

Figure 7 Body weight of SHRSP rats. Values were means \pm SEM (n=8). Significance of differences was analyzed by one-way ANOVA with Turkey's multiple comparison.

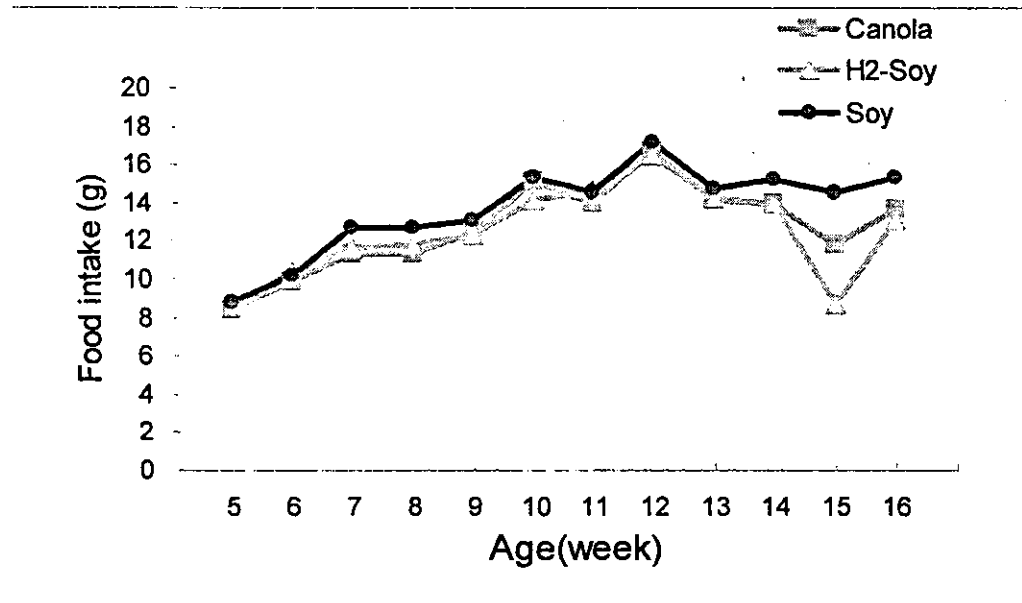


Figure 8 Food intake of SHRSP rats. Significance of differences was analyzed by one-way ANOVA with Turkey's multiple comparison.

Table 8 The body weight and tissue weight of SHRSP rats fed the test diets for up to 16 weeks of age.

Weight(g)/rat									
	Canola			H2-Soy			Soy		
Prostate gland	0.200	±	0.020	0.220	±	0.030	0.243	±	0.010
Testis	1.389	±	0.114	1.481	±	0.045	1.557	±	0.022
Body weight	268.9	±	11.9 ^{ab}	245.7	±	9.8 ^a	296.9	±	8.9 ^b

% of body weight									
	Canola			H2-Soy			Soy		
Prostate gland	0.076	±	0.008	0.089	±	0.011	0.083	±	0.007
Testis	0.516	±	0.041	0.608	±	0.017	0.528	±	0.015

Values are means ±SEM (=8). Significance of differences was analyzed by one-way ANOVA with Turkey's multiple comparison.

硬化大豆油群は大豆油群と比べ、有意に体重が軽かった (p<0.05)。前立腺、精巣の重量はカノーラ油群、大豆油群が軽い傾向が見られたが有意ではなく、体重当りのこれら組織重量にも有意な差が見られなかった。

精巣の testosterone 含量は、カノーラ油群、

硬化大豆油群とも大豆油群より有意に低かった (P<0.05)。血清、前立腺でも同様の傾向が見られたが、それらの差は有意ではなかった。一方、前立腺のジヒドロテストステロン (DHT) 含量は、食餌群間で有意な差がなかった。

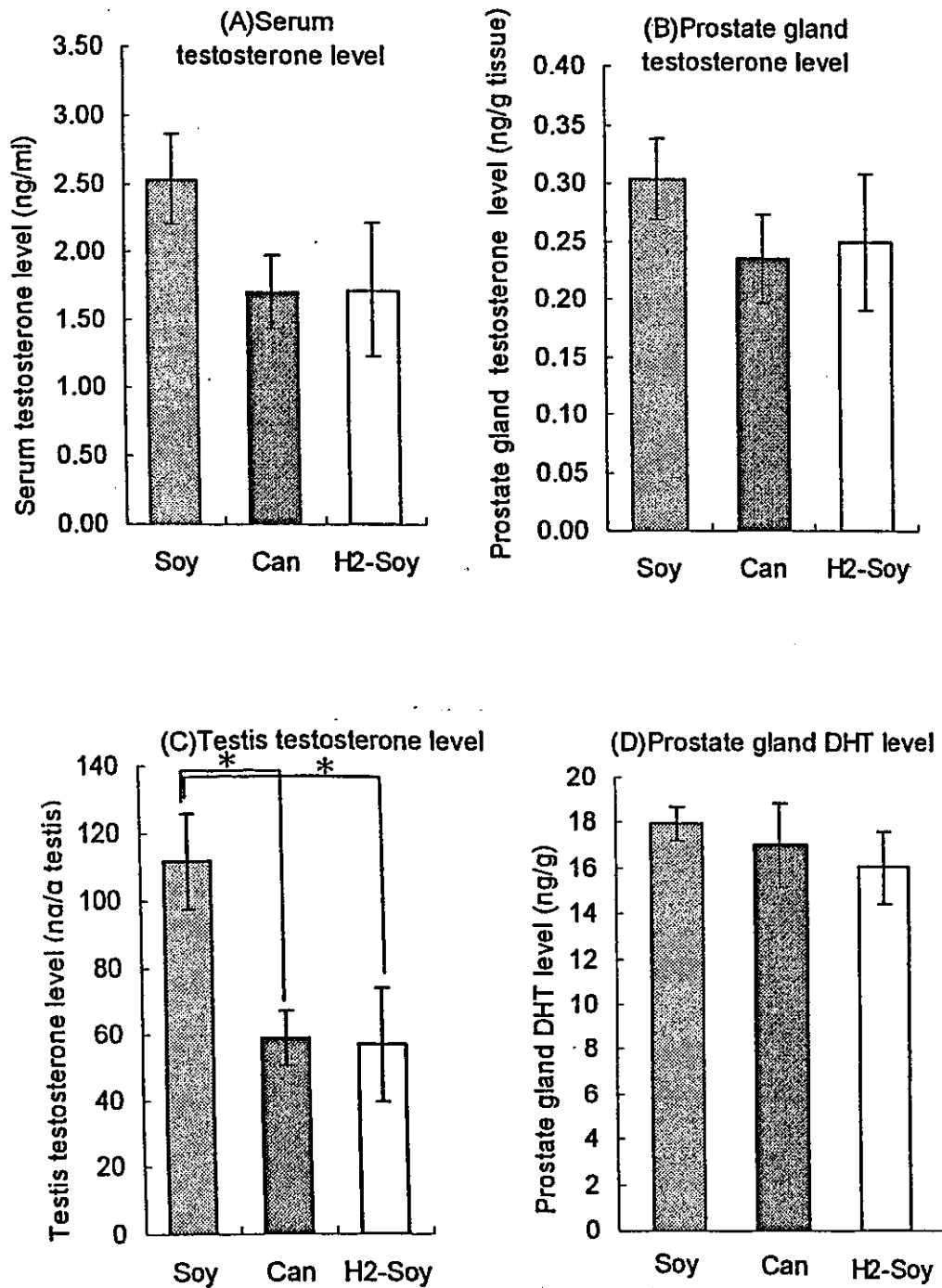


Figure 9 Tissue testosterone or dihydrotestosterone (DHT) levels in 16-wks-old SHRSP rats fed Can diet, Soy diet and H2-Soy diet. Testosterone levels in serum (A), prostate calculated per g tissue (B), testis (C) and DHT level in prostate gland (D). Data were determined for 8 rats and shown as means \pm SEM. Significance of the differences was analyzed by Tukey Test (*, $p < 0.05$).

D. 考察

前年度、分子蒸留法により寿命短縮活性がのぞかれた残留油が高収率で得られたと報告した。しかし残念ながらこの結果は再現できなかった。蒸留法あるいは/および動物実験に問題があったと思われる。今回、残留油部の生存率が元のカノーラ油より短い傾向が見られたが、蒸留油部あるいは凝集物に寿命短縮活性は認められなかった。残留油部に活性が濃縮したか、あるいは防御物質が残留油部より除かれたのかもしれない。

分子蒸留法で植物ステロールは蒸留油画分に抽出され、残留油画分では元のカノーラ油より少なくなっている (Table 3)。すなわち、寿命短縮作用と植物ステロールは相関していない。

大豆油群、カノーラ油群、硬化大豆油群のステロイドホルモン分析の結果は、カノーラ油と大豆油を比較した前年度の結果をほぼ再現していた。カノーラ油、硬化大豆油には、ステロイドホルモンの生合成を負の方向に働きかけるか、あるいは代謝を促進する因子が存在している可能性を示している。しかし、大豆油群のテストステロン含量が上昇している可能性は否定できない。現在、テストステロン生合成に関与する酵素の mRNA 発現量を調べることでカノーラ油が、テストステロン量に及ぼしている機構を解明する研究が進んでいる。

E. 結論

1. 分子蒸留法によるカノーラ油画分で、残留油の生存期間が元のカノーラ油より短い傾向を示したが、他の画分には活性が認められなかった。植物ステロールと生存率の間には相関は認められなかった。
2. 大豆油群に比べ、カノーラ油群、硬化大豆油群の精巢テストステロン含量は有意に低かった。これらの結果は、ほぼ前年度の結果を再現していた。
3. 血清 testosterone 濃度は大豆油群に比べカノーラ油群、硬化大豆油群が低い傾向にあったが、それらの差は有意ではなかった。

参考文献

1. Huang, M. Z., Naito, Y., Watanabe, S., Kobayashi, 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

2. Huang, M. Z., Watanabe, S., Kobayashi, T., Nagatsu, A., Sakakibara, 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
3. Miyazaki, M., Watanabe, S., Oikawa, T., Morozumi, K., Fuzinami, T., and Okuyama, H. (1998) Early mortality effect of partially hydrogenated vegetable oils in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). *Nutr. Res.* 18, 1049-1056
4. 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
5. Simokawa T, Moriuchi A, Hori T, Saito M, Naito Y, Kobayakawa 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
6. Douglas, R. D. Quality of western Canadian mustard. (1999) Canadian Grain Commission. http://collection.nlc-bnc.ca/100/201/301/quality_west_can_mustard/pdf/mustard1999.pdf
7. Ward, K., Scarth, R., Daun, J. K., and Thorsteinson, C. T. (1994) A comparison of high-performance liquid chromatography and spectrophotometry to measure chlorophyll in canola seed and oil. *J.Am.Oil Chem.Soc.* 71, 931-939
8. Abraham, V., and Deman, J. M. (1985) Determination of volatile sulfur compounds in canola oil. *J.Am.Oil Chem.Soc.* 62, 1025-1028
9. Abdi, S. L., List, G. R., and Rennick, K. A. (1999) Effect of genetic modification on the distribution of minor constituents in canola oil. *J.Am.Oil Chem.Soc.* 76, 463-467
10. Ikeda, I., Nakagiri, H., Sugano, M., Ohara, S., Hamada, T., Nonaka, M., Imaizumi, K. (2001) Mechanisms of phytosterolemia in stroke-prone spontaneously hypertensive

- and WKY rats. *Metabolism* 50, 1361-1368
11. Ratnayake, W. M., L'Abbe, M. R., Mueller, R., Hayward, S., Plouffe, L., Hollywood, R., 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
 12. Scoggan, K.A., Gruber, H., Larivière, 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.
 13. 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. *Biochem. Biophys. Acta.* 1483, 101-110
 14. Innis, S. and Dyer, R.A. (1999) Dietary canola oil alters hematological indices and blood lipids in neonatal piglets fed formula. *J. Nutr.* 129: 1261-1268.
 15. Kameyama, T., Ohhara, T., Nakashima, Y., Naito, Y., Huang, M. Z., Watanabe, S., Kobayashi, T., Okuyama, H., Yamada, K., Nabeshima, T. (1996) Effects of dietary vegetable oils on behavior and drug responses in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 400-404
 16. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917
 17. Ratnayake, W. M., Plouffe, L., Hollywood, R., L'Abbe, M. R., and Mueller, R. (2000) Influence of sources of dietary oils on the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipids* 35, 409-420

F. 健康危険情報

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、ほぼ明確となった。カノーラ（菜種）油と大豆油は多くの国で主要な食用油である。わが国では前者が増

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/ α -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、あまり知られていない。カノーラ油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。ヒトでの有害性は証明されていないが、動物実験で有害性の認められる食用油やその加工油脂を多く摂取しないよう、広報活動を進める必要がある。

G. 研究発表

H16年原著論文

(1) 国内 1件

Tatematsu, K., Hirose, N., Ichikawa, Y., Fujii, Y., Takami, A. and Okuyama, H. 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 (2004)

(2) 海外 6件

そのうち主なもの

Du, C., Fujii, Y., Ito, M., Harada, M., Moriyama, E., Shimada, R., Ikemoto, A. and Okuyama, H. 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 (2004)

Tatematsu, K., Fuma, S., Satoh, J., Ichikawa, Y., Fujii, Y. and Okuyama, H. Dietary canola oil and soybean oil fed to SHRSP rats differently affect the growth and survival of their male pups. *J. Nutr.* 134, 1347-1352 (2004)

Tatematsu, K., Fuma, S., Nagase, T., Ichikawa, Y., Fujii, Y. and Okuyama, H. Factors other than phytosterols in some vegetable oils affect the survival of SHRSP rats. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1443-1451 (2004)

H16年 国際学会発表 2件、

国内学会発表 3件

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

有害因子の生化学的、生理学的検索

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 毒性部長
研究協力者 内藤由紀子 同 薬理学研究室 安全性薬理班長
立花滋博 同 薬理学研究室

【研究要旨】

平成14-15年度に実施した、カノーラ油摂取による脳卒中易発性高血圧自然発症ラット(SHRSP)の短命化原因物質の探索実験結果を補遺する目的で、カノーラ油とその超臨界抽出分画(180bar分画、350bar分画および残渣)または大豆油10w/w%を添加した飼料を、5週齢のSHRSPに与え、0.5%食塩水を飲料水として、脳卒中発現までの日数および生存日数を調べる実験を行ない、成果を集約した。350bar分画および残渣摂取は、カノーラ油摂取同様に発作の早期発現と短命化を招いたが、180bar分画摂取ではこのような影響が認められず、大豆油摂取時同様の寿命を示すことが明らかになった。それぞれの油脂混合飼料中に含まれる主な植物ステロール量あるいは総植物ステロール量と各群の生存日数の中央値の間には相関が見られなかった。死亡動物の剖検結果から、残渣摂取によって、心臓死の頻度が増す傾向が見られた。死亡動物の病理組織所見からは、残渣摂取によって脳傷害が重篤化することが示唆された。

生存日数確認実験とは別に、食塩負荷条件下に各油脂を混餌で8週間摂取させる実験を行い、生存日数確認実験の過程で起ると考えられる動物の生理学的変化を調べた。その結果、350bar分画および残渣の摂取が、脳、心臓、腎臓等の臓器重量を増すことがわかった。また、血液中脂質の上昇傾向が見られ、トリグリセリドと塩素イオン濃度の間には、カノーラ油、350bar分画および残渣摂取群においてのみ、有意な負の相関が見られた。残渣摂取群では血糖値と血中尿素窒素およびクレアチニンレベルの間に有意な相関が見られた。

超臨界抽出の他、カノーラ油のゲル濾過で得られた3つの粗分画を飼料に5w/w%添加して、SHRSPの生存日数に及ぼす影響を検討した。これらの分画摂取では、いずれもカノーラ油摂取以上に生存日数を短縮する傾向が見られたが、有意な変化ではなかった。また、発作発現時期、症状および臓器重量には、各分画に特徴的な影響は見られなかった。

本研究の結果を集約すると、以下の通りである。

1. カノーラ油180bar超臨界抽出分画は、安全な油である。
2. 植物ステロールは、生存日数短縮の原因物質とはいえない。
3. 有害因子は超臨界抽出の350bar分画と残渣に含まれている。
4. 悪影響は、SHRSPの背景病態の増悪にもとづく。
5. 残渣には、心・腎を傷害する因子がある。短命化の“有害因子”と関連があるか否かを明らかにするには、さらに検討が必要である。
6. 血中脂質と電解質(塩素イオン)濃度の関係は、平成15年度までに確認した、 Na^+ 、 K^+ -ATPase活性への影響とともに、カノーラ油摂取による膜機能の変化ないし電解質輸送機能への影響を疑わせる。

広く用いられる食用油が、SHRSPのような高血圧症、脳卒中発症を特徴とする系統で短命効果を現わすことは、生活習慣病に注目が集まる中、単に病態モデルによる特異な現象として軽視することはできない。様々な手法で得た油脂分画を用いたbioassayに加え、タンパク、遺伝子レベルの検討を含めた多方面からのアプローチにより、短命化の原因を早急に究明することが強く求められる。

A. 研究目的

食用にされる植物油のいくつかを脳卒中易発性高血圧自然発症ラット (SHRSP) に摂取させると、生存日数が短縮する (Huang et al., 1996, 1997; Miyazaki et al., 1998)。この短命化の原因物質を探索するために、平成 14 年度から、SHRSP にカノーラ油の超臨界抽出分画を摂取させた際の、生存日数に対する影響を調べてきた (平成 14 年度および平成 15 年度研究報告)。平成 16 年度は、この分画を用いた研究を追補する一方、短命化の背景にある生理学的変化を調べるため、食塩負荷の条件下で、SHRSP に各分画を 8 週間摂取させた後、屠殺解剖する実験も実施し、これまでに得た結果と併せて、超臨界抽出分画を用いた有害因子探索研究の成果を集約することを目的とした。

また、別途、カノーラ油のゲル濾過分画についても、同様の検討を行なって、今後の原因物質探索のための基礎情報を得ようとした。

B. 研究方法

カノーラ油分画を与えた SHRSP の生存日数

カノーラ油 (太田製油) を二酸化炭素超臨界蒸留法 (40°C、180bar で 6.5 時間抽出、その後、同温 350bar で 11 時間抽出。於 茂利製油) により、180bar 分画、350bar 分画および残渣の 3 分画に分け、ラット用粉末飼料 (CE-2、日本クレア) に 10w/w% 添加してペレット化した飼料、同様にカノーラ油または大豆油 (太田製油) を 10w/w% 添加した飼料を作製した。

5 週齢の SHRSP (SHRSP/Izm、雄、SHR 等疾患モデル共同研究会) のべ 100 匹を 5 群に分け、前述の油脂添加飼料を与えた。

度分	総計	動物数 (匹)	
		平成 14~15 年度分	平成 16 年度分
大豆油群	15	5	20
カノーラ油群	15	5	20
180bar 分画群	10	10	20
350bar 分画群	15	5	20
残渣群	15	5	20

飲料水には、脱イオン蒸留水で調製した 0.5% 食塩水を用いた。

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として (Okamoto et al., 1974; Nagaoka et al., 1976) 脳卒中症状の発現日を記録し、自然死を待って生存日数を調べた。

結果の評価は、それぞれの群における脳卒中症状のない正常動物の減少曲線あるいは生存動物数の減少曲線を、Log-rank 検定および Wilcoxon 検定で比較し、また、各分画群における、摂取開始から発作発現までの平均日数あるいは生存日数を Dunnett 検定で比較して行った。

カノーラ油分画を与えた 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 40 匹を、1 群 8 匹から成る 5 群に分け、それぞれ、カノーラ油、180bar 分画、350bar 分画、残渣または大豆油添加飼料を与えた。

平成 15 年度に実施した同様の研究では、食塩負荷が SHRSP の昇圧を促進し、脳卒中による死亡を早めるので、生理機能の変化の群間差を不明瞭にする可能性を考慮して食塩負荷をしない条件としたが、今回は、生存日数確認実験と同じ条件で飼育し、双方の結果を比較することとした。

飼育 8 週目に動物を代謝ケージに移して 24 時間採尿し、続いて実施した剖検の際に採血して、腎機能 (電解質クリアランス、クレアチニンクリアランスおよびナトリウム再吸収率) を調べた。また、血液学的検査 {全自動血液解析装置 Cell Dyne 3500 (ダイナボット) 使用} および血液生化学検査 {遠心式全自動生化学解析装置 Cobas Mira (ロシュ) 使用} を行い、骨髓像は塗抹標本を目視で観察した。一方、主要臓器をホルマリン固定し、病理組織学的検査を実施した。

Rho-kinase 活性の測定

われわれは、カノーラ油摂取による血漿中脂質濃度上昇を観察している (Naito et al., 2000a, 2000b)。一方、ヒトにおいては、キロミクロンまたは VLDL レムナント中のトリグリセリドが、冠血管スパズムによる突然心臓死と強く関連し (Takeichi, 1999; Takeichi et al., 2001)、それは、血管の

Rho-kinase 活性化によって起こることが明らかにされている (Oi et al., 2004; Fukumoto et al., 2004)。生存日数を調べた実験では、脳卒中以外に、比較的早い時期の心臓死が見られたため、油脂摂取により血管 Rho-kinase 活性に変化が見られるか否かを、8 週間摂取実験の動物から得た胸部大動脈を標本として測定した。

血管をトリス緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 % Triton X-100, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.5mM PMSF, 1 μ g/mL pepstatin, 0.5 μ g/mL leupeptin, 10mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 10mM β -mercaptoethanol) 中でホモジナイズし、4°C、30,000 \times g で 30 分間遠心し、この上清を標本として、Cyclex 社製キットで Rho-kinase 活性を測定した。

精子数および精子運動の観察

これまでの研究から、生存日数確認実験の解剖の際に、一部の個体で精巣の小型化が認められたため、上記の 8 週間摂取実験の動物の精巣上体尾部から精子を採取して精子運動能を観察し、精巣中の精子数を計数した (精子運動能解析装置、Hamilton Thorne 使用)。

生存日数に対するカノーラ油ゲル濾過分画の影響

セルロファイン GH-25m (生化学工業) を担体に、クロロホルム-メタノール (19:1, 水飽和) \rightarrow メタノール: 水 (1:1) を移動相として得たカノーラ油の 3 つの粗フラクション (分子の大きい順に A, B, C 分画とした) を、粉末飼料 (CE-2、日本クレア) に 5w/w% 添加してペレット化した飼料、および、同様に 5w/w% カノーラ油を添加した飼料を作製した。添加油脂量を 5% としたのは、最も分子が小さい分画の収量が少なく、生存日数評価が可能な個体数を使用するためには添加量を減らす必要があったからである。カノーラ油では添加量を減らしても、用量に依存した短命化が認められている (Huang et al., 1996) ので、今回は、5w/w% 添加とした。

5 週齢の SHRSP (SHRSP/Izm、雄、SHR 等疾患モデル共同研究会) のベ 53 匹を 4 群に分け、前述の油脂添加飼料を与えた。

	動物数 (匹)
カノーラ油群	15
A 分画群	15
B 分画群	15
C 分画群	8

飲料水は 0.5% 食塩水とし、観察、評価ともに、二酸化炭素超臨界蒸留法によって得られた分画を用いた実験と同様に行なった。

C. 結果

脳卒中関連症状の発現

各分画含有飼料の給餌日数と、脳卒中関連症状が無い個体数の割合をプロットしたのが図 1 である。大豆油群と 180bar 分画群では、他の 3 群に比べ、発作の発現が遅く、これら 2 群のグラフは一部が重なった。

統計学的解析結果を表 1 に示す。カノーラ油群、350bar 分画群および残渣群では、大豆油群と比べ、グラフが有意に左へ移行しており、摂取開始から発作発現までの日数も、大豆油群と比較して有意に短かった。一方、180bar 分画群のグラフは大豆油群のそれに近く、両群のグラフには、カノーラ油群のそれと比較して有意な差が見られた。発作発現までの平均日数も、カノーラ油群、350bar 分画群および残渣群では、大豆油群に比べ有意に短かった。

生存日数

図 2 は、各分画含有飼料給餌開始からの日数と、生存動物数の割合をプロットしたものである。大豆油群と 180bar 分画群では、他の 3 群に比べ、生存日数が長くなった。これを統計学的に解析すると、カノーラ油群、350bar 分画群および残渣群では、大豆油群と比較し、グラフが有意に左へ移行しており、動物が短期間で死亡することがわかった (表 2)。また、180bar 分画群と大豆油群のグラフには有意差がなかった。一方、180bar 分画群とカノーラ油群のグラフとの間には有意な差が認められた。平均生存日数は、カノーラ油群が、大豆油群に比べ有意に短かった。その他の群では、大豆油群と比較し、平均生存日数に統計学的有意差はみられなかったが、350bar 分画群および残渣群ではカノーラ油群と同等の短命が窺われた。180bar 分画群の平均生存日数は、大豆油群のそれに近かった。

剖検結果および臓器重量

定期解剖実験と異なり、生存日数を調べる実験では、新鮮な組織を得ることが難しい。ここでは、死亡発見後、速やかに剖検し、主要臓器の重量を測定したが、経時変化で判断が難しくなるため、一部を除いて組織標本は作製しなかった(全ての個体で主要臓器の固定保存は行った)。

剖検結果を表3に示す。大半の個体で脳内出血が認められた。肉眼で確認できる出血および出血痕は、180bar分画群および残渣群でやや低頻度となる傾向が見られた。心不全による肺水腫をきたした個体が全群で認められ、残渣群ではやや高頻度であった。脳に傷害が見られず、肺水腫だけが認められた個体は、大豆油群では1例のみであったが、他群では複数認められ、残渣群で多くなる傾向があった。

主要臓器の重量(対体重相対重量)を表4に示す。残渣群の肺、350bar分画群と残渣群の肝臓、カノーラ油群とその分画群全ての脾臓、カノーラ油群と180bar分画群および残渣群の腎臓、そして、残渣群の副腎で、それぞれ相対重量が大豆油群と比較して重くなる傾向にあったが、有意な差は残渣群の脾臓で認められただけであった。

死亡直後に剖検できた個体の病理所見を表5にまとめた。個体数が少ないので評価が難しいが、脳の組織傷害が、350bar分画群および残渣群で著明であった。いずれの群でも心臓、脾臓および腎臓の傷害が著しかった。

各分画含有飼料で8週間飼育した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

8週間の飼育で一部の個体では脳卒中の症状が認められたが、死亡例はなかった。

腎機能、血液像および骨髄像

各群の24時間尿量の平均値は、大豆油群50.5mL、カノーラ油群33.5mL、180bar分画群54.0mL、350bar分画群41.5mLおよび残渣群50.0mLで、カノーラ油群の尿量がやや少なかったが、有意な差ではなかった。腎ナトリウムクリアランス(CNa, L/kg/day)の平均値は、大豆油群0.1665、カノーラ油群0.1021、180bar分画群0.1435、350bar分画群0.1254、残渣群0.1265と、カノーラ油群と350bar分

画群および残渣群で減少傾向が認められた。塩素クリアランス(CCl, L/kg/day)の平均値も、それぞれ大豆油群0.2264、カノーラ油群0.1414、180bar分画群0.2070、350bar分画群0.1814および残渣群0.1844と、同様の傾向を示した。カリウムクリアランス(CK, L/kg/day)の平均値は、それぞれ大豆油群0.9456、カノーラ油群0.6706、180bar分画群1.205、350bar分画群1.055および残渣群1.362で、カノーラ油群では減少傾向が認められた。糸球体濾過率を示すクレアチニンクリアランス(CCr, L/kg/day)の平均値は、それぞれ大豆油群7.946、カノーラ油群6.055、180bar分画群6.082、350bar分画群6.639および残渣群5.875と、カノーラ油群とその分画群で減少傾向を示したが、有意な差ではなかった。Na再吸収率 $\{100 \times [1 - (CNa/C Cr)]\}$ にも影響は認められなかった。

いずれの群でも赤血球数および血色素には影響は認められず、白血球数にはバラつきが大きかったが、これにも群間差はなかった。このバラつきは、好中球およびリンパ球数が増大した個体によるものであった。平均血小板数は、大豆油群57.84万個、カノーラ油群57.43万個、180bar分画群41.40万個、350bar分画群39.28万個および残渣群40.41万個/ μ Lであった。カノーラ油群には、数値の大きい個体が含まれていたため、平均値は大きかったが、この個体を除くと、カノーラ油群、180bar分画群、350bar分画群および残渣群では、血小板数の減少傾向が認められた。

骨髄ではmyeloblastがカノーラ油とその分画群でやや多く、平均値は、大豆油群、カノーラ油群、180bar分画群、350bar分画群および残渣群で、それぞれ、1.20、1.40、1.65、1.45および1.30(%)であった。しかし、白血球系細胞総数には群間差が認められなかった。赤血球細胞数総数にも群間差は認められなかった。

血液生化学

脂質パラメータに影響が認められた他には、一般生化学検査パラメータに著しい影響は見られなかった。血中総コレステロール、トリグリセリドおよびリン脂質濃度は、大豆油群と比較し、カノーラ油とその分画群で上昇する傾向を示した(表6)。また、これらの群でアルカリ性フォスファターゼ活性が上

昇傾向を示した。残渣群にトリグリセリドの著しい上昇を示す個体がみられ、平均値も有意に高くなった(図3)。この他、カノーラ油とその分画群でグルコースレベルの上昇が見られ、180bar分画群と残渣群では、大豆油群に比べ有意な上昇となった(図3)。残渣群では、尿素窒素およびクレアチニンレベルが血中グルコースと有意な正の相関を示し、クレアチニンクリアランスが負の相関を示した。一方、有意な変化ではなかったが、カノーラ油とその分画群では、大豆油群に比べ、血漿中塩素イオン濃度が低下した(図4)。

これらの血液生化学パラメータの相互関係を細かく調べると、血漿中塩素イオン濃度に対する総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質の関係には、生存日数確認実験で短命だったカノーラ油群、350bar分画群および残渣群に特有で、その他の群では認められない、統計学的に有意な負の相関が認められた。その他、350bar分画群および残渣群では、血漿中塩素イオンとカリウムイオン濃度の間に負の相関、アルカリ性フォスファターゼ活性との間に正の相関が認められた。

Rho-kinase 活性の測定

大動脈血管組織の Rho-kinase 活性には有意な群間差が認められなかった(図5)。

臓器重量

主要臓器の(対体重)相対重量の中で、統計学的に群間差が認められたものを、図6に示す。

カノーラ油群、350bar分画群および残渣群では、大豆油群と比較し、脳、心臓、肝臓、腎臓、精巣および精巣上体の重量が増大する傾向がみられ、350bar分画群および残渣群でそれぞれ有意な増大となった。

病理組織所見

固体別の病理組織所見を表7に、中等度以上の異常所見とその頻度を表8にまとめた。

8週間の飼育では、脳の病変は頻度が低く、腎臓および脾臓の傷害が認められたが、群間差は明らかにならなかった。以下に、中等度以上の異常所見を臓器別にまとめた。

脳：180bar分画群1例で血腫、他の1例で神経膠星状細胞の増殖が見られた。350bar

分画群1例で皮質の壊死が見られた。

心臓：大豆油群3例、カノーラ油群、350bar分画群および残渣群各2例で、心筋変性が見られ、このうち、350bar分画群の1例で動脈の肥厚が見られた。

肺：180bar分画群の1例で肺水腫が見られた。

肝臓：異常は認められなかった。

脾臓：大豆油群、カノーラ油群、180bar分画群で、それぞれ4例、350bar分画群で3例、残渣群で5例に髄外造血が見られた。180bar分画群で3例(2例は脾臓髄外造血の見られた個体)、350bar分画群および残渣群では1例(いずれも脾臓髄外造血の見られた個体)で動脈の肥厚が認められた。

腎臓：カノーラ油群で6例、他の4群ではそれぞれ5例に慢性腎症が認められた。大豆油群とカノーラ油群でそれぞれ2例、180bar分画群で4例、350bar分画群で1例、残渣群で3例に動脈の肥厚が見られた(残渣群の1例以外は、中等度以上の慢性腎症が見られたのと同じ個体)。

精巣：大豆油群で生殖細胞の変性が2例に見られ、うち1例では動脈の肥厚が認められた。

精巣上体：大豆油群で生殖細胞の変性が見られた2例の内腔に細胞屑が認められた。

前立腺：大豆油群で生殖細胞に変性が見られた2例で、好中球の浸潤が認められた。

副腎：大豆油群で1例の皮質に壊死が見られた。

精子運動および精子数

結果を図7にまとめた。精巣上体尾部から得た精子の運動能(運動精子の割合)に群間差はなかった。直進性運動を示す精子の割合は、カノーラ油の分画群で低下し、残渣群では有意に抑制された。精巣内および精巣上体内の精子数には群間差がなかったが、精巣内の精子数は、カノーラ油群、350bar分画群および残渣群で、やや減少する傾向が見られた。

カノーラ油のゲル濾過分画を与えた SHRSP の生存日数

図8に、カノーラ油のゲル濾過分画がSHRSP生存日数に及ぼす影響をまとめた。フラクションA、BおよびCの生存率グラフは、カノーラ油群のそれに比べ、いずれも左方へ

移動する傾向がみられ、Wilcoxon 検定では、3 群ともに有意な(フラクション A、B および C とカノーラ油のグラフの比較で、それぞれ、 $p=0.0365$ 、 $p=0.0020$ および $p=0.0391$) 変化と評価されたが、Log-rank 検定ではいずれにも差が認められなかった(同、 $p=0.3920$ 、 $p=0.0530$ および $p=0.3251$)。平均生存日数にも差は認められなかった。

D. 考察

カノーラ油に含まれる有害因子をつきとめる手段の一つとして、超臨界蒸留法による分画を用い、生存日数確認実験を実施したが、平成 14-15 年度実施分と本年度実施分を併せて検討した結果、有害因子は 350bar 分画と残渣に存在すると推定された。しかし、これらの分画を摂取させた動物の生存日数がカノーラ油摂取動物より短くなることはなく、有害因子が二つの分画に存在することは推定されるが、その分離には、なお検討が必要である。一方、本研究からは、少なくとも、SHRSP の寿命を指標にする限り、180bar 分画が大豆油同様に安全であることが明らかになった。180bar 分画では、生存日数が長く、脳卒中の頻度がやや低いのみならず、8 週間摂取実験では、カノーラ油、350bar 分画および残渣群で見られた臓器重量の増大が 180bar 分画では認められなかった。

カノーラ油の含有植物ステロールが多いことが、SHRSP の短命化の原因であるとする研究報告があり、状態悪化の一因ではあると考えられる(Ratnayake et al., 2000a, 2000b; Naito et al., 2003)。しかし、たとえば、植物ステロール含量の少ないオリーブ油も SHRSP を短命化することがわかっており(Huang et al., 1997; Ratnayake et al., 2000b)、原因を植物ステロール含量だけに結びつけて論じることには限界があった。平成 14 年からこれまでに得た結果をもとに、超臨界抽出分画を与えた SHRSP の生存日数と、それぞれの分画に含まれる主な植物ステロール量、あるいは、総植物ステロール含量との関係をしらべると、図 9 に示すように、負の相関は認められず、stigmasterol では、有意な正の相関さえ認められた。従って、少なくとも、植物ステロールが SHRSP の短命化の「原因物質」であるとは言えないことが明らかになった。同様の知見を Tatematsu ら(2004)が

得ており、今回の結果は、それを支持するものである。

前述のように、350bar 分画と残渣は、カノーラ油同様に SHRSP の生存日数を短縮したが、カノーラ油以上に生存日数を短縮することはなかった。これは、有害因子が両分画に分散したためと考えられる。また、残渣を摂取した動物では、肺水腫の発現頻度が高くなる傾向がみられ、特に、脳には直接死因になったと考えられる傷害が見られないにも関わらず、顕著な心臓のうっ血と重篤な肺水腫が見られる例が多かった。これらの個体は、脳卒中の症状が出る以前の健康な状態の時期に、前兆なく突然死したものが多い。心臓死は SHRSP の主な死因ではないため、心臓死を引き起す因子が短命化の鍵を握ることはないと考えられるが、超臨界抽出によって、突然心臓死を引き起す因子が残渣分画中に残されたという事実は特記すべきものであろう。

今回の死亡動物の組織、平成 15 年度の食塩負荷をしない 8 週間摂取実験における屠殺動物の組織検査で、残渣分画群における脳傷害が著しかったことは、死亡動物では病理組織検出例数が、また、屠殺動物でも 1 群の例数が少なかったことにより、偶然、心臓死が見られなかったことによるものであろう。今回の食塩負荷 8 週間摂取実験では、残渣分画群でやや脳の傷害が多かったが、顕著な変化ではなかった。そのまま飼育すると、残渣分画群における脳傷害が明らかになった可能性があるとともに、そのまま、心臓死を起こす個体があったかも知れない。いずれにせよ、脳への影響と突然死を起こす心臓への影響にかかわる因子が、別個のものであることが示唆される。

生存日数確認実験に用いた動物の脾臓および腎臓重量は、カノーラ油とその分画群で大豆油群より重くなる傾向があった。腎臓および脾臓が、カノーラ油中の有害因子の標的器官であるか否かは明らかでない。カノーラ油と大豆油の比較としてこれまでに報告したとおり、カノーラ油の有害な効果は、SHRSP の背景病態の増悪によるもので、有害因子に特異的な標的があるようには見えない(Naito et al., 2003)。実際、腎臓および脾臓の重量増大傾向は 180bar 群にも認められたし、組織の傷害は全ての群を比較しても大きな違いはなかった。見かけの病変と機能低

下が平行しない可能性も考えられるので、今後、腎機能の詳細な検討が必要である。脾臓については、腎臓の傷害によるエリスロポエチン産生低下が、骨髄抑制を介して引き起す髄外造血のスキームを想定した(平成15年度研究報告)が、今回の8週間飼育実験では、骨髄像に影響が認められなかった。食塩負荷の有無が、骨髄への影響も左右するというのは信じがたいが、今後の検討課題ではある。

食塩負荷条件下で8週間飼育したSHRSPの定期解剖結果では、大豆油群に比べ、カノーラ油群、350bar分画群および残渣群で、脳、心臓、腎臓、肝臓、精巣および精巣上体の相対重量が増した。これらの所見は、平成15年度の研究報告での結果(食塩負荷を行なわないで7週飼育した動物)と概ね同様の変化であったが、今回の結果の方が、350bar分画および残渣群での変化が著しく、高血圧症の増悪による動脈硬化等の全身性の血管障害が、食塩負荷によって進行していることが疑われた。しかし、最も短命効果が明瞭なカノーラ油群で、最も顕著な変化が認められたわけではなかった。摂食開始8週間までに死亡例が見られることは稀でないが、早期死亡には脳に傷害がない心突然死個体が多い。群間で脳卒中死の時期に差異が出るとすれば、さらに長い摂食期間を設けて、ある時点で、形態学的、生理学的検討を加える必要があるが、現実的ではない。今後の解析は、全身動物を用いない系で進め、有害因子の候補を絞った後に、再び全身動物を用いるのが有効であろう。

大豆油に比べ、カノーラ油摂取動物で血液中脂質パラメータが著しく上昇することが、食塩負荷の有無に関らず、SHRおよびWKYラットで確認されている(Naito et al., 2000a, 2000b)。食塩負荷のないSHRSPでも、同様の傾向が見られることを、平成15年の研究報告で示した。この変化は、カノーラ油およびその分画に一樣に認められるため、生存日数の短縮に直接関るか否かはわからない。しかし、カノーラ油および残渣群で影響が著しかったことから、血中脂質の上昇による動脈硬化等の病変の促進による、病態増悪が考えられた。今回の食塩負荷8週間摂取動物においても、カノーラ油分画群で、総コレステロール、トリグリセリドおよびリン脂質濃度に上昇傾向がみられ、トリグリセリドは残渣群で

有意に高かった。今回、カノーラ油群では影響が明確でなかったが、その理由は不明である。

興味深いことに、生存日数確認実験で短命だったカノーラ油群、350bar分画群および残渣群に特有で、その他の群では認められない、統計学的に有意な負の相関が、血漿中塩素イオン濃度とトリグリセリド濃度あるいはリン脂質濃度との間に見られ、また、血漿中塩素イオン濃度と総コレステロールあるいは遊離コレステロールとの間の負の相関がカノーラ油群および残渣群に特有であった。血漿中塩素イオン濃度とトリグリセリド濃度との相関を図10に示す。SHRSPでは、食塩負荷が細胞内外の塩素イオン環境を変え、カノーラ油(またはその分画)摂取によって上昇する血中脂質と、食塩負荷で増える塩素イオンが、膜における脂質取り込みや電解質輸送に影響を及ぼしている可能性がある。われわれは、カノーラ油摂取による、 Na^+ , K^+ -ATPase活性の変動も観察しており(Naito et al., 2000c, 2003)、短命化にかかわる生理学的変化の原因か結果かはわからないが、細胞内外の電解質環境の変化関与することは確かであろう。これには、腎臓および脳から遊離する生体内ウアバイン様物質(Holland et al., 1991)の関与を考えることもできる。食塩負荷は生体内ウアバイン様物質の遊離を促進する(Butt et al., 1997)ので、 Na^+ , K^+ -ATPaseのポンプ機能が抑制される可能性がある。これまで、短命化とステロールの関係が疑われ、カノーラ油では間接的に短命化に関与する疑いがあると考えられるのも、このような機構の関与によるものかも知れない。今後、細胞内イオン環境、イオンチャンネルやトランスポーター機能に対する植物油摂取の影響を精査する必要がある。

残渣群では血中トリグリセリド濃度が有意に高くなった。これを個体別にみると、残渣群にはトリグリセリド濃度が著しく上昇した個体が複数含まれていた。血漿中のキロミクロンまたはVLDLレムナント中のトリグリセリドレベルが突然心臓死と強く相関し(Takeichi, 1999; Takeichi et al., 2001)、それが血管内皮のeNOs活性を抑制(Ohara et al., 2003)する一方、血管のRho-kinase活性化によってスパズムを起す(Oi et al., 2004; Fukumoto et al., 2004)ことがわ

かっている。生存日数確認実験で残渣群に心臓死が多かったことを考えると(それが主な短命化の機序ではないにしろ)、Rho-kinase 活性化に対する影響を調べる必要があった。大動脈の basal な活性には群間性認められなかったが、今後は、セロトニン刺激等に対する活性の変化等も調べる必要がある。また、Rho-kinase 活性化は全身性ではなく局所的に起こる可能性が高いので、in vitro の実験系での検討も求められる。

これまでの研究で、カノーラ油摂取による血中グルコース濃度の減少を観察したが(Naito et al., 2000a, 2000b)、今回、食塩負荷 8 週間摂取実験では、180bar 分画群と残渣群で血糖値が上昇した。180bar 分画群では認められなかったが、残渣群では血糖値と血中尿素窒素、クレアチニン、カリウムイオン濃度が強い相関を示し、CCr とは負の相関が見られた。これら、腎機能障害を示唆する変化と血糖値上昇が糖尿病様症候と関連するか否かはわからないが、残渣摂取群に比較的头著な臓器障害に微小動脈傷害がみられたことは興味深い。

血中グルコース濃度の他、前述の Na^+ , K^+ -ATPase 活性についても、カノーラ油摂取によって有意な上昇と低下が認められる場合があり、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性低下は摂取カノーラ油の量に依存することを確認している(未発表)。カノーラ油摂取動物では、肝細胞のグルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ活性上昇、SOD およびカタラーゼ活性の低下も認められているので(Naito et al., 2000b)、今後、電解質輸送への影響に加え、糖代謝および抗酸化酵素への影響も検討するべきであろう。

これまでの検討の中で、生存日数確認実験の際に、精巣の小型化が見られたため(相対重量では顕れない)、今回の 8 週間摂取実験では精子運動能および精子数への影響を確認したが、著明な影響は認められなかった。絶対重量の減少には卒中発作後の摂食障害による羸瘦の影響が大きいと考えられる。また、カノーラ油の分画摂取で、精子の直進運動の抑制傾向がみられ、残渣群では有意となったが、この原因検討は、今後の課題とした。

最後に、平成 16 年度の研究では、カノーラ油のゲル濾過分画を与えた SHRSP の生存日

数を検討した。全般にゲル濾過分画では、カノーラ油群よりいずれの群も短命になる傾向が認められたが、この実験では、カノーラ油群の生存日数がこれまで何回か確認してきたものより長かったため、評価には再実験が必要である。油脂分画量に制限があったため、添加量を 5w/w% としたが、再検討の際には 10w/w% にした比較が必要であろう。各分画群とカノーラ油群のグラフの比較では、Wilcoxon 検定で有意差が付き、Log-rank 検定では差が見られなかったが、これは、各分画群の曲線の形状が、カノーラ油群のそれに比べ、初期に急激でその後の緩やかな減少を示したためである。

E. 結論

1. カノーラ油180bar超臨界抽出分画は、安全な油である。
2. 植物ステロールは、生存日数短縮の原因物質とはいえない。
3. 有害因子は超臨界抽出の350bar分画と残渣に含まれている。
4. 悪影響は、SHRSPの背景病態の増悪にもとづく。
5. 残渣には、心・腎に悪影響を及ぼす因子がある。短命化の“有害因子”と関連があるか否かを明らかにするには、さらに検討が必要である。
6. 血中脂質と電解質(塩素イオン)濃度の関係は、平成15年度までに確認した、 Na^+ , K^+ -ATPase活性への影響とともに、カノーラ油摂取による膜機能の変化ないし電解質輸送機能への影響を疑わせる。

この研究は、遺伝的に高血圧症および脳卒中を発症するSHRSPを用いて行われた。得られた知見は、生活習慣病が大きな問題として取り上げられている現在、単に病態モデルによる特異な現象として軽視することはできない。我々の食生活に広く、深くゆきわたっている食用油が対象であることを認識し、安全な油脂の供給を目指した研究が求められる。カノーラ油については、今後、ここに示した以外の手法で得た油脂分画のbioassayの結果の精査に加え、タンパク、遺伝子レベルの検討を含めた多方面からのアプローチによる、SHRSP短命化の原因究明が急務である。

(参考文献)

- Butt, A.N., Semra, Y.K., Ho, C.S., 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.
- Fukumoto, H.J., Shimokawa, H., Hirooka, Y., Takeshita, A. 2004. Inhibition of Rho-kinase by fasudil preventing anginal attacks associated with spastic angina: a case report. *J. Cardiol.* 44, 161-164.
- Holland, S., Millett, J., Alaghband-Zedeh, J., deWardener, H., Pamnani, M., Haddy, F. 1991. Cytochemically detectable glucose-6-phosphate dehydrogenase-stimulating/Na-K-ATPase-inhibiting 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., Konishi, 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.
- Oi, K., Shimokawa, H., Hiroki, J., Uwatoku, T., Abe, K., Matsumoto, Y., Nakajima, Y., Nakajima, K., Takeichi, S., Takeshita, A. 2004. Remnant lipoproteins from patients with sudden cardiac death enhance coronary vasospastic activity through upregulation of Rho-kinase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 918-922.
- Okamoto, K., Yamori, Y., Nagaoka, A. 1974. Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Circ. Res.* 34/35, 1143-1153.
- Ratnayake, W.M.N., Plouffe, L., Hollywood, R., L'Abbé, M.R., Hidioglou, N., Sawar, 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'Abbé, 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, 1166-1178.
- Takeichi, S. 1999. Searching for a new risk factor of sudden cardiac death. *Nippon Hoigaku Zasshi* 53, 255-275.
- Takeichi, S., Nakajima, Y., Yukawa, N., Saito, Y., Huang, X.L., Kusakabe, T., Jin, Z.B., Hasegawa, I., Nakano, T., Saniabadi, A., Adachi, M., Ohara, N., Wang, T., Nakajima, K. 2001. Plasma triglyceride-rich lipoprotein remnants as a risk factor of 'Pokkuri disease'. *Legal Med.* 3, 84-94.
- Tatematsu, K., Fuma, S., Nagase, T., Ichikawa, Y., Fujii, Y., Okuyama, H. 2004. Factors other than phytosterols in some vegetable oils affect the survival of SHRSP rats. *Food and Chem. Toxicol.* 42, 1443-1451.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

内藤由紀子, 大原直樹. 2005. 菜種油摂取による脳卒中易発症高血圧自然発症ラットの短命化の要因に関する基礎的研究. 秦野研究所年報 27, 49-60.

脳卒中発作の発現(無症状動物の減少)

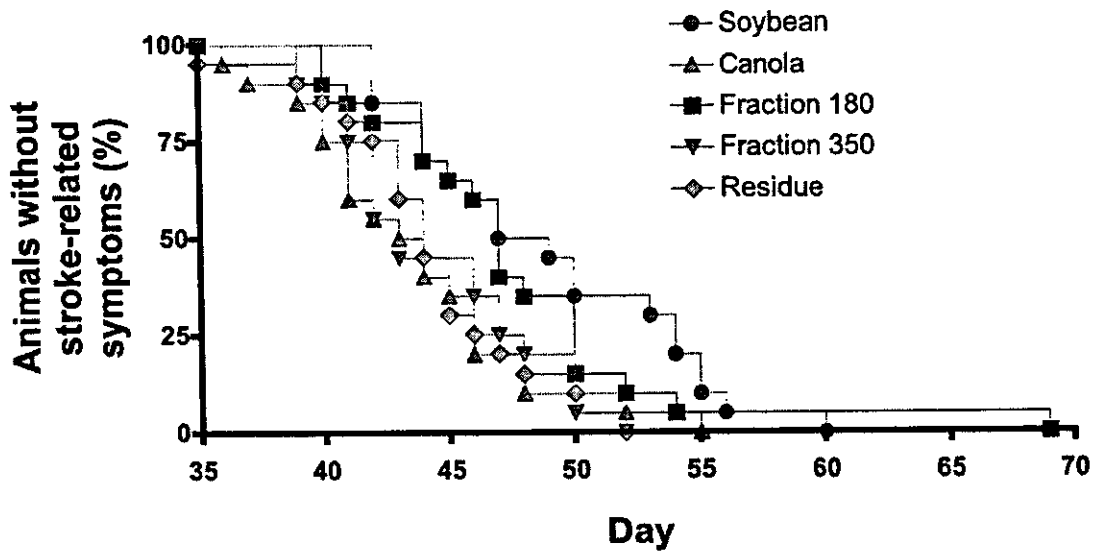


図1 カノーラ油分画を与えた SHRSP における脳卒中関連症状の発現

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、大豆油群；Canola、カノーラ油群；Fraction180 および Fraction350、カノーラ油の超臨界抽出 180bar 分画および 350bar 分画群；Residue、抽出残渣群。N=20。

表1 カノーラ油分画を与えた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)

Group	Median (day)		P value vs Soybean. vs. Canola		Mean±S. E
Soybean	48		-----	0.0041#	49±1
			-----	0.0016#	
Canola	44	Log rank	0.0041†	-----	44±1**
		Wilcoxon	0.0016†	-----	
Fr. 180	47	Log rank	0.4162	0.0494#	48±1
		Wilcoxon	0.1955	0.0066#	
Fr. 350	43	Log rank	0.0040†	0.7322	45±1*
		Wilcoxon	0.0019†	0.2966	
Residue	44	Log rank	0.0033†	0.8865	44±1*
		Wilcoxon	0.0014†	0.3650	

Soybean、大豆油群；Canola、カノーラ油群；Fr. 180およびFr. 350、カノーラ油の超臨界抽出180bar分画および350bar分画群；Residue、抽出残渣群。

† 大豆油群に対して、# カノーラ油群に対して、それぞれ有意な差。

*p<0.05、**p<0.01、大豆油群に対して有意な差(Dunnett's検定)。N=20。

生存日数

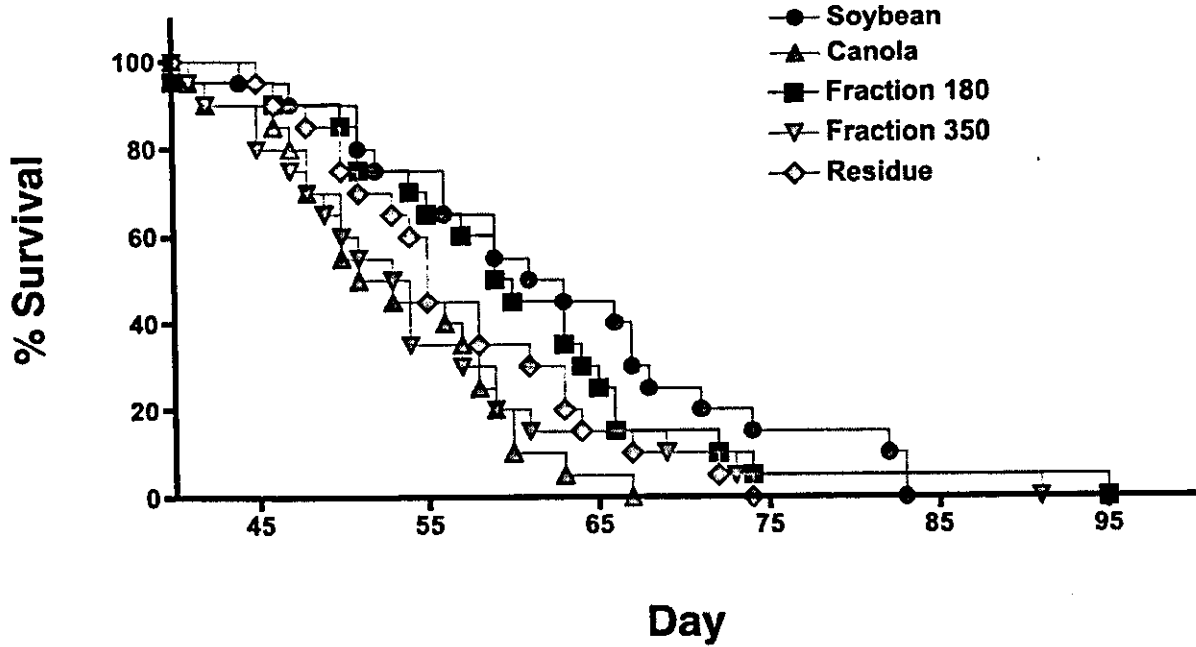


図2 カノーラ油分画を与えた SHRSP の生存日数

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、大豆油群；Canola、カノーラ油群；Fraction180 および Fraction350、カノーラ油の超臨界抽出180bar 分画および350bar 分画群；Residue、抽出残渣群。N=20。

表2 カノーラ油分画を与えたSHRSPの生存日数比較(図2参照)

Group	Median (day)		P value vs Soybean.	vs. Canola	Mean±S. E
Soybean	62		-----	0.0011#	63±3
			-----	0.0002#	
Canola	52	Log rank	0.0011†	-----	53±2*
		Wilcoxon	0.0002†	-----	
Fr. 180	60	Log rank	0.4428	0.0108#	61±3
		Wilcoxon	0.1079	0.0032#	
Fr. 350	54	Log rank	0.0893	0.5064	55±3
		Wilcoxon	0.0049†	0.2717	
Residue	55	Log rank	0.0475†	0.1123	57±2
		Wilcoxon	0.0117†	0.0101#	

Soybean、大豆油群；Canola、カノーラ油群；Fr. 180 および Fr. 350、カノーラ油の超臨界抽出 180bar 分画および 350bar分画群；Residue、抽出残渣群。

† 大豆油群に対して、# カノーラ油群に対して有意な差。

* p<0.05、大豆油群に対して有意な差(Dunnett's検定)。N=20。

表3 生存日数確認実験における死亡動物の剖検所見

	Soybean	Canola	Fr. 180	Fr. 350	Residue
Intracranial hemorrhage	18/20	18/20	12/20	17/20	14/20
Pulmonary edema	4/20	5/20	4/20	3/20	8/20
Congestive heart Pulmonary edema	1/20	2/20	3/20	3/20	5/20
<u>Without intracranial hemorrhage</u>					

Soybean、大豆油群；Canola、カノーラ油群；Fr. 180 および Fr. 350、カノーラ油の超臨界抽出 180bar 分画および 350bar 分画群；Residue、抽出残渣群。

各群 20 例中に、それぞれの所見が認められた個体の例数を示す。