

イーによって、展開溶媒：クロロホルム/メタノール/水（70:30:4, v/v）を用いて分離分析した。これを蛍光支持体である IP プレートに露出し、放射性物質を含むバンドをフルオロイメージアナライザー（FLA-2000, FUJIFILM）により検出・定量することによりトランスフェラーゼの活性を測定した。

#### ⑤ 培養細胞へのステリルグルコシド添加による HSP 誘導活性の測定

ヒト胎児由来正常繊維芽細胞株（TIG-3 細胞）、あるいは、ラット胃粘膜初代培養細胞の培地に、10  $\mu$ M の大豆レシチン由来ステリルグルコシド、あるいは  $\alpha$ -コレステリルグルコシドを添加し、一定時間処理した後、HSP70 の mRNA 量を RT-PCR 法、HSP70 タンパク質量をウェスタンブロットング法で定量した。

### C. 研究結果

#### ① ストレス潰瘍と生体内コレステリルグルコシド合成の関係

寒冷拘束ストレスを与えたラットから胃を摘出し、脂質を抽出して薄層クロマトグラフィーで分析した。その結果、図 1 に示すように、無刺激ラットに比べて、標準品  $\beta$ -コレステリルグルコシドに相当する脂質が蓄積していることが示された。

この脂質がコレステリルグルコシドであることを確認するため、質量分析（LC-ESI/MS）により解析した。ストレス負荷したラットの胃から、調製用 TLC を用いて目的脂質を部分精製して得られた標品から、 $m/z$  571 のイオンピークが観察された。この値は、有機合成した  $\beta$ -コレステリルグルコシドの分子イオンピークと完全に一致した。したがって、ラット胃において、寒冷拘束ストレスにより蓄積した脂質はコレステリルグルコシドであることが確認された。

次に、ラット 12 週令の胃からタンパク質を抽出し、その抽出液を酵素源として用いてコレステリルグルコシド合成活性を測定した。その結果、ラット胃の粗酵素溶液中に、UDP-[ $^{14}$ C]-グルコースからコレステロールへ [ $^{14}$ C]-グルコースを転移するグルコシルトランスフェラーゼ活性が存在することが示された（図 2）。酵素の性状解析の結果、至適 pH は 7.4、 $Mn^{2+}$  要求性の酵素であった。また、粗酵素溶液を遠心分離して、膜画分と細胞質画分に分けて、活性を測定した結果、膜画分のみ活性が検出され、コレステリルグルコシド合成酵素は膜に存在することが示唆された。

#### ② 培養細胞を用いた大豆由来ステリルグルコシドによる HSP の誘導活性

昨年度の結果で、大豆ステリルグルコシドをラットに経口投与すると、寒冷拘束ストレス潰瘍が軽減化（約 50% 抑制）されることを見いだした。一方で、我々は、有機合成したコレステリルグルコシドを経口投与した場合にも、寒冷拘束ストレス潰瘍が軽減化（70-80% 抑制）され、その際に、ストレスタンパク質の HSP70 が胃粘膜細胞内で誘導されていることを明らかにしている。したがって、大豆由来ステリルグルコシドの場合にも、その作用機序として HSP70 が誘導されている可能性を想定し、培養細胞系で大豆ステリルグルコシド添加による HSP70 の誘導能を検討した。

TIG-3 細胞、ラット胃粘膜初代培養細胞のいずれを用いた場合でも、 $\alpha$ -コレステリルグルコシドが 15 分から 30 分で HSP70 mRNA を誘導したのに対し、大豆レシチン由来ステリルグルコシドではほとんど変化がなかった（データは省略）。また、HSP70 タンパク質の量的な変化についても、 $\alpha$ -コレステリルグルコシドが 30 分後には誘導活性を示したのに比べ、大豆ステリルグルコシドでは誘導されなかった（データは省略）。したがって、大豆ステリルグルコシドによる抗ストレス潰瘍活性の発現は、HSP70 誘導を介さない、他の機構に基づくと考えられる。

### D. 考察

寒冷拘束ストレス依存的に、ラット胃においてコレステリルグルコシドが蓄積されることを見いだした。また、ラット胃ホモジネート中には、コレステリルグルコシドを生合成するグルコシルトランスフェラーゼが存在することも示された。一方、昨年度までの結果から、予め、ラットに有機合成したコレステリルグルコシドを経口投与しておく、潰瘍形成が軽減化されることを観察している。これらの知見は、ストレス潰瘍の形成時に、体内で合成されるコレステリルグルコシドが積極的に関わっており、外から投与されたコレステリルグルコシドがその作用を増強していることが考えられる。ストレスによって合成酵素が活性化される機構については、現在、まだ不明である。

ステリルグルコシドの抗潰瘍活性の作用機序としては、次の可能性が考えられた。すなわち、経口投与したステリルグルコシドが胃粘膜細胞に直接作用し、ストレスタンパク質 HSP70 を誘導することにより胃粘膜細胞に対して抗アポトーシス作用などを示す可能性である。し

かし、有機合成したコレステリルグルコシドはヒト正常線維芽細胞（TIG-3 細胞）において、効果的に HSP70 を誘導したのに対して、大豆由来ステリルグルコシドには HSP70 の誘導活性は見られなかった。したがって、大豆由来ステリルグルコシドの場合には、HSP70 を介さない別の機構があると思われる。グルコースの重合体にコレステロールが付加したコレステロールプルランには、それ自身に、タンパク質の変成を防ぐ分子シャペロン活性があるとの報告がある。植物由来のステリルグルコシドは、構造的にこのプルランと近似した会合体を形成する可能性が考えられる。そこで、大豆由来ステリルグルコシド自身のもつ分子シャペロン活性について、現在、解析中である。

今回得られた知見は、コレステリルグルコシドが細胞保護作用を示す新たな因子として働くことを示唆している。また、一方で、この細胞保護機構を攪乱するような化合物は、ストレス依存的な細胞傷害性を発揮することが予想される。今後は、食用油中に存在するステリルグルコシドやアシルステリルグルコシド成分の分析を行うとともに、経口投与量の検討や他の構造類似体での解析をさらに進めて行く必要がある。

#### E. 結論

今回の研究結果から、ラットの胃にコレステリルグルコシドが存在し、その量は、寒冷拘束

ストレス負荷によって増加することが示された。また、ラット胃ホモジネート中には、コレステリルグルコシドを合成する酵素活性が存在することも明らかとなった。細胞をストレスから防御する機構において、コレステリルグルコシドが重要な役割を演じていることが考えられる。また、大豆由来ステリルグルコシドにも抗ストレス胃潰瘍作用が見いだされたが、コレステリルグルコシドとは異なって HSP70 の活性化を介さないことが示された。細胞内ストレス応答の攪乱作用も含めて、その機構について、今後さらに解析される必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

小林哲幸、ストレス応答とステリルグルコシド、脂質栄養学、13: 36-43 (2004)

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

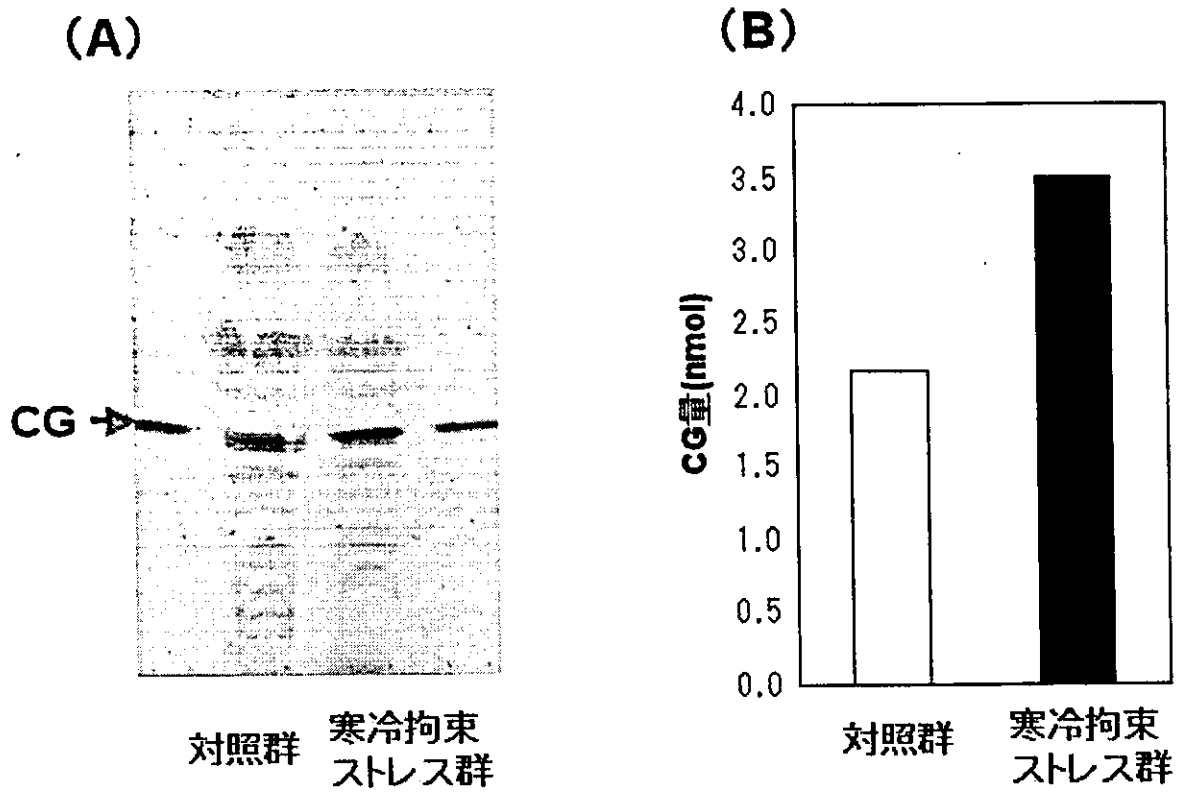


図1 寒冷拘束ストレスによるラット胃粘膜でのCG蓄積

(A)金属製拘束ケージに入れて4℃で2時間静置してストレスを与えたラットから胃を摘出し、Bligh & Dyer 法にて脂質を抽出した後、HPTLC を用いて脂質成分の分析を行った。糖の検出試薬であるオルシノール硫酸試薬で呈色した。CG: コレステリルグルコシド標準品。(B) コレステリルグルコシドに相当するスポットの濃さを、NIH Image1.62 を用いて画像解析により定量化した。

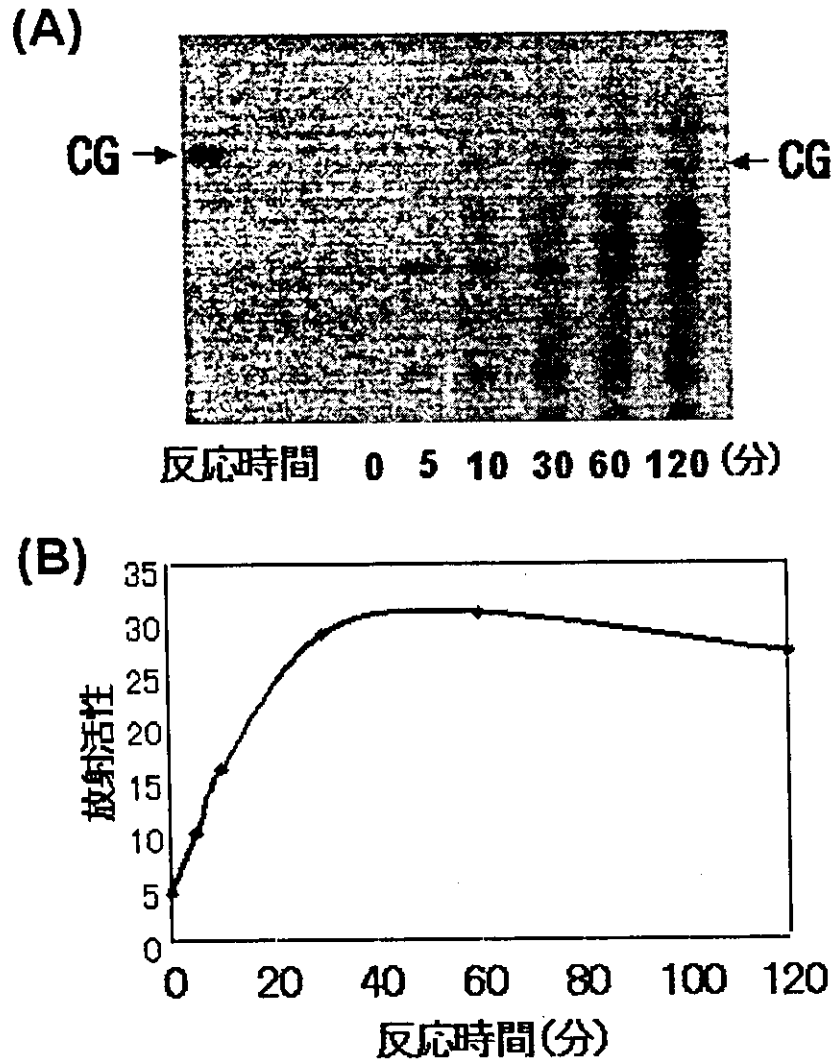


図2 ラット胃粘膜でのCG合成酵素活性

(A) ラット胃粘膜より調製した粗酵素液に、UDP- $[^{14}\text{C}]$ グルコース、および、コレステロールを基質として加え、各種緩衝液中、 $37^\circ\text{C}$ で反応させた。反応後、Bligh & Dyer 法によって脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーによって、展開溶媒：クロロホルム/メタノール/水 ((70:30:4, v/v)) を用いて分離分析した。これを蛍光支持体である IP プレートに露出し、放射性物質を含むバンドをフルオロイメージアナライザー (FLA-2000, FUJIFILM) により検出・定量した。CG：コレステリルグルコシド標準品。(B) パネルAのCG相当のスポットの濃度を定量化してプロットしたものの。

## カノーラ油の植物エストロゲンおよびアンドロゲン様作用の解析

分担研究者 井上 誠 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 助教授

### 【研究要旨】

カノーラ油が SHR ラットの寿命を短縮する原因を探るために、カノーラ油のエストロゲンおよびアンドロゲン様作用を、特に、臓器選択的エストロゲンおよびアンドロゲン受容体モジュレーター活性に焦点を絞り検討した。卵巣摘出 (OVX) した Wistar 系雌性ラットをカノーラ油含有飼料で 6 あるいは 10 週間飼育し、OVX による子宮重量の減少、脾臓、胸腺、骨髄 B 前駆細胞の増加に対する効果を調べた。その結果、カノーラ油はこれらの臓器における OVX による変化に影響を及ぼさなかった。すなわち、カノーラ油はエストロゲン様活性ならびに臓器選択的エストロゲン受容体モジュレーター活性を有さないことが明らかになった。次に、精巣摘出 (ORX) した Wistar 系雄性ラットをカノーラ油含有飼料で 6 週間飼育し、ORX による精囊重量の減少、胸腺重量、骨髄前駆 B 細胞の増加に対する効果を調べた。カノーラ油はこれらの ORX による変化を有意に抑制することはなかったが、カノーラ油含有飼料で飼育した正常ラットと同様に、骨髄 B 前駆細胞の増加傾向と胸腺重量の低下傾向を示した。また、正常ラットでは、カノーラ油含有飼料での飼育により精囊重量と脾臓重量の有意な低下を示した。これらの結果はカノーラ油が精囊、骨髄に対しては弱いながらも、血中アンドロゲンの低下作用あるいはアンドロゲン受容体のアンタゴニスト作用を有する可能性が考えられた。また、胸腺に対してはアンドロゲン様作用を有する可能性が考えられた。さらに、詳細は不明だがこれらの変化はアンドロゲン受容体アンタゴニストのフルタミドの作用と類似していた。以上の結果より、カノーラ油は臓器選択的なアンドロゲン受容体モジュレーター活性を有することが推察された。

### A. 研究目的

これまでにカノーラ油含有飼料で SHR-SP ラットを飼育することにより、ラットの寿命が有意に短縮することが明らかにされている [1, 2]。さらに、カノーラ油含有飼料での飼育は、1) 雄性ラットの前立腺重量を有意に低下させる、2) 血清、精巣中のテストステロン量を減少させる、3) 肝臓 5 $\alpha$ -Reductase mRNA を増加させることなどが報告されている。これらの結果は、それぞれ、1) アンドロゲンの減少あるいはアンドロゲン受容体アンタゴニストの存在、2) 植物エストロゲンによるテストステロン合成系の抑制、ジヒドロテストステロンの合成促進あるいはアンドロゲン様アゴニストによるフィードバック抑制、3) ジヒドロテストステロンによる上昇あるいはアンドロゲン様アゴニストによる活性化などで説明される。そこで、今回、カノーラ油による SHR-SP ラットの寿命短縮活性の作用機序を探る目的で、カノーラ油が植物エストロゲンあるいはア

ンドロゲン様作用、および、臓器選択的エストロゲンあるいはアンドロゲン受容体モジュレーター活性 [3, 4] を有する可能性を、卵巣あるいは精巣摘出ラットを用いて調べた。

### B. 研究方法

本学動物舎施設において SPF 環境下で飼育された雌性 Wistar ラット (4 週齢、一群 5 匹) の卵巣摘出 (OVX) をペントバルビタール麻酔下で行った。3 週間の通常飼育により手術の損傷より回復させた後、カノーラ含有飼料で 6 および 10 週間飼育した。エーテル麻酔下でラットを屠殺し、子宮、副腎を摘出し重量を測定後、液体窒素で凍結した。また、骨髄および脾臓細胞の Thy1, 2 陽性細胞 (T 細胞) と CD45/B220 陽性細胞 (成熟 B 細胞、未熟 B 細胞、プレ B 細胞 (B 前駆細胞)) をフローサイトメーターで測定した。子宮および副腎より TRIzol (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出し、RiverTra Ace- $\alpha$  (Toyobo) を用いて cDNA を作製し、以下の

プライマーを使用し半定量的 PCR を行った。

	センスプライマー	アンチセンスプライマー	生成物 (bp)
ラクトフェリン	5'-TGG GCA GAT AGA GTG TGA GTC-3'	5'-CTG GAA AGC CCC TGT ATA ACC-3'	483
血管内皮増殖因子	5'-TCG GAG AGC AAC GTC ACT ATG-3'	5'-GCA GGA ACA TTT ACA CGT CTG-3'	278
$\beta$ -アクトチン	5'-CCA ACC GTG AAA AGA TGA CCC A-3'	5'-AGC CAC CAA TCC ACA CAG AGT A-3'	629

精巣摘出 (ORX) ラットは SPF 環境下で飼育された雄性 Wistar ラット (5 週令、一群 5 匹) の精巣をペントバルビタール麻酔下で行った。手術の日よりカノーラ油含有飼料で飼育し、6 週間後に精囊、胸腺、脾臓の重量を測定し、骨髄および脾臓細胞の Thy1, 2 陽性細胞 (T 細胞) と CD45/B220 陽性細胞 (B 細胞) をフローサイトメーターで測定した。

### C. 研究結果および考察

#### 1) カノーラ油の植物エストロゲン様活性の検討

卵巣摘出ラットの子宮重量に及ぼす効果は、内分泌攪乱物質の毒性試験あるいはエストロゲン様物質の検索などに汎用されている。昨年度は Wistar 系雌性ラットに卵巣摘出術を施し、その 3 週間後よりカノーラ油含有飼料で 2 および 4 週間飼育したが、今年度は飼育期間を 6 および 10 週間に延長しカノーラ油の影響を検討した。ラットは麻酔下で屠殺した後、子宮重量を測定した。その結果、 $17\beta$ -エストラジオールを投与したラットでは著しい子宮重量の上昇が観察されたが、カノーラ油飼育群のラットの子宮重量は 10 週間の飼育後においてもコントロール群ラットの子宮重量と差はなかった。また、子宮のエストロゲン応答遺伝子であるラクトフェリンの mRNA レベルを測定したところ、カノーラ群とコントロール群の間に差は観察されなかった。これらの結果は、カノーラ油含有食餌は子宮に対するエストロゲン作用を示さないことが明らかになった。

#### 2) カノーラ油の臓器選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) 作用の解析

近年、エストロゲン受容体に  $ER\alpha$  と  $ER\beta$  が存在すること、それらの臓器、組織、さらに、細胞分布が異なること、従来から考えられてきた遺伝子の活性化を介さないシグナル伝達系が存在することなどが明らかになるにつれ、臓器選択的にエストロゲン活性を示す化合物の存在が示唆されている。さらに、

臓器によりアゴニストとして働いたり、アンタゴニストとして働いたりする臓器選択的エストロゲン受容体モジュレーターが知られている。そこで、カノーラ油が生殖器以外の臓器に対してエストロゲン活性あるいはエストロゲン受容体アンタゴニスト活性を示す可能性を検討した。OVX ラットでは、OVX により胸腺・脾臓重量の著しい増加が観察されること、さらに、骨髄の B 前駆細胞集団が著しく増加することが知られている。そこで、OVX ラットで観察される胸腺・脾臓・骨髄における変動に対するカノーラ油の効果を検討した。その結果、カノーラ油含有飼料での 6 週間、10 週間の飼育は、胸腺・脾臓重量の増加を低下させる作用は示さず、さらに、骨髄で増加した B 前駆細胞集団を減少させる作用も示さなかった。すなわち、カノーラ油には、生殖器のみならず、非生殖器臓器に対してもエストロゲン活性あるいはエストロゲン受容体アンタゴニスト様活性を示さないことが明らかになった。

#### 3) カノーラ油の臓器選択的アンドロゲン受容体モジュレーター (SARM) 作用の解析

Wistar 系雄性ラットに精巣摘出術 (ORX) を施し、手術日より 6 週間カノーラ油含有食餌で飼育した。ラットは麻酔下で屠殺した後、体重、精囊、胸腺、脾臓重量を測定し、さらに、骨髄、脾臓のリンパ球組成を OVX ラットでの実験と同様にフローサイトメーターで測定した。その結果、ORX ラットでは有意な体重減少が観察され、カノーラ油食餌飼育群でも同様な体重減少が見られた。また、ORX ラットでは著しい精囊重量の減少が見られ、カノーラ油食餌飼育群でも同様な減少が見られた。さらに、ORX を施していない正常ラットでもカノーラ油含有食餌で飼育することにより、統計的に有意な精囊重量の減少が観察された (Fig. 1)。ORX ラットの子宮では B 前駆細胞集団の増加傾向が見られ、正常ラットおよび ORX ラットをカノーラ油含有飼料で飼育することにより、統計的には有意ではないが B 前駆細胞集団数の平均値が増

加した。すなわち、精囊と骨髄に対するカノーラ油の影響は、ラットに ORX を施した際に観察される変化に類似していた。すなわち、これらの結果はカノーラ油が血中テストステロン、ジヒドロテストステロン濃度を低下させる作用を有すること、あるいは、アンドロゲン受容体のアンタゴニストが存在して

いる可能性を示している。

一方、ORX により増加した胸腺重量に及ぼすカノーラ油の影響を調べたところ、正常ラットおよび ORX ラットにおいてカノーラ油は胸腺重量を減少させる傾向を示した (Fig. 2)。

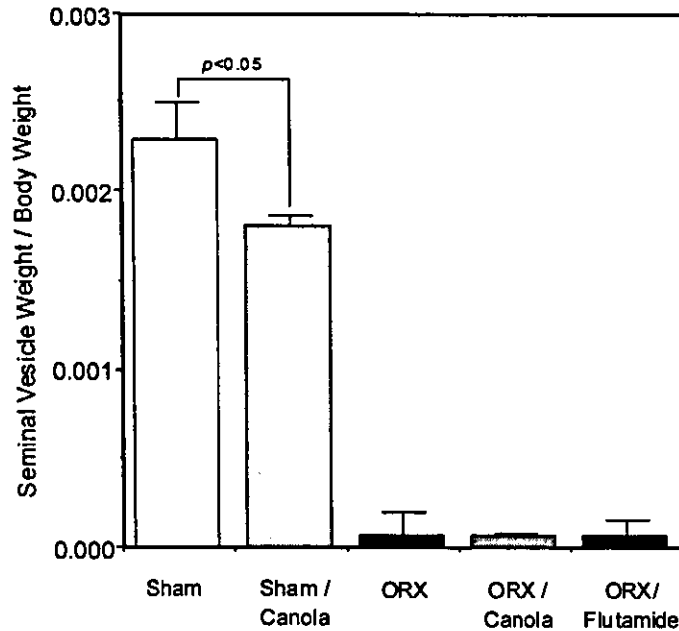


Fig. 1 Seminal vesicle weight of ORX rats fed a Canola-containing diet for 6 weeks. Values are means  $\pm$  SE of 5 rats. The data were analyzed by ANOVA followed by Bonferroni test.

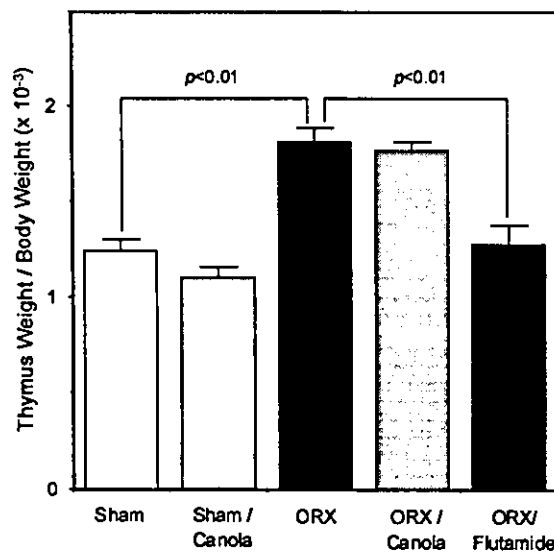


Fig. 2 Thymus weight of ORX rats fed a Canola-containing diet for 6 weeks. Values are means  $\pm$  SE of 5 rats. The data were analyzed by ANOVA followed by Bonferroni test.

また、アンドロゲン受容体のアンタゴニストであるフルタミドは ORX ラットで増加した胸腺重量を 1%の危険率で有意に減少させた。この実験において、フルタミドがどのような機序で作用しているかは不明であるが、カノーラ油中にアンドロゲン受容体のアンタゴニスト様の物質が含有されている可能性が考えられた。

次に、脾臓重量に及ぼす効果を検討したところ、ORX は脾臓重量に影響を与えなかったが、正常ラットをカノーラ油含有食餌で飼育したところ脾臓重量の有意な ( $p < 0.05$ ) 減少

が観察された (Fig. 3)。また、ORX ラットでもカノーラ油含有食餌での飼育により脾臓重量の減少傾向が、さらに、フルタミドの処理によっても脾臓重量の減少傾向が観察された。すなわち、脾臓に対してもカノーラ油はアンドロゲンアンタゴニストであるフルタミドと同様な作用を示し、ORX によるアンドロゲンの減少とは異なるアンドロゲン受容体のブロックによる作用機序を介している可能性が考えられた。

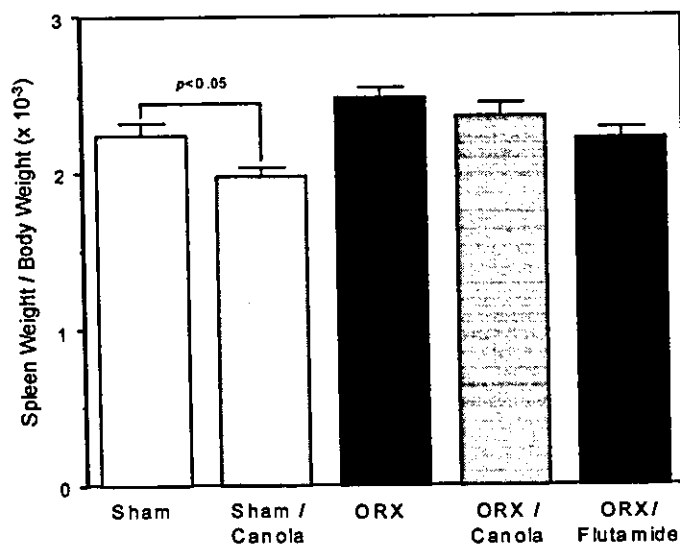


Fig. 3 Spleen weight of ORX rats fed a Canola-containing diet for 6 weeks. Values are means  $\pm$  SE of 5 rats. The data were analyzed by ANOVA followed by Bonferroni test.

#### D. 結論

1) OVX ラットを用いた実験より、カノーラ油はエストロゲン様活性および臓器選択的エストロゲン受容体モジュレーター活性は有していなかった。

2) ORX ラットを用いた実験より、カノーラ油は精囊・骨髄に対してはアンドロゲン受容体アンタゴニストあるいはアンドロゲン濃度低下活性を、胸腺に対してはアンドロゲン様活性を示し、臓器選択的アンドロゲン受容体モジュレーター活性を有している可能性が示された。しかし、それらの活性は極めて弱いものと思われた。

#### (参考文献)

1. Tatematsu K., Fuma S.Y., Nagase T., Ichikawa Y., Fujii Y., Okuyama H. (2004) Factors other than phytosterols in some

- vegetable oils affect the survival of SHRSP rats. Food Chem. Toxicol. 42, 1443-1451.
2. Tatematsu K., Fuma S.Y., Nagase T., Ichikawa Y., Fujii Y., Okuyama H. (2004) Dietary canola and soybean oil fed to SHRSP rat dams differently affect the growth and survival of their male pups. 134, 1347-1352.
3. Zhi L., Martinborough E. (2001) Selective androgen receptor modulators (SARMs). Annu. Rep. Med. Chem. 36, 169-180.
4. McDonnell D. (1999) The molecular pharmacology of SERMs. Trends Endocrinol. Metabol. 10, 301-311.

#### E. 健康危険情報

特になし。

#### F. 研究発表

1. 論文発表 なし。



2. 学会発表 なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし。
2. 実用新案登録 なし。
3. その他 なし。

## カノーラ油および大豆油添加飼料の給餌がマウスの回転かご運動量に及ぼす影響

分担研究者 渡辺志朗 富山医科薬科大学 助教授

### 【研究要旨】

カノーラ油および大豆油添加飼料をマウスに長期間与え、自発的な回転かご運動量と高架式十字迷路行動に及ぼす影響を調べた。しかしながらこれらの飼料の給餌を長期に行っても、マウスのこれらの行動には違いは観察されなかった。

### A. 研究目的

カノーラ油を含めた数種の食用油には脳卒中易発生高血圧ラットの脳卒中の発症や死亡を促進することが明らかになっている。これには脂肪酸以外の微量成分が関与していると考えられているが、いまだその原因物質は同定されていない。一方、以前の研究でカノーラ油を添加した飼料の長期的（8ヶ月）給餌により、マウスの回転かご運動（自発運動）量の増加、オープンフィールドにおける行動の増加、高架式十字迷路での行動の変化が観察された。そこでこれらの行動評価によりカノーラ油に含まれる有害因子の活性を検出し、その同定に寄与できると考えた。また比較的短い期間のカノーラ油の給餌でも、これらの行動変化を検出することができれば、有害因子の同定への時間を短縮できると考え、本研究を行った。

### B. 研究方法

4週齢の雌性 C57BL/6 マウスに菜種油および大豆油（対照群）を 10% (w/w) なるように添加した市販飼料（CE-2）を与えた。その後、4週間、8週間、5ヶ月後において、マウスを回転かごつきケージに個別に入れ、24時間の自発運動量を7日間に渡って測定した。また給餌7ヶ月後においてマウスの高架式十字迷路における行動（クローズドバーに入るまでの時間）を観察した。

（倫理面への配慮）

本研究における動物の飼育および処分の方法は富山医科薬科大学動物実験安全委員会における実験指針に準拠したものである。

### C. 研究結果

実験飼料を給餌し始めた直後、4週間、8週間および5ヶ月後における7日間の回転かご運動量は、カノーラ油と大豆油食群間で差は認められなかった（図1）。また給餌開始7ヶ月後における高架式十字迷路における行動についても、違いは認められなかった（図2）。

### D. 考察

以前にカノーラ油添加飼料の給餌がマウスの行動に影響を及ぼしたとする研究では、雄性 ddy マウスを用いていた。本研究では雌性 C57BL/6 マウスを用いたことが影響が出なかった理由である可能性は否定できない。またマウスの行動にまで影響を及ぼさないような状況でも、脳内での変化、たとえば神経伝達物質の遊離や遺伝子発現には影響を及ぼしていた可能性もある。今後研究を進める余地があるなら、これらの方面からのアプローチも必要であると考えられる。

### E. 結論

カノーラ油および大豆油添加飼料の長期間における給餌はマウスの回転かご運動量と高架式十字迷路行動には影響は及ぼさなかった。

### F. 健康危険情報

本研究の結果からは健康に対する危険性との関連を示すことは出来ない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shiro Watanabe, Satoko Kanada, Mizuki Takenaka, Tomohito Hamazaki, Dietary n-3 fatty acids attenuate LPS-induced behavioral depression in mice. *Physiol. Behav.* 81, 605-613, 2004

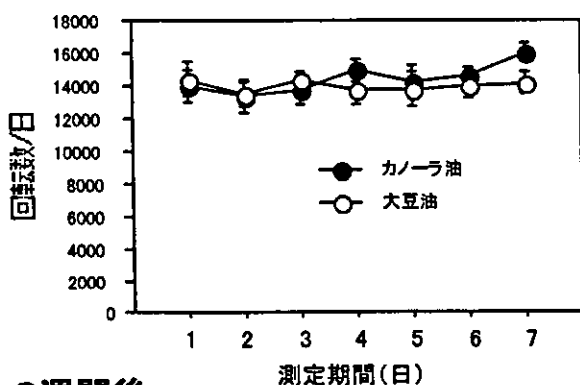
Masaru Doshi, Shiro Watanabe, Tsuyoshi Niimoto, Hiroshi Kawashima, Yoshiyuki Ishikura, Yoshinobu Kiso Tomohito Hamazaki, *Biol. Pharm. Bull.* 27, 319-323, 2004

2. 学会発表  
なし

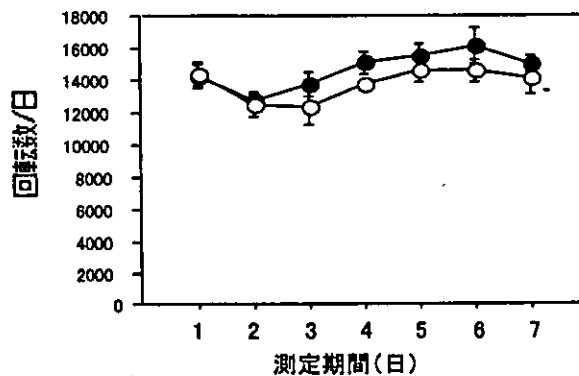
H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

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

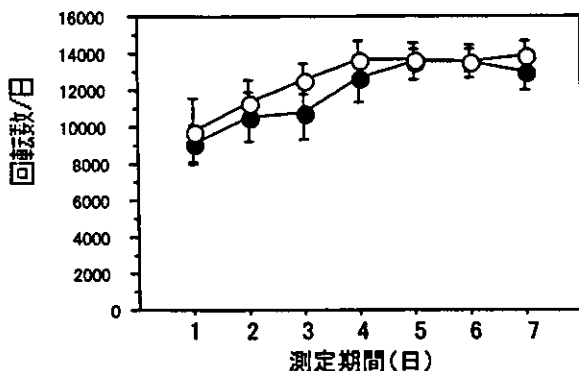
給餌開始直後



4週間後



8週間後



5ヶ月後

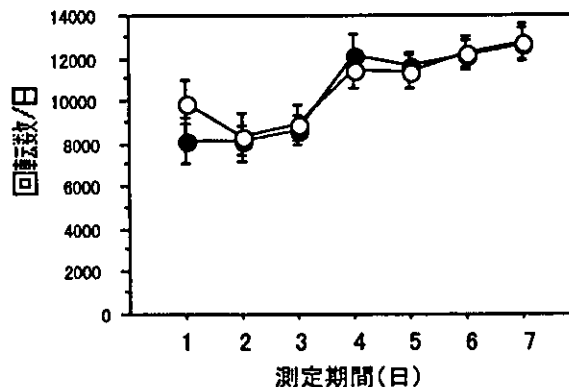


図1 カノーラ油および大豆油添加食の給餌がマウスの回転かご運動に及ぼす影響

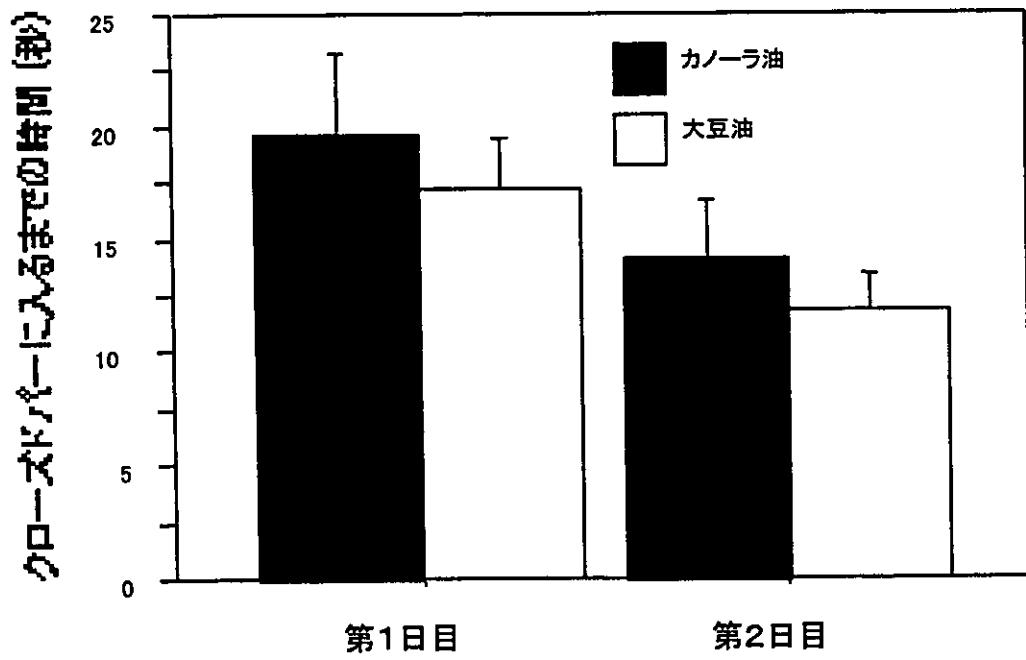


図2 カノーラ油および大豆油添加食の給餌が高架式十迷路行動に及ぼす影響

## オリーブ油ならびにその分子蒸留画分が食塩負荷 SHRSP の寿命に及ぼす影響

分担研究者 小川 博 近畿大学医学部衛生学教室 講師  
協力研究者 山本和夫 近畿大学医学部基礎医学教室、  
伊藤浩行 近畿大学医学部病理学教室

### 【研究要旨】

植物性油脂中の植物ステロール含量高値が食塩負荷脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) の寿命を短縮する因子の一つである可能性が高まっている。しかし、一方では、植物ステロール含量が低い植物性油脂においても、食塩負荷 SHRSP の寿命に与える影響が異なることが報告されている。そこで本実験では、植物ステロール含量が低いオリーブ油に着目し、オリーブ油ならびにその分子蒸留画分が食塩負荷 SHRSP の血圧、脳卒中発症、寿命に及ぼす影響について、大豆油を対照とし比較検討を行った。

オリーブ油は、大豆油と比較し有意ではないが、寿命短縮傾向が観察され、これまでの報告と類似した結果を示した。オリーブ油分子蒸留画分では、蒸留画分において、脳血管障害発症までの期間および発症後死亡までの期間の短縮作用、残留画分では、発症後死亡までの期間の短縮作用が観察された。従って、これらの画分には食塩負荷 SHRSP の寿命短縮作用に関与する有害因子の存在が強く示唆される。しかし、現在の所、有害因子の詳細に関しては全く不明であり、今後はこれらの画分を更に分画して検討を進める必要があると考える。また、捕集画分に関しては寿命短縮作用は観察されず、捕集画分に有害因子が存在する可能性は低いと考えられた。

### A. 研究目的

植物性油脂は動物性油脂と比較し、多価不飽和脂肪酸含量が比較的高く、良好な脂肪酸組成を示すものが多いことから、食用油脂として広く使用されている。しかし、近年、SHRSP をモデル動物として用いた実験において、摂取植物性油脂の違いにより食塩負荷 SHRSP の寿命が異なることが報告された<sup>1) - 5)</sup>。さらに、Ratnayake *et al.*<sup>6) - 7)</sup> は、同様な食塩負荷 SHRSP での各種油脂類やブレンド油脂摂取実験において、カノーラ油、低硫黄カノーラ油の寿命の短縮作用は、吸収された植物ステロールが臓器、さらには赤血球に蓄積し赤血球の変形能低下や流動性低下をきたすのが主因としている。また、我々は<sup>8)</sup>、大豆油にカノーラ油と同程度となるよう植物ステロールを添加すると、添加量に依存して寿命短縮作用の発現が観察されるが、カノーラ油ほどの寿命短縮作用はなく、約5倍量添加した場合にカノーラ油とほぼ同等であったことを報告した。さらに、食塩負荷 SHRSP におけるこの植物ステロールによる

寿命短縮作用には、SHRSP 特異的な ATP-binding cassette transporter (ABC) G5, G8 遺伝子変異が関与していることが示唆されている<sup>9)</sup>。

このように食事、特に植物性油脂中の植物ステロール含量が本態性高血圧症のモデル動物とされる SHRSP の寿命に影響を与える因子の一つである可能性が高まっている。しかし、一方では、植物ステロール含量が低い植物性油脂においても、食塩負荷 SHRSP の寿命に与える影響が異なることが報告されている<sup>1) - 5)</sup>。そこで本実験では、植物ステロール含量が低いオリーブ油に着目し、オリーブ油ならびにその分子蒸留画分が食塩負荷 SHRSP の血圧、脳卒中発症、寿命に与える影響について、大豆油を対照とし比較検討を行った。

### B. 研究方法

実験飼料調製のためのミルクカゼイン、コーンスターチ、 $\alpha$ -コーンスターチ、AIN-93G ミネラル混合物、AIN-93 ビタミン混合物は、日本クレア (株) より購入し

た。研究用試薬は和光純薬（株）より購入し、特級を使用した。実験用飼料は、ミルクカゼインを蛋白源（20%）とする AIN-93 組成<sup>10)</sup> に準拠した純化飼料を基本とし、飼料中に重量比で 3% の NaCl を添加した。油脂源（10%）として、大豆油群（Soybean）には大豆油（味の素（株））、オリーブ油群（Olive）にはオリーブ油（味の素（株））を用いた。分子蒸留画分は、いずれも蒸留前の含量と同一となるよう上記大豆油で希釈し混合油として用いた。この際、蒸留画分と捕集画分は収率が 50% と仮定して希釈を行った。すなわち、油脂源（10%）として、残留部群（Residuum）には残留画分混合油、蒸留部群（Distillate）には蒸留画分混合油、捕集部群（Cold trap）には捕集画分混合油を使用した。さらに、ビタミン E 混合物（ET-840、ホーネン（株））添加により、各種油脂群の総トコフェロール含量は同じとなるように調整したが、植物ステロール含量は何れも低いため調整は行わなかった。各実験飼料組成を Table 1 に示した。なお、オリーブ油の分子蒸留画分の収量は、残留画分（91.3%）、蒸留画分（5.4%）、捕集画分（0.004%）であり、各画分のトコフェロール含量を Table 2、植物ステロール含量を Table 3、脂肪酸含量を Table 4 に示した（いずれも名古屋市立大学大学院薬学研究科 奥山研究室分析値）。実験動物は 4 週齢の雄性 SHRSP/Izm（日本エスエルシー（株）より購入）を 1 週間馴化後、5 週齢より実験に供与した。そして、1 群 8 匹（1 ケージあたり 2 匹ずつ）とし、22.0 ± 2.0°C、湿度 55.0 ± 5.0%、12 時間の明暗（明期は AM 7:00 ~ PM 7:00、暗期は PM 7:00 ~ AM 7:00）切り替えで飼育を行った。飼料は飲水（水道水）とともに自由摂取させ、1 日おきに体重、飼料摂取量を測定した。なお、本動物実験は、「近畿大学医学部動物実験の指針」に則って実施した。頻繁な血圧測定は脳卒中発症への影響が懸念されるため、血圧測定は実験開始より 4 週間後のみに行った。そして、測定日の午前中に、45°C に設定した加温器中であらかじめラットを 5 分程加温した後、ホルダーに固定し、Tail-pulse pickup 法

（Softron BP-98A、ソフトロン（株））にて無麻酔下非観血的に測定した。脳卒中発症は、特有な神経症状（片麻痺、行動異常、半身不随症状等）、急激な体重減少、飼料摂取量の減少により判断した<sup>11) - 13)</sup>。また、死亡ラットは剖検を行い、脳血管障害発症の確認を行うと共に、主要臓器の比重量を測定した。結果は平均値 ± 標準偏差ないし標準誤差で示した。脳卒中発症までの期間、発症より死亡までの期間および生存期間の統計学的解析は、ノンパラメトリックとして扱い Log-Rank 法、Wilcoxon 法にて行った。また、その他の場合は、2 群間の比較には Student's t-test で、多群間の比較では One-way ANOVA で解析し、post-hoc test として Tukey-Kramer 法で検定した。そして、 $p < 0.05$  の場合を有意差ありと判定した。統計ソフトは Stat View (ver. 5, SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用した。

### C. 研究結果

脳卒中未発症期間（いずれかの実験群において最初に 1 匹が発症するまでの期間、摂取 36 日目まで）における飼料摂取量および成長曲線は、5 群間に差は認められず、何れの群においても順調な生育が認められた。しかし、脳卒中発症後には、多くの個体に飼料摂取量、体重の急激な減少が認められた（Fig. 1, 2）。

血圧測定は各個体へのストレス負荷が大きく、頻繁な測定は脳卒中発症への影響が懸念されるため、実験開始 4 週間後のみに行った。実験開始 4 週間後の最高血圧（Fig. 3）および脈拍数も 5 群間に差はほとんど認められなかった。

脳卒中発症までの期間（Fig. 4）は、蒸留部群が最も短く、残留部群、捕集部群、オリーブ油群、大豆油群の順に延長が認められた。そして、蒸留部群では、オリーブ油群、大豆油群と比べ、有意な短縮が認められた。脳卒中発症後死亡に至るまでの期間（Fig. 5）は、蒸留部群が最も短く、残留部群もかなり短縮された。一方、オリーブ油群、捕集部群、大豆油群の順に延長が認められた。そして、蒸留部群では、捕集部群、大豆油群と比べ、有意な短縮が認められた。従って、実験開始よりの生存期間

(Fig. 6) および寿命 (Fig. 7) は、蒸留部群が最も短く、残留部群もかなり短縮された。そして蒸留部群では、オリーブ油群、捕集部群、大豆油群と比べ、有意な短縮が認められ、残留部群では大豆油群と比べ、有意な短縮が認められた。

死亡後の剖検では脳出血と脳浮腫・脳梗塞が混在する個体が多く認められ、脳血管障害の種類に関しては各群間で顕著な差が無かった。また脳血管障害発症率はいずれの群においても100%であった。また、主要臓器の比重量 (Table 5) では、脳比重量において蒸留部群が捕集部群に対し有意な低値を示したが、両群ともその他の群との差は認められなかった。その他、心臓、左右の腎臓の比重量に関しては5群間に差は認められなかった。

#### D. 考察

いずれかの群の1例が脳卒中を発症するまでの期間 (摂取36日目) までの飼料摂取量、成長曲線は各群間に差はなく、何れの群も順調に生育が認められており、飼料摂取量の違いが脳卒中発症に関与した可能性は考えられない。さらに、実験飼料摂取4週間後の最高血圧および脈拍数も5群間に差はほとんど認められず、最高血圧への影響が脳卒中発症に関与した可能性も低いと考えられる。

脳卒中発症への影響をみると、蒸留部群では、オリーブ油群、大豆油群と比べ、有意な短縮が認められていることから、蒸留画分に食塩負荷SHRSPの寿命短縮作用に関与する有害因子が存在する (濃縮されている) 可能性が考えられる。次に、脳卒中発症後死亡に至るまでの期間でも、蒸留部群が最も短く、捕集部群、大豆油群と比べ、有意な短縮が認められており、蒸留画分には食塩負荷SHRSPの脳卒中発症および脳卒中発症後死亡に至るまでの期間を短縮する有害因子の存在が示唆された。更に、脳卒中発症後死亡に至るまでの期間においては、残留部群でも大豆油群と比べ有意ではないがかなりの短縮傾向 ( $p < 0.06$ ) が認められており、何らかの有害因子が存在している可能性が考えられる。従って、実験開始よりの生存期間、寿命も、蒸留部群が最も短く、次いで残留部群の順に短縮さ

れた。そして、蒸留部群、残留部群ともに大豆油群と比べ有意な短縮が認められていることから、上記のように、蒸留画分と残留画分には有害因子の存在が強く示唆される。最も寿命短縮作用が強かった蒸留部群に関しては、実験飼料中の植物ステロール含量が比較的高いが、これまでに報告されたカノーラ油等における含量<sup>8)</sup>と比較し低値であり、寿命短縮作用に関与した可能性は低いと考えられる。

以上のことから、蒸留画分と残留画分に存在が示唆される有害因子は恐らく異なる未知の因子と考えられるが、詳細に関しては全く不明であり、今後はこれらの画分を更に分画して検討を進める必要があると考える。また、今回捕集部群に関しては寿命短縮作用は観察されなかった。捕集画分は大豆油で希釈しており、大豆油と類似した結果が得られたことから、捕集画分に有害因子が存在する可能性は低いと考えられた。

#### E. 結論

オリーブ油摂取は、大豆油と比較し、有意ではないが食塩負荷SHRSPの寿命短縮傾向が認められた。さらに、オリーブ油分子蒸留画分では、蒸留部群、残留部群の順に、寿命短縮作用が観察され、いずれも大豆油群と比較し有意であった。従って、蒸留画分と残留画分には食塩負荷SHRSPの寿命短縮作用に関与する有害因子の存在が強く示唆されるが、詳細に関しては全く不明であり、今後はこれらの画分を更に分画して検討を進める必要があると考える。また、捕集部に関しては寿命短縮作用は観察されず有害因子が存在する可能性は低いと考えられた。

#### F. 健康危険情報

食塩負荷SHRSPを用いた研究において、オリーブ油摂取は寿命短縮作用がある事が報告されている。さらに、オリーブ油を分子蒸留すると蒸留画分、残留画分に、明らかな寿命短縮作用が認められ、食塩負荷SHRSPにおける有害作用が確認される結果となった。この結果をそのままヒトに外挿する事はできないが、少なくともオリーブ油の摂取に対しある程度の注意を払う必

要があると考える。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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

#### [参考論文]

1. 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.
2. 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.
3. Miyazaki, M., Huang, M. Z., Watanabe, S., Kobayashi, T. & 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., Huang, M. Z., Takemura, N., Watanabe, S. & 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. Miyazaki, M., Takemura, N., Watanabe, S., Hata, N., Misawa, Y. & 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.
6. Ratnayake, W. M., Plouffe, L., Hollywood, R., L'Abbe, M. R., Hidioglou, N., Sarwar, G. & Mueller, R. (2000) Influence of sources of dietary oils on the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipids* 35: 409-420.
7. 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.
8. Ogawa, H., Yamamoto, K., Kamisako, T. & 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.
9. Scoggan, K.A., Gruber, H. & Lariviere, K. (2003) A missense mutation in the rat *Abcg5* gene causes phytosterolemia in stroke-prone spontaneously hypertensive (SHRSP), spontaneously hypertensive (SHR), and normotensive (WKY inbred) rats. *J. Lipid Res.* 44: 911-916.
10. Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C. Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123: 1939-1951.
11. Takahashi, M., Fritz-Zieroth, B., Chikugo, T. & Ogawa, H. (1993) Differentiation of chronic lesions after stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats using diffusion weighted MRI. *Magn. Reson. Med.* 30: 485-488.
12. Takahashi, M., Fritz-Zieroth, B., Chikugo, T. & Ogawa, H. (1994) In vivo differentiation of edematous changes after stroke in spontaneously hypertensive rats using diffusion weighted MRI. *Acta Neurochir. (Suppl.)* 60: 224-227.
13. Takahashi, M., Fritz-Zieroth, B., Ohta, Y. & Chikugo, T. (1994) Therapeutic effects of imidapril on cerebral lesions observed by magnetic resonance imaging in malignant stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 12: 761-768.



**Table 1 Composition of the experimental diets (weight %)**

<b>Ingredients</b>	<b>Soybean</b>	<b>Olive</b>	<b>Residuum</b>	<b>Distillate</b>	<b>Cold trap</b>
Soybean oil	10.00	—	0.87	8.92	10.00
Olive oil	—	10.00	—	—	—
Residuum fraction	—	—	9.13	—	—
Distillate fraction	—	—	—	1.08	—
Cold trap fraction	—	—	—	—	0.008
Vitamin E mixture	—	0.008	0.01	—	—
Milk casein	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Corn starch	33.75	33.75	33.75	33.75	33.75
$\alpha$ -Corn starch	13.20	13.20	13.20	13.20	13.20
Sucrose	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Cellulose	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Mineral mixture *	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
Vitamin mixture *	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
L-Cystine	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Sodium chloride	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Phytosterol (mg/100g oil)	346	135	67.5	474	346

\*: American Institute of Nutrition 93G formula

**Table 2 Tocopherol content of the test oils (mg/kg oil)**

	<b>Soybean</b>	<b>Olive</b>	<b>Residuum</b>	<b>Distillate</b>	<b>Cold trap</b>
$\alpha$	102.2 $\pm$ 0.9	171.5 $\pm$ 3.3	12.7 $\pm$ 0.0	1456 $\pm$ 11	2668 $\pm$ 33
$\beta$	525.7 $\pm$ 3.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	39.6 $\pm$ 0.7
$\gamma$	185.4 $\pm$ 1.5	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	178.3 $\pm$ 2.0	179.5 $\pm$ 1.6
$\delta$	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	91.4 $\pm$ 1.3

Values are the mean  $\pm$  standard deviation.

**Table 3 Sterol content of the test oils (mg/100 g oil)**

	Soybean	Olive	Residuum	Distillate	Cold trap
Cholesterol	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	N. D.
Brassicasterol	0.76 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.48 ± 0.01	N. D.
Campesterol	73.71 ± 0.03	6.16 ± 0.01	2.32 ± 0.00	83.41 ± 0.01	N. D.
Stigmasterol	65.14 ± 0.03	1.78 ± 0.00	0.00 ± 0.00	25.99 ± 0.01	N. D.
$\beta$ - Sitosterol	206.2 ± 0.18	126.7 ± 0.10	37.47 ± 0.01	1513 ± 0.30	N. D.
Phytosterol	345.8 ± 0.25	134.7 ± 0.12	39.79 ± 0.01	1623 ± 0.32	N. D.

N. D.: Not determined.

Values are the mean ± standard deviation.

**Table 4 Fatty acid composition of the test oils (%)**

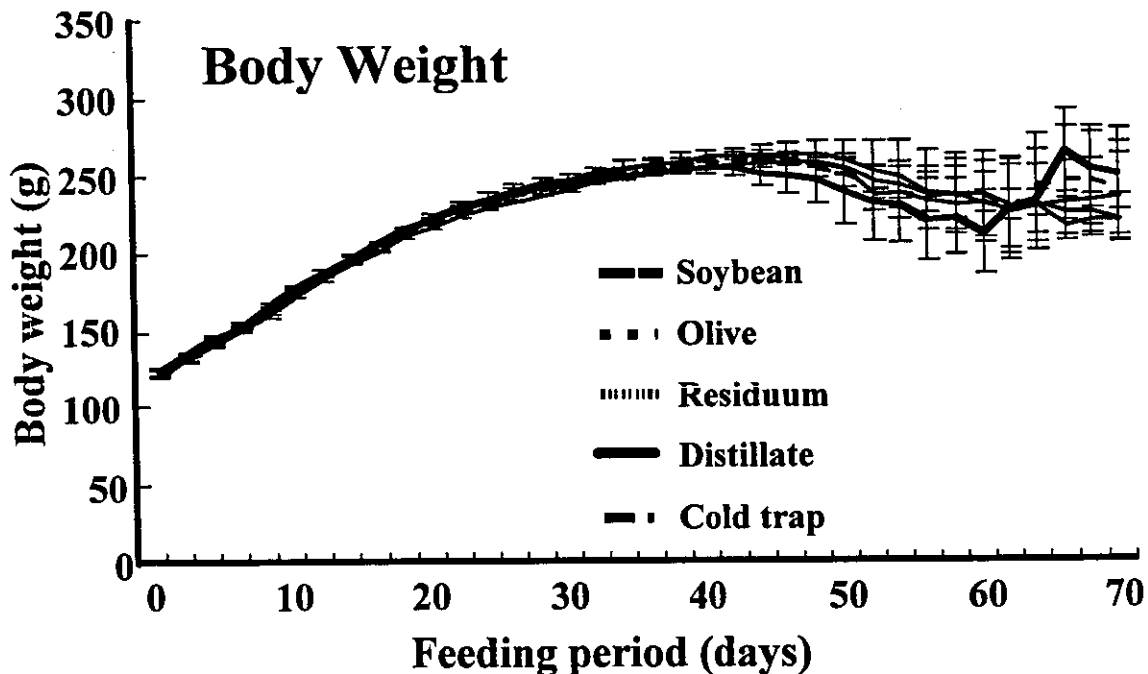
	Soybean	Olive	Residuum	Distillate	Cold trap
16:0	9.78 ± 0.34	11.09 ± 0.21	10.93 ± 0.13	14.42 ± 0.04	35.13 ± 0.05
16:1	0.03 ± 0.04	0.76 ± 0.01	0.74 ± 0.00	1.10 ± 0.00	2.88 ± 0.10
18:0	3.74 ± 0.08	2.31 ± 0.05	2.36 ± 0.02	2.05 ± 0.22	1.38 ± 0.00
18:1n-9	23.40 ± 0.06	75.79 ± 0.12	75.93 ± 0.13	71.97 ± 0.06	52.46 ± 0.33
18:2n-6	55.86 ± 0.43	8.72 ± 0.04	8.62 ± 0.08	9.32 ± 0.06	5.45 ± 0.02
18:3n-3	6.32 ± 0.18	0.58 ± 0.04	0.59 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.38 ± 0.03
20:0	0.34 ± 0.02	0.37 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.26 ± 0.00	0.00 ± 0.00
20:1	0.09 ± 0.13	0.25 ± 0.00	0.25 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.00 ± 0.00
22:0	0.37 ± 0.01	0.03 ± 0.04	0.05 ± 0.00	0.09 ± 0.03	0.00 ± 0.00
SFA	14.30 ± 0.50	13.80 ± 0.19	13.72 ± 0.16	16.81 ± 0.15	38.83 ± 0.21
MUFA	23.52 ± 0.11	76.91 ± 0.11	77.07 ± 0.07	73.30 ± 0.08	55.34 ± 0.22
n-6 PUFA	55.86 ± 0.43	8.72 ± 0.04	8.62 ± 0.08	9.32 ± 0.06	5.45 ± 0.02
n-3 PUFA	6.32 ± 0.18	0.58 ± 0.04	0.59 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.38 ± 0.03
n-6/n-3 ratio	8.84 ± 0.18	15.15 ± 0.97	14.52 ± 0.16	16.34 ± 0.05	14.50 ± 1.01
amount (mg/g)	957.17 ± 22.75	942.21 ± 33.13	927.37 ± 26.18	949.39 ± 21.04	74.03 ± 0.75

Values are the mean ± standard deviation.

**Table 5** Relative weight of various organs [g/Body weight (g) x 100]

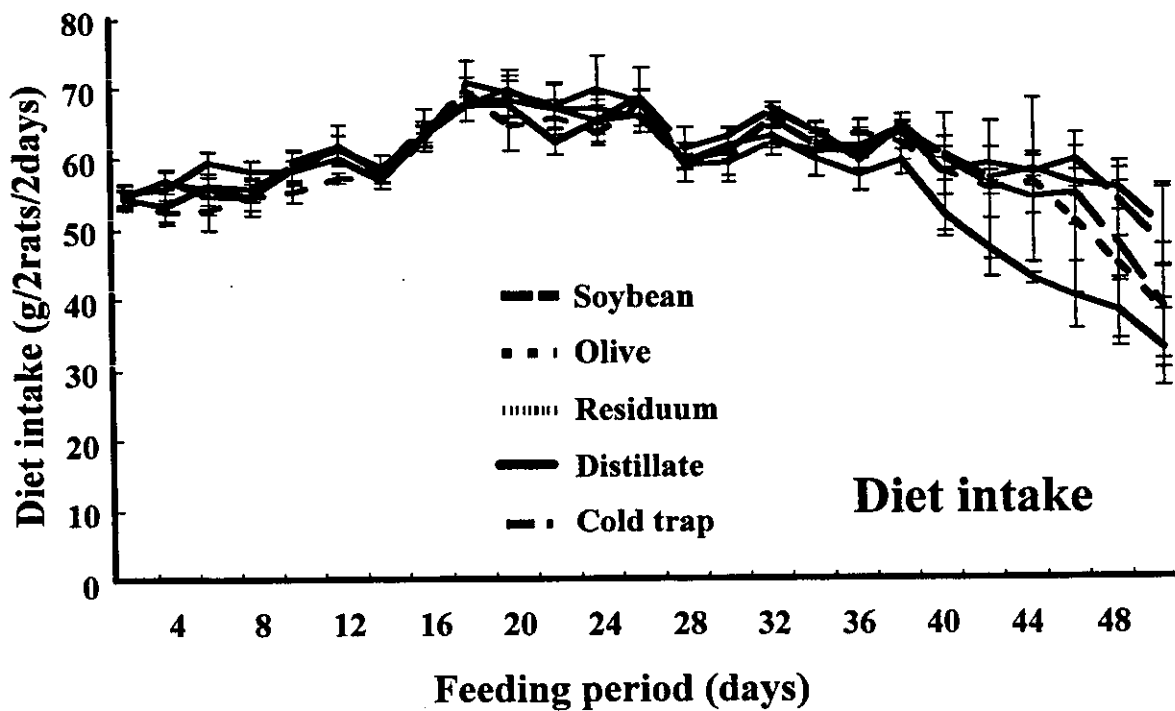
	Soybean	Olive	Residuum	Distillate	Cold trap
Brain	1.35 ± 0.21 <sup>a,b</sup>	1.49 ± 0.18 <sup>a,b</sup>	1.39 ± 0.18 <sup>a,b</sup>	1.26 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.69 ± 0.13 <sup>b</sup>
Heart	0.90 ± 0.10	0.80 ± 0.05	0.68 ± 0.05	0.71 ± 0.04	0.76 ± 0.05
Kidney (R)	0.64 ± 0.03	0.60 ± 0.02	0.57 ± 0.03	0.61 ± 0.03	0.66 ± 0.05
Kidney (L)	0.62 ± 0.03	0.60 ± 0.02	0.57 ± 0.04	0.62 ± 0.03	0.65 ± 0.04

Data are the mean ± standard error of the mean (n=8 in each group).  
 Values not sharing common superscript letter are significantly different at p<0.05 with Tukey-Kramer test.



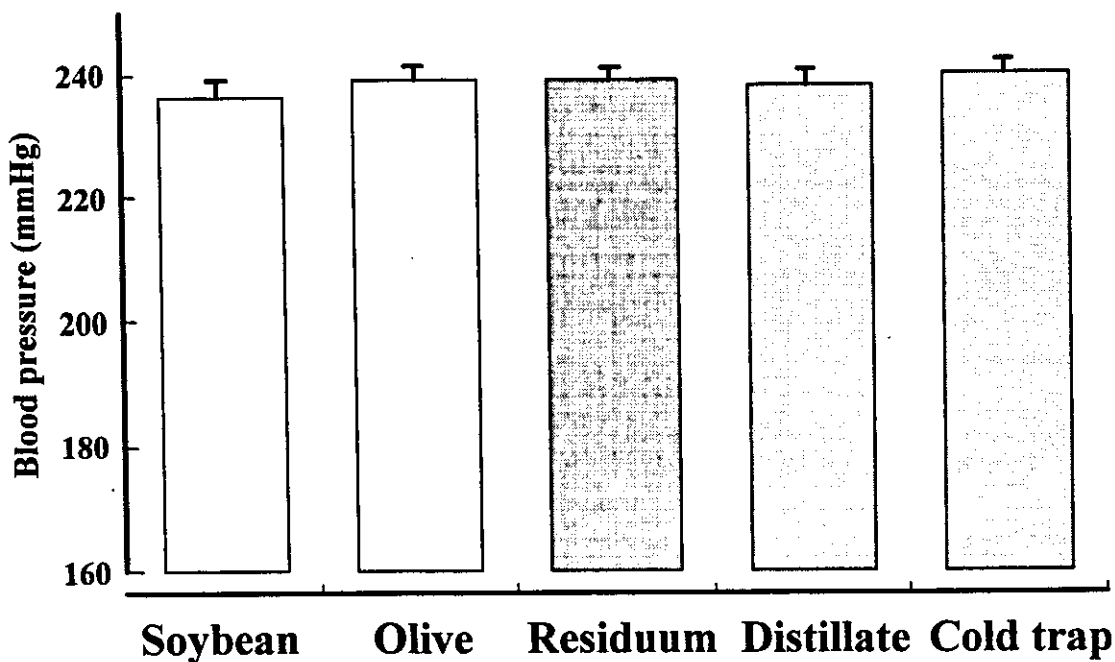
**Fig. 1** Change in body weight of the salt-loaded SHRSP until 70-day-feeding

Data are the mean ± standard error of the mean (n=8 in each group).



**Fig. 2 Change in diet intake of the salt-loaded SHRSP until 50-day-feeding**

Data are the mean  $\pm$  standard error of the mean (n=8 in each group).



**Fig. 3 Systolic blood pressure of the experimental groups after 4-week-feeding**

Data are the mean  $\pm$  standard error of the mean (n=8 in each group).