

201327015A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

ニュートリゲノミクス解析に基づく
機能性食用油の安全性に関する研究

(H24- 食品 - 一般 -004)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 内藤 由紀子

平成26(2014)年3月

目 次

I. 総括研究報告

- ニュートリゲノミクス解析に基づく機能性食用油の安全性に関する研究 1
内藤 由紀子

II. 分担研究報告

- 機能性食用油の安全性に関する研究 11
内藤 由紀子、岩井 直温

- 食用油摂取がステロイドホルモン代謝に及ぼす影響 77
大原 直樹、内藤 由紀子

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 93

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 95

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

総括研究報告書

ニュートリゲノミクス解析に基づく機能性食用油の安全性に関する研究

研究代表者 内藤 由紀子 独立行政法人国立循環器病研究センター・
病態ゲノム医学部・室長

研究要旨

本研究は、特定保健用食品（トクホ）の植物油 3 品目の有効性、安全性について解析評価するものである。生活習慣病モデル動物およびその起源動物（正常動物）に各植物油を摂取させ、生活習慣病患者あるいは予備軍のヒトの食生活指導、健常者への予防指導のための情報を得ることを目的とした。本研究の 2 年目である今年度（平成 25 年度）は、トクホ植物油を摂取させた脳卒中易発症高血圧自然発症モデルラット（SHRSP）および正常血圧（WKY）ラットでのマイクロアレイ解析および肥満・糖尿病（ob/ob）マウスおよび由来系統の C57BL/6J マウスへの投与・解析を行った。また、トクホ植物油の主原料であるカノーラ油摂取によるステロイドホルモン代謝への影響について調べた。

SHRSP および WKY ラットにトクホの植物油 3 種（HR、HC および KS）を 7w/w% 含有する飼料を 4 週間摂取させ、肝組織のマイクロアレイ解析をもとにパスウェイ解析を行ったところ、脂肪酸代謝、ステロイドホルモン代謝、細胞周期・分化、アポトーシス等に関連する経路に変化が認められたが、全体的に遺伝子発現の増減変化は小さく、顕著な有害作用は無かったとした前年度の結果に影響を及ぼすものではないと考えられた。

肥満・糖尿病モデルである ob/ob マウスおよび正常 C57BL/6J マウスに、上記トクホ植物油含有無脂肪精製粉末飼料を 4 週間自由摂取させた。体重および摂餌量に群間差は認められなかった。また両系統において、顕著な有害作用は認められなかった。ob/ob マウスにおける経口糖負荷試験では、対照群と比較して、HR、HC および KS 群の血糖値の低下が促進された。また同マウスでは、HR 摂取により内臓脂肪が減少することが明らかとなった。C57BL/6J マウスでは、HR および KS 摂取による糖負荷後の血糖上昇抑制作用が認められた。ob/ob マウスの肝臓のマイクロアレイ解析では、HR および HC 群で共通して遺伝子発現が上昇および低下したパスウェイはそれぞれ 3 経路、HC および KS 群で共通して発現上昇したパスウェイは 4 経路であった。また、HR および HC はカノーラ油を原料としている植物油であるが、これらの群に共通して発現低下がみられた遺伝子は、

CYP1a2、Bdkrb2 であり、脂肪酸 ω 酸化の抑制およびブラジキニン受容体刺激を介した NOS 発現の抑制の可能性が示された。

SHRSP の精巢では、カノーラ油摂取群の StAR、CYP11A および CYP17 遺伝子の発現が、ダイズ油摂取群と比較して有意に抑制されていた。CYP11A は、そのタンパク質発現も抑制されることを確認した。

以上をまとめると、脳卒中易発症高血圧自然発症モデルである SHRSP、正常血圧である WKY ラットの両系統においても、4 週間トクホ植物油（HR、HC および KS）を摂取させた場合、顕著な有害作用が認められないことが明らかとなった。また、ob/ob マウスおよび正常マウスにおいても、顕著な有害作用は認められなかった。その他、両系統のマウスでの血糖値低下作用や、ob/ob マウスでの HR 摂取による内臓脂肪減少作用が認められた。

岩井 直温・独立行政法人国立循環
器病研究センター・部長
大原 直樹・金城学院大学薬学部・
教授

であることから、本研究によって、安全性研究における新しい解析手法の可能性を見出す。将来は、SNP（一塩基多型）を考慮した、食生活における個の予防医療にも貢献できる可能性があるため、活用が望まれている分野である。

現在トクホの植物油は 3 品目ある。すなわちヘルシーリセッタ（HR、日清オイリオグループ、東京）、ヘルシーコレステ（HC、日清オイリオグループ）および健康サララ（KS、味の素、東京）である。HR には「身体に脂肪がつきにくい」、HC および KS には「コレステロールが高めの方に適する」と表示されている。血中脂質や体脂肪は生活習慣病の発症に大きく関与し、国民の生活習慣病への関心の高さから考えても、これらの植物油の安全性や有効性を評価することは重要である。また、本研究計画のような第三者による同条件下での評価も、国民の安全な食生活の確保に貢献すると考える。

なお、トクホの植物油 3 品目の安全

A. 研究目的

本研究は、トクホの植物油全 3 品目の有効性、安全性について解析評価するものである。生活習慣病モデル動物およびその起源動物（正常動物）にこれらの植物油を摂取させ、生活習慣病患者あるいは予備軍のヒトの食生活指導、健常者への予防指導のための情報を得ることを目的とした。

本研究で用いる解析手法のニュートリゲノミクスは、栄養素や食品を摂取した時に起こる遺伝子発現などを網羅的に調べることにより、食品の機能性や安全性を特定するポストゲノムの科学である。これを栄養関連疾病への危険性の予測にも活用するのが本研究の目標である。食品の機能性研究には多く取り入れられている一方、安全性においては比較的新しい手法

性・有効性を同条件で調査する解析研究もニュートリゲノミクスに基づく研究も、国内外で報告されていない。

カノーラ油は国内消費量が最も多い油脂のひとつで、心保護作用が期待できるオレイン酸が豊富な食用油である一方、摂取による脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の寿命短縮が報告されている。研究代表者らは、この背景メカニズムについての研究を行っているが、これまでに、血圧上昇、血漿脂質上昇や心・腎傷害促進が寿命短縮に関与している可能性があること等を報告している。

本研究は、この食用植物油の研究をバックグラウンドとし、トクホの植物油の安全性、有効性を評価する。最終目標は、健康的な生活を送るための食用油摂取方法 (種類の選択) の提案であることから、本研究は、最終的に必要となるヒトを対象とした研究につなげる研究となる。

平成 25 年度は、トクホ植物油を摂取させた脳卒中モデルラットおよび正常血圧ラットでのマイクロアレイ解析および肥満・糖尿病マウスへの投与・解析を行った。また、トクホ植物油の主原料であるカノーラ油摂取によるステロイドホルモン代謝への影響についても調べた。

B. 研究方法

1. 機能性食用油の安全性に関する研究

トクホの植物油である HR、HC および KS を用いた。HR は中鎖脂肪酸強化、

HC および KS は植物ステロール強化植物油である。これらを、AIN93G 精製粉末飼料の脂肪源である大豆油 (7w/w% 含有) と置き換えた配合の飼料を準備するために、AIN93G 無脂肪精製粉末飼料に、7w/w%HR、HC または KS を添加した特殊飼料を調製した (オリエンタル酵母工業、東京、それぞれ HR、HC または KS 飼料)。また対照 (Cont) 飼料として AIN93G 精製飼料を用いた。各飼料の脂肪酸組成およびステロール類含量をガスクロマトグラフ法で測定した。平成 24 年度にこの調製および測定を実施した飼料 (-30℃、遮光、脱酸素剤同梱で密封保存) を用いた。

雄性 SHRSP および WKY ラット各 24 匹 (6 週齢) を用いた。1 週間の検疫・馴化後、収縮期血圧および体重をもとに各系統とも 4 群に分けた。それぞれ Cont 群、HR 群、HC 群および KS 群とし、Cont 飼料、HR 飼料、HC 飼料または KS 飼料を 4 週間自由摂取させた。摂取期間中の体重・血圧測定、尿検査、摂取期間終了後の剖検、血液生化学検査は平成 24 年度に行い、今年度は動物の肝臓組織から RNA を抽出・精製し、群毎にプールして各群のサンプルとし、遺伝子発現を網羅的に調べ、パスウェイ解析を行った (3D-Gene、東レ)。

雄性 ob/ob マウスおよび C57BL/6J マウス (6 週齢) を用い、1 週間の検疫・馴化後、血糖値および体重をもとに各系統とも 4 群に分けた。それぞれ Cont 群、HR 群、HC 群および KS 群とし、Cont 飼料、HR 飼料、HC 飼料または KS

飼料を4週間自由摂取させた。摂取期間中は体重、摂餌量、血糖値を測定し、摂取最終週に尿検査および経口糖負荷試験を行った。摂取期間終了後は、剖検、血液検査および血液生化学検査を行い、トランスクリプトーム解析用に、肝臓からRNAを抽出・精製し保存した。

2. 食用油摂取がステロイドホルモン代謝に及ぼす影響

SHRSPに、トクホ植物油の原料油として用いられているカノーラ油およびダイズ油を8週間摂取させ、精巢中ステロイドホルモンの代謝に関わる遺伝子(StAR、CYP11AおよびSYP17)およびタンパク発現(CYP11A)を調べた。

また、1.の研究でトクホ植物油を摂取させたob/obマウスの解剖時に肝臓を摘出してRNAを抽出・精製し、マイクロアレイ解析を行い(3D-Gene、東レ)、Cont群と比較して発現変化が1.5倍以上上昇または0.67倍以上低下した遺伝子を抽出し、これが関連するパスウェイの解析を行った。

(倫理面への配慮)

「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知、科発第0601001号)」を遵守し、研究開始前に「国立循環器病研究センター動物実験実施規定」に基づく研究計画書を作成し、同実験管理委員会による審

査が行われ、実験動物に対する動物愛護上の配慮等、倫理的配慮が適正であることが同総長により承認されている。

C. 研究結果

1. 機能性食用油の安全性に関する研究の結果

1-1. ラット肝のパスウェイ解析

発現が2倍以上の増加または2分の1倍以下の減少となった遺伝子を抽出し、これをもとにして関連パスウェイを調べた。脂肪酸代謝に関与する経路[脂肪酸生合成(SHRSPのHR群で増加、WKYラットのHCおよびKS群で減少)、脂肪酸β酸化(SHRSPのHR群で増加)、プロスタグランジン合成調節(SHRSPのHRおよびHC群で減少)および脂質代謝における核内レセプター(WKYラットのHC群で減少)]への影響の他、ステロイドホルモン関連の経路[アンドロゲン受容体シグナル経路(SHRSPのHRおよびHC群、WKYラットのHR群で減少)、エストロゲン経路(SHRSPのHC群で増加)およびアルドステロンおよびコルチゾールの生合成(WKYラットのHC群で減少)]、細胞周期・分化関連の経路[アポトーシス経路(SHRSPのHC群で減少)、細胞周期調節(SHRSPのKS群で減少)、Wntシグナル経路(WKYラットのHC群で減少)、Notchシグナル経路(SHRSPのKS群で減少)]、コレステロール代謝に関与するスタチン経路[SHRSPのHC群で増加]等にも摂取の影響が認められた。

1-2. マウスの一般状態

摂取期間中、全ての動物で異常が認められなかった。

1-3. マウスの体重および摂餌量

両系統において、体重および摂餌量に群間差は認められなかった。

1-4. マウスの血糖値

摂取期間中、ob/ob マウスの空腹時血糖値には群間差が無かった。

1-5. マウスの尿検査

尿量、尿比重、摂餌量および摂水量には、両系統において群間差が無かった。

1-6. マウスの経口糖負荷試験

ob/ob マウスでは、Cont 群と比較して、グルコース負荷後 30 分でトクホ植物油 3 群とも低下 (HR および HC 群) または低下傾向 (KS 群) を示した。また C57BL/6J マウスにおいて、HR 群で糖負荷後 15 および 30 分血糖値が有意に低下、60 分血糖値が低下傾向を示した。KS 群の血糖値は、糖負荷後 15 分で有意に低下、60 分で低下傾向を示した。一方、HC 群は、Cont 群と差が認められなかった。

1-7. マウスの器官重量

ob/ob マウスでは、Cont 群と比較して、HR 群の相対肝重量は高く、脂肪重量は低かった。脾臓、腎臓、心臓および精巣重量には群間差が無かった。一方 C57BL/6J マウスの各器官重量には、群間差が無かった。

1-8. マウスの HbA1c 値

HbA1c 値は、両系統において群間差が無かった。

1-9. マウスの血液検査

RBC、ヘマトクリット、MCV、血小板数、WBC およびヘモグロビンは、両系統において群間差が無かった。

1-10. マウスの血液生化学検査

血漿中のトリグリセリド、総コレステロール、グルコースおよび HDL-コレステロールレベルは、両系統において群間差が無かった。

2. 食用油摂取がステロイドホルモン代謝に及ぼす影響の結果

2-1. SHRSP 精巣における CYP11A タンパク質の発現

カノーラ油摂取群の CYP11A タンパク質発現は、ダイズ油摂取群と比較し、有意に低下した。

2-2. SHRSP 精巣における StAR、CYP11A および CYP17 遺伝子の発現

カノーラ油摂取群の精巣における StAR、CYP11A および CYP17 遺伝子発現はいずれもダイズ油摂取群と比較して有意に抑制された。

2-3. マウスの肝における遺伝子発現のパスウェイ解析

HR 群では Cont 群との比較で関与遺伝子の発現が有意に上昇した経路が 8、HC 群では 19、KS 群では 15 認められた。一方、Cont 群に対し関与遺伝子の発現が有意に低下した経路が HR 群では 18、HC 群では 14、KS 群では 5 認められた。3 群に共通して関与遺伝子の発現が有意に上昇した経路はなかった。HR 群と HC 群では 3 経路で、HC 群と KS 群では 4 経路で、それぞれ共通した関与遺伝子の有意な発現上昇が認められた。遺伝子発現の有意な低下により影響を

受ける可能性がある経路には、3群で共通のものが1経路あった。HR群とHC群間では4経路で共通した関与遺伝子の有意な発現低下が認められた。HC群とKS群間では関与遺伝子の有意な発現低下がみられた共通の経路は無かった。

これらの中で、HR群とHC群においては関与遺伝子の発現低下が共通して認められた3経路では、脂肪酸の ω 酸化、 β 酸化の抑制、ブラジキニン受容体の発現低下によるアンジオテンシンII作用の相対的強化、エストロゲンの分解抑制の可能性が示唆された。

D. 考察

前年度（平成24年度）の研究結果から、SHRSPおよびWKYラットにトクホの植物油を4週間自由摂取させると、両系統において顕著な有害作用はないことが、明らかとなっている。そこで今年度は、肝臓の遺伝子発現レベルでの影響を調べるために網羅的な解析を行った。全体的に、遺伝子発現の増減が大きくなかったことから、「2倍以上の発現上昇または0.5倍以上の発現低下」という、比較的小さな変化を抽出する基準を設けた。脂肪酸代謝に関与する経路の影響が認められたが、前年度、SHRSPのHCおよびKS群、WKYラットのHRおよびHC群で認められた相対肝臓重量の増加との関連は明らかとならなかった。遺伝子発現を個別に解析する等、詳細な検討が必要と考えられる。また、ステロイドホルモンに関与する経路の影響も認めら

れた。SHRSPにカノーラ油を8週間摂取させる実験において、組織は異なるが、精巣でのステロイドホルモン代謝への影響が認められたことから、強化されている成分だけでなく、原料の影響についても、今後検討を加えたい。また、細胞周期、細胞分化、アポトーシスに関与する経路への影響も両系統のHCおよびKS群で認められ、いずれも発現低下であったが、両群で共通して変化する経路は無かった。これらの変化は肝臓の恒常性や機能性の維持に影響する可能性があるが、今回の投与条件では生体に影響は認められなかった。

今年度は新たにob/obマウスとその由来系統動物のC57BL/6Jマウスに、トクホ植物油を4週間自由摂取させた。摂取期間中、両系統において、いずれの群でも一般状態を悪化させるような作用は無いことが明らかとなった。

HRには、「体に脂肪がつきにくい」と表示されていることから、肥満・糖尿病モデルであるob/obマウスの体重や内臓脂肪に注目した。Cont群と比較して、体重は差が認められなかったが、精巣上体周囲の白色脂肪重量は、有意に減少したことから、中鎖脂肪酸強化による効果かもしれない。一方、正常動物であるC57BL/6Jマウスではこのような作用は認められなかったことから、肥満状態ではない動物の体重を減少させるような作用は無いことがわかった。これは、前年度の研究においても確認されたことである。

HCおよびKSには、「コレステロール

が高めの方に適する」と表示されているが、本研究において、HC および KS の摂取は、両系統ともコレステロールレベル(総コレステロールおよび HDL-コレステロール) に対して影響は認められなかった。C57BL/6J マウスと比較して、ob/ob マウスの総コレステロールレベルは約 2 倍高かったことから、ob/ob マウスにおいて、これらの植物油摂取による低下作用が認められる可能性があったが変化しなかった。この作用を調べるためには、別に長期間摂取条件の実験によって確認する必要があるかもしれない。

肥満・糖尿病マウスを用いたことから、糖代謝に関して検討した。ob/ob マウスにおいて、摂取期間中、週 1 回の頻度で空腹時血糖値を測定したが、群間差は認められなかった。一方、摂取最終週に経口糖負荷試験を行ったところ、ob/ob マウスでは糖負荷後 30 分の血糖値は、HR および HC 群で低下、KS 群は低下傾向を示した。血糖値のピークとなった 15 分の値は、群間差がほとんど認められなかったことから、トクホ植物油の摂取は糖負荷後血糖値の上昇を抑制しないが、その後の低下を促進した。インスリンの推移を測定していないので不明だが、インスリン作用による末梢組織への糖の取り込みが促進された可能性が考えられた。また C57BL/6J マウスでは、HR 群の血糖値は負荷後 15 および 30 分において有意に低下し、その後 60 分においても低下傾向を示した。KS 群では 15 分において有意に低下、30 分にお

いて低下傾向を示した。血糖値のピークに達する前の負荷後 15 分において、HR および KS 群の値は Cont 群と比較して低く、また、ピークの 30 分においても低下 (HR 群) または低下傾向 (KS 群) となったことから、負荷後の血糖上昇を抑制する作用を有することが明らかとなった。一方、HC 群は、Cont 群の血糖値の推移と差が認められなかった。したがって、HC は、ob/ob マウスにおいてのみ血糖値の推移に影響を与えることがわかった。ob/ob マウス肝臓のパスウェイ解析では、カノーラ (菜種) 油を原料とした HR および HC 群で共通しており、KS 摂取群では認められなかった遺伝子発現の変化は、CYP1a2 およびブラジキニン受容体遺伝子 Bdkrb2 の発現低下であった。これらの変化は、3 つの経路に影響を及ぼす可能性がある。すなわち、CYP1a2 発現低下によって脂肪酸分解 (ω 酸化、 β 酸化) およびエストロゲン分解の抑制、ブラジキニン受容体発現低下によるアンジオテンシン II 作用に拮抗するブラジキニン受容体を經由した血管弛緩反応の促進である。脂肪酸代謝への影響、アンジオテンシン II 作用の増強の可能性については、これまで自然発症高血圧ラット (SHR) で認められたカノーラ油摂取による肝 G6PD 活性、SHRSP で認められた血脂の上昇、血圧上昇の促進とどのような関連があるか検討する余地がある。また、ob/ob マウスおよび SHRSP は、ともに糖尿病モデルであるため、インスリン作用の変化が病態に及ぼす影響

の解析が求められる。さらに、エストロゲン代謝への影響と、これまでに認められている SHRSP でのステロイドホルモン代謝の変化との関連については、今後さらに検討が必要である。

E. 結論

トクホ植物油を摂取させた脳卒中易発症高血圧自然発症モデルラット (SHRSP) および正常血圧 (WKY) ラットでのマイクロアレイ解析および肥満・糖尿病 (ob/ob) マウスおよび由来系統の C57BL/6J マウスへの投与・解析を行った。また、トクホ植物油の主原料であるカノーラ油摂取によるステロイドホルモン代謝への影響について調べた。

SHRSP および WKY ラットにトクホの植物油 3 種 (HR、HC および KS) を 7w/w% 含有する飼料を 4 週間摂取させ、肝臓サンプルのマイクロアレイ解析をもとにパスウェイ解析を行ったところ、脂肪酸代謝、ステロイドホルモン代謝、細胞周期・分化、アポトーシス等に関連する経路に変化が認められたが、全体的に遺伝子発現の増減変化は小さく、顕著な有害作用は無かったとした前年度の結果に影響を及ぼすものではないと考えられた。

肥満・糖尿病モデルである ob/ob マウスおよび正常 C57BL/6J マウスに、上記トクホ植物油含有無脂肪精製粉末飼料を 4 週間自由摂取させた。両系統において、顕著な有害作用は認められなかった。ob/ob マウスでは、HR、HC および KS 摂取による糖負荷後の血

糖値の低下が促進された。また同マウスでは、HR 摂取により内臓脂肪が減少することが明らかとなった。C57BL/6J マウスでは、HR および KS 摂取による糖負荷後の血糖上昇抑制作用が認められた。ob/ob マウスの肝臓のマイクロアレイ解析では、HR および HC 群で共通して遺伝子発現が上昇および低下したパスウェイはそれぞれ 3 経路、HC および KS 群で共通して発現上昇したパスウェイは 4 経路であった。また、HR および HC はカノーラ油を原料としている植物油であるが、これらの群に共通して発現低下がみられた遺伝子は、CYP1a2、Bdkrb2 であり、脂肪酸 ω 酸化の抑制およびブラジキニン受容体刺激を介した NOS 発現の抑制の可能性が示された。

SHRSP の精巣では、カノーラ油摂取群の StAR、CYP11A および CYP17 遺伝子の発現が、ダイズ油摂取群と比較して有意に抑制されていた。CYP11A は、そのタンパク質発現も抑制されることを確認した。

以上をまとめると、脳卒中易発症高血圧自然発症モデルである SHRSP、正常血圧である WKY ラットの両系統においても、4 週間トクホ植物油 (HR、HC および KS) を摂取させた場合、顕著な有害作用が認められないことが明らかとなった。また、肥満・糖尿病モデルである ob/ob マウスおよび正常マウスにおいても、顕著な有害作用は認められなかった。その他、両系統のマウスでの糖取り込み改善作用や、ob/ob マウスでの HR 摂取による内臓脂肪減

少作用が認められた。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ji X, Naito Y, Weng H, Ma X, Endo K, Kito N, Yanagawa N, Yu Y, Li J, Iwai N. Renoprotective mechanisms of pirfenidone in hypertension-induced renal injury: through anti-fibrotic and anti-oxidative stress pathways. Biomed. Res. 2013; 34(6): 309-19.

2. 学会発表

1) 内藤由紀子、馬嘯、遠藤恒介、紀旭、翁華春、岩井直温：糖尿病モデルマウスにおける不飽和脂肪酸補給の疾患進行に与える影響、第13回日本抗加齢医学会総会、2013.6.28-30、横浜、プログラム抄録集 263.

2) 立松憲次郎、宮澤大介、大原直樹、奥山治美：高融点油脂を摂取した脳卒中ラットの寿命短縮効果について、日本脂質栄養学会第22回大会、2013.9.6-7、高知、Journal of Lipid Nutrition 22, No.2, 134, 2013.

3) 大原直樹、内藤由紀子、岩井直温：機能性食用油の安全性に関する研究—食用油摂取がステロイドホルモン代謝に及ぼす影響—、日本脂質栄養学会第22回大会、2013.9.6-7、高知、Journal of Lipid Nutrition 22, No. 2, 153, 2013.

4) 内藤由紀子、遠藤恒介、翁華春、大原直樹、岩井直温：脳卒中易発症高血圧自然発症ラットにおける3種の機能性食用油摂取の影響、日本脂質栄養学会第22回大会、2013.9.6-7、高知、Journal of Lipid Nutrition 22, No.2, 156, 2013.

5) 橋本洋子、山田和代、森眞由美、宮澤大介、西尾康二、大原直樹、奥山治美：異なる高脂肪食が非肥満性ラットの代謝に及ぼす影響の比較、日本脂質栄養学会第22回大会、2013.9.6-7、高知、Journal of Lipid Nutrition 22, No.2, 159, 2013.

6) 内藤由紀子、柳川成章、大原直樹、岩井直温：肥満糖尿病マウスにおける3種類の機能性食用油4週間摂取の影響、日本薬学会第134年会、2014.3.27-30、熊本、要旨集 Vol. 3, 207, 2014.

H. 知的所有権の取得状況

無し

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

ニュートリゲノミクス解析に基づく機能性食用油の安全性に関する研究

—機能性食用油の安全性に関する研究—

研究代表者 内藤 由紀子 独立行政法人国立循環器病研究センター・
病態ゲノム医学部・室長
研究分担者 岩井 直温 独立行政法人国立循環器病研究センター・
病態ゲノム医学部・部長

研究要旨

脳卒中易発症高血圧自然発症モデルである SHRSP および正常血圧 WKY ラットに特定保健用食品の植物油 3 種（HR、HC および KS）を 7w/w% 含有する飼料を 4 週間摂取させ、肝組織のマイクロアレイ解析をもとにしたパスウェイ解析を行ったところ、脂肪酸代謝、ステロイドホルモン代謝、細胞周期・分化、アポトーシス等に関連する経路に変化が認められたが全体的に遺伝子発現の増減変化は小さく、顕著な有害作用は無かったとした前年度の結果に影響を及ぼすものではないと考えられた。

肥満・糖尿病モデルである ob/ob マウスおよび正常 C57BL/6J マウスに、上記トクホ植物油含有無脂肪精製粉末飼料を 4 週間自由摂取させた。体重および摂餌量に群間差が認められなかった。また両系統において、顕著な有害作用は認められなかった。ob/ob マウスにおける経口糖負荷試験では、対照群と比較して、HR、HC および KS 群の血糖値の低下が促進された。また同マウスでは、HR 摂取により内臓脂肪が減少することが明らかとなった。C57BL/6J マウスでは、HR および KS 摂取による糖負荷後の血糖上昇抑制作用が認められた。

以上をまとめると、脳卒中易発症高血圧自然発症モデルである SHRSP、正常血圧である WKY ラットの両系統においても、4 週間トクホ植物油（HR、HC および KS）を摂取させた場合、顕著な有害作用が認められないことが明らかとなった。また、肥満・糖尿病モデルである ob/ob マウスおよび正常マウスにおいても同様に、顕著な有害作用は認められなかった。その他、両系統のマウスでの血糖値低下作用や、ob/ob マウスでの HR 摂取による内臓脂肪減少作用が認められた。

A. 研究目的
トクホ表示を許可された食用調理油（植物油）は、2012 年時点で 3 品目であるが、本研究では、同条件下でこ

これらの安全性や、生活習慣病の発症および進行への影響の有無を調べることを目的とする。そして、その影響の背景機構を解析し、国民の健康的な生活のための情報として役立てる。平成25年度は、前年度に3種のトクホ植物油を投与した SHRSP および WKY ラット肝のマイクロアレイ解析と、肥満・糖尿病マウスおよび正常マウスでの摂取の影響解析を行った。

B. 研究方法

1. トクホ植物油

本研究では、トクホの植物油全3種を〔ヘルシーリセッタ (HR、日清オイリオグループ、東京)、ヘルシーコレステ (HC、日清オイリオグループ) および健康サララ (KS、味の素、東京)〕を用いた。HR は中鎖脂肪酸強化、HC および KS は植物ステロール強化植物油である。メーカーによる各情報を Table 1 にまとめた (前年度報告書内でも表示)。

2. 飼料

AIN93G 精製粉末飼料の脂肪源である大豆油 (7w/w%含有) と、各トクホ植物油を置き換える飼料を調製した。

AIN93G 無脂肪精製粉末飼料に、7w/w%HR、HC または KS を添加した特殊飼料を調製した (オリエンタル酵母工業、東京)。また対照 (Cont) 飼料として AIN93G 精製飼料を用いた。各飼料の調製および飼料中の脂肪酸組成およびステロール類含量の測定 (ガスクロマトグラフ法、日本食品分析センター、東京) は前年度行い、 -30°C 、

遮光、脱酸素剤同梱の密封袋中で保管したものを使用した。また、n-3/n-6 脂肪酸比および植物ステロール/コレステロール比を算出した。測定データは Table 2 および 3、Figure 1 および 2 に示した。また、植物ステロール/コレステロール比も算出し、示した (Figure 3)。なお添加量の 7w/w%は、Cont 飼料に含有する脂肪 (大豆油) 量に基づく。

3. 動物

1) SHRSP および WKY ラット

雄性 SHRSP および WKY ラット各 24 匹 (6 週齢) を用いた (日本エスエルシー、浜松)。1 週間の検疫・馴化後、収縮期血圧および体重をもとに各系統とも 1 群 6 匹 4 群に分け、それぞれ Cont 群、HR 群、HC 群および KS 群とした。動物は、床敷を敷いた樹脂製ケージに 1 ケージ 3 匹の密度で飼育した。飼育施設の環境設定は温度 $20\sim 23^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $40\sim 55\%$ 、12 時間照明 (7 時~19 時:点灯、19 時~7 時:消灯) とした。各飼料および水道水 (給水ビン) を 4 週間自由摂取させた (前年度実施)。

2) ob/ob マウスおよび C57BL/6J マウス

雄性 ob/ob および C57BL/6J マウスをそれぞれ 43 および 21 匹 (6 週齢) 用いた (日本エスエルシー、浜松)。1 週間の検疫・馴化後、ob/ob マウスにおいては空腹時血糖値および体重をもとに、C57BL/6J マウスにおいては体重をもとにそれぞれ 4 群に分け、Cont 群、HR 群、HC 群および KS 群とした。動物は、床敷を敷いた樹脂製ケージに 1 ケージ 3~5 匹の密度で飼育した。

飼育施設の環境設定は 1) のラットと同様で、温度 20~23℃、湿度 40~55%、12 時間照明 (7 時~19 時: 点灯、19 時~7 時: 消灯) とした。各飼料および水道水 (給水ビン) を 4 週間自由摂取させた。

4. ラット肝のサンプル採取

摂取期間終了後、動物をペントバルビタールナトリウム麻酔下で解剖した際、マイクロアレイ解析用に肝臓を摘出した。直後に液体窒素により凍結し、-80℃で保存した。

5. ラット肝 mRNA の抽出・精製およびトランスクリプトーム解析

Trizol (Invitrogen, CA, アメリカ) を用いて、凍結保存した各動物の肝臓から total RNA を抽出・精製し、個別サンプルとした。さらにこれらを群毎にプールしたものを群サンプルとしてアレイ解析を行った。遺伝子発現の差異は、ラットオリゴチップ 3D-Gene 20k (東レ、東京) を用いて調べた。

6. マウスの検査および測定

6-1. 一般状態の観察

摂取期間中、全例の一般状態を観察した。

6-2. 体重、摂餌量および血糖値測定

体重および摂餌量 (24 時間) は、週 1 回測定した。

6-3. 血糖値の測定

ob/ob マウスにおいて、18 時間の絶食後、尾静脈から採血して血糖値を測定した (ニプロ FS 血糖センサーライト、アボットジャパン、松戸、週 1 回)。

6-4. 尿検査

摂取最終週に、代謝ケージで動物を

個別飼育し、24 時間採尿して尿量を測定し、尿比重を算出した。

6-5. 経口糖負荷試験

摂取最終週に行った。18 時間の絶食後、グルコース水溶液 (1 g/kg, 5 ml/kg) を強制経口投与し、投与前、投与後 15、30、60、120 および 180 分に尾静脈から採血して血糖値を測定した (ニプロ FS 血糖センサーライト)。

6-6. 解剖

摂取期間終了後、18 時間絶食し、動物をペントバルビタール麻酔下で尾静脈から採血し、ヘモグロビン A1c 値 (A1C Now プラス、バイエル薬品、大阪) を測定した。また、腹大静脈より EDTA 加採血した。一部は血液検査に用い、残りは遠心分離により血漿を得、-80℃で保存した。放血致死後、動物を剖検し、肝臓、膵臓、腎臓 (両側)、心臓、内臓脂肪 (精巣上体周囲、両側) および精巣 (両側) の重量を測定した。また、単位体重当たりの重量 (相対重量) を算出した。摘出器官の一部は病理組織検査用にホルマリン固定し、残りを液体窒素で凍結後、-80℃で保存した。凍結精巣は、「食用油摂取がステロイドホルモン代謝に及ぼす影響」の研究用とした。

6-7. 血液検査

赤血球数 (RBC)、ヘマトクリット、平均赤血球容積 (MCV)、血小板数、白血球数 (WBC) およびヘモグロビンを測定した (セルタック、MEK-5208、日本光電、東京)。

6-8. 血液生化学検査

凍結保存した血漿中のトリグリセ

リド、総コレステロール、グルコースおよび HDL-コレステロールレベルを測定した [それぞれ富士ドライケム 7000V (富士フィルム、東京) および HDL コレステロール E テストワコー (和光純薬工業、東京)]。

6-9. マウス肝 mRNA の抽出・精製およびトランスクリプトーム解析

Trizol (Invitrogen) を用いて、凍結保存した各動物の肝臓から total RNA を抽出・精製し、個別サンプルとした。さらにこれらを群毎にプールしたものを群サンプルとしてアレイ解析を行った。遺伝子発現の差異は、マウスオリゴチップ 3D-Gene 24k (東レ、東京) を用いて調べ、Cont 群と比較して、発現が 4 倍以上の増加または 4 分の 1 倍以下の減少となった遺伝子数を調べた。また、パスウェイ解析においては、発現が 2 倍以上の増加または 2 分の 1 倍以下の減少となった遺伝子をもとに関連を調べた。

(倫理面への配慮)

「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知、科発第 0601001 号)」を遵守し、研究開始前に「国立循環器病研究センター動物実験実施規定」に基づく研究計画書を作成し、同実験管理委員会による審査が行われ、実験動物に対する動物愛護上の配慮等、倫理的配慮が適正であることが同総長により承認されている。

C. 研究結果

1. ラット肝遺伝子発現解析

1-1. マイクロアレイ解析

両系統とも、Cont 群と比較して 4 倍以上の発現上昇または 1/4 倍以上の発現低下が認められた遺伝子は、各投与群で散見され、その遺伝子数をまとめた (Table 4)。

1-2. パスウェイ解析

発現が 2 倍以上の増加または 2 分の 1 倍以下の減少となった遺伝子を抽出し、これをもとにして関連パスウェイを調べた結果をまとめた (Table 5 および 6)。また、各パスウェイを示し、発現変化の認められた遺伝子を示した (Figure 4 に図の説明、Figure 5 ~21 にパスウェイ)。

脂肪酸代謝に関与する経路 [脂肪酸生合成 (SHRSP の HR 群で増加、WKY ラットの HC および KS 群で減少)、脂肪酸β酸化 (SHRSP の HR 群で増加)、プロスタグランジン合成調節 (SHRSP の HR および HC 群で減少) および脂質代謝および毒性における核内レセプター (WKY ラットの HC 群で減少)] への影響の他、ステロイドホルモン関連の経路 [アンドロゲン受容体シグナル経路 (SHRSP の HR および HC 群、WKY ラットの HR 群で減少)、エストロゲン経路 (SHRSP の HC 群で増加) およびアルドステロンおよびコルチゾールの生合成 (WKY ラットの HC 群で減少)]、細胞周期・分化関連の経路 [アポトーシス経路 (SHRSP の HC 群で減少)、細胞周期調節 (SHRSP の KS 群で減少)、Wnt シグナル経路 (WKY ラットの HC 群で減

少)、Notch シグナル経路 (SHRSP の KS 群で減少)、コレステロール代謝に関するスタチン経路 [SHRSP の HC 群で増加] 等が認められた。

2. マウス実験結果

2-1. 一般状態

摂取期間中、全ての動物で異常が認められなかった。

2-2. 体重および摂餌量

摂取期間中の体重の推移および摂餌量の変化を、それぞれ Figure 22 および Figure 23 に示した。両系統において、体重および摂餌量に群間差は認められなかった。

2-3. 血糖値

ob/ob マウスの摂取期間中の空腹時血糖値の推移を Figure 24 に示した。各測定時における血糖値は群間差が無かった。

2-4. 尿検査

尿量、尿比重、摂餌量および摂水量は、両系統において群間差が無かった (Figure 25~28)。

2-5. 経口糖負荷試験

ob/ob マウスでは、Cont 群と比較して、糖負荷後 30 分で血糖値は低下 (HR および HC 群) または低下傾向 (KS 群) を示した (Figure 29)。また C57BL/6J マウスでは、HR 群は糖負荷後 15 および 30 分において有意に低下、60 分において低下傾向を示した。KS 群では 15 分において血糖値が有意に低下、60 分において低下傾向を示した。一方、HC 群の血糖値は、Cont 群と比較して差が認められなかった (Figure 30)。

2-6. 器官重量

ob/ob マウスでは、Cont 群と比較して、HR 群の相対肝重量は高く、脂肪重量は低かった。膵臓、腎臓、心臓および精巣重量には群間差が無かった。一方 C57BL/6J マウスの各器官重量には、群間差が無かった (Figure 31~36)。

2-7. HbA1c 値

HbA1c 値は、両系統において群間差が無かった (Figure 37)。

2-8. 血液検査

RBC、ヘマトクリット、MCV、血小板数、WBC およびヘモグロビンは、両系統において群間差が無かった (Figure 38~43)。

2-9. 血液生化学検査

血漿中のトリグリセリド、総コレステロール、グルコースおよび HDL-コレステロールレベルは、両系統において群間差が無かった (Figure 44~47)。

D. 考察

前年度 (平成 24 年度) の研究結果から、SHRSP および WKY ラットにトクホの植物油を 4 週間自由摂取させると、両系統において顕著な有害作用はないことが明らかとなっている。そこで今年度は、肝臓の遺伝子発現レベルでの影響を調べるために網羅的な解析を行った。全体的に、遺伝子発現の増減が大きくなかったことから、「2 倍以上の発現上昇または 0.5 倍以上の発現低下」という、比較的小さな変化を抽出する基準を設けた。脂肪酸代謝に関する経路の影響が認められたが、前年度、SHRSP の HC および KS 群、WKY

ラットのHRおよびHC群で認められた相対肝臓重量の増加との関連は明らかとならなかった。遺伝子発現を個別に解析する等、詳細な検討が必要と考えられる。また、ステロイドホルモンに関与する経路の影響も認められた。これに関しては、分担研究「食用油摂取がステロイドホルモン代謝に及ぼす影響」の結果と併せて、総括研究報告で考察する。細胞周期、細胞分化、アポトーシスに関与する経路の影響も両系統のHCおよびKS群で認められ、いずれも発現低下であったが、共通性は無かった。これらの変化は肝臓の恒常性や機能性の維持に影響する可能性があるが、今回の投与条件では生体に影響は認められなかった。

今年度は新たにob/obマウスとその由来系統動物のC57BL/6Jマウスに、トクホ植物油を4週間自由摂取させた。摂取期間中、両系統において、いずれの群でも一般状態を悪化させるような作用は無いことが明らかとなった。

HRには、「体に脂肪がつきにくい」と表示されていることから、肥満・糖尿病モデルであるob/obマウスの体重や内臓脂肪に注目した。Cont群と比較して、HR群の体重には差が認められなかったが、精巣上体周囲の白色脂肪重量は、有意に減少したことから、HRの特徴である中鎖脂肪酸強化による効果かもしれない。一方、正常動物であるC57BL/6Jマウスではこのような作用は認められなかったことから、肥満状態ではない動物の体重や脂肪量を減少させるような作用は無いこと

がわかった。これは、前年度の研究においても確認されたことである。

HCおよびKSには、「コレステロールが高めの方に適する」と表示されているが、本研究において、HCおよびKSの摂取は、両系統ともコレステロールレベル(総コレステロールおよびHDL-コレステロール)に対して影響は認められなかった。C57BL/6Jマウスと比較して、ob/obマウスの総コレステロールレベルは約2倍高かったことから、ob/obマウスにおいて、これらの植物油摂取による低下作用が認められる可能性があったが変化しなかった。この作用を調べるためには、別に長期間摂取条件の実験によって確認する必要があるかもしれない。

肥満・糖尿病マウスを用いたことから、糖代謝に関して検討した。ob/obマウスにおいて、摂取期間中、週1回の頻度で空腹時血糖値を測定したが、群間差は認められなかった。一方、摂取最終週に経口糖負荷試験を行ったところ、ob/obマウスではグルコース負荷後30分の血糖値は、HRおよびHC群で低下、KS群は低下傾向を示した。血糖値のピークとなった15分の値は、群間差がほとんど認められなかったことから、トクホ植物油の摂取は負荷後血糖値の上昇を抑制しないが、その後の低下を促進した。インスリンの推移を測定していないので不明だが、インスリン作用による末梢組織への糖の取り込みが促進している可能性が考えられた。またC57BL/6Jマウスでは、HR群の血糖値は負荷後15および

30 分において有意に低下し、その後 60 分においても低下傾向を示した。KS 群の血糖値は 15 分において有意に低下、30 分において低下傾向を示した。血糖値のピークに達する前の負荷後 15 分において、HR および KS 群の値は Cont 群と比較して低く、また、ピークの 30 分においても低下 (HR 群) または低下傾向 (KS 群) となったことから、負荷後の血糖上昇を抑制する作用を有することが明らかとなった。一方 HC 群では、Cont 群の血糖値の推移と差が認められなかった。したがって、HC 摂取は、ob/ob マウスにのみ血糖値の推移に影響を与えることがわかった。SHRSP 肝のパスウェイ解析において、KS 群の Notch シグナルに関連する遺伝子発現の低下が認められた。最近、Notch は脂肪合成と糖産生の両方を調節し、肥満や糖尿病においては促進することが報告されている (1、2) ことから、今後、マウス肝のパスウェイ解析結果にも注目したい。

E. 結論

脳卒中易発症高血圧モデルである SHRSP および由来系統の正常血圧 WKY ラット、肥満・糖尿病モデルである ob/ob マウスおよび由来系統の正常 C57BL/6J マウスにトクホの植物油 3 種 (HR、HC および KS) を 4 週間摂取させた。これまでに得られた結果から、疾患モデル動物においても正常動物においても顕著な有害作用が認められないことが明らかとなった。

SHRSP および WKY ラットの網羅的遺

伝子発現解析において、脂肪酸代謝、ステロイドホルモン代謝、細胞周期・分化・アポトーシス等に関するパスウェイが摂取によって影響を受けることが示唆されたが、より正確に調べるためには、個別に遺伝子発現を確認する等の詳細な解析が必要となる。

マウスの実験で明らかとなった摂取による有効性は、ob/ob マウスでの HR、HC および KS 摂取による糖取り込み促進作用、HR 摂取による内臓脂肪減少作用、C57BL/6J マウスでの HR および KS 摂取による糖負荷後の血糖上昇抑制作用であった。背景メカニズムについては今後の実験と併せて解析する。

(参考文献)

1. Czech MP. Obesity notches up fatty liver. *Nat Med.* 2013; 19 (8): 969-971.
2. Pajvani UB et al. Inhibition of Notch uncouples Akt activation from hepatic lipid accumulation by decreasing mTorc1 stability. *Nat Med.* 2013; 19 (8): 1054-1060.

F. 健康危険情報

(総括報告書記載事項)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ji X, Naito Y, Weng H, Ma X, Endo K, Kito N, Yanagawa N, Yu Y, Li J, Iwai N. Renoprotective mechanisms of pirfenidone in hyperten-