

洗浄した。次いで、MeOH 1 mLx2で溶出する画分を集め、以下既報と同様にTFA処理により蛍光誘導体化し、蛍光検出HPLC分析を行った。なお添加回収実験は、試料20gにアフラトキシンB1,B2,G1,G2を各10ppb添加して行った。

なお本年度は、通知で検査が義務づけられている試料のうち、これまでに検討を行っていない残りのナッツ類（ヘーゼルナッツ、マカデミアナッツ、クルミ、ジャイアントコーン）及び、モニタリングでの試料数の多い、コメ、ソバ、コムギ、緑豆、ゴマ、ブルーポピーシード、キヌア、エンドウ、コショウ、トウガラシ、ナツメグ、セージ、ラベンダー、シナモン、クローブ、コリアンダーシード、クミンシード、セロリシード、タイム、紅茶について検討した。

## C. 研究結果・考察

### C.1 精製法について

検討試料のうち、検査が義務づけられているナッツ類及び、コメ、ソバ、コムギ、緑豆、ブルーポピーシード、キヌアは、多機能カラムにより、HPLC上でほとんど妨害ピークがない程度にまで精製され、添加回収率はB1,B2,G1,G2ともに89~119%の良好な回収率を得た。また、ゴマ、エンドウでも、妨害ピークはほとんどなく、B1,B2,G1,G2ともに81~129%の比較的良好な回収率を得た。他方、香辛料及び紅茶では、妨害ピークが出現した。そこで、残りの部分精製試料液をさらにAFカラムで精製する方法を検討した。同カラムは有機溶媒に弱いことが知られている。一方、アフラトキシンは低極性である。従って、まずMeCN90%溶液である部分精製試料液を減圧乾固後、MeOHで溶解し、さらに水

を加えカラムに負荷することにした。ナツメグ、コショウを用い検討した結果、負荷の際MeOH濃度が高いとG2の回収率が極端に低下し、低いと油分が分離し、負荷できないことが判明した。そこで、前述した条件（MeOH濃度20%）でカラムに負荷し添加回収実験を行った。その結果、コリアンダーシード、クミンシード、クローブを除きB1,B2,G1で68~112%の比較的良好な回収結果を得た。またG2の回収結果は50~90%であった。クローブでは、B1,B2の回収率は、73.81%と良好であったがB2,G2の回収率が極端に悪く、それぞれ7.3%であった。クローブの油分がAFカラムの吸着をさまたげているのかもしれない。また、コリアンダーシードと、クミンシードでは、B1とG1の回収率が低かった（18~53%）。多機能カラムまでの部分精製液をHPLCに負荷したところ、これらのシードでは、無添加の試料で観察された妨害ピークを考慮すると、B1,G1に対応するピーク強度が弱く、多機能カラムの段階でうまく溶出しなかった可能性が考えられた。回収率の悪い物は、油分の多い物が多く、今後、抽出直後、ヘキサンで脱脂の過程を加えることを検討する必要があると思われる。以上の添加回収の結果をTable1,2に示す。

### C.2 コラボ分析

神戸市環境保健研究所で、コショウとトウガラシについて、多機能カラムにAFカラムを組み合わせた分析法のコラボ実験を行ったところ、B1,B2,G1,G2で、70~110%の良好な回収率が得られた。また、都衛研で、多機能カラム法によるナッツ類及び穀類に関する分析を行い、全ての試料について限度値で良好な添加回収結果を得た。マイコトキシン検査協会では、自然汚染ピーナッツを用い、多

機能カラム法と従来法、自然汚染トウガラシを用い、多機能カラム+A Fカラム法と従来法の比較を行った。その結果、ピーナッツ採取量 20 g の時、従来法  $26.8 \pm 1.6$  ppb, 多機能カラム法  $25.9 \pm 2.5$  ppb, 50 g の時、従来法  $25.9 \pm 2.5$  ppb, 多機能カラム法  $26.8 \pm 0.3$  ppb; トウガラシ 採取量 20 g の時、従来法  $35.0 \pm 3.9$  ppb, 多機能カラム法  $33.7 \pm 2.6$  ppb, 50 g の時、従来法  $31.4 \pm 2.7$  ppb (以上すべて B1) となり、全てのケースで、従来法とほぼ等しい値が得られることが判明した。なお、協力研究者より、HPLCでは、従来法でA F不検出の試料でも、アフラトキシンの保持時間で微量のピーク(0.1-2.4PPB)が検出され、定量値を出す必要がある場合、これらのピークの確認法が重要である事及び、香辛料では、A Fカラムに負荷する前に生じるの油分の処理が難しい旨の指摘があった。また、香辛料等乾燥しているものでは、抽出溶媒量を多くする必要も指摘された。

### C.3 確認分析

A Fカラムを用いる方法は、多機能カラムだけで分析した試料の確認分析法としてして

利用可能である。また、多機能カラム+A Fカラムで分析した試料の場合には、誘導体化しないことで、蛍光が消失することで行うことが可能である。また、蛍光の多次元検出器を用いる手法も検討中である。

### D. 結論

多機能固相抽出カラムとHPLCを利用した方法は、簡便である上、毒性の高い溶媒を利用しないアフラトキシニン分析法であるが、通知で分析が義務づけられた、全ての試料及びコメ、コムギ、ソバについて、良好な回収率で分析が可能であった。また、モニタリングで分析が必要な試料の多くで、A Fカラムを併用することで分析が可能であることが判明した。これらの結果は、コラボ実験でも確認されており、また従来法とほぼ同等の精度及び正確さで分析可能であることが判明した。今後、本法を公定法とするために、確認分析法としての多次元検出器及びTLCの利用、油分の処理法、抽出溶媒量等を含め、より細部を検討する必要がある。

Recoveries of aflatoxins from cereals by multifunctional column method  
(n=3)

| Samples          | Added<br>(each, ng/g) | Recovery (%) |       |       |       |
|------------------|-----------------------|--------------|-------|-------|-------|
|                  |                       | B1           | B2    | G1    | G2    |
| Macadamia nuts   | 10                    | 97.2         | 95.5  | 95.5  | 92.3  |
| Pine nuts        | 10                    | 96.4         | 88.6  | 92.8  | 95.2  |
| Walnuts          | 10                    | 95.2         | 98.0  | 100.5 | 94.4  |
| Hazelnuts        | 10                    | 92.6         | 89.2  | 90.2  | 92.5  |
| Giant corn       | 10                    | 95.2         | 91.2  | 89.8  | 94.2  |
| Buckwheat        | 10                    | 87.6         | 98.8  | 95.8  | 105.3 |
| Rice             | 10                    | 109.0        | 109.1 | 99.6  | 114.1 |
| Wheat            | 10                    | 116.2        | 109.0 | 112.3 | 118.6 |
| "Midori-mame"    | 10                    | 113.8        | 112.0 | 112.0 | 106.7 |
| Sesame           | 10                    | 81.3         | 96.5  | 114.5 | 93.8  |
| Blue poppy seeds | 10                    | 93.7         | 104.6 | 107.0 | 104.1 |
| Quinoa           | 10                    | 101.3        | 105.1 | 100.4 | 101.8 |
| Pea              | 10                    | 118.4        | 121.4 | 128.9 | 121.4 |

Recoveries of aflatoxins from peppers by multifunctional column /  
affinity column method (n=2)

| Samples          | Added<br>(each, ng/g) | Recovery (%) |       |       |       |
|------------------|-----------------------|--------------|-------|-------|-------|
|                  |                       | B1           | B2    | G1    | G2    |
| White pepper *   | 10                    | 87.5         | 69.0  | 79.5  | 56.1  |
| Red pepper*      | 10                    | 96.9         | 112.6 | 100.6 | 104.4 |
| Nutmeg           | 10                    | 102.7        | 73.6  | 112.3 | 57.1  |
| Sage             | 10                    | 87.9         | 80.1  | 106.3 | 64.8  |
| Lavender         | 10                    | 94.3         | 93.9  | 98.8  | 79.0  |
| Cinnamon         | 10                    | 70.5         | 78.3  | 77.6  | 58.8  |
| Tea              | 10                    | 97.6         | 83.8  | 101.3 | 49.7  |
| Coriander seeds* | 10                    | 21.2         | 109.6 | 20.4  | 93.9  |
| Clove*           | 10                    | 78.5         | 7.4   | 84.9  | 3.8   |
| Cumin seeds*     | 10                    | 49.6         | 103.0 | 52.8  | 68.9  |
| Celery seeds*    | 10                    | 68.2         | 97.8  | 68.5  | 62.5  |
| Thyme*           | 20                    | 68.1         | 96.5  | 69.5  | 87.4  |

\*, n=3

分担研究報告書

菜種油中のステロール類の検査と  
評価に関する研究

分担研究者 内山貞夫

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
（分担研究報告）

研究課題：食品中の有害物質等の評価に関する研究

分担研究項目：菜種油中のステロール類の検索と評価に関する研究

分担研究者： 内山貞夫 （財）食品薬品安全センター、秦野研究所  
食品衛生外部精度管理調査事業部長

協力研究者： 川崎 勝 食品衛生外部精度管理調査事業部 調査事業管理班長  
大原直樹 研究部 薬理研究室長

研究要旨

脳卒中易発性ラット（SHR-SP）への投与で大豆油などに比べ生存期間が短縮されるとの報告があった菜種油において、その原因物質として現在注目されている菜種油（カノーラ油）中の植物ステロール類の詳細な帰属と菜種油投与群中の心臓及び血管中の蓄積植物ステロールならびに菜種油摂取による生体機能の変化について調べた。

菜種油に含まれる植物ステロールをGC/MSで帰属確認し、SIM法で定量した結果、 $\beta$ -シトステロール、カンペステロール、ブラシカステロールが検出され、量的には大きい方からこの順で含有していた。大豆油では、ブラシカステロールは検出されず、 $\beta$ -シトステロール、カンペステロール、ステイグマステロールがこの順で含有していたが、これらの総植物ステロールは菜種油の方が2倍含有した。これらの食用油を29週間混餌投与したSHRラットの心臓及び大動脈血管中には、共に菜種油投与でカンペステロール及び $\beta$ -シトステロールの蓄積が観察されたが、ブラシカステロールが検出されなかった。大豆油ではカンペステロール及び $\beta$ -シトステロールの蓄積が観察されたが、ステイグマステロールは検出されなかった。菜種油投与で蓄積された総植物ステロール量は、心臓で3倍弱、血管で2倍弱、大豆油より多く蓄積されており、細胞膜の脆弱化になんらかの影響を与える可能性もあったが、さらに検討する必要があった。

一方、菜種油及びコレステロール0.6%添加の菜種油を投与したSHR-SPラットの血圧は、大豆油に比較して共に同程度上昇する傾向にあったが、この血圧上昇は菜種油投与による膜の脆弱化と関連性が低かった。腸管膜血管床におけるアラギドン酸投与によるTXA<sub>2</sub>産生が菜種油投与群の方が大豆油より増大する傾向にあり、TXA<sub>2</sub>による血圧上昇の可能性があった。また、菜種油投与で総及びウアバイン感受性Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase活性がともに高値を示し、K<sup>+</sup>free誘発収縮反応は有意に増強されたことから、膜透過性の亢進による増大した細胞内ナトリウムあるいはカルシウムを汲み出すためにNa<sup>+</sup>ポンプ活性が上昇する可能性があった。コレステロール添加菜種油投与群の摘出大動脈標本反応は大豆油投与群に近かったことから、菜種油中のステロールが膜の構成を妨害することで膜の機能に影響を与える可能性が示唆された。

## A. 研究目的

菜種油は、わが国で主に消費する食用油の一つとして重要であり、大部分が外国から輸入されている食用油である。最近、国内の研究者によって菜種油の投与した脳卒中易発性ラット (SHR-SP) では大豆油など他の食用油に比べ平均寿命が短縮されるとの報告があった。菜種油の安全性の確認のため、分担研究者らのグループでは新たにSHRラット及びWKYラットを用いた実験を行った結果、菜種油投与群で大豆油投与群に比べ、血圧の上昇が観察され、生存期間の短縮は別の要因であることが判明している。

本研究では、この原因物質として菜種油中に多く含まれる植物ステロール類等の未知物質と考え、菜種油中の植物ステロール類のより詳細な検索による帰属と、菜種油投与群中の心臓及び血管中の蓄積植物ステロールを量的に検討した。また、菜種油摂取による生体機能の変化として、血管作用のあるプロスタグランジン類の生成及び生体膜の機能について検討し、さらに生存期間短縮の機能的要因も検討した。

以下、「I. 菜種油中のステロール類の確認と投与ラット心臓及び血管中の分布」及び「II. 菜種油投与による機能的変化について」と分割して報告する。

### I. 菜種油中のステロール類の確認と投与ラット心臓及び血管中の分布

## B. 研究方法

自然発症高血圧ラット (SHR) を4週齢で購入し5週齢より食用精製菜種油 (吉原製油(株)、Lot : 940624-71) または大豆油 (吉原製油(株)、Lot : 940620-54) を10%含有する精製粉末試料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業(株)) を1%食塩水負荷の条件で26週間混餌投与した。

### 1. 菜種油中のステロール類の確認と定量

菜種油はアルカリ鹼化後 BSTFAでシリ

ル化を行い、市販のステロール標準品 (コレステロール、ブラジカステロール、エルゴステロール、カンペステロール、ステイグマステロール、 $\beta$ -シトステロール、ラノステロール) はシリル化のみを行って GC-MS(SCAN)法により、保持時間とMSクロマトグラムの直接比較を行い帰属を行った。

#### 1-a) 菜種油及び標準品の調製

菜種油 1g を EtOH 性カリウム EtOH 溶液 50mL で 100℃ 1時間還流した。その後水 100 mL を加え ether 100 mL で 2回振盪抽出を行った。有機層を合わせ、水 30 mL で 5回洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥濾過して濃縮乾涸して残渣をクロロホルム 5 mL に溶解した。溶液 0.5 mL を  $N_2$  気流中で乾涸し、残渣に BSTFA (500  $\mu$ L) を加え 100℃ で 1時間反応した。反応生成物を  $N_2$  気流中で乾涸し、残渣をヘキサン 20 mL で定容した。ヘキサン溶液 1 mL をバリアン (社) 製 Bond elute FL (500 mg / 10 mL) に負荷しヘキサン 5 mL、ヘキサン/アセトン (17 : 3) 5 mL、で順次溶出し、ヘキサン/アセトン層を GC/MS 用の試料とした。

#### 1-b) GC-MS測定条件

GC-MSの測定条件は以下の通りである。  
カラム : DB5-ms 30m X 0.25 I.D.; 0.25  $\mu$ m ; キャリアーガス : He (20ml/min); オープン : 50 °C (1.5 min)  $\rightarrow$  300 °C (20 min), 20 °C/min; 気化室温度 : 250 °C、注入量 : 1  $\mu$ L (スプリットレス); サンプリング時間 : 1.00 min  
MS条件 : イオン化法 EI, イオン化電圧 70eV ; スキャンパラメーター : 検出器ゲイン 2.5 kV ; 測定時間 : 15.00 - 26.00 min; 測定質量数: m/z 100 ~ 550.

#### 1-c) 菜種油中のステロール類の定量

菜種油中のステロール類の定量は絶対検量線法による選択的イオンモニター (SIM) 法により行い、その詳細は表 1 に示した。

### 2. 心臓及び血管中のステロール類の確認

## 認と定量

臓器（心臓、大動脈）の重量測定後、全量を前項目1-a)に準じて反応し、最終液の濃度を溶剤で適宜希釈して、GC-MS用の試料とした。ピークの確認試験はGC-MS(SCAN)法により、保持時間とGC-MS(SCAN)のクロマトグラムが一致することにより行った。蓄積されたステロール類の定量は絶対検量線法による選択的イオンモニター(SIM)法により行い、その詳細は表1に示した。

## C. 結果

### 1. 菜種油及び大豆油中のステロール類の確認と定量

菜種油中のステロール類をアルカリ鹼化後 GC-MS(SCAN)法により保持時間とクロマトグラムを比較したところ、ブラジカステロール(図1)、カンペステロール(図2)、 $\beta$ -シトステロール(図3)が標準品と一致した。GC上従来未知ピークが今回ブラジカステロールであると始めて明らかになった。大豆油にはカンペステロール、ステイグマステロール、 $\beta$ -シトステロールを確認した。

菜種油及び対照群として的大豆油のステロールはGC-MS(SIM)法(図4)で測定し、その定量値は表2と図5に示した。その結果、菜種油の総植物ステロールは567.47 mg/100gで、大豆油は256.98 mg/100gで約2倍菜種油の方が多かった。

### 2. 心臓及び血管中の植物ステロール類の確認と定量

菜種油及び大豆油を投与した SHRラットの心臓と血管中のステロールのクロマトグラムは図6に示した。菜種油及び大豆油の心臓及び血管からカンペステロールと $\beta$ -シトステロールが検出された。これらのステロールは GC-MS(SCAN)法によりステロール標準品との保持時間とMSクロマトグラムの一致をもって同定した。図7にカンペステロールと菜種油投与SHRラットの心臓のMSクロマトグラムの比較を示したが、両者共に良く一致し

た。

次に心臓及び血管中の植物ステロール含量を比較した(表3、表4、図8、図9)。総植物ステロールを比較すると菜種油投与群の方が、心臓で約3倍弱、血管で2倍強多かった。

個別のステロールを心臓及び血管別に比較すると、心臓中のステロール含量の比較は表3と図8に示したが、カンペステロールは菜種油投与群が大豆油投与群に比べて約4倍多く蓄積し、 $\beta$ -シトステロールはほぼ同じ量蓄積されていた。さらに血管中のステロール組成は心臓とほぼ同様の傾向を示し、菜種油投与群はカンペステロールが大豆油投与群の3倍、 $\beta$ -シトステロールは等量とほぼ同様の結果と成った。なお同様の結果はWKYラットでも得られている。

## D. 考察

### 1. 菜種油中のステロール類の確認と定量

菜種油及びその対照群として的大豆油のステロール類をアルカリ鹼化、シリル化、固相抽出による精製を行いGC-MSを用いて確認試験をSCAN法、定量をSIM法を用いて行った。今回菜種油のGC-MSのクロマトグラムの主要なピークをSCAN法で総て帰属し、従来未同定のブラジカステロールのピークも帰属した。今回このブラジカステロールを加えたSIM法による定量法を検討した。このSIM法はステロールの分子イオンピーク、分子イオンピークからTMSが脱離したイオン、 $\text{TMS}^+ \text{C}_3\text{H}_5\text{O}$ 等のイオンを中心に選択したのでステロールの構造に特異的に応答し、夾雑物の影響を受けにくく、感度の良い測定法となった。

菜種油及び対照群として的大豆油のステロールを測定し、その定量値は表2と図5に示した。その結果、今回使用した菜種油の総植物ステロールは大豆油に比べ約2倍多く、より多量の植物ステロールが投与されたことが判明した。

## 2. 心臓及び血管中の植物ステロール類の確認と定量

菜種油及び大豆油を投与した SHR ラットの心臓と血管中のステロールのクロマトグラムは図 6 に示したが、心臓及び血管中からカンペステロールと  $\beta$ -シトステロールが検出された。これらのステロールは SCAN 法によりステロール標準品との保持時間と MS クロマトグラムが一致することにより総て帰属された。図 7 にカンペステロールと菜種油投与 SHR ラットの心臓の MS クロマトグラムの比較を示したが、両者共に良く一致した。

心臓及び血管中の植物ステロール含量は表 3 と表 4 に示したが、蓄積した総植物ステロール含量を比較すると菜種油投与群の方が心臓で 3 倍弱血管で 2 倍強多く蓄積していた。心臓中のステロール含量の比較は表 3 と図 8 に示した。カンペステロールは菜種油投与群が大豆油投与群に比べて約 4 倍多く蓄積し、 $\beta$ -シトステロールはほぼ同じ量蓄積されていた。菜種油ではブラジカステロールが 54.48 mg/100g、大豆油ではステイグマステロールが 41.33 mg/100g 含有しているにも係わらず、今回心臓中には検出されなかった。カンペステロールは菜種油には大豆油の約 4 倍弱含有しているが、心臓中のカンペステロールの量は菜種油が大豆油に対して 4 倍弱と容量依存的に蓄積していた。 $\beta$ -シトステロールはカンペステロールと比較して菜種油には 329.22 mg/100g、大豆油には 168.68 mg/100g と相対的に多く含有しているにも係わらず、心臓中には菜種油で 33.51  $\mu$ g/g 大豆油で 24.69  $\mu$ g/g と相対的に低い含有量を示した(表 3、図 8)。

血管中の植物ステロール組成は心臓とほぼ同様の傾向を示し、菜種油投与群はカンペステロールが大豆油投与群の 3 倍、 $\beta$ -シトステロールは等量とほぼ同様の結果となった(表 4、図 8)。なお同様の結果は予試験的に WKY ラットでも得られた。

以上より菜種油投与群と大豆油投与群

を比較すると、 $\beta$ -シトステロールはもとの油には多く含有するものの、蓄積量は少なく両群で差がなかった。カンペステロールは菜種油と大豆油の組成比がそのまま蓄積される傾向を示した。ブラジカステロールとステイグマステロールは今回臓器中からは検出されなかった。

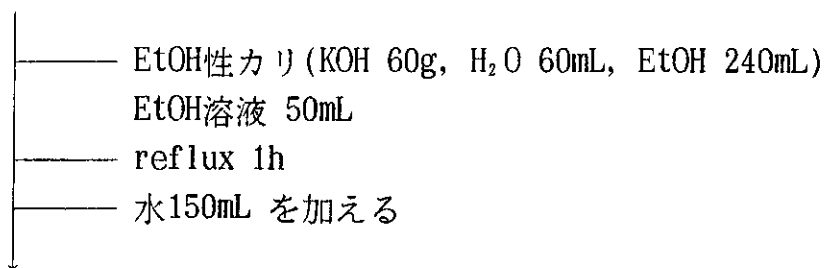
カナダの Ratnayake (Health & Welfare Canada) は、植物油のラットの早死傾向の原因について、植物ステロールが細胞膜を構成するコレステロールに作用して膜の脆弱化を誘起することにより生存期間の短縮を引き起こすという仮説を提唱している。今回蓄積した総植物ステロール含量を比較すると菜種油投与群の方が心臓で 3 倍弱血管で 2 倍強多かったことと、臓器中の蓄積植物ステロール量に両群に差が観察されたことで、この仮説の可能性が示唆された。しかし、菜種油と大豆油の植物ステロール組成が異なるなど、さらに検討する必要がある。今後は *in vitro* の系を用いて更に検討を加える必要がある。

## D. 結論

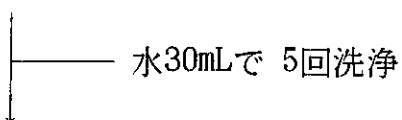
菜種油と大豆油には植物ステロールが含有しているが、この油を投与した SHR ラットの心筋と大動脈にこれらの植物ステロールが蓄積していることが明らかとなった。蓄積量を菜種油投与群と大豆油投与群を比較すると、総植物ステロールは心筋、血管共に菜種油投与群の方が多く、 $\beta$ -シトステロールはもとの油には多く含有するものの、蓄積量は少なく両群で差がなかった。カンペステロールは菜種油と大豆油の組成比がそのまま蓄積される傾向を示した。ブラジカステロールとステイグマステロールは今回心臓及び血管中からは検出されなかった。このステロール類の生理作用はさらに検討を要する。



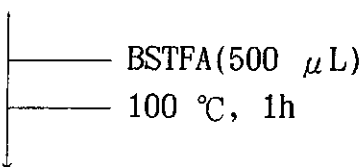
試料 (油1g)



↓  
Ether 100mL で 2回振盪抽出



↓  
溶媒留去後  $\text{CHCl}_3$  5mL に溶解  
0.5mL(油100mg 相当) を反応する。



↓  
 $\text{N}_2$  気流下で濃縮乾涸しn-Hexaneを20mLを加える  
1mL をBond Elute Florisil に負荷する。

Hexane (5mL) Fr. 1, Hexane/Acetone (17:3) Fr. 2 で  
順次溶出し、Fr. 2 をGC/MS 用の試料とする。

#### GC/MS 測定条件

カラム : DB5-ms 30m X 0.25 I.D., 0.25  $\mu\text{m}$

キャリアーガス : He (20ml/min)

オープン : 50 °C (1.5 min) → 300 °C (20 min), 20 °C/min

気化室温度 : 250 °C

注入量 : 1  $\mu\text{L}$  (スプリットレス) ; サンプルング時間 : 1.00 min

MS条件 : イオン化法 EI, イオン化電圧 70eV

スキャンパラメーター : 検出器ゲイン 2.5 kV

測定時間 : 19.00 - 26.00 min

Scheme 1 試料の調製法とGC-MS の測定条件

表 1 ステロールの保持時間、分子量、質量数、選択したイオンの帰属、定量下限

| ion set  | No 成分名                  | 保持時間 (min) | 分子量 | 質量数 (m/z) | 選択したイオンの帰属   | 定量下限 ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|--|-------------------------|------------|-----|-----------|--|---------------------------|
| #1   | 1a cholesterol          | 20.94      | 458 | 458       | [M] <sup>+</sup>                                     | 0.5                       |
|  | 1b                      |            |     | 329       | [M-C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O-TMS] <sup>+</sup> | 0.5                       |
|  | 1c                      |            |     | 129       | [C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O+TMS] <sup>+</sup>   | 0.05                      |
|  | 2a brassicasterol       | 21.57      |     | 470       | [M] <sup>+</sup>                                     | 0.5                       |
|  | 2b                      |            |     | 380       | [M-90] <sup>+</sup>                                  | 0.5                       |
|  | 2c                      |            |     | 129       | [C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O+TMS] <sup>+</sup>   | 0.5                       |
|  | 測定時間(min) : 19.00-21.80 |            |     |           |  |                           |
| モニターするイオン(m/z) : 458, 329, 129, 470, 380           |                         |            |     |           |  |                           |
| #2   | 3a ergosterol           | 21.73      | 468 | 469       | [M+1] <sup>+</sup>                                   | 5.0                       |
|  | 3b                      |            |     | 363       | [M-TMS-18-15] <sup>+</sup>                           | 0.5                       |
|  | 3c                      |            |     | 129       | [C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O+TMS] <sup>+</sup>   | 0.5                       |
|  | 4a campesterol          | 22.08      | 472 | 473       | [M+1] <sup>+</sup>                                   | 5.0                       |
|  | 4b                      |            |     | 382       | [M-TMS-18] <sup>+</sup>                              | 0.5                       |
|  | 4c                      |            |     | 129       | [C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O+TMS] <sup>+</sup>   | 0.5                       |
|  | 5a stigmasterol         | 22.48      | 484 | 484       | [M] <sup>+</sup>                                     | 0.5                       |
|  | 5b                      |            |     | 394       | [M-TMS-18] <sup>+</sup>                              | 0.5                       |
|  | 5c                      |            |     | 129       | [C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O+TMS] <sup>+</sup>   | 0.05                      |
| 測定時間(min) : 21.80-23.30                            |                         |            |     |           |  |                           |
| モニターするイオン(m/z) : 484, 473, 469, 394, 382, 363, 129 |                         |            |     |           |  |                           |
| #3   | 6a $\beta$ -sitosterol  | 23.60      | 486 | 487       | [M+1] <sup>+</sup>                                   | 0.5                       |
|  | 6b                      |            |     | 396       | [M-TMS-18] <sup>+</sup>                              | 0.5                       |
|  | 6c                      |            |     | 129       | [C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O+TMS] <sup>+</sup>   | 0.5                       |
|  | 7a lanosterol           | 23.90      |     | 426       | [M-TMS] <sup>+</sup>                                 | 5.0                       |
|  | 7b                      |            |     | 411       | [M-TMS-15] <sup>+</sup>                              | 5.0                       |
|  | 7c                      |            |     | 109       | [C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> ] <sup>+</sup>       | 5.0                       |
|  | 測定時間(min) : 23.30-26.00 |            |     |           |  |                           |
| モニターするイオン(m/z) : 487, 426, 411, 396, 129, 109      |                         |            |     |           |  |                           |

表 2 菜種油及び大豆油中のステロール含量

| sterol              | 菜種油    |       | 大豆油    |       |
|---------------------|--------|-------|--------|-------|
|                     | 平均     | 標準偏差  | 平均     | 標準偏差  |
| cholesterol         | 0      | 0     | 0      | 0     |
| brassicasterol      | 54.48  | 13.05 | 0      | 0     |
| ergosterol          | 0      | 0     | 0      | 0     |
| campesterol         | 183.77 | 21.53 | 46.97  | 1.69  |
| stigmasterol        | 0      | 0     | 41.33  | 2.46  |
| $\beta$ -sitosterol | 329.22 | 54.4  | 168.68 | 11.81 |
| lanosterol          | 0      | 0     | 0      | 0     |

表 3 菜種油及び大豆油投与SHRラットの心臓中のステロール含量

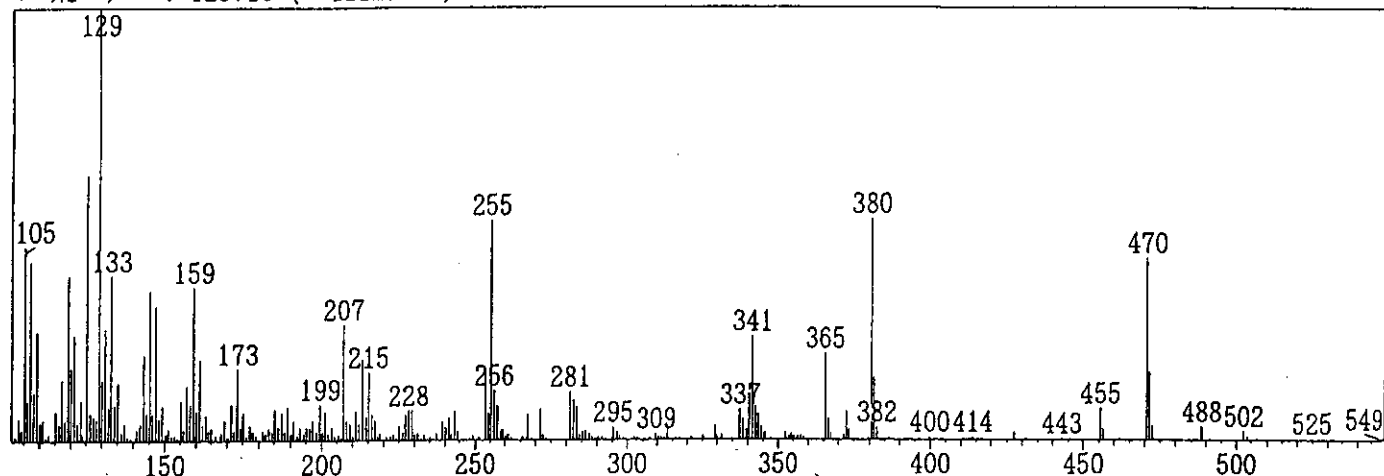
| sterol              | SHR菜種  |       | SHR大豆 |      |
|---------------------|--------|-------|-------|------|
|                     | 平均     | 標準偏差  | 平均    | 標準偏差 |
| brassicasterol      | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 0.00 |
| ergosterol          | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 0.00 |
| campesterol         | 128.20 | 34.48 | 33.34 | 5.46 |
| stigmasterol        | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 0.00 |
| $\beta$ -sitosterol | 33.51  | 13.69 | 24.69 | 7.11 |
| lanosterol          | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 0.00 |

表 4 菜種油及び大豆油投与SHRラットの血管中のステロール含量

| sterol              | SHR菜種  |       | SHR大豆 |       |
|---------------------|--------|-------|-------|-------|
|                     | 平均     | 標準偏差  | 平均    | 標準偏差  |
| brassicasterol      | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 0.00  |
| ergosterol          | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 0.00  |
| campesterol         | 151.46 | 43.43 | 51.34 | 13.99 |
| stigmasterol        | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 0.00  |
| $\beta$ -sitosterol | 40.29  | 5.10  | 37.58 | 10.27 |
| lanosterol          | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 0.00  |

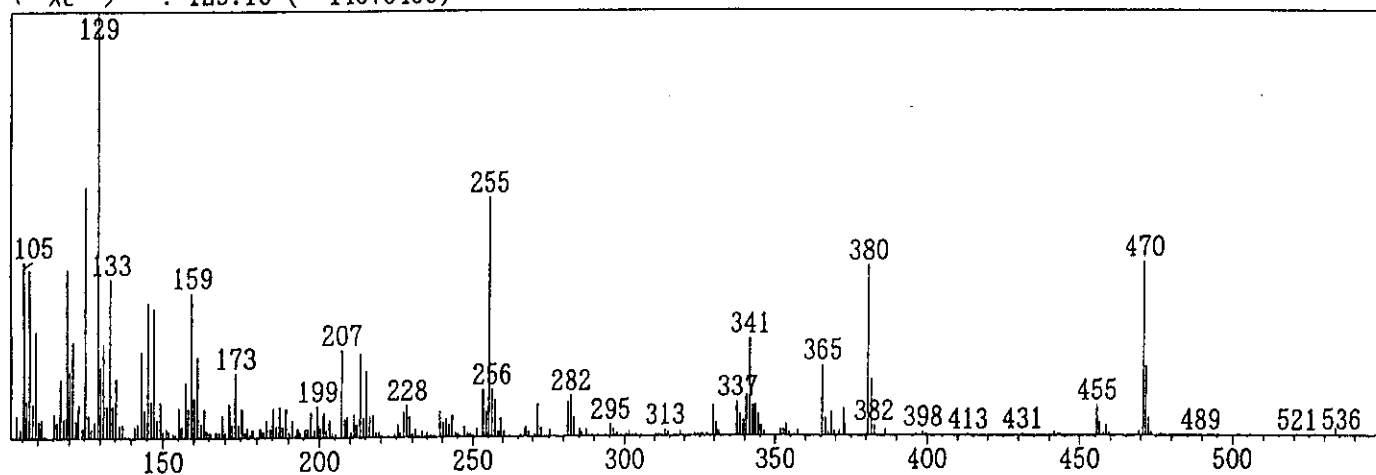
データ : STEE.D03  
 スキャン番号 : 419  
 ピーク数 : 295 保持時間 : 21.483  
 ベースピーク : 129.10 ( 11121662)

ブラジカステロール



データ2 : STEE.D04  
 スキャン番号 : 419  
 ピーク数 : 300 保持時間 : 21.483  
 ベースピーク : 129.10 ( 14675490)

菜種油



Ergosta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol

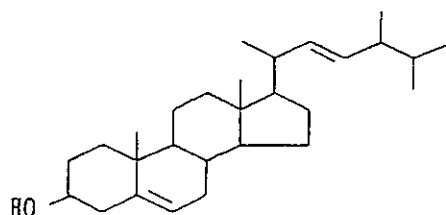
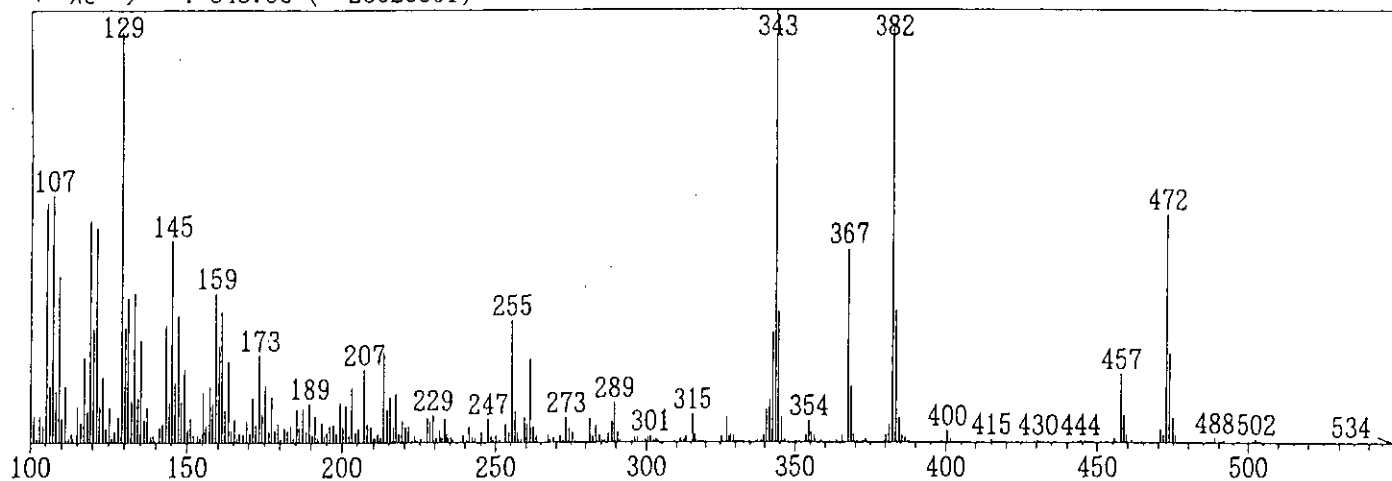


図 1 ブラジカステロール標準品と菜種油のGC-MS(SCAN)による直接比較

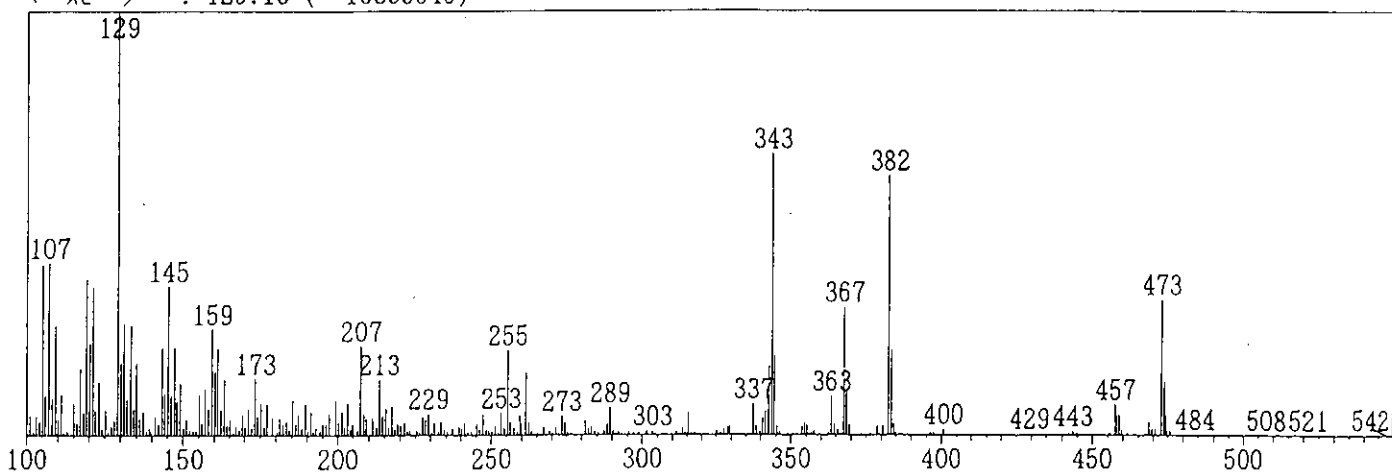
データ1 : STEE.D03  
 スキャン番号 : 548  
 ピーク数 : 322 保持時間 : 22.558  
 ベースピーク : 343.50 ( 23620361)

カンパステロール



データ2 : STEE.D04  
 スキャン番号 : 548  
 ピーク数 : 310 保持時間 : 22.558  
 ベースピーク : 129.10 ( 16895546)

菜種油



(24R)-Ergost-5-en-3 $\beta$ -ol

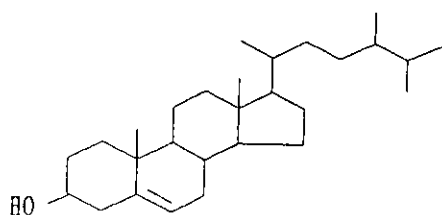
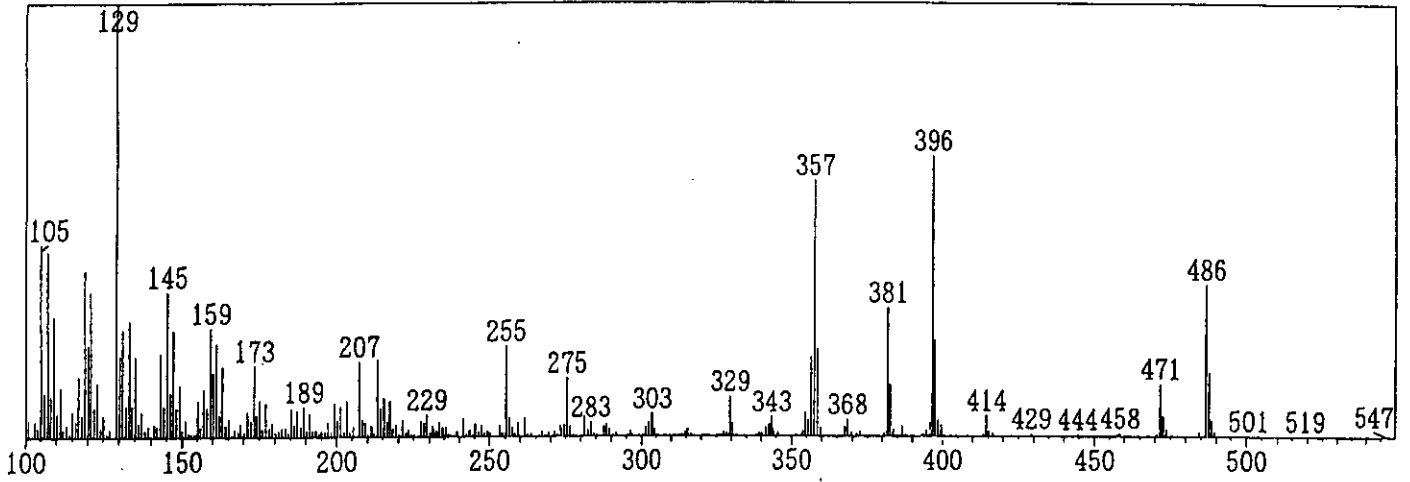


図 2 カンパステロール標準品と菜種油のGC-MS(SCAN)による直接比較

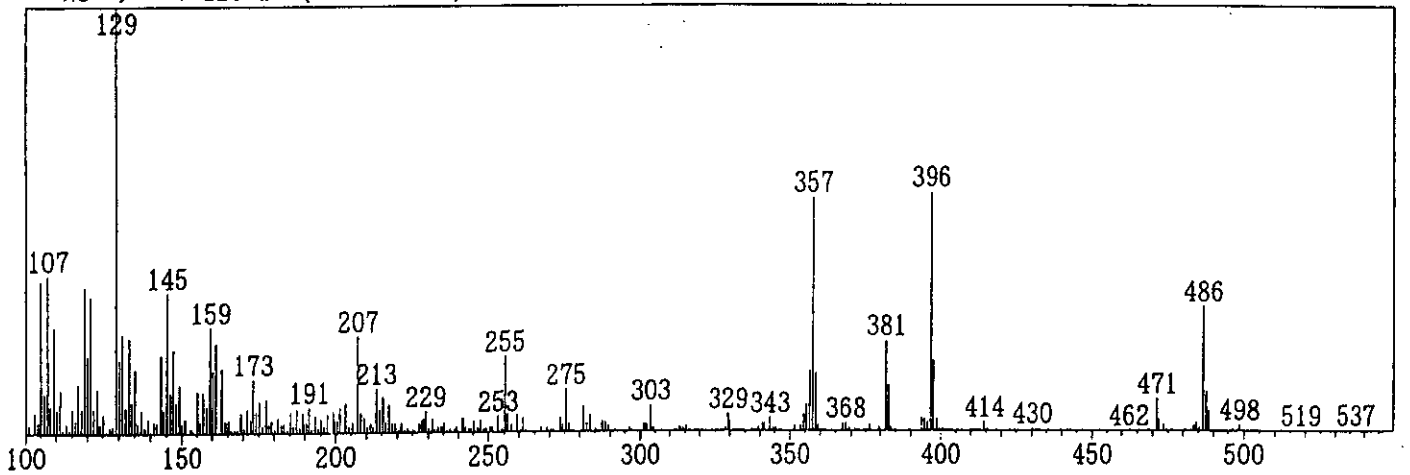
データ1 : STEE.D03  
 スキャン番号 : 739  
 ピーク数 : 320 保持時間 : 24.150  
 ベースピーク : 129.10 ( 18346817)

$\beta$ -シトステロール



データ2 : STEE.D04  
 スキャン番号 : 739  
 ピーク数 : 298 保持時間 : 24.150  
 ベースピーク : 129.10 ( 13143855)

菜種油



Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol

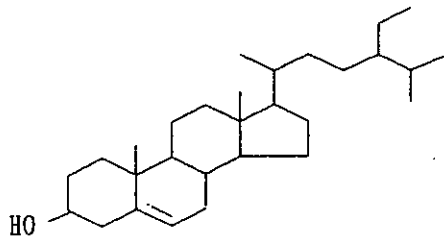
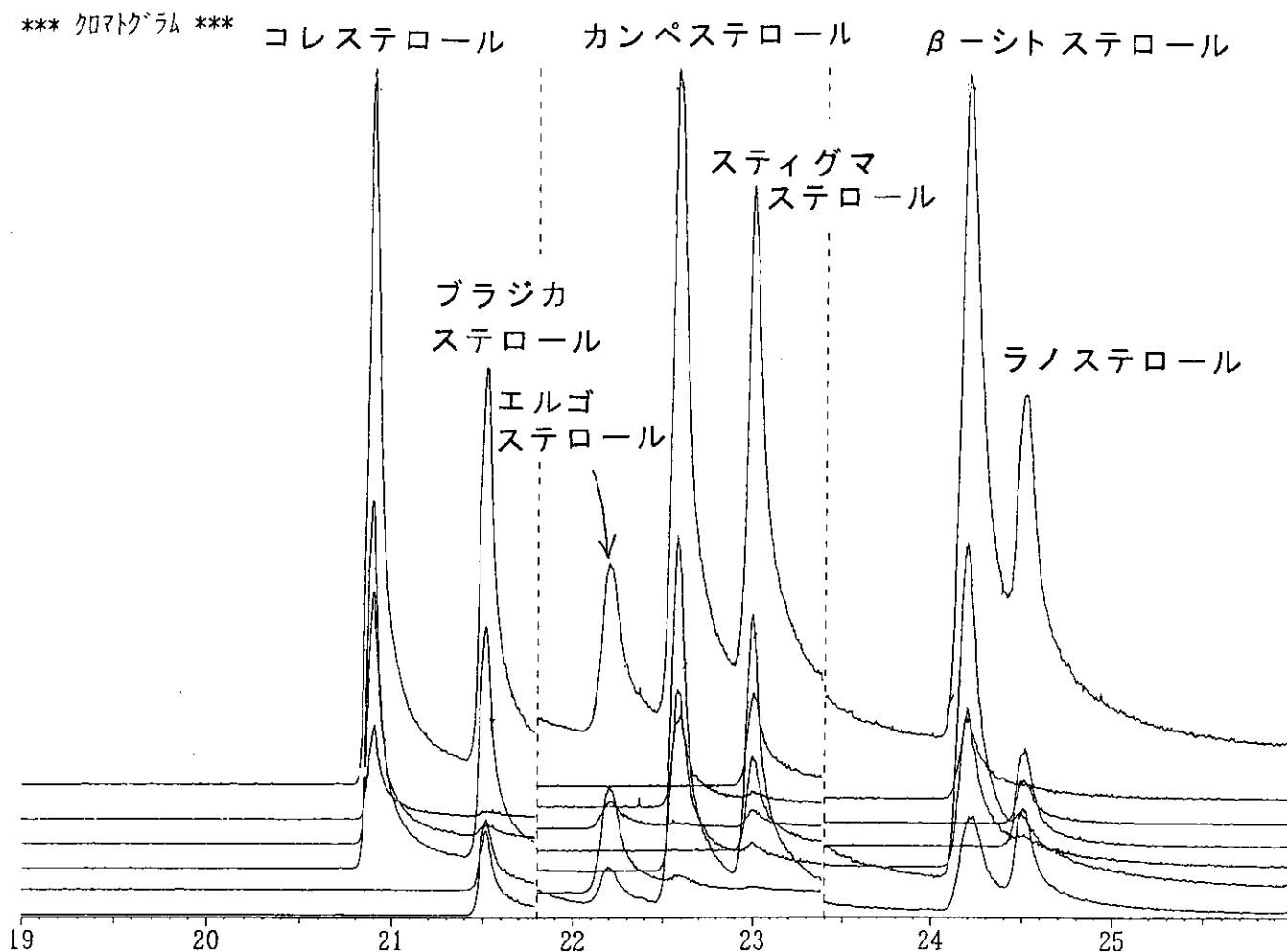


図 3  $\beta$ -シトステロール標準品と菜種油のGC-MS(SCAN)による直接比較



イオン番号 : 1 SIM = 2871613  
 TIC 458.00 329.00 129.00 470.00 380.00

イオン番号 : 2 SIM = 2560803  
 TIC 484.00 473.00 469.00 394.00 382.00 363.00 129.00

イオン番号 : 3 SIM = 1881075  
 TIC 487.00 426.00 411.00 396.00 129.00 109.00

図 4 GC-MS(SIM)によるステロール標準品のクロマトグラム

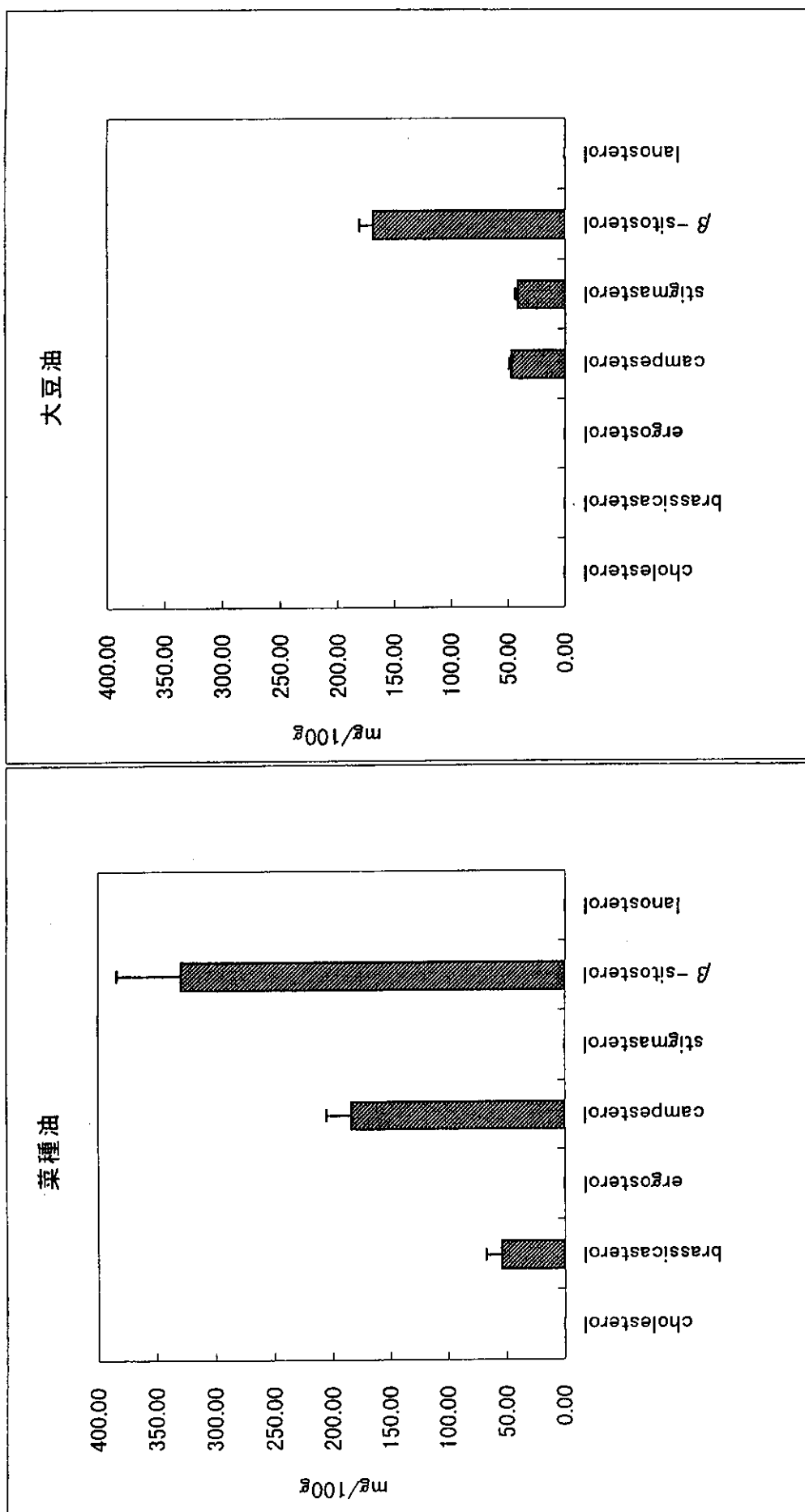


図 5 菜種油及び大豆油のステロール含量



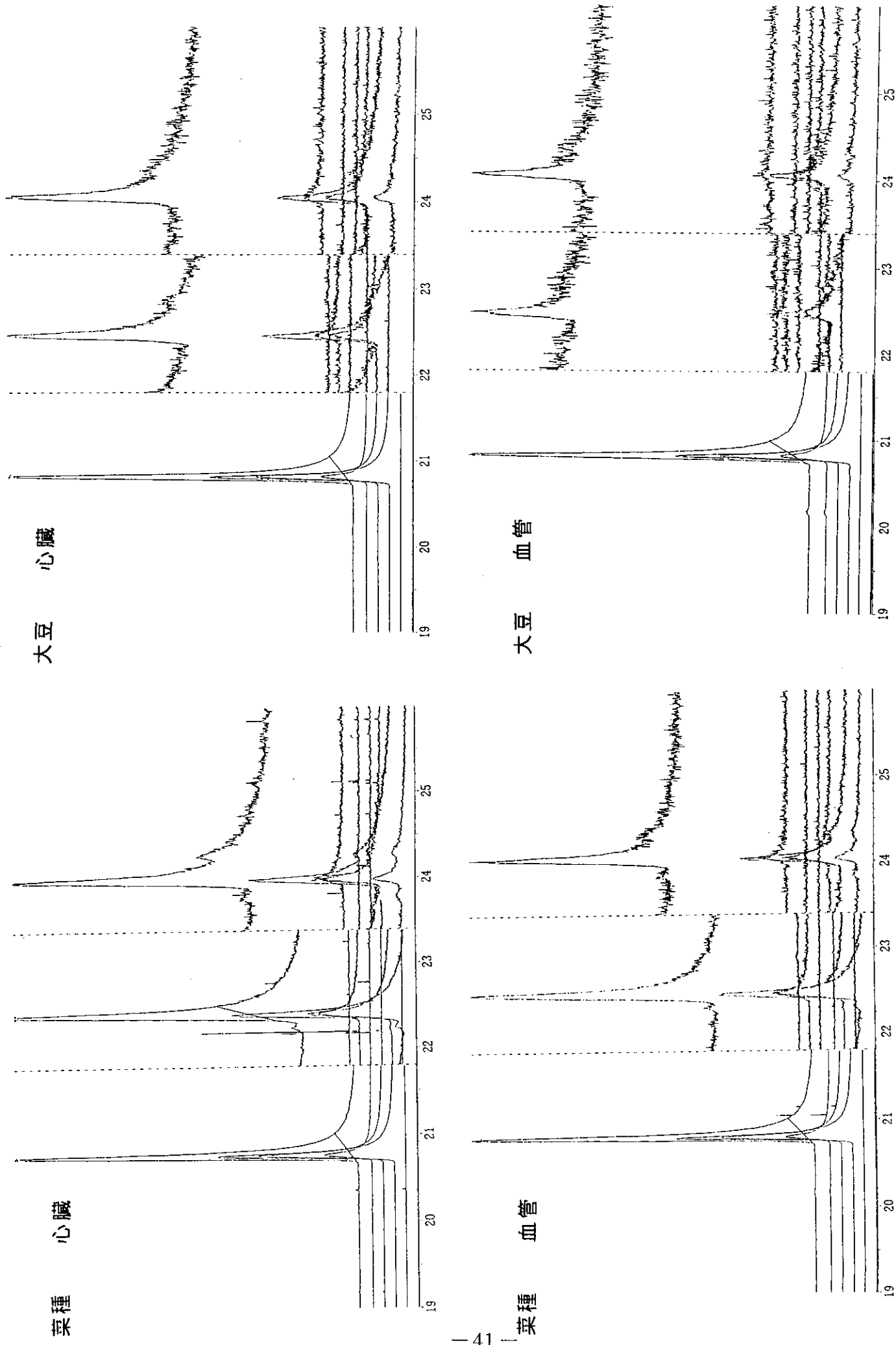
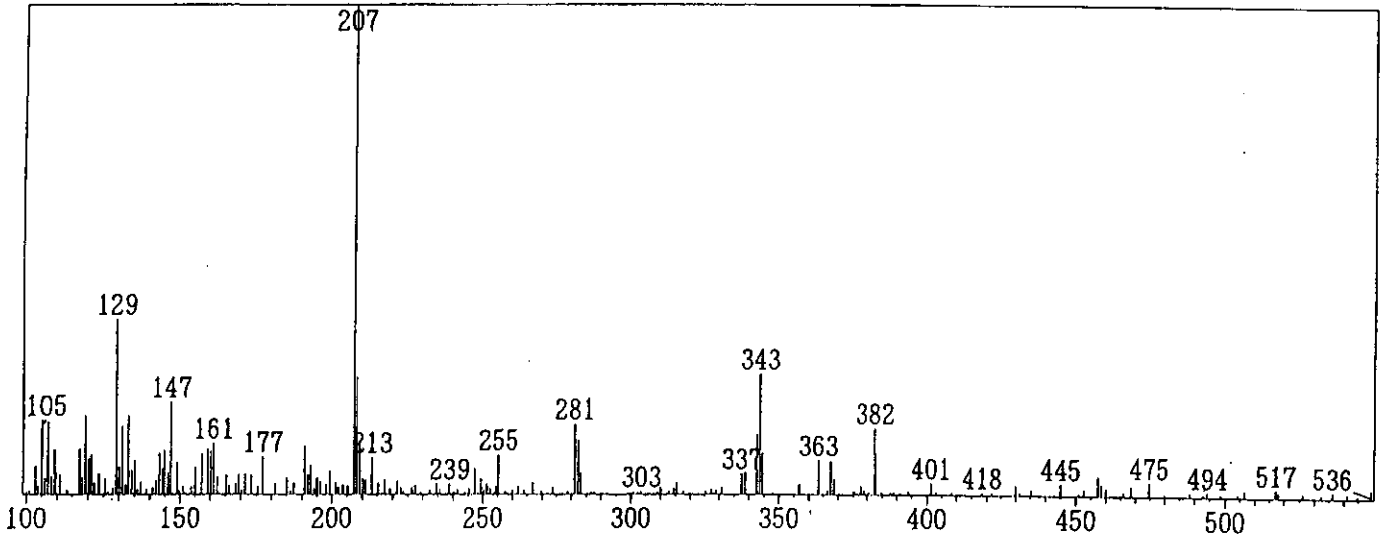


図 6 大豆油及び菜種油投与SHRラットの心臓及び血管中のステロールのクロマトグラム

スキャン番号 : 549  
ピーク数 : 194 保持時間 : 22.567  
ベースピーク : 207.15 ( 2249503)

カンペステロール



スキャン番号 : 541  
ピーク数 : 166 保持時間 : 22.500  
ベースピーク : 207.00 ( 1470115)

菜種油投与SHRラットの心臓

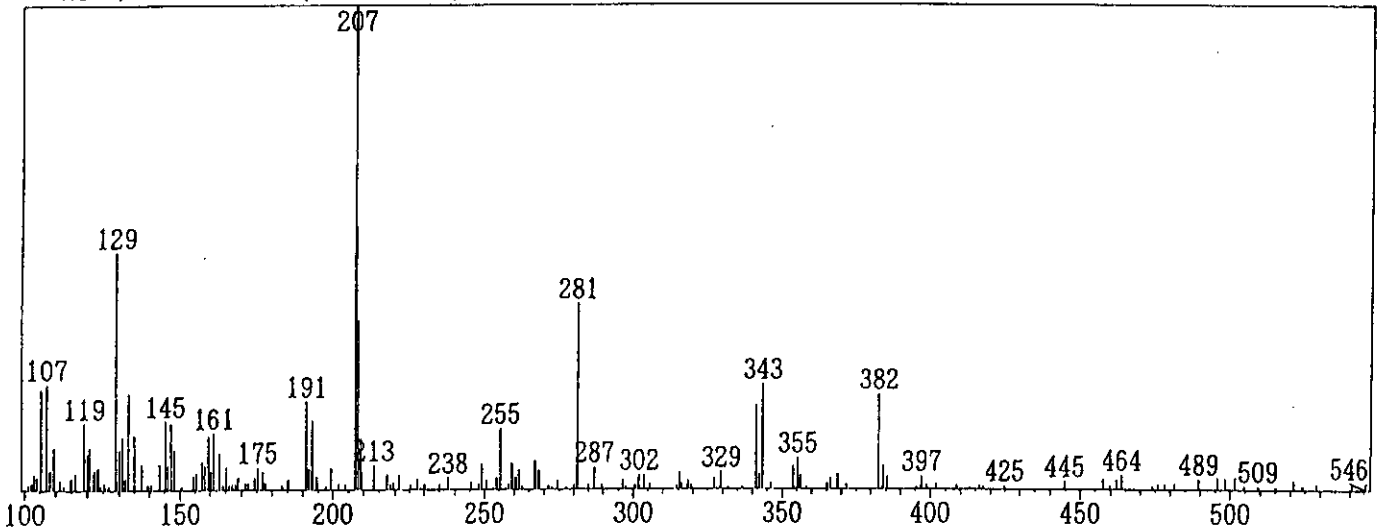


図 7 カンペステロールと菜種油投与SHRラットの心臓のクロマトグラム

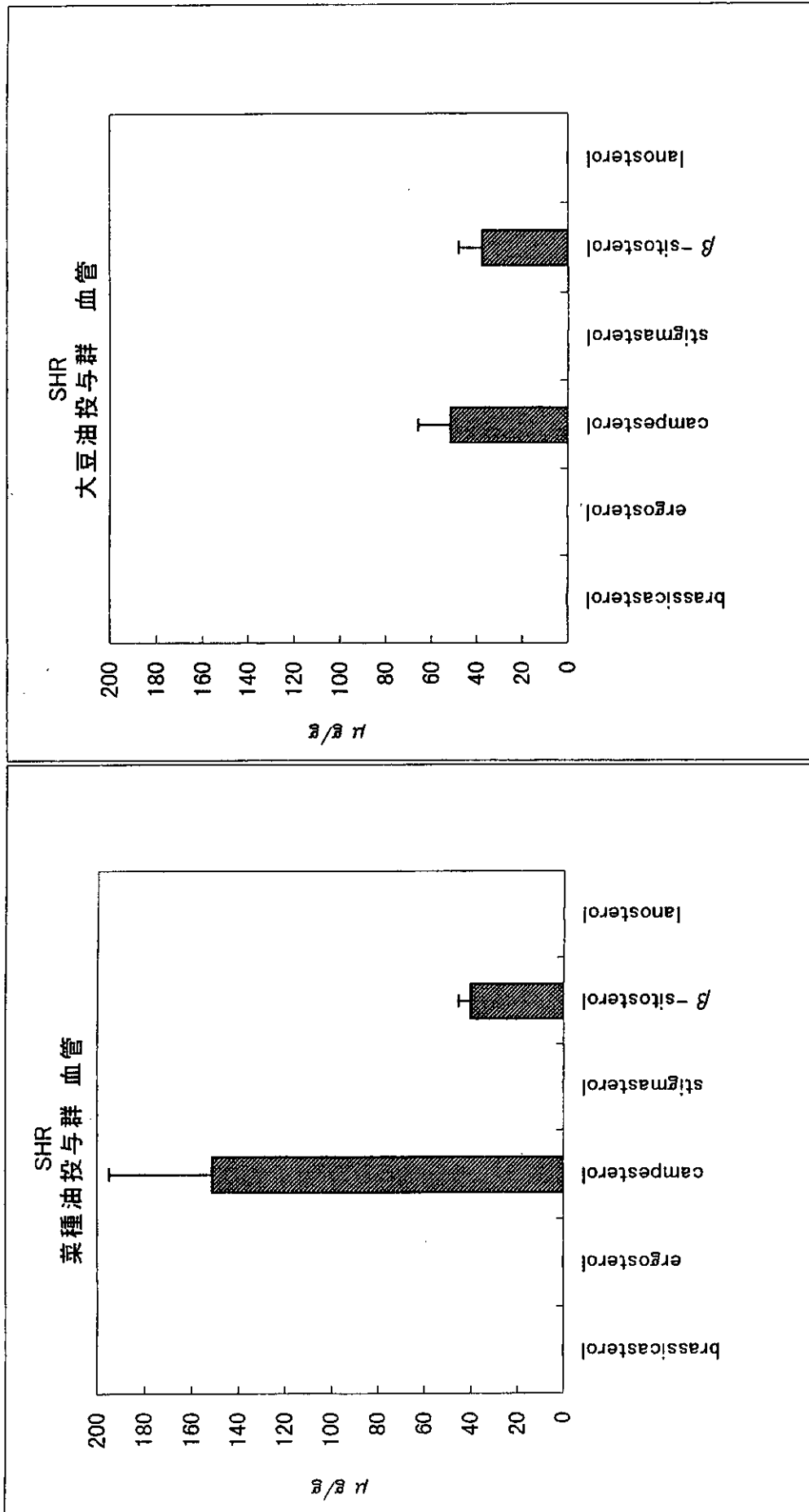


図 9 菜種油及び大豆油投与SHRラットの血管中のステロール含量

## II. 菜種油投与による機能的変化について

### B. 研究方法

脳卒中易発性自然発症高血圧ラット (SHR-SP、雄30匹) を1群10匹からなる3群に分け、ダイズ油、菜種油 (キャノーラ油) および600mg/100gコレステロール添加キャノーラ油投与群とした。脱脂精製飼料を与え、摂餌量の10w%の油脂を毎日28~42日間強制経口投与した。

#### 1. 血圧測定

投与開始4週まで尾動脈収縮期圧を毎週1回非観血的に測定し、コレステロール強化がキャノーラ油による昇圧に影響を及ぼすか否かを検討した。

また、投与28日以降に下記の実験を行った。

#### 2. 溶血試験

動物をペントバルビタール麻酔し、腹部下大静脈から得た赤血球を用い、濃度勾配 (0.1~0.85%) のあるリン酸緩衝生理食塩液で2%赤血球浮遊液を調製し、室温に30分間放置後、上清の540nmにおける吸光度を測定した。これにより、キャノーラ油による膜の脆弱化が起こるか否か、また、膜の脆弱化がコレステロール強化により軽減されるか否かを調べた。一方、血漿を分取するとともに残りの赤血球は膜ゴースト標本として、それぞれ凍結して後日コレステロール類濃度を測定することとした。

#### 3. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase活性測定

大動脈、心、腎および脳を摘出しホモジナイズ後膜標本を得た。この膜標本を用い、細胞膜構造の変化によって影響を受ける可能性がある機能蛋白のひとつである $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase活性を、総 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase活性とウアバイン感受性 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase活性に分けて測定した。

#### 4. 血管反応観察

胸部大動脈を摘出し、長さ約3mmのリング標本を1個体から2本作製した。1mMウアバインまたは $\text{K}^+$  free溶液による収縮をそれぞれの100~150分間観察した。反応の大きさは、100 mM KClによる収縮反応を100%とし、それに対する割合で示した。

#### 5. アラキドン酸投与により産生するプロスタノイドの定量

ダイズ油投与群およびキャノーラ油投与群で検討した。摘出腸間血管床を、37℃に保温し酸素化したアルブミン含有Krebs-Henseleit液で定流量(2ml/min)灌流し、1000 nmoleのアラキドン酸を動脈側から投与し、その後6分間、門脈に挿入したカニューレから流出する灌流液を採取し、 $\text{TXB}_2$ および6 keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ 濃度を測定することで血管床における $\text{TXA}_2$ あるいは $\text{PGI}_2$ 産生能を調べた。

本研究は、食品薬品安全センター秦野研究所における「動物実験に関する指針」に沿い、動物福祉・倫理の立場から、適切な方法を用いるとともに、秦野研究所動物実験委員会の承認の後に実施した。

### C. 研究結果

#### 1. 血圧

キャノーラ油投与群の尾動脈収縮期圧はダイズ油投与群と比較し、投与開始2週から高値を示す傾向にあった。コレステロール添加キャノーラ油投与群の血圧はキャノーラ油投与群の値に近かった (Fig. 1)。

#### 2. 溶血試験

赤血球の溶血曲線 (Fig. 2) から、キャノーラ油投与群ではダイズ油投与群と比較し、0.45~0.55%リン酸緩衝生理食塩液中での溶血が強く起こった。一方、コレステロール添加キャノーラ油投与群とダイズ油投与群との比較では差がみられなかった (Fig. 2)。血漿、赤血球膜標本のコレステロール類濃度は後日測定する予定である。