

Figure 10 Platelet of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

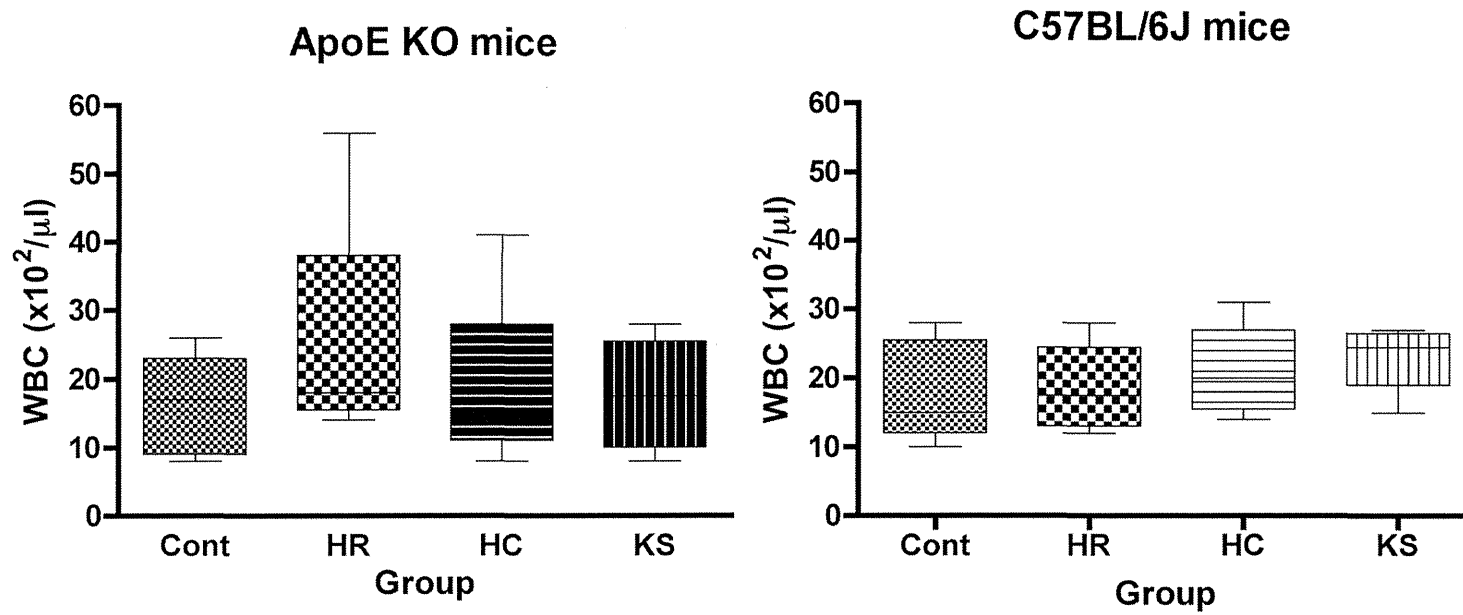


Figure 11 WBC of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks  
WBC, white blood cells

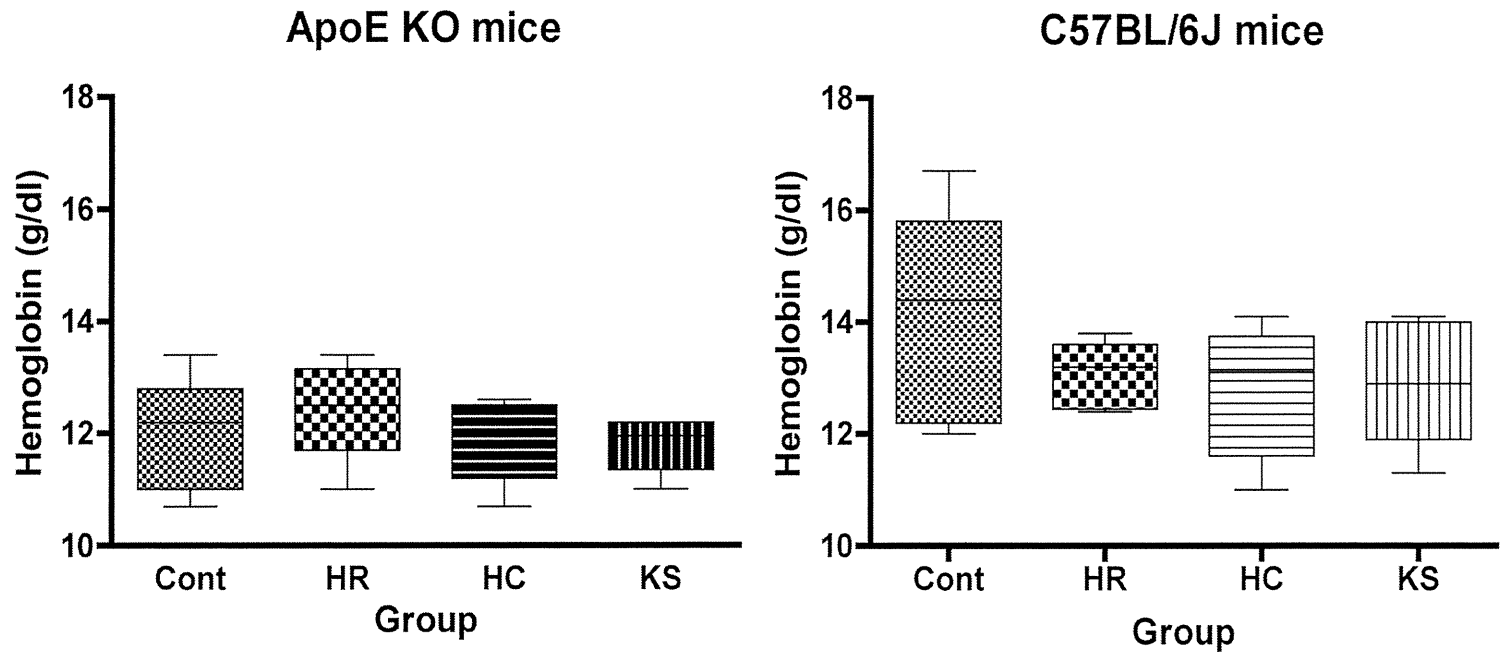


Figure 12 Hemoglobin of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

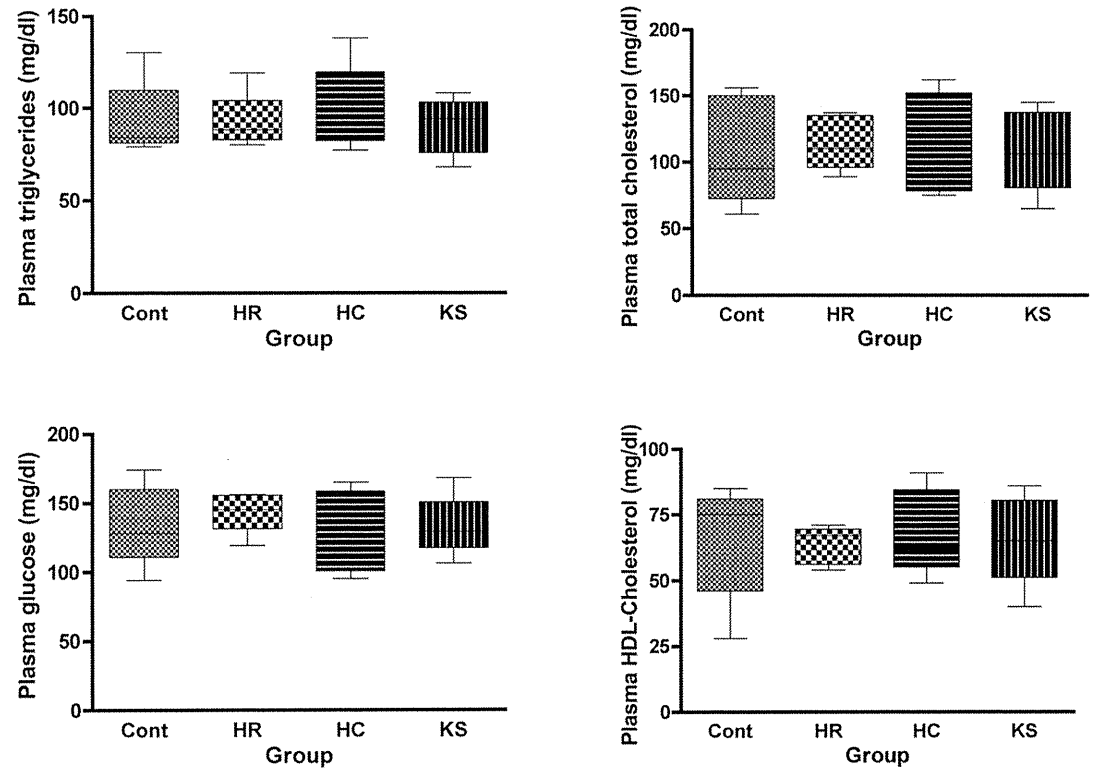


Figure 13 Blood biochemistry of C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

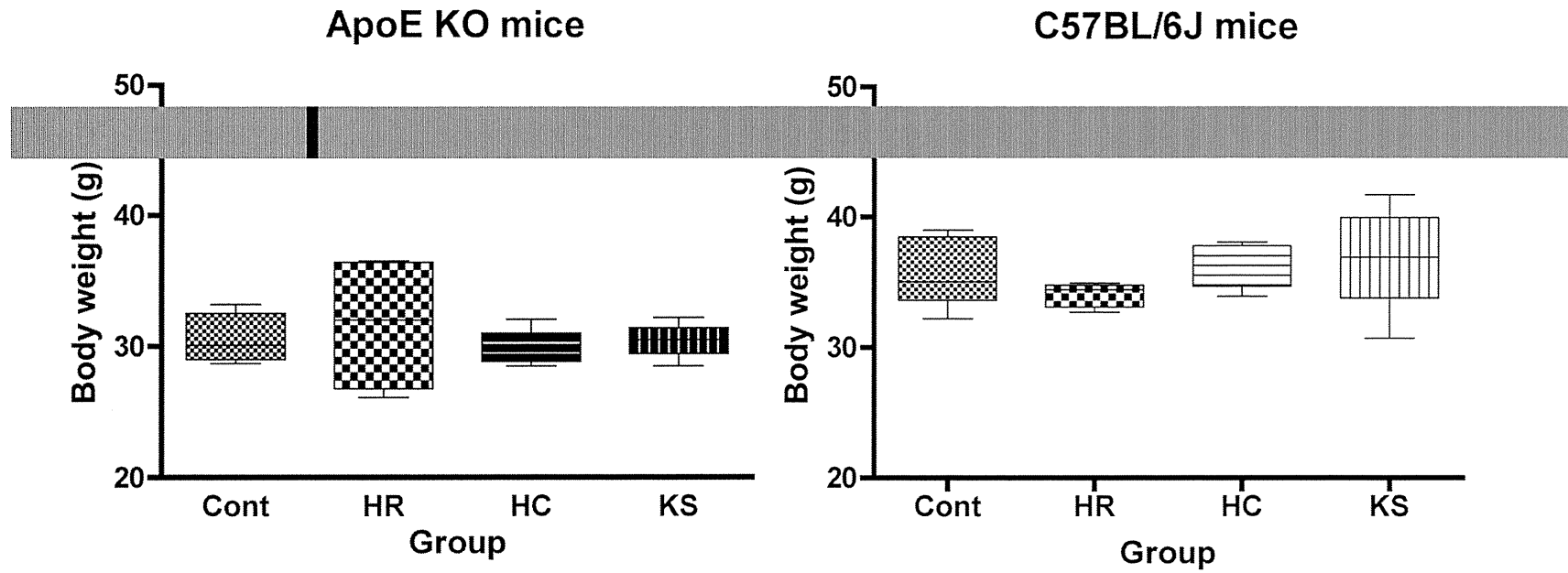


Figure 14 Body weights of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

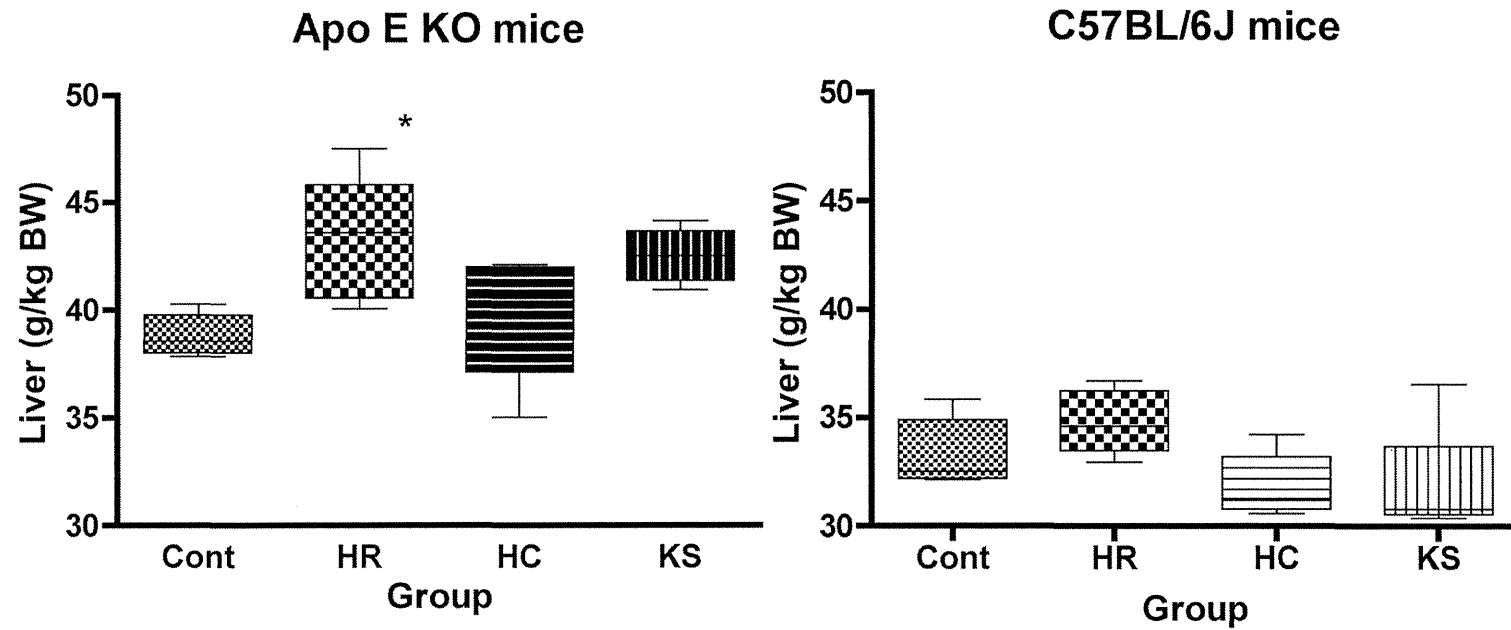


Figure 15 Relative liver weights of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

\* $p < 0.05$ , significantly different from the value of Cont group (Dunnett's test)

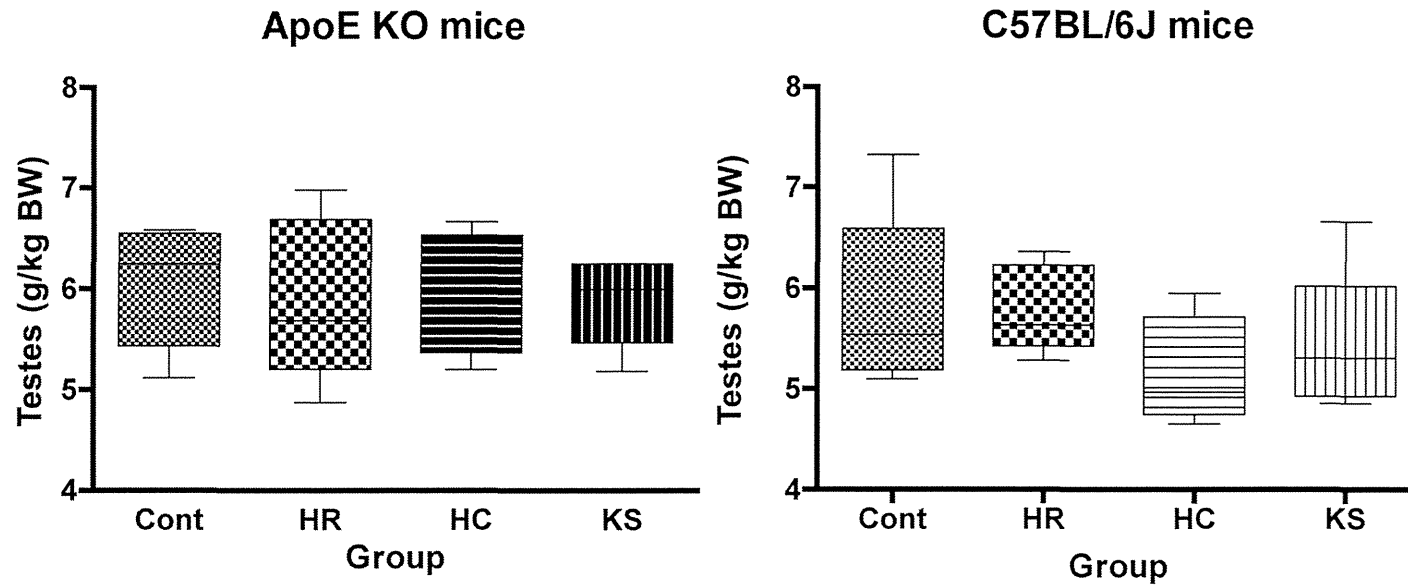


Figure 16 Relative testis weights of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

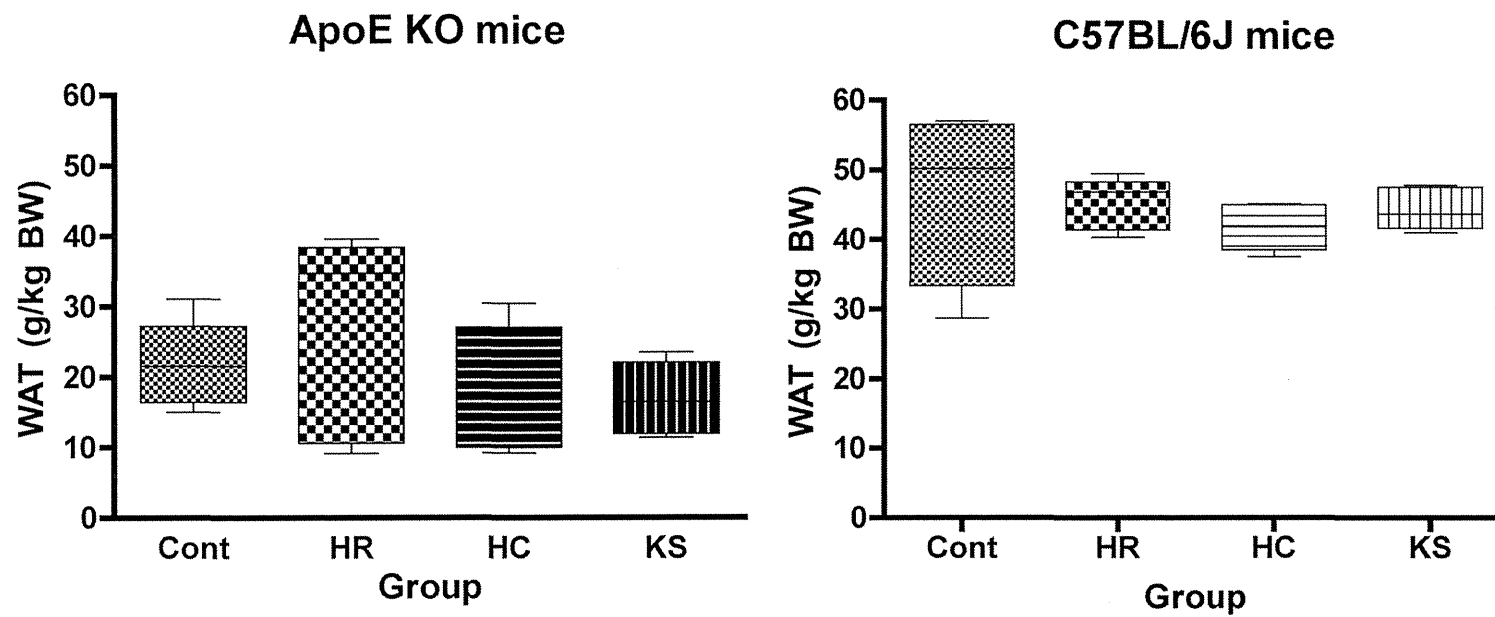


Figure 17 Relative WAT weights of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

WAT, white adipose tissues



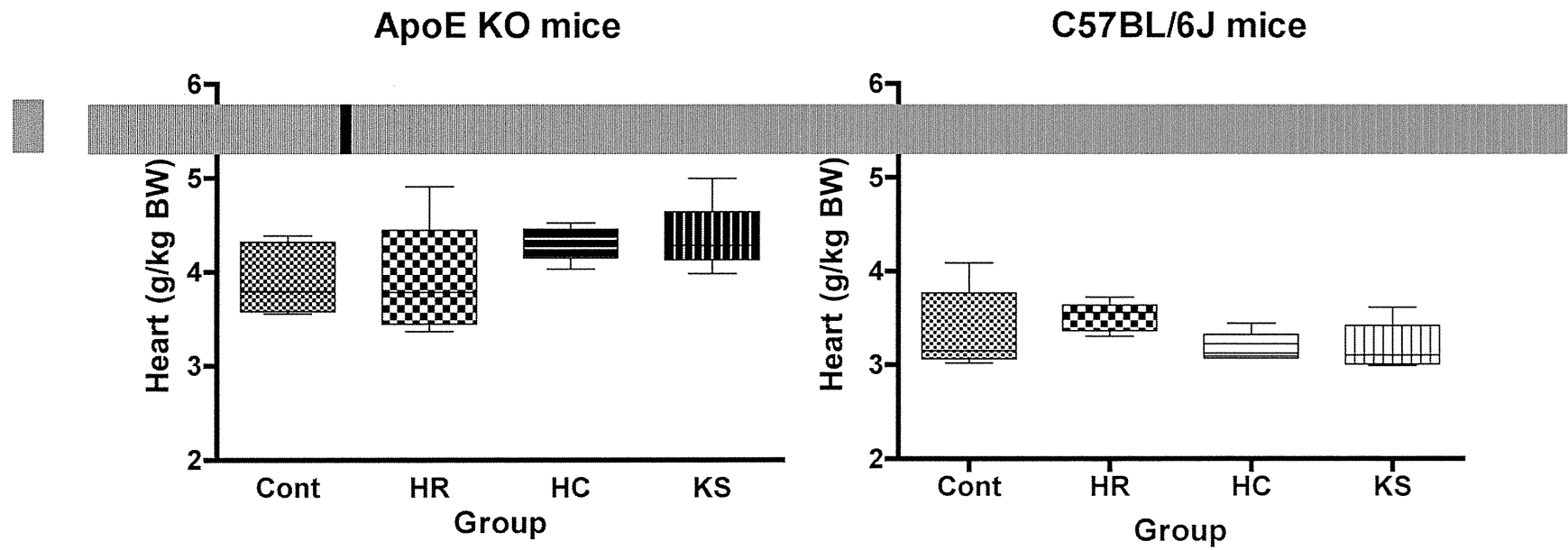


Figure 18 Relative heart weights of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

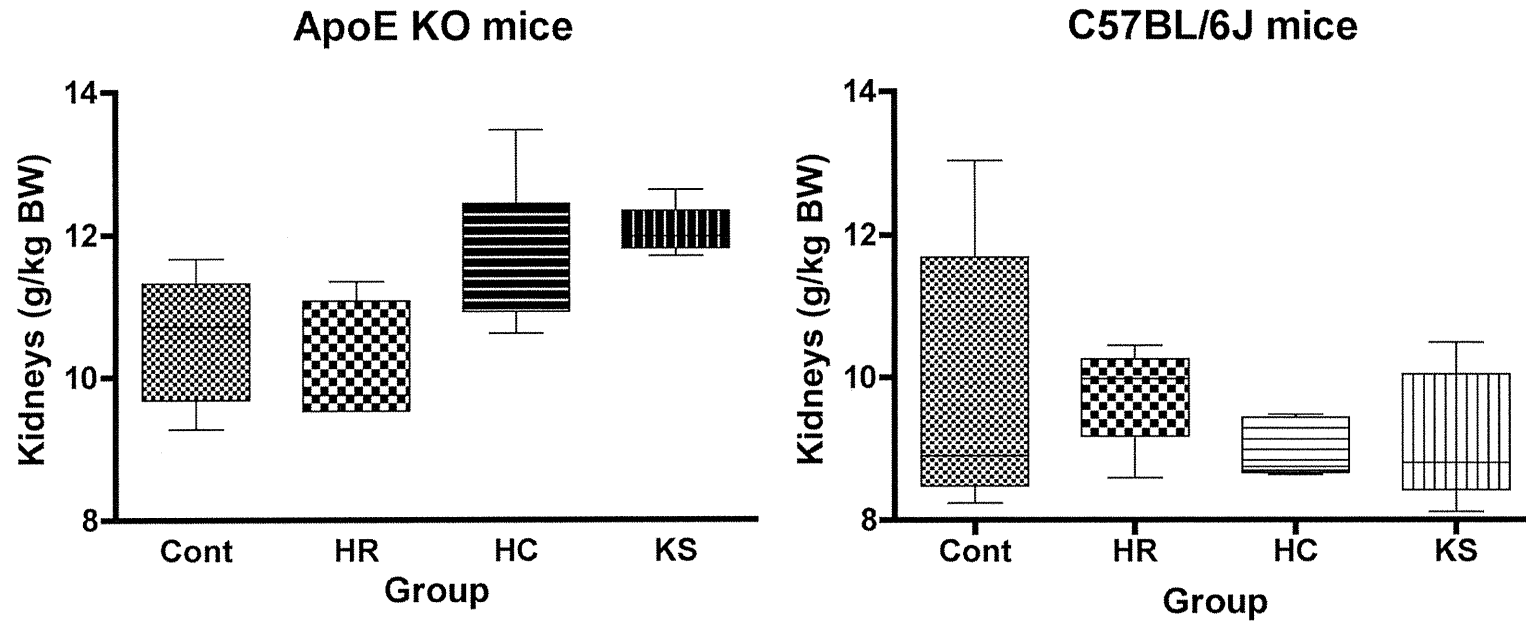


Figure 19 Relative kidney weights of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

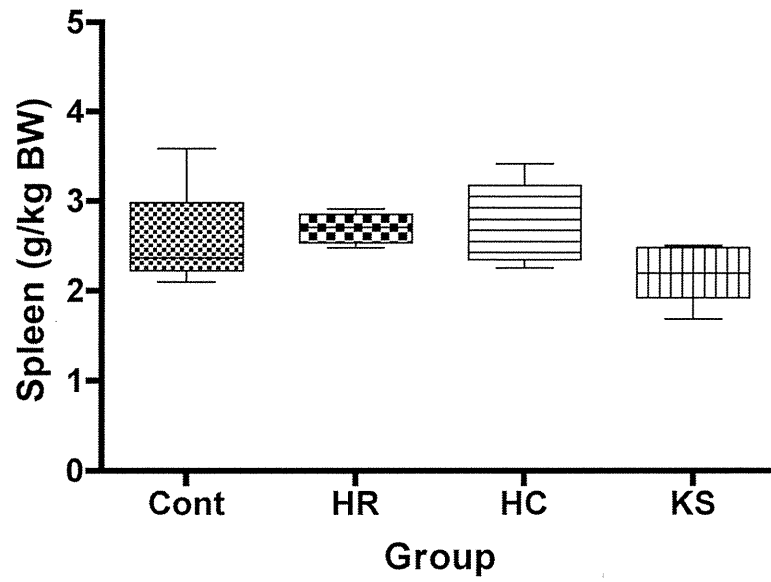


Figure 20 Relative spleen weights of C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

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  
— 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 —

分担研究者 大原 直樹 金城学院大学薬学部・教授  
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

市販されている特定保健用食品（トクホ）の植物油製品3品目；ヘルシーリセッタ®（HR、日清オイリオ）、ヘルシーコレステ®（HC、日清オイリオ）および健康サララ®（KS、味の素）のいずれかを、油脂を含まないAIN-93G組成の飼料に唯一の脂肪源として7w/w%の割合で添加し、ApoEノックアウトマウスおよびその由来系統であるC57BLマウスに20週間摂取させた。対照群には、主に大豆油を含む通常のAIN-93G飼料を与えた。摂取期間終了後、肝を摘出してグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PD）活性を測定した。カノーラ油は、高血圧自然発症ラット（SHR）およびその由来系統であるWKYラットの雄において、肝のG6PD活性を顕著に増大させる。今回のトクホ油脂にもカノーラ油を主な原料として含むものがあるため、マウスでその影響が認められるか否に注目した。とくに、動脈硬化などの血管傷害を起し易いApoEノックアウトマウスにおける変化に注目したが、いずれのトクホ油脂によっても、これらの系統のマウスのG6PD活性には影響が認められなかった。カノーラ油摂取による肝のG6PD活性への影響を、SHRおよびWKYラットと近縁の脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）にカノーラ油を8週間強制摂取させて確認したところ、対照である大豆油摂取群と比較し、顕著なG6PD活性の上昇が確認された。また、カノーラ油を18ヶ月間摂取させたミニブタの肝G6PD活性も測定したが、対照である大豆油摂取群との間に差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活性上昇をもたらさ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事が推測された。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。

### A. 研究目的

3種類のトクホ油脂食品は、それぞれ原料油種が異なる。われわれは、実験動物を用いた研究で、植物油がその脂肪酸組成では説明のできない様々な生理作用を示し、特にカノーラ（菜種）油は、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）やその由来系統である高血圧自然発症ラット（SHR）、さらに両者の由来系統であるWKYラットの雄において顕著な有害効果を示すことを

確認してきた。3種類のトクホ油脂、ヘルシーリセッタ®（HR、日清オイリオ）、ヘルシーコレステ®（HC、日清オイリオ）および健康サララ®（KS、味の素）は、それぞれ、やし油の中鎖脂肪酸を添加した菜種油（HR）、米油とカノーラ油の混合物（HC）および植物ステロールを添加した大豆油（KS）であるため、健康効果を標榜するこれらの食品が積極的に選択され、長期にわたって摂取された場合の生体への影響を確

認しておくことは重要である。SHR や SHR の由来系統である WKY ラットでは、カノーラ油摂取によって G6PD 活性が上昇することが確認されており (1)、G6PD は肝の脂質合成にかかわる酵素の一つであるため、本年度の研究は、HR、HC または KS を長期摂取させた ApoE ノックアウトマウスおよびその由来系統である C57BL マウスにおける肝グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) 活性を測定し、SHRSP でも同様の影響があるか否かを確認することを目的とした。

なお、精巣テストステロン量の測定を計画したが、年度内に実施することができなかった。

## B. 研究方法

### ApoE ノックアウトマウスおよび C57BL マウスの肝 G6PD 活性測定

6 週齢の雄性 ApoE ノックアウトマウス (B6.129P2-Apoetm1Unc/J、The Jackson Laboratories、Bar Harbor、Maine) およびその由来系統である C57BL マウスをそれぞれ 4 群に分け、HR、HC または KS を唯一の脂肪源として添加 (7w/w%) した AIN-93G 組成の精製飼料を与え、20 週間飼育した。それぞれの対照群には通常の AIN-93G 飼料 (脂肪源として主にダイズ油を含む) を与えた。

摂取期間終了後、これらの動物から肝を摘出し、使用時まで -80°C で凍結保存した。G6PD 活性測定に先立ち、凍結肝組織を半融解して一部を採り、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°C 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。

### SHRSP 肝におけるカノーラ油摂取による G6PD 活性上昇の確認

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。通常の AIN-93 組成精製飼料を与えて馴化飼育し、馴化期間終了時に 1 日摂餌量を測定した。その後同様に週 1 回摂餌量を測定し、それぞれ翌週の推定摂餌量とし、飼育第 2 週からは、AIN-93 組成の無脂肪精製飼料を与えて、推定 1 日摂餌量の 10w/w% に当たる大豆油 (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、2000×g、4°C で 10 分間遠心して得た上清の G6PD 活性を測定した。

### カノーラ (菜種) 油摂取ミニブタ肝における G6PD 活性の測定

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。

### タンパク質濃度の測定

G6PD の比活性を求めるため、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た。

### 統計学的方法

測定結果は平均値 ± SEM で表わした。

Prism 6.0f (GraphPad®, San Diego) を用い、2 群の平均値の差の有意性は対応のない t-検定で、マウスの実験結果は ANOVA の後、Turkey の多重比較で、平均値の群間差を評価した。p<0.05 を有意とした。

### (倫理面への配慮)

本研究は、「金城学院大学動物実験指針」および「国立循環器病研究センター動物実

験実施規定」に基づき、「金城学院大学動物実験委員会」および「国立循環器病研究センター実験委員会」による実験計画書の審査を経て、それぞれ、実験動物に対する動物愛護上の配慮等、倫理的配慮が適性であることが確認された後、実施許可されたものである。

#### C. 研究結果

##### ApoE ノックアウトマウスおよび C57BL マウス肝 G6PD 活性

C57BL マウスの肝 G6PD 活性は、対照群では  $91.71 \pm 12.49$  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、群間に差は認められなかった (Figure 1)。

ApoE ノックアウトマウスでは、対照群では  $19.89 \pm 2.160$  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、これらも群間に差は認められなかった (Figure 2)。

##### SHRSP 肝におけるカノーラ油摂取による G6PD 活性上昇

SHRSP 肝ホモジネート中の G6PD 活性は、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 (Figure 3)。

##### カノーラ (菜種) 油摂取ミニブタ肝における 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) (Figure 4)。

#### D. 考察

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、長期的にわたって摂取される場合があると考えられる。従って、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 (2, 3)、血脂上昇 {4, 5、これらは SHRSP の由来系統である高血圧自然発症ラット (SHR) および両者の由来系統である WKY ラットでの研究。}、血小板数減少 (6)、脳、心および腎傷害 (3, 6) 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 (3)。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 (1)、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 (7)、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。今回の研究では、動脈硬化等の血管傷害を起こしやすい ApoE-KO マウスおよび ApoE-KO マウスの由来系統である C57BL マウスに 3 種類のトクホ油脂食品を長期間にわたって与え、肝の G6PD 活性への影響を調べた。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 (1)、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 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 マウスに 30 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。

#### (参考文献)

1. Ohara, N., Kasama, K., Naito, Y., Nagata, T., Saito Y., Kuwagata, M., Okuyama, H. 2008. Different effects of 26-week dietary intake of rapeseed oil and soybean oil on plasma lipid levels, glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and cyclooxygenase-2 expression in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem Toxicol* 46, 2573-2579.

2. Naito, Y., Konishi, C., Katsumura, H., Ohara, N. 2000. 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.

3. Naito, Y., Nagata, T., Takano, Y., Nagatsu, T., Ohara, N. 2003. Rapeseed oil ingestion and exacerbation of hypertension-induced conditions in stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Toxicol* 187, 205-216.

4. Naito, Y., Yoshida, H., Nagata, T., Tanaka, A., Ono, H., Ohara, N. 2000. 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— *Toxicol* 146, 197-208.

5. Naito, Y., Kasama, K., Yoshida, H., Ohara, N. 2000. 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.

6. Ohara, N., Naito, Y., Nagata, T., Tatematsu, K., Fuma, S., Tachibana, S., Okuyama, H. 2006. Exploration for unknown substances in rapeseed oil that shorten survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Effects of super critical gas extraction fractions. *Food Chem Toxicol* 44, 952-963.

7. Okuyama H, Ohara N, Tatematsu K, Fuma S, Nonogaki T, Yamada K, Ichikawa Y, Miyazawa D, Yasui Y, Honma S. 2010. Testosterone-lowering activity of canola and hydrogenated soybean oil in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J Toxicol Sci.* 35, 743-747.

F. 健康危険情報  
なし。

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) Ayana Takagi, Mina Teramachi, Yukiko Naito, Daisuke Miyazawa, Naoki Ohara. Depressed production by rapeseed oil ingestion of testosterone is partially due to decreased expression of testicular CYP11A1 in SHRSP. The 88th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (Nagoya, 2015.3.18-20)



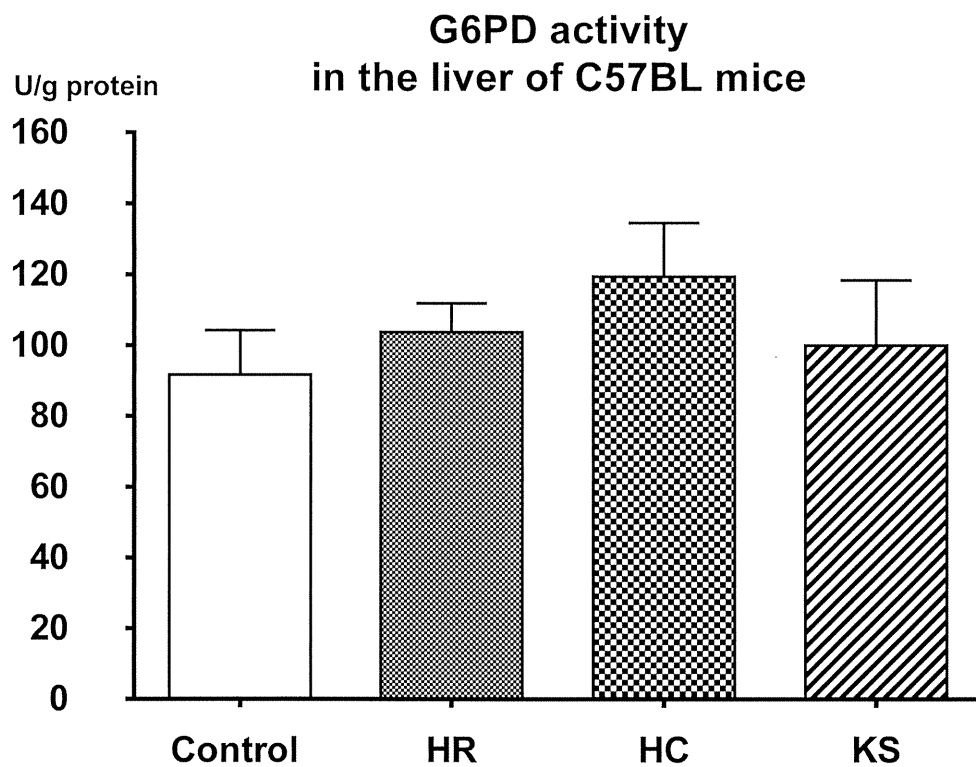


Figure 1 G6PD activity in the liver of C57BL mice

Male C57BL mice were fed on AIN-93G diet containing 7w/w% HR, HC or KS as the sole dietary fat for 20 weeks. N=5.

HR, rapeseed oil containing medium chain fatty acids of coconut oil origin; HC, mixture of rice-bran oil and canola oil; soybean oil added with phytosterols

### G6PD activity in the liver of ApoE-KO mice

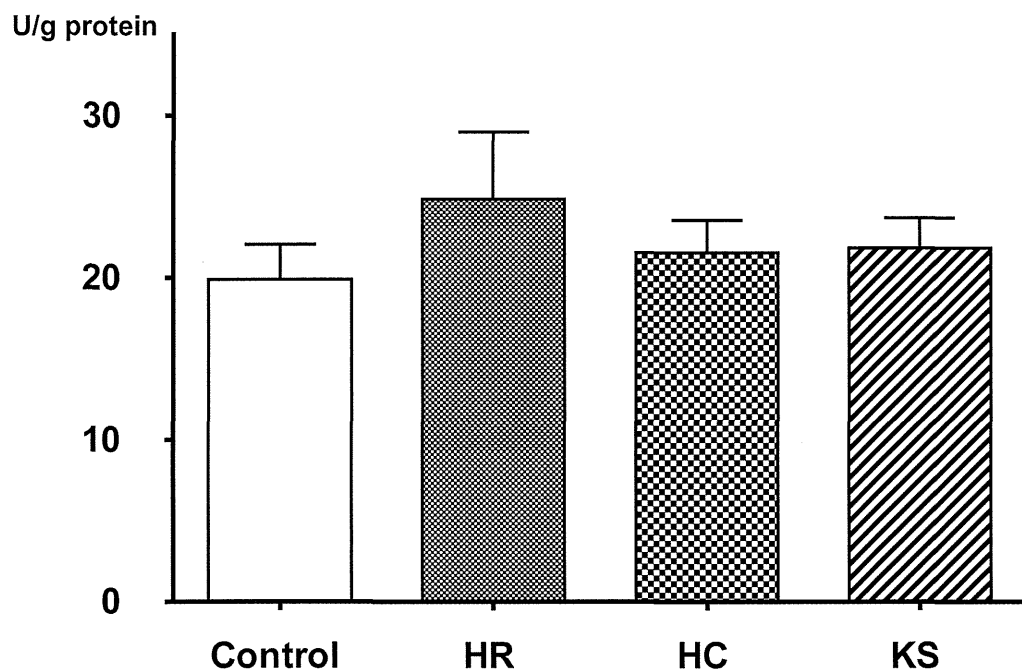


Figure 2 G6PD activity in the liver of ApoE-KO mice

Male ApoE-KO mice were fed on AIN-93G diet containing 7w/w% HR, HC or KS as the sole dietary fat for 20 weeks. N=4-5.

HR, rapeseed oil containing medium chain fatty acids of coconut oil origin; HC, mixture of rice-bran oil and canola oil; soybean oil added with phytosterols

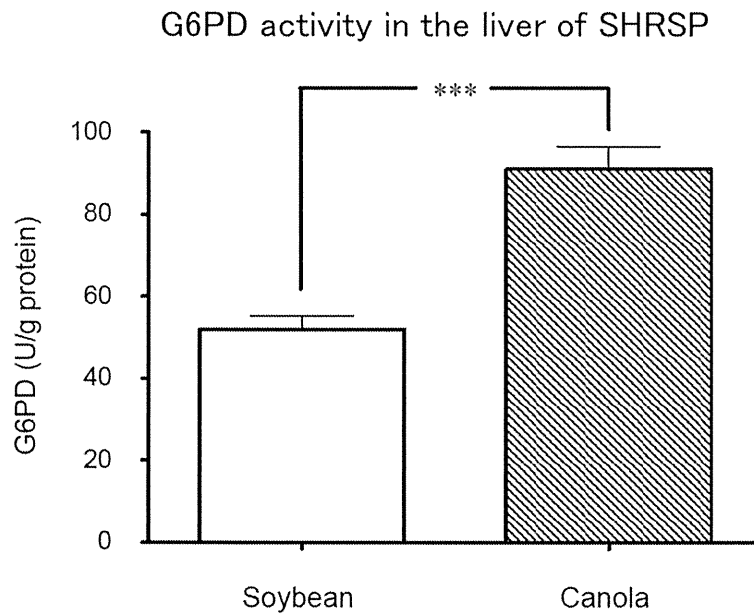


Figure 3 G6PD activity in the liver of SHRSP

Male SHRSP were fed on AIN-93G diet without fat and given soybean oil or canola oil by gavage for 8 weeks. The daily amount of each oil given corresponded with 10w/w% of daily food intake. N=10. \*\*\*p<0.001 (unpaired t-test).

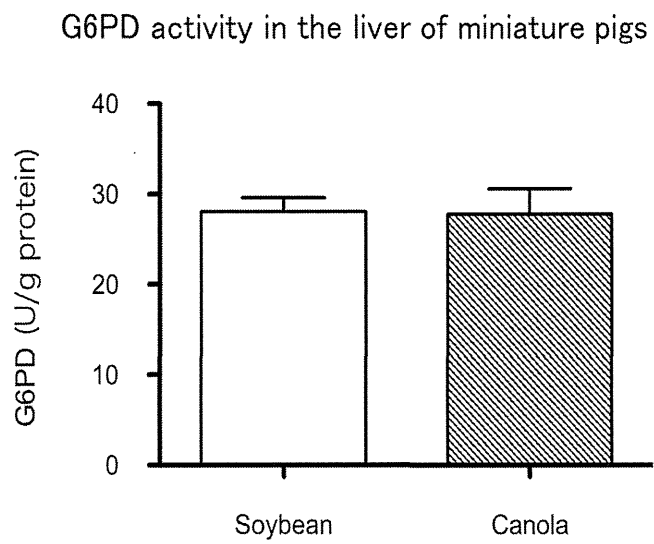


Figure 4 G6PD activity in the liver of miniature pigs

Male miniature pigs were fed on a diet added with 10 w/w% soybean oil or canola oil for 18 months. N=6.