

Fig. 2. Correlation between PS content in diet and relative survival time. (A) A conventional strain of SHRSP rats was used under 1% NaCl loading or with tap water as drinking water. The survival times for high-oleic safflower oil (HO-Saf), high-linoleic safflower oil (HL-Saf), olive oil (Olv), evening primrose oil (Epo), perilla oil (Per), soybean oil (Soy) and canola oil (Can) were cited from Huang et al. (1997), and that of hydrogenated soybean oil (Hyd.Soy) was taken from Miyazaki et al. (1998b). There were 11–12 rats in each group except for the HL-Saf ( $n = 7$ ) group, and the mean survival time of the Soy group was set at 1 to calculate the relative survival times. The range of relative survival times of Can group among different sets of experiments is shown by a horizontal bar. PS content was expressed as mg total phytosterol/100 g of diet. Pearson's correlation factors were  $r = -0.245$  and  $p = 0.558$ . (B) A SPF strain of the SHRSP rat was used under 0.5% NaCl loading (present data). Pearson's correlation factors were  $r = 0.261$  and  $p = 0.508$ .

campesterol and  $\beta$ -sitosterol contents were similar to those in the liver, and tissue PS contents did not correlate with the survival times of these dietary groups (Table 6). The survival times of the basal (CE-2) diet and Soy diet groups were similar (data not shown) while the PS content of the latter was 60% greater (Table 3).

Because the decreased tissue vitamin E content in piglets raised on a Can diet compared with that in piglets raised on a Soy diet had been reported (Sauer et al., 1997), hepatic  $\alpha$ -tocopherol level was compared between the rats fed the Can, the Hyd.Soy and the Soy diets. Although the survival time was significantly shorter for the Can and Hyd.Soy groups than for the Soy group

(Fig. 2A), the hepatic  $\alpha$ -tocopherol levels ( $\mu\text{g/g}$  liver) were  $1.18 \pm 0.14$  (Can group),  $0.86 \pm 0.16$  (Hyd.Soy group) and  $0.92 \pm 0.19$  (Soy group), indicating that survival time does not correlate with hepatic  $\alpha$ -tocopherol level.

#### 4. Discussion

Phytosterols (PSs) are well known for their hypocholesterolemic activities (Nguyen, 1999), and anti-atherogenic (Moghadasian and Frohlich, 1999; Hallikaine et al., 2000) as well as anti-carcinogenic activities (Awad and Fink, 2000) have been proposed. The safety of PSs appears to have been confirmed in many studies (Whittaker et al., 1999; Wolfreys and Hepburn, 2002; Turnbull et al., 1999). However, Ratnayake's group proposed that PSs are involved, at least in part, in the survival-shortening activity of some vegetable oils observed in SHRSP rats (Ratnayake et al., 2000a,b). This proposal was based mainly on observations that PS content in oils (except for olive oil) negatively correlated with the mean survival time, and that a re-crystallized preparation of PS from Can exhibited the survival-shortening activity at a concentration twofold higher than the level observed in the Can diet. The SHRSP rat, as well as its parent WKY rat, is a strain that develops phytosterolemia more easily than other rat strains (Wistar, WKA) (Ikeda et al., 2001), due to a mutation in the ABCG5/8 transporter gene (Scoggan et al., 2003). The cholesterol synthesis activity is relatively low in the SHRSP rat (Sawamura et al., 1992), and supplementation with cholesterol extended the survival of SHRSP rats (Hamano et al., 1995). If the survival-shortening activity of some vegetable oils is confined to this specific animal strain, the physiological impacts of the observed unfavorable effects of some vegetable oils on human nutrition may be extremely limited, although possible unfavorable effects of PS have been suggested in non-phytosterolemic human subjects (Joki et al., 2003; Sudhop et al., 2002; Rajaratnum et al., 2000).

We confirmed that the added PS at a level twofold higher than that in the Can diet shortened the survival time of the Soy group (Ratnayake et al., 2000a), but not to the extent exhibited by the Can diet (Fig. 1B). Furthermore, no significant correlation was observed between relative survival time and PS levels in the diet and tissue lipids (Fig. 1 and Table 4). While revising the manuscript, Ogawa et al. (2003) reported that a fivefold higher amount of phytosterol is required to produce an effect equivalent to the survival-shortening effect of the Can diet. Our data (Fig. 2B), together with the observations by Ogawa et al. (2003) support the conclusion that major PS contents in diets and tissues cannot account for the observed survival-shortening activity of vegetable oils. It should be noted that a semi-purified

Table 5  
Hepatic and serum sterol contents of SHRSP rats fed the test diets

	Can	Can/Alk	Soy	Soy/PS	Hyd.Soy	Olv	Epo
<i>Serum (mg/ml serum)</i>							
Cholesterol	0.59 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.48 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.37 ± 0.04 <sup>bc</sup>	0.48 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.30 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.29 ± 0.09 <sup>c</sup>
Campesterol	0.08 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.05 ± 0.00 <sup>cd</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>de</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>
β-Sitosterol	0.06 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.04 ± 0.00 <sup>bc</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>bc</sup>
Total PS	0.14 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.08 ± 0.00 <sup>bc</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.05 ± 0.02 <sup>c</sup>
Total sterol	0.73 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.06 <sup>abc</sup>	0.56 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.06 <sup>cd</sup>	0.34 ± 0.11 <sup>bcd</sup>
PS/cholesterol	1.24 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.21 ± 0.02 <sup>bc</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>cd</sup>	0.44 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>cd</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>cd</sup>
<i>Liver (mg/g liver)</i>							
Cholesterol	1.44 ± 0.05 <sup>ab</sup>	1.69 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.78 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.66 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.64 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.51 ± 0.09 <sup>ab</sup>
Campesterol	0.20 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>cd</sup>	0.30 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>d</sup>
β-Sitosterol	0.13 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>b</sup>
Total PS	0.33 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.28 ± 0.02 <sup>bc</sup>	0.25 ± 0.02 <sup>bc</sup>	0.50 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>bc</sup>
Total sterol	1.76 ± 0.07	1.97 ± 0.11	2.02 ± 0.11	1.72 ± 0.09	1.87 ± 0.07	1.83 ± 0.07	1.73 ± 0.12
PS/cholesterol	0.19 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.00 <sup>cd</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>cd</sup>	0.29 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.11 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.13 ± 0.00 <sup>cd</sup>

Values are means ± SEM ( $n = 4$ ). Values in the same row not sharing a common superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Table 6  
Correlation coefficients ( $r$ ) between the mean survival time and dietary or tissue sterol content in rats fed the test diets for 8 weeks

	Diet		Serum		Liver	
	$r$	$p$	$r$	$p$	$r$	$p$
Cholesterol	0.482	0.096	0.214	0.645	0.216	0.642
Brassicasterol	0.311	0.301	ND	ND	ND	ND
Campesterol	0.180	0.566	0.268	0.561	0.364	0.422
Stigmasterol	-0.183	0.550	ND	ND	ND	ND
β-Sitosterol	0.024	0.937	0.353	0.438	0.226	0.626
Total PS	0.054	0.861	0.302	0.511	0.325	0.478
Total sterol	0.081	0.792	0.267	0.563	0.643	0.119
PS/cholesterol	-0.016	0.960	0.281	0.541	0.220	0.635

Correlation coefficient was determined by linear regression analysis. ND, not detectable.

diet containing practically no significant amounts of endogenous cholesterol and phytosterols was used in other studies (Ratnayake et al., 2000a,b; Ogawa et al., 2003), while a conventional diet containing endogenous cholesterol and PS was used as a basal diet in our study. In our study, the effect of PS is likely to be masked to some extent because dietary cholesterol would competitively inhibit the absorption of PS in the intestine.

Among the vegetable oils with the survival-shortening activity in SHRSP rats (e.g. olive oil, corn oil, evening primrose oil, hydrogenated soybean oil, high-oleic safflower oil, high-oleic sunflower oil, and Can), Can has been studied most extensively. The unfavorable effects of Can, however, are not confined to SHRSP rats (Naito et al., 2000a,b,c,d, 2003; Du et al., 2001; Kameyama et al., 1996; Sauer et al., 1997; Innis and Dyer, 1999). In piglets fed a milk replacer containing Can, increased requirements for vitamin E were found after iron injection (Sauer et al., 1997). However, the hepatic vitamin E content was greater in the Can group than in the Soy group, indicating that tissue vitamin E level is not a critical factor for the survival-shortening activity in SHRSP rats. Although Can is a double-low type oil, it still contains reduced amounts of glucosinolates and

their hydrolysis products such as isothiocyanates, oxazolidinethione, indole derivatives and other minor components (Bjeldanes et al., 1991). Therefore, effort to identify the presumed factors is warranted, even though the impact of the above observations on human nutrition is entirely unknown.

#### Acknowledgements

This work was supported in part by a Health and Labour Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, and a Scientific Research Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan. We appreciate Amano Pharmaceutical Co., Ltd. (Nagoya, Japan) for kindly providing the lipase preparation used (Lipase AY30).

#### References

- Abe, K., Yaguchi, Y., Katsui, G., 1975. Quantitative analysis of tocopherols by high speed liquid chromatography. *J Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo) 21, 183–188.

- Awad, A.B., Fink, C.S., 2000. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *J. Nutr.* 130, 2127–2130.
- Bjeldanes, L.F., Kim, J.Y., Grose, K.R., Bartholomew, J.C., Bradfield, C.A., 1991. Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9543–9547.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Du, C.-Y., Sato, A., Watanabe, S., Ikemoto, A., Fujii, Y., Okuyama, H., 2001. Effect of dietary oils enriched with  $n-3$  fatty acids on survival of mice. *J. Nutr. Biochem.* 12, 474–480.
- Hallikaine, M.A., Sarkkinen, E.S., Uusitupa, M.I.J., 2000. Plant stanol esters affect serum cholesterol concentrations of hypercholesterolemic men and women in a dose-dependent manner. *J. Nutr.* 130, 767–776.
- Hamano, M., Mashiko, S., Onda, T., Tomita, I., Tomita, T., 1995. Effects of cholesterol-diet on the incidence of stroke and life-span in malignant stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Heart J.* 36, 511.
- Huang, M.-Z., Naito, Y., Watanabe, S., Kobayashi, T., Kanai, H., Nagai, H., Okuyama, H., 1996. Effects 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., Naito, Y., 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.
- 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.
- Innis, S.M., Dyer, R.A., 1999. Dietary Canola oil alters hematological indices and blood lipids in neonatal piglets fed formula. *J. Nutr.* 129, 1261–1268.
- Joki, P., Suomalainen, H., Jarvinen, K.M., Juntunen-Backman, K., Gylling, H., Miettinen, T.A., Antikainen, M., 2003. Cholesterol precursors and plant sterols in children with food allergy. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 51–55.
- 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.
- Kramer, J.K.G., Sauer, F.D., 1983. Results obtained with feeding low erucic rapeseed oils and other vegetable oils to rats and other species. In: Kramer, J.K.G., Sauer, F.D., Pigden, W.J. (Eds.), *High and Low Erucic Acid Rapeseed Oils*. Academic Press, Canada, pp. 413–474.
- McCutcheon, J.S., Umemura, T., Bhatnager, M.K., Walker, B.L., 1976. Cardiopathogenicity of rapeseed oils and oil blends differing in erucic, linoleic, and linolenic acid content. *Lipids* 11, 545–552.
- Minami, M., Kimura, S., Endo, T., Hamaue, N., Hirafuji, M., Monma, Y., Togashi, H., Yoshioka, M., Saito, H., Watanabe, S., Kobayashi, T., Okuyama, H., 1997. Effects of dietary docosahexaenoic acid on survival time and stroke-related behavior in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Gen. Pharmacol.* 29, 401–407.
- Miyazaki, M., Huang, M.-Z., Takemura, N., Watanabe, S., Okuyama, H., 1998a. Early mortality effect of partially hydrogenated vegetable oils in stroke-prone spontaneously hypertensive (SHRSP) rats. *Nutr. Res.* 18, 1049–1056.
- 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.
- Miyazaki, M., Watanabe, S., Oikawa, T., Morozumi, K., Fuzinami, T., Okuyama, H., 1998b. Free fatty acid fractions from some vegetable oils exhibit reduced survival time-shortening activity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipids* 33, 655–661.
- Moghadasian, M.H., Frohlich, J.J., 1999. Effects of phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: clinical and experimental evidence. *Am. J. Med.* 107, 588–594.
- Naito, Y., Kasama, K., Yoshida, H., Ohara, N., 2000a. Thirteen-week dietary intake of rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat in Wistar Kyoto rats—change in blood pressure. *Food Chem. Toxicol.* 38, 811–816.
- Naito, Y., Konishi, C., Ohara, N., 2000b. Blood coagulation and osmolar tolerance of erythrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats given rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat. *Toxicol. Lett.* 116, 209–215.
- Naito, Y., Yoshida, H., Nagata, T., Tanaka, A., Ono, H., Ohara, N., 2000c. 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., Konishi, C., Katsumura, H., Ohara, N., 2000d. Increase in blood pressure with enhanced Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>—ATPase activity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats after 4-weeks intake of rapeseed oil as the sole dietary fat. *Pharmacol. Toxicol.* 87, 144–148.
- 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.
- Nguyen, T.T., 1999. The cholesterol-lowering action of plant stanol esters. *J. Nutr.* 129, 2109–2112.
- 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.
- Okuyama, H., Kobayashi, T., Watanabe, S., 1996. Dietary fatty acids—the  $n-6/n-3$  balance and chronic elderly disease. Excess linoleic acid and relative  $n-3$  deficiency syndrome seen in Japan. *Progr. Lipid Res.* 35, 409–457.
- Rajaratnum, R.A., Gylling, H., Miettinen, T.A., 2000. Independent association of serum squalene and noncholesterol sterols with coronary artery disease in postmenopausal women. *J. Am. Col. Cardiol.* 35, 1185–1191.
- Ratnayake, W.M.N., L'Abbé, M.R., Mueller, R., Hayward, S., Plouffe, L., Hollywood, R., Trick, K., 2000a. 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.
- Ratnayake, W.M.N., Plouffe, L., Hollywood, R., L'Abbé, M.R., Hidioglou, N., Sarwar, G., Mueller, R., 2000b. Influence of sources of dietary oils on the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipid* 35, 409–420.
- Sauer, F.D., Farnworth, E.R., Bélanger, J.M.R., Kramer, J.K.G., Miller, R.B., Yamashiro, S., 1997. Additional vitamin E required in milk replacer diets that contain canola oil. *Nutr. Res.* 17, 259–269.
- Sawamura, M., Nara, Y., Yamori, Y., 1992. Liver mevalonate 5-pyrophosphatase decarboxylase is responsible for reduced serum cholesterol in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J. Biol. Chem.* 267, 6051–6055.
- 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.

- Shimokawa, T., Moriuchi, A., Hori, T., Saito, M., Naito, Y., Kabasawa, H., Nagase, Y., Matsubara, M., 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.
- Stefansson, B.R., Kondra, Z.P., 1975. Tower summer rape. *Can. J. Plant Sci.* 55, 343–344.
- Sudhop, T., Gottwald, B.M., von Bergmann, K., 2002. Serum plant sterols as a potential risk factor for coronary heart disease. *Metabolism* 51, 1519–1521.
- Turnbull, D., Whittaker, M.H., Frankos, V.H., Jonker, D., 1999. 13-Week oral toxicity study with stanol esters in rats. *Regul. Toxicol. Pharm.* 29, 216–226.
- Whittaker, M.H., Frankos, V.H., Wolterbeek, A.P.M., Waalkens-Berendsen, D.H., 1999. Two-generation reproductive toxicity study of plant stanol esters in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 29, 196–204.
- Wolfreys, A.M., Hepburn, P.A., 2002. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 7. Assessment of mutagenic activity of phytosterols, phytosterol esters and the cholesterol derivative, 4-cholesten-3-one. *Food. Chem. Toxicol.* 40, 461–470.

# 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

内藤由紀子, 大原直樹

## Phytosterols play a role in canola oil-induced shortening of lifespan in stroke prone spontaneously hypertensive rats

Yukiko NAITO, Naoki OHARA

High blood level of cholesterol is one of the risk factors for cardiovascular diseases, and foods of which some ingredients are capable of decreasing the level of cholesterol have been chosen and recommended for daily meal. Plant sterols (phytosterols) in vegetable oils, fruits and vegetables possess such an effect, and phytosterol-enriched margarine and dietary oils have become commonly consumed. However, it has been reported in stroke prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) that the intake of a diet containing canola oil shortened lifespan, though the mechanism underlying such an unfavorable effect is unknown. We have studied about the several physiological changes in SHRSP fed a diet containing 10% canola oil as the only dietary fat, and attempted to find causal substances. Soybean oil has been used as control, because the oil is contained in the normal diets for rats. The diet containing 10% canola oil shortened lifespan of SHRSP. The diet also increased blood pressure, accelerated blood coagulation and increased blood lipids. Similar increases in blood pressure and blood lipid level were also found in spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar Kyoto rats. In the SHRSP, erythrocytes became fragile with activated  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, and phytosterols in those membranes were found increased compared with those of the animals fed a diet containing soybean oil. Then, we examined the fragility of erythrocyte obtained from SHRSP fed a diet containing 10% canola oil with 0.06% cholesterol, which is one of the essential membrane components and is liable to be replaced with phytosterols. The erythrocyte obtained were less fragile than that in SHRSP fed a diet containing 10% canola oil.

Additionally, a diet containing phytosterol-enriched canola oil showed a further shortening of lifespan as compared with the diet containing 10% canola oil. Since canola oil is originally high in phytosterol content compared with soybean oil, this finding suggests an essential role of phytosterols in the life-shortening observed.

In this paper, pathophysiological changes accompanying the shortening of life that might be implicated in the mechanisms for an accelerated onset of stroke (by canola oil or phytosterol-rich oils) are also discussed.

### 1. はじめに

#### 1) 心臓血管系疾患とコレステロール

近年, 食生活の変化や環境ストレスなどに起因する心臓血管系疾患患者の増加が注目されてい

る。特に, 血中コレステロール量の増大は, 動脈硬化症, 狭心症, 高血圧症, 脳卒中のような心臓血管系疾患発症のリスク指標として重要であることが広く知られている。そのため, 生活習慣病の予防を目的とした, 血中コレステロールレベルの上昇を防ぐ食物および食品を取り入れた食生活に

Safety Testing Laboratory

対する社会的関心が高まり、それが推奨されている。

その中で、植物油中の植物ステロール (phytosterol) が、食物中コレステロールの消化管吸収を抑え、血中コレステロールレベルを低下させることに注目が集まっている<sup>2)</sup>。植物ステロールは、菜種油、大豆油等の植物油中に多く含まれ、植物油以外では、果物や野菜 (いちじく、落花生、ゴマなど)、豆腐やマーガリンなどの加工食品にも含まれている。さらに植物ステロールを積極的に添加したマーガリンや食用油等の食品の有効性に関する研究事例も多数報告されるようになり<sup>2-4)</sup>、植物ステロールを含む食品が一般的に広く使用されるようになってきた。

植物ステロールは体内で合成されることはなく、また、通常それ自体は消化管からの吸収率が低く、有害作用もほとんどないとされている<sup>5)</sup>。植物ステロールと構造が類似しているコレステロールは、摂取量の40%以上が小腸から吸収されるのに対し、植物ステロールは5%以下である。一方、前述のように、植物ステロールは、小腸からのコレステロール吸収を阻害することによって、血中コレステロールレベルを低下させる作用を有し<sup>6)</sup>、この作用が生活習慣病の予防効果の一因であるとみられる。

## 2) 植物油の特性

わが国では、全食用植物油のうち、菜種油の需

要が最も多く、全消費量の約40% (約89万トン) を占めている (1999年、農林水産省食品油脂調べ)。また菜種油は日常消費される多様な製品 (マーガリン、マヨネーズ、ドレッシング、フライドポテト、唐揚げ、揚げあられ、パン・ケーキ類、ドーナツおよびインスタントラーメン等) 中に含まれている。

菜種油の脂肪酸組成を、広く用いられているもう一種の植物油である大豆油と比較した (表1, 社団法人日本植物油協会)。菜種油中に最も多く含まれる脂肪酸はオレイン酸で、約60%を占める。次いでリノール酸 (約20%)、リノレン酸 (約10%) の順に多い。現在摂取されている菜種油は、心臓毒性作用を有するエルシン酸含有率を、品種改良によって2%未満にした油 (キャノーラ油) であり、本実験でもこの油を用いた。一方、大豆油にはリノール酸が最も多く含まれ (約50%)、次にオレイン酸 (約20%)、パルミチン酸、リノレン酸 (それぞれ約10%) の順である。また、飽和脂肪酸は、菜種油 (約6%) よりも大豆油 (約15%) に多く含まれている。飽和脂肪酸については、血中コレステロールおよび中性脂肪量の増加作用を有することが、また、不飽和脂肪酸については、*n*-9系一価不飽和脂肪酸 (オレイン酸) が血中コレステロール量低下作用および心臓病発症低下作用を有すること、*n*-6系多価脂肪酸 (リノール酸) を過剰摂取すると脂質代謝の

表1 大豆油および菜種油に含まれる脂肪酸組成 (%)

Fatty acid	Soybean oil	Canola oil
14:0 Myristic acid	0.1	0
16:0 Palmitic acid	11.0	4.0
16:1 Palmitoleic acid	0	0.2
18:0 Stearic acid	3.6	1.7
18:1 Oleic acid	23.4	58.8
18:2 Linoleic acid	54.0	21.4
18:3 Linolenic acid	7.0	11.3
20:0 Arachidic acid	0.3	0.5
20:1 Eicosenoic acid	0.2	1.4
22:0 Behenic acid	0.4	0.3
22:1 Erucic acid	0	0.4

バランスが崩れることが知られている。さらに、*n*-6系不飽和脂肪酸/*n*-3系不飽和脂肪酸比が高くなると、血栓が形成されやすくなることが報告されている<sup>7)</sup>。

菜種油および大豆油に含まれるステロール（コレステロールおよび植物ステロール）含量を比較した（表2）<sup>8)</sup>。菜種油中の総植物ステロール量（705 mg/100 g）は、大豆油（286 mg/100 g）の約2.5倍である。また、菜種油中のβ-シトステロール（380 mg/100 g）およびカンペステロール（250 mg/100 g）は、どちらも大豆油中の含量（それぞれ168 mg/100 gおよび61 mg/100 g）よりも多く、一方、スティグマステロールは菜種油にはほとんど含まれないが（2 mg/100 g）、大豆油には比較的多く含まれている（53 mg/100 g）。摂取された植物ステロールは、コレステロールよりも優先して胆汁酸ミセルに取り込まれるため、ミセル中のコレステロールが減少し、小腸で吸収されるコレステロールが少なくなる。ミセル中の植物ステロールはほとんど吸収されず、また、ミセルに取り込まれなかったコレステロールは便として排泄される。

脂肪酸組成やステロール含量に注目した場合、菜種油は健康に良い油であり、植物ステロールが多く含まれているため、生活習慣病の予防に有効であると考えられてきた。

### 3) 植物油摂取におけるSHRSPおよびSHRの特徴

前項で示した菜種油の特徴にも関わらず、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）にある種の植物油のみを唯一の脂肪源として摂取させると、生存日数が短縮するという報告<sup>9-12)</sup>があ

り。その中で、菜種油は生存日数を短縮する油の一つとされている<sup>10-12)</sup>。

SHRSPの生存日数の短縮に関与すると考えられる物質はまだ特定されていないが、植物油中の脂肪酸の特異的組成<sup>9)</sup>、未知物質<sup>10-12)</sup> および植物ステロール<sup>13)</sup> が疑われている。脂肪酸組成については、α-リノレン酸/リノール酸比が高い場合にSHRSPの生存日数が延長するという報告があるが、菜種油とは脂肪酸組成が異なるオリーブ油およびコーン油も、SHRSPの生存日数を短縮させる作用を持つこと<sup>14)</sup> や、リパーゼ処理した菜種油では生存日数短縮作用が消失するものの、脂肪酸組成は菜種油とほとんど差がないこと<sup>12)</sup> から、脂肪酸組成が生存期間短縮の要因である可能性は低いと考えられる。

菜種油摂取による生存日数短縮が報告されたSHRSPは、Wistar系ラットからの選択交配によって分離された、遺伝的に高血圧を発症する高血圧自然発症ラット（SHR）の亜系である。加齢に伴う血圧の上昇がSHRより急速で、収縮期圧の最大値はSHRに比べ、一般に40～50 mmHg高く、25週齢以降には脳血管障害（脳出血および脳梗塞）を併発して死亡する<sup>15)</sup>。この脳血管障害の発症率は、SHRSPの方がSHRよりも有意に高い。SHRSPは、約20週齢で血圧が約250 mmHgとなり、心肥大、臓器（脳、心臓、腎臓、腸間膜など）の血管の炎症を伴うこと、SHRよりも脳血管にアテロームが発生しやすいことが特徴である。また、これらの動物では肝臓でのコレステロール生合成能が低下しており、血中コレステロール量が少ないことが知られている。

表2 大豆油および菜種油に含まれるステロール類 (mg/100g oil)

	Cholesterol	Brassicasterol	Campesterol	Stigmasterol	β-Sitosterol	Total phytosterol
Soybean oil	1	4	61	53	168	286
Canola oil	2	73	250	2	380	705

#### 4) 研究の概要

汎用されている菜種油が、実験動物のみならずヒトに対しても有害作用を示すならば、それは重大な社会問題である。菜種油摂取によって生じる実験動物の生理機能等の変化およびSHRSPでみられた生存日数短縮の原因と機序を調べることは、私たちの食生活と密接に関わっている植物油の安全性について理解を深めるために、また、食品の安全性を保証する上で重要な研究課題であると考え、検討を続けている。そこで、これまで得られた結果をここでまとめることにした。

菜種油摂取による生存日数の短縮が報告されたSHRSPと、SHRおよびこれらの選抜親系統である正常血圧Wistar Kyoto (WKY) ラットの3系統のラットを用い、10%菜種油摂取によるSHRSPの生存日数短縮の背景にある生理学的ならびに血液学的機能変化を調べ、原因物質を探索した。また、一般症状観察、体重、摂餌量、摂水量および血圧測定、腎機能検査、血液学、血液生化学および病理学検査、血管反応性および細胞膜脆弱性検査、膜結合酵素活性の測定を行った。特にSHRSPにみられるコレステロール合成能低下は、先に述べた植物ステロールによるコレステロール吸収の障害と相俟って、SHRSPの血中コレステロールレベルを下げ、生理機能に影響を及ぼす可能性が大きい。本研究は、菜種油中の植物ステロールがSHRSPの生存日数短縮に関与する可能性に注目し、それを証明しようとした。

ラット用の通常飼料には、脂肪分として主に大豆油が含まれることから、大豆油を摂取させた動物を対照動物とした。

## 2. 実験結果

### 1) 血圧に対する影響

菜種油を異なる系統のラットに、異なる条件[SHRSP (7週間摂取, 食塩負荷あり), WKYラット (26週間摂取, 食塩負荷あり)<sup>16)</sup>, SHR (26週間摂取, 食塩負荷あり)<sup>10)</sup>, WKYラット (13週間摂取, 食塩負荷なし)<sup>17)</sup>, SHRSP (4週間摂取, 食塩負荷なし)<sup>18)</sup>]で摂取させた場合、いずれの系統あるいは条件においても、昇圧が促進されることが明らかとなった(図1および表3)。SHRSPでは、昇圧亢進が脳卒中発症に大きく影

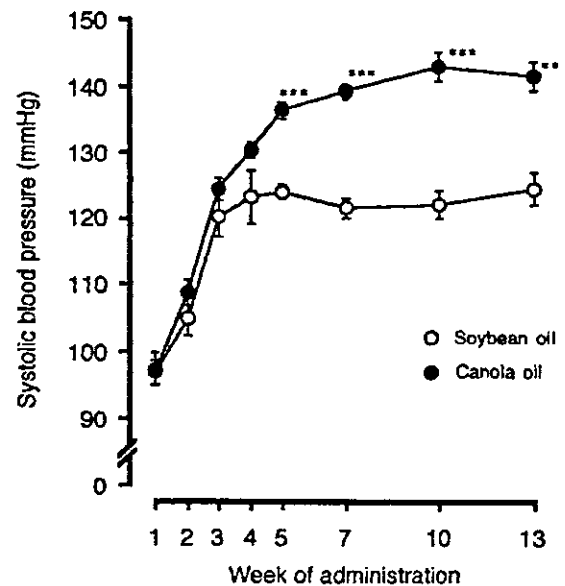


図1 13週間10%大豆油または菜種油含有飼料を摂取したWistar Kyoto (WKY) ラットの収縮期血圧の変化

血圧は、毎週1回Tail-cuff法で測定した。

シンボル(○, 大豆油群; ●, 菜種油群)は、4~5例の平均および標準誤差を表す。

\*\* $p < 0.01$ および\*\*\* $p < 0.001$ , 大豆油群と比較して有意差あり(unpaired *t*-test)。

響すると考えられる。

### 2) 血液に対する影響

菜種油摂取動物で血小板数の減少(26週間摂取SHRおよびWKYラット, 13週間摂取WKYラット)および好中球数の増加(26週間摂取SHRおよび13週間摂取WKYラット)が認められた<sup>16,17)</sup>(表3)ことから、菜種油摂取により血管傷害が誘発され、損傷した部位への粘着による血小板数減少、炎症性反応に伴う好中球の動員が推測された。また、13週間摂取WKYラットのPTおよびAPTTには影響が認められなかったが<sup>17)</sup>, 7週間および4週間投与SHRSPのPTおよびAPTTには、それぞれ短縮傾向あるいは短縮が認められ<sup>18)</sup>(表3)。血栓形成の促進が示唆された。

### 3) 血液生化学に対する影響

菜種油摂取動物の血中総コレステロール、遊離コレステロールおよびトリグリセリド濃度の増大



表3 菜種油を摂取したラットでみられる変化

Animal strain	SHRSP	SHR	WKY	WKY
Feeding period (week)	7	26	26	13
NaCl-loading (with/without)	with	with	with	without
Body weight	↓	→	→	→
Food intake	→	→	→	→
Water intake	→	→	→	→
Blood pressure	↑	↑	↑	↑
<b>Urinalysis</b>				
Urinary volume	→	(↑)	(↑)	→
Na <sup>+</sup>	→	(↑)	(↑)	→
K <sup>+</sup>	→	(↑)	(↑)	→
Cl <sup>-</sup>	→	(↑)	(↑)	→
<b>Hematology</b>				
RBC	→	→	→	↑
Hematocrit	→	→	→	↑
WBC	→	→	→	↑
Neutrophil	→	↑	→	↑
Lymphocyte	→	→	→	→
Platelet	→	↓	↓	↓
PT	↓	■	■	→
APTT	→	■	■	→
<b>Blood chemistry</b>				
BUN	→	→	→	→
Glucose	→	↓	↓	↓
Total cholesterol	↑	↑	↑	↑
Free cholesterol	■	↑	↑	↑
Triglyceride	↑	↑	↑	↑
HDL	■	↑	↑	→
Phospholipids	↑	↑	↑	↑
NEFA	→	→	→	↓
Na <sup>+</sup>	→	→	→	→
K <sup>+</sup>	→	↓	↓	↓
Cl <sup>-</sup>	→	→	→	→
Ca <sup>++</sup>	→	■	■	→
<b>Hepatic enzyme</b>				
G6PDH	■	■	■	↑
Catalase	■	■	■	↓
SOD	■	■	■	↓

↑, increase compared with soybean oil group

↓, decrease compared with soybean oil group

→, no differences between canola oil group and soybean oil group

( ), tendency

■ not measured

が、7週間摂取SHRSP、26週間摂取SHR、および26および13週間摂取WKYラットで認められたことから、菜種油摂取は血漿中脂質濃度を増加させることが明らかとなった<sup>16,17)</sup> (表3)。これは、動脈硬化症を起こしやすい系統であるSHRやSHRSPにおいては、高血圧関連症状発症の早期化につながる。

4) 腎機能に対する影響

菜種油を26週間摂取したSHRおよびWKYラットで、尿量および電解質の増加傾向が認められたが有意な変化ではなく<sup>16)</sup>、13週間摂取WKYラットでは変化が認められなかった<sup>17)</sup> (表3) ことから、菜種油は腎機能に対して著しい影響を及ぼさないと考えられた。

5) 血管反応に対する影響

26週間菜種油を摂取したSHRおよびWKYラットの摘出血流腸間膜血管床標本および胸部大動脈リング標本を用いて血管反応を検討した実験では、血管内皮由来血管弛緩因子(一酸化窒素)の産生あるいは遊離機能、血管平滑筋のノルエピネフリン誘発収縮およびアセチルコリン誘発弛緩反応および交感神経終末のノルエピネフリン貯蔵量に変化は認められなかった<sup>16)</sup>。また、4週間菜種油を投与したSHRSPの摘出血管では、種々のオートコイド(アンジオテンシンII、アラキドン酸、ATP、エンドセリン-1、ノルエピネフリンおよびセロトニン)に対する血管収縮反応およびプロスタノイド(プロスタサイクリンおよびトロンボキサンA<sub>2</sub>)の産生は影響を受けなかった<sup>18)</sup>。したがって、内因性の血管作動物質に対する血管反応の変化は昇圧の要因でないと考えられた。しかし、カリウムフリー栄養液中での血管標本収縮が菜種油投与動物で亢進したこと、および胸部大動脈のNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase活性が上昇したことから、イオン透過性の変化に基づく平滑筋の興奮性の亢進など、間接的に血圧上昇に結びつく生理機能の変化が示唆された。

したがって、内因性の血管作動物質に対する血管反応の変化は昇圧の要因でないと考えられた。しかし、カリウムフリー栄養液中での血管標本収縮が菜種油投与動物で亢進したこと、および胸部大動脈のNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase活性が上昇したことから、イオン透過性の変化に基づく平滑筋の興奮性の亢進など、間接的に血圧上昇に結びつく生理機能の変化が示唆された。

6) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase活性および赤血球膜浸透圧抵抗性に対する影響

4週間の菜種油投与によりSHRSPの脳、心臓、腎臓および胸部大動脈におけるNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase活性は上昇(表4)し<sup>18)</sup>、赤血球膜の浸透圧抵抗性は低下した(図2)<sup>19)</sup>。また、菜種油を摂取したSHRSPでは、細胞膜機能の維持に関わる膜中コレステロール量の総ステロール量に対する割合が低下した(表5)<sup>6)</sup>。これらのことから、菜種油を摂取したSHRSPでは、細胞膜の脆弱化が全身で起こる可能性があること、また、これには菜種油摂取により吸収され、細胞膜中に蓄積した植物ステロール量の増加が関与することが示唆された。

7) 生存日数に対する影響

SHRSPの生存日数は、菜種油摂取により短縮した(図3)<sup>6)</sup>。また、大豆油特有の植物ステロール(ステイグマステロール)を大豆油中含有意量に相当する量だけ添加した菜種油を摂取した動物では、さらに生存日数が短縮した(図4)。菜種油

表4 10%大豆油または菜種油を4週間強制経口投与した脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)のNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase活性

	Soybean oil	Canola oil
Brain	63.9± 6.9	92.4± 7.7*
Heart	39.4± 8.4	80.1± 17.5*
Kidney	19.1± 3.0	34.0± 6.5*
Aorta	72.7	95.2

Values are means ± S. E. (nmol/mg protein/min) for 10 samples, except aorta.

Values of aorta represent the activities obtained from pooling samples.

\*p<0.05, significantly different from the values of soybean oil group (unpaired t-test)

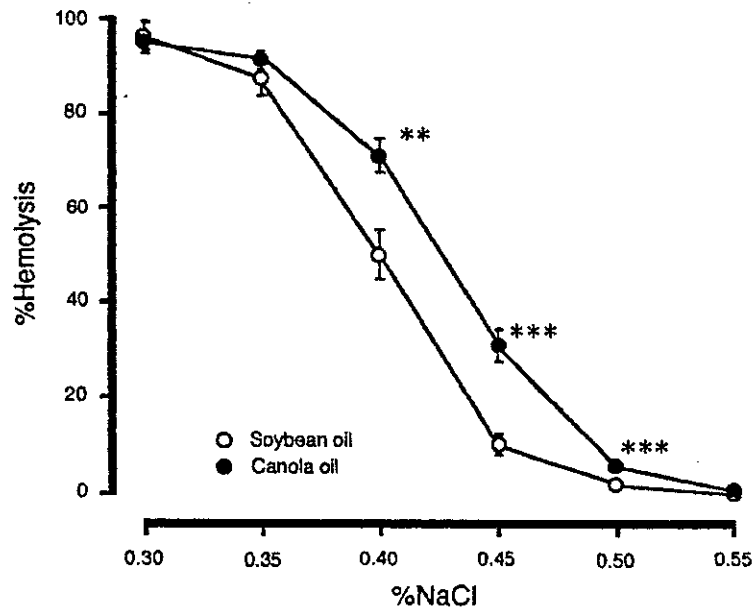


図2 4週間大豆油または菜種油を摂取した脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の溶血性

大豆油または菜種油は、摂餌量の10%に相当する量を強制経口投与した。リン酸緩衝液の希釈系列(0.1~0.85%塩化ナトリウム相当)を調製した。動物から得た血液を各濃度の溶液に加えて混和し、30分間静置した。遠心分離後上清を得、540 nmにおける吸光度を測定し、溶血率を算出した(0.1%溶液を100%溶血とした)。シンボル(○,大豆油群;●,菜種油群)は、10例の平均および標準誤差を表す。\*\* p<0.01および\*\*\* p<0.001。大豆油群と比較して有意差あり(unpaired t-test)。

表5 10%大豆油または菜種油を4週間強制経口投与した脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の赤血球膜中ステロール量

Group		Cholesterol	Brassicasterol	Campesterol	Stigmasterol	β-Sitosterol	Total phytosterol
Soybean oil	Mean	414	n. d.	2.79	0.255	2.19	5.23
	±S.E.	38.7		0.184	0.0242	0.163	0.354
Canola oil	Mean	415	0.135	6.49***	n. d.	3.09***	9.72***
	±S.E.	9.77	0.0376	0.173		0.0899	0.264

Values are means ± S. E. (nmol/mg erythrocyte membranes) for 10 animals.

n. d., <0.1 nmol/mg erythrocyte membranes

\*\*\*p<0.001, significantly different from the values of the soybean oil group (unpaired t-test)

にステイグマステロールを添加した場合でも、摂取した動物の生存日数が菜種油を摂取した動物と違いがなければ、菜種油特有の植物ステロールが生存日数短縮に関与すると推察されるが、短縮が認められた。したがって、生存日数短縮には、菜種油に特有な植物ステロールが関与するのではなく、植物ステロールの総量に関与すると考えられた。

### 3. 考察とまとめ

SHRSPに菜種油を唯一の脂肪源として摂取させるとみられる生存日数の短縮には、菜種油中から体内に取り込まれる植物ステロールの量に関与することが明らかになった。Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase活性の変化がみられたことから、細胞膜中に植物ステロールが蓄積することによって細胞膜中の機能タンパク質であるナトリウムポンプが影響を受けたと推測された。植物ステロールは、吸収後細胞膜中のコレステロールと置換することによって膜結合酵素活性に影響を与えることや<sup>20)</sup>、膜コレステロールが減少すると、本来の膜結合酵素の機能不全が誘発されること<sup>21-24)</sup>が報告されている。このとき膜は脆弱化し、脳卒中につながる血管傷害とも関連する可能性が考えられた。SHRSPで

は植物ステロールの吸収が亢進し、排泄能が低下しているため、植物ステロールが体内に蓄積されやすいことが報告されている<sup>25)</sup>。したがって、この系統の動物に多量の植物ステロールを含有する菜種油を摂取させると、体内の植物ステロール量がさらに増加すると考えられる。また、菜種油摂取によってみられた血漿中脂質レベルの上昇が、血管傷害を促進することも疑われた。図5に示したように、Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase活性の上昇、赤血球脆弱化、血液凝固時間の短縮および血中脂質の増加は、アテローム形成を含む血管傷害、出血および血栓形成に関与する変化と考えられる。主要な要因は、過剰の植物ステロールの蓄積と考えられ、上記の変化を通じて生存日数の短縮をもたらすことが明らかになった。

本研究の結果から、植物ステロールは菜種油摂取によるSHRSPの短命化に関わる原因物質の一つであることが示唆された。近年、高コレステロール血症を防ぐ目的で、植物油の摂取が推奨されているが、血中植物ステロールレベルの上昇による細胞膜の脆弱化等の影響がヒトでも認められないとは限らない。欧米では、アテローム性動脈硬化症の発症を予防する目的で、飽和脂肪酸やコレステロールの摂取量を削減する食事療法が注目

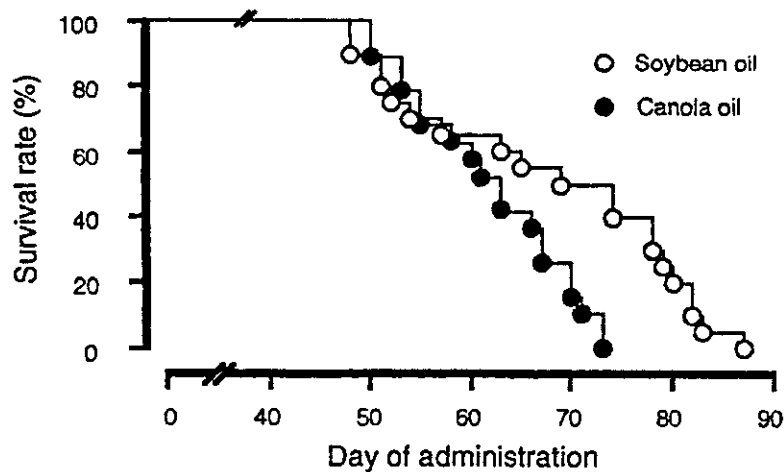


図3 10%大豆油または菜種油含有飼料を摂取した脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の生存曲線  
動物には、1%食塩水を飲水として自由摂取させた。  
○および●は、それぞれ大豆油群および菜種油群を表す、両群間に有意差あり (p < 0.05, Log-rank test, Tarone-Ware test).

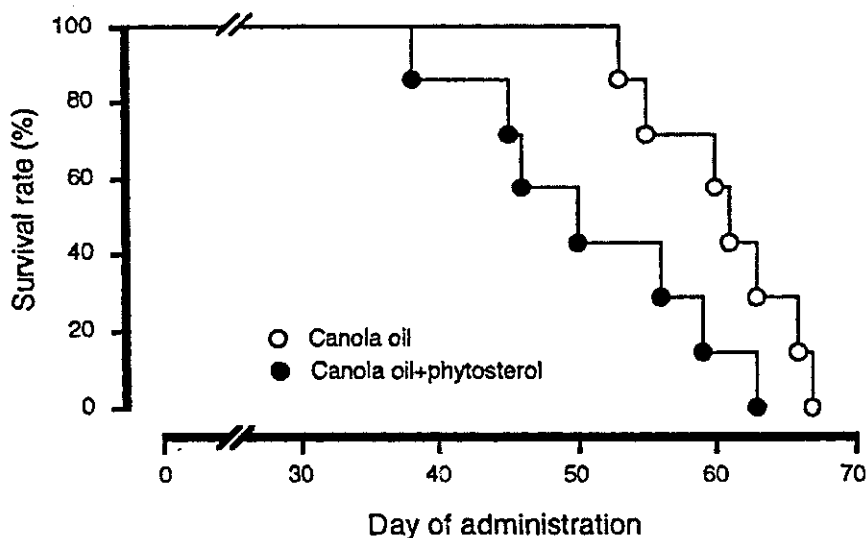


図4 10%菜種油または植物ステロール添加10%菜種油含有飼料を摂取した脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の生存曲線  
 動物には、1%食塩水を飲水として自由摂取させた。  
 ○および●は、それぞれ10%菜種油群およびステイグマステロール添加10%菜種油群を表す。両群間に有意差あり (p < 0.05, Log-rank test, Tarone-Ware test)。

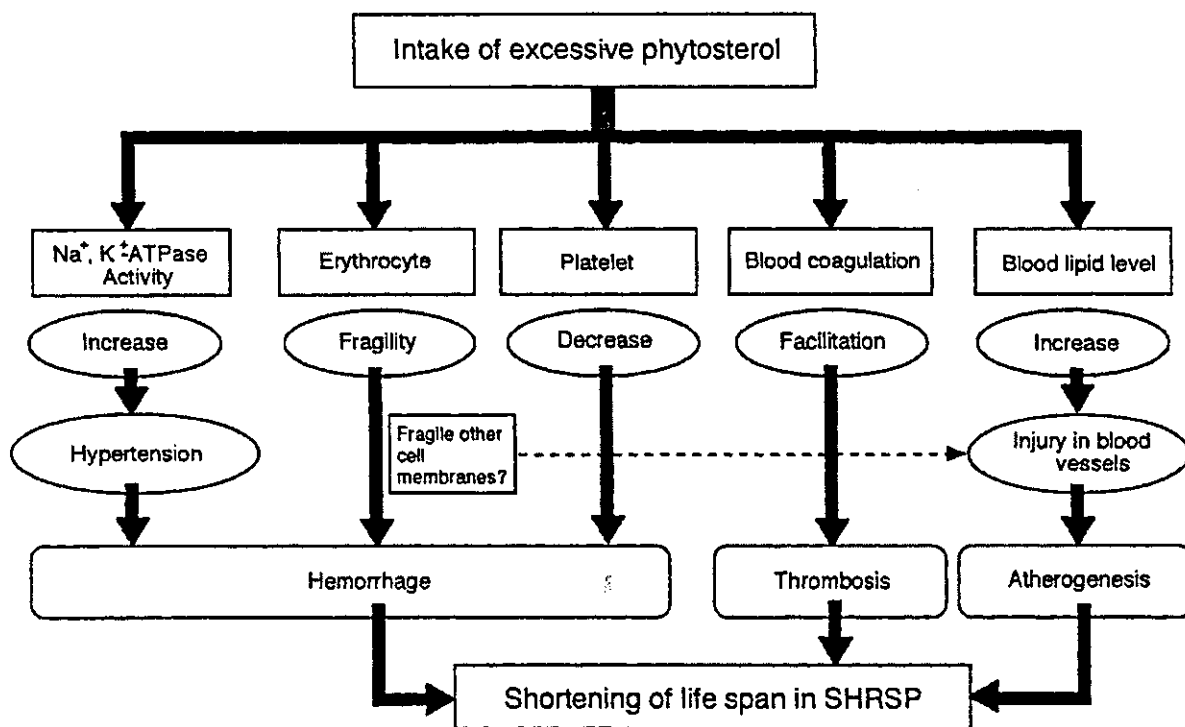


図5 まとめ

され、この療法を取り入れた際の乳幼児における血中コレステロール、コレステロール前駆物質および植物ステロール量の変化に関する研究結果が報告されている<sup>24)</sup>。母乳や調合乳に代えて、脱脂乳と菜種油等の植物油を与えられた乳幼児では、血中コレステロールレベルやコレステロール生合成に変化はみられないが、血中植物ステロールレベルが上昇する。Melliesらも、同様の結果を報告している<sup>25)</sup>。また、魚、卵および牛乳アレルギーの子供では、食事制限によって動物性脂肪の摂取量が減り、代わりに植物性脂肪の摂取量の増加およびコレステロールの摂取量の減少がみられると同時に、血中の植物ステロールレベルが上昇していることが報告されている<sup>26)</sup>。この研究では、動物性脂肪の代替として用いられる菜種油中に植物ステロールが多いことが、コレステロール吸収の抑制および血中コレステロールレベルの低下と平行してみられる血中植物ステロールの上昇にかかわると結論づけており、このような状態ではコレステロールの生合成が代償性に促進されるが、それでもなおコレステロールレベルは低い。血中植物ステロール量が増加した状態で、SHRSPを対象にした本研究でみられたことと同様の細胞膜の脆弱化がヒトでも起こるか否か明らかではない。しかし、植物ステロールの長期大量摂取が発達期にある子供にどのような影響を及ぼすかについてはほとんど情報がないため、今後詳細に検討する必要があると考えられる。また、フィトステロール血症患者においては、植物ステロールの消化管吸収亢進および胆汁や糞便への排泄能低下がみられるため、菜種油のような植物ステロールを多く含む食用油を摂取すると、より多くの植物ステロールが蓄積され、フィトステロール血症でみられる症状の一つである結節性黄色腫の悪化を促進する可能性がある。したがって、フィトステロール血症患者などステロールの吸収排泄に異常のある病態<sup>29)</sup>では、植物油の過剰摂取に注意が必要と考えられる。一方、われわれの日常の食生活では、摂取する脂肪源が常に同一になることはほとんど考えられないため、菜種油からの植物ステロール摂取に過敏となる必要はないと考えられるが、食用油を含め、多様な食品から知らず知らずのうちに摂取している植物ステロールが、われわ

れの生理機能に、あるいは健康に影響を及ぼすことは理解しておくことが肝要である。

本研究の一部は、食品・化学物質安全総合研究事業に対する厚生労働省厚生労働科学研究費補助金に依り実施した。

#### 文 献

- 1) Lichtenstein, A. H., Ausman, L. M., Carrasco, W., Jenner, J. L., Guaitieri, L. J., Goldin, B. R., Ordovas, J. M., Schaefer, E. J.: Effects of canola, corn, and olive oils on fasting and postprandial plasma lipoproteins in humans as part of a National Cholesterol Education Program Step 2 diet. *Arterioscler. Thromb.* 13: 1533-1542 (1993)
- 2) Weststrate, J. A., Meijer, G. W.: Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52: 334-343 (1998)
- 3) Neil, H. A., Meijer, G. W., Roe, L. S.: Randomised controlled trial of use by hypercholesterolaemic patients of a vegetable oil sterol-enriched fat spread. *Atherosclerosis* 156: 329-337 (2001)
- 4) Seki, S., Hidaka, I., Kojima, K., Yoshino, H., Aoyama, T., Okazaki, M., Kondo, K.: Effects of phytosterol ester-enriched vegetable oil on plasma lipoproteins in healthy men. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 12: 282-291 (2003)
- 5) Ling, W. H., Jones, P. J. H.: Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci.* 57: 195-206 (1995)
- 6) Ikeda, I., Sugano, M.: Inhibition of cholesterol absorption by plant sterols for mass intervention. *Cur. Opin. Lipidol.* 9: 527-431 (1998)
- 7) Okuyama, H., Fujii, Y., Ikemoto, A.: *n-6/n-3* Ratio of dietary fatty acids rather than hypercholesterolemia as the major risk factor for atherosclerosis and coronary heart disease. *J. Health Sci.* 46: 157-177 (2000)
- 8) Naito, Y., Nagata, T., Takano, Y., Nagatsu, T., Ohara, N.: Rapeseed oil ingestion and exacerbation of hypertension-related conditions in stroke prone hypertensive rats. *Toxicology* 187: 205-216 (2003)
- 9) Shimokawa, T., Moriuchi, A., Hori, T., Saito, M., Naito, Y., Kabasawa, H., Nagae, Y., Matsubara,

- M., Okuyama, H.: 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 (1988)
- 10) Huang, M.-Z., Naito, Y., Watanabe, S., Kobayashi, T., Kanai, H., Nagai, H., Okuyama, H.: Effect of rapeseed and dietary oils on the mean survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull.* **19**: 554-557 (1996)
- 11) Huang, M.-Z., Watanabe, S., Kobayashi, T., Nagatsu, A., Sakakibara, J., Okuyama, H.: Unusual effects of some vegetable oils on the survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipids* **32**: 745-751 (1997)
- 12) Miyazaki, M., Huang, M.-Z., Takemura, N., Watanabe, S., Okuyama, H.: Free fatty acid fractions from some vegetable oils exhibit reduced survival time-shortening activity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipids* **33**: 655-661 (1998)
- 13) Ratnayake, W. M. N., L'Abbe, M. R., Mueller, R., Hayward, S., Plouffe, L., Hollywood, R., Trick, K.: 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 (2000)
- 14) Ratnayake, W. M. N., Plouffe, L., Hollywood, R., L'Abbe, M. R., Hidioglou, N., Sarrwar, G., Mueller, R.: Influence of sources of dietary oils on the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipids* **35**: 409-420 (2000)
- 15) Okamoto, K., Yamori, Y., Nagaoka, A.: Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). *Circ. Res.* **34**: 35: I143-I153 (1974)
- 16) Naito, Y., Yoshida, H., Nagata, T., Tanaka, A., Ono, H., Ohara, N.: Dietary intake of rapeseed oil or soybean oil as the only fat nutrient in spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats.—Blood pressure and pathology. *Toxicology* **146**: 197-208 (2000)
- 17) Naito, Y., Kasama, K., Yoshida, H., Ohara, N.: Thirteen-week dietary intake of rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat in Wistar Kyoto rats. Change in blood pressure. *Food Chem. Toxicol.* **38**: 811-816 (2000)
- 18) Naito, Y., Konishi, C., Katsunura, H., Ohara, N.: Increase in blood pressure with enhanced Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats after 4-week intake of rapeseed oil as the sole dietary fat. *Pharmacol. Toxicol.* **87**: 144-148 (2000)
- 19) Naito, Y., Konishi, C., Ohara, N.: Blood coagulation and osmolar tolerance of erythrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats given rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat. *Toxicol. Lett.* **116**: 209-215 (2000)
- 20) Bruckdorfer, K. R., Demel, R. A., de Gier, J., van Deenen, L. L. M.: The effect of partial replacements of membrane cholesterol by other steroids on the osmotic fragility and glycerol permeability of erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **183**: 334-345 (1969)
- 21) Gray, D. F., Hausen P. S., Doohan, M. M., Hool, L. C., Rasmussen, H. H.: Dietary cholesterol affects Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump function in rabbit cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* **272**: H1680-H1689 (1997)
- 22) Lijnen, P., Petrov, V.: Cholesterol modulation of transmembrane cation transport systems in human erythrocytes. *Biochem. Mol. Med.* **56**: 52-56 (1995)
- 23) Yeagle, P. L., Young, J., Rice, D.: Effects of cholesterol on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase ATP hydrolyzing activity in bovine kidney. *Biochemistry* **27**: 6449-6452 (1988)
- 24) Yeagle, P. L.: Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie* **73**: 1303-1310 (1991)
- 25) Ikeda, I., Nakagiri, H., Sugano, M., Ohara, S., Hamada, T., Nonaka, M., Imaizumi, K.: Mechanisms of phytosterolemia in stroke-prone spontaneously hypertensive and WKY rats.: *Metabolism* **50**: 1361-1368 (2001)
- 26) Tammi, A., Rönnemaa, T., Valsta, L., Seppänen, R., Rask-Nissilä, L., Miettinen, T. A., Sinell, O.: Dietary plant sterols alter the serum plant sterol concentration but not the cholesterol precursor sterol concentrations in young children (the STRIP study): *J. Nutr.* **131**: 1942-1945 (2001)
- 27) Mellies, M., Glueck, C. J., Sweeney, C., Fallat, R. W., Tsang, R. C., Ishikawa, T. T.: Plasma and dietary phytosterols in children. *Pediatrics* **57**: 60-67 (1976)
- 28) Jeki, P., Suomalainen, H., Järvinen, K.-M., Juntunen-Backman, K., Glylling, H., Miettinen, T. A., Antikainen, M.: Cholesterol precursors and

- plant sterols in children with food allergy. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**: 51-55 (2003);
- 29: Miettinen, T. A.: Phytosterolaemia, xanthomatosis and premature atherosclerotic arterial disease: a case with high plant sterol absorption, impaired sterol elimination and low cholesterol synthesis. *Eur. J. Clin. Invest.* **10**: 27-35 (1980)



<総説>

ストレス応答とステリルグルコシド

お茶の水女子大学理学部生物学科 小林哲幸

1. はじめに

細胞は、高熱、浸透圧、酸化、重金属、紫外線など外界の様々な環境ストレスから自らを保護するために、熱ショックタンパク質 (Hsp) を中心とするストレス防御機構をもっている。しかし、各種ストレスを最初に感知する実体、機構は何か、また、Hsp の誘導に先立つシグナル伝達系は何かについては不明の点が多い。この問題を解決する糸口として、我々は、ストレスを最初に感知する場である細胞膜に注目し、中でもその脂質成分の迅速な変動を解析した。その結果、ヒト由来の培養細胞に熱ストレスを与えると、ある種の糖脂質が特異的、かつ速やかに合成誘導されることを見出した。この分子を構造解析した結果、ステリルグルコシドの一種であるコレステリルグルコシド (Fig. 1) と同定された。

ステリルグルコシドは、種々のステロールにグルコースが $\alpha$ 、あるいは $\beta$ -グルコシド結合した分子であり、高等植物に広く存在している<sup>1,2)</sup>ほか、マイコプラズマ<sup>3)</sup>、酵母<sup>4)</sup>、真性粘菌<sup>5,6)</sup>、ヘリコバクター<sup>7,9)</sup>などにも存在する。ステロールやグルコースの輸送、膜融合などに関与する可能性や、グルコシルセラミド合成のグルコース供与体として働く可能性が示唆されているが、その生物学的・生理的機能についてはほとんど明らかにされていない。

本稿では、このステリルグルコシドの誘導が、細胞のストレス応答において積極的に関わっている可能性について、筆者らの最近の研究結果を基に考察したい。さらに、コレステリルグルコシドの経口投与がラットのストレス胃潰瘍の発症を抑制することを見出したので、その機構についても論じる。

2. 熱ストレスによって誘導されるコレステリルグルコシド

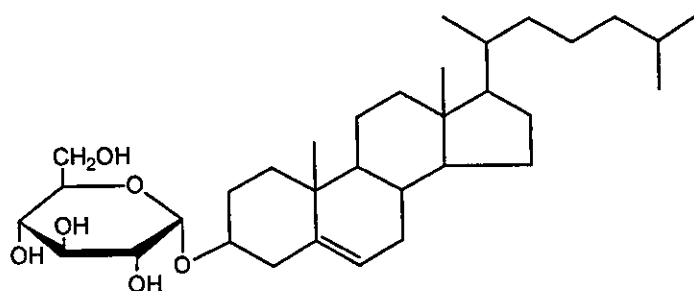
筆者らは、ヒト胎児由来正常繊維芽細胞 (TIG-3 細胞) を用いて、ストレス依存的に変動する脂質成分について詳細に解析した。37°Cで培養した細胞を、予め加温した培地に交換することによって42°Cに熱ショックを与え、その後も42°Cに保ちながら、経時的に細胞を回収して脂質抽出し、薄層クロマトグラフィーで分析した。その結果、熱ストレス後、15、および30分後に新たな脂質が検出され、その後60分後には消失した (Fig. 2)<sup>10)</sup>。この未知脂質は、標準物質として用いた真性粘菌由来のステリルグルコシドであるポリフェラステリルモノグリコシド (PSMG) よりやや小さなRf値を示した。また、呈色反応からこの物質は糖とステロールを含む脂質と推定された。なお、この時のHsp70は温度シフトしてから約60分後に誘導されており、この脂質の誘導はHsp70に先立って起こる現象であった。

この未知脂質を精製して構造決定した結果、 $\beta$ -コレステリルグルコシド (Fig.1) であった。熱ストレス依存的なステリルグルコシドの合成誘導は真性粘菌 *Physarum polycephalum* で初めて見出された現象<sup>6)</sup>であるが、ヒト由来培養細胞においても確認されたことになる。最近、酵母の一種 *Pichia pastoris* においても同様の報告<sup>11)</sup>がされており、熱ストレス依存的なステリルグルコシドの誘導は生物界に普遍的な現象であると考えら

れる。

TIG-3 細胞の膜面分には、UDP-グルコースからコレステロールへ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ており、この点、真性粘菌の場合<sup>12)</sup>と類似している。ステリルグルコシドの合成酵素については植物での研究が進んでおり、ムギやシロイヌナズナのUDP-グルコース：ステロールグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子がクローニングされ<sup>13)</sup>、続いて酵母や細胞性粘菌でも同種の酵素がクローニングされた<sup>14)</sup>。これらの配列には、植物、酵母、細胞性粘菌にわたって共通の保存領域が含まれており、UDP-糖転移酵素のスーパーファミリーであるUGT スーパーファミリーに共通の配列、ステロイド結合ドメインと考えられる領域などが予想されている。しかし、哺乳動物での遺伝子は、現在までのところ特定されていない。

(A)  $\alpha$ -コレステリルグルコシド ( $\alpha$ -CG)



(B)  $\beta$ -コレステリルグルコシド ( $\beta$ -CG)

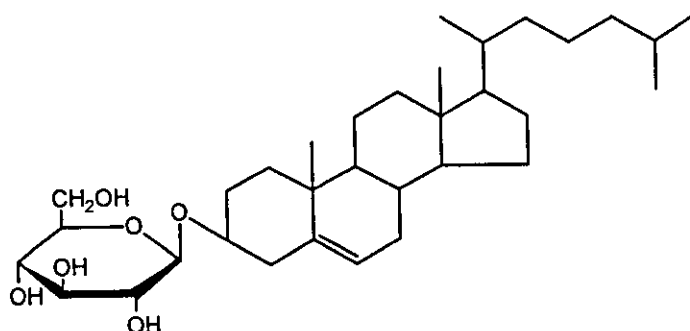


Fig. 1 コレステリルグルコシドの構造

(A)  $\alpha$ -コレステリルグルコシドは *Acholeplasma*, *Helicobacter pylori* などに存在する。(B)  $\beta$ -コレステリルグルコシドはタバコ、*Candida*、ニワトリ上皮などの他、ヒト繊維芽細胞に存在する。

### 3. コレステリルグルコシドによる Hsp の誘導

前述したように、熱ストレスによるコレステリルグルコシドの蓄積は、Hsp70 の誘導される時間よりも早く起こることから、Hsp誘導に至るシグナル伝達の上流にステリルグルコシドが位置することが考えられる。そこで、TIG-3 細胞の培養上清に有機合成したコレステリルグルコシドを添加した場合に、熱ストレスをかけなくともHsp70 誘導が起こるかを検討した。その結果、熱ストレス処理時より早い時間でHsp70 の誘導が観察されたことから、コレステリルグルコシドは細胞の熱ストレス応答における初期の段階で作られ、その後のHsp誘導を惹起する重要な分子であることが示唆された<sup>15)</sup>。

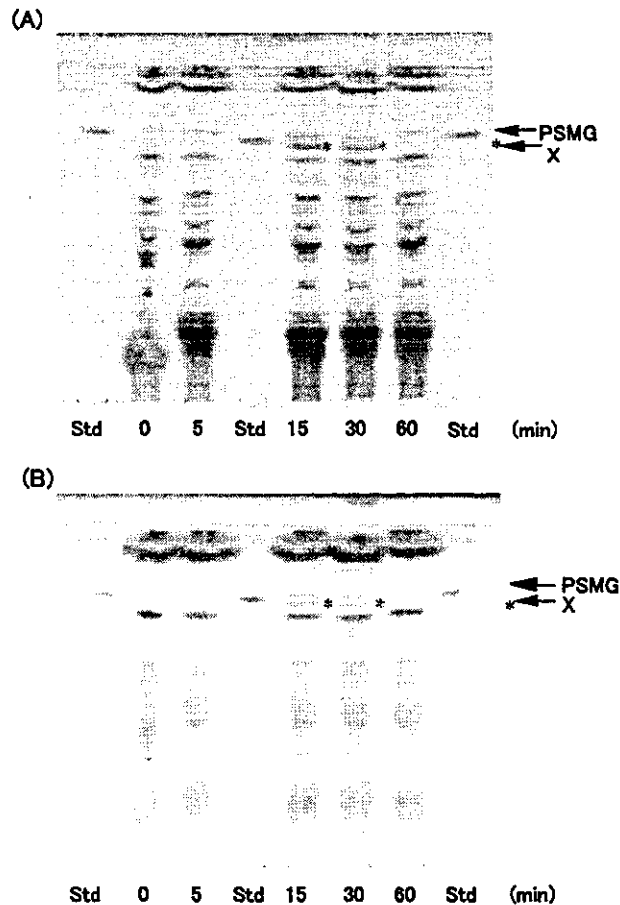


Fig. 2 ヒト正常繊維芽細胞 (TIG-3) での熱ストレスによる脂質組成の変化<sup>10)</sup>

37°Cで培養した TIG-3 細胞を 42°Cの培地に変換後、42°Cで 5、15、30、60 分間インキュベートした。その後、脂質成分を抽出して薄層クロマトグラフィーを用いて分析した。展開溶媒はクロロホルム/メタノール/水 (60:40:9) を使用した。(A) はオルシノール硫酸試薬による糖の発色、(B) は塩化第二鉄試薬によるステロールの発色を示す。PSMG; 標準品 (Std) として用いた真性粘菌由来のポリフェラステロールモノグルコシド。X: 熱ストレスにより誘導されたステロール配糖体。

さらに筆者らは、ラットから摘出した胃粘膜細胞を初代培養して *in vitro* で熱ストレスを与えることにより、胃粘膜におけるストレス応答の解析を行った。その結果、ラット胃粘膜細胞においても TIG-3 細胞と同様に、熱ストレス依存的に速やかなコレステリルグルコシドの増加が観察され、引き続き Hsp70 の誘導が見られた。

以上の知見をもとに、ステリルグルコシドを介する細胞ストレス応答の分子機構について考察すると、Fig.3 に示したようなスキームが想像される。すなわち、細胞が熱ストレスなどに曝されると、細胞膜の物性変化を介して細胞膜のステリルグルコシド合成酵素が活性化されてステリルグルコシドが合成誘導される。蓄積したステリルグルコシドは、細胞内に存在するある種のタンパク質キナーゼを活性化するなどして、最終的に HSF1 をリン酸化して活性化し、HSE との結合を介して Hsp 遺伝子の発現を誘導する。細

胞内のタンパク質キナーゼの存在とその活性化機構など今後検討していくべき課題も多いが、ステリルグルコシドを中心とした新たな細胞内ストレス応答機構として注目される。

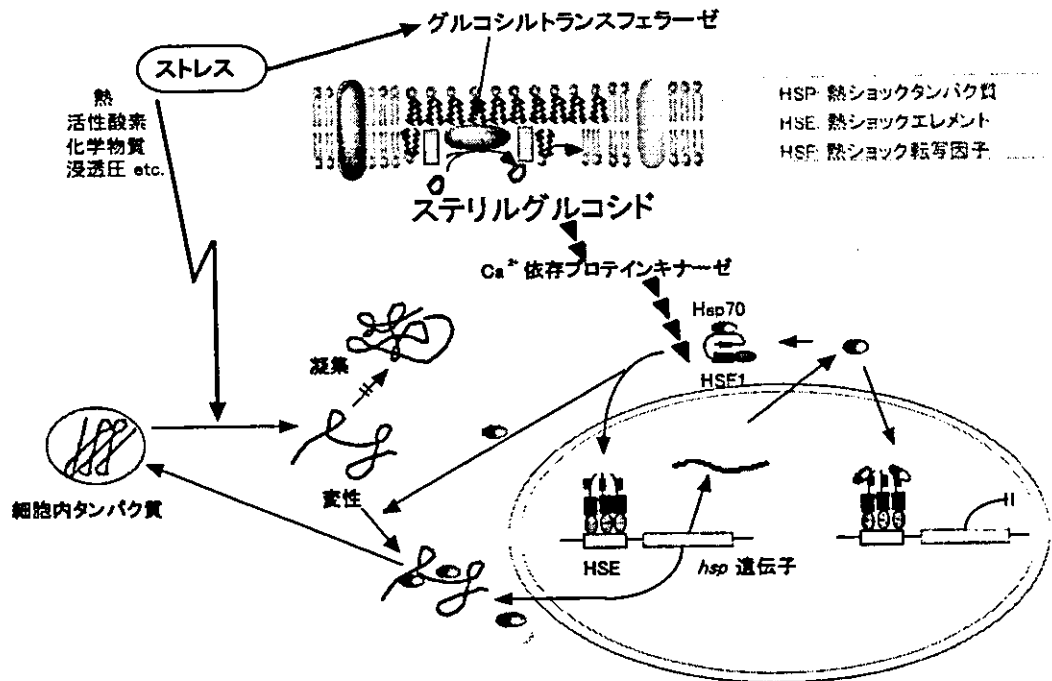


Fig. 3 ステリルグルコシドを介するストレス応答の分子機構 (仮説)

ストレスを受けると、細胞膜に存在するグルコシルトランスフェラーゼが活性化され、ステリルグルコシドが合成される。ステリルグルコシドによりある種のプロテインキナーゼが活性化され、このキナーゼによって HSF1 がリン酸化、活性化されて Hsp 発現を誘導する。

#### 4. コレステリルグルコシドの抗胃潰瘍作用

細胞内ストレス応答において、Hspはタンパク質変性を防ぐ分子シャペロンとして働き、その誘導は様々なストレスに対して細胞保護作用を示す。一方、拘束ストレスなどの個体レベルで受けるストレスによっても、内分泌系や自律神経系によるストレス反応を介して、最終的には細胞レベルでのストレス応答が惹起され、その結果、細胞内でHspが誘導されることが生体防御に役立っていると考えられている。Hspは、虚血・再灌流などによる酸化ストレス、低濃度アルコールなどの物理的・化学的傷害因子に対して抗アポトーシス作用を示す。また、高濃度のエタノールによる急性ネクロシスもHsp70により抑制されることが示されている<sup>16)</sup>。したがって、このHsp誘導を医薬品や食品分野へ効果的に利用することが期待される。ラットを用いた寒冷拘束ストレスによる消化器潰瘍の発症モデルでも、胃粘膜細胞での適度なHspの誘導が細胞保護作用を発揮して潰瘍症状の軽減化をもたらすと考えられており、現在、抗潰瘍薬として臨床的に使われているテブレノン<sup>®</sup>は、その主要な作用機序としてHsp誘導が報告されている<sup>17)</sup>。胃の血流調節や胃