

201426004A

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 内藤 由紀子

平成27(2015)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                                       |    |
| 食用油摂取がグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) 活性に<br>及ぼす影響..... | 49 |
| 大原 直樹、内藤 由紀子                                       |    |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....                           | 59 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷.....                               | 61 |

# 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。本研究の最終年度（3 年目）である今年度（平成 26 年度）は、高脂血症・動脈硬化疾患モデルである ApoE 欠損（KO）マウスおよび由来系統の C57BL/6J マウスに植物油を摂取させ、血液、生化学、病理学および C57BL/6J マウスの肝臓を用いた遺伝子発現解析を行った。また、両系統の肝臓の G6PD 活性を測定した。さらにトクホ植物油の主原料であるカノーラ油を、異種動物である脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）およびミニブタに摂取させ、同様に G6PD 活性を測定した。

ApoE KO マウスおよび C57BL/6J マウスにトクホの植物油 3 種（HR、HC および KS）を 7 w/w% 含有する飼料を 20 週間摂取させた。摂取期間中、体重、摂餌量および摂水量に群間差が認められなかった。また、血液、血液生化学、病理学的検査を行ったが、これらの植物油摂取群に顕著な有害作用は認められなかった。C57BL/6J マウスにおいて、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、各投与群において、Cont 群と比較して高発現または低発現した遺伝子数が有意に多く含まれるパスウェイが散見され、それには脂肪酸代謝関連以外のパスウェイ（細胞サイクル等）も含まれていた。他には、有効性に関与する可能性のある糖尿病発症パスウェイでの遺伝子低発現が、HR 群で認められた。

また、トクホ植物油の摂取は、両系統において肝臓の G6PD 活性に影響を与えなかった。一方、カノーラ油を摂取させた SHRSP および WKY ラットではこの活性が上昇したが、ミニブタでは変化が認められなかった。これらのことから、植物油摂取による G6PD 活性の上昇には種差があることが示唆された。

以上をまとめると、ApoE KO マウスおよび正常 C57BL/6J マウスに 20 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、トクホ植物油摂取によって G6PD 活性に影響が無いことがわかったが、植物油摂取による G6PD 活性の上昇には種差があると考えられ、ヒトへの外挿も含め、より詳細な背景メカニズムの解析が必要である。なお、今年度の研究においても、網羅的に遺伝子発現を解析することは、予測していた遺伝子変動以外の変動を見つけることができ、さらに詳細な解析につながり有用な手法であることが示唆された。

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

#### 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 24 年度の脳卒中モデルラットおよび正常血圧ラット、平成 25 年度の肥満・糖尿病マウスおよび正常マウスに引き続き、平成 26 年度は高脂血症・動脈硬化マウスおよび正常マウスを用いて研究を行った。

なお、本研究成果を公表するにあたり、開示すべき COI 関係にある企業等はない（トクホ植物油は研究代表者が市販品を購入した）。

## 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 ApoE 欠損（KO）および正常 C57BL/6J マウス各 20 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 20 週間自由摂取させた。摂取期間中は一般状態の観察、体重、摂餌量および摂水量測定を、摂取期間終了後は剖検、血液生化学検査、血液検査を行った。また C57BL/6J マウスの肝臓組織から、RNA を抽出・精製した。RNA は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）。

### 2. 食用油摂取がグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PD）活性に及ぼす影響

1. の研究で投与した動物の肝臓を摘出し、使用時まで-80℃で凍結保存した。G6PD 活性測定に先立ち、凍結肝臓組織を 10 倍量のリン酸緩衝液（pH 7.4、タンパク質分解酵素阻害薬含有）中でホモジナイズした。このホモジネートを 2000×G、4℃で 10 分間遠心して得

た上清の G6PD 活性を、Glucose-6-phosphate dehydrogenase assay kit-WST (同仁化学) を用いて測定した。また、Coomassie brilliant blue G を用いたタンパク質定量キット (同仁化学) を用い、ホモジネートのタンパク質濃度を定量し、G6PD の比活性を算出した。

4 週齢の雄 SHRSP (SHRSP/Izm、日本エスエルシー) 20 匹を 1 群 10 匹からなる 2 群に分け、それぞれカノーラ油および大豆油摂取群とした。動物には AIN-93 組成無脂肪精製飼料を与え、週 1 回測定した 1 日摂餌量をもとに、10w/w% に相当する大豆油 (対照) またはカノーラ油 (日本植物油協会) を 8 週間強制経口投与した。摂取期間終了後、これらの動物から肝を摘出し、組織の一部を採って 10 倍量のリン酸緩衝液 (pH7.4、タンパク質分解酵素阻害薬含有) 中でミンスし、ホモジナイズした後、2,000×G、4°C で 10 分間遠心して得た上清の G6PD 活性を測定した。

また、カノーラ (菜種) 油摂取ミニブタ肝における G6PD 活性の測定は、文部科学省私立大学学術研究高度化推進事業補助によって実施した研究 (2007-2011 年、プロジェクト番号 070025) で保存したサンプルを用いた。この研究では、離乳後 1 ヶ月のミニブタ (NIBS、日生研) に、植物油脂 10w/w% を添加した基礎飼料を 18 ヶ月摂取させ、その影響を広範に調べた。その際に採取、凍結保存した肝組織を用い、マウス、ラットと同様の手順で得られ

たホモジネートの G6PD 活性を測定した。

(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. 一般状態、体重、摂餌量および摂水量

摂取期間中、全ての動物で一般状態の異常が認められず、摂取期間中の体重、摂餌量および摂水量も、両系統において、群間差は認められなかった。

#### 1-2. 血液および血液生化学検査

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。また、C57BL/6J マウス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、群間差が無かった。

#### 1-3. 器官重量

ApoE KO マウスでは、Cont 群と比較し

て、HR 群の相対肝重量は高かったが、白色脂肪、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。

#### 1-4. 網羅的遺伝子発現解析

C57BL/6J マウスにおいて、Cont 群と比較して 1.5 倍以上の発現上昇または 0.67 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た。この基準で発現増加した遺伝子数は、HR、HC および KS 群で、それぞれ 36、90 および 144 であり、発現低下した遺伝子数は、それぞれ 114、82 および 66 であった。

発現が 1.5 倍以上の増加または 0.67 倍以上の低下となった遺伝子を抽出し、これをもとにしてパスウェイ解析を行った。脂肪酸代謝に関与する経路 [不飽和脂肪酸生合成 (HC 群で増加)、PPAR シグナル (HC 群で増加)、アラキドン酸代謝 (HR 群で低下、KS 群で増加)、ステロイド生合成 (HC および KS 群で増加) 2 型糖尿病 (HR 群で低下) の他、Jak-STAT シグナル (HR 群で低下、HC および KS 群で増加)、薬物代謝 (HR および KS 群で低下) 等が認められた。また、がんに関連するパスウェイや p53 シグナルを含めた細胞周期調節の遺伝子高発現が、HC および KS 群で認められた。

## 2. 食用油摂取が肝 G6PD 活性に及ぼす影響の研究結果

### 2-1. ApoE KO マウスおよび C57BL/6J マウス肝 G6PD 活性

ApoE KO マウスでは、Cont 群では  $19.89 \pm 2.160$  U/g protein (N=5)、HR 群では  $24.85 \pm 4.138$  U/g protein (N=5)、HC 群では  $21.56 \pm 1.992$  U/g protein (N=4)、KS 群では  $21.85 \pm 1.852$  U/g protein (N=4) であり、群間に差は認められなかった。

C57BL/6J マウスの肝 G6PD 活性は、Cont 群では  $91.71 \pm 12.49$  U/g protein、HR 群では  $103.7 \pm 8.166$  U/g protein、HC 群では  $119.4 \pm 15.15$  U/g protein、KS 群では  $99.99 \pm 18.41$  U/g protein (それぞれ N=5) であり、これらも群間差は認められなかった。

### 2-2. カノーラ油摂取 SHRSP の肝 G6PD 活性

SHRSP 肝ホモジネート中の G6PD 活性は、対照の大豆油群で  $52.0 \pm 3.34$  U/g protein、カノーラ油群で  $91.1 \pm 5.47$  U/g protein となり、カノーラ油群の G6PD 活性が有意に高い (N=10,  $p < 0.001$ ) ことが確認された。

### 2-3. カノーラ油摂取ミニブタの肝 G6PD 活性

ミニブタ肝組織中の G6PD 活性は、大豆油摂取群で  $28.0 \pm 1.54$  U/g protein、カノーラ油摂取群で  $27.8 \pm 2.82$  U/g protein であり、両群間に有意差は認められなかった (N=6)。

## D. 考察

これまで (平成 24 および 25 年度) の研究結果から、SHRSP、WKY ラット、ob/ob マウスおよび C57BL/6J マウスにトクホの植物油を 4 週間自由摂取させると、各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、異なる生活習慣病モデル動物に対する摂取の影響を調べるために、高脂血症・動脈硬化モデル動物である ApoE KO マウスと正常 C57BL/6J マウスを用いた。また C57BL/6J マウスは平成 25 年度に 4 週間摂取させているため、今年度はより長期間である 20 週間摂取させた。ApoE KO マウスの影響を考慮しても、20 週間は適切であったと考えられる。

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。また、摂餌量や摂水量、血液検査においても群間差が認められなかったことから、トクホ植物油の 20 週間摂取がこれらに影響を与えないことが明らかとなった。C57BL/6J マウスで行った血液生化学検査でも、摂取の影響は認められなかった。

器官重量は、ApoE KO マウスの HR 群の肝重量が Cont 群と比較して有意に重かったことを除き、その他の器官や C57BL/6J マウスでは、トクホ植物油摂取の影響は認められなかった。前年度、ob/ob マウスにおいて HR 摂取による肝重量の増加が認められたが C57BL/6J マウスでは影響がなかったことから、HR は、摂取期間の長短（今年度 20 週間、前年度 4 週間）に関わらず C57BL/6J マウスの肝重量に影響を及ぼさないが、疾患モデル動物（ApoE KO マウスおよび ob/ob マウス）の肝重量を増加させることがわかった。

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、体重や内臓脂肪に注目した。両系統において、Cont 群と比較して、HR 群の体重および精巣上体周囲の白色脂肪重量には差が認められなかった。C57BL/6J マウスに 4 週間摂取させた前年度の研究においても、体重や脂肪量を減少させるような作用は無かったことから、投与期間の長短による影響は無いことが分かった。

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、C57BL/6J マウスの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 マウス肝のパスウェイ解析において、HR 群では発現増加するパスウェイは無かった一方、アラキドン酸代謝および 2 型糖尿病、Jak-STAT シグナル等の低下が認められたことから、HR 摂取は、生活習慣病と関連する可能性が示唆された。また、植物ステロール強化食用油である HC および KS 群では、不飽和脂肪酸合成、PPAR シグナル、ステロイド合成等のパスウェイの遺伝子高発現のほか、細胞周期に関与する遺伝子発現が増加していた。これらの植物油の有効作用と関連すると予測されたパスウェイ以外にも、遺伝子発現に影響が認められることが明らかとなった。これを明らかにするためには、これらの遺伝子発現変動をより詳細に、例えば個別キットを

用いた測定を行って確認する必要がある。

HR、HC および KS は、それぞれ、やし油の中鎖脂肪酸を添加した菜種油、米油とカノーラ油の混合物および植物ステロールを添加した大豆油である。肥満、脂質異常症、血管傷害などの生活習慣病を防ぐ効果を標榜するこれらの食品は、昨今の健康志向の高まりから、積極的に選択され、長期にわたって摂取される場合があると考えられる。従って、トクホ植物油で強化されている物質の由来植物油も含めて、ここで、生体への影響を確認しておくことは重要である。

SHRSP の雄は、カノーラ油摂取で短命化し、その背景には、昇圧促進、血脂上昇、血小板数減少、脳、心および腎傷害などの変化があることが認められている。この有害効果の標的器官は特定されておらず、SHRSP の遺伝的背景病態の悪化促進が原因であると推察された。一方、SHR とその由来系統である WKY ラットでは、カノーラ油 26 週間摂取によって、肝および赤血球のスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) およびカタラーゼ活性が低下し、G6PD 活性が上昇するなど、カノーラ油摂取が生体内の酸化還元機構に影響を及ぼす可能性が示唆された。G6PD は、肝における脂肪合成酵素の一つでもあり、その活性上昇は、動脈硬化などの血管傷害を促進することとの関連が考えられる。さらに、SHRSP では、カノーラ油摂取によって血漿中テストステロンレベルが著しく低下

し、このとき血漿中アルドステロンレベルが上昇する (未報告) ため、このアルドステロン上昇と昇圧促進や血管傷害増悪との関連が疑われる。

前述のように、HR、HC および KS は、それぞれ主成分の油種が異なり、中にはラットで有害効果が認められ、その原因が解明されていないカノーラ (菜種) 油が用いられている製品もある。SHR や WKY ラットでは、大豆油摂取動物を対照としたとき、カノーラ油摂取によって G6PD 活性の上昇が認められているので、マウスにおいても、SHR や WKY ラットと同様に、原料が大豆油である KS 摂取群や対照群に比べ、カノーラ (菜種) 油を原料とする HR や HC を摂取した群では、相対的に G6PD 活性が上昇するのではないかと推測した。しかし、今回の結果から、HR、HC および KS の長期摂取は、ApoE KO マウスにおいても C57BL/6J マウスにおいても、肝 G6PD 活性には影響を及ぼさないことが明らかになった。

カノーラ油摂取によって、既に SHR あるいは WKY ラットの肝で認められている G6PD 活性上昇が、SHRSP の肝においても認められるか否かについては、活性上昇効果が確認された。ここには示さなかったが、この G6PD 活性上昇は、肝だけでなく、腎においても認められた。従って、この作用は、SHRSP および関連系統のラットでは共通に発現するものと考えられた。一方、げっ歯類よりもヒトに近い種であるミニブタでも検討したが、カノーラ油摂取による G6PD 活性上昇は認められな

かった。

今回の研究結果から、トクホ油脂食品、HR、HC および KS は、ApoE KO マウスおよび C57BL/6J マウスに 20 週間摂取させても、SHR や WKY ラットで認められる組織の G6PD 活性上昇をもたらすことがないことが確認された。おそらく、これらの系統のマウスではカノーラ油の G6PD 活性上昇も起こらないであろうと推測された。また、カノーラ油摂取による G6PD 活性上昇には種差があることが示唆された。

#### E. 結論

高脂血症・動脈硬化モデルである ApoE KO 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 20 週間摂取させた。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。また本研究での探索において有意な有用性は認められなかった。

一方、正常マウスの肝臓組織での網羅的遺伝子発現解析において、中鎖脂肪酸が強化されている HR 摂取によって糖尿病、Jak-STAT パスウェイの遺伝子発現低下し、植物ステロール強化植物油である HC および KS 摂取は、不飽和脂肪酸合成、PPAR シグナル、ステロイド合成等のパスウェイの遺伝子高発現のほか、細胞周期に影響を及ぼす可能性が示唆された。正確に調べるためには、個別に遺伝子発現を確認するとともに、背景メカニズムの解明も必要となる。

また、今回の研究結果から、トクホ植物油である HR、HC および KS は、ApoE KO マウスおよび C57BL/6J マウスに 20 週間摂取させても、SHR や WKY ラットで認められる組織の G6PD 活性上昇をもたらすことがないことが確認された。おそらく、これらの系統のマウスではカノーラ油の G6PD 活性上昇も起こらないであろうと推測された。また、カノーラ油摂取による G6PD 活性上昇には種差があることが示唆された。

安全性確保のための研究にニュートリゲノミクス解析を取り入れることの有効性に関しては、本研究で、被験物質の性質や期待されている効果から予測された遺伝子発現以外にも、発現変動が多数認められたことから、網羅的に遺伝子発現を解析することは、有益な手法となりうると考えられた。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hashimoto Y, Yamada K, Tsushima H, Miyazawa D, Mori M, Nishio K, Ohkubo T, Hibino H, Ohara N, Okuyama H. Three dissimilar high fat diets differentially regulate lipid and glucose metabolism in obesity-resistant Slc: Wistar/ST rats. *Lipids* 48, 803-815, 2013

## 2. 学会発表

1) 糖尿病マウスにおける機能性食用油の4週間摂取の影響、内藤由紀子、大原直樹、岩井直温、日本脂質栄養学会第23回大会平成26年8月、東京、J Lipid Nutr 23, 159, 2013

2) Depressed production by rapeseed oil ingestion of testosterone is partially due to decreased expression of testicular CYP11A1 in SHRSP, Ayana Takagi, Mina Teramachi, Yukiko Naito, Daisuke Miyazawa, Naoki Ohara, The 88th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (No. P3-137, Nagoya, 2015.3.18-20)

3) Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid intake on type II diabetes with obesity mice, Yukiko Naito, Huachun Weng, Naoharu Iwai, The 88th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (No. P3-135, Nagoya, 2015.3.18-20)

## 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

ApoE 欠損 (KO) マウスおよび正常 C57BL/6J マウスに、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 20 週間摂取させた。体重、摂餌量および摂水量に群間差が認められなかった。また、血液、血液生化学、病理学的検査を行ったが、トクホ植物油摂取群に顕著な有害作用は認められなかった。C57BL/6J マウスにおいて、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、各投与群において、Cont 群と比較して高発現または低発現した遺伝子数が有意に多く含まれるパスウェイが散見され、脂肪酸代謝関連以外のパスウェイ（細胞サイクル等）も含まれていた。有効性に関与する可能性のある糖尿病発症パスウェイでの遺伝子低発現が、HR 群で認められた。

以上をまとめると、ApoE KO マウスおよび正常 C57BL/6J マウスに 20 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、網羅的に遺伝子発現を解析することは、予測していた遺伝子変動以外の変動を見つけることができ、さらに詳細な解析につながり有用な手法であることが示唆された。

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つ。平成 26 年度は、高脂血症・動脈硬化モデル ApoE 欠損マウスおよび正常 C57BL/6J マウスを用いて、これらの植物油摂取の影響解析を行った。

なお、本研究成果を公表するにあたり、開示すべき COI 関係にある企業等はない（トクホ植物油は研究代表者が

市販品を購入した)。

## 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 (平成 24 および 25 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) は平成 24 年度に行い、 $-30^{\circ}\text{C}$ 、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

雄性 ApoE 欠損 (KO) および正常 C57BL/6J マウス各 20 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、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 5 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 20 週間自由摂取させた。

### 4. 検査および測定

#### 4-1. 一般状態の観察

摂取期間中、全例の一般状態を観察した。

#### 4-2. 体重、摂餌量および摂水量測定

体重、摂餌量 (24 時間) および摂水量 (24 時間) は、1 または 2 週に 1 回の頻度で測定した。

#### 4-3. 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、腹大静脈より EDTA またはヘパリン加採血した。一部は血液検査に用い、残りは遠心分離により血漿を得、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。放血致死後、動物を剖検し、肝臓、腎臓 (両側)、心臓、内臓脂肪 (精巣上部周囲、両側)、精巣 (両側) および脾臓 (C57BL/6J マウス) 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、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。凍結肝臓の一部は、「食用油摂取がグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) 活性に及ぼす影響」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、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、Cont 群と比較して、発現が 1.5 倍以上の増加または 0.67 倍以上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、これらの発現変動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. 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. 体重、摂餌量および摂水量

摂取期間中の体重の推移、および摂餌・摂水量の変化を、それぞれ Figure 4、5 および 6 に示した。両系統において、体重、摂餌量および摂水量に群間差は認められなかった。

#### 3. 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 7~12)。

#### 4. 血液生化学検査

C57BL/6J マウスの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、群間差が無かった (Figure 13)。

#### 5. 器官重量

ApoE KO マウスでは、Cont 群と比較して、HR 群の相対肝重量は高かったが



( $p < 0.05$ )、白色脂肪、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 14~20)。

#### 6. マイクロアレイ解析

C57BL/6J マウスにおいて、Cont 群と比較して 1.5 倍以上の発現上昇または 0.67 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)。

#### 7. パスウェイ解析

発現が 1.5 倍以上の増加または 0.67 倍以上の低下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 5~9)。この基準で発現増加した遺伝子数は、HR、HC および KS 群で、それぞれ 36、90 および 144 であり、発現低下した遺伝子数は、それぞれ 114、82 および 66 であった。また、HC および KS 群では、3 倍以上発現レベルが上昇した遺伝子が認められたが、HR 群には無かった。

脂肪酸代謝に関与する経路 [不飽和脂肪酸生合成 (HC 群で増加)、PPAR シグナル (HC 群で増加)、アラキドン酸代謝 (HR 群で低下、KS 群で増加)、ステロイド生合成 (HC および KS 群で増加) 2 型糖尿病 (HR 群で低下) の他、Jak-STAT シグナル (HR 群で低下、HC および KS 群で増加)、薬物代謝 (HR および KS 群で低下) 等が認められた。また、がんに関連するパスウェイや p53 シグナルを含めた細胞周期調節の遺伝子高発現が、HC および KS 群で認

められた。

#### D. 考察

今年度は新たに、高脂血症・動脈硬化疾患モデル動物である ApoE KO 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 20 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。また、摂餌量や摂水量、血液検査においても群間差が認められなかったことから、トクホ植物油の 20 週間摂取がこれらに影響を与えないことが明らかとなった。C57BL/6J マウスで行った血液生化学検査でも、摂取の影響は認められなかった。

器官重量は、ApoE KO マウスの HR 群の肝重量が Cont 群と比較して有意に重かったことを除き、その他の器官や C57BL/6J マウスでは、トクホ植物油摂取の影響は認められなかった。前年度、ob/ob マウスにおいて HR 摂取による肝重量の増加が認められたが C57BL/6J マウスでは影響がなかったことから、HR は、摂取期間の長短 (今年度 20 週間、前年度 4 週間) に関わらず C57BL/6J マウスの肝重量に影響を及ぼさないが、疾患モデル動物 (ApoE KO マウスおよび ob/ob マウス) の肝重量を増加させることがわかった。

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、体重や内臓脂肪に注目した。両系統において、Cont 群と比較して、HR 群の体重およ

び精巣上体周囲の白色脂肪重量には差が認められなかった。C57BL/6J マウスに4週間摂取させた前年度の研究においても、体重や脂肪量を減少させるような作用は無かったことから、投与期間の長短による影響は無いことが分かった。

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、C57BL/6J マウスの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 マウス肝のパスウェイ解析において、HR 群では発現増加するパスウェイは無かった一方、アラキドン酸代謝および 2 型糖尿病、Jak-STAT シグナル等の低下が認められたことから、HR 摂取は、生活習慣病の発症・進行と関連する可能性が示唆された。また、植物ステロール強化食用油である HC および KS 群では、不飽和脂肪酸合成、PPAR シグナル、ステロイド合成等のパスウェイの遺伝子高発現のほか、細胞周期に関与する遺伝子発現が増加していた。このように、植物油の有効作用と関連すると予測されたパスウェイ以外にも、遺伝子発現に影響が認められることが明らかとなった。これを明らかにするためには、これらの遺伝子発現変動をより詳細に、例えば個別キットを用いた測定を行って確認する必要がある。

## E. 結論

高脂血症・動脈硬化モデルである ApoE KO 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 20 週間摂取させた。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。また本研究での探索において有意な有用性は認められなかった。

一方、正常マウスの肝臓組織での網羅的遺伝子発現解析において、中鎖脂肪酸が強化されている HR 摂取によって糖尿病、Jak-STAT パスウェイの遺伝子発現低下し、植物ステロール強化植物油である HC および KS 摂取は、不飽和脂肪酸合成、PPAR シグナル、ステロイド合成等のパスウェイの遺伝子高発現のほか、細胞周期に影響を及ぼす可能性が示唆された。正確に調べるためには、個別に遺伝子発現を確認するとともに、背景メカニズムの解明も必要となる。

これらの結果から、被験物質の性質や期待されている効果から予測された遺伝子発現以外にも、発現変動が多数認められたことから、網羅的な遺伝子発現解析は、食品の安全性確保のための有益な手法となりうると考えられた。

## 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

無し

## 2. 学会発表

- 1) 糖尿病マウスにおける機能性食用油の 4 週間摂取の影響、内藤由紀子、大原直樹、岩井直温、日本脂質栄養学会第 23 回大会平成 26 年 8 月、東京、J Lipid Nutr 23, 159, 2013
- 2) Depressed production by rapeseed oil ingestion of testosterone is partially due to decreased expression of testicular CYP11A1 in SHRSP、Ayana Takagi, Mina Teramachi, Yukiko Naito, Daisuke Miyazawa, Naoki Ohara, The 88th Annual Meeting

of the Japanese Pharmacological Society (No. P3-137, Nagoya, 2015. 3. 18-20)

- 3) Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid intake on type II diabetes with obesity mice, Yukiko Naito, Huachun Weng, Naoharu Iwai, The 88th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (No. P3-135, Nagoya, 2015. 3. 18-20)

H. 知的所有権の取得状況  
無し

Table 1-1 被験物質の比較（独立行政法人国立健康栄養研究所「健康食品の安全性・有効性情報」より抜粋<sup>1)</sup>）

| 食品名         | ヘルシーリセッタ   | ヘルシーコレステ   | 健康サララ   |
|-------------|--|--|---|
| 本研究での略称     | HR   | HC   | KS  |
| 製造あるいは販売者   | 日清オイリオグループ株式会社   | 日清オイリオグループ株式会社   | 味の素株式会社   |
| 許可された年月     | 平成 14 年 12 月   | 平成 15 年 9 月  | 平成 13 年 12 月  |
| 許可された表示     | この油は、中鎖脂肪酸を含み、体に脂肪がつきにくいのが特徴です。体脂肪が気になる方や肥満気味の方は、通常の油に替えて、この油をお使いいただくことをおすすめします。   | この油は、コレステロールの体内への吸収を抑える植物ステロールを豊富に含んでいるので、血中コレステロールを下げるのが特長です。コレステロールが気になる方の食生活の改善に役立ちます。                                    | 大豆胚芽を原料とする健康サララは、コレステロールの体内への吸収を抑える働きがある天然の植物ステロールを豊富に含んでいるので血中総コレステロールや悪玉 (LDL) コレステロールを下げるのが特長です。コレステロールが高めの方の毎日の食事におすすめです。 |
| 一日当たりの摂取目安量 | 各種料理に合わせて通常ご使用の食用油と同じ様に調理用油、卓上油としてお使いください。普段ご使用の食用油と同じ量でご使用になれます。一日当たり摂取目安量として 14 g 程度を摂取してください。(日本人の食用油の平均摂取量は 10~14 g/日です) | 各種料理に合わせて通常ご使用の食用油と同じ様に調理用油、卓上油としてお使いください。普段ご使用の食用油と同じ量でご使用になれます。一日当たり摂取目安量として 14 g 程度を摂取してください。(日本人の食用油の平均摂取量は 10~14 g/日です) | 調理用の油として、普段ご使用の食用油と同じようにお使いください。(日本人の食用油摂取量は平均 10~12 g/日)   |