

200401149 B

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全性高度化推進研究事業

数種の食用油に含まれる微量有害因子  
に関する研究

平成14年度～平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 奥山治美

平成 17 (2005) 年 3 月

## 目 次

I. 総合研究報告	
数種の食用油に含まれる微量有害因子に関する研究 -----	1
奥山 治美	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	21
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	22

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)

総合研究報告書

## 数種の食用油に含まれる微量有害因子に関する研究

平成 14 年度～平成 16 年度

主任研究者 奥山 治美 (名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授)

### 【研究要旨】

数種の食用油は大豆油に比べて脳卒中易発症性(SHRSP)ラットの寿命を異常に短縮し、微量有害因子の存在を想定している。本研究はこの有害因子を同定し、寿命短縮作用をもたない食用油を供給することを最終目的としている。具体的には、寿命短縮作用を示すカノーラ油、オリーブ油を40kg単位で分画し、有害因子の分離法を探ること、寿命短縮にいたる臓器障害を多面的に解析すること、種子の微量成分を化学的に、また生化学的に解析すること、などを目的としている。

#### 方法(とくに記載のない限り SHRSP ラットを使った)

CO<sub>2</sub> 超臨界流体抽出法、遠心分子蒸留法等でカノーラ油、オリーブ油を分画し、分画物の寿命短縮活性、組織の病理評価、および/あるいは血管内皮細胞管腔形成系(*in vitro*)に及ぼす影響等を評価した。また油糧種子の微量成分について化学的に解析し、それらの生物活性を調べた(*in vitro*)。一方、カノーラ油の自発行動(マウス)、金属イオン代謝、ステロイドホルモン代謝系に及ぼす影響を評価した。さらに、ヤギの成育に及ぼすカノーラ粕の影響を評価した。

#### 主な成果

- ① 超臨界抽出法によるカノーラ油の低圧抽出部(180bar)は寿命短縮作用を示さず、安全な油であった。ただし収率が低く(約10%)、産業化には更なる研究が必要であった。高圧(360bar)抽出部、残留油には活性が残っていた。残留油の心臓・腎臓などに対する障害の程度が強かった(大豆油対照)。
- ② 分子蒸留法では、カノーラ油、オリーブ油とも、残留油画分(収率>90%)の寿命短縮活性が元の油より強い傾向を示した。この画分に寿命短縮因子が濃縮されたか、あるいは防御因子がこの画分から除かれた可能性が示された。オリーブ油の蒸留油画分は強い寿命短縮活性を示したが、カノーラ油の蒸留油画分には活性が認められず、食用油間で微量成分に質的な差がある可能性が示された。
- ③ 植物ステロール含量と寿命短縮活性には相関がなかった。
- ④ カノーラ油のトラップ画分(分子蒸留法)に血管管腔形成阻害活性(*in vitro*)が認められたが、他の画分には認められなかった。油糧種子の数種の微量成分は、多様な生物活性を示した(*in vitro*)。
- ⑤ カノーラ油はブタ、ラットで血小板数を減らす、それに対応する組織変化(腎障害、骨髄巨核球減少、脾臓巨核球増加、髄外造血亢進)がSHRSPラットで認められた。
- ⑥ カノーラ油および硬化大豆油は大豆油に比べ、精巣テストステロン含量を有意に低下させ、血清テストステロンレベルを低下させる傾向を示した。超臨界抽出法分画物の間では、精子数、運動性精子数には差がなかったが、直線運動する精子の割合は残留油画分で低下する傾向がみられた。SHRSPラットでは出生数、仔の生存率の低下があり、これらの油に内分泌攪乱作用が認められた。
- ⑦ ヘキサン脱脂法によるカノーラ粕はヤギ、SHRSPラットの成育に悪い影響を与えず(大豆粕対照)、これらに対し安全であると結論した。一方、カノーラ油はSHRSPラットの血清銅イオン、セルロプラスミンのレベルを有意に上げたが、プリオン蛋白量には影響を与えなかった。雌マウスの自発運動、不安誘発頻度に差は見られなかった(カノーラ油群対大豆油群)。

これらの結果に基づき、人の健康に及ぼすこれら食用油の影響を考察した。

【分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名】

大原直樹	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所	副部長
小野寄菊夫	名古屋市立大学大学院 薬学研究科	教授
今泉勝己	九州大学大学院 農学研究院	教授
藤井陽一	名古屋市立大学大学院 薬学研究科	助教授
永津明人	名古屋市立大学大学院 薬学研究科	講師
大谷 滋	岐阜大学 応用生物科学部	教授
加治和彦	静岡県立大学大学院生活健康科学研究科	教授
小林哲幸	お茶の水女子大学 理学部生化学科	助教授
井上 誠	名古屋市立大学大学院 薬学研究科	助教授
門田重利	富山医科薬科大学 和漢薬研究所	教授
渡辺志朗	富山医科薬科大学 和漢薬研究所	助教授
小川 博	近畿大学 医学部基礎医学科	講師

## A. 研究目的

数種の食用油は、大豆油やシソ油に比べて脳卒中易発症性 (SHRSP) ラットの寿命を異常に短縮する。その作用は脂肪酸組成の差では説明できないことから、微量有害因子の存在を想定した。本研究はこの有害因子を探索・同定し、寿命短縮作用を示さない食用油を創出・供給することを最終目的としている。具体的には、CO<sub>2</sub> 超臨界流体抽出法、遠心分子蒸留法などによって食用油を分画し(～40kg)、有害因子の分離法を探ること、寿命短縮にいたる臓器障害を多面的に解析すること、種子の微量成分を化学的・生化学的に解析すること、などを目的とした。

## B. 研究方法 (詳細は平成 16 年度総括研究報告書の各分担者報告に記述した)

### 動物と飼育

脳卒中易発症性高血圧自然発症 (SHRSP) ラットに普通食 (日本クレア、CE2) と試験油を 9:1 の割合で混ぜ、離乳期 (4 週齢あるいは 5 週齢) より給餌した。寿命 (生存率) を指標とする場合は食塩水 (0.5～0.3%) を負荷し、あるいは食塩を混餌することにより、約半年で結果が求められるが大豆油群とカノーラ油群に有意な生存率の差が認められるが条件 (各群 12 匹以上) とした。この条件と異なる場合は、該当個所に説明を加えた。

### 食用油の分画

カノーラ油を超臨界抽出法 (委託: 茂利製油(株)、三重) で、低圧 (180bar) 抽出画分 (約 12%)、高圧 (350bar) 抽出画分 (約 68%)、残留油画分 (約 20%) の 3 画分に分離し、寿命短縮活性、組織病理などを評価した。分子蒸留法 (委託: 交洋ファインケミカル、京都) でカノーラ油、オリーブ油を残留油 (約 93%)、蒸留油 (3%)、凝集面付着部 (<1%)、(コールド) トラップ部 (<

1%) の 4 画分に分けた。各分画について寿命短縮活性を評価した。

### 組織評価

組織病理評価は死後および 8 週齢の SHRSP ラットについて、常法により行なった。

### 内分泌攪乱作用 (SHRSP ラット)

大豆油を対照とし、寿命短縮作用を示すカノーラ油および硬化大豆油を 10% 含む餌で 16 週齢まで飼育し (食塩負荷なしの条件)、臓器ステロイドホルモン含量、ステロイド合成酵素活性を測定した (分析委託: 帝国臓器メディカル、川崎)。また、仔 (F1) の離乳期より大豆油食、カノーラ油食を変換し、生存率、出生数を求めた。

一方、Wistar ラットを卵巣切除あるいは精巣切除し、組織重量等に及ぼすカノーラ油の影響を評価した。

### 油糧種子微量成分の探索、および化学的・生化学的解析

植物ステロールおよびそれ以外の微量成分について化学的解析を行ない、それらの生理活性を *in vitro* のアッセイ系 (ヒト臍帯血管内皮細胞管腔形成系等)、あるいはストレス性胃潰瘍形成モデル (ラット) で評価した。

### 雌性マウスの行動への影響評価

C57BL/6 マウス (雌) をカノーラ油あるいは大豆油を 10% 含む餌で飼育し、8 ヶ月にわたって自発運動、不安誘発頻度を比較した。

### ヤギ、SHRSP ラットの成長に及ぼすカノーラ粕の影響評価

母ヤギ (各群、n=3) およびその仔ヤギの成長に対するカノーラ粕 (n=5) と大豆粕 (n=3) の影響を評価した。また SHRSP ラットの生存率に及ぼすこれらの粕、油の影響を

評価した。

### プリオンタンパク、金属イオン代謝に及ぼす影響

SHRSP ラットの生存率に差のあるカノーラ油群と大豆油群について、脳のプリオン蛋白の発現、血清の銅イオンと亜鉛イオン(原子吸光法)、およびセルロプラスミン(比色法)のレベルを比較した。

(倫理面への配慮)

動物実験は成長や生存率、行動評価が主要な指標である。組織採取を必要とする場合は安楽死させた。すべての動物実験は各

研究施設の倫理委員会で承認された範囲である。ヒト臍帯血管内皮細胞は株化されているものである。その他、とくに配慮すべき倫理面での問題点は見当たらない。

### C. 研究結果

#### 1. 超臨界抽出法によるカノーラ油の分画と分画物の評価

カノーラ油の低圧抽出部(180bar, 12%収率)は寿命短縮作用を示さず(SHRSP ラット)、安全な油であった。高圧抽出部(350bar, 20%収率)、残留油(68%収率)には短縮活性が元の油と同程度、残っていた(図1)。生存率の統計的解析結果を表1に示した。

図1 カノーラ油の超臨界抽出物とSHRSPラットの生存率(大豆油対照)

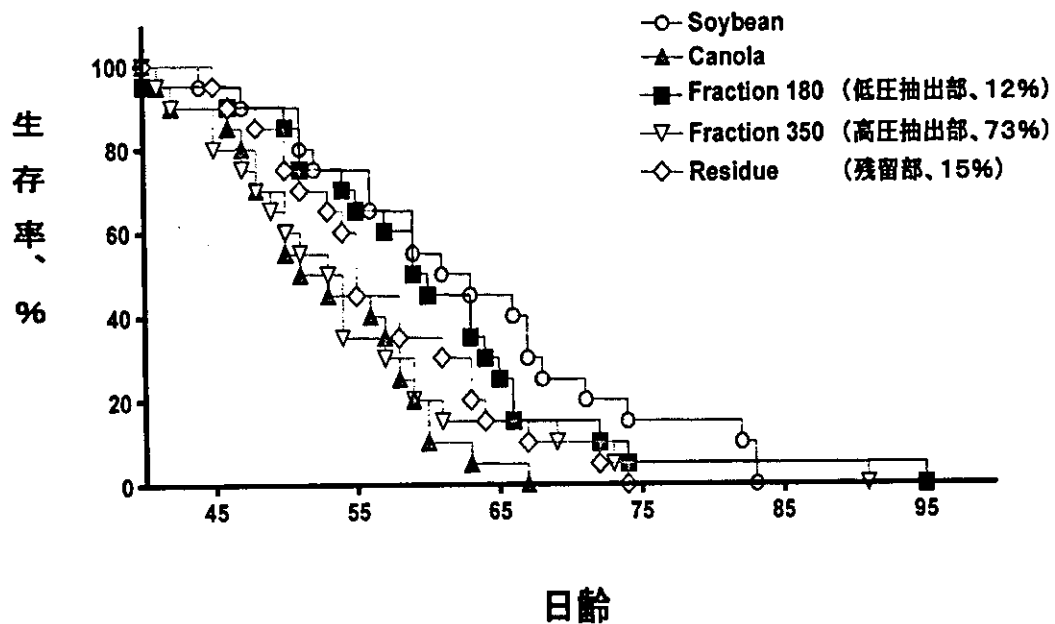


表1 カノーラ油超臨界抽出物の生存率についての統計的解析(大豆油、カノーラ油対照)

Group	Median (day)		P value		Mean±S.E.
			vs. Soybean oil	vs. Canola oil	
Soybean	62	Log rank	-----	0.0011#	63±3
		Wilcoxon	-----	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、抽出残留油群。

† 大豆油群に対して、# カノーラ油群に対して有意な差。

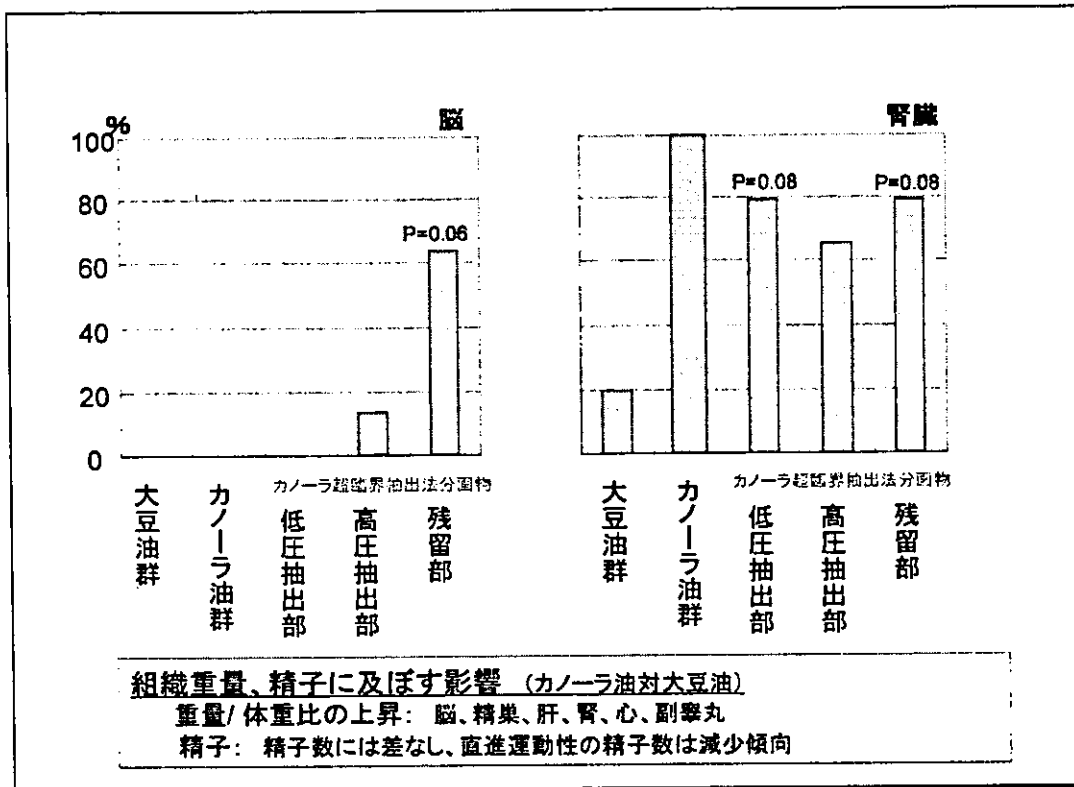
\* p<0.05、大豆油群に対して有意な差(Dunnett's検定)。N=20。

組織病理像の解析結果の詳細は平成15、16年度 大原分担研究報告書に記載した。残留油群の脳病変が著しかった(図2)。腎臓では、カノーラ油群およびカノーラ油超臨界抽出物群の病変が大豆油群より著しかったが、生存率と病変の相関は明確ではなかった。新鮮死体の組織では、カノーラ油とそ

の分画物群で腎障害、骨髓巨核球数の減少、髄外造血の亢進、脾臓巨核数の増加が顕著であり、血小板数の減少に対応した病変が認められた。

カノーラ油群の脳、肝臓、腎臓、心臓、精巣、副睾丸で重量/体重比が大豆油群より有意に大きかった。

図2 SHRSPラットにおける中程度以上の病変の頻度—カノーラ油超臨界抽出物の影響



2. 分子蒸留法によるカノーラ油、オリーブ油の分画物の生存率評価

SHRSPラットの生存率は、残留油群(収率>90%)<カノーラ油群<大豆油群、蒸留油/大豆油群の順であった(図3)。すなわち、残留油では有害因子が濃縮されたかあるいは防御因子が除かれた可能性が示された。カノーラ油の分子蒸留分画物とSHRSPラット

の生存率に関する統計的解析結果を表2に示した。カノーラ油分画後の残留油画分の寿命短縮活性が元の油より強いという傾向が見られた。すなわち、寿命短縮因子が濃縮されたか、あるいは寿命短縮作用に対する防御因子がこの画分から除かれた可能性が示された。



図3 SHRSPラットの生存率(0.3%食塩水負荷)—カノーラ油の分子蒸留分画物の影響

カノーラ油)、残留油 (MD-R)、蒸留油/大豆油混合油 (MD-D)、大豆油 (Soy) の比較。他の食餌群については、表 2 参照。

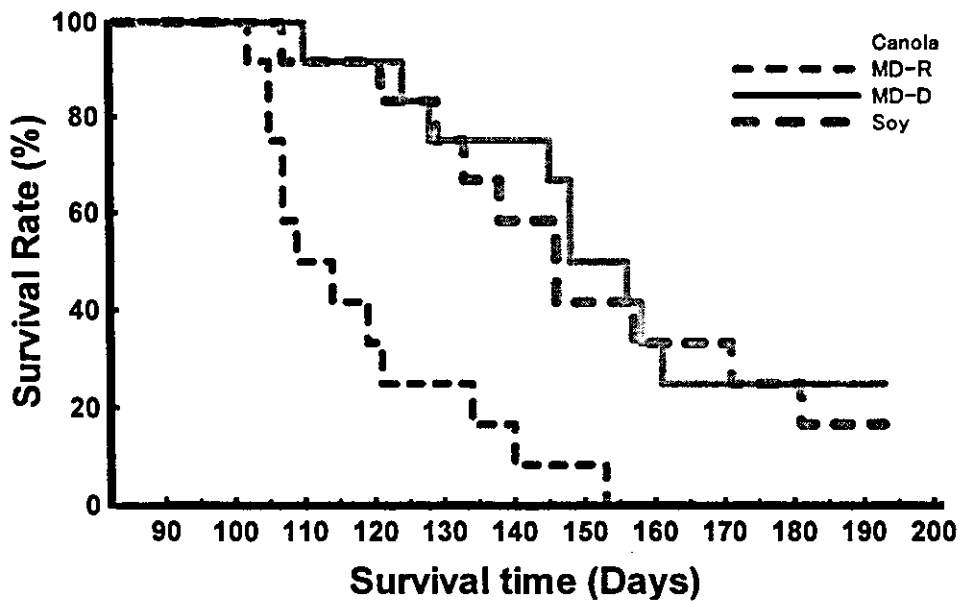


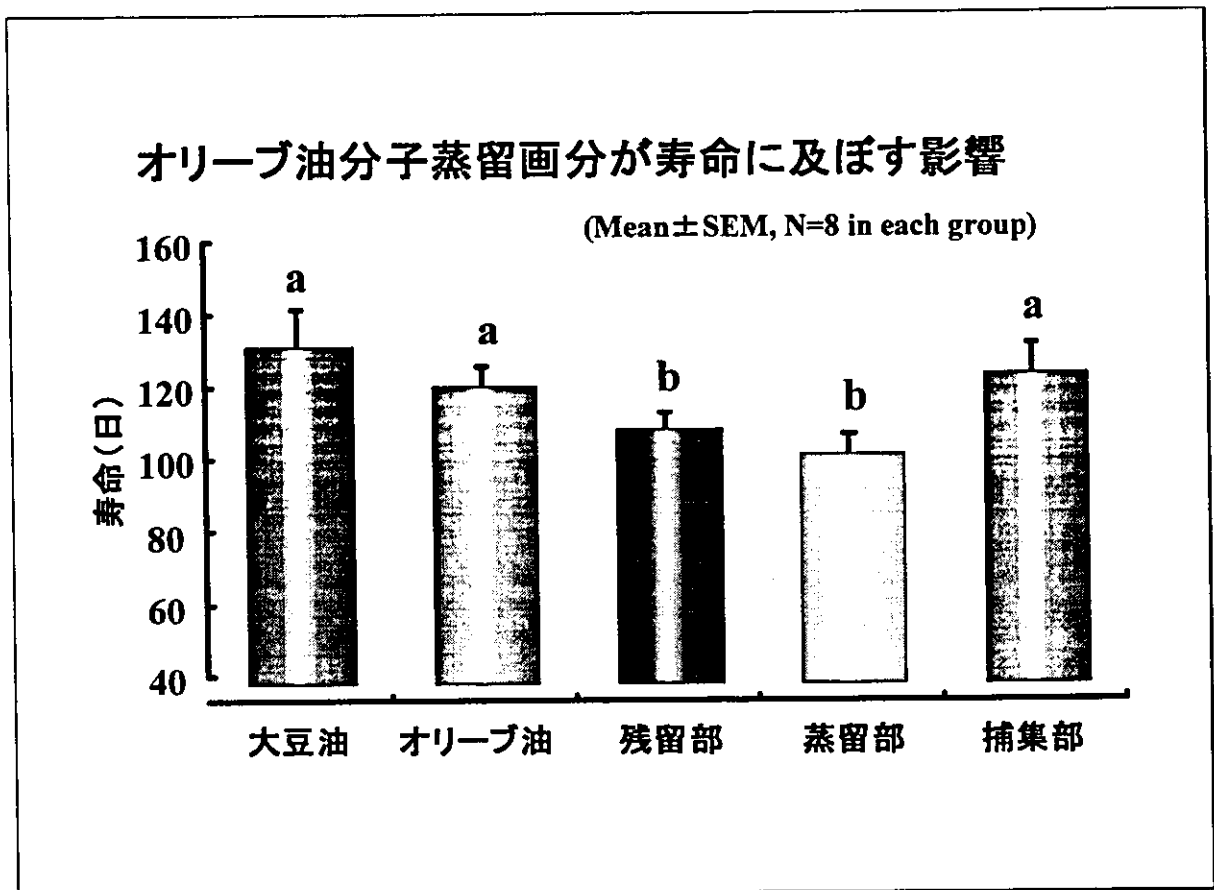
表2 カノーラ油分子蒸留分画物の生存率についての統計的解析(大豆油、カノーラ油対照)  
カノーラ油 (Can), 残留油 (MD-R)、蒸留油/大豆油混合 (MD-D)、蒸発面凝集物/大豆油混合 (MD-A)、トラップ部/大豆油混合 (MD-C)、大豆油 (Soy)、基本飼料(CE-2)の比較をおこなった。

	Can	MD-R	MD-D	MD-A	MD-C	MD-M	Soy	CE-2
Days ±	129±6	118±5	155±8	147±8	154±9	129±6	151±8	151±9
v.s. Can								
Log-rank		0.159	0.021	0.101	0.019	0.834	0.028	0.076
Wilcoxon		0.138	0.027	0.124	0.061	0.954	0.053	0.11
v.s. MD-R								
Log-rank			<0.001	0.005	0.001	0.128	0.001	0.004
Wilcoxon			<0.001	0.002	0.004	0.085	0.002	0.002
v.s. Soy								
Log-rank			0.663	0.689	0.608	0.022		0.938
Wilcoxon			0.644	0.544	0.729	0.037		0.729

Values represent means ±SEM (n=12). Significance of differences was analyzed by Log-rank test and Wilcoxon test.

一方、オリーブ油の分子蒸留分画物について影響を調べた。  
 て、SHRSPラットの生存率（図4）に及ぼす

図4 SHRSPラットの生存率—オリーブ油分子蒸留分画物の影響(食塩混餌)



カノーラ油の場合と同様に、残留油分画は元のオリーブ油より寿命が短かった。一方、カノーラ油の蒸留油分画には寿命短縮活性が認められなかったが(図3)、オリーブ油の蒸留油分画は最も活性が強かった(図4)。

### 3. 植物ステロールと生存率の関係

カノーラ油の分画により、主分画物の間に有意な脂肪酸組成の差は認められなかつ

た。

超臨界抽出法によるカノーラ油分画物を含む餌の主要植物ステロール含量を表3に示す。また、分子蒸留法によるカノーラ油分画物を含む餌の主要植物ステロール含量を表4に示す。

表3 超臨界抽出法によるカノーラ油分画物の植物ステロールの含量(飼料中のステロール、mg/100g)

基本食(CE-2)およびカノーラ油(Canola)、低圧抽出部(Fr.180)、高圧抽出油(Fr.350)、残留油(残渣)、大豆油(大豆)を10%含む餌の比較を行なった。

	CE-2	Canola	Fr. 180	Fr. 350	残渣	大豆
ブラシカステロール	-	7	15	6	6	-
カンペステロール	27	41	53	39	51	26
スティグマステロール	10	8	10	8	8	14
$\beta$ -シトステロール	65	87	106	82	100	67
総計	102	143	184	135	165	107
コレステロール	69	59	61	60	58	58

表4 分子蒸留法によるカノーラ油分画物を含む餌の植物ステロールの含量(飼料中のステロール、mg/100g)

	Can	MD-R	MD-D	MD-A
Cholesterol	72.19 $\pm$ 3.57	59.83 $\pm$ 2.68	67.94 $\pm$ 5.36	65.65 $\pm$ 0.11
Brassicasterol	5.50 $\pm$ 0.36	1.93 $\pm$ 0.06	6.35 $\pm$ 0.84	0.42 $\pm$ 0.23
Campesterol	24.09 $\pm$ 1.27	20.91 $\pm$ 3.34	26.15 $\pm$ 2.22	13.60 $\pm$ 0.97
Stigmasterol	4.88 $\pm$ 0.20	4.52 $\pm$ 0.05	9.73 $\pm$ 0.74	8.43 $\pm$ 0.29
$\beta$ -Sitosterol	63.42 $\pm$ 3.58	48.65 $\pm$ 6.13	71.79 $\pm$ 3.44	49.28 $\pm$ 3.17
Phytosterol	97.89 $\pm$ 3.11	76.01 $\pm$ 9.48	114.03 $\pm$ 7.13	71.73 $\pm$ 2.27
PS/chol ratio	1.36 $\pm$ 0.03	1.28 $\pm$ 0.22	1.68 $\pm$ 0.09	1.09 $\pm$ 0.03

	MD-C	MD-M	Soy	CE-2
Cholesterol	64.53 $\pm$ 5.49	63.75 $\pm$ 1.51	54.73 $\pm$ 5.44	59.25 $\pm$ 2.06
Brassicasterol	0.00 $\pm$ 0.00	7.98 $\pm$ 0.24	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Campesterol	14.43 $\pm$ 1.12	27.64 $\pm$ 1.85	16.47 $\pm$ 0.64	12.34 $\pm$ 2.41
Stigmasterol	9.39 $\pm$ 0.66	4.52 $\pm$ 0.44	8.55 $\pm$ 0.88	4.73 $\pm$ 0.18
$\beta$ -Sitosterol	49.46 $\pm$ 7.56	65.18 $\pm$ 2.10	51.49 $\pm$ 4.61	32.58 $\pm$ 1.55
Phytosterol	73.28 $\pm$ 8.75	105.32 $\pm$ 3.20	76.51 $\pm$ 4.86	49.65 $\pm$ 3.69
PS/chol ratio	1.14 $\pm$ 0.14	1.65 $\pm$ 0.04	1.40 $\pm$ 0.05	0.84 $\pm$ 0.03

各種食用油の植物ステロール含量と生存率の間には相関が見られない。大豆油と硬化大豆油は植物ステロール含量がほとんど同じであるが、生存率には大きな差があった。同様に高オレイン酸型紅花油と高リノール酸型紅花油の間には植物ステロール含量に大きな差が無いにもかかわらず、生存率には大きな差があった。

カノーラ油、カノーラ油超臨界法分画物、大豆油について、植物ステロール含量と生存率の間に相関は認められなかった。同様に、カノーラ油、カノーラ油分子蒸留分画物、大豆油について植物ステロールと生存率の間に相関は認められなかった。植物ステロールは分子蒸留法で残留油から除かれるが、寿命短縮活性はむしろ残留油で強かった。すなわち、主要植物ステロール (campesterol, brassicasterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol) は、この条件で寿命短縮活性の本体ではなかった。

#### 4. 分子篩法による分画

架橋デキストランカラムを用い、クロロホルム-メタノール (19:1水飽和) →メタノール-水 (1:1) 系でゲル濾過し、3画分を得た。餌の油含量を5%に減らして寿命短縮活性を評価したが、明確な結論は得られなかった。

#### 3. 種子の微量成分とそれらの作用生理作用—化学的・生化学的解析

血管内皮細胞 (HUVEC) の3次元培養系を用い、その管腔形成に及ぼすカノーラ油の分子蒸留画分、超臨界抽出画分 (19種類) の影響を評価した (*in vitro*)。カノーラ油のトラップ画分 (分子蒸留法分画) に血管腔形成阻害活性が認められ (50  $\mu$ g/mL)、この活性は他の画分には認められなかった。このトラップ画分にエイコサノイド合成阻害作用をもつ4-butylresorcinolが同定された。これが血管腔形成阻害活性や防御因

子の本体であるか否かは、現在のところ不明である。

紅花油粕からセロトニン誘導体 (フェルラ酸あるいはクマリン酸とアミド結合した物質) を同定した。これらは虚血—再還流障害を抑制し、抗酸化作用を示し、炎症性サイトカインの産生を抑制し、NF- $\kappa$ Bの活性化を行うなど、*in vitro*で多様な作用を示した。

一方、大豆ステリルグルコシドが、ストレス応答タンパク (HSP70) の産生を介することなく、胃潰瘍形成を抑制することを明らかにした。また、カノーラ油由来の酸化植物ステロールは、SHRSPラットの寿命を短縮しなかった。

これらの微量成分と寿命短縮作用の関わりは明らかではないが、“トリアシルグリセロール以外にも多くの微量生理活性成分が食用油に含まれている”、という解釈を支持している。

#### 5. カノーラ油、硬化大豆油の内分泌攪乱作用

##### (ア) 組織ステロイドホルモン

カノーラ油群と大豆油群の脳、肝臓で発現している遺伝子をDNAマイクロアレイ法で検索した (食塩負荷なし、16週齢)。発現量に差のあった多くの遺伝子群の中から、ステロイドホルモン代謝系に注目した。すなわち、androgen-binding protein, hydroxysteroid 17  $\beta$ -dehydrogenase 7, hydroxysteroid 17  $\beta$ -dehydrogenase 2, hydroxysteroid 3  $\beta$ -dehydrogenase, CYP2A1などの発現レベルの低下、arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-like, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2などの上昇がマイクロアレイ法で認められた。遺伝子発現の差を正確に評価するには別法による確認が必要であるが、これらの結果に基

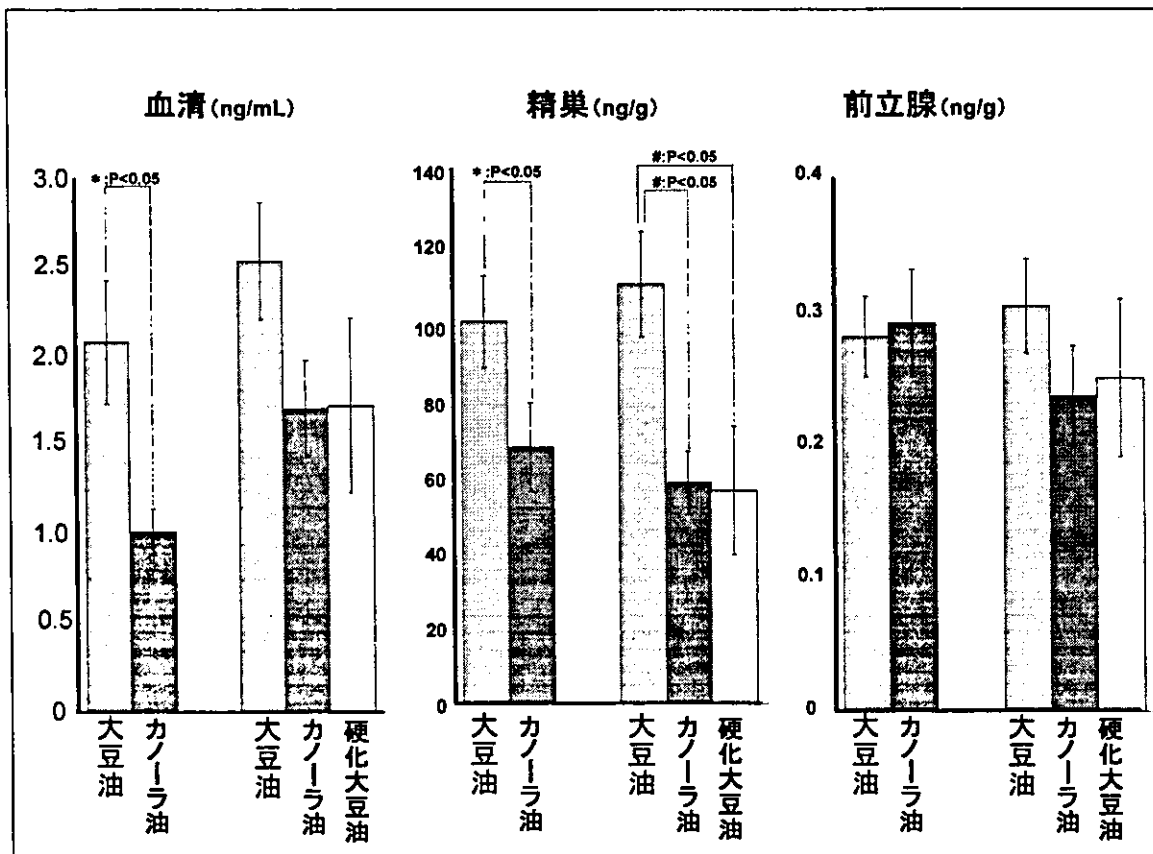
づき、組織ステロイドホルモンを分析した。

カノーラ油は大豆油に比べ、SHRSPラットの血清および精巣において、テストステロン含量を有意に低下させた。前立腺では有意な差が認められなかった。前立腺のジヒドロテストステロン含量には有意な差が認められなかった。血清および副腎のコルチコステロン含量には有意な差がなく（雌雄）、また卵巣エストラジオール含量にも差が認められなかった。ただし、雌の性周期を同調させていないので、エストラジオールに

関しては不確定な面がある。副腎（雌雄）および精巣、卵巣の $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase活性には、有意な差が認められなかった。

これらの結果の重要性にかんがみ、寿命短縮作用を示す硬化大豆油を加え、有意差のあったテストステロンに注目して再度、食用油の影響を評価した。ほぼ前年度の結果が再現され、カノーラ油群、硬化大豆油群の精巣テストステロン含量は大豆油群に比べ、有意に低かった（図5）。

図5 SHRSPラットの組織テストステロン含量に及ぼす油脂の影響



(イ) 精子への影響

超臨界抽出法によるカノーラ油分画物を与えた群は大豆油群に比べ、精子数、運動している精子の数には差がなかったが、直線運動する精子の割合が残留油画分で低下

する傾向が認められた。

(ウ) 生殖生理に及ぼす影響

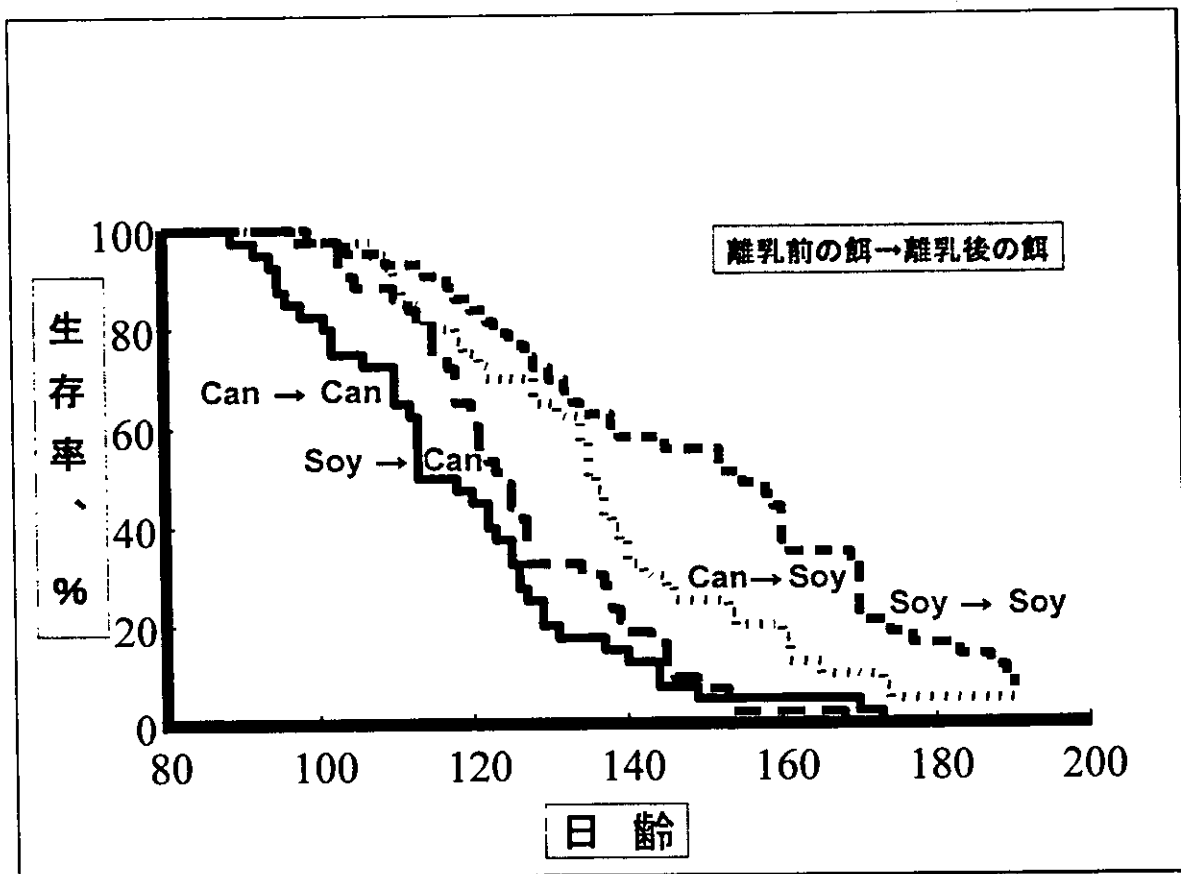
カノーラ油食 (Can) あるいは大豆油食 (Soy) で飼育した雌 (F0) を11週齢で交配し、仔 (F1) を得た。離乳期まで育った仔

(F1) の数 (親1匹当たり) は、Can群 (7.9匹) がSoy群 (8.9匹) より少ない傾向を示した。

仔 (F1) を離乳期以後、それぞれランダムに2群にわけ、同じ餌で飼育するか (Can→Can群、Soy→Soy群) あるいは餌を変換し

た (Soy→Can群、Can→Soy群)。平均生存期間はCan→Can群、Soy→Can群、Can→Soy群、Soy→Soy群の順に長くなり、親 (F0) の摂取した餌が仔 (F1) の生存期間に影響を与えることが示された (図6)。

図6 親の摂取した餌が仔の生存率に影響を与える



(エ) 卵巣摘出あるいは精巣摘出 Wistar ラットの生殖器官に及ぼすカノーラ油の効果

卵巣摘出の Wistar ラットでは、カノーラ油のエストロゲン受容体モデュレーター活性は認められなかった。しかし精巣摘出ラットでカノーラ油は精嚢重量を減少させ、脾臓重量を減少させた。

(オ) マウス行動に及ぼす影響

雌マウス (C57BL/6) の自発運動、不安誘発頻度に差は見られなかった。すなわち、雄マウスでの結果は雌では再現できなかった。

## 6. 脱脂粕の安全性評価

家畜飼料として供給されている大豆粕、カノーラ粕は脂質含量が極めて低く、ヘキサソ脱脂法による粕であると判断した。このことは、産業界情報で確認した。このカノーラ粕は大豆粕と同様にヤギの育成に悪

い影響を与えず（親、仔）、SHRSPラットの寿命も短縮せず、これらに対し安全であると結論した。

7. カノーラ粕、カノーラ油がプリオンタンパクの発現と金属イオン代謝に及ぼす影響

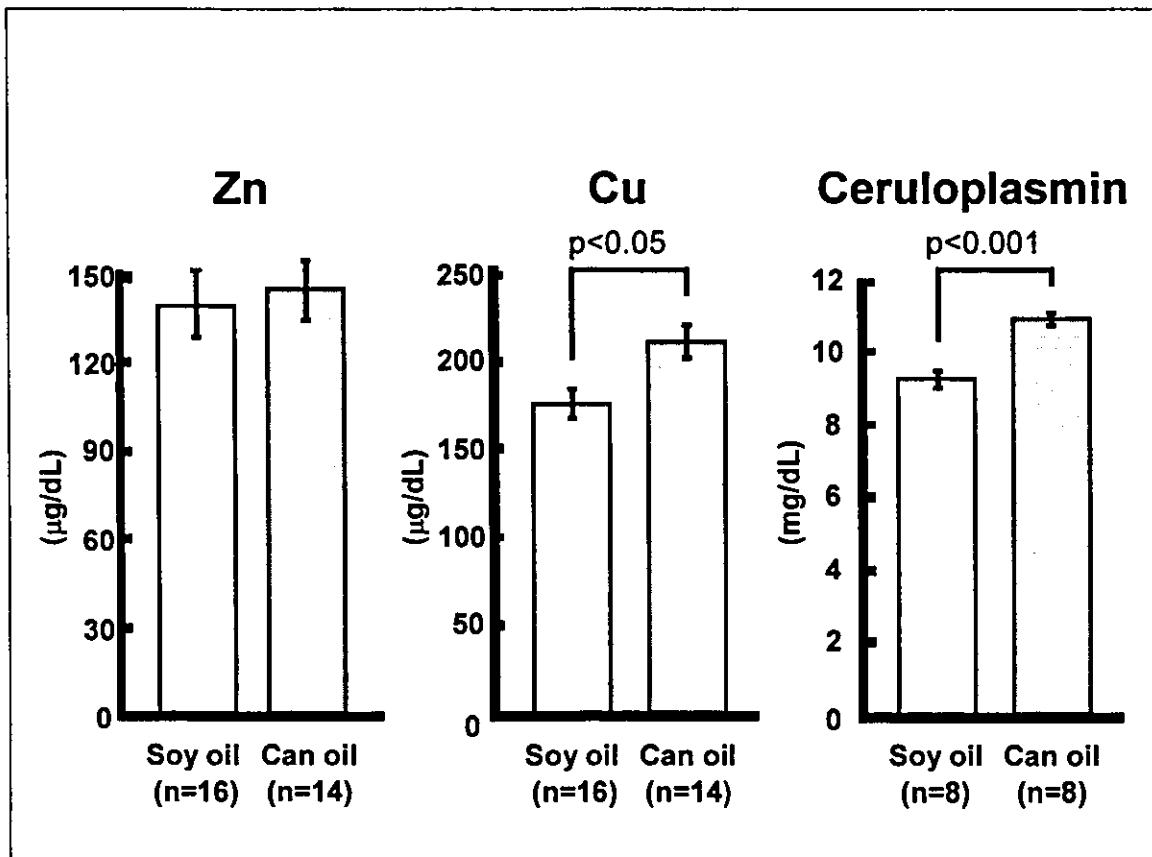
プリオンタンパクは細胞表面にあり銅イオン代謝に関わっている。ナタネ（カノーラ種）は低銅、高マンガンの土地に育ち、この摂取がプリオンタンパクの異常化にかかわっている可能性が議論されている（イ

ンターネット情報）。

カノーラ粕は大豆粕に比べSHRSPラットの生存期間に影響を与えなかったが、カノーラ油群は大豆油群に比べ、SHRSPラットの寿命が有意に短かった。この条件（食塩水負荷）で、脳のプリオンタンパクの発現量には差がなかった。また異常プリオン（プロテイナーゼ K 抵抗性）は検出できなかった。

一方、カノーラ油群は大豆油群に比べ、血清の銅イオンとセルロプラスミンのレベルが有意に高かったが、亜鉛レベルには差がなかった（図 7）。

図 7 血清の銅、亜鉛、セルロプラスミンのレベルに及ぼすカノーラ油の影響(対大豆油) 平均値±SEMを示す。両群の比較は Student's t-test によった。



#### D. 考察

数種の食用油は SHRSP ラットの寿命を異常に短縮するが(図 8、表 6)、寿命を指標とすると長期の研究期間を要することから、他のラット系統では寿命短縮作用に関する知見は乏しい。SHRSP ラット、SHR ラットおよび WKY ラットは同系統であり、この順に血圧は低くなる。SHR ラットではカノーラ油の寿命短縮作用が再現されたといわれる

(Ratnayake WMN 博士、Health Canada)。これらのラット系統は共通して植物ステロールの排泄に関わる ABC トランスポーターに異常がある (Scoggan KA et al. (2003) J Lipid Res 44:911-6)。SHRSP ラットに特異な遺伝子異常としては、BDNF (brain-derived neurotrophic factor) 受容体 trkB のミスセンス変異が報告されている (Kageyama H ら, 1995)。

図 6 SHRSP ラットに対するカノーラ油、月見草油の寿命短縮作用 (食塩水負荷なし)  
他の生存率評価実験では、より短期間で活性評価ができるよう食塩を負荷した(n=12)。

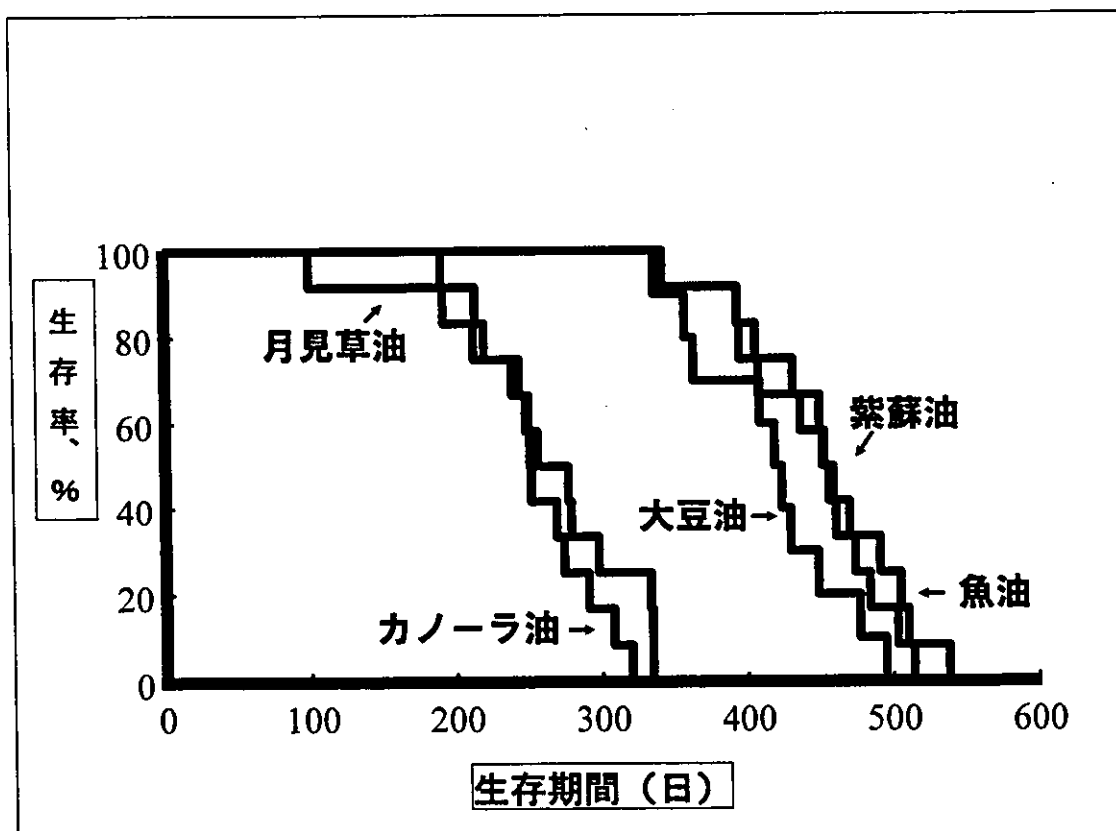




表 6 SHRSP ラットの寿命で評価した食用油の安全性

寿命を長く保ち安全	寿命を 1 割ほど短縮	寿命を 異常に短縮 *
紫蘇油 (エゴマ油) フラックス油 DHA 魚油	大豆油 ゴマ油 ラード バター 紅花油	菜種油、カノーラ油 オリーブ 油、月見草油、 高オレイン酸紅花油 高オレイン酸ひまわり油 コー ン油 硬化大豆油 硬化菜種油

\* 食塩水負荷なしの条件では 40%前後、負荷時には 10~20%。(斜字は高リノール酸型)

数年前、カナダ健康省 Ratnayake 博士、日本側の一部研究者、厚生省、日本植物油協会が集まり、“この問題はヒトの健康に大きな影響を及ぼさない”と総括したとされる (Ratnayake 博士談)。その根拠は、① SHRSP ラットは植物ステロールを貯めやすい特殊な動物である、② SHRSP ラットの寿命短縮効果は植物ステロールによる、③ 植物ステロールは医薬品素材になっており、特定保健用食品素材としても認可されており安全なものである、などであったとされる。

しかしながら、① オリーブ油は植物ステロール含量が低いにもかかわらず寿命短縮活性は最も強い例外である (Ratnayake ら)、② 紅花油の高オレイン酸型と高リノール酸型、カノーラ油とカノーラ油由来の遊離脂肪酸分画、大豆油と硬化大豆油のそれぞれの組み合わせは、植物ステロール含量がほぼ同じであるのに SHRSP ラットの寿命に及ぼす影響が著しく異なる、③ カノーラ油の寿命短縮活性を再現するには、数倍量の植物ステロール画分の添加を必要とする (小川分担研究者)、④ 超臨界抽出法

や分子蒸留法による分画物の植物ステロール含量と寿命短縮作用は相関しない (大原・奥山分担研究報告)、などから、主要植物ステロールやその酸化物 (今泉分担研究報告) は寿命短縮活性の本体 (主因) ではない、と結論できる。

CO<sub>2</sub> 超臨界流体抽出法で、SHRSP ラットに対する寿命短縮活性が実質的に除かれた低圧 (180bar) 抽出油が得られた (前年度の結果をほぼ再現)。ただし、この低圧抽出油の収率が 10%程度であり、このままで産業化できるとは考えがたく、分離条件の検討が必要である。この分画法では寿命短縮活性が著しく濃縮された画分は得られなかった。

分画物を与えた群の組織評価を行ったが、心臓、腎臓などの病理変化が再現性よく認められた。しかし、寿命短縮活性とは必ずしも相関しない面があり、性質の異なる複数の因子が関与している可能性が考えられる。カノーラ油は SHRSP ラットのほか、新生ブタや WKY ラットで血小板数を減少させるが、これに対応する腎臓、骨髄、脾臓の変化が組織病的に認められた (大原分担

者、藤井分担者)。

分子蒸留法により、寿命短縮活性を示さない改質カノーラ油が高収率で得られるという平成 15 年度報告の結果は再現できなかった。分画法と動物実験の両方、あるいはいずれかに問題があったと考える。この分子蒸留法によりカノーラ油とオリーブ油を再度、分画したが、どちらも残留油画分の寿命短縮活性が元の油より強い傾向を示し、有害因子と同時に防御因子が存在する可能性もある。一方、オリーブ油の蒸留油画分は強い寿命短縮活性を示したが、カノーラ油の蒸留油画分は活性を示さなかった。両食用油の間で質的に異なる微量有害因子が存在する可能性が示唆された。

SHRSP ラットでカノーラ油は血清テストステロンレベルを低下させる傾向を示し、精巣のテストステロンレベルを有意に低下させることが再現性よく示された(大豆油対照)。大豆油に対し硬化大豆油が寿命短縮活性を示すが、硬化大豆油も精巣テストステロンレベルを有意に低下させた。カノーラ油は仔(雄)の生存率を低下させること(SHRSP ラット)、精囊重量を減少させること(Wistar ラット)などから(平成 16 年度奥山分担報告)、カノーラ油などは雄性能に対し、より強い影響を示すのかもしれない。いずれにしても、わが国の植物油の 4 割以上を占めるカノーラ油や硬化大豆油に内分泌攪乱作用が認められたことは重要である。日本人のダイオキシン摂取量(2.6 pg/kg/day)と動物でのテストステロン低下作用量(161 pg/kg/day)の間には 60 倍の差があるが これらの植物油の場合は 2~3 倍以下の差しかないと計算される。

カノーラ粕はヤギや SHRSP ラットの成長に影響を及ぼさなかった。一般に圧搾粕には油分がかなり残存するが、ヘキサン脱脂粕の油分の残留量は極めて少ない。微量有害因子はヘキサン可溶であると考えられ、ヘキサン脱脂カノーラ粕はこれらの動物に安全であると結論した。カナダのグループ

は代用乳としてカノーラ油あるいは大豆油をつかった場合、新生ブタの生存率や血小板数に差が出たと報告しているが(Innis SM et al, 1999; Sauer FD et al., 1997)、このようなアッセイ系で、両植物油の生理作用が異なるかどうかを確認する必要がある。

SHRSP ラットの脳プリオンタンパク発現には、カノーラ油は影響しなかった。この条件で、異常プリオンタンパクが生成しているかどうかは、結論できていない。しかし、血清銅イオンとセルロプラスミンのレベルはカノーラ油群で有意に上昇していた。プリオンタンパクは GPI アンカー型タンパクであり、銅を細胞内に取り込む役割を果たしているが、カノーラ油がその経路に影響を与えた可能性は否定できず、今後の課題となっている。

#### E. 結論

数種の食用油(カノーラ油、オリーブ油、月見草油、高オレイン酸型紅花油、高オレイン酸型ヒマワリ油、硬化大豆油、硬化カノーラ油)は大豆油やシソ油に比べ、脳卒中易発症性(SHRSP)ラットの寿命を異常に短縮する。この作用は脂肪酸組成では説明できず、微量有害因子の存在を想定し、研究を進めた。結果は次のように要約される。  
① カノーラ油の CO<sub>2</sub> 超臨界抽出法により、寿命短縮活性を示さない低圧抽出油が得られた。この画分の脂肪酸組成は元の油とほぼ同じであるが収率が低く(約 10%)、産業に結びつけるには、さらなる条件検討が必要であった。

② 分子蒸留法により分画したカノーラ油、オリーブ油では、残留油画分の寿命短縮活性が元の油より強く、有害因子と共に防御因子の存在が示唆された。分画物のうちトラップ部のみが血管内皮細胞管腔形成阻害作用を示し(*in vitro*)、この画分にエイコサノイド合成阻害作用をもつ 4-butylresorcinol が同定されたが、因果

関係は不詳であった。またオリーブ油とカノーラ油で微量有害因子に差がある可能性が示された。

③ カノーラ油はブタ、ラットで血小板数を減らすが、それに対応する組織変化（腎障害、骨髄巨核球減少、脾臓巨核球増加、髓外造血亢進）がSHRSPラットで認められた。

④ カノーラ油と同様に硬化大豆油も、精巢テストステロン含量を半減させた（SHRSPラット）。またカノーラ油は仔（雄）の生存率を低下させ（SHRSPラット）、精囊重量を減少させた（Wistarラット）。超臨界抽出法によるカノーラ油残留油画分は、直線運動する精子の割合を低下させる傾向を示した。すなわち、わが国の食用油の約半量を占める油種がSHRSPラットで内分泌攪乱作用を示すことが明らかとなった。

⑤ SHRSPラットに対する寿命短縮因子として、植物ステロール以外の未知因子が重要であることが明確となった。油糧種子には植物ステロール以外に、種々の生理作用をもつ微量成分が存在することが示された（serotonin derivatives, sterylglucoside, resorcinol derivatives, oxysterol,）。

⑥ 使用したカノーラ粕、大豆粕はヘキサノ脱脂粕であり、ヤギ、SHRSPラットなどの成長に対して安全であった。

⑦ カノーラ油は大豆油に比べSHRSPラットの血清の銅、セルロプラスミンのレベルを上昇させたが、プリオンタンパク発現量、血清亜鉛レベルには影響を与えなかった。プリオンタンパクを介した金属イオン代謝とカノーラ油の関係については、さらなる検討を要する。

## 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

によらない微量有害因子が存在することが明確となった。カノーラ（菜種）油や硬化大豆油は多くの組織で病変をひきおこして寿命短縮にいたるが、新たに内分泌攪乱作用が動物で認められた。

カノーラ油と硬化大豆油はわが国の植物油の半分前後を占め、多くの国で主要な食用油である。これらが動物実験で有害作用を示す用量は、日本人の摂取量にくらべて超大量ではない。さらに、カノーラ油の有害作用の報告は脳卒中ラットに限定されず、多くの種（マウス、ブタなど）に及んでいる。ヒトでの有害性は明確に示されていないが、動物実験で有害性の認められるこれらの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

奥山 治美

1. 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. 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)
3. Tatematsu,K., Fuma,S., Satoh,J., Ichikawa,Y., Fujii,Y. and Okuyama,H. Dietary canola oil and soybean oil fed to SHRSP rat dams differently affect the growth and survival of their male pups. *J.Nutr.* 134, 1347-1352 (2004)
4. 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)
5. Miyazawa,D., Ikemoto,A., Fujii,Y. and Okuyama,H. (2003) Dietary alpha-linolenic acid suppresses the formation of lysophosphatidic acid, a lipid mediator, in rat

platelets compared with linoleic acid. *Life Sci.* 73, 2083-2090

6. Umezawa, M., Tatematsu, K., Korenaga, T., Fu, X., Matsushita, T., Okuyama, H., Hosokawa, M., Takeda, T. and Higuchi, K. (2003) Dietary fat modulation of apoA-II metabolism and prevention of senile amyloidosis in the senescence-accelerated mouse. *J. Lipid Res.* 44, 762-769
- 7. Du, C., Sato, S., Watanabe, S., Wu, C.-Z., Ikemoto, A., Ando, K., Kikugawa, K., Fujii, Y. and Okuyama, H. (2003) Cholesterol synthesis in mice is suppressed but lipofuscin formation is not affected by long-term feeding of n-3 fatty acid-enriched oils compared with lard and n-6 fatty acid-enriched oils. *Biol. Pharm. Bull.* 26(6), 766-770
8. Brisibe, E.A., Okada, N., Mizukami, H., Okuyama, H. and Fujii, R.Y. (2003) RNA interference: potentials for the prevention of HIV infections and the challenges ahead. *TRENDS in Biotech.* 21(7), 306-311
9. Fujii, Y., Murase, Y., Otake, K., Yokota, Y., Omoto, S., Hayashi, H., Okada, H., Okada, N., Kawai, M. and Imakawa, K. (2003) A potential live vector, foamy virus, directed Intra-Cellular expression of ovine Interferon- $\alpha$  exhibited the resistance to HIV infection. *J. Vet. Med. Sci.* 66(2), 115-121.
10. Tokudome, S., Kuriki, K., Suzuki, S., Imaeda, N., Goto, C., Tokudome, Y., Takeda, E., Ichikawa, Y. and Okuyama, H. (2003) n-6 polyunsaturated fatty acids and breast cancer. *Nutr. Cancer* 47(2):210
11. Tokudome, S., Ichikawa, Y., Okuyama, H., Tokudome, Y., Goto, C., Imaeda, N., Kuriki, K., Suzuki, S., Shibata, K., Jiang, J., Wang, J. and Takeda, E. (2004) The Mediterranean vs the Japanese diet. *European Journal of Clinical Nutrition* 58:1323

大原 直樹

1. 横田俊二, 内藤由紀子, 古谷真美, 関 剛幸, 丸茂秀樹, 大澤徳子, 松本浩孝, 大原直樹, 加藤温中. ディーゼル排気粒子(diesel exhaust particle:DEP)のラット急性心虚血-再灌流不整脈への影響 秦野研究所年報 26:36-47(2002).
2. 大原直樹, 内藤由紀子, 小野宏, 花井美保, 山内淳, 江指隆年. 3種の健康補助食品。「核酸」, 「ダイエットシステムシックス」および「ノコギリヤシ」のラットにおける4週間混餌投与による安全性評価. 秦野研究所年報 25:36-53(2002).

3.○ Yukiko Naito, Tomoko Nagata, Yuko Takano, Takashi Nagatsu and Naoki Ohara. Rapeseed oil ingestion and exacerbation of hypertension-related conditions in strokeprone spontaneously hypertensive rats. *Toxicology* 187:205-216,(2003).

4. Naoki Ohara, Sanae Takeichi, Yukiko Naito, Yasuhiro Nakajima, Nobuhiro Yukawa, Takamitsu Nakano and Katsuyuki Nakajima. 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,(2003).

5. Syunji Yokota, Mami Furuya, Takayuki Seki, Hideki Marumo, Naoki Ohara, Atsunaka Kato. Delayed exacerbation of acute myocardial ischemia/reperfusion-induced arrhythmia by tracheal instillation of diesel exhaust particles. *Inhalation Toxicology* 16:319-331,(2004).

6. Naoki Ohara, Chiaki Matsuoka, Tomoko Nagata, Yukiko Kanazawa, Hiroko Inada, Shinji Horiuchi, Katsuhiko Saegusa and Hiroshi Ono. Topical reactions against intracutaneous injection of three hyaluronan products, Artz<sup>®</sup>, Synvisc<sup>®</sup> and Durolane<sup>®</sup> in guinea pigs. *Japanese Pharmacology and Therapeutics(薬理と治療)*32:663-677(2004).

7. Takeichi S, Nakajima Y, Yukawa N, Fujita MQ, Saito T, Satoh F, Seto Y, Kusakabe T, Jin ZB, Hasegawa I, Nakano T, Saniabadi A, Adachi M, Ohara N, Usui S, Okazaki M, Nakajima K. Validity of plasma remnant lipoproteins as surrogate markers of antemortem level in cases of sudden coronary death. *Clin Chim Acta.* 343(1-2):93-103,(2004).

8.○ 内藤由紀子, 大原直樹. 菜種油摂取による脳卒中易発性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 27:49-61(2004).

今泉 勝己

1. H.Sato, S.Nishida, H.Tomoyori, M.Sato, I.Ikeda and K.Imaizumi, Oxysterol regulation of estrogen receptor  $\alpha$ -mediated gene expression in a transcriptional activation assay system using Hela cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 :1790-1793 (2004)

2. H.Tomoyori, Y.Kawata, T.Higuchi, I.Ichi, H.Sato, I.Ikeda and K.Imaizumi, Phytosterol oxidation products are absorbed in the