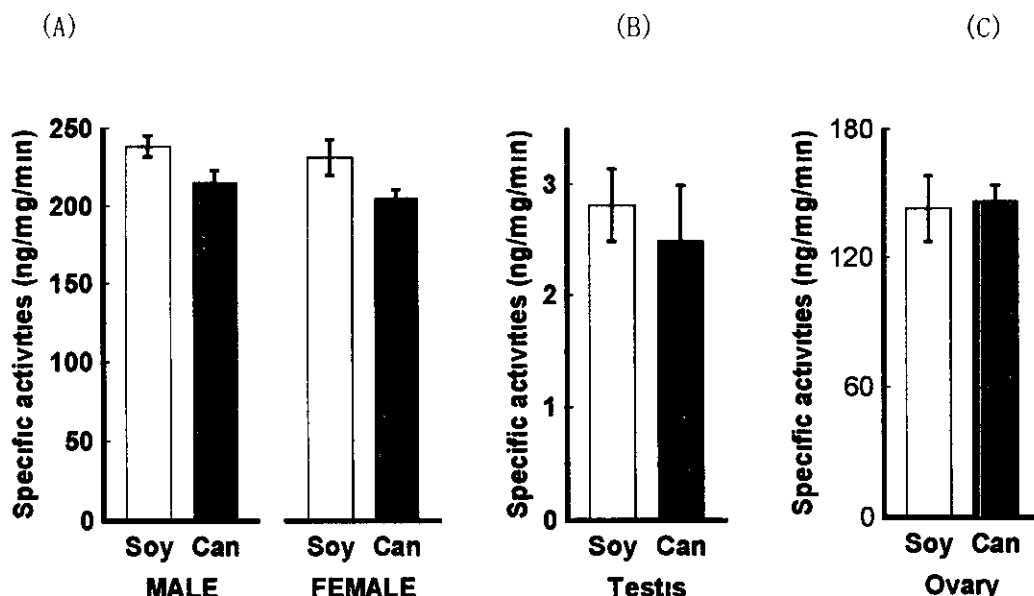


図5 3β-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in adrenal (A), testis (B) and ovary (C) from SHRSP rats fed the Can diet or Soy diet.  
The differences between the two groups were not significant



3) 副腎、腎臓の植物ステロール (PS) 含量  
コレステロール含量は両食餌群間に差は無かったか、campesterol、総 PS、PS/コレステロ

ール比は、キャノーラ油群が有意に高かった (表 10, 11)。両食餌群間で臓器重量に差は無かった。

表 10 The weight and the sterol content in testes (mg/g tissue) from SHRSP rats at 16 wk of age. Diet containing 10 % canola or soybean oil was fed from 4 wk of age.

	Canola	Soybean	P value
Cholesterol	1.29 ± 0.15	1.40 ± 0.26	0.352
Campesterol	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.005
β-Sitosterol	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.416
Phytosterol	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.020
Total sterol	1.35 ± 0.16	1.44 ± 0.27	0.444
PS/Chol	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.020
Testes weight(g)	3.00 ± 0.34	3.00 ± 0.18	0.991

Values are means ± SD. Statistical analysis was performed using a Student's *t*-test.

表 11 The weight and the sterol content in kidneys (mg/g tissue) from SHRSP rats at 16 wk of age. Diet containing 10 % canola or soybean oil was fed from 4 wk of age.

	Canola	Soybean	P value
Cholesterol	4.50 ± 0.36	4.76 ± 0.42	0.238
Campesterol	0.33 ± 0.02	0.21 ± 0.02	<0.001
β-Sitosterol	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.044
Phytosterol	0.47 ± 0.03	0.34 ± 0.03	0.001
Total sterol	4.97 ± 0.39	5.10 ± 0.43	0.554
PS/Chol	0.10 ± 0.00	0.07 ± 0.01	<0.001
Kidneys weight (g)	2.29 ± 0.19	2.38 ± 0.22	0.494

Values are means ± SD. Statistical analysis was performed using a Student's *t*-test.

## 【考察】

マイクロアレイ法のデータ解析には様々な方法があるか [45]、今回は実験の方向性をつかむ上での参考のために行ったため、クラスター解析は行わなかった。並行して進められた実験結果を考慮に入れると、ステロイドホルモン関連の酵素の変化が著明であったため、その方向へ研究を展開した。今回、testosterone レベルに顕著な差が見出されたので、関連する遺伝子について RT-PCR 法などで確認する必要がある。

ステロイドホルモン関連酵素以外の遺伝子を見てみると、例えば、arylhydrocarbon receptor 類 (AhR) の遺伝子発現が変化をしていた。AhR はタイオキシンなどの炭化水素を直接のリガントとして、CYP1A1 や UGT-1 などの発現を誘導する転写因子である [46]。キャノーラ油に含まれる未知の有害成分がこのリガントとなり、AhR 遺伝子の発現を上昇させているかもしれない。近年、この遺伝子の発現が estrogen receptor (ER) とリンクしていることかわかり [47]、ステロイドホルモンの変化に同調して、この遺伝子の発現が上昇した可能性も考えられる。

脂質関連では、PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) gamma coactivator (PGC-1)、PPAR  $\delta$ 、constitutive androstane receptor (CAR) などの転写因子の遺伝子発現が変化していた。PGC-1 と PPAR  $\delta$  はエネルギー産生・蓄積に深く関与している [48-50]。CAR は PXR などと同しく薬物代謝に関与する転写因子で、胆汁酸合成にも関与している [51]。また、エイコサノイド代謝に関与する lysophospholipase [52, 53] や prostaglandin F receptor [54]、脂肪酸不飽和化酵素で他の脂質代謝にも大きく関わる SCD-1 [55, 56] にも変化があった。しかし、これらの発現の変化は、他の類似の役割を持つ酵素の変化で補償されており、外見上は生体には変化が現れないかもしれない。例えば、SCD-1 は Can 群で発現が減少しているか ( $\times 0.21$ )、SCD-2 は逆に上昇している ( $\times 1.41$ )。

一方、K チャネル群で発現の差の大きいものが多かった。SHRSP ラットでは腎障害に伴い浸透圧調整に不具合が生じた結果であるとも考えられたか、直接的に説明できる遺伝子は確認できなかった。Naito らの報告によると Can 食の摂取により  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase の活性が各種の臓器で上昇していた [41]。しかし、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase 自体の変化はマイクロアレイの結果からでは見られなかった。これら変化は食餌群間の違い

だけでなく病態の進行によって変わるとも考えられる。また、データが多量であるため、誤ったデータも確率的に存在していると思われる。これらを加味した上で、マイクロアレイのデータを取り扱うことが重要である。

今回の測定の結果、血清および精巣中の testosterone 量が減少していた。testosterone は男性の 2 次成長に関与しているほか、筋肉や骨代謝に関与している [57]。これらの機能は testosterone の代謝物である DHT が AR を介して発現していると考えられている [58]。DHT の主作用部位の一つである前立腺では DHT 含量に差がなかったか、前立腺の重量は有意に Can 群で低かった。マイクロアレイの結果から肝臓の androgen binding protein の発現が Can 群で少なかったため、testosterone level の低下と関連すると思われる。

副腎での  $3\beta$ -HSD の活性は有意な差ではないものの Can 群で低い傾向を示した。これはマイクロアレイの結果と対応していた。しかし、実際に個別別で見てみると  $3\beta$ -HSD 活性の減少と testosterone の減少は相関していなかった

(data not shown)。Testosterone 合成に関わるもう一つの酵素  $5\alpha$ -reductase はマイクロアレイの結果からは Can 群で上昇しているか、検討を行う必要がある。また、 $3\beta$ -HSD は他のステロイドの合成にも関与している [59]。今回は estradiol 含量に関してははらつきが大きかったため有意な差が認められなかった。しかし、性周期を同調させることで、より正確な比較ができてくると思われる。Estradiol は女性ホルモンとしてだけでなく幅広い生理活性を有するため、その検討は重要であると考えられる。また、イオンチャネルの変化や腎障害の亢進などを考慮に入れると、ミネラルコルチコイドにも変化がある可能性がある。しかし、血中濃度が低く、少しのストレスで値が大きく変動するため、正確な測定は容易ではない。これらの差が、上述の生殖生理に及ぼす影響といかに関連するかは、今後の課題である。

キャノーラ油の摂取は大豆油に比べて、SHRSP ラットの組織 testosterone レベルを有意に低下させた。また、上述のように、「想定されている有害因子は出生数を減らし、仔に伝わって仔の成長を遅らせ（雌雄）、寿命を短縮した（雄）」。これらの作用は内分泌攪乱物質、タイオキシン、の作用と極めて似ている。

日本人のタイオキシン摂取量は  $2.6 \text{ pg/kg/日}$  と算出されており、動物実験で testosterone

レベルが低下し始めるのは160 pg/kg/日オスターからとされている [60]。すなわち、両レベルの間には60倍ほどの差がある。これに対し、日本人のキャノーラ油の摂取量と動物実験での testosterone 低下レベルの間には大きな差が見られず、内分泌攪乱作用物質の中では数種の食用油の問題が最も重要であるかもしれない。

食用油のタイオキシン含量は極めて低く、Can 食から摂取するタイオキシンは0.3 pg/kg/

日と算出できる。したがって、今回、見出された Can 食の内分泌攪乱作用は、混在するタイオキシンの作用によるとは考えにくい。タイオキシン類似の作用をもつ別の有害因子の存在が想定できる。この関連で、アフラナ科植物中に見出されているイントール誘導体は興味深く、イントール-3-カルヒノールは胃酸の条件で重合して AhR 受容体に親和性の高い物質に変換される [61-63]。AhR 受容体に親和性を持つ因子の探索も、ひとつの課題となる。

### III 組織変化の病理学的評価

#### 【序】

SHRSP ラットは食塩水負荷により高頻度で致死性の脳卒中を引き起こす。脳出血と脳梗塞の両方を引き起こし、大脳皮質前内部および後頭部と脳幹神経節周辺部がそれらの発生部位として知られている [64]。また、高血圧や脳卒中の原因となる遺伝子の染色体領域は報告されており [65]、いくつかの原因遺伝子も報告されている。

以前にわれわれのグループはキャノーラ油および硬化大豆油などの摂取により、大豆油の摂取に比べて腎障害が促進されることを報告した。組織病理学的変化を観察すると腎臓では糸球体損傷、腎血管損傷などが見られ、renin、angiotensin、TGF $\beta$ などの遺伝子発現が上昇していた [37]。SHRSP ラットの血圧が腎臓の機能低下に伴っておきることから [66]、油脂の摂取により、これらの病態が進行したと考えられた。

今回、Can 食および Soy 食を与えた 16 週齢ラットの脳、肝臓、脾臓をホルマリノ固定し、パラフィン包埋切片を作成し、ヘマトキシン-

エオン染色して組織病理学的評価を行った。

#### 【結果と考察】

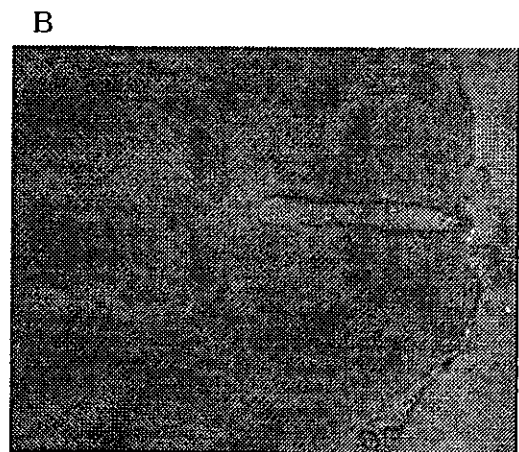
##### 1) 脳における病理学的変化

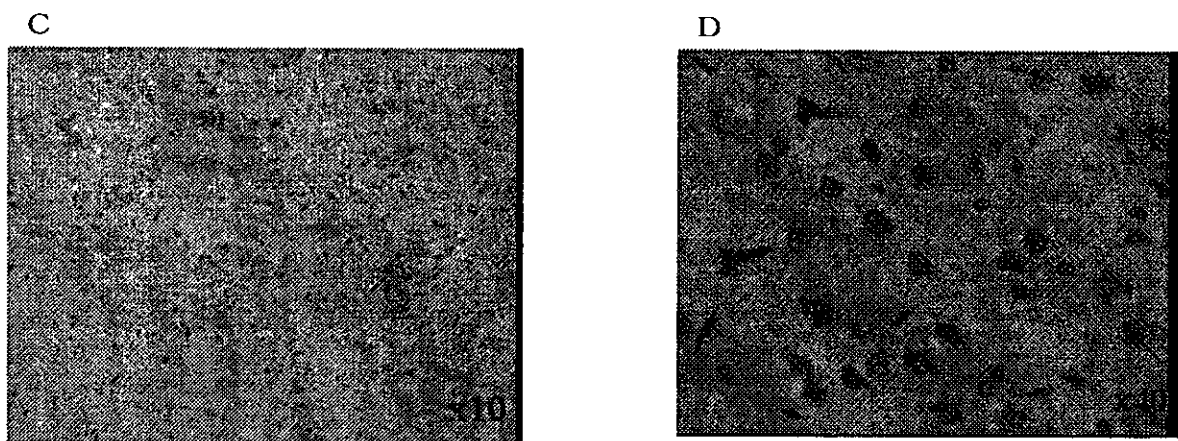
図 6 に 16 週齢時におけるキャノーラ油を摂取した SHRSP ラット(雄)の中で、顕著な脳出血の確認できた組織像を示した。大脳皮質浅層に点状の出血と浮腫が見られ、その周囲に虚血性の変性が見られた (A)。基底核や第 3 脳質には変化が見られなかった (B)。

(C) (D) では出血斑周囲の図を拡大し、神経細胞、神経膠細胞の消失、空泡変性の様子を示した。この個体自体は、外見上、顕著な病態を示していなかった。また、このような変化は他の Can 群の個体や Soy 群では確認できなかった。部位的には SHRSP ラットの出血部位に近いものもあり、特徴的な脳出血の後にその周囲での炎症反応および虚血の結果としての神経細胞の脱落等が起きたのではないかと考えられた。また、タイムポイントとしては差が大きいと考えられた 16 週齢を選んだか、実際に出血をしていた個体は 6 匹中 1 匹だけであった。

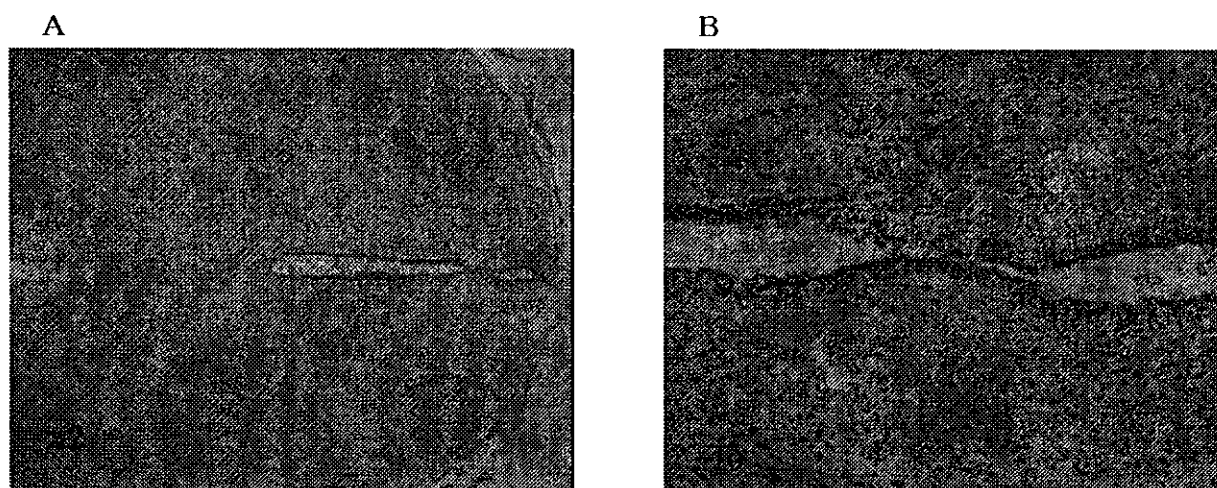
図 6 Photomicrographic image of cerebral hemorrhage lesion in 16-wks-old SHRSP rats fed Can diet (X 2)

In cerebral cortex, severe bleeding and edema were observed (A), but not detected in the third ventricle (B). Higher power reviews of hemorrhage/eosin of cerebrum show neuronal loss (C) and perineuronal halo resembling spongiform change (D). These lesions were not observed in other Can diet group or Soy diet group

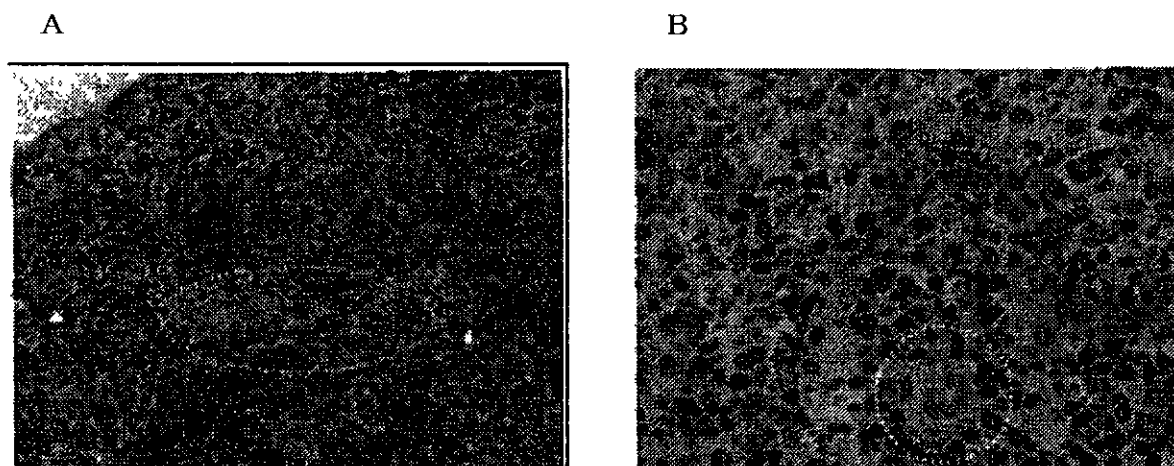




☒ 7 Photomicrographic image of some vacuoles near the third ventricle of 16-wks-old SHRSP rats fed the Soy diet (A) Overall of the third ventricle, and (B) magnified image of the picture (A) These vacuoles were detected in four out of 6 rats of the Soy group, but not in other two rats nor all rats fed the Can diet



☒ 8 Image of spleen showing the appearance of megakaryocytes The circled portion shows megakaryocyte Magnification,  $\times 20$  (A) and  $\times 40$  (B) The number of megakaryocyte was significantly greater in the Can diet group ( $18 \pm 4/10$  HPF) compared with the Soy diet group ( $12 \pm 3/10$  HPF)



一方、Soy群では第3脳質付近に脂肪の沈着を疑わせる所見を確認できた(図7)。これはSoy群6匹中4匹において、同様の部位で確認できたか、Can群のラットおよび他のSoy群のラットにはこのような所見は観察されなかった。この部位の変化か出血後の神経細胞の脱落を埋めるものなのか、また、別の役割で新たに産生されたものかはわからない。具体的にどのような変化か起きているは更に検討が必要である。しかし、Soy群のみに認められたのは興味深い。脳卒中に対して何らかの保護的な作用か働く機構かあり、キャノーラ油の摂取により、その合成か妨げられているのかもしれない。

## 2) 脾臓における病理学的変化

脾臓では出血などの主だった病変部位は確認できなかったか、巨核球の数を確認するとCan群のほうが有意に多かった(Can 18±4/10 HPF vs Soy 12±3/10 HPF,  $p<0.05$ , 図8)。巨核球は骨髄細胞に存在する巨核を持つ細胞である。通常の細胞より多くの染色体をもつため、それを包む核か巨大化しており、他の血球細胞(赤血球や白血球)に比べると3~1.5倍の大きさをもつ。この巨核球の細胞質か細かくちぎれた断片か血小板である。脾臓においては血小板を取り込み、マクロファージにより貪食され、これを破壊する役割を持つ。

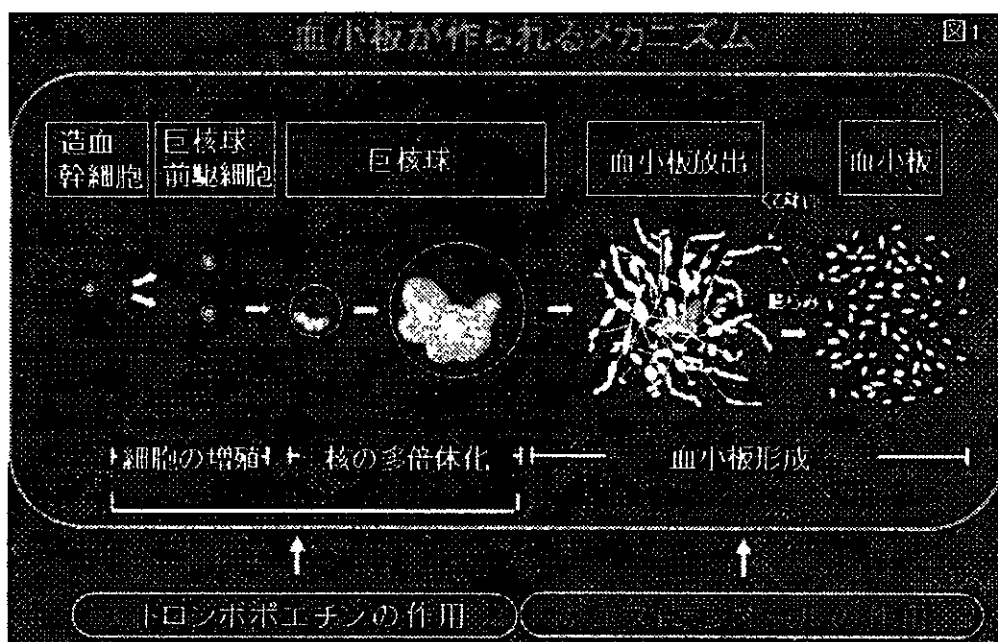
キャノーラ油の摂取により血中の血小板数

か減少している現象は複数の研究者によってSHRSP ラットや新生豚で確認されている[42, 67-70]。血小板の減少はこの巨核球の時点での脾臓での取り込みに起因しているかもしれない。例えば、血小板減少症紫斑症では自己抗体により血液中の血小板か破壊される。これに対し、骨髄で産生される巨核球か増加し、血小板を産生する[71]。また、当研究室でもWistar/ST ラットに4週間キャノーラ油を摂取させると大豆油摂取群に比べて脾臓重量か増加することを確認した(Can, 0.56±0.03 mg/ラット, Soy, 0.45±0.03 mg/ラット,  $p<0.05$ )。Wistar/ST ラットはSHRSP ラットと異なり、植物ステロールの蓄積性を持たないことから、脾臓における巨核球数の増加は植物ステロール以外の有害因子による作用と考えられる。

肝臓においては両群ともに顕著な組織病理学的違いは見られなかった。

Oharaらは、骨髄での前骨髄球と巨核球の減少と前赤芽球の増加、脾臓での髓外造血の上昇を報告した(本報告書、大原直樹分担)。すなわち、有意な血小板数の減少、赤血球の減少傾向に対応する組織像か観察された(図9)。一方、巨核球より血小板に成熟するためにはestradiolの作用か必要である[72]。今回の実験系ではestradiol レベルに有意な差か見られなかったか、ステロイドホルモン類に変化かあることと血球細胞の異常とは相関かあるかもしれない。

図9 血小板が作られるメカニズム[73]



#### IV 分子蒸留法によるキャノーラ油の分画—有害因子の除去

##### 【分画結果】

キャノーラ油 40kg を遠心式分子蒸留 (CMD) 法により分画し (図 10、オリサ油化(株)委託)、蒸留油 (0.9 kg) と回収油 (36.3 kg) を得た。蒸留油に有害成分が回収率 50% で分留されたと仮定し、大豆油で 20 倍に希釈し、キャノーラ油と等量有害成分を含むよう調製した (蒸留部 0.15 kg に対し大豆油 2.85 kg を加えた)。回収油は希釈することなく用いた。大豆油 (Soy, n=12)、キャノーラ油 (Can, n=12)、キャノ

ーラ油を CMD して得られた回収油 (CMD-R, n=12)、キャノーラ油を CMD 法で分画して得られた蒸留油と大豆油混合物 (CMD-D/Soy, n=12) をそれぞれ標準飼料 (日本クレア、CE2) と 1 : 9 の割合で混合し、ペレット化して給餌した。

摂取させた実験飼料の脂肪酸組成を表 12 に、ステロール含量を表 13 に示した。いずれも n = 3 で測定した。

図 10 Fractionation of canola oil by a CMD method

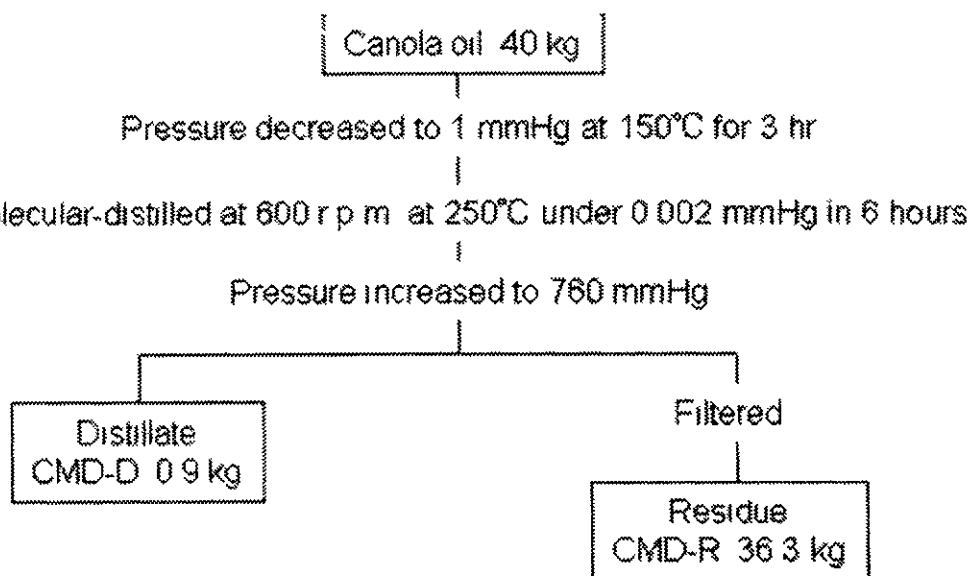


表 12 Fatty acid compositions of the test diets (% of total fatty acids).

	Canola	CMD-R	CMD-D/Soy	Soybean
14:0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0
15:0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
16:0	8.1 ± 0.1	7.8 ± 0.1	11.9 ± 0.1	11.8 ± 0.0
16:1	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
18:0	1.5 ± 0.0	1.9 ± 0.1	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.0
18:1n-9	51.6 ± 0.1	51.3 ± 0.2	25.0 ± 0.2	23.8 ± 0.0
18:2n-6	27.7 ± 0.1	27.6 ± 0.2	50.3 ± 0.4	52.1 ± 0.1
18:3n-3	6.8 ± 0.0	7.2 ± 0.1	5.9 ± 0.1	5.9 ± 0.0
20:0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
20:1	1.3 ± 0.0	1.1 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0
20:5n-3	0.6 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0
22:0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
22:1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0
22:6n-3	0.5 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0
24:0	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0
24:1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
n-6/n-3 ratio	3.5 ± 0.0	3.2 ± 0.1	6.9 ± 0.2	7.5 ± 0.0
Content (mg/g diet)	116.7 ± 3.5	124.7 ± 3.6	121.1 ± 5.7	118.7 ± 2.1

表 13 Sterol contents of the test diets (mg/100 g diet)

	Canola	CMD-R	CMD-D/Soy	Soybean
Cholesterol	420 ± 17	486 ± 06	470 ± 24	414 ± 16
Brassicasterol	42 ± 01	18 ± 02	40 ± 05	00 ± 00
Campesterol	287 ± 13	292 ± 13	325 ± 05	154 ± 05
Stigmasterol	28 ± 01	38 ± 03	86 ± 09	62 ± 01
β-Sitosterol	458 ± 20	469 ± 25	618 ± 37	333 ± 13
Phytosterol	815 ± 35	816 ± 30	1069 ± 52	550 ± 19
Total sterol	1236 ± 52	1301 ± 28	1539 ± 72	964 ± 33
PS/Chol ratio	1.94 ± 0.01	1.68 ± 0.07	2.28 ± 0.08	1.33 ± 0.02

【生存率評価】

実験飼料と共に 0.5% 食塩水を 4 週齢から雄性 SHRSP ラットに自由摂取させた。12 週齢までの

体重は各群順調に増加し、平均体重については、全食餌群間において差は見られなかった（データ示さず）。生存率カーブを（図 11）に示す。

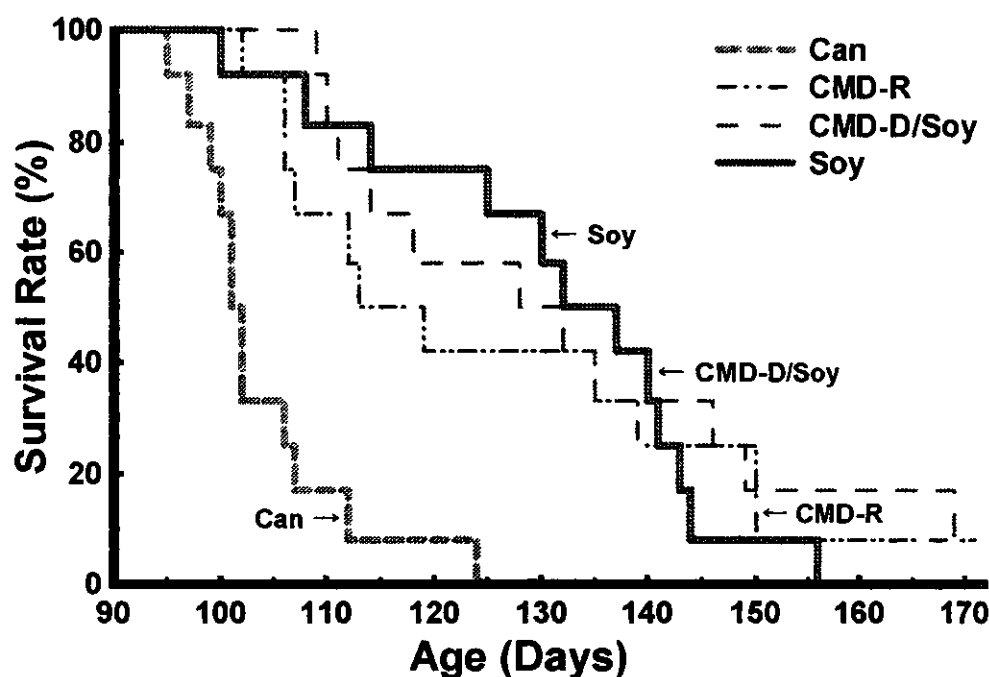


図 11 The survival curve of male SHRSP rats fed a diet containing 10% oil

Diet was fed to SHRSP rats from 4 wk of age. NaCl solution (0.5%) was given *ad libitum* as drinking water.

表 15 Statistical analysis of the survival rates shown in Figure 11 (図 11)

		Canola	CMD-R	CMD-D/Soy (5)	Soybean
Days ± SEM		103 ± 2	>125 ± 6	>132 ± 7	130 ± 5
v s Canola	Log-rank		0.001	<0.001	<0.001
	Wilcoxon		0.001	<0.001	<0.001
v s CMD-R	Log-rank			0.720	0.960
	Wilcoxon			0.420	0.419
v s CMD-D/Soy (5)	Log-rank				0.505
	Wilcoxon				0.954

Twelve rats were assigned for survival time measurement in each dietary group



寿命測定の結果、CMD-R、CMD-D/Soyの双方が大豆油の生存曲線とほぼ重なり、統計解析の結果(表15)からも、CMD分画により寿命短縮活性が除かれたといえる。ただし、有害因子の捕集はできなかった。そこで有害因子が前処理段階(150℃、3時間)の条件で除かれたか、あるいは250℃の加熱条件で分解した可能性を考え、次に検証した。

#### 【減圧加熱による有害因子の除去の試み】

大豆油(Soy, n=12)、キャノーラ油(Can, n=12)、キャノーラ油を3 mmHg、160℃で3時間減圧蒸留して得られた残留油(Can/160, n=12)、キャノーラ油を3 mmHg、250℃で3時間減圧蒸留して得られた残留油(Can/250, n=11)の4群を設定した。この実験ではいずれも団子状飼料を用いた。摂取させた実験飼料の脂肪酸組成を表16に示す。

表16 Fatty acid compositions of the test diets (% of total fatty acids).

	Canola	Can/160	Can/250	Soybean
14:0	0.2	0.2	0.2	0.2
15:0	0.0	0.0	0.1	0.1
16:0	7.8	7.7	8.1	12.0
16:1	0.4	0.4	0.4	0.3
18:0	1.6	1.7	1.7	3.7
18:1n-9	51.2	51.3	52.5	23.2
18:2n-6	29.0	28.3	29.1	52.5
18:3n-3	6.8	7.1	4.8	6.1
20:0	0.4	0.4	0.4	0.3
20:1	1.0	1.1	1.1	0.4
20:5n-3	0.5	0.5	0.5	0.4
22:0	0.2	0.2	0.2	0.2
22:6n-3	0.5	0.6	0.6	0.5
24:0	0.1	0.2	0.2	0.1
24:1	0.1	0.2	0.2	0.0
n-6/n-3 ratio	3.7	3.4	4.9	7.5
Content (mg/g diet)	106.6	112.2	118.7	114.5

寿命測定の結果(図12、表17)、Can/160群の寿命はLog-rank検定において大豆油群との有意差が検出されなくなっているものの、Can/250、Can/160の両食餌群ともCan群との生存率の差は無く、これらの条件では有害因子は除去できなかった。キャノーラ油の有害因子はこの条件で熱失活したものではなく、CMD法に

より除去されたものであると推測できる。今後、未回収画分を回収し、寿命への影響を評価する必要がある。

以上の結果、遠心分子蒸留法により、「寿命短縮活性を実質的に除去したキャノーラ油を>90%の収率で得る」ことに成功した。

图 12 The survival curve of SHRSP rats fed a diet containing 10% oil (Can, Can/250, Soy/160, or Soy) Diet supplemented with the indicated oil was fed to SHRSP rats from 4 wk of age NaCl solution (0.5%) was given *ad libitum* as drinking water Results of statistical analysis are presented below

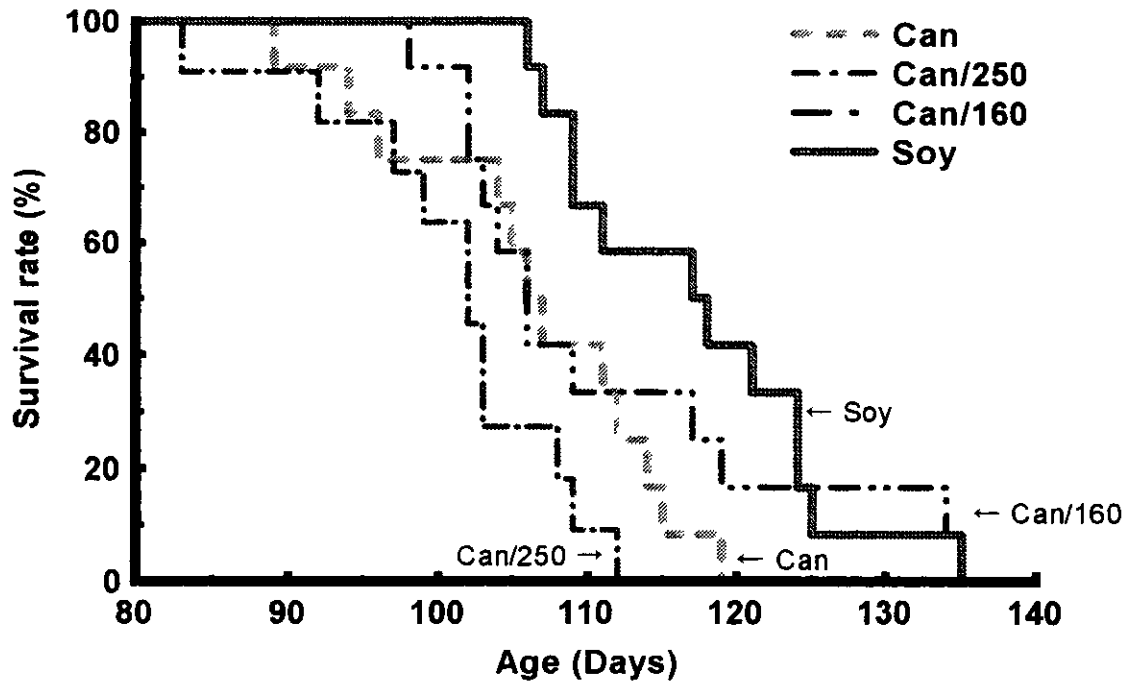


表 17 Statistical analysis of the survival rates shown in Figure 12 (图 12)

		Canola	Can/250	Can/160	Soybean
Days ± SEM		107 ± 9	101 ± 8	112 ± 12	117 ± 9
v s Canola	Log-rank		0.051	0.290	<b>0.009</b>
	Wilcoxon		0.112	0.624	<b>0.014</b>
v s Can/250	Log-rank			<b>0.035</b>	<b>&lt;0.001</b>
	Wilcoxon			<b>0.047</b>	<b>&lt;0.001</b>
v s Can/160	Log-rank				0.258
	Wilcoxon				<b>0.048</b>

Twelve rats were assigned for survival time measurement in each dietary group, except for Can/250 in which the number of rats was eleven

## V 寿命短縮因子としての植物ステロール (PS) の評価

### 【序】

Ratnayake らはキャノーラ油、コーン油、オリーブ油、大豆油を比較し、PS 含量が高いキャノーラ油、コーン油か PS 含量の低い大豆油に比べて SHRSP ラットの寿命を短縮すること、キャノーラ油から精製した PS 分画を大豆油に添加すると寿命が短縮することを示し、PS が寿命短縮作用の一因であるとした[38, 39]。ただし、オリーブ油は PS 含量が低いにもかかわらず寿命短縮活性が最も強く、これを例外とした[39]。SHRSP ラットは WKA ラット、SHR ラットは体内に PS を蓄積しやすい特徴があるので[26]、観察された数種の食用油の寿命短縮活性は、特殊な動物モデルに見られる植物ステロールの影響である、とみなす風潮もあった。しかしこの理解は、我々のグループが報告した、「キャノーラ油のリパーゼ分解物、アルカリ分解物が寿命短縮作用を示さない」という結果と合わない。また、オリーブ油、硬化大豆油は PS 含量が低いにも関わらず強い寿命短縮活性を示している[7, 35]。PS は、油脂中では遊離型と脂肪酸エステル型の状態で存在しているか、遊離型のみが有害性を示す可能性は、アルカリ分解物が寿

命短縮作用を示さない[7]ことから除外できる。そこで、食餌 PS、組織 PS が寿命短縮作用に及ぼす影響を、再評価することとした。

### 1) 飼料の PS 含量と寿命の相関

これまで当研究室で寿命を評価した食用油および今回評価した食用油、あるいはキャノーラ油の加水分解物(遊離脂肪酸分画)について、飼料の植物ステロール含量と寿命の関係を図 13 に示した。寿命は実験ごとに変動するので、実験毎にキャノーラ油食と大豆油食を加え、大豆油群の寿命を 1 として相対的な寿命の値を用いた。

植物ステロール含量に対する相関係数を求めると、campesterol ( $r=0.167$ ,  $p=0.586$ )、stigmasterol ( $r=-0.160$ ,  $p=0.602$ )、 $\beta$ -sitosterol ( $r=0.025$ ,  $p=0.937$ )、および総植物ステロール含量 ( $r=0.046$ ,  $p=0.881$ ) となり、これら主要植物ステロールと寿命との間に有意な相関関係は見られなかった(図 13)。もとの油の植物ステロール含量と寿命の間でも同様に、有意な相関関係は見られなかった(データ示さず)。

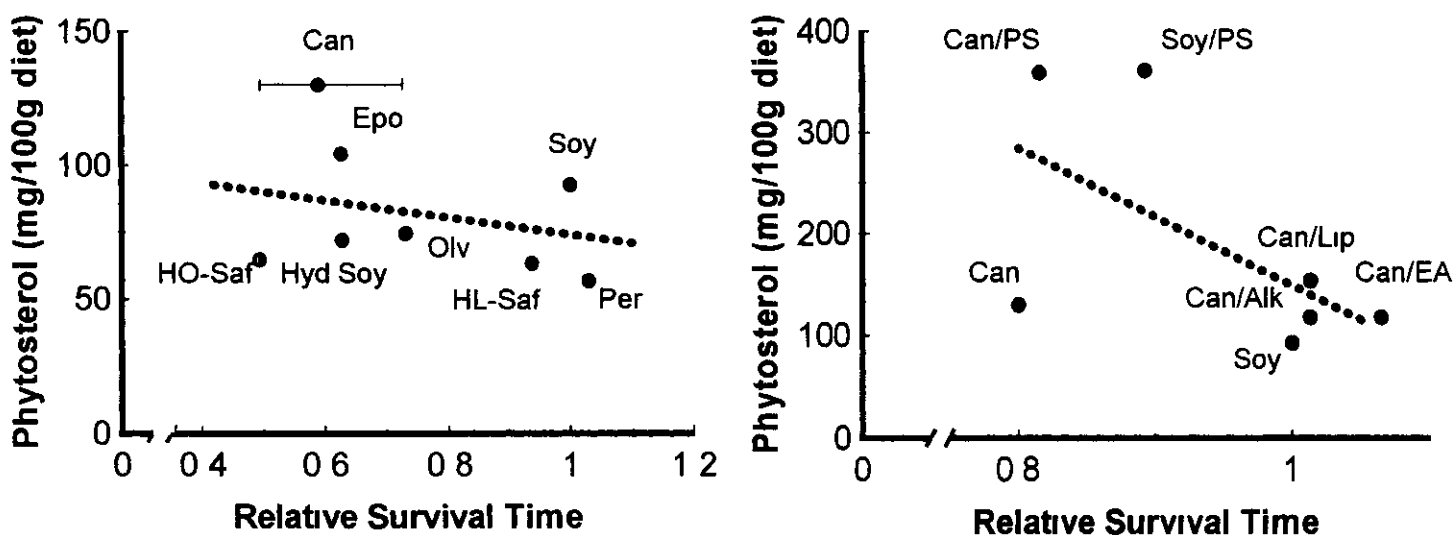


図 13 Correlation between PS content of diet and relative survival time

(A) A conventional strain of SHRSP rats was used under 1% NaCl-loading or tap water as drinking water. The survival times for high-oleic safflower oil (HO-Saf), high-linoleic safflower oil (HL-Saf), olive oil (Olv), evening primrose oil (Epo), perilla oil (Per), soybean oil (Soy) and canola oil (Can) and hydrogenated soybean oil (Hyd Soy) were taken from previous observations. The number of rats was 11~12 except for HL-Saf ( $n=7$ ), and the mean survival time of the Soy group was set at 1 to calculate the relative survival times. The range of relative survival times of Can group among different sets of experiments was shown in a horizontal bar. The PS content was expressed as mg total phytosterol/100g diet. Pearson's correlation factors were  $r=-0.245$  and  $p=0.558$ .

(B) A SPF strain of SHRSP rats was used under 0.5% NaCl-loading (present data). Pearson's correlation factors were  $r=-0.261$  and  $p=0.508$ .

1-2-2 PS 添加油脂が SHRSP ラットの寿命に及ぼす影響

PS による有害作用を検討するために、PS 添加食群の寿命測定を行った。キャノーラ油 (Canola, n=12)、大豆油 (Soybean, n=12) の他、キャノーラ油 2,880 g に PS (大豆由来) を 120 g 添加した群 (Can/PS, n=12)、大豆油

2,880 g に PS を 120 g 添加した群 (Soy/PS, n=12) の 4 群を設定した。ペレット化した飼料を用いた。

摂取させた実験飼料の脂肪酸組成を表 18 に、ステロール含量を表 19 に示した。いずれも n=3 で測定した。

表 18 Fatty acid compositions of the test diets (% of total fatty acid)

	Canola	Can/PS	Soy/PS	Soybean
14 0	0.3	0.3	0.3	0.2
15 0	0.1	0.1	0.0	0.0
16 0	8.1	8.1	11.9	11.8
16 1	0.5	0.4	0.3	0.3
18 0	1.5	1.7	4.0	3.8
18 1n-9	51.6	51.0	24.2	23.8
18 2n-6	27.7	28.2	50.8	52.1
18 3n-3	6.8	6.7	5.8	5.9
20 0	0.4	0.4	0.3	0.3
20 1	1.3	1.1	0.4	0.4
20 5n-3	0.6	0.8	0.8	0.5
22 0	0.2	0.2	0.2	0.2
22 1	0.2	0.1	0.1	0.0
22 6n-3	0.5	0.7	0.7	0.6
24 0	0.2	0.1	0.1	0.1
24 1	0.2	0.2	0.0	0.0
n-6/n-3 ratio	3.5	3.4	7.0	7.5
Content (mg/g diet)	116.7	118.8	120.6	118.7

表 19 Sterol contents in the test diets (mg/100 g diet)

	PS(mg/g PS)	Canola	Can/PS	Soy/PS	Soybean
Cholesterol	29 ± 0.1	420 ± 1.7	427 ± 2.0	40.7 ± 3.0	41.4 ± 1.6
Brassicasterol	176 ± 0.2	42 ± 0.1	74 ± 0.2 *	34 ± 0.2 *	0.0 ± 0.0
Campesterol	2728 ± 7.2	287 ± 1.3	96.2 ± 4.6	83.4 ± 4.8	15.4 ± 0.5
Stigmasterol	1317 ± 2.0	28 ± 0.1	32.1 ± 2.9	37.9 ± 2.1	6.2 ± 0.1
β-Sitosterol	5097 ± 15.3	45.8 ± 2.0	161.7 ± 9.8	155.4 ± 8.9	33.3 ± 1.3
Phytosterol	931.7 ± 20.3	81.5 ± 3.5	296.5 ± 16.7	280.2 ± 13.6	55.0 ± 1.9
Total sterol	934.7 ± 20.2	123.6 ± 5.2	339.2 ± 18.6	320.9 ± 16.6	96.4 ± 3.3
PS/Chol ratio	319.25 ± 15.57	1.94 ± 0.01	6.93 ± 0.14	6.89 ± 0.17	1.33 ± 0.02

\*, Brassicasterol fraction in the PS mixture (Sigma) includes unidentified component (dihydrobrassicasterol?)

12 週齢までの体重は各群とも順調に増加し、平均体重 (図 14) については、全食餌群間において差は見られなかった。しかし、PS を添加し

た 2 つの食餌群では、添加しない群に比較して 9 週齢から体重の伸びが鈍る傾向が見られた。

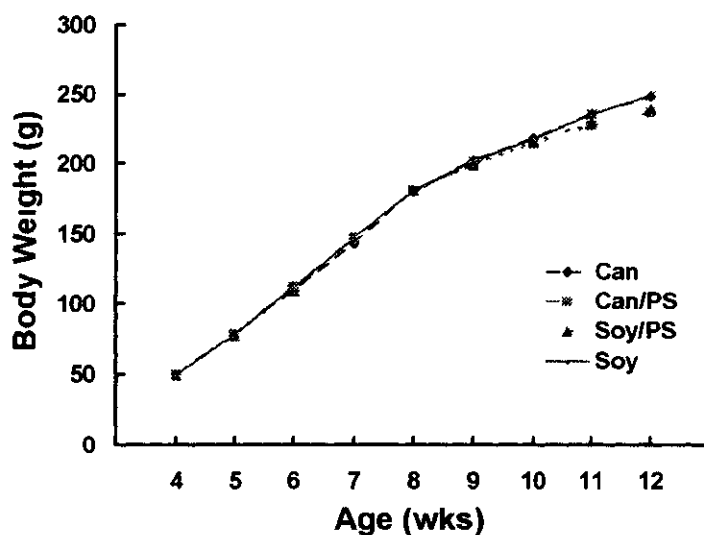


図 14 Effect of dietary oils and PS on the growth rates of male SHRSP rats

Diet containing 10% oil with or without supplemented phytosterol (PS) was fed to male SHRSP rats from 4 wk of age

寿命測定の結果、キャノーラ油に過剰の PS を添加しても、寿命の更なる短縮はみられなかった。また大豆油食にキャノーラ油の 3.5 倍過剰の PS を添加した場合、大豆油群に比較して有意な寿命短縮を確認できたか、Can 群より有意に長かった (図 15、表 20)。

4 章で示したように (図 11、表 15)、CMD-D/Soy 群の PS 含量は Can 群より多かったか、寿命は Can 群より有意に長く Soy 群と同じであった。すなわちこのアノセイ条件で、多量の PS は SHRSP ラットの寿命を短縮するか、Can 群と同程度の PS は短縮しないことか明らかとなった。

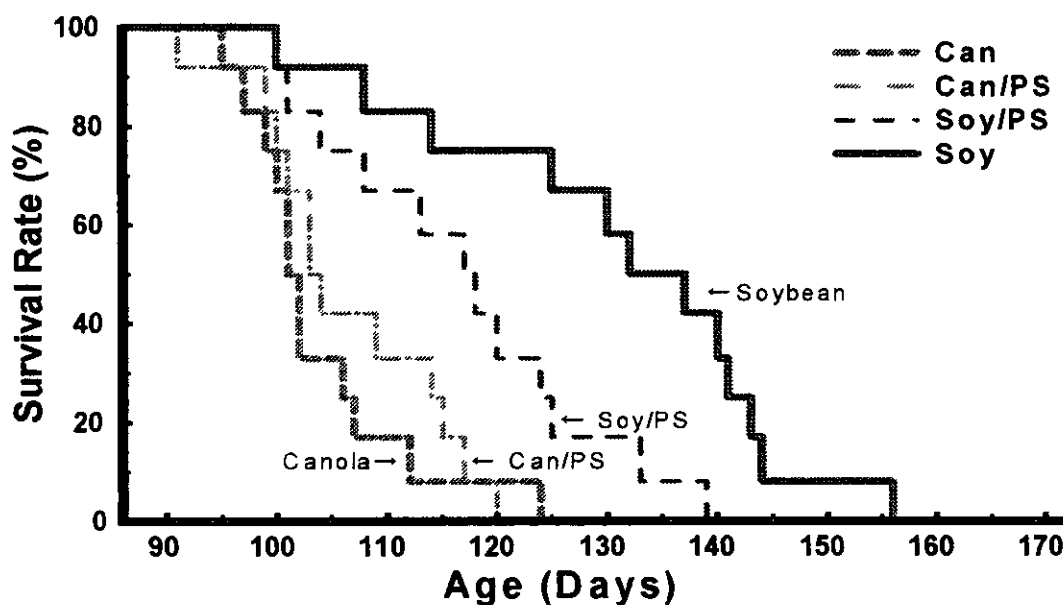


図 15 The survival curve of SHRSP rats fed a diet containing 10% oil with or without PS

Diets were fed to SHRSP rats from 4 wk of age NaCl solution (0.5%) was given *ad libitum* as drinking water Results of statistical analysis were presented in Table 20 (表 20)

表 20 Statistical analysis of the survival rates of SHRSP rats fed a different diet

		Canola	Can/PS	Soy/PS	Soybean
Days ± SEM		103 ± 2	106 ± 2	116 ± 4	130 ± 5
v s Canola	Log-rank		0.514	<b>0.003</b>	<b>&lt;0.001</b>
	Wilcoxon		0.326	<b>0.005</b>	<b>&lt;0.001</b>
v s Can/PS	Log-rank			<b>0.017</b>	<b>&lt;0.001</b>
	Wilcoxon			<b>0.037</b>	<b>0.001</b>
v s Soy/PS	Log-rank				<b>0.008</b>
	Wilcoxon				<b>0.027</b>

Twelve rats were assigned for survival time measurement in each dietary group

【考察】 以上の結果は、観察された寿命短縮作用が campesterol、 $\beta$ -stigmasterol、sitososterol、brassicasterol など主要植物ステロール以外の有害因子によるという解釈を支持している。

一方、われわれの使用した餌はラット普通食 (CE-2、日本クレア) を基本食としており、素材由来のコレステロールを含んでいる。これに対し、Ratnayake ら[38]の使用した基本食は精製飼料 (semi-purified) であり、コレステ

ロールを含まない。したがって、この条件の差が見かけ上の差を生じさせている可能性は否定できなかった。しかし Ogawa らは最近、精製飼料を基本食とした場合でも Can 油食と同程度の寿命短縮作用を示すには 5 倍量の PS が必要であると報告した[70]。これらの結果に基づき、認められている寿命短縮作用は主要植物ステロール以外の有害因子によることか、より確かになってきた。

## VI 実験方法の詳細

### 飼料の調製

ラット普通食 (CE-2、2.7%の脂肪酸および 0.59%の食塩を含む 日本クレア) と各種油脂を 9 : 1 の比で混合したものをを用いた (油脂の終濃度は 12.7%、29 energy %)。あるいは研究室で調製した餌 (SK ミキサー-101S、エスケーミキサー、兵庫) を用いて、粉末普通飼料 CE-2 と油脂が均一になるまで最低速で 30 分間練合し、さらに蒸留水を { (CE-2+油脂) kg × 0.7 } l 加えて 10 分間練合し、およそ 100 g/個の団子状に製した。飼料 (キャノーラ油 (Can) 食、大豆油 (Soy) 食) は 4℃で真空容器あるいは -20℃、窒素封入下で保存した。給餌飼料は過酸化物質を 100 meq/kg 以下に保つため、2日に1度交換をした。植物ステロールの添加実験では  $\beta$ -Sitosterol (Sigma, St. Louis, MO) を 4% (w/w) になるように大豆油およびキャノーラ油に加えた。

### 飼育条件

脳卒中易発症性高血圧自然発症 (SHRSP) ラットはセアノク吉富 (Fukuoka) より購入し、当研究室で維持しているものをを用いた。著しく血圧が低いもの (11 週齢時にて  $\sigma$ 220mmHg、 $\text{♀}$ 195mmHg 以下) は交配には用いなかった。3 週齢で離乳した雄を、同腹子かてきる限り異なる

食餌群に、また体重の群間差が生しないように、振り分けた。試験飼料はとくに断りのない限り、4 週齢からラットに自由摂取させた。寿命測定実験では飲用水として 0.5%食塩水を与えた。寿命測定に用いたラットは体重および摂食量の測定以外にはなるべく触れないようにした。他の実験 (臓器採取、遺伝子発現評価、組織ステロイドホルモン評価など) に用いたラットに対しては、食塩水負荷は行わなかった。飼育は SPF 環境下 (室温 23 ± 3℃および湿度 50%に設定されたクリーン環境) で行った。

CMD 法と、PS 添加実験においては、ペレット化飼料を用い、減圧蒸留実験では団子状飼料を用いた。CMD 法と PS 添加実験においては、親の交配から仔の実験飼料給餌開始まで、プラスチック製床敷ケージを使用し、実験開始から 12 週齢時までを金属製ハンギンクケージにて 6 匹/ケージ、12 週齢時からはプラスチック製床敷ケージにて 4 匹/ケージで飼育した。減圧蒸留実験では、CMD、PS 添加実験と同様であるが、12 週齢時からも金属製ハンギンクケージを使用した。体重の測定は各個体か出生した曜日に、1 週間ごとに測定した。摂食量の測定には、1 週間ごとに 24 時間後の残量を計量し差を求めた。4 週齢、5 週齢時には、30 g/匹、6-12 週齢時には 40 g/匹の飼料であった。

### 出産数の確認

雌性 SHRSP ラット (F0, 4 週齢) を Can 食あるいは Soy 食で 11 週齢まで飼育した。普通飼料で飼育した同週齢の雄性ラットと♂ ♀ = 1 2 になるように保ち、交配させた。雄性ラットは 4 日ごとに別のラットに変え、計 8 日間同居させた。その後、単独ケージに移し、出産までの経過を観察した。出産(生育)数は 28 日齢時での子供の匹数とした。

仔 (F1) ラットは 3 週齢時で離乳し、4 週齢より同じ飼料で飼育した群 (Can→Can 群、Soy→Soy 群) と、飼料を変換した群 (Can→Soy 群、Soy→Can 群) にわけ、計 4 群 (F1) とした。

雌性 F1 ラットは同腹子よりランダムに 1 匹を選び、これを F0 と同様に交配して出産数 (F2) を数えた。一方、雄性ラットは 0.5% 食塩水負荷条件下で寿命を測定した。実験は飼育スペースの都合上 4 回に分けて行い、その合計数について統計処理した。

### 乳汁および血液の採取

離乳 8 時間後の親ラット (F0) から乳汁を採取した。ペントバルビタールによる麻酔条件下で、オキシトシン溶液 5 μl を皮下注射して乳汁を分泌させた。分析に十分な量を得られた 2 回分を用い脂肪酸とステロールを分析した。

乳汁採取より 3 週間後に、ペントバルビタール麻酔し、心臓採血により得た血液を分析に用いた。

本研究は名古屋市立大学動物実験倫理委員会の承諾を得て行われた。

### 腎臓、精巣のホモンエネート調製

前述の飼育条件において飼育した雄性 SHRSP ラットを、実験飼料摂取開始後 16 週齢の時点まで飼育した。12 時間絶食後、暗期 6 時間目にエーテル麻酔下、放血させ、速やかに精巣と腎臓を摘出し、重量を測定した後、液体窒素により凍結させた。これを水上で解凍し、重量を測定した。ワッセルマン試験管に移して、2 ml の 1 M リン酸緩衝液 (ブチルヒトロキントルエンを添加) を加え、氷冷下、ヒスコトロンによってホモンエネートとした。これをパスツールピペットでコニカルチューブに移した。ホモンエネートとならず、残留した臓器には同様に 2 ml の 1 M リン酸緩衝液を加えホモンナイスした。これを繰り返し、計 3 回ホモンナイスした。ホモンエネートはリン酸緩衝液により 10 ml までメスアップし、-20°C で凍結して保存した。

### 脂肪酸測定

以下の操作におけるガラス器具は全て使用前にクロロホルム/メタノール=2/1 の混合溶媒で 3 回ずつ洗浄して用いた。また特段の断りかからない限り、有機溶媒は和光純薬 (大阪) より購入した 1 級の溶媒を、精留塔を用いた蒸留器具で蒸留して用いた。試薬は生化学用、若しくは GC 用を用い、それらか入手できない場合は特級を用いた。

油脂のサンプリンクは 50 mg、或いは 100 mg をキャノプ付試験管に量り取り、これを 10 ml の n-ヘキサンに溶解し、そのうちの 1 ml を、ガラスピペットを用いて別のキャノプ付試験管に分取した。これに窒素を吹き付けてヘキサンを除き 5 mg、若しくは 10 mg の油脂のサンプルとした。飼料のサンプリンクは、ペレット化飼料は、乳鉢で粉末になるまで磨り潰し、そのうち 50 mg、あるいは 100 mg を分取してサンプルとした。団子状飼料はエノペントルフチューブにその一部を取り、80°C、2 時間加熱、あるいは窒素置換を行った上で、水流アスピレータで減圧したデシケータ中で 4°C、2 日間置き水分を除いた。これの 50 mg、あるいは 100 mg をキャノプ付試験管に分取してサンプルとした。臓器はホモンエネート 0.5 ml をマイクロピペットによってキャノプ付試験管に分取し、これをサンプルとした。ホモンエネートが凍結により凝固している場合は、水冷下ハンディソニケータで均一としてから分取した。

これらのサンプルに含まれる総脂質は Bligh & Dyer の方法 [75] に従い抽出した。即ち、内部標準として総脂質含量の 10% となるようヘプタデカン酸 (デカン溶液中  $1 \times 10^{-2}$  M フナコシ、東京) を、マイクロシリシンを用いて加え、さらに抗酸化剤としてブチルヒトロキントルエン (メタノール溶液中 5 mg/ml シクマーアルトリッチ、セントルイス) を総脂質含量の 1% となるようマイクロシリシンで加えた。これに組成がクロロホルム/メタノール/1M 塩化カリウム水溶液 = 1/2/0.8 である混合溶媒を 3.8 ml ずつ加えた (但し、臓器のサンプルに関してはクロロホルム/メタノール/1M 塩化カリウム水溶液 = 1/2/0.3 を 3.3 ml ずつ加えた)。これを密栓し、一晚 4°C に安置し、総脂質を溶出した。これにクロロホルム、1M 塩化カリウム水溶液をそれぞれ 1 ml ずつ加え、タリミキサーにより混合攪拌し、3,000 rpm × 10 min で遠心分離した。下層を分取し、上層にはクロロホルムを 2 ml 加えた。同様の操作 (混合攪拌、遠心分離、下層分取) を 2 回行い、合計 3 回の抽出を行った。ここで得られたクロロ

ホルム層（下層）を 38℃の水浴上で窒素を吹き付けて乾固した。

これに 5%塩酸メタノール（東京化成、東京）を 1 ml 加え、密栓して水浴上にて 1 時間 100℃で加熱し、脂肪酸をメチルエステルとした。

これに蒸留水と石油エーテルを 1 ml ずつ加え、タンチミキサーにより混合攪拌し、3,000 rpm × 10 min で遠心分離した。上層を分取し、下層には石油エーテルを 1 ml 加えた。同様の操作（混合攪拌、遠心分離、上層分取）を 2 回行い、合計 3 回の抽出を行った。ここで得られた石油エーテル層（上層）を 38℃の水浴上で窒素を吹き付けて乾固した。これに無水硫酸ナトリウム（ハヤシ化成、名古屋）により脱水した石油エーテルを総脂質含量に応じて加え、GC ハイアルに移し、キャピラリーカラム（DB-225、J&W SCIENTIFIC）を装着したガスクロマトグラフ（GC-18A、島津製作所、京都）で FID により測定を行った。FID の酸素供給源はコンプレッサーにより圧縮された空気を、シリカケル（青色）（和光純薬、大阪）を詰めた筒を通して脱水して用いた。インジェクションはオートインジェクター AOC-20（島津製作所、京都）によって行い、インジェクトする量はサンプルにより適宜変更した。ガスクロマトグラフィーの設定は、窒素 75 kPa、水素 60 kPa、圧縮空気 50 kPa、1℃/min の昇温設定で、始点 160℃から終点 250℃で測定した。

#### ステロール測定

ガラス器具の洗浄や、有機溶媒についての蒸留、試料のサンプリング、Bligh & Dyer の方法による総脂質の抽出は、脂肪酸測定の方法に準じた。但し用いる内部標準は、ヘツリン（クロロホルム溶液中 5 mg/ml シクマーアルトリッチ、ミヌーリ）であり、加える量は総脂質含量の 0.5-1% となるよう設定した。

ステロールの定量は Ratnayake の方法[38]を応用して行った。即ち、Bligh & Dyer の方法により抽出した総脂質に、10%水酸化カリウム/エタノール溶液を 5 ml 加え、密栓した上で水浴上にて 100℃、2 時間加熱し鹼化を行った。

室温放冷後、1M 塩酸 2 ml、クロロホルム 2 ml、n-ヘキサン 4 ml を順次加えた。これをタンチミキサーにより混合攪拌し、3,000 rpm × 10 min で遠心分離した。上層をパスツールピペットを用いて別のキャップ付試験管に分取した。この上層をさらにエタノール 水=1:4 の混合溶媒 3 ml で洗い、混合攪拌、遠心分離、上層分取を行った。ここで得られた上層はエタノール 水=1:4 の混合溶媒 5 ml で洗い、混合攪拌、遠

心分離、上層分取を行った。ここで得られた上層はキャップ付スピッツに分取した。このヘキサン層に窒素を吹き付け乾固した。これに HMDS/TMCS 試薬（東京化成、東京）、若しくは BSTFA/10%TMCS 試薬（和光純薬、大阪）をガラスシリリンンを用いて 100 μl ずつ加えて密栓し、室温で 15 分以上反応させ、トリメチルシリル誘導体とした。これをキャピラリーカラム（DB-1、J&W SCIENTIFIC）を装着したガスクロマトグラフ（GC-18A、島津製作所、京都）で FID により測定を行った。FID の酸素供給源はコンプレッサーにより圧縮された空気を、シリカケル（青色）（和光純薬、大阪）を詰めた筒を通して脱水して用いた。インジェクションは手打ちで行い、インジェクション量はサンプル量に応じて 0.5-1.5 μl の範囲で設定した。ガスクロマトグラフィーの設定は、窒素 75 kPa、水素 60 kPa、圧縮空気 50 kPa、1℃/min の昇温設定で始点 250℃から終点 300℃まで測定した。HMDS/TMCS 試薬（東京化成、東京）、BSTFA/10%TMCS 試薬（ピアース、イリゾナ）はともに GC 用マイクロシリリンンを著しく腐食するため、1 サンプルインジェクトすることに、シリリンンを蒸留水、メタノール、クロロホルムの順に各 10 回ずつ洗った。

#### DNA マイクロアレイ法

本実験の一部は日本電子レーサ㈱に委託して行った。Can および Soy 食で育てた雄性 SHRSP ラット（食塩水負荷なし、16 週齢、n=6/群）より臓器を採取し、TRIZOL（Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA）を用いて Total RNA を抽出した。得られた RNA は MMLV-Reverse transcriptase により Random primer mix をプライマーとして逆転写反応を行った後、各サンプルをそれぞれ Cy3 および Cy5 にて標識し、プローブとした。このプローブを Atlas Glass Rat 1.0 Microarray（Clontech, CA, USA）とハイブリダイスさせた。分析には GenePix 4000（Axon Instruments, CA, USA）を用い、GenePix pro 3.0（Axon Instruments）を用いてスコア化した。

得られたデータは 8 つの内部標準の遺伝子の発現（phospholipase A2, group IB, pancreas, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, myosin IB, Ornithine decarboxylase, Ribosomal protein S29, polyubiquitin, alpha-tubulin, cytoplasmic beta-actin）によって標準化された値を用いた。しかし、肝臓においてはこれら内部標準の値が



線形を取らないために、Global Normalization 法で標準化した値を参考値として出した。両者の発現量の比率を出して、その値が duplicate のアッセイでともに 20 倍以上のもの（肝臓においては Can で発現が上昇しているものは 1.3 倍以上のもの）をピンクアップした。

#### ホルモン量の測定

本実験の一部は帝国臓器メティカル株式に委託して行った。Can 食あるいは Soy 食で育てた雄性および雌性 SHRSP ラット（食塩水負荷なし、16 週齢、n=6/群）より臓器を採取し直ちに凍結させた。コルチコステロン（血清、副腎）、テストステロン（血清、精巣）、ノヒドロテストステロン（前立腺）、およびエストラジオール（血清、卵巣）はそれぞれ抽出し、LC-MS および LC-MS/MS により定量した。また、 $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase の活性は、DHEA（dihydroepiandrosterone）より testosterone を合成する反応の初速度を LC-MS により定量することにより求めた。

#### 脳および脾臓の病理学的解析

本実験の一部は名古屋大学医学部第一病理学教室に委託して行った。Can 食および Soy 食で育てた雄性 SHRSP ラット（食塩負荷なし、n=6・群、16 週齢）より臓器（脳、肝臓、脾臓）を採出し、10%ホルマリン溶液にて固定して組織標本とした。定法に従い組織切片を作成し、hematoxylin-eosin で染色後、光学顕微鏡下で観察した。病理の判定は名古屋大学医学部伊藤真文博士が担当した。

#### キャノーラ油の CMD 法による分画（オリザ油化株式会社）

分子蒸留法は、高真空下において近接した蒸発面と凝集面よりなる蒸留法である。この蒸留法の特徴として高真空下であること、蒸発面と凝集面が近接した距離にあることで、揮発した分子が窒素や酸素分子などと相互作用して元に戻る回避される。MD 装置には大別して遠心式と円筒式の 2 種があるがいずれもサンプルを延展・薄膜化し表面積を拡大することで揮発させやすくする特徴がある。これにより、極めて揮発性の低い分子を蒸留精製することか可能であり、実際に脂溶性ビタミン、あるいはノアシルクリセロールやモノアシルクリセロール、EPA、DHA 等の高純度化、或いはダイオキシン類の分離、また、ペントホルルのリサイクルにおいてホルルの原料であるヒスヒドロキノエチルテレフタラートの高純度化・回収に応用され

ている。

菜種白絞油（太田油脂株式会社、岡崎）40kg を 1 mmHg の圧力下、3 時間 150°C で加熱し、油脂に残留する低沸点の溶媒や精油を除去した。これを 0.002 mmHg、600 rpm で回転している蒸発面中央に少量ずつ滴下、延展し、6 時間をかけて 40 kg を蒸留した。このとき、蒸発面は 258°C に保たれている（この温度は蒸発面末端で測定されるものであり、蒸発面そのものはこれよりやや高い温度になっている）。蒸発面の面積、時間、処理量から換算すると、油が蒸発面に接触していた時間は 2 分前後であると計算できる。蒸留油は常温で冷却、回収し、蒸留部、回収油、共に窒素雰囲気の下、4°C で遮光保存した。

#### 減圧加熱油の調製

キャノーラ油 4 kg を 3 mmHg、遮光下で底抜けのマントルヒーターで 150°C まで加熱した。またホットスターラーで加熱しながら攪拌した。150°C までの到達時間は 2.5 時間であった。またコールトランプを設置し、揮発成分を -40°C でトラップした。油の温度は、容器内部に温度計を吊るすことにより直接測定した。

150°C に到達した後に 3 時間、同じ条件（3 mmHg、遮光下、ホットスターラーによる加熱＋攪拌）で減圧加熱した。このとき、15 分間隔で減圧度と油の温度をチェックした。このとき、過熱して 160°C にまで昇温した。

加熱終了後、アルコン置換をし、常温に冷めるまで、遮光下で一晩室温で放置した。翌日、トラップ部分は n-hexane、EtOH で洗い落とし、窒素置換後、4°C で保存した。残留油は 4°C で、窒素雰囲気て保存した。

250°C の油脂の調製は、160°C の場合に準ずる。ただし、250°C までの到達時間は 3.5 時間であった。過熱はしなかった。

#### 統計学的解析

得られたデータは平均値±標準偏差もしくは標準誤差で示した。寿命の統計学的解析はデータをノンパラメトリックとして扱い、コンピューターソフトウェア KyPlot (Kyence Inc, Tokyo) を用いて Log-Rank 法および Wilcoxon 法によって検定した。その他のデータはパラメトリックとして扱い、Microsoft Excel を用いて、2 群間の比較の場合には Student's t test で、多群間の比較の場合には one-way ANOVA または two-way repeated measures ANOVA により解析し、post-hoc test として Tukey-Kramer の方法で判定をした。相関性の検討には Pearson の相関係数を用いて評価した。

## VII 引用文献

- 1 Feelev, M and Brouwer, A (2000) Health risks to infants from exposure to PCBs, PCDDs and PCDFs *Food Addit Contam* **17**, 325-333
- 2 Chen, J, Laughlin, L S, Hendrickx, A G, Natarajan, K, Overstreet, J W, and Lasley, B L (2003) The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on chorionic gonadotrophin activity in pregnant macaques *Toxicology* **186**, 21-31
- 3 Naughton, J M (1981) Supply of polyenoic fatty acids to the mammalian brain the ease of conversion of the short-chain essential fatty acids to their longer chain polyunsaturated metabolites in liver, brain placenta and blood *Int J Biochem* **13**, 21-32
- 4 Kamal-Eldin A, Pettersson, D and Appelqvist, L A (1995) Sesamin (a compound from sesame oil) increases tocopherol levels in rats fed ad libitum *Lipids* **30**, 499-505
- 5 Nicholls, J, Lasley, B L, Nakajima S T, Setchell, K D, and Schneeman, B O (2002) Effects of soy consumption on gonadotropin secretion and acute pituitary responses to gonadotropin-releasing hormone in women *J Nutr* **132**, 708-714
- 6 Huang M-Z, Naito, Y, Watanabe, S, Kobayashi, T, Nagatsu, A, Skakibara, J, and Okuyama, H (1997) Unusual effects of some vegetable oils on the survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats *Lipids* **32**, 745-751
- 7 Miyazaki, M, Watanabe, S, Oikawa T, Morozumi, K, Fuzinami, T, and 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**, 655-661
- 8 Yamada, N, Kido, K, Havashi, S, and Mukai, M (1979) Pregnancy and delivery of stroke-prone SHR (SHRSP) [proceedings] *Jpn Heart J* **20**, 753
- 9 Ueno, K I, Togashi, H, Mori K, Matsumoto, M, Ohashi, S, Hoshino, A, Fujita, T, Saito, H, Minami, M, and Yoshioka, M (2002) Behavioural and pharmacological relevance of stroke-prone spontaneously hypertensive rats as an animal model of a developmental disorder *Behav Pharmacol* **13**, 1-13
- 10 Setchell, K D, and Lydeking-Olsen, E (2003) Dietary phytoestrogens and their effect on bone evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies *Am J Clin Nutr* **78**, (3 Suppl) 593S-609S
- 11 Tice, J A, Ettinger, B, Ensrud, K, Wallace, R, Blackwell, T, and Cummings, S R (2003) Phytoestrogen supplements for the treatment of hot flashes the Isoflavone Clover Extract (ICE) Study a randomized controlled trial *JAMA* **290**, 207-214
- 12 Matsumoto, H, Ma, W, Smalley, W, Trzaskos, J, Breyer, R M, and Dey, S K (2001) Diversification of cyclooxygenase-2-derived prostaglandins in ovulation and implantation *Biol Reprod* **64**, 1557-1565
- 13 Okamoto, K, and Aoki, K (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats *Jpn Circ J* **27** 282-293
- 14 Yamori, Y, Nagaoka, A, and Okamoto, K (1974) Importance of genetic factors in hypertensive cerebrovascular lesions. An evidence obtained by successive selective breeding of stroke-prone and resistant SHR *Jpn Circ J* **38**, 1095-1100
- 15 Okamoto, K, Yamori, Y, and Nagaoka K (1974) Establishment of the stroke prone spontaneously hypertensive rats (SHR) *Circ Res* **34/35**, 143-153
- 16 Saito, N, Matsunaga, M, Hara, A, Yamamoto, J, and Yamori, Y (1975) Hypertensive vascular lesions and renin or lysosomal enzymes in rats *Jpn Circ J* **39**, 551-558
- 17 Saito, N, Mukamo, S, Ogino, K, and Kawai, C (1976) Vascular lesions in hypertensive rats under salt loading kidney renin and lysosomal enzymes *Chn Sci Mol Med Suppl* **3**, 49s-51s
- 18 Griffin, K A, Abu-Amarah, I, Picken, M, and Bidani, A K (2003) Renoprotection by ACE inhibition or aldosterone blockade is blood pressure-dependent *Hypertension* **41**, 201-206
- 19 Sasagawa, S, Yamori, Y, Sato, M, Horie, R, and Fukushima, S (1976) Proceedings Experimental studies on sex difference in stroke-prone SHR (SHRSP) hypoxic vulnerability and aortic brittleness *Jpn Heart J* **17**, 399-400
- 20 Sawamura, M, Nara, Y, and Yamori, Y (1992) Liver mevalonate 5-pyrophosphate decarboxylase is responsible for reduced serum cholesterol in stroke-prone spontaneously hypertensive rat *J Biol Chem* **267**, 6051-6055
- 21 Pravenec, M, Jansa, P, Kostka, V, Zidek, V, Kren, V, Forejt, J, and Kurtz, T W (2001) Identification of a mutation in ADD1/SREBP-1 in the spontaneously hypertensive rat *Mamm Genome* **12**, 295-298
- 22 Scoggan, K A, Gruber, H, and Lariviere, K A (2003) A missense mutation in the Abcg5 gene causes phytosterolemia in SHR, stroke-prone SHR, and WKY rats *J Lipid Res* **44**, 911-916
- 23 Yu, H, Pandit, B, Klett, E, Lee, M H, Lu, K, Helou, K, Ikeda, I, Egashira, N, Sato, M, Klein, R, Batta, A, Salen, G, and Patel, S B (2003) The rat STSL locus characterization, chromosomal assignment, and genetic variations in sitosterolemic hypertensive rats *BMC Cardiovasc Disord* **3**, 4
- 24 Berge, K E, Tian, H, Graf, G A, Yu, L, Grishin, N V, Schultz, J Kwiterovich, P, Shan, B, Barnes, R, and Hobbs, H H (2000) Accumulation of dietary cholesterol in

- sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters *Science* **290**, 1771-1775
- 25 Matsuo I, Yoshino, K, Ozawa, A., and Ohkido, M (1981) Phytosterolemia and type IIa hyperlipoproteinemia with tuberous xanthomas *J Am Acad Dermatol* **4**, 47-49
  - 26 Ikeda I, Nakagiri, H, Sugano, M, Ohara, S, Hamada, T, Nonaka, M, and Imaizumi, K (2001) Mechanisms of phytosterolemia in stroke-prone spontaneously hypertensive and WKY rats *Metabolism* **50**, 1361-1368
  - 27 Sehavek, E, Duncan E M, Lutjohann, D, Von Bergmann, K, Ono, J G, Batta A K, Salen, G and Breslow J L (2002) Loci on chromosomes 14 and 2, distinct from ABCG5/ABCG8, regulate plasma plant sterol levels in a C57BL/6J x CASA/Rk intercross *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16215-16219
  - 28 Hubner N, Kreutz, R, Takahashi, S, Ganten, D, and Lindpaintner, K (1995) Altered angiotensinogen amino acid sequence and plasma angiotensin II levels in genetically hypertensive rats A study on cause and effect *Hypertension* **26**, 279-284
  - 29 Orlov S N, Adarichev, V A, Devlin, A M, Maximova, N V, Sun, Y L, Tremblay, J, Dominiczak, A F, Postnov Y V, and Hamet, P (2000) Increased Na(+)/H(+) exchanger isoform 1 activity in spontaneously hypertensive rats lack of mutations within the coding region of NHE1 *Biochim Biophys Acta* **1500**, 169-180
  - 30 Brosnan, M J, Clark, J S, Jeffs, B, Negrin, C D, Van Vooren, P, Arribas, S M, Carswell, H, Aitman, T J, Szpirer, C, Macrae, I M, and Dominiczak, A F (1999) Genes encoding atrial and brain natriuretic peptides as candidates for sensitivity to brain ischemia in stroke-prone hypertensive rats *Hypertension* **33**, 290-297
  - 31 Kageyama, H, Nemoto, K, Nemoto, F, Sekimoto, M, Nara, Y, Nabika T, Iwayama, Y, Fukamachi K, Tomita, I, Senba, E, Forehand, C J, Hendlev, E D, and Ueyama, T (1996) Mutation of the trkB gene encoding the high-affinity receptor for brain-derived neurotrophic factor in stroke-prone spontaneously hypertensive rats *Biochem Biophys Res Commun* **229**, 713-718
  - 32 Collison, M, Glazier, A M, Graham, D, Morton J J, Dominiczak, M H, Aitman, T J, Connell, J M, Gould G W, and Dominiczak, A F (2000) Cd36 and molecular mechanisms of insulin resistance in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat *Diabetes* **49**, 2222-2226
  - 33 Simokawa, T, Moriuchi, A, Hori, T, Saito, M, Naito, Y, Kabasawa, H, Nagase, Y, Matsubara, M, and Okuyama H (1988) Effect of dietary alpha-linolenate/linoleate balance on mean survival time incidence of stroke and blood pressure of spontaneously hypertensive rats *Life Sci* **43**, 2067-2075
  - 34 Huang M-Z, Naito, Y, Watanabe, S, Kobavashi, T, Kanai, H, Nagai, H, and 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
  - 35 Miyazaki, M, Huang M-Z, Takemura, N, Watanabe, S, and Okuyama, H (1998) Early mortality effect of partially hydrogenated vegetable oils in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) *Nutr Res* **18**, 1049-1056
  - 36 Miyazaki, M, Takemura N, Watanabe, S, and Okuyama, H (1999) Dietary flaxseed oil prolongs the survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats under 1% NaCl loading *J Lipid Nutr (Japanese)* **8**, 46-51
  - 37 Miyazaki, M, Takemura, N, Watanabe, S, Hata, N, Misawa, Y, and Okuyama, H (2000) 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**, 101-110
  - 38 Ratnayake, W M N, Plouffe, L, Hollywood, R, L'Abbe, M R, Hidiroglou, N, Sarwar, G and Mueller, R (2000) Influence of sources of dietary oils on life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats *Lipids* **35**, 409-420
  - 39 Ratnayake, W M N, L Abbe, M R, Mueller, R, Hayward, S, Plouffe, L, Hollywood, R, and Trick, K (2000) Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats *J Nutr* **130**, 1166-1178
  - 40 Naito, Y, Konishi, C, and Ohara, N (2000) Blood coagulation and osmolar tolerance of erythrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats given rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat *Toxicol letter* **117**, 209-215
  - 41 Naito, Y, Nagata, T, Takano, Y, Nagatsu, T, Ohara, N (2003) Rapeseed oil ingestion and exacerbation of hypertension-related conditions in stroke prone spontaneously hypertensive rats *Toxicology* **187**, 205-216
  - 42 Naito, Y, Yoshida, H, Nagata, T, Tanaka, A, Ono, H, and Ohara, N (2000) Dietary intake of rapeseed oil or soybean oil as the only fat nutrient in spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats - blood pressure and pathophysiology *Toxicology* **146**, 197-208
  - 43 Naito, Y, Kasama, K, Yoshida, H, and Ohara, N (2000) Thirteen-week dietary intake of rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat

- in Wistar Kyoto rats-change in blood pressure  
*Food Chem Toxicol* **38**, 811-816
- 44 Naito Y, Konishi C, Katsumura, H, and Ohara, N (2000) Increase in blood pressure with enhanced Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, -ATPase activity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats after 4-weeks intake of rapeseed oil as the sole dietary fat *Pharmacol Toxicol* **87**, 144-148
- 45 Bilban, M, Buehler L K, Head S, Desoye, G, and Quaranta, V (2002) Normalizing DNA microarray data *Curr Issues Mol Biol* **4**, 57-64
- 46 Mimura, J, and Fujii-Kuriyama, Y (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD *Biochim Biophys Acta* **1619**, 263-268
- 47 Ohtake, F, Takeyama, K, Matsumoto, T, Kitagawa, H, Yamamoto, Y, Nohara, K, Tohyama, C, Krust, A, Mimura, J, Chambon, P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama, Y, and Kato, S (2003) Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor *Nature* **423**, 545-550
- 48 Puigserver, P, and Spiegelman, B M (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) transcriptional coactivator and metabolic regulator *Endocr Rev* **24**, 78-90
- 49 Wolf, G (2003) The function of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor delta in energy homeostasis *Nutr Rev* **61**, 387-390
- 50 Kojo, H, Fukagawa, M, Tajima, K, Suzuki, A, Fujimura, T, Aramori I, Hayashi, K, and Nishimura, S (2003) Evaluation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtype selectivity of a variety of anti-inflammatory drugs based on a novel assay for PPAR delta(beta) *J Pharmacol Sci* **93**, 347-355
- 51 Honkakoski, P, Sueyoshi, T, and Negishi, M (2003) Drug-activated nuclear receptors CAR and PXR *Ann Med* **35** 172-182
- 52 Nanjundan, M, and Possmayer F (2003) Pulmonary phosphatidic acid phosphatase and lipid phosphate phosphohydrolase *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**, 1-23
- 53 Tokumura, A (2002) Physiological and pathophysiological roles of lysophosphatidic acids produced by secretory lysophospholipase D in body fluids *Biochim Biophys Acta* **1582**, 18-25
- 54 Krzymowski, T, and Stefanczyk-Krzymowska, S (2002) Uterine blood supply as a main factor involved in the regulation of the estrous cycle--a new theory *Reprod Biol* **2**, 93-114
- 55 Miyazaki, M, and Ntambi, J M (2003) Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **68** 113-121
- 56 Lin, J, Choi, Y H, Hartzell, D L, Li, C Della-Fera, M A, and Baile, C A (2003) CNS melanocortin and leptin effects on stearoyl-CoA desaturase-1 and resistin expression *Biochem Biophys Res Commun* **311**, 324-328
- 57 Schneider, H P (2003) Androgens and antiandrogens *Ann NY Acad Sci* **997**, 292-306
- 58 Roy, A K, and Chatterjee, B (1995) Androgen action *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **5**, 157-176
- 59 Ben-Zimra, M, Koler, M, Melamed-Book, N, Arensburg, J, Payne, A H, and Orly, J (2002) Uterine and placental expression of steroidogenic genes during rodent pregnancy *Mol Cell Endocrinol* **187**, 223-231
- 60 中央環境審議会環境保健部会等報告書、平成11年6月
- 61 Bjeldanes, L F, Kim, J Y, Grose, K R, Bartholomew, J C, Bradfield, C A (1991) Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 9543-9547
- 62 Riby, J E, Chang, G H, Firestone, G L, Bjeldanes, L F (2000) Ligand-independent activation of estrogen receptor function by 3, 3'-diindolylmethane in human breast cancer cells *Biochem Pharmacol* **60**, 167-177
- 63 Grose, K R, Bjeldanes, L F (1992) Oligomerization of indole-3-carbinol in aqueous acid *Chem Res Toxicol* **5**, 188-193
- 64 Volpe, M, and Rabattu, S (1994) Pathophysiological aspects of genetically determined hypertension in rats, with special emphasis on stroke-prone spontaneously hypertensive rats *Handbook of Hypertension Vol 16 Experimental and Genetic Models of Hypertension* (Ganten D and de Jong W, eds), pp 365-394 Elsevier
- 65 Jacob, H J, Lindpaintner K, Lincoln, S E, Kusumi, K, Bunker, R K, Mao, Y P, Ganten, D, Dzau, V J, and Lander, E S (1991) Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat *Cell* **67**, 213-224
- 66 Berecek, K H, Schwertschlag, U, Gross, F (1980) Alterations in renal vascular resistance and reactivity in spontaneous hypertension of rats *Am J Physiol* **238**, 287-293
- 67 Kramer, J K, Sauer, F D, Farnworth, E R, Wolynetz M S, Jones, G, and Rock, G A (1994) Hematological and lipid changes in newborn piglets fed milk replacer diets containing vegetable oils with different levels of n-3 fatty acids *Lipids* **29**, 859-868
- 68 Kramer, J K, Sauer, F D, Farnworth, E R, Stevenson, D, and Rock, G A (1998) Hematological and lipid changes in newborn piglets fed milk-replacer diets containing erucic