

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

数種の食用油に含まれる微量有害因子に関する研究

課題番号 (H14-食品・化学-005)

## 総括・分担研究報告書

主任研究者

奥山 治美 名古屋市立大学・大学院薬学研究科 教授

平成 15(2003)年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 数種の食用油に含まれる微量有害因子に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1  
奥山 治美 (名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授)

### II. 分担研究報告

1. 油脂の分画および微量有害因子の評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6  
奥山 治美 (名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授)
2. 有害因子の生化学的、生理学的検索および簡便なアッセイ系の検討・・・・・・・・ 12  
大原直樹 (財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所 試験部副部長)
3. 大豆硬化油・植物ステロールの評価・生化学的評価に関する研究・・・・・・・・ 23  
今泉勝己 (九州大学大学院 教授)
4. 腫瘍誘導血管新生抑制物質探索を目的とした *in vitro* および  
*in vivo* 実験系の確立とその応用・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25  
加治和彦 (静岡県立大学 生活健康科学研究科 教授)
5. 狂牛病飼料の油糧種子成分調査・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29  
小野寄菊夫 (名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授)
6. マイクロアレイ解析による分析の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 40  
藤井陽一 (名古屋市立大学大学院 薬学研究科 助教授)
7. 菜種油微量成分の化学的解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 44  
永津明人 (名古屋市立大学大学院 薬学研究科 講師)

### III 招聘研究報告

(社団法人 日本食品衛生協会 外国人研究者招聘事業、平成14年度による)

- Report on Cooperative Research on the Safety of Vegetable Oils・・・・・・・・・・・・ 45  
Nimal Ratnayake Nutrition Research Division, Food Directorate, Health Canada

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
総括研究報告書

数種の食用油に含まれる微量有害因子に関する研究

主任研究者 奥山 治美 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授

【研究要旨】

数種の食用油は大豆油や紫蘇油に比べて脳卒中易発症性（SHRSP）ラットの寿命を異常に短縮する。その作用は脂肪酸組成によらないことから、微量有害因子の存在を想定している。本研究では菜種油（キャノーラ）と硬化大豆油を選び、大豆油を対照として有害因子の探索を開始した。本年度は、①キャノーラ、硬化大豆油を炭酸ガス超臨界法で分画し、後者を分子蒸留法で分画し、SHRSPラットの寿命に及ぼす影響を評価する、②報告されている植物ステロールの寄与を評価する、③簡易アッセイ系の確立を図る、④遺伝子発現に及ぼす影響を評価する、⑤生殖生理などに及ぼす影響を評価する、⑥いわゆるプリオン病発症に対する菜種（キャノーラ）の関与の可能性を探る、などの研究を開始した。

これまでに得られた結果は、①分画キャノーラ油と大豆油の間に寿命の差が生じる可能性があるが、差は少なそうである（大原、今泉、奥山分担、継続中）、②コレステロールを含まない精製飼料を基礎飼料とした場合は、植物ステロールがSHRSPラットの寿命に影響を及ぼしている可能性があるが（Ratnayake博士、今泉分担）、コレステロールや植物ステロールを内在する普通飼料（CE2）を基礎飼料とした場合は、植物ステロール作用がマスクされると考えられ、植物ステロールの含量に関わらず寿命に差が表れる、すなわち植物ステロール以外の微量有害因子が存在すると考えられる（奥山分担）、③インビトロの血管内皮細胞培養系では有害因子の作用は再現できなかった（加治分担）、④肝臓で100種を越える遺伝子発現の差がキャノーラ群と大豆油群の間で観察され、有害因子の作用について多くの示唆が得られた（藤井分担）、⑤2世代目の仔の成長が親の餌の影響を受ける、⑥狂牛病・プリオン病・スクレイピーなどにキャノーラが関与している可能性が十分に考えられる、などであった。

これらの結果に基づき、植物ステロール以外の微量有害因子の探索に向けて、SHRSPラットのステロイドホルモン合成、脳遺伝子発現、普通ラットのプリオンタンパク生成、ヤギの成育と血液生化学パラメーター、などに対するキャノーラと大豆の効果を比較する研究を開始した。また、ステロイドホルモン合成の初発段階の遺伝子発現が大きな影響を受けている可能性がマイクロアレイ法で示され、植物エストロゲンのような内分泌かく乱作用物質の観点から、化学的検索を開始した。

【分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名】

奥山 治美	名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授
大原 直樹	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所 副部長
今泉 勝己	九州大学大学院 農学研究院 教授
加治 和彦	静岡県立大学・大学院生活健康科学研究科 教授
小野 崙 菊夫	名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授
藤井 陽一	名古屋市立大学大学院 薬学研究科 助教授
永津 明人	名古屋市立大学大学院 薬学研究科 講師

【協力研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名】

大谷 滋 岐阜大学農学部 教授

【招聘研究者】：社団法人 日本食品衛生協会 食品・化学物質安全総合研究推進事業

(外国人研究者招へい事業、平成14年度)による

Nimal Ratnayake博士 Nutrition Research Division, Food Directorate, Health Canada  
(カナダ厚生(健康)省 栄養研究部門上席研究員)

## A. 研究目的

本研究は、数種の食用油に存在が想定されている微量有害因子（脳卒中易発症性ラットの寿命を短縮する因子）を探索・同定し、それを含まない安全性の高い油糧種子を創出・供給することを目的としている。具体的には、有害作用を示す菜種油（キャノーラ）と硬化大豆油を選び（大豆油コントロール）、超臨界法、分子蒸留法で分画し、有害因子が分離できる可能性を探ること、植物ステロールが微量有害因子のひとつである、とする Ratnayake 博士らの報告を検証すること、簡易アッセイ系の確立を図ること、遺伝子発現に及ぼす影響を評価すること、生殖生理など 2 世代目への影響を評価すること、キャノーラがプリオン病発症の因子となっている可能性を評価すること、などを初年度の目標とした。

## B. 研究方法

### ① 寿命短縮作用を示すキャノーラおよび硬化大豆油の分画と評価

有害因子を含むと考えられる数種の食用油のうち、キャノーラ油と硬化大豆油に限定し、大豆油を対照として有害因子の探索を開始することとした。CO<sub>2</sub> 超臨界法による植物油の分画条件を検討し、キャノーラおよび硬化大豆油（各 25 kg 程度）を、それぞれ 3 画分に分画する（茂利製油㈱）。また分子蒸留法による分画条件を検討し、菜種油 25kg を 2 画分に分画する（オリザ油化㈱）。一方、分画物間で薄層クロマトグラフ上、異なるスポットを示す物質及び再結晶植物ステロール標品（Ratnayake 博士調製・送付）の混雑物について、化学的分析を行う（永津分担）。これらを普通食に混ぜ（10%）、SHRSP ラットに与えて 0.5%食塩水負荷の条件で寿命を評価する（大原、今泉、奥山分担）。

### ② 有害因子としての植物ステロールの評価

脳卒中ラットは他のラット系統より植物ステロールを蓄積しやすい（ABC トランスポーターの異常）。そこで植物ステロールを添加し、その影響を評価する（今泉分担）。一方、カナダ（Health Canada）の

N.Ratnayake 博士と情報交換を行ってきたが、有害作用を示す植物ステロール（再結晶画分）をカナダ側で調製し、当研究グループに供給する共同研究を進める（Ratanayake 博士を招聘研究者として申請）（今泉、奥山分担）。

### ③ 簡易アッセイ系の確立

寿命の測定には長期間を要し、これを指標とする限り有害因子の探索には長年月を要すると考えられる。菜種油は大豆油に比べ、腎血管の損傷を引き起こす。そこで血管新生を三次元的に評価する培養細胞系を確立し、この系に植物油、あるいはその分画物を添加し、血管新生に及ぼす影響を評価する（加治分担）。

### ④ 肝臓遺伝子発現に及ぼす影響を評価する

DNA チップを使い、キャノーラ群と大豆油群の遺伝子発現の差を評価する（藤井分担）。

### ⑤ 有害因子の生化学的、生理学的検索

キャノーラはラット、新生豚で血小板数を減少させる。これと関連して、赤血球の浸透圧耐性や物理刺激に対する耐性、血小板の赤血球への粘着、Na, K-ATPase に及ぼす影響を評価する（大原分担）。一方、生殖生理や第二世代の成長に及ぼす影響を評価する（奥山分担）。

### ⑥ プリオン病にキャノーラ（油、粕）が関与している可能性を探る

わが国で発症した牛海綿状脳症（BSE）、英国におけるスクレイピーや BSE、米国における野生鹿のプリオン様症状の発生、などに関連する飼料（餌）の調査・検索を行い、キャノーラが関与している可能性を調べる（小野寄分担）。

## C. 研究結果

### ① 寿命短縮作用を示すキャノーラおよび硬化大豆油の分画と評価

CO<sub>2</sub> 超臨界法による植物油の分画条件を検討し、キャノーラおよび硬化大豆油（各 25 kg 程度）を、それぞれ 3 画分に分画し

た(茂利製油㈱、奥山分担)。また、分子蒸留法による分画条件を検討し、菜種油 25kg を 2 画分に分画した(オリザ油化㈱、奥山分担)。シリカゲル薄層クロマトグラフィーで分離度を評価した。それぞれの各分画はトリアシルグリセロール(TG)が主成分であるが、未分画の油では隠れていた微量成分が検出された。それらについて分離し、化学構造を決定する研究を開始している(永津分担)。

一方、硬化大豆油の超臨界法による分画物(今泉分担)、キャノーラの超臨界法による分画物(大原分担)について、3 分画物間で寿命に少しの差が見られるようであるが差は大きくなく、実験継続中である。キャノーラの分子蒸留法による 2 分画物の間では、現在までのところ、差が見られていない(奥山分担)。

## ② 有害因子としての植物ステロールの評価

SHRSP ラットは ABC トランスポーターに異常があり、またコレステロール合成活性も低いことから、高植物ステロール血症(Phytosterolemia)になりやすい。内在性コレステロールを含まない精製飼料を基礎飼料とした場合、オリーブ油の例外を除いて、植物ステロール含量の高いキャノーラ油などで寿命が短縮し、その含量の低い大豆油に植物ステロール分画を添加すると寿命が短縮する(Ratnayake ら、今泉ら)。ところが普通飼料(日本クレア、CE2)は内在性コレステロールと植物ステロールを含み、これを基礎飼料とした場合は、植物油のステロール含量と寿命とは相関しなかった(奥山ら)。例えばキャノーラから得られる遊離脂肪酸分画は高濃度の植物ステロールを含むにもかかわらず寿命短縮作用を示さず、また硬化大豆油と大豆油、および高オレイン酸紅花油と高リノール酸紅花油とはそれぞれ植物ステロール含量がほぼ等しいにもかかわらず、寿命には大きな差が生じた。これらのことから、「植物ステロールも寿命短縮因子の一つでありうるが、植物ステロール以外に有害因子が存在する」ことが明らかとなった。

なお、植物ステロールはヒトでも有害作用を示している可能性を指摘するいくつか

の論文があり、カナダ(Health Canada)では、「植物ステロール添加食品」を認可しない方向であるとの情報が Ratnayake 博士よりもたらされた。因みにわが国では植物ステロール添加食品に特保の認可が与えられ、広く有効性が宣伝されている。本研究と直接の関係は無いが、コレステロール低下作用が健康増進に結びつかないことを示す報告が増えている(奥山ら、心疾患予防、学会センター関西、参照)。

## ③ 簡易アッセイ系の確立

植物油とその分画物は水に難溶であるが、マトリゲルを使った内皮細胞の三次元培養系にキャノーラ油、大豆油を添加したが、有意な差は認められなかった。一方、腫瘍誘導血管新生をインビボで評価する系の確立を開始した(加治分担)。

後述の、赤血球の浸透圧耐性、あるいは赤血球-血小板粘着作用の変化や(大原分担)、遺伝子発現評価系(マイクロアレイ法)(藤井分担)も、簡易(短期間)アッセイ系として使える可能性を秘めている。

## ④ 肝臓遺伝子発現に及ぼす影響の評価

キャノーラ油群と大豆油食群について肝臓の RNA を抽出し、マイクロアレイ法による遺伝子発現の評価を行った結果、100 種以上の遺伝子発現の変化が認められた(藤井分担)。多くの遺伝子の発現低下(キャノーラ油群対大豆油群の比が 0.3 以下)が認められた(二価金属イオン関連、アミロイドやプリオン関連、ステロイドホルモン合成関連、血液凝固関連、免疫関連、細胞増殖関連、プロテアーゼ類、エネルギー代謝、タンパク合成など)。発現上昇(キャノーラ油群対大豆油群の比が 2 以上)もいくつかの遺伝子で見られた。

これらのうちのいくつかは、これまでの有害作用(血液関係、腎障害、生殖生理など)との関連性を示したが、多くは予測できなかったものであった。これらのいくつかを糸口に、今後の研究の展開を図る予定である。

なお、遺伝子発現の経時変化をみることによって、評価日数の短縮を図れる可能性がある。また、キャノーラ油がステロイドホルモン(副腎、性腺)合成に関わるいく

つかのキー酵素の発現を数分の1に低下させることから、キャノーラ油は常用量で内分泌かく乱物質である可能性が示された。これらの分野に関しては、新しい分担者を得て集中的に追及する計画を進めている。

#### ⑤ 有害因子の生化学的、生理学的検索

脳卒中ラットにキャノーラ油食を与え(F0)、交配し、F1(雄)の離乳時より餌を交換し寿命を評価した結果、大豆油(F0)-大豆油(F1)群に比べてキャノーラ油(F0)-大豆油(F1)群の寿命が、また大豆油-キャノーラ油群に比べてキャノーラ油-キャノーラ油群の寿命が有意に短く、親(F0)の餌(菜種油か大豆油か)が仔(F1)の寿命に影響を及ぼす可能性が示唆された(奥山分担)。他の生理作用については、検討が始まったところである。

#### ⑥ プリオン病にキャノーラ(油、粕)が関与している可能性を探る

わが国で発症が確認された7頭の狂牛病牛について、菜種(キャノーラ)が共通因子となっている可能性があることを明らかにした(小野崙。奥山分担)。プリオンタンパクはGPIアンカータンパクであり、細胞表面にあってCuの取り込みに寄与していると考えられている。正常プリオンタンパクが何らかの因子(例えばERストレス)によって異性化し、増殖性プリオンタンパクになる可能性が示唆されている。キャノーラはMo、Sなどを多く含み、Cu代謝を障害する可能性がある。これらの情報に基づき、プリオン病のキャノーラ関与説をモデル動物で評価する系を構築中である(小野崙分担)。これと関連して、ヤギにおける菜種粕、大豆粕の安全性を評価する系を立ち上げた(大谷研究協力者、15年度から分担者として加わる予定)。

#### (倫理面への配慮)

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

ヒト臍帯内皮細胞は約10年前に口頭によるインフォームドコンセントを得た後、東京都老人総合研究所で分離、確立された培養細胞であり、問題はない。

#### D. 考察

“数種の食用油の示す有害作用は植物ステロールによる”、という解釈は、主としてRatnayake博士らによる次の二つの観察に基づいている。(イ)植物ステロール含量の多い食用油が脳卒中ラットの寿命を短縮した、(ロ)キャノーラ油製造の副生物、deodorant distillate分画より調製した結晶植物ステロールが寿命短縮活性を示した。しかし、オリーブ油は(イ)の例外であると認められており、また紅花油の高オレイン酸型と高リノール酸型の比較、キャノーラとキャノーラ由来の遊離脂肪酸分画の比較、大豆油と大豆硬化油の比較などがなされておらず、これらを含めた比較では(イ)の結論は限定されたものと解釈できる(例外が多く、全体として相関は認められない)。他方、(ロ)については、植物ステロールの混合物が結晶を作るとは考えがたく、実際、Ratnayake博士により調製・送付された植物ステロール標品にはC29炭化水素といわれるものがかなりの量で含まれており、寿命に対する影響もキャノーラ油の植物ステロールの2倍量を加えて評価している、などの問題点があった。これらの結果に基づき、「植物ステロールが脳卒中ラットの寿命を短縮する可能性はあるが、植物ステロール以外の有害因子が存在する」という点で、奥山ら、Ratnayake博士らの解釈が一致した(Ratnayake博士の報告書参照)。

マイクロアレイ解析結果は、キャノーラ油が大豆油に比べて肝臓の多くの遺伝子発現を変えることが示された。その作用は多様であり、有害因子は多様な物質であるかもしれない。しかし、ひとつの因子によるターゲットタンパクへの影響の結果、多くの遺伝子発現が影響を受けたのかもしれない。これらの結果はいくつかの作業仮説を生み、有害因子を同定する手がかりが得られたと考えられる。

一方、物理的手法(超臨界法)によるキャノーラの分画により、二つの分画(180bar、bar抽出画分と350bar抽出画分)の間で寿命に差が出る傾向が見られた(大原分担者)。両分画に脂肪酸組成の差は無いので、分画条件を変えることにより、有害因子を含む画分と含まない画分が得られる可

能性がある。

菜種(キャノーラ)油と大豆油は多くの国で主要な食用油であり、日本では前者が増加しつつあり総植物油の4割、後者が3割程度を占めている。これら二つがリノール酸/ $\alpha$ -リノレン酸のバランスにかかわらず大きな生理作用の差を生じさせることは、あまり周知されていない。キャノーラの異常作用は脳卒中ラットに限定されず、多くの種(マウス、豚、乳牛など)に及んでいること、その用量がヒトの食環境に匹敵するレベルであること、などから、健康情報発信の面でも、これまでの施策を踏襲することは不適切であると考えられる。

#### E. 結論

これまでに得られた結果は次のように要約される。

- ① 大豆油、硬化大豆油の分画物の間に、SHRSPラットの寿命の差が生じる可能性があるが、差は少なそうである(大原、今泉、奥山分担、継続中)
- ② コレステロールを含まない精製飼料を基礎飼料とした場合は、植物ステロールがSHRSPラットの寿命に影響を及ぼしている可能性がある(Ratnayake 博士、今泉分担)、コレステロールや植物ステロールを内在する普通飼料(CE2)を基礎飼料とした場合は、植物ステロール作用がマスクされると考えられ、植物ステロールの含量に関わらず寿命に大きな差が表れる、すなわち植物ステロール以外の微量有害因子が存在すると考えられる(奥山分担)
- ③ インビトロの血管内皮細胞培養系では有害因子の作用は再現できなかった。インビボの簡易アッセイ系の確立を試みている(加治分担)
- ④ 肝臓で100種を超える遺伝子発現の差がキャノーラ油群と大豆油群の間で観察され、有害因子の作用について多くの示唆が得られた(藤井分担)。これに基づき、新分担者によるいくつかの研究が開始された。
- ⑤ 二世代目の仔の成長が親の餌(大豆油食かキャノーラ油食か)の影響を

受けることが示された。

- ⑥ 狂牛病・プリオン病・スクレイピーなどにキャノーラが関与している可能性が十分に考えられることが明らかとなった。

これらの結果に基づき、植物ステロール以外の微量有害因子の探索に向けて、SHRSPラットのステロイドホルモン合成、脳遺伝子発現、普通ラットのプリオンタンパク生成、ヤギの成育と血液生化学パラメーター、などに対するキャノーラと大豆の効果を比較する研究を開始した。また、ステロイドホルモン合成の初発段階の遺伝子発現が大きな影響を受けている可能性がDNAマイクロアレイ法で示され、植物エストロゲンのような内分泌かく乱作用物質の観点から、化学的検索を開始した。

#### F. 健康危険情報

この課題に対して従来、「数種の食用油について報告された有害作用は、特殊な動物モデル(脳卒中ラット)でみられる植物ステロールの作用である」という一部の研究者の解釈が重視されてきた。しかし、植物ステロールによらない有害因子が存在することは、多くの研究者の認める段階となった。またキャノーラ油の有害作用(大豆油コントロール)は脳卒中ラットに限定されず、普通(WKA)ラットやマウス、新生豚、乳牛などでも認められており、行政側の適切な対応が求められている。

#### G. 研究発表(各分担者分の項参照)

#### H. 知的財産権の出願。登録状況

- なし
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
分担研究報告

油脂の分画および微量有害因子の評価

分担研究者 奥山治美 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授

研究要旨

菜種油(キャノーラ油)および硬化大豆油を CO<sub>2</sub> 超臨界法により分画し、またキャノーラ油を分子蒸留法により分画した。分画物の寿命短縮活性 (SHRSP ラット) を分担して評価した。現在までにキャノーラ油を超臨界法で分画した画分間で、寿命短縮活性に差がある傾向が示された。ほかの分画物の寿命に及ぼす影響の評価は継続中である。一方、キャノーラをアルカリ水解およびリパーゼ水解し、得られる遊離脂肪酸分画には、植物ステロールは含まれるが寿命短縮活性を示さないこと、植物ステロール含量がほぼ同程度である紅花油の高リノール酸型と高オレイン酸型の間や大豆油と硬化大豆油の間に寿命の大きな差があること等から、植物ステロール以外の有害因子が存在するという確証を得た。(社) 日本食品衛生協会 外国人招聘事業で招聘された Nimal Ratnayake 博士 (Health Canada) と意見交換し、「植物ステロールも寿命短縮作用を示していると考えられるが、それ以外の因子が寿命に大きな影響を与えている」、という点で共通の認識を持つことができた。

A. 研究目的

菜種油(キャノーラ油)および硬化大豆油を CO<sub>2</sub> 超臨界法により分画し、またキャノーラ油を分子蒸留法により分画し、分担して寿命短縮作用を評価すること、有害因子としての植物ステロールの影響を評価すること、キャノーラの二世投与の影響を評価すること、を目的とした。

B. 研究方法

油脂の分離条件を検討し、菜種油 (キャノーラ) および硬化大豆油 (各 25kg) を CO<sub>2</sub> 超臨界法、分子蒸留法で分画する。大豆油を対象とし、分画油脂を粉末飼料 (CE2、日本クレア) に 10%(w/w)の割合で添加し、4 週齢の脳卒中易発症性 (SHRSP) ラットに与える。一方、キャノーラ油を定法によりアルカリ分解し、あるいはリパーゼ分解し、ヘキサン抽出により遊離脂肪酸分画を得る。これら油脂や他の油脂、基本食 (CE2) の脂肪酸組成、植物ステロール含量を定量し、脳卒中ラットの寿命との相関を評価する。

(倫理面に対する考慮)

本実験計画は名古屋市立大学薬学研究科倫理委員会の承認を得た。

C. 実験結果

分画物について、分担者が分担して脳卒中ラットの寿命を評価しているが、現在までにキャノーラ油分画物の寿命測定がほぼ終わった。他の分画物については、実験継続中である。

I キャノーラ油の超臨界法による分画物の組成と寿命の相関

CO<sub>2</sub> 超臨界法を使い、180 バール (bar) -40°Cで抽出される分画、350bar-40°Cで抽出される分画、および残留分に分けた。この分画法では質量が一つの因子として分離されるとされているが、シリカゲル薄層クロマトグラフィー上で分離して脂肪酸分析を行うと、遊離脂肪酸、ジアシルグリセロールが 180bar 分画に多い傾向が見られた (表 1)。主成分はいずれの画分もトリアシルグリセロール (TG) であった。



表1 CO<sub>2</sub>超臨界法で分離した三画分の脂質組成（脂肪酸の%として）

脂質	180 bar	350 bar	残留分
植物ステロール エステル	0.9	0.8	1.1
トリアシルグリセロール	96.3	98.7	98.1
遊離脂肪酸	0.4	0.2	0.3
ジアシルグリセロール	2.3	0.2	0.5
モノアシルグリセロール	0.1	0.1	0.1
合計	100.0	100.0	100.0

三画分の脂肪酸組成(表 2)はほぼ似ているが、不飽和脂肪酸（リノール酸およびα-リノレン酸）が早く抽出される傾向が見られた。ステロール含量をみると（表 3）、350bar 分画の植物ステロール含量が他の分画物より低い傾向が見られた。なお、基本食（CE2）には魚粉や大豆タンパク由来のコレステロールおよび植物ステロールが含まれていることに留意する必要がある（精製飼料にはこれらはほとんど含まれない）。大

原分担者の寿命評価では、植物ステロール含量の高い 180bar 画分の寿命短縮活性が弱い傾向を示し、350bar 画分はキャノーラ油とほぼ同じであった。すなわち、寿命短縮因子が本法により分離される可能性が示された。最初の抽出条件(180bar)を160bar に下げ、より長時間をかけることにより、有害因子を含まないキャノーラ油分画物を得る試みを行うこととした(次回)。

表2 CO<sub>2</sub>超臨界法で分離した三画分の脂肪酸組成

	180 bar	350 bar	残留分
14:0	0.6	1.3	2.9
16:0	6.2	7.0	8.9
18:0	1.2	2.2	4.5
18:1n-9 オレイン酸	60.9	60.4	59.2
18:1n-7	0.7	2.6	1.0
18:2n-6 リノール酸	25.4	22.3	19.0
22:1 セトレン酸	0.7	0.6	0.0
18:3n-3 α-リノレン酸	4.2	3.7	4.4
合計	100.0	100.0	100.0

表3 基本食（CE2）のステロール含量（mg/g diet）およびCO<sub>2</sub>超臨界法で分離した三画分と大豆油（対照）のステロール含量（mg/g oil）

	CE-2	180 bar	350 bar	残留分	大豆油
コレステロール	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00
ブラシカステロール	0.00	1.56	0.63	0.72	0.00
カンパステロール	0.09	4.11	1.87	4.61	1.58
スティグマステロール	0.05	0.00	0.00	0.00	1.52
シトステロール	0.27	5.43	2.91	6.10	3.60
総植物ステロール	0.41	11.09	5.41	11.43	6.70
総ステロール	0.81	11.09	5.41	11.43	6.70

## II 植物ステロールと寿命の相関

キャノーラ油のリパーゼ分画による遊離脂肪酸分画は、界面活性剤なしの反応条件で調整した（従来法と異なる点）。別法として、一般的な鹼化法でアルカリ分解後、遊離脂肪酸分画を得た。一方、各種油脂を10%添加した餌の植物ステロール含量を定量した。寿命は今回測定分に従来のデータを加え、大豆油群の寿命に対する相対値として

示した(図 1)。大豆油と硬化大豆油の間、キャノーラ油とキャノーラ由来遊離脂肪酸分画の間、紅花油の高オレイン酸型と高リノール酸型の間、植物ステロール含量の有意な差はなかった。しかし、脳卒中ラットの寿命は大きく異なっていた。そして、全体として、植物ステロール含量と寿命の間には有意な相関は認められなかった。

図 1 油脂の植物ステロール含量と脳卒中ラットの寿命の相関

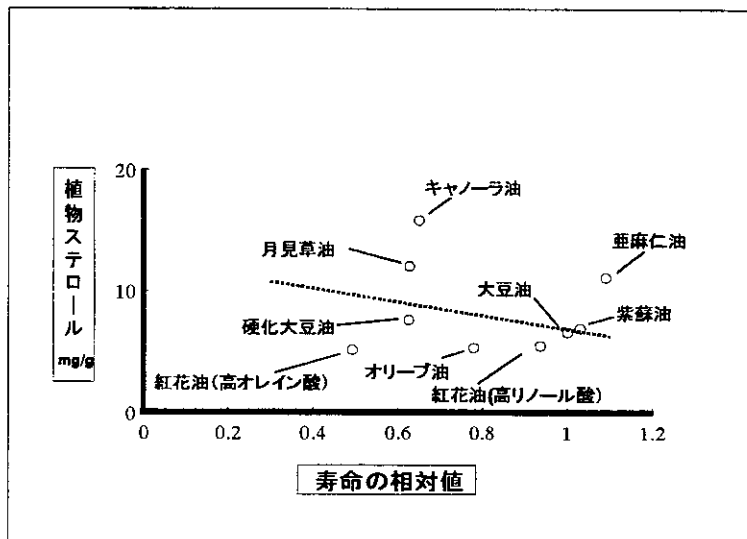


表 3 に示したように、普通食 (CE2) は内在性のステロールを含んでいる。これに油を添加しても全体のステロール含量に顕著な差が見られない。数例を表 4 に示した。しかし、脳卒中ラットの寿命は食餌群間で大きな差があった(図 1)。

表 4 数種の油脂添加食のステロール含量 (mg/100g diet)

ステロール	キャノーラ	キャノーラ遊離脂肪酸分画	大豆油	硬化大豆油	オリーブ油	月見草油
コレステロール	47.3	60.2	48.4	49.9	46.9	40.6
Brassicasterol	6.2	6.3	0.0	0.0	0.0	0.0
Campesterol	33.7	38.4	22.5	17.3	16.1	15.8
Stigmasterol	11.2	15.6	14.1	10.0	8.9	5.3
$\beta$ -Sitosterol	78.6	93.4	55.9	44.6	49.2	83.1
総植物ステロール (mg/100g)	129.8	153.7	92.6	71.8	74.2	104.2

### III 微量有害因子としての植物ステロールの寄与

#### 一Ratnayakeグループと当グループの結論の差に対する解釈一

Ratnayakeグループが、植物ステロールを有害因子の一つと報告した根拠は主として次の二点であった。

① 食用油の植物ステロール含量と寿命の間に負の相関があった(ただし、オリーブ油は植物ステロール含量が低いにもかかわらず、寿命短縮作用は最大であった)。

② キャノーラ油製造時の deodorant distillate 分画から再結晶により得た植物ステロール分画を大豆油に添加すると(キャノーラ油の2倍量)、寿命短縮活性が認められた。

このうち、①については、検討した食用油の種類が当グループより少ないため、多くの例外が評価されていない結果、見かけ上、植物ステロール含量と寿命に負の相関が認められたと解釈できる。②については、再結晶植物ステロールと称されるものが植物ステロールの混合物であり、今回、Ratnayake博士が持参した植物ステロール分画は、炭素29の直鎖炭化水素といわれるものが薄層クロマトグラフィーで十分に検出されるほど含まれており、他の微量成分の混入は否定できない。結晶植物ステロールと呼ばれる物質の結晶の意味は、いわゆる

る物理化学的に定義できる結晶ではないといえる。しかもこの物質をキャノーラが含む植物ステロールの2倍量添加しており、植物ステロールが微量有害因子の本体と結論できる根拠とはなっていない。

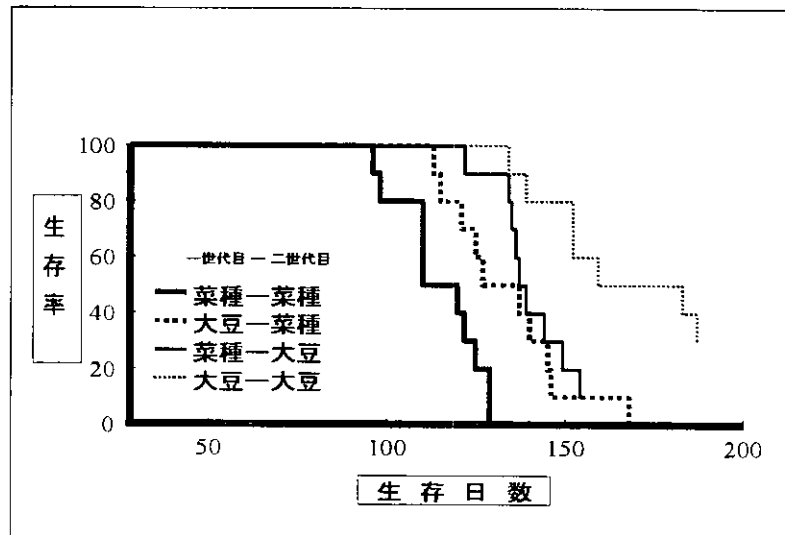
招聘されたRatnayake博士との意見交換から、餌の基本食の差に気づいた。すなわちRatnayake博士らの用いた精製飼料は内在性コレステロールを含まず、植物ステロールの寿命短縮作用が強く現れたのに対し、当研究グループの用いた普通食は内在性コレステロールを含み、植物ステロールの作用があったとしてもマスクされていたと理解できる。

以上の考察に基づき、当グループの報告してきた「植物ステロール以外の微量有害成分が脳卒中ラットの寿命を大幅に短縮する」という結論は妥当であった。

### III キャノーラが脳卒中ラットの生殖生理に及ぼす影響

離乳期(4週齢、F0)からキャノーラ油食あるいは大豆油食を与え、11週齢で交配し、仔(F1)を4週齢で同じ餌で飼育し(あるいは異なる餌に変換し)、F1(雄)の生存率を評価した。その結果、F0の餌の差がF1の寿命に影響を与えることを示す結果が得られた(図2)。この結果については、実験を繰り返し、確認する必要があると考える。

図2 親(F0)の餌(キャノーラ食か大豆油食か)が仔(F1、雄、各群 n=10)の生存率に影響を与える



IV キャノーラの有害作用は脳卒中 (SHRSP) ラットに限らない

SHRSP ラットは他の系統に比べ、コレステロール合成能が低く、ABC トランスポーターに欠損があって植物ステロール血症 (phytosterolemia) になりやすい。そして、有害因子の本体は植物ステロールであり、これらの結果 (寿命短縮作用など) は極めて限られた動物モデル (SHRSP ラット) に限定される、というのが、一部の研究者の

解釈であった。

しかし、大豆油に比べキャノーラ油が異常の作用を示すことは、普通ラットや普通マウスでも観察されており (分担者)、また新生豚でも繰り返し報告されている (血小板数減少など) (表 5)。新生豚や乳牛のケースは寿命の評価にいたっていないが、死亡率上昇が報告されており、これらの結果を見過ごすことはできない。

表5 菜種(canola)油・粕の安全性は確立していない (大豆油、紫蘇油に比べ)

☆ 脳卒中 (SHRSP) ラット	Huang M-S ら (1996) Biol Pharm Bull 19:554 腎障害(タンパク尿、糸球体異常、腎血管異常)、出産数の減少、寿命短縮
☆ 普通 (WKY) ラット/SHRラット	Naito ら (2000) Toxicology 146:197 血圧上昇、心・腎組織異常、好中球数上昇、血小板数減少、血漿脂質上昇
☆ マウス	Kameyama ら(1996)、Du ら (2003) 行動異常、脂肪肝
☆ 新生ブタ	Kramer JK ら (1994) Lipids 29:859; Innis ら (1999) J Nutr 129:1261 血小板数低下、血小板分布幅・容量増加 鉄剤投与で死亡 Sauer ら (1997) Nutr Res 17:259-269
☆ 乳牛	Clark C ら (2001) Can Vet J 42: 721 菜種油を誤飲した乳牛、9頭中、4頭は死亡、3頭は剖検に付した。死因不詳
☆ 産卵鶏	奉若稔三ら(1975)全農飼畜中研報告書第3号37-76 菜種粕で大豆粕に対し、肝臓の異常出血を観察
☆ ヒト(中国女性食堂経営者)	Shields ら (1995) JNCI 87:836 肺腺癌増加(?)

D. 考察

キャノーラの CO2 超臨界法による分画により、有害因子を含まない (低減化した) キャノーラ油が得られる可能性が示された。分離条件を改善して再度分画一評価を行う価値があると考え。基本食が精製飼料の場合、比較的多量の植物ステロール画分を大豆油に添加すると、キャノーラ油に相当する寿命短縮効果が認められた。しかし添加した植物ステロール画分の純度は低く、現時点では、寿命短縮作用が植物ステロールによるとするには難点がある。また、オリーブ油の場合のように、植物ステロール

含量が低いのに寿命短縮活性が強いものもある。

一方、基本食として内在性コレステロールを含む普通飼料を用いた場合、植物ステロール含量に関係なく、大幅な寿命短縮が認められた。これらの結果は、「植物ステロールが寿命短縮因子の一つでありうるが、それ以外の因子が脳卒中ラットの寿命を大幅に短縮する」、ことを示している。他方、親の餌がキャノーラ油であるか大豆油であるかが、仔の成長に影響を及ぼす可能性が示された。

## E. 結論

① キャノーラ油の分画に CO<sub>2</sub> 超臨界法は利用できる可能性が示された。

② 植物ステロールが寿命短縮因子の一部である可能性はあるが、植物ステロール以外の因子がより重要である。

③ キャノーラ油の寿命短縮因子は、親から子に伝わる可能性が示された。

これらに基づき、数種の食用油に含まれる微量有害因子の探索を継続する必要がある

## F. 健康危険情報

脳卒中ラットの寿命を短縮する食用油は数種ある。日本人の摂取するこれらの総和は、動物実験で示された危険レベルを超えている。そのうちのキャノーラ油はわが国の総植物油の4割を越え、現在も増えつつある。キャノーラ油の有害な作用は他の動物種でも報告されており、ヒトへの影響が評価されていない段階でも、健康注意情報を出すべきである。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Takemura, N., Takahashi, K., Tanaka, H., Ihara, Y., Ikemoto, A., Fujii, Y. and Okuyama, H. (2002) Dietary, but not topical, alpha-linolenic acid suppresses UVB-induced skin injury in hairless mice when compared with linoleic acid. *Photochem. Photobiol.* 76, 657-663

Tokudome, S., Imaeda, N., Tokudome, Y., Kuriki, K., Cheng, J., Fujii, T., Goto, C., Nagaya, T., Ichikawa, H. and Okuyama, H. (2002)

Correspondence re: Tery et al., No association between fat and fatty acid intake and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 11, 217-218

Tokudome, S., Yokoyama, Y., Kamiya, T., Seno, K., Okuyama, H., Kuriki, K., Cheng, J., Nakamura, T., Fujii, T., Ichikawa, H. and Itoh, M. (2002) Rationale and study design intervention in patients polypectomized for tumors of the colorectum. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 32, 550-553

Miyazawa, D., Ikemoto, A., Fujii, Y. and Okuyama, H. (2002) Partial purification and characterization of phosphatidic acid-specific phospholipase A1 in porcine platelet membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1331, 17-25

Du C, Sato A, Watanabe S, Wu CZ, Ikemoto A, Ando K, Kikugawa K, Fujii Y and Okuyama H (2003) *Biol Pharm Bull* (in press)

### 学会発表

なし

### 著書

奥山治美、市川祐子、孫月由、浜崎智仁、WEM Lands 心疾患予防 - コレステロール仮説から脂肪酸の n-6/n-3 バランスへ、学会センター関西、2002年、大阪、68頁

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働省科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
分担研究報告

有害因子の生化学的、生理学的検索および簡便なアッセイ系の検討

分担研究者 大原直樹 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 試験部副部長  
研究協力者 内藤由紀子 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 試験部

【研究要旨】

菜種（Canola）油、Canola 油の超臨界蒸留 180bar 分画、350bar 分画、残渣または大豆油を粉末飼料に 10w/w% 添加し、5 週齢の脳卒中易発性高血圧ラット（SHRSP）に与えた。通常飼料の対照群を設け、飲料水には 0.5% 食塩水を与えて生存率を調べた。実験は現在進行中であるが、Canola 油群および 350bar 分画群が大豆油群より短命であった。脳卒中症状は Canola 油群、350bar 分画群および残渣群において大豆油群より有意に早く発現した大豆油群と対照群の赤血球膜は他群に比べ機械的刺激に抵抗性を示す傾向が認められた。

9 週齢の SHRSP に油脂を含まない精製飼料を与え、1 日摂餌量の 10w/w% にあたる大豆油、大豆油:Canola 油 = 7 : 3 の混合油または Canola 油を 1 日 1 回強制経口投与した結果、Canola 油群の血漿中脂質濃度は大豆油群に比べ上昇する傾向を示した。尿量、尿中電解質排泄量に差はなかったが、Canola 油群で腎クリアランスの上昇傾向が認められた。機械的刺激に対する赤血球の抵抗性は大豆油群、混合油群、Canola 油群の順となる傾向を示した。

5 週齢の SHRSP に 10w/w% 大豆油、campesterol と  $\beta$ -sitosterol 添加大豆油、Canola 油または stigmasterol 添加 Canola 油を混餌で与え、1% 食塩水を飲料水として生存率を調べた結果、大豆油群より Canola 油群が、Canola 油群よりステロール添加 Canola 油群が短命となる傾向を示した。

今回の研究結果から、Canola 油中の有害因子は 350bar 分画により多く含まれる可能性が示唆された。また、脳卒中症状発現後の生理機能維持に食餌中油脂が影響を及ぼすことが示唆された。一方、Canola 油摂取は血球を脆弱化し、血中コレステロール値を上昇させる傾向を示し、Canola 油中の植物ステロールによる影響が疑われたが、植物ステロールと短命化の関係を明確にすることはできなかった。

A. 研究目的

本研究は、数種の食用油に存在が想定されている脳卒中易発性高血圧ラット（SHRSP）の生存日数短縮に関わる微量有害因子を探索・同定することを目的とする。本年度は、菜種（Canola）油を CO<sub>2</sub> 超臨界蒸留法によって分画し、それぞれの分画を飼料中の油脂として与えた場合の SHRSP の生存率および生理機能の変化を指標に、Canola 油中の微量有害因子が分離できるか否かを検討した。また、簡便な方法で油中の有害因子を評価する系を確立するため、血球組成変化を反映する膜機能を調べ有害因子の有無を評価できるか否かを検討した。

B. 研究方法

① Canola 油分画を与えた SHRSP の生存率

Canola 油（太田製油株式会社）を超臨界蒸留法により、180bar 留分、350bar 留分および残渣の 3 分画に分け、粉末飼料（CE-2、日本クレア）に 10w/w% 添加しペレットとした。同様に 10w/w% Canola 油あるいは大豆油（太田製油株式会社）添加飼料を調製した。

5 週齢の脳 SHRSP（SHRSP/Izm、雄、SHR 等疾患

モデル共同研究会）85 匹を次の 6 群に分け、前述の調製飼料および対照である CE-2 ペレットを与える群を設けた。

	処置	動物数（匹）
1 群	Canola 油	15
2 群	180bar 分画	10
3 群	350bar 分画	15
4 群	残渣	15
5 群	大豆油料	15
6 群	対照飼料	15

脱イオン蒸留水を用いて 0.5% 食塩水を調製し飲料水とした。

以上の条件で動物を飼育し、生存率を調べた。また、混餌投与開始 42 日に各群 5 匹の動物の尾静脈から採血し、溶血実験を実施した。

Canola 油分画を与えた SHRSP の赤血球の性質（溶血実験）

Parpart 法による浸透圧脆弱性の比較

リン酸緩衝食塩液の低張希釈系列をつくり、各

濃度の緩衝液 1mL に EDTA 加血液 10 $\mu$ L を加えて混和し、室温で 30 分間放置した。これを 1000 $\times$ g で 5 分間遠心し、上清の 540nm における吸光度を測定した。溶血率は各濃度の緩衝液上清における吸光度と 0.85%緩衝液における吸光度の差を、0.1%緩衝液における吸光度と 0.85%緩衝液における吸光度の差で割り、その商を 100 倍して得た。

#### 機械的刺激による溶血の比較

Tris 緩衝生理食塩液 0.9mL にヘパリン加血液 100 $\mu$ L を加えて混和し、直ちにボルテックスミキサーで 30、60 または 120 秒間攪拌した。これを 1000 $\times$ g で 5 分間遠心し、上清の 540nm における吸光度を測定した。溶血率は各攪拌時点における上清の吸光度と攪拌しない場合の上清の吸光度の差を、蒸留水で完全溶血させた場合の上清の吸光度と攪拌しない場合の上清の吸光度の差で割り、その商を 100 倍して得た。

#### ② SHRSP 若年成獣に対する強制経口投与

9 週齢の SHRSP15 匹を 1 群 5 匹からなる 3 群に分け、CRF-1 飼料（オリエンタル酵母）を与えて予備飼育し、続いて油脂を含まない精製飼料（AIN93）を与えて、あらかじめ計測しておいた 1 日摂餌量の 10w/w%にあたる大豆油、大豆油：Canola 油=7：3 の混合油または Canola 油を 1 日 1 回強制経口投与した。週に 1 回 1 日摂餌量を測定し、油の投与量を算出した。投与第 4 週に、動物を代謝ケージに移し、1 日尿を蓄尿した。翌日、ウレタン麻酔下で動物を開腹し、ヘパリンリチウム採血した静脈血を用い、総コレステロール、遊離コレステロール、トリグリセリド、リン脂質、遊離脂肪酸、電解質（Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>）およびクレアチニン濃度を測定した。また、動脈血を EDTA2Na 抗凝固で採取し血漿を分離後、レニン活性測定のため凍結保存した。尿中の電解質およびクレアチニン濃度を測定し、赤血球の機能変化を前述の項目同様に溶血実験で検討した。

#### ③ 植物ステロール添加飼料による飼育

5 週齢の SHRSP40 匹を 1 群 10 匹からなる 4 群に分け、油脂を含まない精製飼料（AIN93）に大豆油、Canola 油中に多い campesterol と  $\beta$ -sitosterol を添加した大豆油、Canola 油または大豆油中に多い stigmasterol を添加した Canola 油投与群とした。脱イオン蒸留水で 1%食塩水を調製し飲料水として飼育し、生存率を調べた。

#### （倫理面への配慮）

本研究は、財団法人食品薬品安全センター秦野研究所「動物実験に関する指針」にもとづき、同所動物実験委員会による実験計画書の審査が行われ、実験動物に対する動物愛護上の配慮等、倫理

的配慮が適性であることが確認された後、同研究所研究管理委員会によって実施許可されたものである。

#### C. 研究結果

##### ① Canola 油分画の生存率に対する影響

この実験は現在進行中で、全例が死亡した時点では結論が変わる可能性がある。

これまでに得られている生存率データの Logrank test による解析では、Canola 油群および 350bar 分画群の生存率が大豆油群より有意に低く短命であった（図 1）。興味深いことに、対照群も大豆油群より有意に短命であった（図 1）。

一方、脳卒中発症の時期と死亡時期には必ずしも相関があるわけではないと推測されたため、脳卒中関連症状：過敏、眼球突出、多動、鎮静、歩行異常、痙攣、四肢の麻痺および突然死を指標に症状が発現した時点を記録して、正常な動物の残存率を調べた結果、Canola 油群、350bar 分画群および残渣群における正常動物の減少が大豆油群と比較し有意に早く、また、対照群と比較した場合も、Canola 油群と残渣群では有意な、350bar 分画群ではかなり有意に近い正常動物減少の早期化が認められた（図 2）。

#### Canola 油分画を与えた SHRSP の赤血球浸透圧脆弱性

リン酸緩衝生理食塩液と溶血率変化が直線関係になる濃度である 0.65 および 0.60%における溶血には群間差がなかった（図 3）。

#### 機械的溶血

機械的刺激の持続時間と溶血率変化が直線関係になる 30、60 および 120 秒刺激における溶血に群間差はなかったが、大豆油群と対照群が抵抗性を示す傾向が認められた（図 4）。

#### ② SHRSP 若年成獣に対する強制経口投与の影響 血液生化学的検査

Canola 油群で、血漿中総コレステロール、遊離コレステロール、トリグリセリドおよびリン脂質濃度が上昇する傾向を示したものの、いずれも有意な変化ではなかった（表 1）。

#### 腎機能への影響

24 時間尿量、電解質（Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>）排泄量に群間差はなかった。電解質クリアランスにも群間差はなかったが、各電解質クリアランスおよびクレアチニンクリアランスが Canola 油群で上昇する傾向が認められた（表 2）。

#### 浸透圧脆弱性および機械的溶血

系列希釈したリン酸緩衝生理食塩液中での溶血

には群間差がなかった。30、60 および 120 秒間の機械的刺激後の溶血にも群間差はなかったが、大豆油群、混合油群、Canola 油群の順に抵抗性を示す傾向があった (図 5)。

### ③ 植物ステロール添加と生存率への影響

各油中の主な植物ステロール量を表 3 に示す。群間の生存率には有意差がなかった。細かく見ると、大豆油群とステロール添加大豆油群には差がなく、大豆油群より Canola 油群が、Canola 油群よりステロール添加 Canola 油群が短命になる傾向がみられた (図 6)。

## D. 考察

名古屋市立大学薬学部の奥山教授らにより初めて見いだされた Canola 油摂取による SHRSP の短命化 (Huang et al., 1996, 1997; Miyazaki et al., 1998) が、今回の研究によって改めて確認された。SHRSP の生存率に対する混餌 Canola 油分画の影響を比較すると、Canola 油群および 350bar 分画群が大豆油群より有意に短命であると結論づけられ、Canola 油中の有害因子が 350bar 分画により多く含まれることが示唆された。350bar 分画に次ぎ、残渣、180bar 分画の順で生存日数が短縮する傾向が認められた (対大豆油群の P 値はそれぞれ 0.1570 および 0.4188)。脳卒中関連症状発現の時間経過には、Canola 油群と 3 つの分画群の間で顕著な差がなく、大豆油群と対照群ではこれらの群と比較して症状発現が遅延した。対照群では脳卒中関連症状が出現する時期が遅いにも関わらず死亡が早く進行し、生存率では Canola 油群および 350bar 分画群との間に有意差がつかなかったことは、症状発現後の生理機能維持に食餌中油脂が影響を及ぼすことを示唆するが、詳細については、全例死亡後に再度比較検討する必要がある。

Ratnayake らによると、植物油中のステロール量が膜機能に影響を及ぼし、SHRSP にあっては出血性の病変をより早期に顕在化することが、この系統のラットにおける短命化の一因であるという (Ratnayake et al., 2000a, 2000b)。われわれも、SHRSP に食餌の 10% に当たる Canola 油を 4 週間強制投与することにより赤血球が浸透圧脆弱性を示すことを見い出していたので (Naito et al., 2000a)、食餌から摂取されるステロール量がより多いと推定される今回の生存率確認実験の中で、脳卒中関連症状が発現し始めた時期 (摂取 42 日目) に赤血球の浸透圧耐性を調べたが、いずれの群においても顕著な脆弱化は見い出せなかった。一方、機械的刺激による溶血実験では、Canola 油群および 3 つの分画群と比較し、大豆油群が抵抗性を示す傾向が認められ、SHRSP 若年成獣に対する強制経口投与実験でも、有意差は認められなかったが Canola 油の割合が増すにつれて機械的刺

激による溶血が起こりやすくなる傾向が認められた。今回は、例数が少なかったこともあり、実験規模を拡大すれば差の有無を明確にすることができると考えられるが、簡便な検索方法という意味では、今後 *in vitro* での影響を検討すべきであると考ええる。Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性の動きについては、後日測定する予定である。

Canola 油投与による SHRSP の赤血球膜脆弱化を確認した既報の実験では、生存率確認実験同様にやや幼若動物が用いられたことから、若年成獣に対する強制経口投与実験を実施して赤血球膜脆弱化の有無を確認することにより、差が認められれば発達過程の動物と成獣では Canola 油投与の影響が異なることが示されると考えた。結果は、Canola 油投与による浸透圧耐性への影響が無いことから、発達過程の動物と成獣では Canola 油の作用に差があることが示されたかに見えるが、前述のとおり、機械的刺激による溶血実験では混餌摂取による生存率確認実験においても強制経口投与実験においても Canola 油による膜の脆弱化傾向が見られたため、発達・加齢に伴う影響の違いについては今回までの結果だけから結論を出すことは難しい。

今回の強制経口投与実験では、自然発症高血圧ラット (SHR) や Wistar Kyoto (WKY) ラットを用い、長期混餌投与で認められた Canola 油による血中脂質レベルの上昇 (Naito et al., 2000b, 2000c) を確認することはできなかった。Ratnayake らによる植物ステロール原因説を認めるとすれば、血中コレステロール値の上昇傾向が、植物ステロール摂取による体内でのコレステロール動態の変化の反映であると推測できなくはないが、変化が小さく評価に耐えなかった。

これまでに SHRSP の生存率を調べた実験では、多くの個体の死因が出血性または梗塞性脳血管障害によると推定されたものの、心不全による死亡が疑われる例も複数認められ、病理学的には、脳のほかに心臓および腎臓組織の傷害が顕著だった (Naito et al., 2003)。今回の強制経口投与実験では 24 時間尿量、尿中電解質 (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) 排泄量に群間差はなかった。Canola 油投与群にける電解質クリアランスおよびクレアチニンクリアランスの僅かな上昇、糸球体濾過量の増大傾向から、腎臓が有害因子の標的器官の一つである可能性がある。しかし、算出したナトリウム再吸収率には影響が認められず (結果は示さず)、短期間投与の実験では機能変化を明確にするのが難しいと考えられた。SHRSP では機能変化から死亡に至る病態悪化の過程が急峻であると推測されるので、腎臓をはじめとする標的器官候補の臓器への影響を確認するには、病態モデルではない系統のラットを用いるのが良いかも知れない。

Ratnayake らによる植物ステロール原因説は総



植物ステロール摂取量を問題としている。ここでは、大豆油に Canola 油中に多い campesterol と  $\beta$ -sitosterol を添加して Canola 油のステロール組成に近付けた油と、Canola 油に stigmasterol を添加して大豆のステロール組成に近付けた油を混餌で与えて生存率を調べたが、campesterol と  $\beta$ -sitosterol を添加した大豆油群の生存率が大豆油と比較して低下することはなかった。また、この添加によって、上記 4 種のステロール含量の総和は大豆油を大きく上回った。従って、campesterol と  $\beta$ -sitosterol は生存率を下げる原因物質ではなく、また、総植物ステロール含量も生存率に影響を及ぼさない可能性が示唆された。一方、Canola 油に stigmasterol を添加して与えた群では Canola 油群より短命になる傾向が認められたが、Canola 油に比べ生存率を増す作用がある大豆油中に特有の stigmasterol を添加された Canola 油で stigmasterol が原因となる短命化が起こるとは考えにくく、また、総植物ステロール含量の増大も顕著ではなかったので、植物ステロールと短命化の関係を明確にすることはできなかった。

#### E. 結論

今回の研究結果から、Canola 油中の有害因子が 350bar 分画により多く含まれる可能性が示された。対照群では脳卒中関連症状が出始める時期が遅いにも関わらず死亡が早く進行し、症状発現後の生理機能維持に食餌中油脂が影響を及ぼすことが示唆された。また、Canola 油の摂取が血球を脆弱化する傾向が認められた。Canola 油摂取による血中コレステロール値の上昇傾向は植物ステロール摂取による体内でのコレステロール動態の変化を反映するかも知れないが、植物ステロールと短命化の関係を明確にすることはできなかった。腎臓は有害因子の標的器官の一つである可能性があるが、腎機能を指標とした検索を行うには実験系の検討が必要である。

#### (参考文献)

- Huang, M.-Z., Naito, Y., Watanabe, S., Kobayashi, T., Kanai, H., Nagai, H., Okuyama, H. 1996. Effect of rapeseed and dietary oils on the mean survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 554-557.
- Huang, M.-Z., Watanabe, S., Kobayashi, T., Nagatsu, A., Sakakibara, J., Okuyama, H. 1997. Unusual effects of some vegetable oils on the survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipids* 32,

745-751.

- Miyazaki, M., Huang, M.-Z., Takemura, N., Watanabe, S., H., Okuyama, H. 1998. Free fatty acid fractions from some vegetable oils exhibit reduced survival time-shortening activity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipids* 33, 655-611.
- Naito, Y., Konishi, C., Ohara, N. 2000a. Blood coagulation and osmolar tolerance of erythrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats given rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat. *Toxicol. Lett.* 117, 209-215.
- Naito, Y., Yoshida, H., Nagata, T., Tanaka, A., Ono, H., Ohara, N. 2000b. 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, 197-208.
- Naito, Y., Kasama, K., Yoshida, H., Ohara, N. 2000c. Thirteen-week dietary intake of rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat in Wistar Kyoto rats -- change in blood pressure --. *Food and Chem. Toxicol.* 38, 811-816.
- Naito, Y., Nagata, T., Takano, Y., Nagatsu, T., Ohara, N. 2003. Rapeseed oil ingestion and exacerbation of hypertension-related conditions in stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Toxicology*, in press.
- Ratnayake, W.M.N., Plouffe, L., Hollywood, R., L' Abbe, M.R., Hidiroglou, N., Sarwar, G., Mueller, R. 2000a. Influence of sources of dietary oils on the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipids* 35, 409-420.
- Ratnayake, W.M.N., L' Abbe, M.R., Mueller, R., Hayward, S., Plouffe, L., Hollywood, R., Trick, K. 2000b. Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* 130, 1166-117

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

未発表。

表 1 油脂を含まない精製飼料(AIN93)を与えて、1日摂餌量の10w/w%にあたる大豆油、大豆油:Canola油=7:3の混合油またはCanola油を1日1回、4週間強制経口投与したSHRSPの血中総コレステロール、遊離コレステロール、トリグリセリドおよびリン脂質濃度(mg/dL)

	血漿中総コレステロール	遊離コレステロール	トリグリセリド	リン脂質
大豆油	52.8±1.9	13.2±0.5	38.0±6.2	103±2.2
混合油	55.0±0.7	13.4±0.3	35.0±3.6	101.6±1.6
Canola油	59.0±4.6	14.8±1.8	41.6±2.6	111.4±8.1

混合油は大豆油:Canola油=7:3

N = 5

詳細は本文参照。

表 2 油脂を含まない精製飼料(AIN93)を与えて、1日摂餌量の10w/w%にあたる大豆油、大豆油:Canola油=7:3の混合油またはCanola油を1日1回、4週間強制経口投与したSHRSPの電解質クリアランス( $\times 10^{-3}$  ml/min/kg)およびクレアチニンクリアランス(ml/min/kg)

	C Na	C K	C Cl	C Cr
大豆油	3.7±1.0	254.9±46.9	4.8±1.7	2.8±0.2
混合油	3.2±0.4	252.2±14.0	4.2±0.7	3.0±0.1
Canola油	4.2±0.9	287.6±32.2	5.8±0.9	3.2±0.2

混合油は大豆油:Canola油=7:3

N = 5

詳細は本文参照。

表 3 調製油中のステロール量(mg/100g)

大豆油	コレステロール	ブラシカステロール	カンベステロール	スティグマステロール	$\beta$ -シトステロール	4植物ステロールの加算値
大豆油	1	1	62	53	169	285
大豆油 +ステロール	6	3	196	55	325	579
Canola油	2	72	262	5	398	737
Canola油 +ステロール	2	77	275	43	418	813

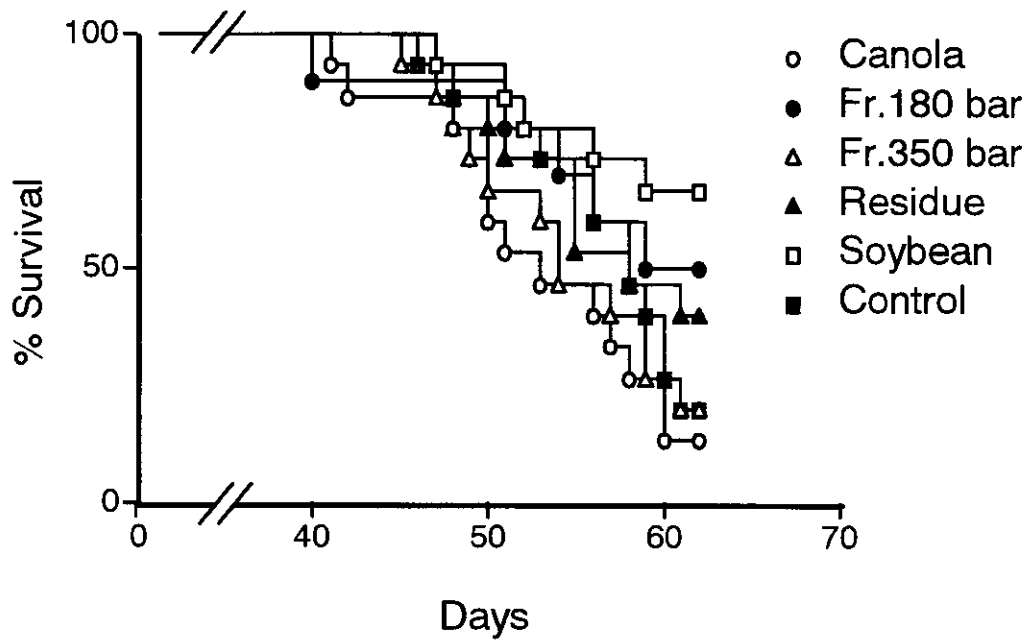


図 1 Canola 油、同 180bar 分画、同 350bar 分画、同残渣、大豆油を 10w/w%含有する飼料または対照飼料 (CE-2) を与えた SHRSP における給餌日数と生存率の関係

Canola 油 180bar 分画 (N=10) 以外は N=15、詳細は本文参照。

Logrank test で有意差が認められた群間の P 値：大豆油 vs.Canola 油=0.0035；大豆油 vs.350bar 分画=0.0140；大豆油 vs.対照=0.0276

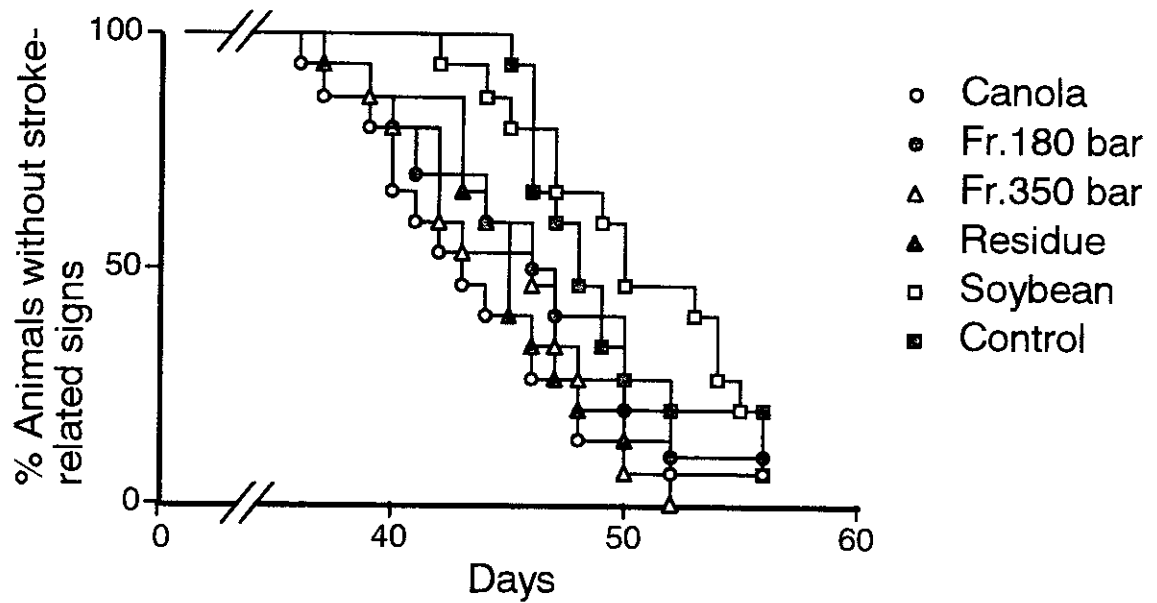


図 2 Canola 油、同 180bar 分画、同 350bar 分画、同残渣、大豆油を 10w/w%含有する飼料または対照飼料 (CE-2) を与えた SHRSP における給餌日数と脳卒中症状を示さない正常個体の残存率の関係

Canola 油 180bar 分画 (N=10) 以外は N=15、詳細は本文参照。

Logrank test で有意差が認められた群間の P 値：大豆油 vs.Canola 油=0.0149；大豆油 vs.350bar 分画=0.0025；大豆油 vs.残渣=0.0018；対照 vs.Canola 油=0.0192；対照 vs.残渣=0.0204