリンナトリウム(ナカライテスク, 京都)を用いて後大静脈から採血し、血液を 150×g, 4°C で 15 分間遠心した。得られた血漿サンプルは使用するまで -80°C で保存した。採血後、臓器を摘出して重量を測定し、肉眼的に観察した。各群 6 匹の左腎臓は RNA 抽出に用いるため液体窒素中で凍結し、-80°C で保存した。その他の臓器は 10%ホルマリンを含む 0.1 mol/L リン酸緩衝液中で固定し、パラフィンに包埋した後薄切してプレパラート標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色して鏡検した。

血漿中 Glu, 遊離脂肪酸(FFA), トリグリセリド(TG), 総コレステロール(TCh)および遊離コレステロール(FCh)濃度は市販のキット, Glucose C-II test™, NEFA C-test™, Triglyceride E-test™, Cholesterol E-test™ および Free cholesterol E-test™ (フジフィルム和光純薬, 大阪)を用いてそれぞれ測定した。

血漿中ステロイド濃度の測定は高木らの方法で行った(30)。概略を示すと ; 2H-または 13C-標識ステロイドを内部標準物質として血漿に添加した後、ステロイドをジエチルエーテルで抽出した。続いてこの抽出物を InertSep pharma カラム(GL sciences, 東京)を用いて精製し、ピコリン酸エステルで誘導体化した。得られた誘導体を InertSep SI カラム(GL Sciences)に入れ、溶出した画分を Nexera UHPLC システム(島津製作所, 京都)と API4000 質量分析計(George, Framingham, MA, USA)で構成される液体クロマトグラフィー-質量分析/質量分析装置(LC/MS/MS)に注入した。使用した標準物質は以下の通りである : テストステロン-13C3 およびアルドステロン-d7(IsoSciences, King of Prussia, PA, USA)。

2-2-3-5 mRNA 発現の解析

凍結した腎皮質組織を Trizol™ 試薬(Thermo Fisher Scientific, 東京)中でホモジナイズし、

クロロホルムで抽出した totalRNA をクロロホルム-イソプロパノールで相分離させて、精製 totalRNA を得た。TotalRNA の濃度は、Ultra-micro spectrophotometer NanoDrop™1000 (Thermo Fisher Scientific)を用い、260 nm の吸光度を測定して求めた。2 µg の total RNA を High Capacity RNA-to-cDNA™ kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて cDNA に逆転写した。得られた cDNA 溶液を希釈(1 : 2)し、EagleTaq universal MMX™ (Roche Diagnostics, 東京)と標的遺伝子のプローブ/プライマーキットである TaqMan Assay™ (Thermo Fisher Scientific)を用いて解析した。使用した TaqMan Assay™ は次の通りである：グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH), Rn01775763_g1; レニン Rn00561847_m (Thermo Fisher Scientific)。リアルタイム PCR は、7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, 東京)を用いて、順に 95°C で 10 分間、95°C で 15 秒間および 60°C で 1 分間の保持時間で 40 サイクル増幅するプログラムで行った。発現量は $\Delta\Delta CT$ 法で算出した。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼの発現量に対する各 mRNA の相対発現量を雌雄および 2 つの飼料を与えた群間で比較した。

2-2-3-6 血漿中レニンおよびアンジオテンシン II 濃度の測定

血漿中のレニンおよびアンジオテンシン II 濃度は、それぞれ Rat Renin-1 ELISA キット (Raybiotech-Cosmo Bio, Tokyo ; 検出範囲 27.4-20,000 pg/mL) および Angiotensin II ELISA キット (Enzo Life Sciences-Cosmo Bio, 東京 ; 検出範囲 3.9-10,000 pg/mL) を用いてトリプレケートで測定した。測定手順はそれぞれのキットの説明書に従った。

2-2-4 統計学的方法

病理学的所見の発生頻度の性差あるいは飼料間差は Fisher の正確確率検定で評価した (Table 5)。発生頻度以外の結果はすべて平均値±標準誤差で示した。雌雄間および飼料間での変数の違いは、性および飼料を因子とした two way ANOVA によって評価した。因子間の相互作用が有意な場合あるいは群間差を確認する際には Tukey の多重比較を行った。さらに、雌雄どちらかの性における異なる摂取飼料群の平均値の差は unpaired *t*-test で比較した。いずれの場合も平均値の差は $p < 0.05$ を以って有意とした。これらの統計解析には Prism 9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, USA) を使用した。

2-3 結果

2-3-1 生存日数測定実験

2-3-1-1 BW と FC の推移

BW の変化を Fig. 2-1 に示す. 各時点で two way ANOVA を行った. 雄は雌よりも一貫して BW が大きかった. 摂取第 70 日から 308 日まで, CAN 含有飼料を与えた動物の BW は性別に関係なく SOY 含有飼料を与えた動物の BW よりも有意に小さかった. 雄では第 70 日, 77 日および 238 日から 308 日にかけて, CAN 含有飼料を与えた動物の BW が SOY 含有飼料を与えた動物の BW よりも有意な低値を示した (Tukey's test および unpaired *t*-test). また, 雌雄それぞれにおいて飼料間には有意差が散見された (unpaired *t*-test). この飼料間の差は, 雌雄いずれにおいても徐々に大きくなり, 雄で特に顕著であった. 第 315 日以降, CAN 含有飼料群では雄が少数しか生存していなかったため統計解析を行わなかった. 雄では第 168 日以降, 雌では第 350 日以降, 与えた飼料にかかわらず, 脳卒中発症個体の増加に伴って BW がバラついた.

FC の変化を Fig. 2-2 に示す. FC も一貫して雄の方が雌よりも多かった. 第 133 日までは, CAN 含有飼料を与えた動物の FC が SOY 含有飼料を与えた動物の FC よりも多い傾向があり, その差は第 14 日, 21 日, 28 日, 49 日, 112 日および 133 日において有意であった (two way ANOVA). 第 140 日以降は, 脳卒中を発症した動物が増えるにつれて FC のバラつきが増した. 第 252 日, 280 日, 294 日および 301 日に CAN 含有飼料を与えた動物の FC が SOY 含有飼料を与えた動物の FC よりも有意に少なくなったことを除いては, 異なる飼料を与えた動物の間に FC の差はみられなかった (two way ANOVA). また, 雄では CAN 含有飼料群の FC が SOY 含有飼料群よりも 第 203 日, 259 日および 301 日において有意に減少した (Tukey's test). 雌雄いずれにおいても FC には散発的な飼料間の有意差が認められた (unpaired *t*-test).

2-3-1-2 生存日数

Fig. 2-3 に示すように, 雄における生存曲線は飼料間で有意に異なっていた (Wilcoxon 検定, log-rank 検定). 一方, 雌の生存曲線は, 摂取期間初期すなわち CAN 含有飼料群の雄で 4 例目の死亡が認められるまでの期間 (それ以降 CAN 含有飼料群の雌雄で差が認められなくなる) を除いて, 雄における生存曲線で認められるような飼料間差はみられなかった. 雌の曲線には Wilcoxon 検定では 2 群間で有意差が認められたが, log-rank 検定では認められなかった. 平均生存日数には有意な性差 (雌 > 雄) が認められた. また, SOY 含有飼料を与えた動物と CAN 含有飼料を与えた動物の平均生存日数は有意に異なっていた (SOY > CAN) (two way ANOVA). 雄では CAN 含有飼料群の平均生存日数が SOY 含有飼料群の平均生存

日数よりも有意に減少した。一方、雌の生存日数には飼料間差がなかった (Tukey's test および unpaired *t*-test)。CAN 含有飼料を与えた雄が脳卒中関連症状を呈するまでの平均日数は 128 ± 15 日で、SOY 含有飼料を与えた雄の 214 ± 21 日よりも有意に短かった (unpaired *t*-test)。

しかし、雌では SOY 含有飼料を与えた群で脳卒中関連症状がみられるまでの平均日数が 296 ± 13 日であったのに対し、CAN 含有飼料を与えた群では 249 ± 24 日となり、両者の間に有意な差はなかった (unpaired *t*-test)。また、SOY 含有飼料群の平均生存日数は雄で 393 ± 14 日、雌では 401 ± 18 日となり、差は認められなかった (unpaired *t*-test)。しかし、CAN 含有飼料を与えた動物の雌雄で比較すると、雄では 274 ± 21 日、雌では 349 ± 24 日であり、有意な差が認められた (unpaired *t*-test)。

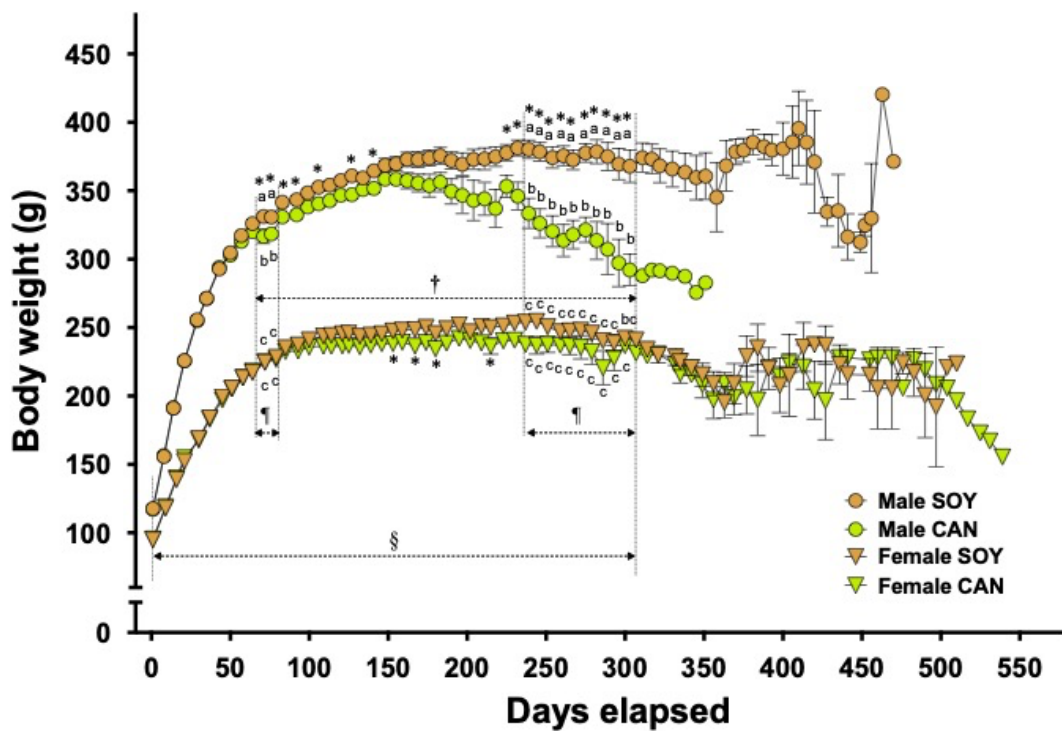


Fig. 2-1 Body weight gain in SHRSP during the survival experiment.

Twelve animals of each sex were assigned to the group fed 10% soybean oil diet (SOY, control) or 10% canola oil diet (CAN).

Symbols with bars represent means with S.E.M.

§ and †, Significantly different between sexes and between the 2 different diets, respectively ($p < 0.05$, two way ANOVA).

¶, Interaction exists between the factors, sexes and diets ($p < 0.05$, two way ANOVA). Identical alphabetical letters indicate the absence of significant differences between the groups ($p > 0.05$, Tukey's test).

*, Significantly different from the SOY group in both sexes ($p < 0.05$, unpaired t -test).

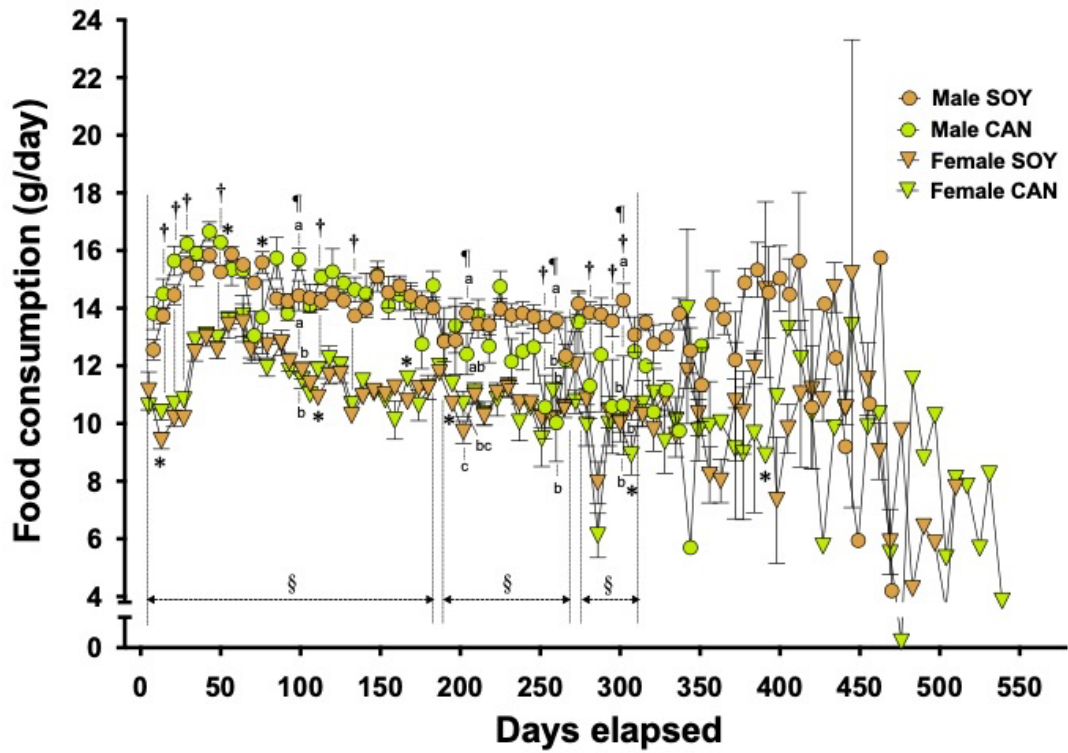


Fig. 2-2 Food consumption in SHRSP during the survival experiment.

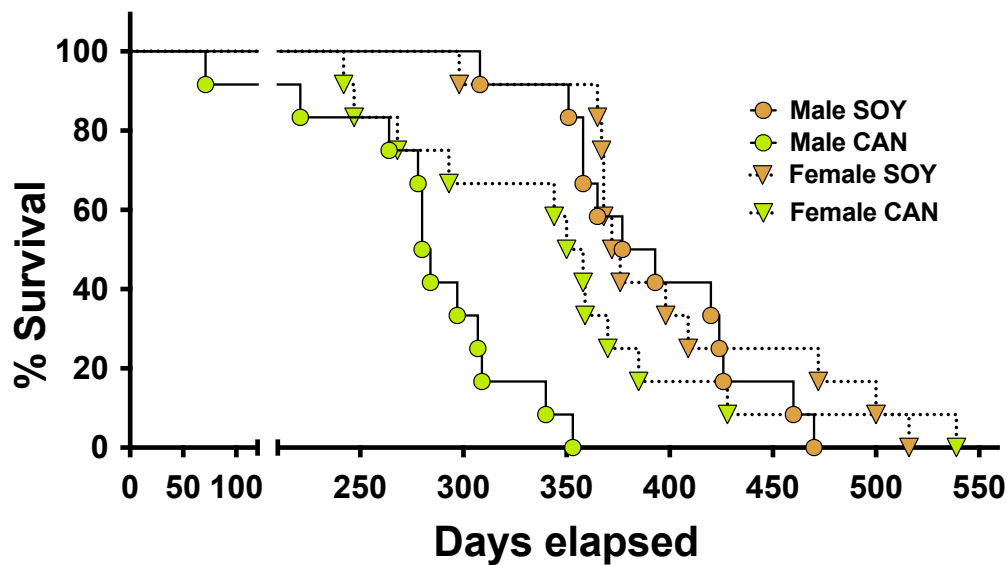
Twelve animals of each sex were assigned to the group fed 10% soybean oil diet (SOY, control) or 10% canola oil diet (CAN).

Symbols with bars represent means with S.E.M.

§ and †, Significantly different between sexes and between the 2 different diets, respectively ($p < 0.05$, two way ANOVA).

¶, Interaction exists between the factors, sexes and diets ($p < 0.05$, two way ANOVA). Identical alphabetical letters indicate the absence of significant differences between the groups ($p > 0.05$, Tukey's test).

*, Significantly different from the SOY group in both sexes ($p < 0.05$, unpaired t -test).



Survival curves	Male	SOY > CAN	$p < 0.0001$ (Wilcoxon test),	$p < 0.0001$ (Log-rank test)
	Female	SOY \geq CAN	$p < 0.05$ (Wilcoxon test),	n.s. (Log-rank test)
Mean survival (days)	Male		Male vs Female SOY vs CAN	$p < 0.05$ $p < 0.05$ (two way ANOVA)
	SOY	393 ± 14^a		
	CAN	$274 \pm 21^{b,*}$	$349 \pm 24^{a,\#}$	

Fig. 2-3 Survival curves of SHRSF fed 10% soybean oil diet or 10% canola oil diet.

Twelve animals of each sex were assigned to the group given 10% soybean oil diet (SOY, control) or 10% canola oil diet (CAN).

The survival curves in the males in the SOY group and in the CAN group were significantly different (Wilcoxon and log-rank tests). The curves in the females were evaluated significantly different between the 2 dietary groups by Wilcoxon test but not by log-rank test. The mean survival time was significantly different between sexes, female > male, and between the animals given the 2 different diets, SOY > CAN (two way ANOVA). Identical alphabetical letters indicate the absence of significant differences between the groups ($p > 0.05$, Tukey's test). *, Significantly different from the SOY group in the males ($p < 0.05$, unpaired t -test).

#, Significantly different from the male animals given CAN diet ($p < 0.05$, unpaired t -test).

2-3-1-3 血小板数

Fig. 2-4 は摂取第 8 週の血小板数を示す。血小板数には有意な性差はなかったが、飼料間（雌雄にかかわらず SOY 含有飼料を与えた動物と CAN 含有飼料を与えた動物群間）で有意な差が認められた (two way ANOVA)。雄では CAN 含有飼料群の血小板数が SOY 含有飼料群の血小板数よりも有意に少なかった (Tukey's test および unpaired *t*-test)。一方、雌の血小板数には飼料間差がみられなかった。雌の第 16 週の血小板数は、SOY 含有飼料群で $51.2 \pm 1.8 \times 10^4 / \mu\text{L}$ 、CAN 含有飼料群では $55.3 \pm 2.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$ であり、飼料間差は認められなかった (unpaired *t*-test)。

2-3-1-4 剖検

2-3-1-4-1 臓器重量と肉眼的観察所見

雄における心臓、肺、肝臓および腎臓の絶対重量は、それぞれ雌に比べ有意に重かった。また、脳、脾臓、腎臓および副腎の相対重量が雌よりも雄で有意に重かった。絶対重量、相対重量ともに、与えた飼料に起因するとみられる有意な差はみられなかった (two way ANOVA, データは示さず)。卵巣の絶対重量を除いて、絶対重量および相対重量ともに、雌雄いずれにおいても飼料間で差は認められなかった (unpaired *t*-test)。CAN 含有飼料群の卵巣重量 $77.6 \pm 4.7 \text{ mg}$ は、SOY 含有飼料群の $59.8 \pm 5.6 \text{ mg}$ よりも有意に大きかったが、相対重量は SOY 含有飼料群で $0.41 \pm 0.04 \text{ mg/g}$ 、CAN 含有飼料群で $0.46 \pm 0.04 \text{ mg/g}$ であり、差は認められなかった (unpaired *t*-test)。ほとんどの動物で、脳出血、心肥大、肺と肝臓の鬱血、腎組織の線維化がみられたが、いずれの頻度にも飼料間差は認められなかった (Fisher の正確確率検定, データは示さず)。

2-3-1-4-2 病理組織学的所見

肉眼的観察でみられた脳出血が組織の鏡検でも確認された。脳では脳室拡張、血栓および浮腫が認められた。心筋の肥大と線維化がすべての動物で認められた。また、冠動脈硬化や動脈壁の肥厚を伴う慢性腎症もほぼすべての動物にみられた。いずれの臓器における異常所見の頻度にも、性差あるいは飼料間差は認められなかった (Fisher の正確確率検定, データは示さず)。

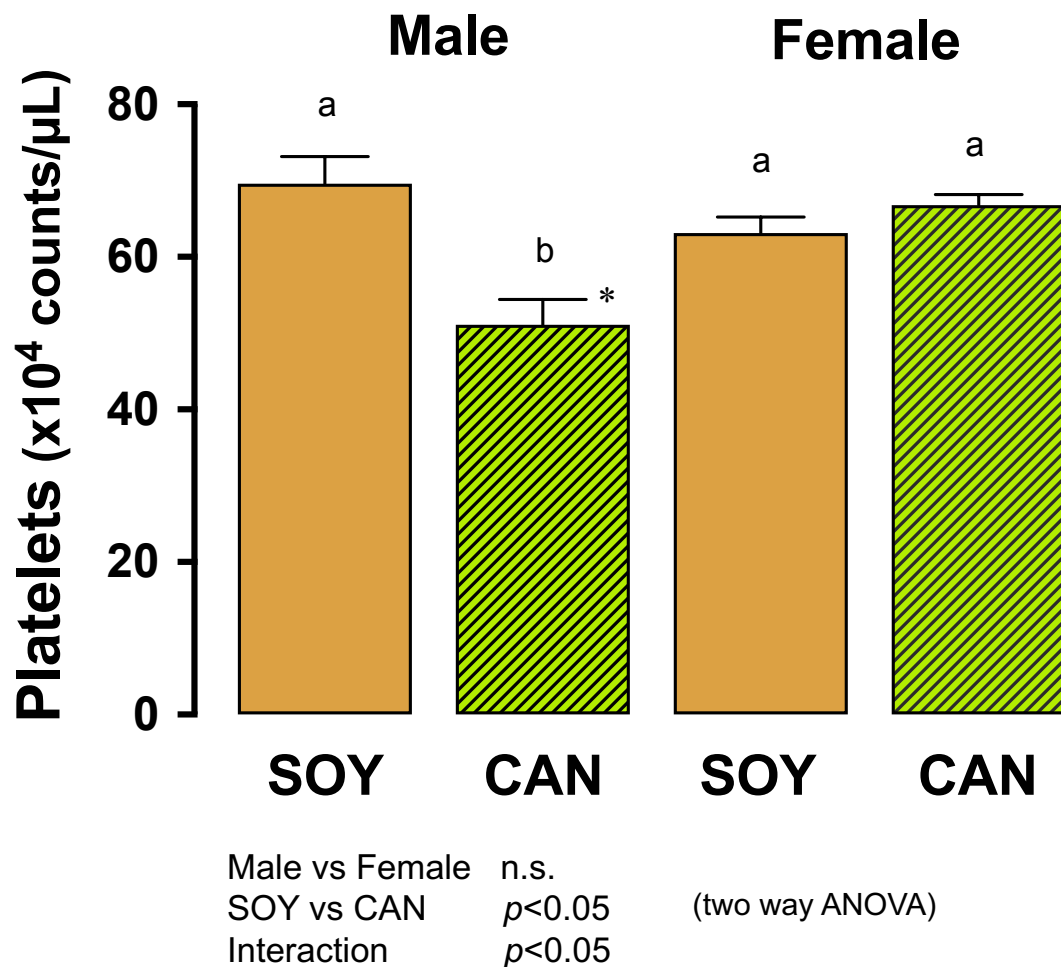


Fig. 2-4 Platelet count in SHRSP fed 10% soybean oil diet (SOY, control) or 10% canola oil diet (CAN).

At the 8th week of feeding during the survival experiment, platelet count was determined.

Columns with bars represent means with S.E.M. of 12 animals. Platelet count was similar in both sexes but was significantly different between the animals given the 2 different diets ($p < 0.05$, two way ANOVA). Platelet count in the males in the CAN group was significantly lower than any other group. Identical alphabetical letters indicate the absence of significant differences between the groups ($p > 0.05$, Tukey's test).

*, Significantly different from the SOY group in the males ($p < 0.05$, unpaired t -test).

2-3-2 8週間摂取実験

2-3-2-1 血圧および心拍数

血圧および心拍数の変化を Table 2-2 に示す。血圧には性差と飼料間差が認められた (two way ANOVA)。血圧は雌よりも雄で有意に高かった。Two way ANOVA における有意な飼料間差は、CAN 含有飼料によって雄の血圧が著しく上昇したことを反映していた。収縮期血圧、拡張期血圧および心拍数は、SOY 含有飼料群に比べて CAN 含有飼料群で有意に上昇した (Tukey's test および unpaired *t*-test)。一方、雌の血圧および心拍数には飼料間で差が認められなかった。

2-3-2-2 OGTT

血漿中 Glu および血清中インスリン濃度の時間経過を、それぞれの曲線下面積 (AUC) の棒グラフとともに Fig. 2-5 に示す。Glu 経口投与後 150 分間の血糖値推移には有意な性差が認められた。雄の血漿中 Glu 濃度は雌のそれよりも常に高かった。Glu 負荷後 30 分、60 分および 90 分における CAN 含有飼料を与えた動物の血漿中 Glu 濃度は、SOY 含有飼料を与えた動物のそれと有意に異なっており、CAN 含有飼料は血漿中 Glu 濃度を増大させた (two way ANOVA, Fig. 2-5A)。特に雄では CAN 含有飼料群の血漿中 Glu 濃度が顕著に増大し、30、60、90 および 150 分後に SOY 含有飼料群よりも有意な高値を示した (Tukey's test および unpaired *t*-test)。雌では CAN 含有飼料群の血漿中 Glu 濃度が負荷後 30 分で SOY 含有飼料群よりも有意に高かったが、その差はごくわずかであった (unpaired *t*-test)。血漿中 Glu 濃度変化の AUC は雌雄間および飼料間で有意に異なっていた (two way ANOVA, Fig. 2-5C)。雄では CAN 含有飼料群の AUC が SOY 含有飼料群の AUC よりも大きかった。一方、雌では与えた飼料にかかわらず AUC は同程度であった (Tukey's test および unpaired *t*-test, Fig. 2-5C)。

Glu 負荷後 120 分までの血清インスリン濃度にも有意な性差がみられた。雄のインスリン濃度は一貫して雌のそれよりも高かった。一方、2 種類の飼料を与えた動物のインスリン濃度は、性別に関係なく同程度であった (two way ANOVA, Fig. 2-5B)。インスリン濃度変化の AUC にも性差はみられたが AUC に飼料間差は認められなかった (two way ANOVA, Fig. 2-5D)。雌雄いずれにおいても AUC には飼料間の有意差が認められなかった。

2-3-2-3 血漿中 Glu および脂質濃度

剖検時の血漿中 Glu と脂質の濃度を Table 2-3 に示す。FFA を除くすべてのパラメータが有意な性差を示した (two way ANOVA)。雄の Glu 濃度は雌のそれよりも高かった。TCh, FCh および TG の濃度は、雌の方が雄よりも高かった。これら 3 つの脂質は、2 つの異なる

飼料を与えた動物の間で有意に異なっていた (two way ANOVA). 雌雄それぞれで CAN 含有飼料群の TCh, FCh および TG 濃度は, SOY 含有飼料群のそれよりも有意に高かった (Tukey's test および unpaired *t*-test).

Table 2-2 Blood pressure and heart rate in SHRSP of both sexes given SOY diet or CAN diet for 8 weeks.

Parameters	Male		Female	
	SOY	CAN	SOY	CAN
Systolic BP ^{§, †, ¶} (mmHg)	230 ± 5 ^b	267 ± 7 ^{a,*}	209 ± 4 ^c	207 ± 4 ^c
Diastolic BP ^{§, †, ¶} (mmHg)	168 ± 7 ^b	197 ± 6 ^{a,*}	152 ± 4 ^b	148 ± 4 ^b
Heart rate [¶] (beats/min)	470 ± 11 ^b	501 ± 7 ^{a,*}	488 ± 5 ^{ab}	473 ± 7 ^b

SOY, 10 w/w% soybean oil diet (control); CAN, 10 w/w% canola oil diet. BP, blood pressure. Values are means ± SEMs of 10 animals. § and †, Significantly different between sexes and between diets, respectively ($p < 0.05$, two way ANOVA). ¶, Interaction exists between the factors, sexes and diets ($p < 0.05$, two way ANOVA). Identical uppercase letters (above SEM) indicate the absence of significant differences between the groups ($p > 0.05$, Tukey's test). *, Significantly different from the SOY group in both sexes ($p < 0.05$, unpaired t -test).

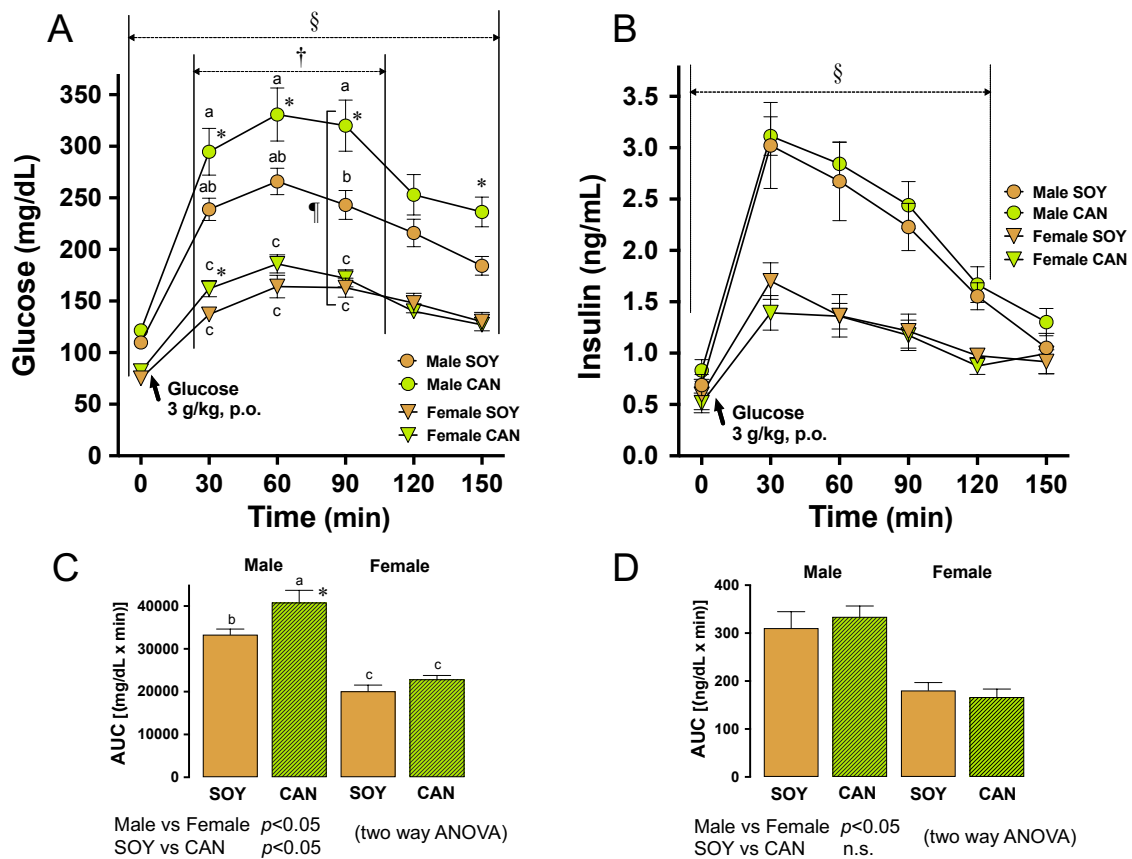


Fig. 2-5 Oral glucose tolerance test (OGTT) in SHRSP fed 10% soybean oil diet (SOY, control) or 10% canola oil diet (CAN) for 8 weeks.

Symbols or columns with bars represent means with S.E.M. of 10 animals.

A. Time course of plasma Glu, B. Time course of serum insulin; § and †, Significantly different between sexes and between the 2 different diets, respectively ($p < 0.05$, two way ANOVA). ¶, Interaction exists between the factors, sexes and diets ($p < 0.05$, two way ANOVA). Identical alphabetical letters indicate the absence of significant differences between the groups ($p > 0.05$, Tukey's test). *, Significantly different from the SOY group in both sexes ($p < 0.05$, unpaired t -test).

C. AUCs for the curves of Glu levels; The AUCs were significantly different between sexes and between the 2 diets given (two way ANOVA). Identical alphabetical letters indicate the absence of significant differences between the groups ($p > 0.05$, Tukey's test). *, Significantly different from the SOY group in the males (unpaired t -test).

D. AUCs for the curves of insulin levels.; The AUCs were significantly different between sexes but not different between the 2 different diets (two way ANOVA). Identical alphabetical letters indicate the absence of significant differences between the groups ($p > 0.05$, Tukey's test).

Table 2-3 Plasma glucose and lipid concentrations in SHRSP of both sexes given SOY diet or CAN diet for 8 weeks.

Parameters	Male		Female	
	SOY	CAN	SOY	CAN
Glucose [§] (mg/dL)	144 ± 4.7 ^{ab}	155 ± 2.7 ^a	135 ± 4.0 ^b	137 ± 1.9 ^b
Total cholesterol ^{§, †} (mg/dL)	56.0 ± 7.1 ^b	76.2 ± 5.3 ^{ab,*}	64.9 ± 4.1 ^b	92.0 ± 4.0 ^{a,*}
Free cholesterol ^{§, †} (mg/dL)	8.28 ± 0.7 ^d	15.1 ± 0.9 ^{c,*}	18.1 ± 0.7 ^b	22.9 ± 0.5 ^{a,*}
Triglyceride ^{§, †} (mg/dL) (mg/dL)	67.7 ± 3.3 ^c	107 ± 8.6 ^{b,*}	123 ± 8.8 ^{ab}	148 ± 5.9 ^{a,*}
Free fatty acids (mEq/L)	1.05 ± 0.1	0.97 ± 0.1	0.89 ± 0.1	0.90 ± 0.1

SOY, 10 w/w% soybean oil diet (control); CAN, 10 w/w% canola oil diet.

Values are means ± S.E.M. of 10 animals.

[§] and [†], Significantly different between sexes and between diets, respectively ($p < 0.05$, two way ANOVA). Identical uppercase letters (above S.E.M.) indicate the absence of significant differences between the groups ($p > 0.05$, Tukey's test).

^{*}, Significantly different from the SOY group in both sexes ($p < 0.05$, unpaired t -test).

2-3-2-4 血漿中ステロイド濃度

Fig. 2-6 A に示すように、血漿中テストステロン濃度には性差が認められ、SOY あるいは CAN を含有した飼料を与えた動物間でも有意に異なっていた。テストステロン濃度は、雌よりも雄の方が有意に高く、雌雄を問わず CAN 含有飼料によって減少した (two way ANOVA)。雄の CAN 含有飼料群のテストステロン濃度、 $1,302 \pm 143$ pg/mL は SOY 含有飼料群の $3,034 \pm 530$ pg/mL よりも有意に低かった (Tukey's test および unpaired *t*-test)。雌でも CAN 含有飼料群のテストステロン濃度、 62.7 ± 8.7 pg/mL が SOY 含有飼料群の 128.4 ± 24.7 pg/mL よりも低かった (unpaired *t*-test)。雌の CAN 含有飼料群の血漿中エストラジオール濃度が 4.2 ± 0.9 pg/mL と SOY 含有飼料群の 17.8 ± 5.6 pg/mL に比べて有意に低かったことは、CAN 含有飼料による雌の血漿中テストステロン濃度減少を反映していると考えられる (unpaired *t*-test, Fig. 2-6 B)。血漿中アルドステロン濃度には性差がなかったが、2 種類の食餌を与えた動物間では有意に異なっていた。CAN 含有飼料を与えた動物は SOY 含有飼料を与えた動物に比べて、血漿中アルドステロン濃度が有意に増大した (two way ANOVA)。雄の CAN 含有飼料群の血漿中アルドステロン濃度は 464.1 ± 107.8 pg/mL で、SOY 含有飼料群の 151.2 ± 27.9 pg/mL と比較して有意に高かった (約 3 倍)。一方、雌の血漿中アルドステロン濃度は CAN 含有飼料摂取によってわずかに増大したものの (352.0 ± 66.3 pg/mL)、SOY 含有飼料を与えた群 (304.3 ± 41.0 pg/mL) との間に有意な差はなかった (Tukey's test および unpaired *t*-test, Fig. 2-6 C)。

2-3-2-5 レニン mRNA の発現

腎臓におけるレニン mRNA の発現を Fig. 2-7 A に示す。レニン mRNA 発現には有意な性差がみられ、SOY または CAN 含有飼料を与えた動物間でも有意に異なっていた (two way ANOVA)。雄では CAN 含有飼料群における発現量が SOY 含有飼料群のそれよりも有意に大きかった (Tukey's test および unpaired *t*-test)。一方、雌では飼料間で差が認められなかった (Tukey's test および unpaired *t*-test)。

2-3-2-6 血漿中レニンおよびアンジオテンシン II 濃度

血漿中レニンおよびアンジオテンシン II 濃度をそれぞれ Fig. 2-7 B と C に示す。血漿中レニン濃度には有意な性差があったが、SOY または CAN 含有飼料を与えた動物間では差がなかった (two way ANOVA)。雄では CAN 含有飼料群の血漿中レニン濃度、 624.6 ± 34.8 pg/mL が SOY 含有飼料群の 439.6 ± 16.5 pg/mL よりも有意に高かった (Tukey's test および unpaired *t*-test)。雌では CAN 含有飼料群の血漿中レニン濃度、 193.2 ± 45.6 pg/mL が SOY 含有飼料群の 305.6 ± 77.6 pg/mL に比べて強い抑制傾向にあった (Tukey's test)。また、血漿中アンジオテンシン II 濃度にも有意な性差と SOY または CAN 含有飼料を与えた動物間での有意差が認められた (two way ANOVA)。雄では、CAN 含有飼料群の血漿中アンジオテンシン II 濃度、 65.33 ± 5.23 pg/mL が SOY 含有飼料群の血漿中アンジオテンシン II 濃度、 48.9 ± 3.42 pg/mL

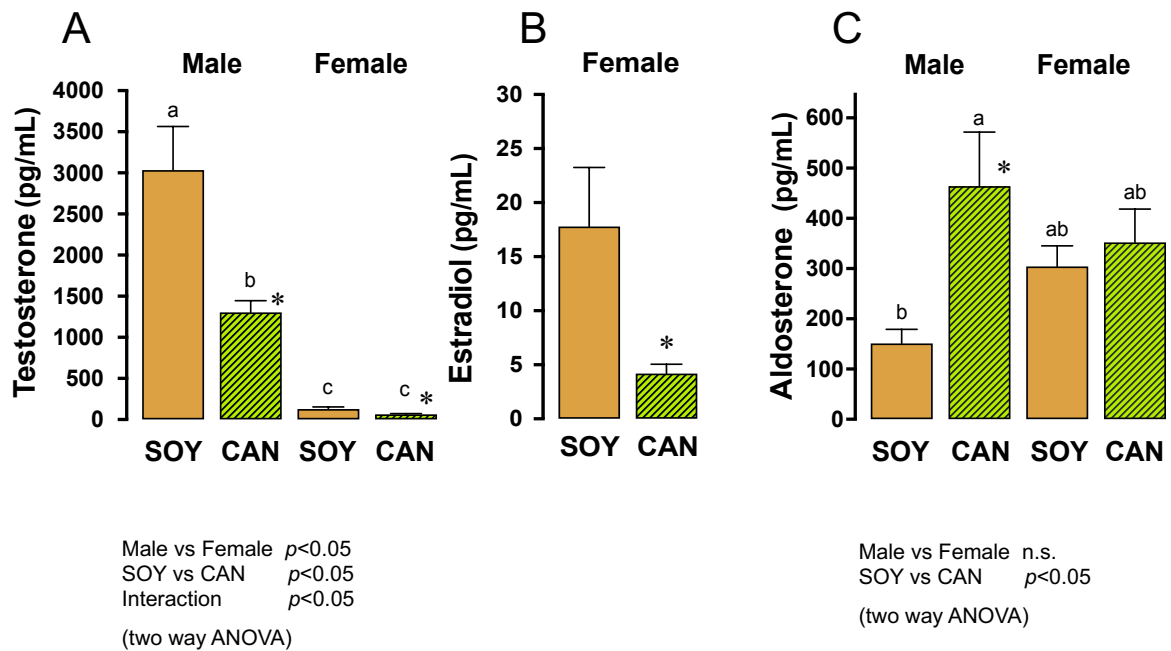


Fig. 2-6 Plasma testosterone, estradiol and aldosterone levels in SHRSP fed 10% soybean oil diet (SOY, control) or 10% canola oil diet (CAN) for 8 weeks.

Columns with bars represent the means with S.E.M. of 6 animals.

A. Plasma testosterone concentration was significantly different between sexes and between the 2 different diets ($p < 0.05$, two way ANOVA). Identical alphabetical letters indicate the absence of significant differences between the groups ($p > 0.05$, Tukey's test).

*, significantly different from the SOY group in both sexes ($p < 0.05$, unpaired t -test).

Testosterone level in the males in the CAN group was significantly lower than in the SOY group (unpaired t -test). In the females, testosterone level in the CAN group was also significantly lower than in the SOY group (unpaired t -test).

B. In the females, the CAN diet-induced decrease in testosterone was associated with a significantly lower estradiol level in the CAN group than in the SOY group (unpaired t -test).

C. Aldosterone level was not different between sexes but significantly different between the 2 different diets (two way ANOVA). In the males, the aldosterone level in the CAN group was significantly higher than in the SOY group (Tukey's test and unpaired t -test). Aldosterone concentrations in the females did not show difference between the 2 different diets.

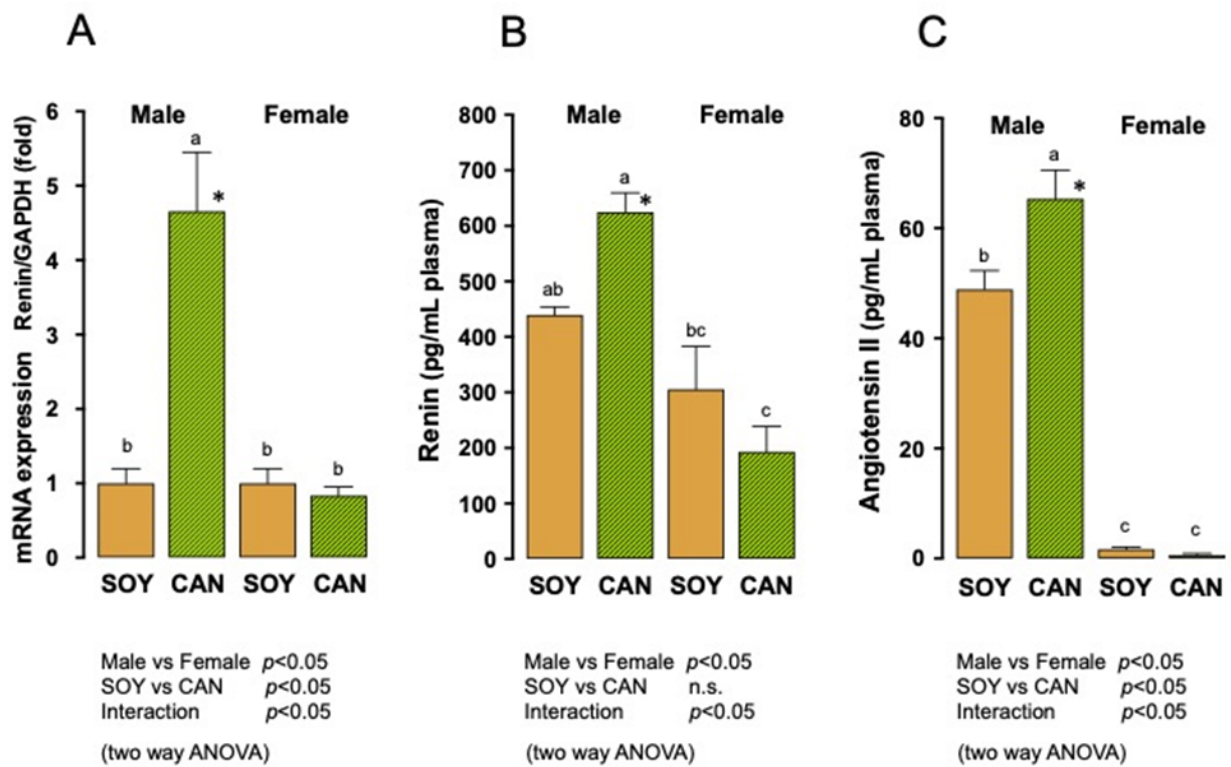


Fig. 2-7 Expression of mRNA for renin in the kidney and plasma concentrations of renin and angiotensin II in SHRSF fed 10% soybean oil diet (SOY, control) or 10% canola oil diet (CAN) for 8 weeks.

Columns with bars represent the means with S.E.M. of 6 animals. Identical alphabetical letters indicate the absence of significant differences between the groups ($p > 0.05$, Tukey's test).

*, significantly different from the SOY group in both sexes ($p < 0.05$, unpaired t -test).

A. Expression of mRNA for renin/that for GAPDH was significantly different between sexes and between the 2 different diets ($p < 0.05$, two way ANOVA). The gene expression for renin in the males in the CAN group was significantly greater than in any other group (Tukey's test). In the males, the gene expression in the CAN group was greater than in the SOY group (unpaired t -test).

B. Plasma renin concentration was significantly different between sexes but not between the 2 different diets (two way ANOVA). In the males, plasma renin level in the CAN group was significantly greater than in the SOY group (Tukey's test and unpaired t -test). In the females, plasma renin level in the CAN group was significantly less than in the SOY group (Tukey's test).

C. Plasma angiotensin II concentration was significantly different between sexes and between the 2 different diets (two way ANOVA). In the males, plasma angiotensin II concentration in the CAN group was significantly greater than in the SOY group (Tukey's test and unpaired t -test).

よりも有意に高かった (Tukey's test および unpaired *t*-test). 一方, 雌では CAN 含有飼料群の血漿中アンジオテンシン II 濃度, 0.61 ± 0.27 pg/mL と SOY 含有飼料群の 1.66 ± 0.42 pg/mL に差は認められなかった.

2-3-2-7 臓器重量と肉眼的観察所見

臓器の絶対重量および相対重量を Table 2-4 に示す. 脳, 心臓, 肺, 脾臓, 肝臓および腎臓の絶対重量には有意な性差があり, 雄の方が雌よりも重かった (two way ANOVA). また, 脳, 心臓, 肝臓, 腎臓および副腎の相対重量にも有意な性差があった. 雄の心臓と腎臓の相対重量は雌よりも重く, 脳, 肝臓および副腎の相対重量は雌よりも軽かった (two way ANOVA). 心臓, 肝臓, 腎臓の相対重量は, SOY 含有飼料を与えた動物と CAN 含有飼料を与えた動物との間で有意差があり, CAN 含有飼料を与えた動物の方が重かった (two way ANOVA). 雄では CAN 含有飼料群で心臓と腎臓の相対重量が有意に重かった (Tukey's test および unpaired *t*-test). 雌では CAN 含有飼料群における肝臓の相対重量が有意に重かった (Tukey's test および unpaired *t*-test). 心臓の絶対重量は僅かだが有意に減少し (unpaired *t*-test), 肝臓の絶対重量は CAN 含有飼料によって増大した (unpaired *t*-test). 子宮重量は絶対値, 相対値ともに CAN 含有飼料群で減少した (unpaired *t*-test).

2-3-2-8 病理組織学的所見

雄ではほとんどの臓器で組織学的な異常が観察された. しかし, 異常所見の頻度は CAN 含有飼料群で精巣上体管内腔の細胞片が増加したことを除き, 2つの飼料間で有意な差は認められなかった (Table 2-5). 一方, 雌では肝臓と腎臓以外の臓器で異常所見はみられなかった. 雌の肝臓では SOY 含有飼料群の 1 例に小肉芽種がみられ, SOY 含有飼料群の 7 例と CAN 含有飼料群の 2 例で門脈周囲の脂肪変性がみられた. 腎臓では SOY 含有飼料群の 1 例で糸球体変性が, CAN 含有飼料群の 2 例で好塩基性尿細管が認められた. 心筋の傷害は雌に比べ雄で高頻度にみられる傾向があった. 性差は SOY 含有飼料を与えた動物よりも CAN 含有飼料を与えた動物においてより顕著であった.

2-4 考察

本研究では, CAN 含有飼料摂取が雌雄 SHRSP の病態生理に及ぼす影響を初めて検討した. 雄では 8 週間の CAN 含有飼料摂取が血圧および心拍数の上昇, インスリン抵抗性, 血小板数減少, 腎臓および心臓の傷害あるいは病理学的な異常, 血漿中テストステロン濃度の減少とそれに伴う血漿中アルドステロンの mRNA, 腎臓におけるレニン mRNA の発現と血漿中レニンおよびアンジオテンシン II 濃度の mRNA など, 多くの有害事象を引き起こした. これらの所見は, 生活習慣病様症候の増悪とその結果として起こる短命化に関連していると考えられる. 一方, CAN 含有飼料を与えた雌では, 血漿中テストステロン濃度の減少を

Table 2-4 Absolute and relative organ weights in SHRSP of both sexes given SOY or CAN diet for 8 weeks.

Organs		Male				Female			
		SOY		CAN		SOY		CAN	
Brain	Absolute weight (g) [§]	1.97	± 0.02	1.96	± 0.02	1.92	± 0.01	1.92	± 0.0
	Relative weight (mg/g) [§]	7.17	± 0.25	7.76	± 0.40	10.8	± 0.16	11.4	± 0.2
Heart	Absolute weight (g) [§]	1.48	± 0.04	1.52	± 0.04	0.78	± 0.01	0.74	± 0.0
	Relative weight (mg/g) ^{§,†,¶}	5.24	± 0.16 ^b	5.97	± 0.11 ^{a,*}	4.34	± 0.09 ^c	4.38	± 0.0
Lung	Absolute weight (g) [§]	1.34	± 0.20	1.06	± 0.06	0.85	± 0.01	0.85	± 0.0
	Relative weight (mg/g)	4.91	± 0.79	4.07	± 0.08	4.77	± 0.09	5.03	± 0.0
Spleen	Absolute weight (g) [§]	0.62	± 0.02	0.62	± 0.02	0.43	± 0.02	0.41	± 0.0
	Relative weight (mg/g)	2.24	± 0.06	2.41	± 0.09	2.41	± 0.07	2.45	± 0.0
Liver	Absolute weight (g) ^{§,¶}	8.03	± 0.12 ^a	7.95	± 0.21 ^a	5.19	± 0.08 ^b	5.66	± 0.1
	Relative weight (mg/g) ^{§,†}	28.4	± 0.31 ^c	31.2	± 0.47 ^b	29.2	± 0.17 ^c	33.5	± 0.6
Kidneys	Absolute weight (g) [§]	2.36	± 0.04	2.30	± 0.04	1.31	± 0.02	1.29	± 0.0
	Relative weight (mg/g) ^{§,†}	8.34	± 0.09 ^b	9.08	± 0.25 ^{a,*}	7.33	± 0.06 ^c	7.66	± 0.1
Adrenal glands	Absolute weight (mg)	48.9	± 2.57	55.0	± 2.78	51.3	± 1.13	49.4	± 0.9
	Relative weight (mg/g) [§]	0.17	± 0.01	0.21	± 0.02	0.29	± 0.01	0.29	± 0.0
Testes	Absolute weight (g)	2.98	± 0.04	2.86	± 0.08	-		-	
	Relative weight (mg/g)	10.6	± 0.21	11.3	± 0.34	-		-	
Epididymides	Absolute weight (g)	0.98	± 0.02	0.93	± 0.03	-		-	
	Relative weight (mg/g)	3.49	± 0.09	3.64	± 0.06	-		-	
Ovaries	Absolute weight (mg)	-		-		66.2	± 1.68	68.5	± 2.3
	Relative weight (mg/g)	-		-		0.30	± 0.01	0.29	± 0.0
Uterus	Absolute weight (g)	-		-		0.39	± 0.04	0.29	± 0.0
	Relative weight (mg/g)	-		-		2.20	± 0.20	1.71	± 0.0

SOY, 10 w/w% soybean oil diet (control); CAN, 10 w/w% canola oil diet. Values are means ± SEMs of 10 animals.

§ and †, Significantly different between sexes and between diets, respectively ($p < 0.05$, two way ANOVA). ¶, Interaction exists between the factors, sexes and diets ($p < 0.05$, two way ANOVA). Identical uppercase letters (above SEM) indicate the absence of significant differences between the groups ($p > 0.05$, Tukey's test). *, Significantly different from the SOY group in both sexes ($p < 0.05$, unpaired t -test).

Table 2-5 Microscopic findings in SHRSP of both sexes given SOY or CAN diet for 8 weeks.

Organs	Findings	Male		Female	
		SOY	CAN	SOY	CAN
Brain	Infarction or laminar necrosis of cortex	2	3	0	0
	Glial reaction, microglia or astroglia	1	1	0	0
	Degeneration of corpus callosum	1	0	0	0
	Petechial hemorrhaging	4	0	0	0
Heart	Myocardium degeneration	3	7	0	0 [#]
	Perisclerosis of arterioles	5	9	0 [‡]	0 [#]
	Thrombosis in arterioles	3	7	0	0 [#]
Lung	Alveolar hemorrhage/congestion	3	3	0	0
	Macrophage infiltration	2	1	0	0
Liver	Centrilobular single cell necrosis	5	7	0 [‡]	0 [#]
	Microgranuloma	5	6	1	0 [#]
	Periportal fatty change	6	3	7	2
	Perisclerosis of arterioles	0	3	0	0
Kidney	Basophilic tubule	10	10	0 [‡]	2
	Hyalin cast	5	9	0 [‡]	0 [#]
	Glomerular degeneration	9	10	1 [‡]	0 [#]
Spleen	White pulp atrophy	1	2	0	0
	Arterial wall thickening	6	7	0 [‡]	0 [#]
Testis	Lymphocyte perivascular infiltration	0	3	-	-
	Seminiferous tubule atrophy	0	1	-	-
	Leydig cell atrophy	0	1	-	-
Epididymis	Cell debris in lumen	0	5 [*]	-	-
Uterus	Squamous cell metaplasia	-	-	1	0

SOY, 10 w/w% soybean oil diet (control); CAN, 10 w/w% canola oil diet.

Values are means ± S.E.M. of 10 animals.

[‡], Significantly different from the male animals given SOY diet.

[#], Significantly different from the male animals given CAN diet.

^{*}, Significantly different from the SOY group in the male animals ($p < 0.05$, Fisher's exact probability test).

除いて、上述の有害事象はみられず、有意な短命化もみられなかった。これらの結果は、SHRSPにおけるCANの副作用や毒性に性差があることを示している。

CAN含有飼料摂取動物では脳卒中の症状が最初に現れた時点、雄では第60日、雌では第80日頃からBW増加が抑制された。その後は雌雄いずれにおいても、CAN含有飼料群のBWがSOY含有飼料群よりも一貫して低かった。CAN含有飼料群の雄のBWは経日的に減少し、摂取第238日から308日の間SOY含有飼料群のBWよりも有意な低値を示した。このようなBWの減少は、高血圧症を含む生活習慣病様症候が加齢に伴って顕著になったためと考えられる。一方、CAN含有飼料を与えた雌では、このように明らかなBWの減少はみられなかった。これらの結果から、CAN含有飼料は雌雄を問わずSHRSPで何らかの有害効果を引き起こすが、それは雄においてより顕著であることが明らかになった。摂取期間の始めの数週間のFCについては、CAN含有飼料の摂取量がSOY含有飼料のそれよりも多くなる傾向がみられた。このような傾向は雌雄ともにみられたが、雄においてより明確であった。雄マウスにCAN含有飼料を与えると、SOY含有飼料を与えた場合に比べて、運動活性(歩行および立ち上がり回数、ホイールケージ・パフォーマンス)の増加、高架式十字迷路における移動時間の短縮および痛覚閾値の低下が認められたことが報告されている(31)。本研究でもハンドリングの際にCAN含有飼料を与えた動物でSOY含有飼料を与えた動物よりも強い不穏および易刺激性が見受けられた(データは示さず)。SHRやSHRSPは多動性を示すことが知られており(32,33)、SHRSPは注意欠陥・多動性障害のモデル動物として用いられている(34,35)ことから、運動量の増加による粉末飼料こぼしがCAN含有飼料摂取動物における見かけのFC増加に繋がったと考えられる。初期の数週間にCAN含有飼料摂取動物で認められた見かけのFC増加とそれに伴うBW増加の抑制は雌雄に共通していた。このような変化は、多動性を促進するCANの有害作用を反映している可能性はあるが、短命化に繋がるSHRSP固有の疾患の悪化とは直接関係がないかもしれない。

これまでに報告された研究報告で、CAN含有飼料を4週間摂取した雄性SHRSPの収縮期血圧はSOY含有飼料を摂取した動物よりも有意に高くなることが報告されている(7)。本研究でもCAN含有飼料摂取による雄性SHRSPの血圧上昇が確認された。この血圧上昇は、反射性徐脈ではなく頻脈を伴っていたことから、CANがもつ何らかの交感神経刺激作用が示唆された。CANを4週間経口投与した雄性SHRSPの摘出灌流腸間膜血管床におけるノルアドレナリン収縮がSOYを与えた動物の標本における反応と比較して抑制される傾向にあること(6)、CAN含有飼料を26週間摂取させたSHRでは、SOY含有飼料を摂取させた対照動物と比較して、摘出灌流腸間膜血管床のノルアドレナリン収縮が有意に抑制されること(37)を考慮すると、(ここでは末梢のカテコラミン濃度は測定しておらず、アドレナリン受容体を介したシグナル伝達の活性化も確認していないが、)少なくとも雄のSHRSPにおいては、CAN摂取により交感神経が刺激され、その結果、末梢血管系でアドレナリン反応のダウンレギュレーションが起こっていた可能性がある。したがって、後述するようにCAN含有飼料を摂取した動物でみられる血中アルドステロン濃度のmRNAが交感神経興

奮を引き起こすことが CAN 毒性の機序と考えられる。

OGTT で、血清中インスリン濃度の時間-濃度曲線は雌雄を問わず 2 つの飼料間で同じであったが、CAN 含有飼料群の雄動物の血漿中 Glu 濃度は SOY 含有飼料群のそれよりも一貫して高かった。また、雌においても CAN 含有飼料を与えた動物の血漿中 Glu 濃度が SOY 含有飼料を与えた動物のそれよりも高い傾向にあったが、有意な差はなかった。これらの結果から、CAN による末梢の Glu 取り込みの抑制は、雌雄に共通してみられるが、顕著な抑制は雄でのみ認められることが示唆された。精巣摘出ラットにおけるインスリン受容体数の減少と Glu 輸送の阻害がテストステロンの補充によって回復することが報告されている (38)。さらに、テストステロンは、ラットの新生児の骨格筋での Glut-4 の発現を増し、心筋細胞において Glut-4 を介した Glu の取り込みを増大させることが報告されている (39, 40)。したがって、CAN 含有飼料摂取によるテストステロンの減少が、雄性 SHRSP のインスリン抵抗性をもたらしたと考えられる。雌の動物においても、CAN 含有飼料は血漿中テストステロン濃度を減少させ、それに伴って血漿中エストラジオール濃度が減少した。しかし、これらの性ホルモンの変化は血漿中 Glu 濃度の明らかな変化を伴わなかった。エストロゲンがラット末梢器官の Glu 取り込みにどのような影響を与えるかについては定説がないが (41-45)、CAN による性ホルモンの減少は雌の SHRSP の末梢器官の Glu 取り込みにほとんど影響を与えなかった。

これまでに、WKY (36, 37, 46)、SHR (36) および SHRSP (8) の雄動物における CAN 摂取による血小板数減少が報告されている。また、血小板数減少は CAN を含む人工乳を与えた仔豚でも報告されている (47-49)。Kramer ら (47) は、血小板数の減少が出血時間の延長を伴うことを報告し、その原因として、菜種油や CAN に含まれるエルシン酸の脂肪酸伸長酵素による代謝物であるネルボン酸を挙げた。彼らは雌雄の仔豚を使用した。結果の雌雄差には触れていない。本研究では、CAN 含有飼料摂取による血小板数の有意な減少が SHRSP において確認されたが、それは雄の動物に限られていた。本研究ではネルボン酸を測定しておらず、エルカ酸から合成されるネルボン酸が雄の SHRSP 血小板減少に関連するかどうかは不明である。一方、Tomita ら (50) は、SHRSP の血小板からのセロトニン脱顆粒が正常血圧の WKY と比較して雌雄を問わず年齢および血圧に依存して促進すること、そして高血圧が長く続くほど血小板の活性化が強くなることを示している。また、雄性 SHRSP を脳卒中の有無で比較すると、高血圧状態では血小板数が減少し、脱顆粒が増加することが報告されている (51)。本研究では SOY 含有飼料群と比較して CAN 含有飼料群で高血圧症の悪化が認められたのは雄であり、雌では 2 つの飼料群で同等の血圧であった。したがって、CAN 含有飼料摂取による雄の血小板数の減少は、高血圧の悪化により傷害を受けた末梢血管における血小板の活性化と消費の増大に起因するものと考えられる。

生存日数測定実験における剖検では、ほぼすべての動物で、脳では出血、血栓および浮腫が、心臓では肥大、心筋線維化および動脈硬化が、腎臓では慢性腎症が認められ、SHRSP に固有の高血圧関連合併症で死亡したことが示唆された。さらに、SHRSP がもつ遺伝性疾患

に関連するもの以外の異常所見は認められず、臓器重量や病理学的異常の発生率には、雌雄を問わず、飼料間差が認められなかった。これらの結果から、CAN 含有飼料を与えた動物に特有の病理学的異常はみられないが、CAN 含有飼料は SHRSP の遺伝性疾患、すなわち高血圧症を含む生活習慣病様の病態を、特に雄動物において悪化させることが裏付けられた。

8 週間摂取試験において、腎臓の病理学的検査では、雄動物に好塩基性尿細管、硝子様円柱、糸球体変性が認められたが、各所見の頻度は 2 つの飼料群で同程度であった。この知見から、雄性 SHRSP では腎組織の傷害そのものがその系統特有の遺伝性疾患の進行過程で加齢に伴いどの個体にも起こる必然的な病態であると考えられた。また、腎傷害は雄動物においてみられる CAN 含有飼料摂取による短命化とは必ずしも直接の関連性がないと考えられる。その理由は、摂取第 8 週の時点で SOY 含有飼料を与えた雄動物に顕著な腎傷害が認められ、傷害の程度が CAN 含有飼料を与えた雄動物と同等だったのとは対照的に SOY 含有飼料を与えた雌動物では腎臓に何ら異常が認められなかったにもかかわらず、これらの動物の生存日数には性差が認められなかったからである。生存日数測定実験における自然死または安楽死後の腎臓相対重量が 2 つの飼料間で同程度であったことを考慮すると、CAN 含有飼料群の雄における腎臓相対重量が SOY 含有飼料群のそれよりも大きかった背景には CAN 含有飼料餌によって高血圧症が増悪した(発症が早まった)ことが関与していると考えられる(自然死または安楽死後の腎臓は極限まで変性しているが、摂取第 8 週では変性が進行する過程にあり、血圧変化の影響を反映している可能性がある)。CAN 含有飼料群の雄の心臓では、SOY 含有飼料群に比べ、動脈内の血栓や硬化、心筋の変性の頻度が増す傾向がみられた。これらの所見は、心臓の相対重量が有意に大きいことと合わせて、CAN 含有飼料群の雄における昇圧による有害効果によると考えられる。これらの病理学的所見を総合すると、血圧の上昇が短命化の原因と考えられる。実際、8 週間摂取試験では、CAN 含有飼料群の雌の心臓の絶対重量は、SOY 含有飼料群に比べてわずかながら有意に減少した。これは CAN 含有飼料群の雌の血圧と心拍数が SOY 含有飼料群よりも低い傾向にあることと関係があると推測される。また、SOY 含有飼料群と比較して CAN 含有飼料群の子宮重量の絶対値および相対値が減少したのは、CAN 含有飼料群の血漿中エストロジオール濃度が低かったことを反映していると考えられる。本研究では発情周期を同期させなかったため、発情周期のバラつきによる影響も考えられる。CAN 含有飼料群の雄では、精細管内腔の細胞層の増加が唯一の異常所見であった。テストステロン濃度の有意な減少と併せ、精巣は CAN 毒性の少なくともひとつの標的臓器であることが示唆された。

雄性 SHRSP に CAN 含有飼料を 8 週間摂取させると血漿中脂質 ; TCh, FCh, TG, FFA およびリン脂質に増大傾向が認められたという報告や(8)、5 日間摂取させると血漿中 TCh と LDLC が増大したという報告がある(10)。SHRSP 以外の系統の雄ラットでも、CAN 含有飼料による血症中脂質増大が 13 週間摂取させた WKY ラットで(36)、26 週間摂取させた WKY ラットおよび SHR で(37,52)報告されている。脂質異常症は、ヒトの生活習慣病における動脈硬化の素因のひとつとされていることから(53)、生活習慣病のモデル動物である

SHRSP における短命化の原因として、血漿中脂質の増大が疑われる可能性があった。しかし、血漿中脂質の有意な増大と肝臓相対重量の増大は、雄動物に特異的なものではなく、CAN 含有飼料による有害事象が顕著ではなかった雌動物でもみられた。肝臓の病理所見では性差がみられたが、飼料間差はみられなかった。したがって、血漿中脂質の増大は、CAN 含有飼料に起因するものではあるが、病理学的変化や、雄の SHRSP の短命化する高血圧症に関連した合併症の悪化とは無関係であると考えられる。

CAN 含有飼料を与えた雄は、SOY 含有飼料を与えた雄と比較して、レニン mRNA の発現およびレニンとアンジオテンシン II の血漿中濃度が有意に増大した。レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAAS) の活性化が雄動物の高血圧症の悪化に関係していることは間違いない。Miyazaki ら (54) は、雄性 SHRSP に CAN 含有飼料を 9 週間与えると SOY 含有飼料を与えた場合に比べて、レニン、TGF- β およびフィブロネクチン mRNA の発現が増大することを報告し、CAN による腎傷害を指摘している。腎傷害とそれに伴う RAAS の活性化が短命化の原因であるとするれば、本研究でも CAN 含有飼料群は SOY 含有飼料群よりも重篤な腎病変を示していたはずである。しかし、摂取第 8 週の時点の腎傷害は 2 群とも同程度であった。一方、CAN 含有飼料群の雄の心臓傷害は SOY 含有飼料群よりも頻度が高い傾向にあった。したがって、交感神経興奮による血圧上昇、交感神経刺激を介したレニン放出、あるいはその両方が生命短縮の引き金になっていると推定される。この機能的変化は、少なくとも今回の実験条件下では、SHRSP の腎臓における組織学的、構造的変化とは無関係であるとみられた。したがって、CAN 含有飼料はどのようにして交感神経興奮やレニン放出を引き起こすのかという疑問が残る。

これまでに、Wistar 系雄性ラットに CAN 含有飼料を 10 週間与えた場合、SOY 含有飼料を与えた場合と比較して、血漿中アルドステロン濃度が有意に高くなることが報じられている (22)。一方、CAN 含有飼料を 12 週間摂取した SHRSP の精巣および血漿中テストステロン濃度は SOY 含有飼料を摂取した対照動物に比べて有意に減少することが明らかにされている (12)。本研究では、雄性 SHRSP に CAN 含有飼料を 8 週間摂取させると、SOY 含有飼料を摂取させた対照動物と比較して、血漿中テストステロン濃度は減少し、このときほぼ同時に血漿中アルドステロン濃度が増大することがわかった。Kau ら (55) によると、雄性ラットの血漿中アルドステロン濃度は去勢後に増大し、テストステロン補充によって回復すること、また、 10^{-9} - 10^{-7} mol/L のテストステロンは初代培養ラット副腎球状層 (ZG) 細胞のアルドステロン産生を濃度依存的に阻害することを報告している。これらの知見は、雄ラットにおける、テストステロンによるアルドステロン産生の生理的な抑制的制御機構の存在と、CAN 含有飼料摂取による精巣でのテストステロン産生抑制を介したその制御機構の破綻を示唆する。言い換えれば、血漿中テストステロンは副腎におけるアルドステロン産生と相互に関連し、アルドステロン産生を生理的に負に制御していると考えられる。したがって、CAN によってテストステロンレベルが低下すると、アルドステロン産生に対する負の制御が解除されることになる。その結果として起こるアルドステロン濃度の増大が高血圧症や

血管障害を引き起こしている可能性がある。アルドステロンは、吻側延髄のミネラルコルチコイド受容体を刺激し、交感神経系を直接活性化することが知られている(56-58)。交感神経トーンの亢進は、直接、血圧と心拍数を上昇させ、さらに、傍糸球体装置からのレニン放出を刺激すると考えられる。精巣の病理学的異常は認められなかったが、精巣上体の細胞破片の増加は、CAN 含有飼料摂取によるテストステロン産生の抑制による精子形成の障害を反映している可能性がある。また、CAN 含有飼料を与えた雌では、血漿中テストステロン濃度の著しい減少とそれを反映するエストラジオールの減少がみられた。雌ラットにおけるテストステロンによるアルドステロン産生の調節については報告がない。エストロゲンはアルドステロン産生を抑制することが報告されているが(59,60)、CAN 含有飼料を与えた雌動物では、テストステロンの減少もエストラジオールの減少もアルドステロンレベルに影響を与えていないようであった。したがって、今回の結果は、少なくともテストステロンは、雌性 SHRSP の副腎におけるアルドステロン産生の調節には関与していないことを示している。血漿中アルドステロン濃度の定常値(SOY 含有飼料群での値)は、雌の動物の方が雄の動物よりも高かった。このような違いは、既に報告されている SHR(61)や Wistar ラット(62-64)における血漿アルドステロン濃度の性差と一致している。雄性動物ではテストステロンの減少がアルドステロン産生の有意な促進を起こしたが、雌性動物ではアルドステロン産生の促進は起こらなかった。このような雄性動物固有の調節が CAN 含有飼料摂取による有害事象の性差と密接に関係している可能性がある。

2-5 小括

本研究結果から、SHRSP における CAN 毒性には性差が認められることが初めて示された。雄性 SHRSP においては、CAN 含有飼料を摂取した際の生存期間が SOY 含有飼料を摂取した場合に比べ有意に短縮したが、雌の生存期間には飼料間差が認められなかった。CAN 含有飼料を摂取した雄では、生活習慣病の主な症候である昇圧、血小板数減少およびインスリン抵抗性などが顕著に認められたが、雌では飼料間差が認められなかった。血漿中テストステロン濃度の低下は、雌雄いずれにおいても SOY 含有飼料群に比べ、CAN 含有飼料摂取群で有意に低下したが、雄においてのみ血漿中アルドステロン濃度の有意な増大を伴っていた。したがって、CAN 毒性の性差は、生活習慣病を増悪させる原因となるアルドステロン生成促進の有無に基づくと考えられた。CAN 含有飼料は、雌でも体重減少、短命化、末梢組織における血中グルコースの取り込み抑制そして血漿中脂質濃度の上昇を引き起こす傾向を示したが、血漿中脂質濃度の上昇以外では有意な飼料間差が認められなかった。興味深いことに、雄では生理学的にテストステロンがアルドステロン産生を抑制的に制御しており、CAN 含有飼料摂取がテストステロン産生を抑制することでその制御を解き、結果として増大した血漿中アルドステロンが、生活習慣病様症候の促進と増悪を介して短命化に繋がる有害効果を引き起こしていると考えられることができる。

第3章 CAN 摂取が性腺および副腎のステロイド生成に及ぼす影響

3-1 序論

CAN 摂取は雄性 SHRSP においてテストステロン産生を抑制し(12), 雄性 Wistar ラットでは血漿中アルドステロン濃度を増大させることが報じられていた(22). これらの知見から, CAN 摂取はステロイド代謝経路に影響を及ぼすのではないかという疑問が生じるが, それに関する研究報告はなかった. 前章では, 雌雄 SHRSP を用いて CAN 摂取が生存日数に及ぼす影響を比較し, CAN による短命化には性差がみられることを明らかにした. また, 昇圧と頻脈, 血小板数減少, インスリン抵抗性など, 短命化に関与する有害効果が雄においてのみ認められることも明らかにした. さらに, CAN 摂取による血漿中テストステロン濃度の減少がアルドステロン濃度の増大と同時に起こることを明らかにした. このように, CAN 毒性には性差があり, それがステロイドホルモン代謝経路への影響と密接に関係していることが推定されたので, 本研究では, CAN 摂取が性腺および副腎皮質のステロイドホルモン産生に及ぼす影響を概観し, CAN 毒性の標的(器官)を絞り込むことを目的として以下の検討をした.

雌雄の SHRSP に CAN 含有飼料または SOY 含有飼料を与え, 下垂体からのゴナドトロピン分泌に影響が認められるか否かを調べた. ステロイド代謝経路の性ホルモン産生経路および糖質・鉱質コルチコイド産生経路で生成する幾つかのステロイドについて, それらの血漿中濃度および性ホルモンについては精巣組織中濃度を測定した. 性腺と副腎で, ステロイド合成経路に関わっている StAR および幾つかの酵素の mRNA 発現を測定した. また, 多くの mRNA 発現に有意な変化がみられた雄性 SHRSP では, これらの mRNA がコードするタンパク質量も測定した. さらに, テストステロン産生細胞であるライディッヒ細胞数への影響を調べた.

3-2 方法

3-2-1 飼料

第2章, 2-2-1 “飼料”の項に記されたものと同じ飼料を用いた.

3-2-2 動物飼育

日本エスエルシー(静岡)から4週齢の SHRSP(Izm)40匹(雌雄各20匹)を購入した. 7日間の馴化後, 動物を雌雄それぞれ1群10匹から成る2群に分け, 3匹/ケージの密度で飼育した. 各群の動物には SOY 含有飼料(対照)または CAN 含有飼料と水道水を自由摂取させ, 8週間飼育した. 飼育環境および方法の詳細は, 第2章, 2-2-2-1 および 2-2-3-1 “動物飼育”の項を参照のこと.

3-2-3 血液および組織サンプル

摂取期間終了後、セボフルラン(富士フィルム和光純薬, 大阪)吸入により動物を麻酔して開腹し、後大静脈から抗凝固剤としてヘパリンナトリウム(ナカライテスク)を用いて採血した。採取した血液は 150×g, 4°Cで 15 分間遠心し、得られた血漿をゴナドトロピンおよびステロイド濃度測定まで-80°Cで保存した。採血後、雄からは精巣と副腎を、雌からは卵巣と副腎を摘出した。雄の左精巣と両側副腎は液体窒素中で凍結し、ステロイド濃度, mRNA および mRNA がコードするタンパク質の発現量の測定に使用するまで-80°C で保存した。右側の精巣は 10%ホルマリンを含む 0.1 mol/L リン酸緩衝液中に浸漬して固定し、パラフィンに包埋し、薄切して組織標本とし、染色後に鏡検した。また、雌の両側卵巣および副腎も液体窒素中で凍結し、mRNA 発現量の測定に使用するまで-80°C で保存した。

3-2-4 血漿中 FSH および LH の測定

血漿中のゴナドトロピン濃度の測定には雌雄それぞれ各飼料群の 6 匹を使用した。血漿中 FSH および LH 濃度はそれぞれ市販の ELISA キット, E-EL-R0391(Elabscience Biotechnology, Houston, USA ; 検出範囲 3.31-200 ng/mL) および ENZ-KIT107(ENZO Life Sciences, Lausen, Switzerland ; 検出範囲 0.14-32.9ng/mL)を用い、各キットの操作手順書に従って測定した。

3-2-5 血漿および精巣中のステロイドの測定

血漿中ステロイド濃度は雌雄すべての動物で、精巣組織中ステロイド濃度はすべての雄性動物で測定した。ステロイド濃度の測定は、第 2 章, 2-2-3-4 “剖検, 血液生化学, ステロイドの測定” に記された方法で行った。

3-2-6 mRNA 発現の定量的解析

ステロイド代謝に関与する StAR および酵素の mRNA 発現は雌雄それぞれ各飼料群のゴナドトロピンを測定した 6 匹で測定した。凍結した精巣, 副腎および卵巣組織を Trizol™ 試薬(Thermo Fisher Scientific, 東京)中でホモジナイズした後, 2-2-3-5 “mRNA 発現の解析” に記したと同様の方法でリアルタイム PCR による mRNA 発現の解析を行い, グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼの発現量に対する各 mRNA の相対発現量を 2 つの飼料を与えた群間で比較した。使用した標的遺伝子と TaqMan Assay™ は次の通りである: グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH), Rn01775763_g1; ステロイド生成急性調節タンパク質(StAR), Rn00580695_m1; CYP11A1, Rn00568733_m1; CYP11B1, Rn02607234_g1; CYP11B2, Rn01767818_g1; CYP17, Rn00562601_m1; 3βHSD, Rn01789220_m1; 17βHSD, Rn00562601_m1; CYP 19, Rn00567222_m1。

3-2-7 ウェスタンブロット法

ステロイド代謝に関与する StAR および酵素の mRNA がコードするタンパク質量はゴナドトロピンを測定した各群 6 匹の雄を用いて測定した。PCR の結果、雄性動物では 2 つの飼料を与えた群間ですべての mRNA 発現に有意差が認められた。そこで 6 匹の精巣および副腎組織を用い、それらの mRNA に対応するタンパク質の発現をウェスタンブロット法で半定量した。精巣および副腎組織の一部を、4 容量の 137 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 20%グリセロール, プロテアーゼ阻害薬カクテル(Thermo Fisher Scientific)を含む 10 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) 中にとり、Ultra-Turrax™ (Ika, Staufen, Austria) を用いてホモジナイズした。ホモジネートを 1,000×g, 4°C で 15 分間遠心し、上清を得た。上清のタンパク質濃度を BCA タンパク質アッセイ試薬(ナカライテスク)で測定し、各サンプルのタンパク質濃度を 1 mg/mL に希釈、調整した。このサンプルを等量の Laemmli 緩衝液 (62.5 mol/L Tris, 2% SDS, 12%2-メルカプトエタノール, 25%グリセロール, 0.01%ブROMフェノールブルーを含有, pH=6.8; Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) と混和し、95°C で 5 分間加熱変性させた。15 μL のサンプルを 10%SDS-PAGE で分離し、分離したタンパク質をセミドライ電気泳動転写セル(Bio-Rad Laboratories)を用いてポリビニリデンジフルオライド(PVDF)メンブレンに転写した。PVDF メンブレンを Bullet Blocking One™(ナカライテスク)に室温で 10 分間浸した後、137 mmol/L NaCl, 0.1%Tween 20 を含む 20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液(TBS-T 緩衝液, pH=7.6)で洗浄した。洗浄した PVDF メンブレンを、一次抗体として以下の抗ラットタンパク質抗体(最終希釈倍率)を含む TBS-T 緩衝液中、4°C で一晩インキュベートした。

抗β-actin 抗体(1:5,000-20,000; 8457, Cell Signaling Technology, Danvers, USA), 抗 GAPDH 抗体(1:2,000; sc-32233, Santa Curz Biotechnology, Dallas, USA), 抗 StAR 抗体(1:100-500; 8449, Cell Signaling Technology), 抗 CYP11A1 抗体(1:1,000; AB1244, Sigma-Aldrich Merck, 東京), 抗 CYP17 抗体(1:200-1,000; sc-66850, Santa Curz Biotechnology), 抗 3βHSD 抗体(1:1,000; sc-515120, Santa Curz Biotechnology), 抗 17βHSD 抗体(1:100-200; sc-32872, Santa Curz Biotechnology) または抗 CYP11B2 抗体(1:1,000; PA-5-67694, Invitrogen, Thermo Fisher)

続いて PVDF メンブレンを TBS-T 緩衝液で洗浄し、適切なペルオキシダーゼ標識二次抗体 (Goat Anti-Mouse IgG HRP Conjugate 71045 または Goat Anti-Rabbit IgG Antibody HRP-conjugate 12-348, Sigma-Aldrich Merck) と室温で 1 時間インキュベート または Simple Stain MAX-PO MULTI™ (Nichirei Biosciences, 東京) を用いて室温で 15 分間インキュベートした。膜に結合した抗体のプロットは、Western Blot Hyper HRP Substrate (Takara Bio) で可視化し、Amersham AI680 lumino image analyzer (GE Healthcare, 日野) を用いて測定してβ-actin または GAPDH の値で標準化した。

3-2-8 ライディッヒ細胞の計数

ライディッヒ細胞数はゴナドトロピンを測定した各群 6 匹の雄を用いて計数した。右精巣を 10%ホルマリン含有 0.1 mol/L リン酸緩衝液で固定し、常法に従ってパラフィンブロッ

クを作製した。各ブロックから厚さ 4 μm の切片を切り出し、ライディッヒ細胞の calretinin を免疫組織化学的に染色した (65, 66)。切片をキシレンで脱パラフィンし、段階的にエタノールで脱水した後、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄した。続いて標本を pH 6.0 のクエン酸緩衝液に浸し、95°C の水浴中に 20 分間置いて抗原を賦活化した。PBS で洗浄した後、標本に Blocking One Histo™ (ナカライテスク) 2 滴を垂らし、15 分間静置した。Blocking One Histo™ を除去した後、抗ラット calretinin 抗体 (A9807 Abclonal, 東京) を Immuno Shot™ (Takara Bio) で 50 倍に希釈した溶液 1 滴を垂らし、室温で 1 時間静置した。続いて、0.05% Tween20 を含む PBS で標本を洗浄し、3.3% 過酸化水素を含むメタノールで内因性ペルオキシダーゼをブロックした。その後、HRP 標識二次抗体 Simple Stain MAX-PO MULTI™ (ニチレイバイオサイエンス, 東京) を 2 滴垂らし、室温で 30 分間静置した。0.005% Tween20 を含む PBS で洗浄した後、3,3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB) 溶液 (peroxidase stain DAB kit, ナカライテスク) 1 滴を垂らして厳密に 10-12 秒間反応させた。標本を蒸留水、続いて 0.005% Tween20 含有 PBS で洗浄した後、ヘマトキシリンで核染色した。染色した標本を BZ X-800 顕微鏡 (キーエンス, 大阪) で観察し、標本毎に 200 倍で観察した重なり合わない 10 視野内のライディッヒ細胞数を自動カウントして総数を求めた。

3-2-9 統計的方法

結果は平均値 \pm 標準誤差で表した。飼料群間の平均値の差は、2 つの群の変数が正規分布する場合は unpaired *t*-test で、正規分布しない場合は Mann-Whitney test で評価した。いずれの場合も $p < 0.05$ を以って有意とした。統計解析には Prism 9.3.1 (GraphPad Software) を使用した。

3-3 結果

3-3-1 血漿中の FSH および LH

FSH と LH の血漿中濃度を Table 3-1 に示す。雌雄とも、いずれのゴナドトロピン濃度にも飼料群間で差はなかった。

3-3-2 血漿および精巣中のステロイド濃度

雄性動物の血漿および精巣中のステロイド濃度を Table 3-2 に示す。CAN 含有飼料群の血漿中プレグネノロン、プロゲステロン、コルチコステロン、11-デヒドロコルチコステロン、デオキシコルチコステロンおよびデヒドロエピアンドロステロン濃度は、それぞれ SOY 含有飼料群と比較して増大する傾向にあったが、有意な差はなかった。一方、テストステロンとアルドステロンの血漿中濃度には有意な飼料間差が認められ、CAN 含有飼料群の血漿中テストステロン濃度は SOY 含有飼料群に比べて有意に低く、血漿中アルドステロン濃度は有意に高かった。精巣では、CAN 含有飼料群の組織中プレグネノロンとテストステロン濃度が、SOY 含有飼料群に比べて有意に減少した。また、CAN 含有飼料群の血漿中アンドロ

ステンジオンと精巣中デヒドロエピアンドロステロン濃度は、SOY 含有飼料群に比べて低くなる傾向が認められた。雌性動物の血漿中ステロイド濃度を Table 3-3 に示す。SOY 含有飼料摂取群に比べ、CAN 含有飼料摂取群の血漿中テストステロンおよびエストラジオール濃度は、いずれも減少する傾向を示した。

3-3-3 性腺および副腎におけるステロイド代謝に関与するタンパク質の mRNA 発現

精巣における、CAN 含有飼料群の StAR, CYP11A1, CYP17, 3 β HSD および 17 β HSD の mRNA 発現は、SOY 含有飼料群のそれと比較して有意に減少した (Fig. 3-1A)。雄の副腎では CAN 含有飼料群の StAR, CYP11A1, 3 β HSD の mRNA 発現量が SOY 含有飼料群のそれらと比較して増大する傾向にあったが、有意な変化ではなかった。CAN 含有飼料群の CYP11B2 (アルドステロン合成酵素) の mRNA 発現は SOY 含有飼料群の約 3 倍で、有意な増大となった。CYP11B1 の mRNA 発現は 2 つの飼料群でほぼ同じだった (Fig. 3-1B)。

卵巣では、CAN 含有飼料群の CYP17 の mRNA 発現に有意な抑制が、StAR, CYP11A1 および CYP19 の mRNA 発現に抑制傾向が、3 β HSD および 17 β HSD の mRNA 発現には増大傾向が認められた (Fig. 3-2A)。雌の副腎では、CAN 含有飼料群の StAR, CYP11A1, 3 β HSD, 17 β HSD および CYP11B2 の mRNA 発現量が SOY 含有飼料群のそれらと比較して増大する傾向が認められたが、有意な差ではなかった。CYP11B1 の mRNA 発現は 2 つの飼料群でほぼ同じだった (Fig. 3-2B)。

3-3-4 ステロイド代謝に関わるタンパク質の発現量

雄において 2 つの飼料群間で発現が有意に異なっていた mRNA に対応するすべてのタンパク質の発現量をウェスタンブロット法で調べた。CAN 含有飼料群の精巣における StAR, CYP11A1, CYP17, 3 β HSD および 17 β HSD のタンパク質発現が SOY 含有飼料群のそれと比較して有意に減少していた。副腎では、CAN 含有飼料群の CYP11B2 の発現が SOY 含有飼料群に比べて有意に増大していた (Fig. 3-3)。

3-3-5 ライディッヒ細胞数

ライディッヒ細胞数は、2 つの飼料群で同程度だった (Fig. 3-4)。200 倍の拡大視野 10 視野内の細胞数は、SOY 含有飼料群で 1167 \pm 36.6, CAN 含有飼料群では 1176 \pm 34.7 であった (N=6, p=0.8519)。また、いずれの群においても精巣組織に異常所見は認められなかった。

3-4 考察

CAN 含有飼料を与えた雄性 SHRSP では、精巣におけるテストステロン産生に関与する StAR, CYP11A1, CYP17, 3 β HSD および 17 β HSD の mRNA およびタンパク質発現が有意に減少した。これらの動物では、精巣組織中プレグネノロンおよびテストステロン濃度が SOY 含有飼料を与えた動物に比べて有意に減少していた。CAN 含有飼料を与えた動物の血漿中

テストステロン濃度の有意な減少は、精巣におけるテストステロン生産の減少を反映したものである。精巣とは対照的に、CAN 含有飼料は副腎の StAR, CYP11A1 および 3 β HSD の mRNA 発現に影響を及ぼさなかった。これらの知見から、CAN は、同様のステロイド代謝経路をもつ精巣と副腎で、その代謝経路に及ぼす影響が異なることが明らかになった。また、血漿中 LH 濃度には変化がみられなかったことから、CAN の毒性作用は中枢作用ではなく主に末梢作用であり、精巣は標的臓器のひとつであると考えられる。CAN 飼料群と SOY 飼料群の動物のライディッチ細胞数が同等であったことから、CAN によるテストステロン産生の抑制は、精巣の器質的(病理組織学的)変化に基づくものではなく、ライディッチ細胞の機能的変化に基づくものと考えられる。

StAR はステロイド代謝の律速タンパク質であり、ミトコンドリアへのコレステロール取り込みを担っていることから(67-69)、StAR の欠乏や機能不全は、CYP11A1, CYP17, 3 β HSD および 17 β HSD の発現、StAR やこれらの酵素によって制御されるステロイド代謝経路の中間生成物の産生を抑制すると考えられる。したがって、StAR や StAR の転写因子(70-72)が CAN 毒性の標的分子である可能性を除外することはできない。しかし、精巣と副腎のステロイド代謝経路において、コレステロールがプレグネノロンの直接の前駆体であり、StAR の役割はそれぞれ共通しているにもかかわらず、CAN による遺伝子発現の減少は精巣でのみ認められた。もし、StAR または StAR の転写因子が CAN 毒性の標的分子であるならば、StAR の mRNA 発現の減少は精巣だけでなく副腎でも同様にみられるはずである。本研究では副腎組織中のステロイド濃度は測定しなかったが、副腎におけるグルココルチコイドおよびミネラルコルチコイド産生経路の中間生成物であるプレグネノロン、プロゲステロン、コルチコステロン、デオキシコルチコステロンおよび 11-デヒドロコルチコステロンの量を反映しているそれぞれのステロイドの血漿中濃度そして StAR, CYP11A1, CYP17 および 3 β HSD の mRNA 発現は、CAN 含有飼料群の副腎で減少することはなく、むしろ増大傾向にあった。以上の結果から、CAN 毒性の標的臓器は副腎ではなく精巣であると考えられる。

雄の CAN 含有飼料群では血漿中アルドステロン濃度が SOY 含有飼料群と比較して有意に高く、副腎における CYP11B2(アルドステロン合成酵素)mRNA およびそのタンパク質発現量も SOY 含有飼料群と比較して有意に増大していた。アルドステロンの前駆体や、代謝経路のさらに上流で前駆体の生成に関与する酵素の mRNA 発現が有意に増大していなかったことから、CYP11B2 の mRNA およびタンパク質発現の増大を伴う血漿中アルドステロン濃度の増大は、副腎外からの刺激によってピンポイントで誘発されたものと考えられる。その原因のひとつとして、CAN によって引き起こされた腎臓の血管傷害による血漿中レニン濃度の増大が考えられる。実際、雄の SHRSP に CAN 含有飼料を与えた場合、SOY 含有飼料を与えた場合に比べて、動脈の肥厚を伴う腎症の発生率が増すこと(8)、さらに、レニン mRNA の有意な発現増大を伴う重篤な腎傷害が認められることが報告されている(54)。したがって、まず腎血管傷害が起こり、それに続くレニン放出の増大が血漿中アルドステロン

Table 3-1 Plasma FSH and LH levels in SHRSP given SOY diet or CAN diet for 8 weeks.

Gonadotropins	Male				Female			
	SOY	CAN	<i>p</i> Value	Difference	SOY	CAN	<i>p</i> Value	Difference
FSH (pg/mL)	351±19.2	347±50.0	0.9366	n.s.	325±49.2	467±53.8	0.1425	n.s.
LH (ng/mL)	18.7±1.88	19.5±0.634	0.6831	n.s.	17.5±1.11	18.0±1.39	0.7871	n.s.

SOY, 10 wt/wt% soybean oil diet (control); CAN, 10 wt/wt% canola oil diet.

Values are means ± S.E.M. of 6 animals.

n.s., Group mean values are not significantly different (unpaired *t*-test).

Table 3-2 Plasma and testicular tissue concentrations of steroids in male SHRSP given SOY diet or CAN diet for 8 weeks.

Steroids	SOY	CAN	<i>p</i> Value	Difference
Pregnenolone (ng/mL plasma)	0.373 ± 0.0731	0.554 ± 0.175	0.3150	n.s. Mann-Whitney test
Progesterone (pg/mL plasma)	965 ± 299	1600 ± 816	0.6842	n.s. Mann-Whitney test
Corticosterone (ng/mL plasma)	305 ± 57.2	332 ± 52.0	0.7315	n.s. Unpaired <i>t</i> -test
11-Dehydrocorticosterone (ng/mL plasma)	29.4 ± 5.25	33.4 ± 3.67	0.5402	n.s. Unpaired <i>t</i> -test
Deoxycorticosterone (ng/mL plasma)	2.66 ± 0.840	3.67 ± 1.53	0.5700	n.s. Unpaired <i>t</i> -test
Dehydroepiandrosterone (pg/mL plasma)	3.77 ± 1.79	2.61 ± 0.22	0.7164	n.s. Unpaired <i>t</i> -test
Androstenedione (pg/mL plasma)	512 ± 94.3	301 ± 58.0	0.0729	n.s. Unpaired <i>t</i> -test
Aldosterone (pg/mL plasma)	159 ± 33.7	345 ± 79.6	0.0433	s.d. Mann-Whitney test
Testosterone (ng/mL plasma)	2.79 ± 0.514	1.36 ± 0.271	0.0247	s.d. Unpaired <i>t</i> -test
Pregnenolone (ng/g testis)	36.4 ± 1.98	27.2 ± 3.20	0.0251	s.d. Unpaired <i>t</i> -test
Dehydroepiandrosterone (ng/g testis)	1.63 ± 0.386	0.784 ± 0.172	0.0630	n.s. Mann-Whitney test
Testosterone (ng/g testis)	167 ± 28.1	92.2 ± 21.4	0.0492	s.d. Unpaired <i>t</i> -test

SOY, 10 wt/wt% soybean oil diet (control); CAN, 10 wt/wt% canola oil diet.

Values are means ± S.E.M. of 10 animals.

s.d., Group mean values are significantly different ($p < 0.05$ by Mann-Whitney test or unpaired *t*-test).

n.s., Group mean values are not significantly different.

Table 3-3 Plasma concentrations of steroids in female SHRSP given SOY diet or CAN diet for 8 weeks.

Steroids	SOY	CAN	<i>p</i> Value	Difference
Pregnenolone (pg/mL plasma)	7.610 ± 1.824	5.550 ± 2.360	0.4986	n.s. Mann-Whitney test
Progesterone (pg/mL plasma)	13.9 ± 2.402	16.51 ± 2.836	0.4450	n.s. Mann-Whitney test
Corticosterone (ng/mL plasma)	729.4 ± 58.71	652.9 ± 97.28	0.5094	n.s. Unpaired <i>t</i> -test
Deoxycorticosterone (ng/mL plasma)	35.33 ± 7.254	23.33 ± 8.106	0.2845	n.s. Unpaired <i>t</i> -test
Androstenedione (pg/mL plasma)	424.0 ± 105.2	180.9 ± 33.43	0.1051	n.s. Mann-Whitney test
Aldosterone (pg/mL plasma)	306.0 ± 53.40	340.6 ± 92.78	0.7507	n.s. Unpaired <i>t</i> -test
Testosterone (pg/mL plasma)	160.7 ± 39.38	65.68 ± 13.03	0.0630	n.s. Mann-Whitney test
Estradiol (pg/mL plasma)	19.53 ± 5.329	4.340 ± 1.006	0.0601	n.s. Mann-Whitney test

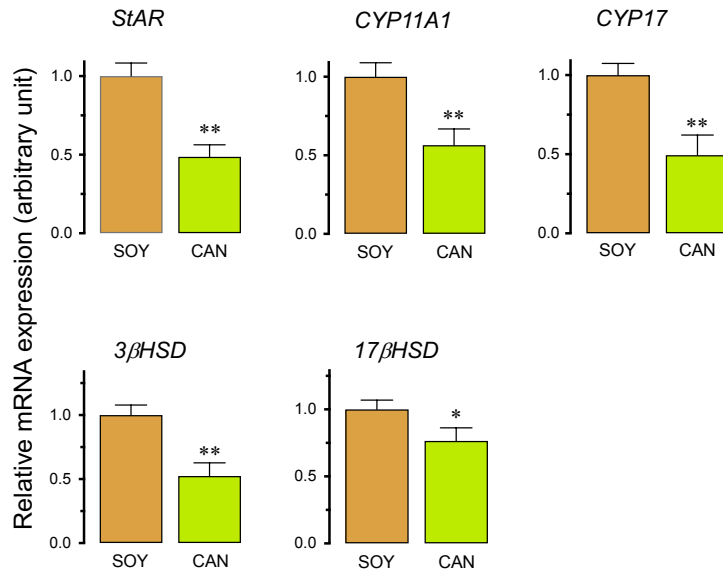
SOY, 10 wt/wt% soybean oil diet (control); CAN, 10 wt/wt% canola oil diet.

Values are means ± S.E.M. of 10 animals.

s.d., Group mean values are significantly different ($p < 0.05$ by Mann-Whitney test or unpaired *t*-test).

n.s., Group mean values are not significantly different.

(A) Testis



(B) Adrenal gland

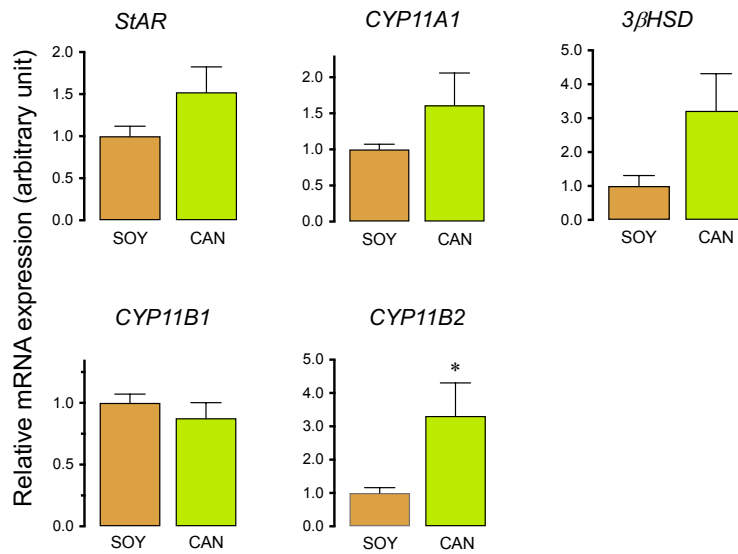
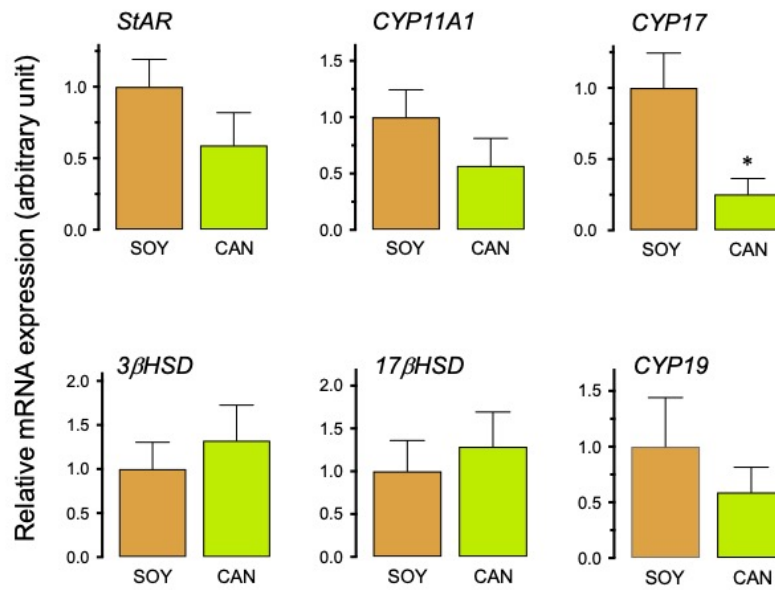


Fig. 3-1 Expressions of mRNA for StAR and enzymes involved in the steroid metabolism in male SHRSP given SOY diet or CAN diet for 8 weeks.

Columns and bars are means \pm S.E.M. of 6 animals, respectively.

(A) Testis, (B) Adrenal gland. SOY, 10 wt/wt% soybean oil diet (control) group; CAN, 10 wt/wt% canola oil group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from the values in the soybean oil group (unpaired t -test).

(A) Ovary



(B) Adrenal gland

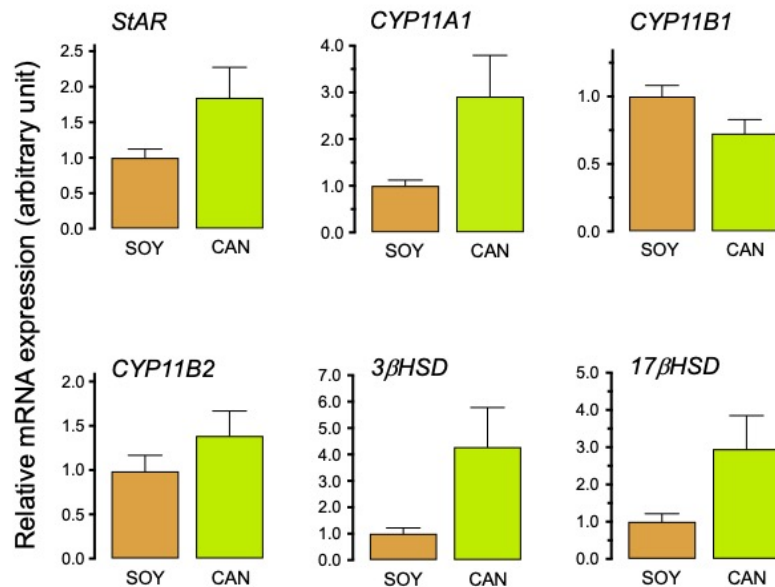


Fig. 3-2 Expressions of mRNA for StAR and enzymes involved in the steroid metabolism in female SHRSP given SOY diet or CAN diet for 8 weeks.

Columns and bars are means \pm S.E.M. of 6 animals, respectively.

(A) Ovary, (B) Adrenal gland. SOY, 10 wt/wt% soybean oil diet (control) group; CAN, 10 wt/wt% canola oil group. * $p < 0.05$, significantly different from the values in the soybean oil group (unpaired t -test).

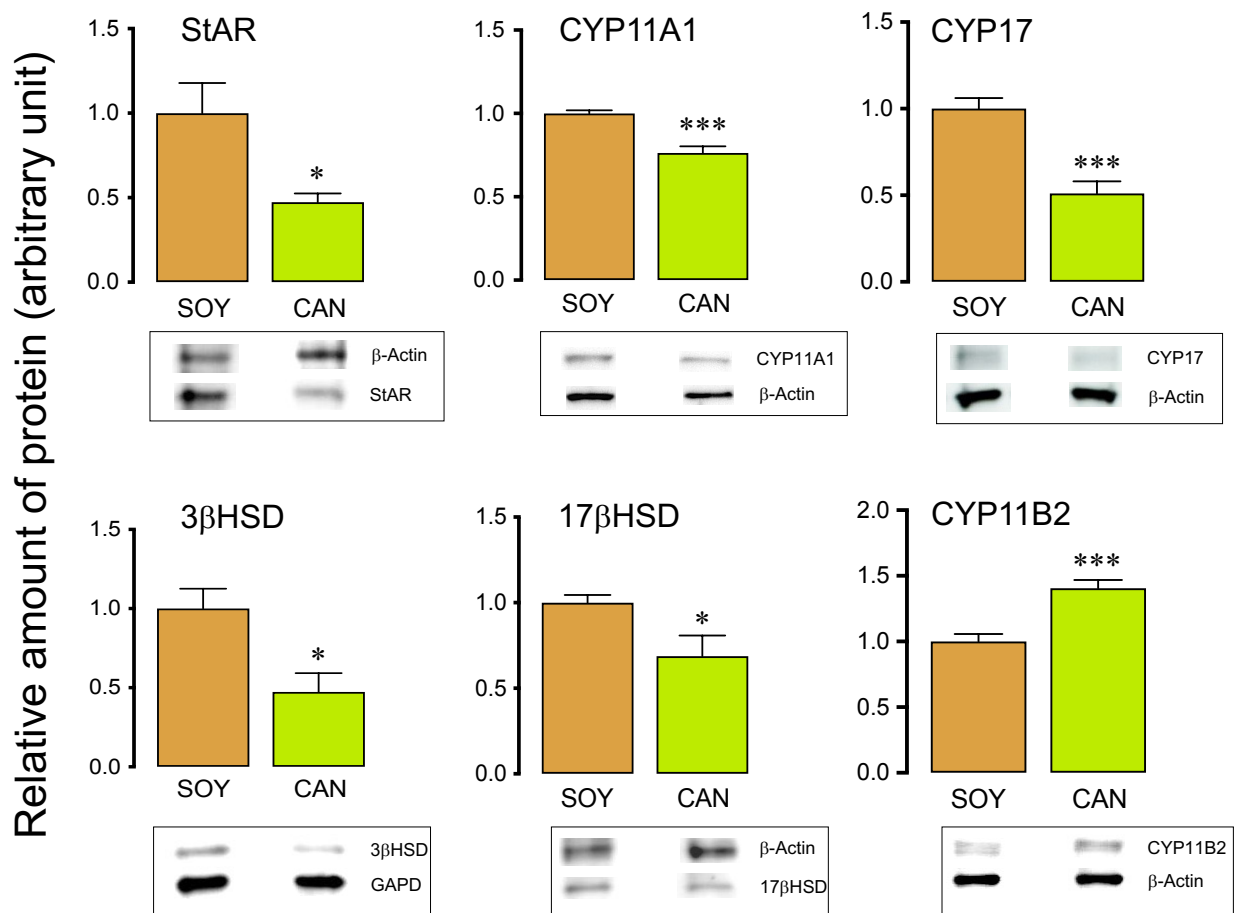


Fig. 3-3 Amounts of protein of StAR and enzymes involved in the steroid metabolism in the testis and the adrenal gland (CYP11B2) of male SHRSP given SOY diet or CAN diet for 8 weeks

Columns and bars are means \pm S.E.M. of 6 animals, respectively.

SOY, 10 wt/wt% soybean oil (control) group; CAN, 10 wt/wt% canola oil group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, significantly different from the values in the soybean oil group (unpaired t -test).

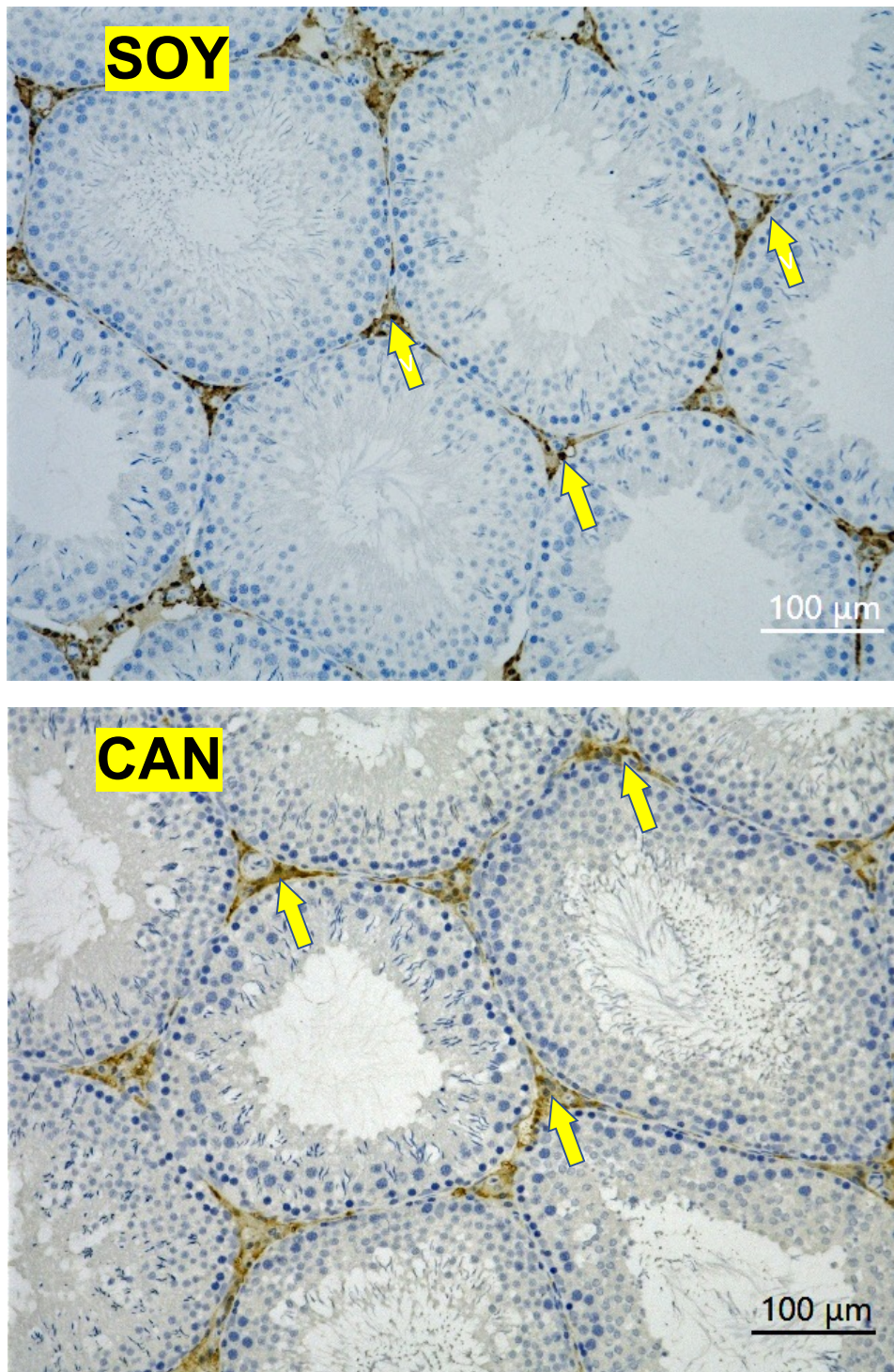


Fig. 3-4 Leydig cells in male SHRSP given SOY diet or CAN diet for 8 weeks.

SOY, 10 wt/wt% soybean oil (control) group; CAN, 10 wt/wt% canola oil group. Yellow arrows, Leydig cells. Calretinin in Leydig cells was stained using an anti-calretinin primary antibody, an HRP-conjugated secondary antibody and DAB reagent.

濃度増大の引鉄となることも全面的に否定はできないが、第2章の考察で述べた通り、その可能性は低いと判断している。

CAN が引き起こすテストステロンの減少がアルドステロンの増大を伴うという事実によって、CAN による血漿中アルドステロン濃度増大のもうひとつの原因が示唆される。血漿中テストステロン濃度の減少が副腎でのアルドステロンの産生を直接促進する可能性である。これも第2章の考察で触れたが、Kau ら(55)の報告によると、ZG 細胞のアルドステロン産生が 10^{-9} - 10^{-7} mol/L のテストステロンによって濃度依存的に抑制される。本研究で、SOY 含有飼料群の血漿中テストステロン濃度は約 0.97×10^{-9} mol/L であったが、CAN 含有飼料群では 0.47×10^{-9} mol/L であった。したがって、CAN 含有飼料を与えた雄性 SHRSP が早期に生活習慣病様症状を呈して短命化するのには、テストステロン産生が抑制されることが引き金になっている可能性がある。

3-5 小括

本章で記した研究結果をまとめると、CAN 含有飼料は雄性 SHRSP の血漿中テストステロン濃度を減少させると同時に血漿中アルドステロン濃度を増大させることが明らかになった。また、精巣のステロイド代謝経路における StAR, CYP11A1, CYP17, 3 β HSD および 17 β HSD の mRNA およびそれらがコードするタンパク質発現量が減少し、これらの分子が制御する中間代謝物の生成が抑制されることがわかった。一方、精巣と同じステロイド代謝経路を持つ副腎では CYP11B2 mRNA とそのタンパク質の発現だけが有意に増大した。血漿中 LH 濃度には影響が認められなかったため、CAN 毒性の標的は精巣であると考えられた。しかし、精巣のライディッヒ細胞数には影響が認められなかったため、CAN 毒性は精巣における機能的毒性と考えられた。これらの知見と ZG 細胞を用いた Kau らの報告(55)とを合わせて考えると、雄性 SHRSP では血漿中テストステロンが副腎のアルドステロン産生を生理的に負に制御しており、CAN 摂取によるテストステロンの減少は、アルドステロン産生の抑制的な制御を解除している可能性がある。

第4章 テストステロンがアルドステロン産生に与える影響

4-1 序論

これまでの研究で、CAN 摂取は SHRSP においてその遺伝的な背景病態である高血圧症、血小板数減少、インスリン抵抗性および血管傷害などの生活習慣病様症候を増悪することによって短命化を引き起こすこと、この有害効果は雄でのみ顕著に認められることを明らかにした。また、CAN 摂取により精巣では StAR, CYP11A1, CYP17, 3 β HSD および 17 β HSD の mRNA とそれらがコードするタンパク質の発現量が有意に減少したが、副腎では、StAR, CYP11A1 および 3 β HSD の mRNA 発現は減少せず、むしろ増大する傾向がみられ、その中で CYP11B2(アルドステロン合成酵素)の mRNA およびタンパク質だけが発現量が有意に増大していた。血漿中ゴナドトロピン濃度には影響が認められなかったため、CAN による精巣毒性は末梢性に働くことが示唆された。しかし、性腺と副腎は同じステロイド代謝経路をもつにもかかわらず、そこで働く StAR や酵素に対する CAN 摂取の影響が精巣と副腎とで異なっていたこと、また、精巣の病理所見には CAN 摂取による異常が認められず、ライディヒ細胞数にも影響が認められなかったことから、精巣は CAN 毒性の標的器官のひとつであり、CAN の精巣毒性は組織の器質的変化を呈することはなく、機能的変化を伴うと考えられた。

雄性 SHRSP ではテストステロンが副腎皮質のアルドステロン産生を抑制的に制御する生理学的なしくみがあり、CAN 摂取による精巣のテストステロン産生抑制がその抑制的制御を解除し、結果として増大したアルドステロンが雄性 SHRSP の生活習慣病様症候を増悪すると考えられた。テストステロンが副腎皮質のアルドステロン産生を抑制するという知見は、ZG 細胞を用いて、これまでに一報だけ報告されている(55)。本研究では、この先行論文の手法に基づき、ZG 細胞を用い、アルドステロン産生に対するテストステロンの影響の有無を確認した。さらに、同様の検討をヒト副腎皮質細胞(H295R 細胞)で行うことにより、テストステロンによるアルドステロン産生の抑制的な制御がヒト細胞でも存在するか否かを明らかにしようとした。

4-2 方法

4-2-1 ZG 細胞の培養

7週齢の雄性 Wister ラット5匹を日本エスエルシー(静岡)より購入し、ウッドチップを敷いたプラスチックケージに3匹ずつ収容して7日間馴化した。飼育環境は第2章、2-2-2-1 “動物飼育”の項に記したとおりである。馴化期間終了後、動物をセボフルラン(富士フィルム和光純薬)吸入麻酔下に瀉血致死させた。クリーンベンチ内で腹部を無菌的に正中切開し、副腎を摘出して滅菌生理食塩液中にとり、周囲の余分な組織を除去した。Kauら(1999)の方法に従って、2枚の滅菌ガラス板で副腎を挟み、軽く潰してカプセルとそれに付着した皮質球状層からなる部分および残りの部分(束状層、網状層、髓質)に分けた。5匹分のカプセル

と球状層部分を集め、2 mg/mL コラゲナーゼ(富士フィルム和光純薬)および 1/100 容の抗生物質カクテル、Zell Shield™ (Minerva Biolabs, Berlin, Germany)を添加した DMEM Ham's F-12 完全培地中にとり、37°Cの CO₂ インキュベータ内で 1 時間振盪して結合組織を消化した。DMEM Ham's F-12 完全培地は、DMEM Ham's F-12 培地に 1/100 容の ITS+プレミックス (0.625 mg/mL インスリン, 0.625 mg/mL トランスフェリン, 626 ng/mL 亜セレン酸, 125 mg/mL ウシ血清アルブミンおよび 0.535 mg/mL リノール酸; コーニング ジャパン, 東京)および 2.5% Nu-serum 1 (コーニング ジャパン)を加えて作製した。コラゲナーゼ処理後、等量の完全培地を加えてコラゲナーゼを失活させ、細胞懸濁液を 60 mm メッシュを通し、続いて 150×g, 室温で 10 分間遠心した。上清を捨てた後、沈渣に純水を加えて攪拌し、赤血球を溶血させた。懸濁液を再び遠心し、沈渣に完全培地を加えて再懸濁後、150×g, 室温で 10 分間遠心した。懸濁と遠心を繰り返して細胞を洗浄した後、沈渣に 1 mL の培地を加えて細胞懸濁液を作製した。少量の細胞懸濁液をトリパンブルー(富士フィルム和光純薬)で染色して計算盤に載せ、顕微鏡下で計数した (Fig. 4-1)。細胞生存率は 90%以上であった。細胞を 10⁵ cells/mL の密度で無血清フェノールレッド無添加 DMEM Ham's F-12 (ナカライテスク)に懸濁し、コラーゲンコート 24 ウェルプレート (コーニング ジャパン)に 1 mL/well ずつ分注後、10⁻⁷ mol/L ACTH (ナカライテスク), 10⁻⁷ mol/L アンジオテンシン II (ペプチド研究所, 大阪)または 10⁻³ mol/L ジブチリル cAMP (Chem Scene, Monmouth Junction, USA) 存在下あるいは非存在下にテストステロン (TCI, 東京) 10⁻⁹, 10⁻⁸ または 10⁻⁷ mol/L とともに 37°C の CO₂ インキュベータ内で 4 時間インキュベートした。インキュベート後の細胞の生存率は Cell Counting Kit-8 (同仁化学, 熊本)を用いて測定した。生存率は、溶媒 (0.1% DMSO) 処置対照細胞を 100%としたとき 92-99%であった。

4-2-2 H295R 細胞の培養

H295 細胞 (CRL-2128, ヒト副腎皮質腫瘍由来, ATCC) を 10⁶ cells/mL の密度で DMEM Ham's F-12 完全培地中に懸濁し、ヒトフィブロネクチンコートディッシュ (60mmφ, コーニング ジャパン) に播いて継代した。4 継代後、回収した細胞をトリパンブルー染色し、計算盤で計数した (細胞の生存率は 95%以上であった)。DMEM Ham's F-12 完全培地で細胞を 10⁶ cells/mL 懸濁液とし、ヒトフィブロネクチンコート 24 ウェルプレート (コーニング ジャパン) に 1 mL/well で分注し、37°C の CO₂ インキュベータ内で 24 時間培養した。続いて培地を 0.25% Nu-serum 1 含有フェノールレッドなし DMEM Ham's F-12 に換え、10⁻⁷ mol/L ACTH (ナカライテスク), 10⁻⁷ mol/L アンジオテンシン II (ペプチド研究所) または 10⁻³ mol/L ジブチリル cAMP (Chem Scene, Monmouth Junction, USA) 存在下あるいは非存在下にテストステロン (TCI) 10⁻⁹, 10⁻⁸ または 10⁻⁷ mol/L とともに 37°C の CO₂ インキュベータ内で 48 時間インキュベートした。インキュベーション時間は OECD 456 ガイドラインに従った (73)。インキュベート後の細胞の生存率は Cell Counting Kit-8 (同仁化学)を用いて測定した。溶媒 (0.1% DMSO) 処置対照細胞を 100%としたとき、85-90%であった。

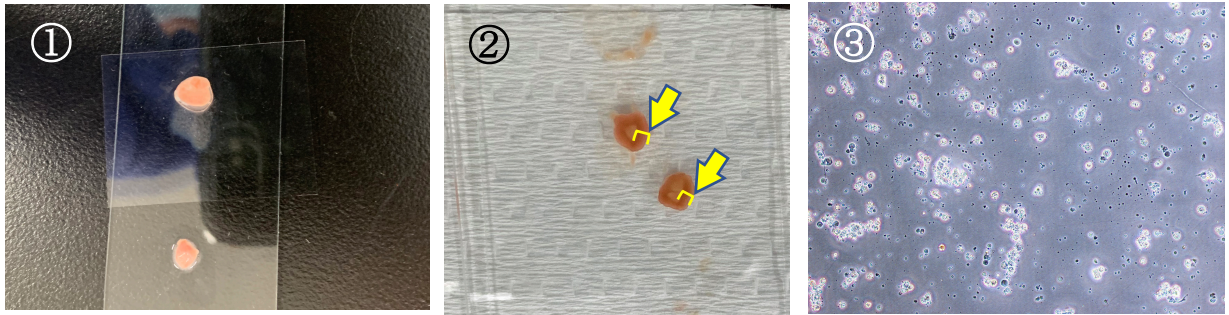


Fig. 4-1 Preparation of rat ZG cells

Two adrenal glands obtained in germ-free condition were placed between 2 pieces of sterilized glass plate and crushed gently (①). Each gland was separated into capsule with outer-zone (yellow arrows, mainly ZG) and inner-zone (mainly zona fasciculata/reticularis and medulla) fractions (②). After a collagenase-digestion, the tissue fractions were mechanically dispersed into cells and finally filtered through nylon mesh(③).

4-2-2 培地中アルドステロン濃度の測定

インキュベーション終了後、プレートを氷上にとり培地を回収した。培地は測定まで -30°C で保存した。アルドステロン濃度は、Aldosterone ELISA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA ; 検出範囲 5.6-2,000 pg/mL)を用い、使用説明書に従って測定した。 10^{-7}mol/L 以上のテストステロンでアルドステロンとの交差が認められたため、 10^{-7}mol/L テストステロン存在下での測定では、 10^{-7}mol/L テストステロン存在下に検量線を補正した。

4-2-3 統計学的方法

平均値の違いは2つの群の変数が正規分布する場合は unpaired *t*-test で、正規分布しない場合は Mann-Whitney test で評価した。いずれの場合も $p < 0.05$ を以って有意とした。統計解析には Prism 9.3.1 (GraphPad Software)を使用した。

4-3 結果

10^{-7}mol/L ACTH, 10^{-7}mol/L アンジオテンシンII または 10^{-3}mol/L ジブチリル cAMP は、ZG 細胞および H295R 細胞のアルドステロン産生を促進した (Fig. 4-2)。 10^{-9} , 10^{-8} および 10^{-7}mol/L テストステロンは、いずれの細胞でも濃度依存的かつ有意にアルドステロン産生を抑制した (Fig. 4-3)。

4-4 考察

ACTH, アンジオテンシンII およびジブチリル cAMP のいずれによっても ZG 細胞および H295R 細胞のアルドステロン産生が増大したことから、これらの細胞では、ACTH 受容体およびアンジオテンシンII (AT1) 受容体経由のアルドステロン産生刺激経路が機能していることがわかった。テストステロンがアルドステロン産生を抑制したことから、ラット、ヒトのいずれにおいても、テストステロンが副腎皮質のアルドステロン産生を抑制的に制御することが細胞レベルで示された。

CAN 摂取によって精巢のテストステロン産生が減少することで、この抑制的制御が解除され、副腎皮質のアルドステロン産生が増大することが雄性 SHRSP で認められる CAN 毒性の機序のひとつと考えられる。CAN 摂取が、雄性 SHRSP におけると同様にヒト男性のテストステロン産生を抑制するとすれば、ラットにおける毒性と同じ有害事象がヒトでも観察される可能性がある。

4-5 小括

本章で記した研究結果から、副腎皮質細胞におけるアルドステロン産生をテストステロンが抑制的に制御する機構がラットおよびヒト双方に存在することが強く示唆された。

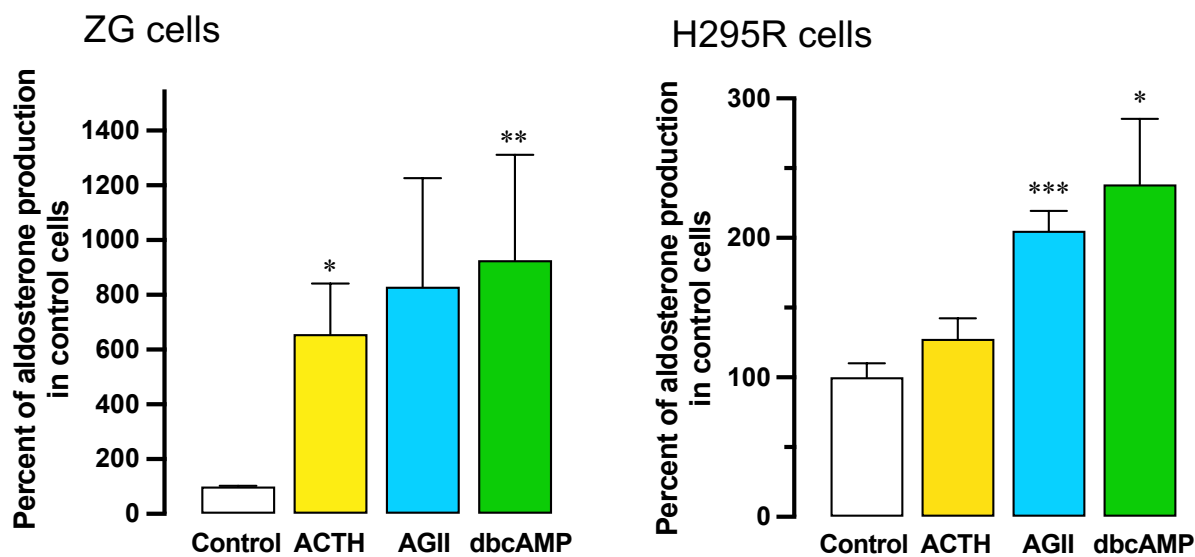


Fig. 4-2 Facilitation by adrenocorticotrophic hormone, angiotensin II or dibutyryl-cAMP of aldosterone production in rat ZG cells or H295 cells

Control, 0.1%DMSO; ACTH, adrenocorticotrophic hormone, 10^{-7} mol/L; AGII, angiotensin II, 10^{-7} mol/L; dbcAMP, dibutyryl-cAMP, 10^{-3} mol/L

Columns and bars are means \pm S.E.M. of 4 experiments, respectively.

The mean value in the control was defined as 100%.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, significantly different from the control (unpaired t -test).

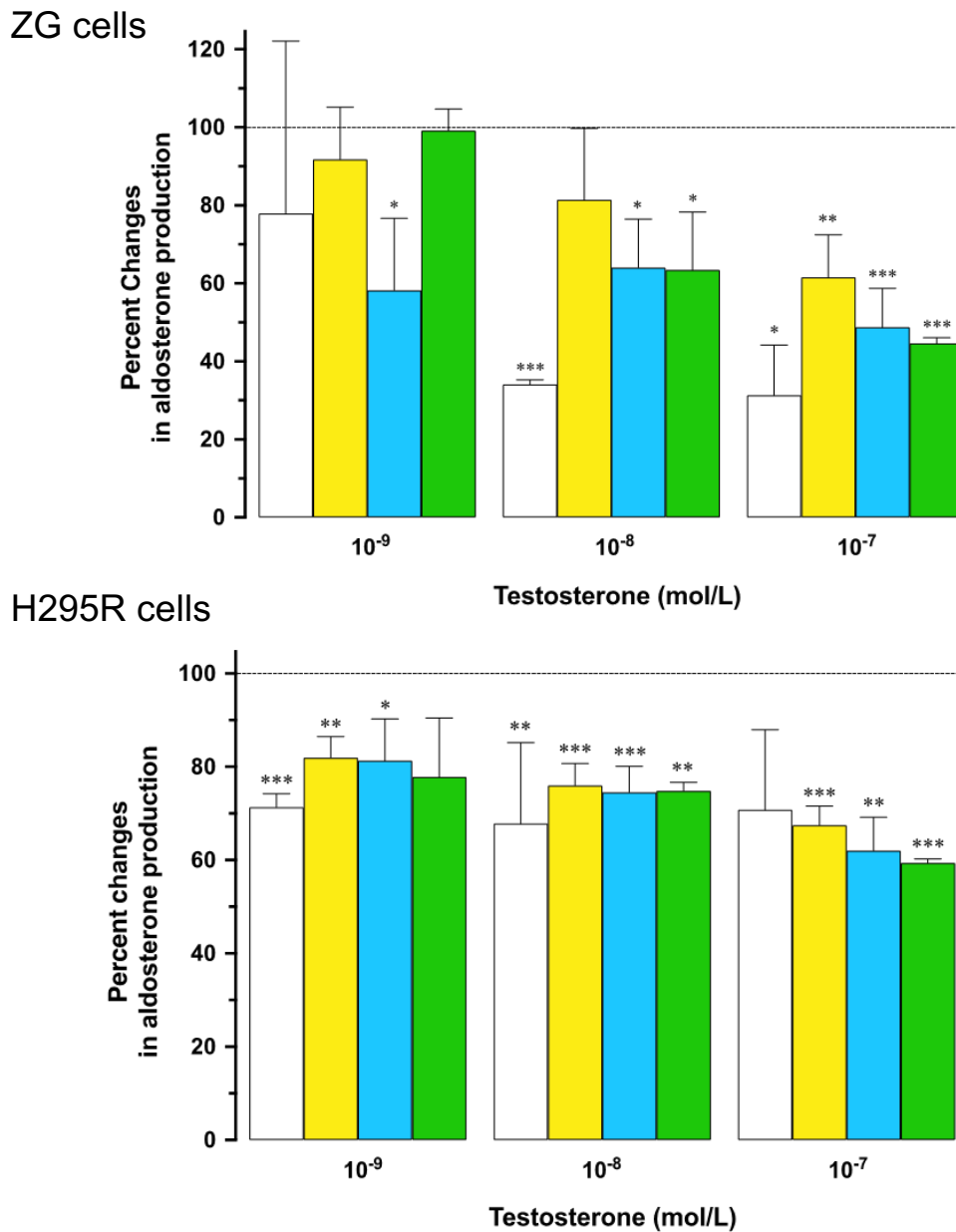


Fig. 4-3 Testosterone-induced inhibition of aldosterone production in ZG cells and H295R cells

White column, aldosterone production in the presence of 0.1%DMSO; Yellow column, 10⁻⁷ mol/L adrenocorticotrophic hormone-stimulated aldosterone production; Blue column, 10⁻⁷ mol/L angiotensin II-stimulated aldosterone production; Green column, 10⁻⁷ mol/L dbcAMP-stimulated aldosterone production.

Columns and bars are means ± S.E.M. of 4 experiments, respectively.

The mean value of the aldosterone production by the cells treated with the vehicle, DMSO or one of the stimulants in the absence of testosterone were defined as 100% productions.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, significantly different from the control (unpaired t -test).

第5章 総合考察および結論

本研究結果を以下のとおり総括する。

CAN 摂取が血漿中ゴナドトロピン濃度に影響を及ぼさなかったことから、CAN 毒性は末梢性であることが示唆された。性腺と副腎皮質は共通のステロイド代謝経路をもつが、精巣と副腎における代謝経路で働く酵素等の遺伝子、タンパク質発現量の変化が両器官で異なっていたことから、CAN 毒性の標的は両器官に共通した酵素等ではなく精巣組織そのものであると推定された。卵巣においても精巣と同様にステロイド代謝に関与するタンパク質や酵素の遺伝子発現が全般的に抑制されたが、有意な変化は CYP17mRNA 発現の減少のみであった。精巣の病理組織には器質的变化が認められなかったため、この毒性は組織の病変の結果生じたものではなく、機能的変化に基づくものと考えられた。昇圧、インスリン抵抗性および血管傷害には増大した血漿中アルドステロンが密接に関わると考えられる。

SHRSP では、精巣におけるテストステロン産生の抑制が血漿中テストステロン濃度の減少を介して副腎皮質球状層におけるアルドステロン産生を促し、生活習慣病の増悪を引き起こすと考えられる。一方、ラット ZG 細胞およびヒト H295R 細胞のいずれにおいてもテストステロンによるアルドステロン産生の濃度依存的抑制が認められたことから、ラットとヒトの双方で副腎のアルドステロン産生が血中テストステロンを介して抑制的に制御されていると考えられる。本研究では、この制御機構に対する CAN 摂取の影響を調べることはできなかったが、この機構がヒトでも存在することは、ヒトにおける CAN の健康被害の有無が引き続き検討を要する課題であることを示している。CAN 毒性発現の端緒となる変化がテストステロン減少によるアルドステロン産生の増大なのか、持続的高血圧で生じた腎血管傷害に基づくレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系活性化の結果として起こる二次的なアルドステロンの増大なのかについては、雄で認められた昇圧が反射性徐脈ではなく頻脈を伴っていたことから前者(アルドステロンの自律神経中枢直接興奮作用)であろうと判断している。CAN 摂取がヒトでもテストステロン低下を引き起こすか否かはわからないが、男性では性ホルモン低下による生活習慣病の発症や総死亡率の上昇が報じられている。本研究において、ラットとヒトの培養細胞において同じ制御機構(テストステロンによるアルドステロン産生の抑制)が存在することが確かめられた。CAN が日本における代表的な汎用食用油であることを考慮すると、生活習慣病モデル動物である SHRSP で認められるこの有害事象が、少なくとも男性においては CAN 摂取量に注意を払うべきであることを強く示唆している。

結論

1. CAN は雄性 SHRSP の生活習慣病様症候を増悪し、短命化を引き起こす。この有害効果には性差があり、雌性 SHRSP では認められない。
2. CAN 毒性の端緒となる病態生理的な変化は自律神経中枢の直接興奮と考えられ、顕著な

昇圧と血管傷害が雄のみで認められる。

3. ステロイド代謝経路への影響が CAN 毒性のひとつの特徴であるが、主な標的器官は副腎ではなく性腺である。性ホルモン産生の抑制または抑制傾向は雌雄を問わず認められ、それらは遺伝子レベルでも確認できるが、雄性 SHRSP で認められるテストステロン産生の著しい減少が短命化に繋がる生活習慣病様症候の増悪と密接に関連していると考えられる。なお、CAN の精巣毒性は機能的毒性である。

4. 雄におけるテストステロン産生の抑制はアルドステロン産生の促進を伴い、雄の副腎では CYP11B2 の mRNA およびタンパク質発現がともに増大することから、テストステロンが副腎におけるアルドステロン産生を抑制的に制御する機構が存在し、テストステロンの減少がその制御を解除する結果、アルドステロン産生が増大することが示唆される。このアルドステロン産生の増大が、雄における自律神経中枢の直接興奮を起こしていると考えられる。

5. テストステロンが副腎皮質細胞のアルドステロン産生を濃度依存的に抑制することをラット ZG 細胞およびヒト H295R 細胞で確認したことから、テストステロンによるアルドステロン産生の抑制的制御機構は、ラットとヒトの双方に存在すると考えられる。また、CAN 摂取によるテストステロン産生の強い減少傾向は雌性 SHRSP でも認められるが、この制御(制御の解除)が *in vivo* でみられないのは、雌では血中テストステロン濃度が極めて低く、この制御機構が働いていないことを示唆する。

6. ヒトでも男性においては、生活習慣病の発症あるいは進行における CAN 摂取の影響に留意すべきである。

第 6 章 引用文献

1. M. Z. Huang, Y. Naito, S. Watanabe, T. Kobayashi, H. Kanai, H. Nagai, H. Okuyama, Effect of rapeseed and dietary oils on the mean survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Biol. Pharm. Bull.* 19 (1996) 554-557, <https://doi.org/10.1248/bpb.19.554>
2. M. Z. Huang, S. Watanabe, T. Kobayashi, A. Nagatsu, J. Sakakibara, H. Okuyama, Unusual effects of some vegetable oils on the survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Lipids* 32 (1997) 745-751, <https://doi.org/10.1007/s11745-997-0095-z>
3. M. Miyazaki, M. Z. Huang, N. Takemura, S. Watanabe, H. Okuyama, Free fatty acid fractions from some vegetable oils exhibit reduced survival time-shortening activity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Lipids* 33 (1998) 655-661, <https://doi.org/10.1007/s11745-998-0253-3>
4. W. M. Ratnayake, L. Plouffe, R. Hollywood, M. R. L'Abbé, N. Hidirolou, G. Sarwar, R. Mueller, Influence of sources of dietary oils on the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Lipids* 35 (2000a), 409-420, <https://doi.org/10.1007/s11745-000-539-5>
5. W. M. Ratnayake, M. R. L'Abbé, R. Mueller, R. Hayward, L. Plouffe, R. Hollywood, K. Trick, Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* 130 (2000b) 1166-1178, <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1166>
6. Y. Naito, C. Konishi, H. Katsumura, N. Ohara, 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 (2000a) 144-148, <https://doi.org/10.1111/j.0901-9928.2000.870308.x>
7. Y. Naito, T. Nagata, Y. Takano, T. Nagats, N. Ohara, Rapeseed oil ingestion and exacerbation of hypertension-related conditions in stroke prone spontaneously hypertensive rats, *Toxicology* 187 (2003) 205-216, [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00052-0](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00052-0)
8. N. Ohara, Y. Naito, T. Nagata, K. Tatematsu, S. Fuma, S. Tachibana, H. Okuyama, Exploration for unknown substances in rapeseed oil that shorten survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Effects of super critical gas extraction fractions, *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 952-963, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.11.004>
9. A. Papazzo, X. A. Conlan, L. Lexis, P. A. Lewandowski, Differential effects of dietary canola and soybean oil intake on oxidative stress in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Lipids Health Dis.* Jun 13;10:98. (2011a), <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-98>
10. A. Papazzo, A. Conlan, L. Lexis, P. Lewandowski, The effect of short-term canola oil ingestion on oxidative stress in the vasculature of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipids Health Dis.* Oct 17;10:180 (2011b), <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-180>

11. J. Cai, J.-Y. Jang, J. Kim, K. Shin, K. S. Kim, D. Park, T.-S. Kim, S.-P. Lee, B. Ahn, E.-K. Choi, J. Lee, Y.-B. Kim, Comparative effects of plant oils on the cerebral hemorrhage in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Nutr. Neurosci.* 19 (2016) 318-326, <https://doi.org/10.1179/1476830514Y>
12. H. Okuyama, N. Ohara, K. Tatematsu, S. Fuma, T. Nonogaki, K. Yamada, Y. Ichikawa, D. Miyazawa, Y. Yasui, S. Honma, Testosterone-lowering activity of canola and hydrogenated soybean oil in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat, *J. Toxicol. Sci.* 35 (2010) 743-747, <https://doi.org/10.2131/jts.35.743>
13. F. Saad and L. Gooren, The role of testosterone in the metabolic syndrome: a review, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 114 (2009) 40-43, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.12.022>
14. D. M. Kelly and T. H. Jones, Testosterone: a metabolic hormone in health and disease, *J. Endocrinol.* 217 (2013) R25-45, <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0455>
15. N. Laouali, S. Brailly-Tabard, C. Helmer, M. L. Ancelin, C. Tzourio, A. Singh-Manoux, A. Dugravot, A. Elbaz, A. Guiochon-Mantel, M. Canonico, Testosterone and All-Cause Mortality in Older Men: The Role of Metabolic Syndrome, *J. Endocr. Soc.* 2 (2018) 322-335, <https://doi.org/10.1210/js.2018-00005>
16. D. M. Kelly, S. Akhtar, D. J. Sellers, V. Muraleedharanm, K. S. Channerm, T. H. Jones, Testosterone differentially regulates targets of lipid and glucose metabolism in liver, muscle and adipose tissues of the testicular feminised mouse, *Endocrine* 54 (2016) 504-515, <https://doi.org/10.1007/s12020-016-1019-1>
17. M. Baik, J. Y. Jeong, S. J. Park, S. P. Yoo, J. O. Lee, J. S. Lee, M. N. Haque, H.-J. Lee, Testosterone deficiency caused by castration increases adiposity in male rats in a tissue-specific and diet-dependent manner, *Genes Nutr.* 15 (2020) 14, <https://doi.org/10.1186/s12263-020-00673-1>
18. D. A. M. Hermoso, P. F. V. Bizerra, R. P. Constantin, E. L. Ishii-Iwamoto, E.H. Gilgioni, Association between metabolic syndrome, hepatic steatosis, and testosterone deficiency: evidences from studies with men and rodents, *Aging Male* 23 (2020) 1296-1315, <https://doi.org/10.1080/13685538.2020.1764927>
19. J. Hiraoka-Yamamoto, Y. Nara, N. Yasui, Y. Onobayashi, S. Tsuchikura, K. Ikeda, Establishment of a new animal model of metabolic syndrome: SHRSP fatty (fa/fa) rats. *Clin. and Exptl. Pharmacol. and Physiol.* 31 (2004) 107–109, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.03962.x>
20. A. A. de Artiñano and M. M. Castro, Experimental rat models to study the metabolic syndrome, *British J. Nutr.* 102 (2009) 1246–1253, <https://doi.org/10.1017/S0007114509990729>
21. S. Tanaka, C. Kojiguchi, T. Yamazaki, A. Mitsumoto, D. Kobayashi, N. Kudo, Y. Kawashim, Altered fatty acid profile in the liver and serum of stroke-prone spontaneously hypertensive

- rats: reduced proportion of cis-vaccenic acid, *J. Oleo. Sci.* 62 (2013) 933-948, <https://doi.org/10.5650/jos.62.933>
22. N. Ohara, Y. Naito, T. Nagata, S. Tachibana, M. Okimoto, H. Okuyama, 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 (2008a) 641-645, <https://doi.org/10.2131/jts.33.641>
 23. T. Minetoma, S. Kuroda, F. Hiasa, T. Narahashi, T. Ito, T. Akayama, A study on oilseed rape residue as livestock feed. Nutrition and safety evaluation study in hens, Annual Report of Central Research Institute for Feed and Livestock (National Federation of Agricultural Cooperative Associations) 3 (1975) 37-96 (in Japanese)
 24. I. Ikeda, H. Nakagiri, M. Sugano, S. Ohara, T. Hamada, M. Nonaka, K. Imaizumi, Mechanisms of phytosterolemia in stroke-prone spontaneously hypertensive and WKY rats *Metabolism* 50 (2001) 1361-1368, <https://doi.org/10.1053/meta.2001.26739>
 25. K. Tatematsu, S. Fuma, T. Nagase, Y. Ichikawa, Y. Fujii, H. Okuyama, Factors other than phytosterols in some vegetable oils affect the survival of SHRSP rats, *Food Chem. Toxicol.* 42 (2004) 1443-145, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.04.005>
 26. H. Okuyama, S. Sultan, N. Ohara, T. Hamazaki, P. H. Langsjoen, R. Hama, Y. Ogushi, T. Kobayashi, S. Natori, H. Uchino, Y. Hashimoto, S. Watanabe, K. Tatematsu, D. Miyazawa, M. Nakamura K. Oh-hashii, All mainstream guidelines in lipid nutrition disregard evidence that some types of vegetable fats and oils induce stroke and disrupt endocrines, *Lipid Nutrition Guidelines: A comprehensive analysis MDPI* (2021) 19-29, <https://doi.org/10.3390/nu13082828>
 27. V. E. Bianchi and V. Locatelli, Testosterone a key factor in gender related metabolic syndrome, *Obes. Rev.* 19 (2018) 557-575, <https://doi.org/10.1111/obr.12633>
 28. K. Okamoto, Y. Yamori, A. Nagaoka, Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR), *Circ. Res.* 34/35 (1974) Suppl I 143-153
 29. A. Nagaoka, H. Iwatsuka, Z. Suzuoki, K. Okamoto, Genetic predisposition to stroke in spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Physiol.* 230 (1976) 1354-1359, <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1976.230.5.1354>
 30. K. Takagi, Y. Miki, S. Nagasaki, H. Hirakawa, H. Onodera, J. Akahira, T. Ishida, M. Watanabe, I. Kimijima, S. Hayashi, H. Sasano, T. Suzuki, Increased intratumoral androgens in human breast carcinoma following aromatase inhibitor exemestane treatment, *Endocr. Relat. Cancer* 17 (2010) 415-430, <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0257>
 31. T. Kameyama, T. Ohhara, Y. Nakashima, Y. Naito, M. Z. Huang, S. Watanabe, T. Kobayashi, H. Okuyama, K. Yamada, T. Nabeshima, Effects of dietary vegetable oils on behavior and drug responses in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 19 (1996) 400-404, <https://doi.org/10.1248/bpb.19.400>
 32. H. Togashi, M. Minami, Y. Bando, Y. Koike, K. Shimamura, H. Saito, Effects of clonidine and guanfacine on drinking and ambulation in spontaneously hypertensive rats, *Pharmacol.*

- Biochem. Behav. 17 (1982) 519-522, [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(82\)90313-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(82)90313-6)
33. H. Togashi, M. Matsumoto, M. Yoshioka, M. Hirokami, K. Minami, H. Saito, Neurochemical profiles in cerebrospinal fluid of stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Neurosci. Lett*, 166 (1994) 117-120, [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90854-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90854-0)
34. K. Ueno, H. Togashi, K. Mori, M. Matsumoto, S. Ohashi, A. Hoshino, T. Fujita, H. Saito, M. Minami, M. Yoshioka, Behavioural and pharmacological relevance of stroke-prone spontaneously hypertensive rats as an animal model of a developmental disorder, *Behav. Pharmacol.* 13 (2002a) 1-13, <https://doi.org/10.1097/00008877-200202000-0000>
35. K. Ueno, H. Togashi, M. Matsumoto, S. Ohashi, H. Saito, M. Yoshioka, Alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor activation ameliorates impairment of spontaneous alternation behavior in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, *Pharmacol. Exp. Ther.* 302 (2002b) 95-100, <https://doi.org/10.1124/jpet.302.1.95>
36. Y. Naito, K. Kasama, H. Yoshida, N. Ohara, 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 (2000b) 811-816, [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(00\)00076-4](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(00)00076-4)
37. Y. Naito, H. Yoshida, T. Nagata, A. Tanaka, H. Ono, N. Ohara, 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 (2000c) 197-208, [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00175-x](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00175-x)
38. T. Muthusamy, P. Murugesan, K. Balasubramanian, Sex steroids deficiency impairs glucose transporter 4 expression and its translocation through defective Akt phosphorylation in target tissues of adult male rat, *Metabolism* 58 (2009) 1581-1592, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.05.010>
39. K. Sato, M. Iemitsu, K. Aizawa, R. Ajisaka, Testosterone and DHEA activate the glucose metabolism-related signaling pathway in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294 (2008) E961-968, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00678.2007>
40. C. Wilson, A. Contreras-Ferrat, N. Venegas, C. Osorio-Fuentealba, M. Pavez, K. Montoya, J. Duran, R. Maass, S. Lavandero, S. Estrada, Testosterone increases GLUT4-dependent glucose uptake in cardiomyocytes, *J. Cell Physiol.* 228 (2013) 2399-2407, <https://doi.org/10.1002/jcp.24413>
41. H. Shamon and P. Felig, Effects of estrogen on glucose uptake by rat muscle, *Yale J. Biol. Med.* 47 (1974) 227-233, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2595133/>
42. C. Nolan and J. Proietto, The effects of oophorectomy and female sex steroids on glucose kinetics in the rat, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 30 (1995) 181-188, [https://doi.org/10.1016/0168-8227\(95\)01193-5](https://doi.org/10.1016/0168-8227(95)01193-5)

43. S. E. Campbell and M. A. Febbraio, Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282 (2001) E1139-1146, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00184.2001>
44. B. K. Gorres, G. L. Gbomhoff, J. K. Morris, P. C. Geiger, In vivo stimulation of oestrogen receptor α increases insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake, *J. Physiol.* 589 (Pt 8) (2010) 2041-2054, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.199018>
45. N. H. Rogers, C. A. Witzak, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear, A. S. Greenberg, Estradiol stimulates Akt, AMP-activated protein kinase (AMPK) and TBC1D1/4, but not glucose uptake in rat soleus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382 (2009) 646-650, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.154>
46. N. Ohara, Y. Naito, K. Kasama, T. Shindo, H. Yoshida, T. Nagata, H. Okuyama, Similar changes in clinical and pathological parameters in Wistar Kyoto rats after a 13-week dietary intake of canola oil or a fatty acid composition-based interesterified canola oil mimic, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 157-162, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.10.022>
47. J. K. Kramer, F. D. Sauer, E. R. Farnworth, M. S. Wolynetz, G. Jones, G. A. Rock, Hematological and lipid changes in newborn piglets fed milk replacer diets containing vegetable oils with different levels of n-3 fatty acids, *Lipids* 29 (1994) 859-868, <https://doi.org/10.1007/BF02536254>
48. J. K. Kramer, F. D. Sauer, E. R. Farnworth, D. Stevenson, G.A. Rock, Hematological and lipid changes in newborn piglets fed milk-replacer diets containing erucic acid, *Lipids* 33 (1998) 1-10, <https://doi.org/10.1007/s11745-998-0174-1>
49. S. M. Innis and R. A. Dyer, Dietary canola oil alters hematological indices and blood lipids in neonatal piglets fed formula, *J. Nutr.* 129 (1999) 1261-1268, <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1261>
50. T. Tomita, K. Umegaki, E. Hayashi, The appearance of exhausted platelets due to a duration of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Thrombosis Research* 37 (1985) 195-200, [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(85\)90046-5](https://doi.org/10.1016/0049-3848(85)90046-5)
51. K. Umegaki, Y. Inoue, T. Tomita, The appearance of "exhausted" platelets at the time of stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Thromb. Haemost.* 54 (1985) 764-767, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4089811>
52. N. Ohara, K. Kasama, Y. Naito, T. Nagata, Y. Saito, M. Kuwagata, H. Okuyama, 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 (2008a) 2573-2579, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.04.015>
53. K. G. M. M. Alberti, R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, P. Z. Cleeman, K. A. Donato, J.-C. Fruchart, W. P. T. James, C. M. Loria, S. C. Smith Jr, *International Diabetes*

- Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity, 2009.
- Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity, *Practice Guideline Circulation* 120 (2009) 1640-1645, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644>
54. M. Miyazaki, N. Takemura, S. Watanabe, N. Hata, Y. Misawa, H. Okuyama, Dietary docosahexaenoic acid ameliorates, but rapeseed oil and safflower oil accelerate renal injury in stroke-prone spontaneously hypertensive rats as compared with soybean oil, which is associated with expression for renal transforming growth factor-beta, fibronectin and renin, *Biochim. Biophys. Acta* 1483 (2000) 101-110, [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(99\)00180-8](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(99)00180-8)
55. M. M. Kau, M. J. Lo, S. W. Wang, S. C. Tsai, J. J. Chen, Y. C. Chiao, J. Y. Yeh, H. Lin, A. Y. Shum, V. S. Fang, L. T. Ho, P. S. Wang, Inhibition of aldosterone production by testosterone in male rats. *Metabolism* 48 (1999) 1108-1114, [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(99\)90123-3](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(99)90123-3)
56. R. B. Felder, Mineralocorticoid receptors, inflammation and sympathetic drive in a rat model of systolic heart failure, *Exp. Physiol.* 95 (2010) 19-25, <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.045948>
57. H. Takahashi, Upregulation of the Renin-Angiotensin-aldosterone-ouabain system in the brain is the core mechanism in the genesis of all types of hypertension, *Int. J. Hypertens.* 2012 (2012) 242786, <https://doi.org/10.1155/2012/242786>
58. T. Nakagaki, Y. Hirooka, R. Matsukawa, M. Nishihara, M. Nakano, K. Ito, S. Hoka, K. Sunagawa, Activation of mineralocorticoid receptors in the rostral ventrolateral medulla is involved in hypertensive mechanisms in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Hypertens. Res.* 35(2012) 470-476, <https://doi.org/10.1038/hr.2011.220>
59. D. M. Roesch, Y. Tian, W. Zheng, M. Shi, J. G. Verbalis, K. Sandberg, Estradiol attenuates angiotensin-induced aldosterone secretion in ovariectomized rats, *Endocrinology* 141 (2000) 4629-4636, <https://doi.org/10.1210/endo.141.12.7822>
60. M. Macova, I. Armando, J. Zhou, G. Baiardi, D. Tyurmin, I.-M. Larrayoz-Roldan, J. M. Saavedra, Estrogen reduces aldosterone, upregulates adrenal angiotensin II AT2 receptors and normalizes adrenomedullary Fra-2 in ovariectomized rats, *Neuroendocrinology* 88 (2008) 276-286, <https://doi.org/10.1159/000150977>
61. S. G. Iams, J. P. McMurthy, B. C. Wexler, Aldosterone, deoxycorticosterone, corticosterone, and prolactin changes during the lifespan of chronically and spontaneously hypertensive rats,

- Endocrinology 104 (1979) 1357-1363, <https://doi.org/10.1210/endo-104-5-1357>
62. P. J. Hofmann, M. Michaelis, F. G tz, C. Bartel, T. Kienitz, M. Quinkler, Flutamide increases aldosterone levels in gonadectomized male but not female Wistar rats, *Am. J. Hypertens.* 25 (2012) 697- 703, <https://doi.org/10.1038/ajh.2012.21>
63. M. Z. Shukri, J. W. Tan, W. Manosroi, L. H. Pojoga, A. Rivera, J. S. Williams, E. W. Seely, G. K. Adler, I. Z. Jaffe., R. H. Karas, G. H. Williams, J. R. Romero, Biological sex modulates the adrenal and blood pressure responses to Angiotensin II, *Hypertension* 71 (2018) 1083-1090, <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.11087>
64. P. Svitok, L. Molcan, A. Vesela, P. Kruzliak, R. Moravcik, M. Zeman, Increased salt intake during early ontogenesis lead to development of arterial hypertension in salt-resistant Wistar rats, *Clin. Exp. Hypertens.* 37 (2015) 142-147, <https://doi.org/10.3109/10641963.2014.913610>
65. K. I. Strauss, K. R. Isaacs, Q. N. Ha, D. M. Jacobowitz,, Calretinin is expressed in the Leydig cells of rat testis, *Biochim. Biophys. Acta* 1219 (1994) 435-440, [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(94\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0167-4781(94)90069-8)
66. D. Augusto, E. Leteurtre, A. De La Taille, B. Gosselin, X. Leroy, Calretinin: a valuable marker of normal and neoplastic Leydig cells of the testis, *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 10 (2002) 159-162, <https://doi.org/10.1097/00129039-200206000-00011>
67. B. J. Clark, J. Wells, S. R. King, D. M. Stocco, The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormoneinduced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 28314-28322.
68. D. M. Stocco and B. J. Clark, Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells, *Endocr. Rev.* 17 (1996) 221-244, <https://doi.org/10.1210/edrv-17-3-221>
69. L. K. Christenson and J. F. Strauss III., Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol, *Biochim. Biophys. Acta* 1529 (2000) 175-187, [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00147-5](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00147-5)
70. Rust, W., Stedronsky, K., Tillmann, G., Morley, S., Walther, N. and Ivell, R. (1998): The role of SF-1/Ad4BP in the control of the bovine gene for the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein. *J. Mol. Endocrinol.*, 21, 189-200.
71. J. J. Tremblay, F. Hamel and R. S. Viger, Protein kinase A-dependent cooperation between GATA and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors regulates steroidogenic acute regulatory protein promoter activity, *Endocrinology* 143 (2002) 3935-3945, <https://doi.org/10.1210/en.2002-220413>
72. Manna, P.R., Eubank, D.W., Lalli, E., Sassone-Cors, P. and Stocco, D.M. (2003): Transcriptional regulation of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene by the cAMP

- response element binding protein and steroidogenic factor 1. *J. Mol. Endocrinol.*, 30, 381-397.
73. OECD Guideline for the testing of chemicals 456 H295R steroidogenesis assay (Adopted 28 July 2011)

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始多大なる御指導，御鞭撻を賜り，また，本研究の発表および論文執筆にあたって，数多くの有益な御助言を賜りました金城学院大学大学院 人間生活学研究科 篠原康郎教授，日野知証教授，金城学院大学薬学部 大原直樹名誉教授に謹んで深甚なる謝意を表します。