

- acid *Lipids* 33, 1-10
- 69 Innis, S M (1999) Dietary Canola oil alters hematological indices and blood lipids in neonatal piglets fed formula *J Nutr* 129 1261-1268
- 70 Sauer, F D, Farnworth, E R, Belanger, J R, Kramer, J G, Miller, R B and Yamashiro, S (1997) Additional vitamin E required in milk replacer diets that contain canola oil *Nutr Res* 17 259-269
- 71 Cines, D B, McKenzie, S E, and Siegel, D L (2003) Mechanisms of action of therapeutics in idiopathic thrombocytopenic purpura *J Pediatr Hematol Oncol* 25, Suppl 1 S52-56
- 72 Nagata, Y, Yoshikawa, J, Hashimoto, A, Yamamoto, M, Payne, A H, and Todokoro, K (2003) Proplatelet formation of megakaryocytes is triggered by autocrine-synthesized estradiol *Genes Dev* 17, 2864-2869
- 73
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20031201/zul.html>
- 74 Ogawa H, Yamamoto, K, Kamisako, T, and Meguro, T (2003) Phytosterol additives increase blood pressure and promote stroke onset in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30, 919-924
- 75 Bligh, E G, and Dyer, W J (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917

D 考察 (分担課題全体)

従来、“キャノーラ油の寿命短縮作用はSHRSPラットにみられる植物ステロールの作用である”とされ、健康危険情報は広報されていない(大豆油対照)。今回、① 多量の植物ステロールの添加はSHRSPラットの寿命を短縮させるか、キャノーラ油の短縮作用には至らない(図15)、② キャノーラ油と同程度の植物ステロールの添加は寿命を有意に短縮しない(図11)、ことか明らかとなった。Ogawaら(74)もRatnayakeら(39)と同じ精製飼料を基本食とした実験系で、“キャノーラ油と同程度の寿命短縮作用を表すためにはキャノーラ油の5倍量の植物ステロールが必要であった”と報告しており、主要植物ステロール(campesterol, stigmasterol, brassicasterol, β -sitosterol)以外の有害因子が寿命短縮作用に関わっていることか、より明確となった。

キャノーラ油のSHRSPラット組織に及ぼす影響は既報の腎障害のほか、脳、脾臓などに及び、大原直樹分担研究者の知見(本報告書)も含めると、ほとんどの組織が影響を受けていた。これらの内、血小板数の減少は新生豚でも同様にキャノーラ油でひきおこされることか知られ

ているか、それに関わる骨髄、脾臓、腎臓などの異常か組織病理学的にも明らかにされた。

植物ステロール以外の有害因子が存在するとすれば脂溶性であり、次世代に伝わる可能性かある。今回、キャノーラ油は大豆油に比へ有意に仔の数を減らすこと、親の摂取したキャノーラ油か仔(F1雄)を大豆油食に変えても、仔の寿命を短縮すること、などか明らかとなった。さらにキャノーラ油は血清と精巣のテストステロンレベルを著しく低下させること、が明らかとなった。これらの作用はダイオキシンと似ているか、日本人のダイオキシン摂取量と、認められているテストステロン低下作用量(動物実験)との間に60倍の幅かあるのに対し、キャノーラ油の場合は幅は少ない。寿命短縮作用とテストステロン低下作用か共通であるとするか、日本人のこれら食用油の摂取量は動物実験での危険量を超えていることとなる。ただし、現在のところ、これらの知見はSHRSPラットについてであり、ヒトの栄養に適用できるかとうかかはわからない。

遠心分離蒸留法で有害因子か実質的に除かれたキャノーラ油か>90%の収率で得られた。現在のところ有害因子は捕集できていないか、このような薄膜分子蒸留法か産業的に応用できるかとうか、また有害因子か捕集できるかとうか、などの検討か必要である。

E 結論 (分担課題全体)

- ① キャノーラ油はSHRSPラット(F0, F1)の出生数を減少させ、有害因子は仔に伝わり仔(F1雄)の寿命を短縮させた(大豆油対照)。
- ② キャノーラ油はSHRSPラットの血清、精巣におけるテストステロンレベルを有意に低下させた。この内分泌攪乱作用を示す用量は超大量ではなかった
- ③ 血小板減少、脳出血などにかかわる病理変化か脾臓、脳で認められた。
- ④ 分子蒸留法により寿命短縮作用か実質的に除かれたキャノーラ油か>90%以上の収率で得られた。
- ⑤ 寿命短縮作用は主要な植物ステロールによらないことか、より明確となった。

F 健康危険情報

SHRSPラットで明らかにされたキャノーラ油のダイオキシン様作用か、ヒトにも表れるかとうかを短年月で調へることはできない。したがって、動物実験で有害作用か認められた食用油を、多く摂取しないよう広報する必要かある。

現在、国産菜種の生産を展開し、その菜種油を学校給食に使う運動が一部で展開されているようであるか、方向転換する必要がある。

G 研究発表(原著論文)

- Miyazawa,D, Ikemoto,A, Fujii,Y and Okuyama,H (2003) Dietary alpha-linolenic acid suppresses the formation of lysophosphatidic acid, a lipid mediator, in rat platelets compared with linoleic acid *Life Sci* 73, 2083-2090
- Umezawa,M, Tatematsu,K, Korenaga,T, Fu,X, Matsushita,T, Okuyama,H, Hosokawa,M, Takeda,T and Higuchi,K (2003) Dietary fat modulation of apoA- \square metabolism and prevention of senile amyloidosis in the senescence-accelerated mouse *J Lipid Res* 44, 762-769
- Du, C, Sato,S, Watanabe,S, Wu,C-Z, Ikemoto,A, Ando,K, Kikugawa,K, Fujii,Y and Okuyama,H (2003) Cholesterol synthesis in mice is suppressed but lipofuscin formation is not affected by long-term feeding of n-3 fatty acid-enriched oils compared with lard and n-6 fatty acid-enriched oils *Biol Pharm Bull* 26(6), 766-770
- Brisibe,EA, Okada,N, Mizukami,H, Okuyama,H and Fujii,R.Y (2003) RNA interference potentials for the prevention of HIV infections and the challenges ahead *TRENDS in Biotech* 21(7), 306-311
- Fujii,Y, Murase,Y, Otake,K, Yokota,Y, Omoto,S, Hayashi,H, Okada,H, Okada,N, Kawai,M and Imakawa,K (2003) A potential live vector, foamy virus, directed Intra-Cellular expression of ovine Interferon- τ exhibited the resistance to HIV infection *J Vet Med Sci* 66(2), 115-121
- Du,C, Fujii,Y, Ito,M, Harada,M, Moriyama,E, Shumada,R, Ikemoto,A and Okuyama,H (2003) Dietary polyunsaturated fatty acids suppress acute hepatitis, alter gene expression and prolong

survival of Long-Evans Cinnamon rats, a model of Wilson Disease *J Nutr Biochem* 15(5), 273-280

- Tokudome,S, Kuriki,K, Suzuki,S, Imaeda,N, Goto,C, Tokudome,Y, Takeda,E, Ichikawa,Y and Okuyama H (2003) n-6 polyunsaturated fatty acids and breast cancer *Nutr Cancer* (in press)
- Tatematsu,K, Hirose,N, Ichikawa,Y, Fujii,Y, Takami,A and Okuyama,H (2004) Nutritional Evaluation of an Inter-Esterified Perilla Oil and Lard in Comparison with Butter and Margarine Based on the Survival of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive (SHRSP) Rats *J Health Sci* 50(1), 108-111
- Tokudome,S, Ichikawa,Y, Okuyama,H, Tokudome,Y, Goto,C, Imaeda,N, Kuriki,K, Suzuki,S, Shibata,K, Jiang,J, Wang,J and Takeda,E (2004) The Mediterranean vs the Japanese diet *European Journal of Clinical Nutrition* (in press)
- Tatematsu,K, Fuma,S, Satoh,J, Ichikawa, Y, Fujii,Y, and Okuyama,H (2004) Dietary canola oil and soybean oil fed to SHRSP rat dams differently affect the growth and survival of their male pups *J Nutr* 134, (in press)
- Tatematsu,K, Fuma,S, Nagase,T, Ichikawa, Y, Fujii,Y, and Okuyama,H (2004) Factors other than phytosterols in some vegetable oils affect the survival of SHRSP rats *J Chem Toxicol* (accepted)

H 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許出願
PCT 出願 (PCT/JP03/16589) 「安全性を高めた食用油およびその製法」
- 2 実用新案登録 なし
- 3 その他 なし

数種の食用油の微量有害因子に関する研究
有害因子の生化学的、生理学的検索

- Canola 油の超臨界蒸留分画を摂取した脳卒中易発性自然発症高血圧ラットの生存日数変化とそれらの動物で認められた生化学的、生理学的および病理学的変化 -

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 油の超臨界蒸留分画 (180bar 分画、350bar 分画、残渣) または大豆油を粉末飼料に 10w/w% 添加してペレット化し、5 週齢の脳卒中易発性自然発症高血圧ラット (SHRSP) に与え、0.5% 食塩水を飲料水として、脳卒中関連症状発現までの日数および生存日数を調べた結果、大豆油群と比較した場合、Canola 油、350bar 分画および残渣群では脳卒中関連症状の発現が早く、Canola 油群および残渣群は有意に短命であった。それぞれの油脂混合飼料中の脂肪酸組成には差が無く、含まれる植物ステロールの総量は、180bar 分画 > 残渣 > Canola 油 > 350bar 分画 > 大豆油の順に多かった。

上記と同様の実験を食塩負荷無しに行い、脳卒中関連症状を示す個体が現れた時点で全例を屠殺、解剖した結果、残渣群の脳の傷害が他群に比して顕著であった。また、残渣群の末梢血では、単球およびリンパ球数の増大を反映した白血球総数の増加がみられた。骨髄像では、Canola 油群およびその分画群で、組織球、形質細胞、巨核球の比率の減少または減少傾向が認められ、特に残渣群でみられた変化は著しかった。これらの変化は、骨髄抑制、炎症性病変の存在あるいは免疫系への影響を示唆する。巨核球の比率の減少は、Canola 油摂取による末梢血小板数の減少と関連するかもしれない。血液生化学検査では、大豆油群と比較し、Canola 油群およびその分画群で脂質パラメータが上昇傾向を示し、特に残渣群ではその程度が強かった。

生存日数短縮にかかわる有害因子の一つに油中植物ステロールが挙げられているか、今回の研究結果からは、それ以外の因子の関与が疑われ、それは残渣分画中に最も多く含まれることが示唆された。

A 研究目的

脳卒中易発性自然発症高血圧ラット (SHRSP) に、ある種の食用油を摂取させると、生存日数が短縮するか (Huang et al, 1996, 1997, Miyazaki et al, 1998)、その原因物質を探索するために、超臨界蒸留法で得た菜種 (Canola) 油の分画を SHRSP に与え、生存日数および生化学的、生理学的および病理学的影響を調べた。

生存日数確認実験は、平成14年度報告書に途中経過を報告したか、本報告は、それを追補するものである。また、別途、生存日数確認実験と同様の実験を行い、こちらは動物を定期解剖して、油脂分画摂取か、血液学および血液生化学的パラメータあるいは病理所見に及ぼす影響について調べた。

B 研究方法

Canola 油分画を与えた SHRSP の生存日数

Canola 油 (太田製油株式会社) を二酸化炭素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% 添加してペレット化した。同様に 10w/w% Canola 油あるいは大豆油 (太田製油株式会社) 添加飼料も作製した。5 週齢の SHRSP (SHRSP/1zm、雄、SHR 等疾患モデル共同研究会) 70 匹を 5 群に分け、前述の油脂添加飼料を与えた。180bar 分画群は、同分画が少量しか得られなかったため、10 匹とした。

	動物数 (匹)
Canola 油群	15
180bar 分画群	10
350bar 分画群	15
残渣群	15
大豆油群	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。

飼育期間中に、眼球突出、過敏、鈍麻、多動、運動障害、震え、痙攣、四肢の麻痺および突然死を指標に(Okamoto et al, 1974, Nagaoka et al, 1976)脳卒中症状の発現を記録し、自然死を待って生存日数を調べた。

Canola 油分画を与えた SHRSP の腎機能、血液学および血液生化学的パラメータの測定と剖検

5 週齢の SHRSP 30 匹を、1 群 6 匹から成る 5 群に分け、それぞれ、Canola 油、180bar 分画、350bar 分画、残渣または大豆油添加飼料を与えた。

食塩負荷は SHRSP の昇圧を促進し、脳卒中による死亡を早めるので、生存日数確認実験においては短い観察期間で結論が得られるという利点があるか、一方では生理機能の変化や臓器の病変を加速し、これらのパラメータの群間差を不明瞭にする可能性が考えられた。従って、この実験では食塩負荷を行わなかった。

飼育期間中、脳卒中症状を示す個体が出現した時点で動物を代謝ケーン内に移して 24 時間採尿し、続いて実施した剖検の際に得た血液を併せて用い、腎機能(クリアランス等)を調べた。また、この血液を用いて血液学的検査および血液生化学的検査を行い、骨髄を採取して骨髄像を観察した。一方、主要臓器をホルマリノ固定し、病理検査を実施した。

肺および腎臓のアンジオテンシン変換酵素活性測定

剖検の際に、肺および腎臓の一部を採り、既報の方法(Oliveira, et al, 2000, Santos et al, 1985)に従って組織中アンジオテンシン変換酵素活性を測定した。すなわち肺および腎臓組織を 0.34M ショ糖、0.3M 食塩を含む氷冷 0.4M ホウ酸緩衝液(pH 7.2)中でホモシナイスし、1800×g で 10 分間遠心した上清を用い、Hip-His-Leu を基質として、pH 8.0、37°C で 15 あるいは 30 分間インキュベートした際に生じる His-Leu を蛍光分光光度計で測定した(励起波長 365nm、測定波長 495nm)。

C 結果

脳卒中関連症状の発現と生存日数

Canola 油群、350bar 分画群および残渣群における脳卒中関連症状の発現 = 正常動物の減少は、大豆油群と比較し有意に早かった(図 1、表 1)。また、Canola 油群および残渣群の生存

日数は大豆油群より有意に短かった(図 2、表 2)。

腎機能変化、血液学、血液生化学および病理学的変化

実験開始 6 週に 2 例(350bar 分画群および残渣群、それぞれ 1 例)が死亡したか、これらの個体を含め、他の動物には、それまでに異常な症状は認められなかったため、第 7 週はそのまま観察を続けた。7 週に入ると、脳卒中関連症状が散発したため、第 8 週に、腎機能検査および剖検を行った。全例の剖検がすむまでに、さらに 2 例(大豆油群および 350bar 分画群、それぞれ 1 例)が死亡した。

腎機能(表 3)

後述の病理学的検査結果に示すように、腎臓組織には著しい傷害がみられたか、機能的な変化は著明でなかった。腎機能の変化をまとめると、350bar 分画群および残渣群で尿量の減少傾向か、180bar 分画群および 350bar 分画群でナトリウム排泄量およびナトリウムクリアランスの減少傾向と塩素排泄量および塩素クリアランスの減少傾向か、350bar 分画群でカリウム排泄量の減少傾向か、Canola 油群および残渣群でナトリウム再吸収率の低下傾向か認められた。Canola 油群および残渣群では、血漿中ナトリウムの低下傾向も認められた(表に示さず)。クレアチニンクリアランス{糸球体ろ過値(GFR)}には著変がなかった。

血液像(表 4)

以下の所見が得られた。

Canola 油群、180bar 分画群および残渣群で赤血球数の減少傾向か、180bar 分画群、350bar 分画群および残渣群で白血球数の増加傾向(残渣群では有意な増加)か、180bar 分画群、350bar 分画群および残渣群でリンパ球数増加傾向(残渣群では有意な増加)か、180bar 分画群および残渣群で好酸球数減少傾向か、180bar 分画群で好中球数増加傾向か、そして、残渣群で単球数の有意な増加が認められた。350bar 分画群および残渣群ではリンパ球の比率が増大傾向(白血球百分比)を示した。

骨髄像(表 5-1、5-2)

以下の所見が得られた。

Canola 油群、350bar 分画群および残渣群で promyelocyte 比率の減少傾向か、残渣群で neutrophilic metamyelocyte 比率の減少傾向か、180bar 分画群、350bar 分画群および残渣群で eosinophilic myelocyte 比率の減少傾向が認め

られた。骨髓細胞に顆粒球系細胞全体が占める割合は、残渣群で増大傾向を示したか、他群では著変化しなかった。

一方、Canola 油群、180bar 分画群および残渣群で proerythroblast 比率の増加傾向か、残渣群で basophilic erythroblast 比率の増加傾向か認められた。骨髓細胞に赤芽球系細胞全体が占める割合には著しい変化がなかった。また、180bar 分画群、350bar 分画群および残渣群で histiocyte 比率の有意な減少 (Canola 群は減少傾向) か、180bar 分画群、350bar 分画群および残渣群で plasma cell 比率の減少傾向か、Canola 油群、180bar 分画群、350bar 分画群および残渣群で megakaryocyte 比率の減少傾向か認められた。残渣群で M/E の減少傾向 (顆粒球系細胞に対する赤芽球系細胞の相対的な増大) か認められた。

血液生化学(表 6)

Canola 油群、180bar 分画群および残渣群で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燐脂質濃度の上昇傾向か認められた。特に残渣群でみられた変化は、例数を増せば、大豆油群との比較で有意差がつくことは明らかであった。遊離脂肪酸濃度は、大豆油群との比較では、Canola 油群と全ての分画群で上昇傾向を示した。Glucose 濃度には Canola 油群と残渣群で上昇傾向か認められた。

臓器重量および病理

主要臓器の(対体重)相対重量を表 7 に示す。

Canola 油群および残渣群で脳重量の増大傾向および心臓重量の有意な増大か認められた。Canola 油群では肺重量の有意な減少か、180bar 分画群では減少傾向か認められた。180bar 分画群および残渣群で脾臓重量の有意な増大か、Canola 油群および 350bar 分画群で増大傾向か認められた。Canola 油群、180bar 分画群、350bar 分画群および残渣群で腎臓重量の増大傾向か認められた。残渣群で精巣重量の有意な増大か、Canola 油群、180bar 分画群および 350bar 分画群では増大傾向か認められた。

病理組織(表 8、9、図 3)

脳 大豆油群 2 例、Canola 油群 2 例、180bar 分画群 5 例、350bar 分画群 1 例および残渣群 5 例で大脳皮質に層状あるいは楔状の梗塞巣か、両側または片側性に認められ、残渣群 4 例および 350bar 分画群 1 例では他群に比較してその変化の程度が強く、アストロサイトあるいはミクログリアの反応、マクロファージの浸潤も強

い傾向かみられた。180bar 分画群ではクリアの反応を伴った軽度な梗塞巣が 5 例で観察されたか、マクロファージの浸潤は認められなかった。350bar 分画群では中等度の梗塞巣が 1 例にみられた。中等度以上の変化か認められた頻度は、大豆油群と比較し、残渣群で高くなる傾向かあった。

腎臓 いずれの群においても、葉間細動脈の中膜および外膜の肥厚、好塩基性尿細管(尿細管の再生)、蛋白様円柱などからなる慢性腎症か観察された。これらの変化の程度は Canola 油群、180bar 分画群および残渣群では強度、350bar 分画群で中等度、大豆油群では軽度であった。中等度以上の変化か認められた頻度は、Canola 油およびその分画群で大豆油群より高い傾向かあり、Canola 油では有意に高かった。

肺 死亡例には肺水腫、肺胞内出血および鬱血か認められた。

脾臓 細動脈の中膜および外膜肥厚が大豆油群、Canola 油群および残渣群の 4～5 例、180bar 分画群および 350bar 分画群のそれぞれ 1 例に観察された。このほか、軽微～強度とばらつきはあるものの、髄外造血が各群の多くの例に観察されたか、大豆油群では変化か軽い例が多かった。

肝臓 細動脈の中膜および外膜肥厚が 350bar 分画群および残渣群の各 1 例にみられた。

精巣 細動脈の中膜および外膜肥厚が大豆油群および残渣群各 1 例にみられた。

肺および腎臓のアンジオテンシン変換酵素活性(表 10)

アンジオテンシン変換酵素活性は、腎臓より肺で高かった。肺のアンジオテンシン変換酵素活性には群間差か認められなかったか、腎臓では Canola 油およびその分画群における活性が大豆油群に比へ有意に低かった。

D 考察

生存日数確認実験の結果から、Canola 油に含まれる有害因子は、180bar 分画以外の分画に多く含まれていることか推測された。今回用いた油脂添加飼料の脂肪酸組成には差か認められなかった(表 11)ことから、特異的な脂肪酸あるいは脂肪酸組成か生存日数短縮の原因となることはないと考えられる。180bar 分画には植物

ステロールが比較的多く含まれていたが(表12)、この分画を与えた群で、症状の発現や死亡の早期化は認められなかったため、植物油とともに取り込まれる植物ステロールは、少なくとも単独では寿命短縮要因になり得ないと考えられた。

病理検索を実施した実験では、残渣群の脳の傷害が他群に比べて顕著であり、重量も増す傾向にあった。従って、残渣群では脳の出血や梗塞による浮腫が早く起こることか推測された。心臓の傷害の程度は、Canola 油群およびその分画群で、いずれも大豆油群より著しく、特に Canola 油群と 180bar 分画群および残渣群の傷害は強かった。Canola 油群および残渣群では重量も有意に増大しており、血圧の上昇や冠血管障害による影響が早期に現れることか示唆された。肺水腫を起こして死亡した個体を除いた比較では、肺重量は Canola 油群で有意に低下した。病理組織所見では、特記すべき変化が認められないので、この肺重量減少の理由は不明である。脾臓の髄外造血は、ラットでは通常の動物でも一定頻度で認められるか、大豆油群に比べ、Canola 油群およびその分画群では、その程度が強く、180bar 分画群および残渣群では脾臓重量も有意に増大した。骨髄像の変化と合わせて、骨髄抑制による影響を推測できるか、骨髄像そのものの変化は、必ずしも著明ではなかった。腎臓は、SHRSP を用いた一連の実験で病変が最も早く、著しく現れる臓器であるか(Naito et al, 2000a, 2003)、全群のほぼ全例に異常がみられたため、群間の差を明確にすることは難しかった。重量は、Canola 油およびその分画群で大豆油群より増大する傾向があった。このような状態で腎機能が著しい影響を受けていないのは興味深い。この状態でも、肺組織のアンジオテンシン変換酵素活性には明らかな群間差がなく、腎病変の進行→レニン・アンジオテンシン系亢進→高血圧症の悪化という一連の変化と、死亡率には明確な関連が無いと推測された。腎組織のアンジオテンシン変換酵素活性低下は、実質の傷害と平行していると考えられ、Canola 油とその分画群において著しかった。また、クレアチニンクリアランスから、GFR に変化がないので、ナトリウム再吸収率と血漿中ナトリウム濃度のわずかな低下から、Canola 油群および残渣群では、差し引きのナトリウム排泄増大が続いた可能性が示唆された。

骨髄細胞に赤芽球系細胞が占める割合は、残渣群で増大傾向を示した。出血による赤血球損失の代償と考えることもできるか、一方、脾臓における髄外造血については、著しい腎傷害→

腎臓尿細管周囲血管床間質細胞で生成するエリスロポエチンの減少→赤血球幹細胞 DNA 断片化→アポトーシスによる骨髄抑制状態、という病変ないし機能変化の図式も考え得る。

生存日数確認実験では、剖検結果から Canola 油群およびその分画群で精巣の萎縮があると判断していたか、今回、定期解剖した実験では確認できず、精巣重量は大豆油群よりむしろ増える傾向があり、残渣群では有意に増大した。生存日数確認実験で観察した精巣の萎縮は、所見が認められた個体のるい瘦が著しかったことから、摂食障害による栄養不良か原因で器官の吸収が起こったとも考えられるか、今回認められた重量の増大か、飼育を延長した際に、組織変性を伴う重量減少につながるかどうかについては、今後確認したい。

残渣群では、単球およびリンパ球数の増大を反映した白血球総数の増加がみられた。感染や腫瘍に特徴的な変化であるか、SHRSP に特異的な血管傷害等との関連については今後検討したい。骨髄像では、大豆油群と比較し、組織球、形質細胞、巨核球の比率の減少または減少傾向が Canola 油群およびその分画群で認められ、特に残渣群の変化は強かった。これらの変化は炎症性病変の存在あるいは免疫系への影響を示唆する。巨核球の比率の減少は、これまでの研究で見てきた Canola 油摂取による末梢血小板数の減少(Naito et al, 2000a, 2000b)と関連があるかもしれない。今回の末梢血液像では血小板数の減少はみられなかったか、飼育期間を延長することで、骨髄抑制による血小板数の減少が起こる可能性もある。

血液生化学検査では、有意差はなかったか、大豆油群と比較し、Canola 油群およびその分画群で脂質パラメータが上昇傾向を示し、特に残渣群ではその程度が強かった。これも、これまでの研究結果を支持するものである(Naito et al, 2000a, 2000b) カイロミクロレムナント、VLDL レムナント、LDL レベルの上昇は、血管内皮傷害や動脈硬化、突然心臓死と深い関わりがあり(Takeichi et al, 1997, Ohara et al, 2003)、実際、生存日数確認実験では、心臓機能障害が原因と考えられる突然死例が散見され、これらの個体では脳に病変が認められなかった。脂質パラメータの上昇が SHRSP の病態の悪化とどのようにかわるかについては、今後、心臓への影響も含めて検討する必要がある。

これまでの研究で、Canola 油摂取による血中クルコース濃度の減少を確認しているか(Naito et al, 2000a, 2000b)、今回の測定では Canola 油群および残渣群で上昇傾向が認め

られた。一方、既報のWKYラットを用いた研究では、大豆油摂取動物と比較し、Canola油摂取動物では、血中グルコース濃度低下とともに、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ活性の上昇、SODおよびカタラーゼ活性の低下がみられている(Naito et al, 2000b)。また、Canola油摂取で緒臓器の Na^+ , K^+ -ATPase活性が上昇することを報告したか(Naito et al, 2000c, 2003)、逆に低下する場合もあった(未公表)、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ活性上昇と Na^+ , K^+ -ATPase活性低下を併せて考えると、推測ではあるか、Canola油摂取動物においては生体内ウアハイン様物質の遊離が促進している(Holland et al, 1991)と考えることもできる。食塩負荷が生体内ウアハイン様物質の遊離を促進すること(Butt et al, 1997)、生存日数短縮の一因としては摂取油中の植物ステロールの関与も考えられる(Naito et al, 2003)ことを考慮すると、強心ステロイドであるウアハイン様物質の遊離や消長に影響を及ぼす何らかの物質が油中に存在することも考え得る。上記のように、過去の実験結果で、 Na^+ , K^+ -ATPase活性への影響が一定しなかったのは、 Na^+ , K^+ -ATPaseがCanola油中に存在する有害因子の直接のターゲットではないことを示唆するか、なお、注目の対象ではある。

Canola油摂取動物では血中グルコース濃度低下、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ活性上昇とともにSODおよびカタラーゼ活性の低下が認められた。したがって、血管の傷害には抗酸化酵素の抑制も関与すると考えられる。

E 結論

今回の研究結果から、超臨界蒸留法によって得たCanola油の分画の中で、SHRSPの生存日数短縮にかかわる有害因子が最も多く含まれるのは、残渣分画であることか明らかになった。この有害因子は脂肪酸ではなく、植物ステロールでもないと考えられる。今後、この残渣分画の詳細な分析と、生理作用の検討が必要である。

(参考文献)

Butt, A N, Semra, Y K, Ho CS, Swaminathan R 1997 Effect of high salt intake on plasma and tissue concentration of endogenous ouabain-like substance in the rat *Life Sci* 61 2367-2373
Holland S, Millett, J, Alagband-Zedeh, J, de Wardener, H, Pamnani, M, Haddy, F 1991 Cytochemically detectable glucose-6-phosphate dehydrogenase-stimulating/ Na^+ - K^+ -ATPase-inhibiti

ng activity of plasma and hypothalamus in reduced renal mass *Am J Hypertens* 4,315-320
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
Nagaoka, A, Iwatsuka, H, Suzuoki, Z, Okamoto, K 1976 Genetic predisposition to stroke in spontaneously hypertensive rats *Am J Physiol* 230 1354-1359
Naito, Y, Yoshida, H, Nagata, T, Tanaka, A, Ono, H, Ohara, N 2000a 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 2000b 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, Komishi, C, Katsumura, H, Ohara, N 2000c Increase in blood pressure with enhanced Na^+ , K^+ -ATPase activity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats after 4-weeks intake of rapeseed oil as the sole dietary fat *Pharmacol Toxicol* 87,144-148
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
Ohara, N, Takeichi, S, Naito, Y, Nakajima, Y, Yukawa, N, Nakano, T, Nakajima, K 2003 Remnant-like particles from subjects who died of coronary artery disease suppress NO synthase activity and attenuate endothelium-dependent vasorelaxation *Clinica Chimica Acta* 338,151-156
Okamoto, K, Yamori, Y, Nagaoka, A 1974 Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat *Circ Res* 34/35 1143-1153
Oliveira, E M, Santos, R A S, Krieger, J E 2000 Standardization of a fluorimetric assay for the determination of tissue angiotensin-converting enzyme activity in rats *Brazil J Med Biol Res* 33,755-764
Santos, R A S, Krieger, E M, Greene, L J 1985 An

improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting-enzyme Hypertension 7, 244-252

Takeichi,S 1999 Searching for a new risk factor of sudden cardiac death Nippon Hoigaku Zasshi 53,255-275

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

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

2 学会発表

内藤由紀子、永田伴子、鷹野祐子、大原直樹

Rapeseed oil ingestion shortened life span and exacerbated hypertension- related conditions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats

日本薬理学会第 76 回年会 (福岡, 2003)

Japanese Journal of Pharmacology 91 Suppl I 291P,(2003)

内藤由紀子、大原直樹

脳卒中易発性自然発症高血圧ラットの生存日数および赤血球膜浸透圧抵抗性に対する菜種油摂取の影響

日本薬学会第 124 回年会 (大阪, 2004)

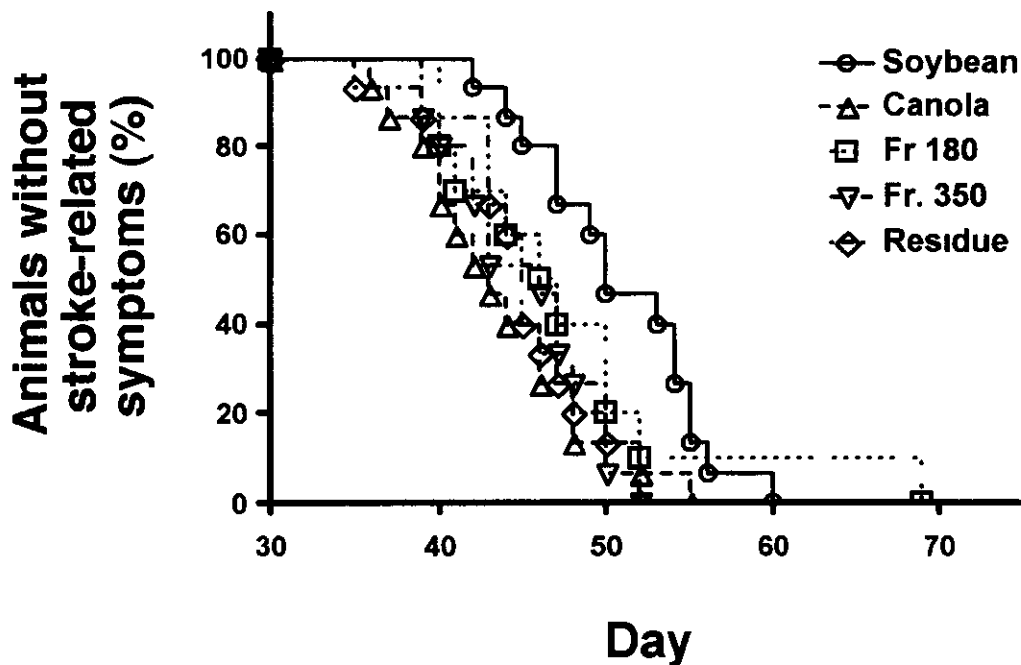


図1 Canola 油分画を与えた SHRSP における脳卒中関連症状の発現

縦軸は正常(脳卒中関連症状のない)個体数の割合。横軸は混餌による油脂摂取開始後の日数。

Soybean、大豆油、Canola、Canola 油、Fr 180 および Fr 350、Canola 油の超臨界蒸留 180bar 分画および 350bar 分画、Residue、蒸留残渣。

表1 Canola油分画を与えたSHRSPにおいて脳卒中関連症状が現われるまでの日数(図1参照)

群	中央値	N	対 Canola P 値	対 Soybean P 値
Soybean	50	15	<u>0.0023</u>	-----
Canola	43	15	-----	<u>0.0023</u>
Fr 180	47	10	0.2288	0.3491
Fr 350	46	15	0.6914	<u>0.0026</u>
残渣	45	15	0.7356	<u>0.0018</u>

N=例数。

Canola油群、350bar分画群および残渣群における脳卒中関連症状の発現は大豆油群と比較し有意に早い(下線部、Log-rank test)。

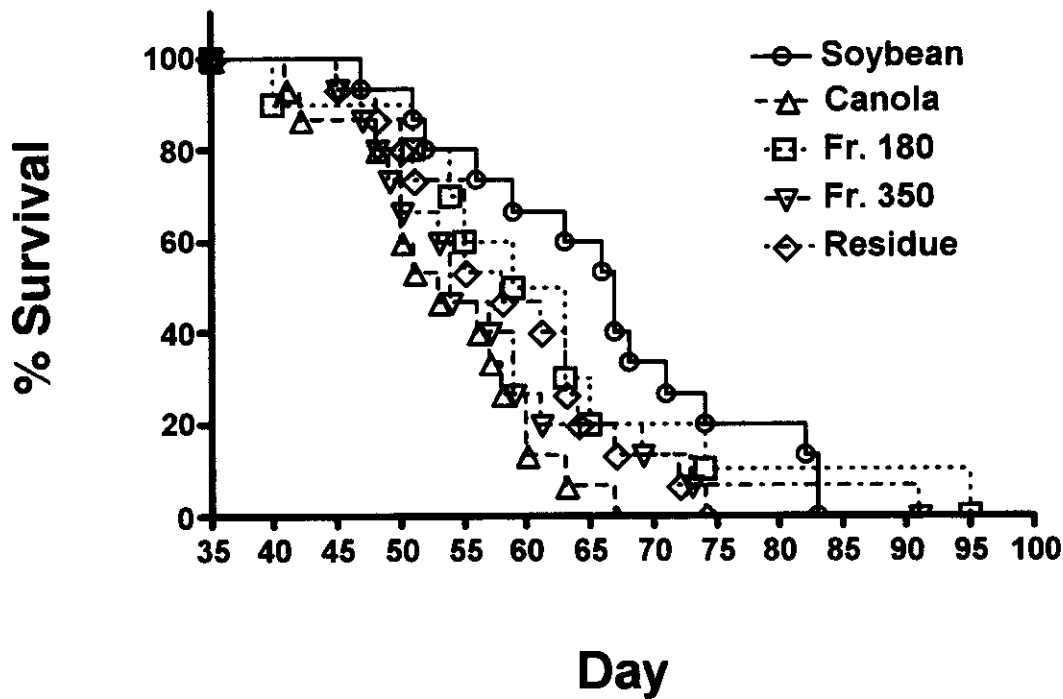


図2 Canola 油分画を与えた SHRSP の生存日数

縦軸は生存個体数の割合。横軸は混餌による油脂摂取開始後の日数。

Soybean、大豆油、Canola、Canola 油、Fr 180 および Fr 350、Canola 油の超臨界蒸留 180bar 分画および 350bar 分画、Residue、蒸留残渣。

表2 Canola油分画を与えたSHRSPの生存日数比較(図2参照)

群	中央値	N	対 Canola P 値	対 Soybean P 値
Soybean	67	15	<u>0.0009</u>	-----
Canola	53	15	-----	<u>0.0009</u>
Fr 180	61	10	0.0639	0.5451
Fr 350	54	15	0.2999	0.1675
残渣	58	15	0.0832	<u>0.0433</u>

N=例数。

大豆油群に比べ、Canola油群と残渣群は有意に短命である(下線部、Log-rank test)。

表3 Canola 油とその超臨界蒸留分画摂取による SHRSP の腎機能変化

	Soybean	Canola	Fr 180	Fr 350	Residue
Urinary vol mL/kg	20.6±8.0	25.0±7.7	22.2±5.4	17.8±8.0	15.0±5.3
Na excretion mE/kg/day	1.89±0.53	2.25±0.13	1.48±0.27	1.23±0.19	1.86±0.48
K excretion mE/kg/day	3.97±0.51	4.38±0.27	4.40±1.3	2.68±0.24	4.59±1.1
Cl excretion mE/kg/day	2.00±0.45	2.22±0.097	1.45±0.26	1.32±0.28	1.84±0.37
Creatinine ex mg/kg/day	31.4±2.6	30.1±2.8	29.6±2.7	27.2±3.8	28.0±3.1
C _{Na} (x10 ⁻³) mL/min/kg	10.4±3.1	12.3±0.84	7.83±1.5	6.50±1.0	9.80±2.5
C _K mL/min/kg	0.356±0.033	0.320±0.024	0.549±0.22	0.339±0.062	0.422±0.068
C _{Cl} (x10 ⁻³) mL/min/kg	15.2±3.9	16.2±0.75	10.7±1.9	9.25±2.0	13.0±2.2
C _{Cr} mL/min/kg	2.54±0.10	2.56±0.18	2.50±0.26	2.65±0.42	2.59±0.35
Na reabsorption %	99.6±0.11	99.5±0.014	99.7±0.054	99.7±0.083	99.6±0.12
N	5	6	6	4	5

Soybean、大豆油、Canola、Canola 油、Fr 180 および Fr 350、Canola 油の超臨界蒸留 180bar 分画および 350bar 分画、Residue、蒸留残渣。N=例数。

350bar 分画群および残渣群で尿量の減少傾向か、180bar 分画群および 350bar 分画群でナトリウム排泄量およびナトリウムクリアランスの減少傾向と塩素排泄量および塩素クリアランスの減少傾向か、350bar 分画群でカリウム排泄量の減少傾向か、Canola 油群および残渣群でナトリウム再吸収率の低下傾向か認められる。クレアチニンクリアランス(糸球体ろ過値 (GFR))には著変かない。

表4 Canola油とその超臨界蒸留分画を摂取したSHRSPの血液像

	Soybean	Canola	Fr 180	Fr 350	Residue
RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	933±30	889±28	873±23	933±61	886±55
HGB (g/dL)	15.6±0.38	14.9±0.48	14.8±0.33	15.5±0.87	15.1±0.66
Hct (%)	46.9±1.4	45.3±1.4	45.0±0.90	47.1±2.8	45.8±2.2
MCV (fL)	50.3±0.16	50.9±0.15	51.6±0.50	50.5±0.38	51.9±0.74
MCH (pg)	16.7±0.13	16.8±0.049	17.0±0.15	16.7±0.19	17.1±0.32
MCHC (g/dL)	33.2±0.20	32.9±0.095	32.9±0.17	33.0±0.17	32.9±0.25
WBC ($10^2/\mu\text{L}$)	39.2±7.0	37.3±8.4	53.8±3.6	53.4±6.5	86.4±22*
Neu ($10^2/\mu\text{L}$)	13.6±2.5	15.1±1.6	18.9±1.6	12.5±0.77	13.4±2.1
Lym ($10^2/\mu\text{L}$)	22.0±4.8	18.4±7.3	30.9±4.5	36.0±5.7	65.7±21*
Mono ($10^2/\mu\text{L}$)	2.98±0.68	3.08±0.64	3.45±0.85	3.10±0.28	6.85±1.2*
Eos ($10^2/\mu\text{L}$)	0.720±0.17	0.733±0.27	0.567±0.12	1.85±1.6	0.450±0.029
Baso ($10^2/\mu\text{L}$)	0±0	0±0	0±0	0±0	0.0250±0.025
Platelet ($10^4/\mu\text{L}$)	46.7±8.3	37.3±0.76	46.3±6.9	50.1±12	51.5±2.9
% Neu	35.6±3.0	49.0±9.9	36.3±4.3	24.5±3.8	17.8±3.9
% Lym	54.8±4.4	40.5±9.6	56.5±5.4	66.5±3.5	73.5±4.4
% Mono	7.80±1.2	8.67±0.33	6.50±1.6	6.25±1.0	8.25±0.48
% Eos	1.80±0.37	1.50±0.34	1.00±0.45	3.00±2.0	0.500±0.29
% Baso	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
N	5	6	6	4	5

Soybean、大豆油、Canola、Canola油、Fr 180およびFr 350、Canola油の超臨界蒸留180bar分画および350bar分画、Residue、蒸留残渣。RBC、赤血球数、HGB、ヘモグロビン濃度、Hct、ヘマトクリット値、MCV、平均赤血球容積、MCH、平均赤血球色素量、MCHC、平均赤血球ヘモグロビン濃度、WBC、白血球数、Neu、好中球数、Lym、リンパ球数、Mono、単球数、Eos、好酸球数、Baso、好塩基球数、Platelet、血小板数、%Neu、白血球百分比。

* $p < 0.05$, (Dunnett's test, vs Soybean) N=例数。

Canola油群、180bar分画群および残渣群で赤血球数の減少傾向か、180bar分画群、350bar分画群および残渣群で白血球数の増加傾向(残渣群では有意な増加)か、180bar分画群、350bar分画群および残渣群でリンパ球数増加傾向(残渣群では有意な増加)か、180bar分画群および残渣群で好酸球数減少傾向か、180bar分画群で好中球数増加傾向か、そして、残渣群で単球数の有意な増加か認められる。350bar分画群および残渣群ではリンパ球の比率が増大する傾向にある(白血球百分比)。

表5-1 Canola 油とその超臨界蒸留分画を摂取した SHRSP の骨髓像

	Soybean	Canola	Fr 180	Fr 350	Residue
Myeloblast	2.2±0.31	1.7±0.44	1.4±0.35	2.2±0.53	1.8±0.54
Promyelocyte	3.3±0.70	2.1±0.16	3.0±0.45	2.3±0.55	2.5±0.60
Neutrophilic myelocyte	5.3±0.73	5.0±1.0	6.4±0.58	6.4±0.62	4.6±0.68
Neutrophilic metamyelocyte	11±0.82	8.8±0.83	10±1.1	11±1.4	7.3±1.1
Neutrophil	12±0.92	14±0.79	14±1.2	16±1.5	15±2.7
Eosinophilic myelocyte	1.3±0.29	1.0±0.26	0.73±0.12	0.85±0.17	0.72±0.29
Eosinophilic metamyelocyte	1.0±0.13	1.3±0.23	1.0±0.14	1.5±0.096	0.80±0.18
Eosinophil	0.32±0.049	0.43±0.14	0.40±0.14	0.30±0.17	0.36±0.075
Basophil	0±0	0.10±0.10	0.13±0.099	0.10±0.058	0±0
Total granular leukocyte	37±2.3	34±2.1	37±2.4	40±1.5	33±4.2
N	5	6	6	4	5

Soybean、大豆油、Canola、Canola 油、Fr 180 および Fr 350、Canola 油の超臨界蒸留 180bar 分画および 350bar 分画、Residue、蒸留残渣。N=例数。

Canola 油群、350bar 分画群および残渣群で promyelocyte 比率の減少傾向か、残渣群で neutrophilic metamyelocyte 比率の減少傾向か、180bar 分画群、350bar 分画群および残渣群で eosinophilic myelocyte 減少傾向か認められる。骨髓細胞に占める総顆粒球系細胞の割合には著しい変化かない。

表5-2 Canola 油とその超臨界蒸留分画摂取による SHRSP の骨髓像変化

	Soybean	Canola	Fr 180	Fr 350	Residue
Proerythroblast	0.32±0.16	0.73±0.22	0.50±0.18	0.25±0.13	0.76±0.27
Basophilic erythroblast	6.7±1.6	9.0±1.9	9.9±1.6	8.2±1.5	13±3.3
Polychromatic erythroblast	24±1.4	22±1.6	25±1.5	21±1.4	28±4.3
Normoblast	17±1.6	18±3.0	15±1.4	16±1.3	14±3.6
Total erythroblast	47±3.1	50±3.6	51±3.0	45±1.7	56±5.5
Histiocyte	3.9±0.43	3.0±0.36	1.4±0.27*	1.8±0.26*	1.7±0.40*
Lymphocyte	11±1.9	12±1.7	11±1.9	13±1.8	9.5±1.3
Plasma cell	0.56±0.13	0.47±0.13	0.33±0.13	0.35±0.15	0.28±0.080
Megakaryocyte	0.40±0.063	0.23±0.095	0.13±0.067	0.15±0.096	0.080±0.049
Mast cell	0.080±0.080	0.067±0.042	0±0	0±0	0.12±0.12
M/E	0.78±0.097	0.72±0.087	0.77±0.084	0.90±0.058	0.66±0.15
N	5	6	6	4	5

Soybean、大豆油、Canola、Canola 油、Fr 180 および Fr 350、Canola 油の超臨界蒸留 180bar 分画および 350bar 分画、Residue、蒸留残渣。* p<0.05, (Dunnett's test, vs Soybean) N=例数。

Canola 油群、180bar 分画群および残渣群で proerythroblast 比率の増加傾向か、残渣群で basophilic erythroblast 比率の増加傾向か認められる。骨髓細胞に占める総赤芽球系細胞の割合は残渣群で増大傾向かみられる。他群では著しい変化かない。

180bar 分画群、350bar 分画群および残渣群で histiocyte 比率の有意な減少 (Canola 群は減少傾向) か、180bar 分画群、350bar 分画群および残渣群で plasma cell 比率の減少傾向か、Canola 油群、180bar 分画群、350bar 分画群および残渣群で megakaryocyte 比率の減少傾向か認められる。また、残渣群で M/E の減少傾向 (顆粒球系細胞に対する赤芽球系細胞の相対的な増大) か認められる。

表6 Canola 油とその超臨界蒸留分画摂取による SHRSP の血中脂質変化

	Soybean	Canola	Fr 180	Fr 350	Residue
TC mg/dL	56.0±1.9	64.8±4.7	67.8±4.8	58.5±1.2	67.2±3.9
FC mg/dL	12.6±0.92	16.1±1.3	16.5±1.5	13.6±1.1	17.3±1.2
TG mg/dL	27.6±4.1	39.2±4.9	39.5±8.6	27.0±4.0	50.0±7.4
FFA mEq/dL	0.640±0.021	0.828±0.088	0.878±0.063	0.930±0.20	0.876±0.11
PL mg/dL	97.8±7.3	113±8.4	119±7.8	103±5.2	122±11
GL mg/dL	170±10	228±29	174±6.7	174±8.1	204±40
N	5	6	6	4	5

Soybean、大豆油、Canola、Canola 油、Fr 180 および Fr 350、Canola 油の超臨界蒸留 180bar 分画および 350bar 分画、Residue、蒸留残渣。N=例数。

Canola 油群、180bar 分画群および残渣群で血中総コレステロール(TC)、遊離コレステロール(FC)、トリグリセリド(TG)および燐脂質濃度(PL)に上昇傾向が認められる。大豆油との比較では、全ての群で遊離脂肪酸濃度(FFA)の上昇傾向がみられる。Glucose 濃度(GL)は Canola 油群と残渣群で上昇傾向が認められる。

表7 Canola油とその超臨界蒸留分画を摂取した SHRSP の臓器相対重量

	Soybean	Canola	Fr 180	Fr 350	Residue
Brain	7.91±0.35	8.96±0.36	8.15±0.19	7.91±0.27	9.07±0.42
Heart	5.00±0.14	5.80±0.099*	5.34±0.093	5.11±0.075	6.03±0.19*
Lung	4.29±0.14	3.94±0.081*	3.96±0.076	4.03±0.10	4.21±0.063
Liver	35.5±1.9	39.6±0.67	36.4±0.96	36.3±2.0	37.5±1.5
Spleen	2.36±0.072	2.62±0.099	2.87±0.13*	2.64±0.071	2.94±0.23* (N=4)
Kidneys	9.14±0.30	9.90±0.17	9.49±0.12	9.33±0.16	9.98±0.35
Adrenal glands	0.197±0.0075	0.238±0.019	0.216±0.0088	0.205±0.0079	0.251±0.022
Testes	10.8±0.35	11.9±0.27	12.1±0.38	11.7±0.38	12.3±0.54*
N	5	6	6	4	5

Soybean、大豆油、Canola、Canola 油、Fr 180 および Fr 350、Canola 油の超臨界蒸留 180bar 分画および 350bar 分画、Residue、蒸留残渣。数値は g/kg body weight。* p<0.05, (Dunnett's test, vs Soybean) N=例数。

Canola 油群および残渣群で脳重量の増大傾向および心臓重量の有意な増大が認められる。Canola 油群では肺重量の有意な減少か、180bar 分画群では減少傾向が認められる。180bar 分画群および残渣群で脾臓重量の有意な増大か、Canola 油群および 350bar 分画群で増大傾向が認められる。Canola 油群、180bar 分画群、350bar 分画群および残渣群で腎臓重量の増大傾向が認められる。残渣群で精巣重量の有意な増大か、Canola 油群、180bar 分画群および 350bar 分画群では増大傾向が認められる。

表8 Canola 油とその超臨界蒸留分画を摂取した SHRSP の病理所見

Individual histological findings		Soybean					Canola					Fr180					Fr350				Residue									
Group	Animal no	1	2	3	4	5d	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20d	21d	22	24	26	27	28	29d	30	
(Brain)	Infarct of laminae necrosis cortex	+				±	-	-	±	+			+	±	+	+	+	+						+	++	++	++	+	-	
	Infiltration macrophage	-				-							-	-									±		+	+				
	Gliosis reaction microglia or astroglia	±				-					±		±	±	±			±							++	+	++		-	
	Degeneration corpus callosum	±				-					±												±		+					
	Petechial hemorrhage																										+		+	±
(Kidney)	Chronic nephropathy	++	±	NE	+								+	++	++	+	++	+	+				+		+	+			+	
	Thickening media and adventitia arteriole			NE									++	+	++	+	+	++	+				+	++	±	++	+		+	
(Heart)	Myocardial degeneration/fibrosis	±	±	±	±	±	±	±	+	+	±	±	±	+	+	++	±						+	±	±	+	+	±	±	
	Thickening media and adventitia arteriole	+	±	±	±	±	±	-	+	+	±	±	±	+	±	++	±					±	±	±	±	±	+	+	±	
(Lung)	Alveolar hemorrhage/congestion	±																					++	+					±	
	Edema					+	-																±	±	±				+	
	Infiltration macrophage					±	±					±	±	±									±	±	±	±	-		+	±
(Spleen)	Extramedullary hematopoiesis	++	±	±	±	+	+						++	+	++	+	++	++	++	++	++	++	+	±	NE	+++	+	+	±	
	Thickening media and adventitia arteriole	±	±			+	+					+	±	+	±	±							±	±	NE	++	±			
(Liver)	Thickening media and adventitia arteriole																													
(Testis)	Vacuolation Sertoli cell																													
	Degeneration germ cell																													
	Thickening media and adventitia arteriole																													

- negative ± very slight + light ++ moderate +++ severe
NE not examined due to missed sampling

Soybean、大豆油、Canola、Canola 油、Fr180 および Fr350、Canola 油の超臨界蒸留 180bar 分画および 350bar 分画、Residue、蒸留残渣。

表9 Canola 油とその超臨界蒸留分画を摂取した SHRSP の病理所見

Summary of histological findings		Soybean				Canola				Fr180				Fr350				Residue													
Group	Grad	±	+	++	Po	±	+	++	Po	±	+	++	ro	±	+	++	Po	±	+	++	Po										
(Brain)		[P]				[B]				[B]				[B]				[B]													
	Infarct of laminae necrosis cortex	4	1	1	0	0	4	1	1	0	0	2	1	1	4	0	0	5	0	0	1	0	1	1	0	1	4	0	5		
	Infiltration macrophage	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	1	0	0	3	0	0	3		
	Gliosis reaction microglia or astroglia	5	1	0	0	0	5	1	0	0	0	1	1	4	1	0	0	6	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	3		
	Degeneration corpus callosum	5	1	0	0	0	5	1	0	0	0	1	6	0	0	0	0	4	2	0	0	0	4	0	2	0	0	2	2		
	Petechial hemorrhage	4	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	4	0	0	0	2	4	1	1	0	0	1	2	1	0	4	4			
(Kidney)		[G]				[B]				[B]				[G]				[B]													
	Chronic nephropathy	0	1	0	1	5	0	0	0	4	6	0	0	1	3	0	6	0	0	2	4	0	6	0	0	1	3	6			
	Thickening media and adventitia arteriole	0	0	0	1	0	3	0	0	1	5	0	6	0	0	1	4	1	6	0	1	1	4	0	6	0	0	1	5	0	6
(Heart)		[B]				[B]				[B]				[B]				[B]													
	Myocardial degeneration/fibrosis	0	4	0	0	0	0	2	3	1	0	6	0	2	2	2	0	6	1	2	2	1	0	5	0	1	5	0	6		
	Thickening media and adventitia arteriole	0	4	0	0	0	6	1	2	2	1	0	5	0	2	1	2	0	6	0	4	2	0	6	0	1	0	0	3		
(Lung)		[P]				[B]				[B]				[B]				[B]													
	Alveolar hemorrhage/congestion	4	1	0	1	0	0	6	0	0	0	0	4	1	1	0	0	4	0	0	1	1	0	4	1	0	1	0	2		
	Edema	5	0	0	1	0	1	6	0	0	0	0	4	1	1	0	0	2	3	1	0	2	0	1	0	0	0	0	1		
	Infiltration macrophage	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	4	0	0	0	4	3	0	0	0	0	3	3	2	1	0	0	3	
(Spleen)		[P]				[L]				[G]				[B]				[B]													
	Extramedullary hematopoiesis	0	1	1	0	0	6	0	0	0	4	0	6	0	0	2	4	0	6	0	1	2	3	0	0	1	0	3	1	0	
	Thickening media and adventitia arteriole	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	5	5	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	1	1	0	1	0	4		
(Liver)		[P]				[B]				[B]				[B]				[B]													
	Thickening media and adventitia arteriole	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
(Testis)		[P]				[B]				[B]				[B]				[B]													
	Vacuolation Sertoli cell	6	0	0	0	0	0	5	1	0	0	0	1	5	1	0	0	0	1	5	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	
	Degeneration germ cell	4	0	0	0	0	4	1	1	0	0	0	4	2	0	0	0	3	1	2	0	0	0	5	0	1	0	0	1		
	Thickening media and adventitia arteriole	5	0	1	0	0	1	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		

- negative ± very slight slight ++ moderate severe Po total number of animal with lesion
[] total number of animal examined #P 0.05 U test vs Soybean # Fisher's exact prob test

Soybean、大豆油、Canola、Canola 油、Fr180 および Fr350、Canola 油の超臨界蒸留 180bar 分画および 350bar 分画、Residue、蒸留残渣。

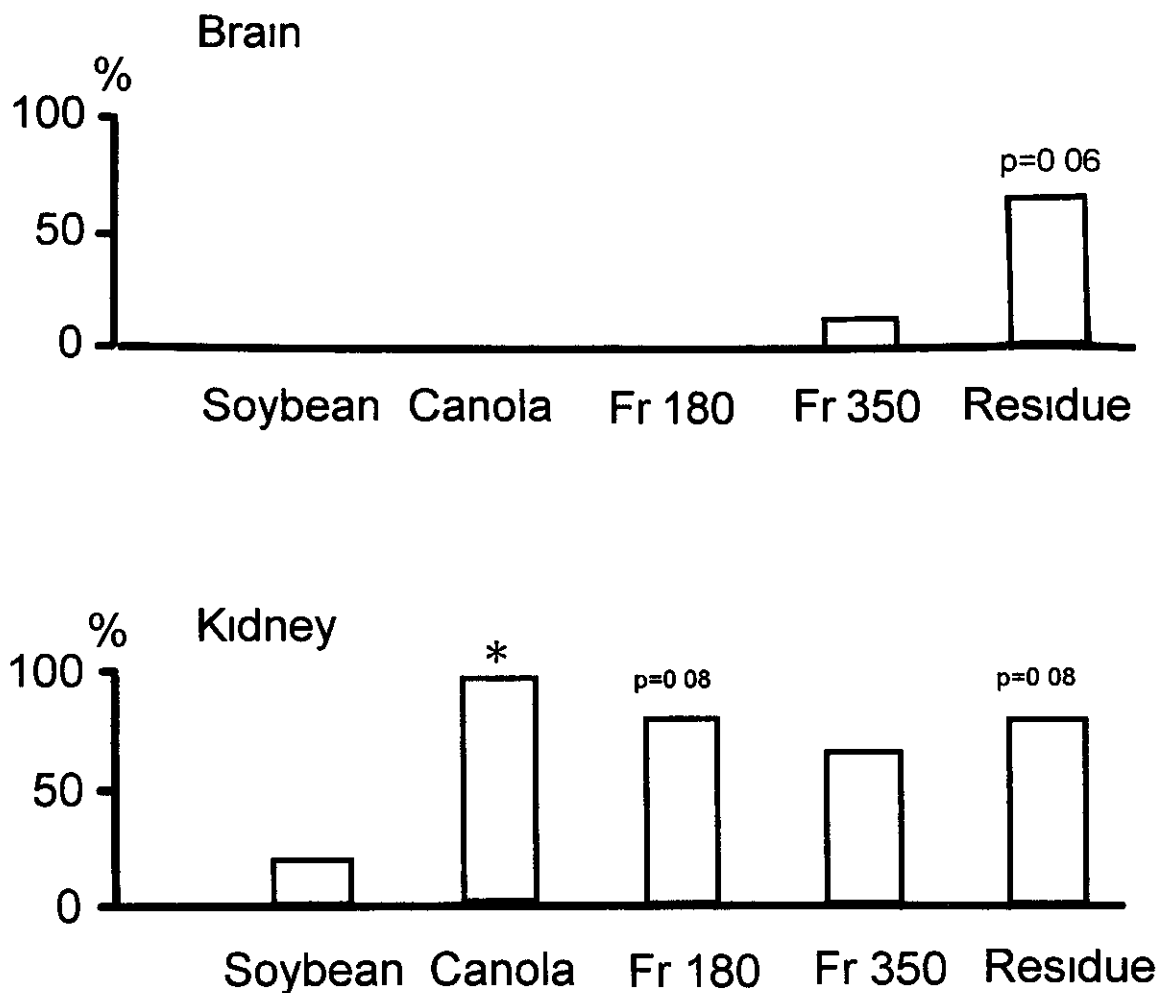


図3 Canola油とその超臨界蒸留分画を摂取したSHRSPの脳および腎臓病理所見で中等度以上の病変がみられた頻度 (表8および9参照)

Soybean、大豆油、Canola、Canola油、Fr 180 および Fr 350、Canola油の超臨界蒸留180bar分画および350bar分画、Residue、蒸留残渣。* p<0.05, (Dunnett's test, vs Soybean) P値は、対大豆油群。

表10 Canola油とその超臨界蒸留分画を摂取したSHRSPの組織アンジオテンシン変換酵素活性

	Soybean	Canola	Fr 180	Fr 350	Residue
Lung	166±21	169±14	170±12	174±14	176±20
N	4	6	6	4	5
Kidney	10.2±2.0	5.26±1.2*	3.98±2.0*	3.39±0.94*	2.78±1.1*
N	5	6	6	4	5

Soybean、大豆油、Canola、Canola油、Fr 180およびFr 350、Canola油の超臨界蒸留180bar分画および350bar分画、Residue、蒸留残渣。酵素活性は、nmol His-Leu/min/mg proteinで示す。

* p<0.05, (Dunnett's test, vs Soybean) N=例数。

表11 飼料中の脂肪酸

	CE-2	Canola	Fr 180	Fr 350	残渣	Soybean
脂肪酸量 (%)	4.59	12.8	12.9	12.7	12.5	13.0
組成 (%)						
14:0	0.7	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3
16:0	16.5	8.6	8.8	8.4	7.7	12.2
16:1	1.0	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5
17:0	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
18:0	2.3	2.6	1.9	2.1	2.4	3.7
18:1	24.2	49.0	47.4	48.0	49.0	23.8
18:2	42.7	26.1	28.8	28.5	27.1	50.5
18:3(n-3)	3.4	7.0	7.0	6.9	6.2	6.0
20:0	0.3	0.5	0.4	0.5	0.8	0.3
20:1	1.4	1.4	1.2	1.3	1.7	0.6
20:4(n-6)	0.1	-	-	-	-	-
20:5	2.3	0.6	0.7	0.6	0.6	0.6
22:0	0.2	0.4	0.3	0.3	0.6	0.3
22:1	1.0	0.7	0.4	0.3	0.7	0.2
22:5(n-3)	0.1	-	-	-	-	-
22:6	2.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6
24:0	0.5	0.3	0.3	0.2	0.5	0.2
24:1	0.3	0.2	0.1	0.2	0.3	-
その他	0.3	1.0	1.1	1.1	1.0	-

CE-2、基礎飼料、Soybean、10w/w%大豆油含有飼料、Canola、10w/w%Canola 油含有飼料、Fr 180 および Fr 350、Canola 油の超臨界蒸留 180bar 分画および 350bar 分画を 10w/w%含有する飼料、Residue、10w/w%蒸留残渣含有飼料。

表12 飼料中のステロール (mg/100g)

	CE-2	Canola	Fr 180	Fr 350	残渣	Soybean
プランカステロール	-	7	15	6	6	-
カンペステロール	27	41	53	39	51	26
スティグマステロール	10	8	10	8	8	14
β -ノトステロール	65	87	106	82	100	67
総植物ステロール	102	143	184	135	165	107
コレステロール	69	59	61	60	58	58

CE-2、基礎飼料、Soybean、10w/w%大豆油含有飼料、Canola、10w/w%Canola 油含有飼料、Fr 180 および Fr 350、Canola 油の超臨界蒸留 180bar 分画および 350bar 分画を 10w/w%含有する飼料、Residue、10w/w%蒸留残渣含有飼料。

SHRSP ラットの寿命に及ぼす植物ステロールとコレステロールの同時添加の影響

分担研究者 今泉勝己 九州大学大学院 教授

研究要旨

菜種油は大豆油と比較して脳卒中易発症性自然発症高血圧（SHRSP）ラットの寿命を短縮させるという報告があり、この理由として菜種油の植物ステロール含量が大豆油に比べて多いことか考えられる。また、コレステロールと植物ステロールは小腸内腔で互いに干渉していると考えられており、コレステロールの摂取が植物ステロールによる SHRSP ラットの寿命短縮作用に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで本研究では、植物ステロールとコレステロールの同時摂取がこのラットの寿命にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

SHRSP ラットに飲料水として 0.5%食塩水を投与し、10%大豆油(SO)、SO に植物ステロール(SO+PS)、植物ステロールとコレステロール(SO+PS+CH)を添加し、寿命について検討を行った。また 10%菜種油(CA)、CA にコレステロール(CA+CH)を添加した群についても寿命の比較を行った。SO+PS は SO に比べ寿命は短く、植物ステロールによる寿命短縮効果が確認できた。また SO+PS の寿命短縮作用は、コレステロールを添加しても影響を受けなかった。更に、大豆油については SO と SO+CH 間、SO+PS と SO+PS+CH 間で寿命に有意な差はみられず、コレステロール添加による寿命延長効果は確認できなかった。菜種油についても CA と CA+CH との間に寿命の差はみられなかった。このことより、植物ステロールの寿命短縮作用はコレステロール摂取の影響をほとんど受けないと考えられた。

A 研究目的

菜種油は大豆油と比較して SHRSP ラットの寿命を短縮させるという報告がある。SHRSP ラットは植物ステロールの高吸収・高蓄積がみられるか、寿命短縮の理由として菜種油の植物ステロール含量が大豆油より多いためと考えられる。

前回の実験でも大豆油に植物ステロールを添加した食餌を与えた SHRSP ラットでは大豆油のみを与えたラットに比べて寿命が短くなった。また、体内のステロール組成も植物ステロールを添加したラットで植物ステロールの蓄積がみられ、各臓器でコレステロールの割合は減少していた。また、コレステロールと植物ステロールは小腸内腔で互いに干渉しあっていると考えられており、コレステロールの摂取が植物ステロールの寿命短縮作用に何らかの影響を及ぼすことか考えられる。

そこで本研究では、SHRSP ラットに植物ステロールとコレステロールを摂取させ、植物ステロールとコレステロールの同時摂取がこのラットの寿命に及ぼす影響について検討を行った。

B 研究方法

3週齢の雄 SHRSP ラットを1週間予備飼育後、飲料水として 0.5%食塩水を投与し、10%大豆

油(SO)、SO に植物ステロール(SO+PS)、植物ステロールとコレステロール(SO+PS+CH)を添加した AIN-93G に基づく食餌を与え、寿命について比較を行った。それぞれの添加量は植物ステロールが 0.6g/kg、コレステロールが 0.5g/kg であった。また、上記と同様の飼育条件で 10%菜種油(CA)、それにコレステロール(CA+CH)を添加した群についても寿命の比較を行った。

飼育条件は室温 21~24℃、12 時間のライトサイクルとした。

また、ロクランク検定を用いて各群の生存日数の比較を行った($p < 0.05$)

(倫理面への配慮)

本実験は九州大学の実験動物取り扱い規定に基づいて行われた。

C 研究結果

大豆油に植物ステロールを添加した SO+PS 群は SO 群に比べ寿命は短かった(平均寿命 SO 112 日、SO+PS 93 日、ロクランク検定 SO SO+PS, $p = 0.02$)。更に、SO と SO+PS+CH の間にも寿命の差がある傾向であった。(ロクランク検定 SO SO+PS+CH, $p = 0.06$)。また大豆油にコレステロールを添加した SO+CH 群と SO 群、植物ステロールとコレステロールを同時添加した

S0+PS+CH群とS0+PS群との寿命に有意な差はみられなかった(平均寿命 S0+CH 122 日、S0+PS+CH 97 日、ログランク検定 S0 S0+CH, $p=0.174$, S0+PS S0+PS+CH, $p=0.50$)。菜種油においても、CA群とCA+CH群との間に差はみられなかった(CA 98 日、CA+CH 103 日、ログランク検定 CA CA+CH, $p=0.762$)。

D 考察

今回も前回の実験と同様に、植物ステロールを添加した大豆油を与えた SHRSP ラットで、大豆油のみと比較して、寿命短縮効果を確認できた。従って、SHRSP ラットの植物油による寿命の違いは植物ステロールか大きな要因であると考えられた。

植物ステロールは摂取により血漿コレステロール濃度が低下することか知られている。また、前回の実験結果からも植物ステロール添加大豆油を与えたラットで植物ステロールの蓄積と各臓器のコレステロールの割合の減少を確認できた。そこで今回、植物ステロール共存下でのコレステロール摂取か SHRSP ラットの寿命に及ぼす影響について検討したか、大豆油にコレステロールを添加しても大豆油のみを与えたときと比べて寿命に差はみられなかった。また大豆油にコレステロールと植物ステロールを同時添加しても大豆油と植物ステロールを添加したときとの間に寿命の差はみられなかった。更に、菜種油へコレステロールを添加しても寿命への影響はみられなかった。このことより、植物ステロールの寿命短縮効果はコレ

ステロール摂取の影響をほとんど受けないと考えられた。

本実験では、AIN-93G 純化食を用いて、0.5% 食塩水を与えた SHRSP ラットの寿命に及ぼす植物油と植物ステロールの影響を検討した。この実験条件下では、前年度の報告書で示したように、市販食摂取条件下で観察される SHRSP ラットにおける硬化大豆油の寿命短縮効果は確認されなかった。また、市販食摂取条件下では菜種油と大豆油との間に顕著な寿命の違いがみられているか、純化食摂取条件下では、両油脂の違いはそれほど大きくはなかった。このように、植物油の寿命短縮作用は共存する食餌の影響を強く受けている可能性がある。特に、これまで公表されている食用油脂の寿命への影響に関する調査・実験に供されている食餌条件下では、今回我々が用いた純化食と比較して、摂取脂肪含量の違いが大きい。また、摂取食塩水のレベルにも違いがある。そこで、植物ステロール以外の植物油に含まれる寿命短縮成分について検証を試みるためには、食餌脂肪のレベルや摂取食塩水濃度を考慮して、検討する必要がある。

E 研究発表

1 学会発表

長曾俊郎、市育代、佐藤匡央、池田郁男、今泉勝己(2003) SHRSP ラットの寿命に及ぼす硬化大豆油成分の影響, 第 57 回日本栄養・食糧学会西日本支部大会

プリオン病と菜種油糧飼料に関する研究

研究分担者 小野寄菊夫 名古屋市立大学大学院・薬学研究科・教授

研究要旨

平成 14 年度年に牛海綿状脳症（BSE）、羊や山羊のスクレイピーと菜種との関連について調査を行った結果、BSE を発症した牛の飼料中の多くに菜種油粕が含まれていた。菜種は、土壌中の硫黄(S)やモリブデン(Mo)やマンガン(Mn)などの重金属を吸収、蓄積しやすく、菜種油粕を過剰に摂取することにより、S や Mo は銅(Cu)と競合し、プリオンを介した細胞内への Cu の取り込みを阻害する可能性がある。Cu 欠乏症になった細胞は Cu/ZnSOD 活性が低下して酸化ストレスに対し脆弱になり、アポトーシスを起こしやすくなると思われる。Mn は Cu と競合的にプリオンに結合し、プリオンや関連する抗酸化酵素の抗酸化作用を阻害するとともに、Cu 欠乏症を増強する可能性がある。異常プリオンの発現はその結果であるかもしれない。本年度は、その仮説を証明するための研究を開始した。現在、ラットを菜種油粕、大豆油粕を含む飼料で飼育し、発育、生存率などについて観察中である。また、ラットのプリオンを Western blotting 法により検出する系を確立することかてきた。また、飼料、血液や脳などの組織中の Cu, Mn, Mo 含量を定量する系を確立できた。

A 研究目的

本邦における BSE の原因は、当初、海外から輸入された異常プリオンに汚染された肉骨粉が原因ではないかと推測された。しかし、農水省による調査の結果、BSE 汚染国からは肉骨粉が輸入されていなかったことから、別の原因が考えられる。菜種油には、奥山らの研究により有害因子が含まれていることから、平成 14 年度は BSE ならびに羊や山羊のスクレイピーと菜種との関連について調査を行い、以下の仮説が立てられた。

菜種は、土壌中の硫黄(S)、モリブデン(Mo)やマンガン(Mn)などの重金属を吸収、蓄積しやすい。Cu 含量の少ない地域や土壌中の S や Mo, Mn 含量の多い地域で飼育された牛、羊、ヤギは銅欠乏症になりやすい(1, 2)。そのような状況下でさらに菜種油粕を過剰に摂取することにより、菜種中の S や Mo は Cu と強固に結合することになる。正常プリオンは、PI アンカーを介して細胞膜のラフトと呼ばれるコレステロール含量の多い部分に存在している。プリオンは、脳の神経細胞やアストロサイト、免疫担当細胞に多く発現している。プリオンは特に Cu と親和性が高く、Cu の細胞内輸送に働いている。S や Mo は、プリオンと Cu との結合を阻害し、プ

リオンを介した細胞内への Cu の取り込みを阻害する。細胞外 Cu 含量の低下している状況下では、Mn は Cu と競合的にプリオンに結合し、Cu 欠乏症を増強する。プリオンには抗酸化作用もあるか、Mn と結合することで抗酸化作用は阻害される。Cu 欠乏症になった細胞は、Cu を必要とする酵素類、特に Cu/ZnSOD 活性の活性低下をもたらす。Cu/ZnSOD 活性が低下した神経細胞は酸化ストレスに対し脆弱になり、アポトーシスを起こしやすくなる。異常プリオンの発現はその結果であるかもしれない。

細胞をツニカマイシン処理することによる ER ストレスの負荷(3)、サイクロスポリンによる過剰リン酸化(4)や Mn 処理(5)などにより異常プリオンが生成されるという報告があることから、感染説だけでは説明できない異常プリオン生成の経路が考えられる。

一方では、菜種油か大豆油を対照として、脳をはしめ多くの臓器を障害することか当研究事業班で明らかにされつつあり、想定されている微量有害因子の関与も考えられる。

本年度は、菜種の粕か異常プリオンの発生に関与するのか否か明らかにする研究を始めた。

B 研究方法