

201426004B

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 総合研究報告書

研究代表者 内藤 由紀子

平成27(2015)年3月

## 目 次

### 総合研究報告

#### 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 .....	13
内藤 由紀子、岩井 直温	

食用油摂取がステロイドホルモンや脂質合成酵素活性に及ぼす影響 .....	133
大原 直樹、内藤 由紀子	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	163
---------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	165
-----------------------	-----



# 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）

総合研究報告書（総括）

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。トクホの植物油は、中鎖脂肪酸が強化されたもの（HR）および植物ステロールが強化されたもの（HC および KS）であり、HC と KS は植物ステロールの含有量が異なる。これらを、生活習慣病モデル動物およびその起源動物（正常動物）に摂取させ、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。平成 24、25 および 26 度の対象疾患は、それぞれ高血圧、肥満・糖尿病および高脂血症・動脈硬化とした。したがって、平成 24 年度は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、平成 25 年度は肥満・糖尿病（ob/ob）マウスおよび由来系統の C57BL/6J マウス、平成 26 年度は ApoE 欠損（KO）マウスを用いた。また投与期間は、平成 24 および 25 年度は 4 週間、平成 26 年度は 20 週間とした。

#### 1. 機能性食用油の安全性に関する研究

上記の条件で動物に摂取させてその影響を評価した結果、顕著な有害作用は認められないことが明らかとなった。一方、拡張期血圧の上昇（HC、KS 摂取 SHRSP）、心重量増加（KS 摂取 SHRSP）、HR 摂取による肝重量増加（HR 摂取 ob/ob および ApoE KO マウス）等が認められたことから、さらに背景メカニズムを調べる必要があると考える。またトクホに表示される有効性は、正常動物では認められないことが明らかとなった一方で、疾患モデル動物では ob/ob マウスにおいて HR 摂取によって白色脂肪重量が減少し、SHRSP においては各植物油の摂取により HDL-コレステロールが増加した（並行して総コレステロールも増加）が、これら以外に表示に関わる有効作用は認められなかった。その他に、ob/ob および C57BL/6J マウスで、各植物油の血糖値に対する有効性が認められた。網羅的に遺伝子発現解析では、トクホ植物油の性質から予測される以外のパスウェイへの影響が認められたことから、この解析手法を取り入れて安全性研究を行うことの意義が確認できた。

## 2. 食用油摂取がステロイドホルモンや脂質合成酵素活性に及ぼす影響

SHRSP精巢中のプレグネノロン、アンドロステンジオンおよびテストステロンを定量した結果、HC摂取動物の精巢プレグネノロン濃度が有意に上昇したが、他のホルモンには影響が認められなかった。また、ob/obマウスの肝の遺伝子発現情報について、原料がカノーラ油であるHRおよびHCに注目してパスウェイ解析した結果、HRおよびHCに共通して発現低下がみられた遺伝子は、*CYP1a2*および*Bdkrb2*であり、脂肪酸の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。カノーラ油を8週間自由摂取させたSHRSPの精巢中の*StAR*、*CYP11A*および*CYP17*の発現は、対照としたダイズ油群と比較して有意に抑制され、*CYP11A*はタンパク発現も抑制された。ApoE KOおよびC57BLマウスの肝グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) 活性には、20週間のトクホ植物油摂取は影響を与えなかった。カノーラ油摂取は、高血圧自然発症ラット (SHR) および正常血圧Wistar-Kyoto (WKY) ラットの肝G6PD活性を顕著に増大させるが、これを原料としたトクホ植物油の摂取による影響はマウスで認められなかったことや、カノーラ油を18ヶ月間摂取させたミニブタでも同様の結果であったことから、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。

以上をまとめると、トクホ植物油3種を複数の生活習慣病モデル動物および正常動物に4または20週間摂取させると、疾患の有無に関わらず顕著な有害作用な無いことが明らかとなった。しかし、疾患動物においては、血圧、心臓・肝臓重量、ステロイド代謝、トクホ植物油の性質から予測される以外のパスウェイでの遺伝子発現変動が認められるものもあった。また、白色脂肪重量や血糖値に対する有効性も含めて、さらに詳細な解析が必要とされる。上記のように、網羅的に遺伝子発現解析の有用性がわかったことから、安全性研究にこの解析手法を取り入れることの意義が確認できた。

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

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。

### 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

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がる研究となる。

研究の目的、方法および期待される効果の流れ図を示した（Figure 1）。

平成24年度は脳卒中・高血圧、平成25年度は肥満・糖尿病、平成26年度は高脂血症・動脈硬化に注目し、それぞれの疾患モデル動物および対応する正常起源動物を用いた。

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. トクホ植物油および飼料

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。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。また対照（Cont）飼料として AIN93G 精製飼料を用いた。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。

### 2. 機能性食用油の安全性に関する研究

雄性 SHRSP および WKY ラット（平成 24 年度）、ob/ob および C57BL/6J マウス（平成 25 年度）、ApoE KO および C57BL/6J マウス（平成 26 年度）を用いた。それぞれ Cont 群、HR 群、HK 群 および KS 群とし、混餌飼料を自由摂取させた（平成 24 および 25 年度は 4 週間、平成 26 年度は 20 週間）。

一般状態の観察、体重、摂餌量、剖検、器官重量測定、血液生化学検査を共通して行ったほか、追加評価項目として、血圧測定（平成 24 年度）、尿検査（平成 24 および 25 年度）、糖負荷試験（平成 25 年度）、ヘモグロビン（Hb）A1c 測定（平成 25 年度）、血液検査（平成 25 および 26 年度）を実施した。また、SHRSP、WKY ラット、ob/ob マウス および C57BL/6J マウス（20 週間摂取）の肝臓 RNA を抽出・精製し、アレイ解析を行い、設定した基準を上回る発現変動のあった遺伝子をもとにパスウェイ解析を行った。

### 3. 食用油摂取がステロイドホルモンや脂質合成酵素活性に及ぼす影響

2. の研究で抽出した SHRSP 精巣組織からステロイド類を抽出し、

LC/MS-MS を用いて プレグネノロン、アンドロステンジオン および テストステロン 濃度を測定した。

この動物とは別に、10 w/w% ダイズ油 または カノーラ油 を 8 週間 摂取 させた SHRSP の 精巣 組織 から、ミトコンドリア 分画 および RNA を 抽出・精製し、それぞれ たんぱく および 遺伝子 発現 を 調べた (StAR、CYP11A および CYP17)。

2. の 研究 で 抽出 した ob/ob マウス および B57CL/6J マウス 肝 mRNA の 遺伝子 発現 を 網羅 的に 調べて、パスウェイ 解析 を 行った。

また、2. の 研究 で 抽出 した ApoE KO および C57BL/6J マウス の 肝 グルコース-6-リン酸 デヒドロゲナーゼ (G6PD) 活性 を 測定 した。G6PD 活性 については、SHRSP および ミニブタ における カノーラ油 摂取 に 影響 も 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。同様に、「金城学院大学動物実験指針」に基づき、「金城学院大学動物実験委員会」による実験計画書の審査を経て実施許可されたものである。

## C. 研究結果

### 1. 機能性食用油の安全性に関する研究

HR は中鎖脂肪酸（炭素数が 8～10 個）を強化した食用油であるが、HR 飼料の脂肪酸組成を調べた結果、他の飼料には含有しなかった中鎖脂肪酸 [カプリル酸 (8:0) およびカプリン酸 (10:0)] が検出された。また、植物ステロールが強化されている HC 飼料および KS 飼料中には、主に  $\beta$ -シトステロールが多く含まれていた。また、植物ステロール強化を謳っていない HR 飼料中の植物ステロール量も、Cont 飼料の約 2 倍含まれることが分かった。

摂取期間中、全ての動物で異常が認められず、体重および摂餌量に群間差は認められなかった。

SHRSP では、HC 群および KS 群の拡張期および平均血圧は、摂取期間の後半に高値を示したが、WKY においては、期間を通して摂取による影響は認められなかった。

SHRSP、WKY ラット、ob/ob および C57BL/6J マウス (4 週間摂取) の動物において、尿量および尿比重に群間差は認められなかった。

KS 摂取 SHRSP の相対心臓重量の増加、HC および KS 摂取 SHRSP、HR および HC 摂取 WKY ラットの肝重量の増加が認められた。また、HC 摂取 SHRSP 脾臓重量も増加した。ob/ob マウスでは、HR 摂取により肝重量の増加および脂肪重量低下が認められた。HR 摂取 ApoE KO マウス肝重量増加が認められた。その他の動物 (器官) には、摂取

による影響はみられなかった。

血漿中総コレステロールレベルは、HR、HC および KS 摂取 SHRSP の総コレステロールレベルは高値を示した。これは HDL-コレステロールの増加によるものであった。総コレステロールおよび HDL-コレステロールレベルから算出した AI は、HC 摂取 SHRSP で低値を示した。ob/ob マウス、ApoE KO マウスおよび C57BL/6J マウス (4 および 20 週間摂取) において、トクホ植物油摂取の影響はなかった。

ob/ob マウスの摂取期間中の空腹時血糖値には群間差が認められなかったが、糖負荷試験において、トクホ植物油摂取の影響が認められた。ob/ob マウスでは HR および HC、C57BL/6J マウスでは HR および KS 摂取によって血糖値の低下が認められた。摂取によって HbA1c 値は影響を受けなかった。

血液検査を実施した動物において、トクホ植物油の影響は認められなかった。

網羅的遺伝子発現解析は、SHRSP および WKY ラットにおいては、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の他、ステロイドホルモン関連の経路、細胞周期・分化関連の経路、コレステロール代謝に関与するスタチン経路等にも影響が認められた。

20 週間摂取させた C57BL/6J マウスでは、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行った。脂肪酸代謝に関与する経路、ステロイド生合成、2型糖尿病の他、Jak-STAT シグナル、薬物代謝等への影響が認められた。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も認められた。

2. 食用油摂取がステロイドホルモンや脂質合成酵素活性に及ぼす影響

トクホ植物油を摂取させた SHRSP 精巢中のプレグネノロン、アンドロステンジオンおよびテストステロン濃度を測定した結果、HC 群のプレグネノロンが高値を示した。

カノーラ油摂取 SHRSP 肝の CYP11A タンパク質発現は、対照であるダイズ油群と比較して低下した。また、カノーラ油摂取 SHRSP の精巢 StAR、CYP11A および CYP17 遺伝子発現は、ダイズ油群と比較して抑制された。

ob/ob マウス肝臓における遺伝子発現のパスウェイ解析では、原料がカノーラ油である HR および HC に注目したところ、両群において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 $\omega$ 酸化、 $\beta$ 酸化の抑制、ブラジキニン受容体の発現低下によるアンギオテンシン 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。

ApoE KO および C57BL マウスの肝 G6PD 活性は、それぞれ群間に差は認められなかった。カノーラ油摂取 SHRSP 肝の G6PD 活性は、対照のダイズ油群と比較して高いことがわかっ

た。また、ミニブタの肝 G6PD 活性は、カノーラ油の18か月間摂取は影響を与えなかった。

#### D. 考察

本研究は、トクホの植物油全3品目の有効性、安全性を調べるために、生活習慣病モデル動物である SHRSP、ob/ob マウスおよび ApoE KO マウスと、それぞれの起源となる正常動物である WKY ラットおよび C57BL/6J マウスにトクホ植物油を4週間または20週間摂取させて評価し、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。その結果、本研究での実験条件では、正常動物において、HR 摂取による WKY ラットの拡張期血圧上昇を除いて、影響は認められなかった。また疾患動物では、拡張期血圧の上昇、器官(心、肝および脾臓)重量の増加等の影響が散見されたが、いずれの植物油においても顕著な有害作用は認められないことがわかった。しかし、投与期間がさらに長期になった場合の影響の大きさは確認できていないことから、今回観察された変化の背景メカニズムについては、今後さらに調べる必要があると考えられる。

また、各トクホ植物油に表示され、有効性が期待されていると考えられる項目として、血中コレステロールレベルおよび体内脂肪に注目した。コレステロールレベルに関しては、SHRSP での HDL-コレステロールの増加作用

がHR、HCおよびKS摂取によって認められた。またその他の動物には影響を及ぼさないことが明らかとなった。SHRSPで認められた変化が、その後の疾患の進展にどのような影響を与えるかどうか、さらに長期間摂取させる等の実験によって検証できると考えられた。また体内脂肪に関連することとして、ob/obマウスでのHR摂取による白色脂肪重量減少が認められた。このHR摂取ob/obマウスで観察された、肝重量の増加との関連も含めて、さらに研究を継続する必要があるかもしれない。

その他の有効作用として、ob/ob (HRおよびHC) およびC57BL/6J (HRおよびKS) マウスでの血糖値低下が認められた。これらについては詳細な解析を行うことも検討したい。

HR、HCまたはKS摂取SHRSPの精巢プレグネノロン、アンドロステンジオンおよびテストステロンは、Cont群より高値を示す傾向が認められた。これらがステロイドホルモン代謝に著しい影響を及ぼすことはないと考えられるが、ステロイドホルモン代謝に影響を及ぼす可能性は除外できない。HRはカノーラ油を、HCはカノーラ油由来の植物ステロールを含有するが、以前行った研究において、カノーラ油摂取ミニブタ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や、本研究での摂取期間が4週間と短かったことを考えても、今後、これらの代謝に影響を及ぼすか否かの検討は必要とされる。カノーラ油を8週間摂取させ

たSHRSP精巢を用いて、3種類の遺伝子(コレステロールをミトコンドリアへ取り込む際に働くタンパク質であるStAR、コレステロール側鎖切断酵素であるCYP11Aおよびプレグネノロンからアンドロステンジオンなどのアンドロゲン生成に関わるCYP17)の発現が抑制されることが確認された。

3種のトクホ植物油に、カノーラ油のようなG6PD活性化作用があるか否かを確認するため、HR、HCおよびKSをApoE KOマウスおよびC57BL/6Jマウスに長期摂取させたが、SHRやWKYラットで認められるG6PD活性上昇は認められなかった。これらの系統のマウスではカノーラ油によるG6PD活性上昇が起こらないと推測された。また、カノーラ油長期摂取ミニブタでも影響が見られなかったので、カノーラ油によるG6PD活性上昇には種差があることが示唆された。

網羅的に遺伝子発現解析を行った結果、脂肪酸代謝やステロール代謝等に関連するパスウェイの遺伝子変動が認められたほか、細胞周期、アポトーシス等、トクホ植物油の性質から予測される以外のパスウェイへの影響が認められた。また、ob/obマウスでの解析においては、以前の動物を用いた研究で有害性が確認されているカノーラ油を原料とする、HRおよびHCに注目した評価を行った。HRおよびHC摂取により、脂肪酸代謝、血管反応およびエストロゲン代謝に関わる経路に影響を及ぼす可能性がある遺伝子の発現変化が認められた。ob/obマ

ウスおよびSHRSPとともに糖尿病モデル動物であることから、インスリン感受性の変化、アルドステロンに対する反応の変化の確認、さらに、これらの変化とステロイド代謝への影響の関連の有無については、今後さらに検討する必要がある。変動のあった遺伝子発現については、さらに個別キットを用いた検討を行って精査する必要があるが、この解析手法を取り入れて安全性研究を行うことの意義が確認できた。したがって、本研究で用いた解析手法のニュートリゲノミクスは、栄養関連疾病への危険性の予測に、今後活用できると思われる。さらに、食生活における個の予防医療への貢献も期待できる。

トクホの承認において、メーカー主導の研究のデータや情報がもたされて審査されるが、本研究では、第三者の立場の研究グループで安全性、有効性の評価を行った。本研究規模では対象とするトクホの商品数が限定されてしまうという点においては、第三者機関による研究・評価は合理的でなかったかもしれない。しかし今回、トクホ食用植物油に分類される、異なる商品3種を同条件下で評価したことにより、これらの作用の比較検討ができたことは利点であったと思われる。また、利害関係がないことから、本研究成果の信頼性は高く評され、国民の安全な食生活の確保に貢献できると考える。

本研究では、トランス脂肪酸の関与については触れていない。植物油精製

あるいはトクホ製品の製造過程でトランス脂肪酸が生成する可能性があり、その安全性も考慮する必要があるが、その問題については、別の機会に検討したい。

本研究結果とヒトの健康影響との関係については、現時点で疫学的調査が公表されていないことから、独立行政法人国立健康・栄養研究所のホームページ「健康食品の安全性・有効性情報」(<https://hfnet.nih.go.jp/>)でのみ参考にすることができる。ここで示されているのはメーカーによる情報であるが、健康なヒトに摂取させる安全性試験において、有害性は認められなかったとされている。したがって、本研究において、正常動物での顕著な有害性がなかったことと一致している。トクホは食品であることから、疾患の自覚症状の有無に関わらず摂取する場合があります、必ずしも健康なヒトだけが摂取するとは限らない。このことを考慮すると、今後、疫学的調査が必要となると思われる。

## E. 結論

トクホ植物油であるHR、HC およびKSを生活習慣病モデル動物または正常動物に4または20週間摂取させたところ、顕著な有害作用は認められないことが明らかとなった。しかし、結果に示したような変化が散見されており、例えば長期間摂取でこれらが大きな影響になる可能性は否定できない。したがって、今後さらに検討することが必要とされる。この検討には、

動物実験以外にも、ヒトでの疫学的調査も有効であると考え。商品表示から予測された有効性について、本研究条件では一部しか確認できなかったが、それ以外に血糖値への有効性が認められ、これらについては背景メカニズムの解析が必要である。また、安全性試験・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用性も確認でき、それを確立するために、他の食品を対象とした研究でも確認していきたい。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Xu Ji, Yukiko Naito, Huachun Weng, Kosuke Endo, Xiao Ma, Naoharu Iwai. P2X7 deficiency attenuates hypertension and renal injury in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 303: F1207-F1215, 2012.

2) 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.

3) 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) 小野田早恵、内藤由紀子、立花滋博、河村さやか、大原直樹、吉川真衣、新美まどか、川口真帆、宮澤大介、安井裕子、山田和代、奥山治美. 菜種(カノーラ)油摂取が脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の病態悪化を促進する機序. 第39回日本毒性学会学術年会. 2012年7月17日~19日. 仙台、要旨集 P121 (7月18日).

2) 内藤由紀子、遠藤恒介、紀旭、馬嘯、立花滋博、安藤栄里子、青木聡子、永田伴子、宮澤大介、岩井直温: DSS誘導ラット大腸炎に対するアラキドン酸補給の影響、日本脂質栄養学会第21回大会、2012.9.7-9.8、相模原、*Journal of Lipid Nutrition* 21, No. 2, 205.

3) 河村さやか、内藤由紀子、立花滋博、小野田早恵、大原直樹、吉川真衣、新美まどか、川口真帆、宮澤大介、安井裕子、山田和代、奥山治美. 植物油摂取が脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の生存日数に及ぼす影響 -カノーラ油による生存日数短縮とその背景-. 日本薬学会フォーラム 2012 衛生薬学、環境トキシコロジー. 2012年10月25~26日. 名古屋、要旨集 166 (10月26日).

- 4) 紀旭、内藤由紀子、翁華春、遠藤恒介、馬嘯、岩井直温：高血圧と腎傷害における P2X7 受容体の役割、第 16 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2012. 11. 23-11. 24、東京、要旨集 89.
- 5) 翁華春、紀旭、内藤由紀子、岩井直温：Pex11 $\alpha$  deficiency impairs peroxisome elongation and division and contributes to nonalcoholic fatty liver in mice、第77回日本循環器学会、2013. 3. 15-3. 17、横浜、PJ-791 (抄録CD掲載) .
- 6) Yukiko Naito, Xiao Ma, Kosuke Endo, Xu Ji, Huachun Weng, Naoharu Iwai: Effects of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acid supplementation on regulation of blood glucose in mice、第 86 回日本薬理学会年会、2013. 3. 21-23、福岡、Journal of Pharmacological Sciences 121, 21 suppl 1, 237P.
- 7) Chihiro Amma, Mai Takamatsu, Mai Yoshikawa, Madoka Niimi, Maho Kawaguchi, Yukiko Naito, Shigehiro Tachibana, Naoki Ohara, Harumi Okuyama. Sex difference of the adverse effects induced by canola oil ingestion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). 第86回日本薬理学会年会. 2013年3月21～23日. 博多, JPS 121Suppl. 238P P3-105 (3月23日).
- 8) 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
- 9) 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、平成 25 年 9 月、高知、Journal of Lipid Nutrition 22, 153, 2013
- 10) 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、平成 25 年 9 月、Journal of Lipid Nutrition 22, 156, 2013
- 11) 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年9月6, 7日. 高知. 脂質栄養学22. 134.
- 12) 橋本洋子、山田和代、津島宏美、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 年 9 月 6, 7 日. 高知. 脂質栄養学 22. 159.
- 13) 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、熊本、2014 年 3 月 27-30 日、要旨集 Vol. 3, 207
- 9) 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

10) 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 (No. P3-137, Nagoya, 2015. 3. 18-20)

11) Yukiko Naito, Huachun Weng, Naoharu Iwai. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid intake on type II diabetes with obesity mice, 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

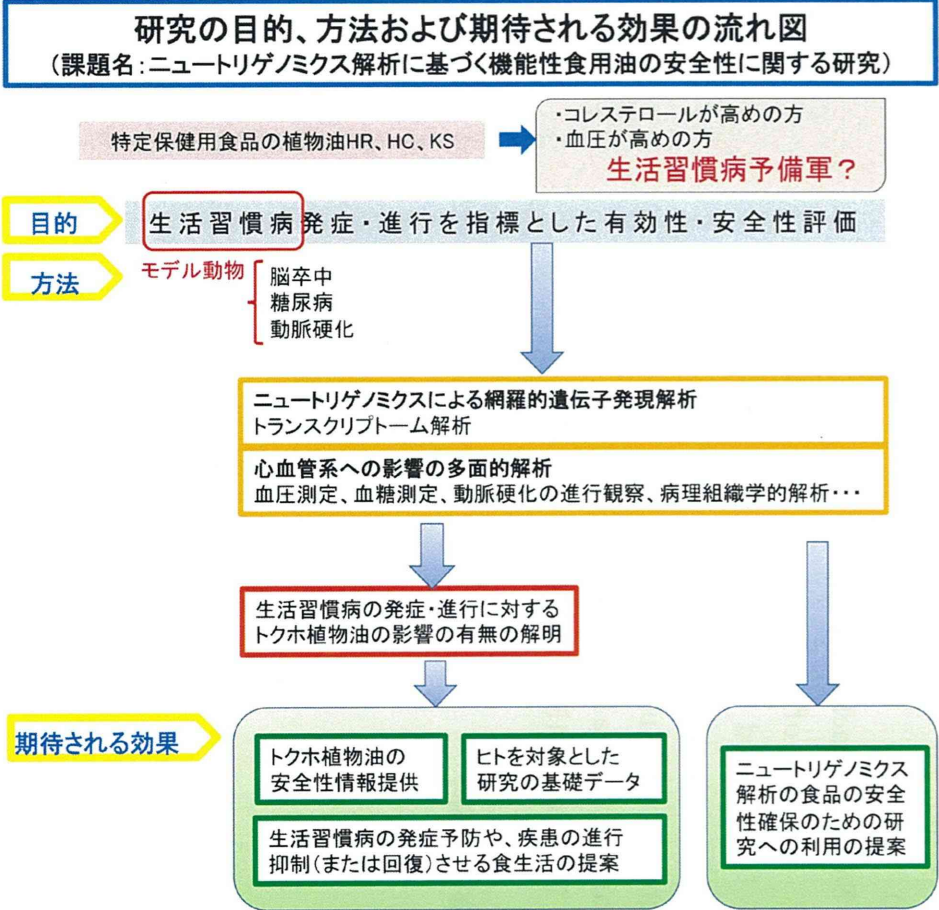


Figure 1 研究の目的、方法および期待される効果の流れ図

## 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）  
総合研究報告書

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

トクホ植物油の安全性および有効性を明らかにするためには、摂取する可能性が高いと考えられる生活習慣病やその予備群での影響を調べるのが重要であると考えられる。そこで本研究では、生活習慣病モデル動物および正常起源動物にこれらの植物油を摂取させた。また詳細な評価のためにニュートリゲノミクス解析を取り入れ、食品の安全性確保のための試験・研究においても、有益性の高い手法であるかを検討した。

生活習慣病モデル動物である脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）、肥満・糖尿病 ob/ob マウスおよび高脂血症・動脈硬化 ApoE KO マウスと、それぞれの起源となる正常動物である Wistar-Kyoto（WKY）ラットおよび C57BL/6J マウスにトクホ植物油 HR、HC および KS を 4 週間（SHRSP、WKY ラット、ob/ob および C57BL/6J マウス）または 20 週間（ApoE KO および C57BL/6J マウス）混餌摂取させた場合、顕著な有害作用は認められないことが明らかとなった。一方、拡張期血圧の上昇（HC、KS 摂取 SHRSP）、心重量増加（KS 摂取 SHRSP）、HR 摂取による肝重量増加（HR 摂取 ob/ob および ApoE KO マウス）が認められたことから、さらに背景メカニズムを調べる必要があると考える。またトクホに表示される内容と関与する有効性は、正常動物では認められないことが明らかとなった一方で、疾患モデル動物では、HR 摂取 ob/ob マウスでの白色脂肪重量減少と各植物油摂取 SHRSP での HDL-コレステロール増加（総コレステロールも増加）が認められたが、それ以外に顕著な作用は認められなかった。その他、ob/ob および C57BL/6J マウスで認められた血糖値に対する有効性がわかった。

網羅的に遺伝子発現解析を行った結果、トクホ植物油の性質から予測される以外のパスウェイへの影響が認められた。変動のあった遺伝子発現については、さらに個別キットを用いた検討を行って精査する必要があるが、この解析手法を取り入れて安全性研究を行うことの意義が確認できた。

## 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てる。

### 平成24年度の研究

生活習慣病の中から脳卒中に注目し、SHRSPおよびWKYラットを用い、3種のトクホ植物油4週間摂取の影響を調べた。

### 平成25年度の研究

前年度に3種のトクホ植物油植物油を投与したSHRSPおよびWKYラット肝のマイクロアレイ解析（パスウェイ解析）と、肥満・糖尿病マウスおよび正常マウスでの4週間摂取の影響解析を行った。

### 平成26年度の研究

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、これらの植物油の20週間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。

### 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℃、遮光、脱酸素剤同梱の密封袋中で保管し、継続年度の研究においてもこれを使用した。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. 平成24年度の研究

#### 3-1 動物

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、HK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20~23℃、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。

### 3-2 検査及び測定

#### 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。

#### 2) 体重、摂餌量および血圧測定

体重および摂餌量(24時間)は、週1回測定した。また、tail-cuff法により血圧および心拍数を測定した(週1回、BP-98A、Softron、東京)。

#### 3) 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。

#### 4) 解剖

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腹大静脈よりEDTAまたはヘパリン加採血して血漿を得、-80℃で保存した。放血致死後、動物を剖検し、さらに心臓、肝臓、脾臓、腎臓(両側)、副腎(両側)、精巣(両側)、内臓脂肪(精巣上体周囲)および脳(SHRSPのみ)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。

#### 5) 血液生化学検査

血漿中の総コレステロール、HDLコレステロール、トリグリセリドおよびグルコースを測定した(富士ドライケム7000V、富士フイルム、東京)。また、非HDLコレステロール値(総コレステロール-HDLコレステロール)および動脈硬化の危険度の指標である動脈硬化指数{(総コレステロール-HDLコレステロール)/HDLコレステロール、arteriosclerosis index、AI}をそれぞれ算出した。

#### 6) RNAの抽出・精製

Trizol(Invitrogen、アメリカ)を用いて、各動物の肝臓から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群サンプルを、アレイ解析用のサンプルとした。Cont群と比較し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。

### 4. 平成25年度の研究

#### 4-1 動物

##### 1) SHRSPおよびWKYラット

平成24年度の動物と共通である。これらから得たRNAサンプルの遺伝子発現解析をもとに、H25年度はさらにパスウェイ解析を進めた。

##### 2) ob/obマウスおよびC57BL6J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

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。

#### 4-2. ラット肝のトランスクリプトーム解析

平成24年度に行ったアレイ解析において、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、パスウェイ解析を行った。

#### 4-3 マウスの検査および測定

##### 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。

##### 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。

##### 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)。

##### 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。

##### 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(1g/kg、5ml/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(A1C Nowプラス、バイエル薬品、大阪)。

##### 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)を測定した。また、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℃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(精巣上部周囲、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。

##### 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)。

##### 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(富士フイルム、東京)および