

HDL コレステロール E テストワコー (和光純薬工業、東京)]。

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、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 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。

5. 平成 26 年度の研究

5-1 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 20~23°C、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 20 週間自由摂取させた。

5-2 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。

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°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°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。

4) 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)。

5) 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) 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. 平成 24 年度の研究結果

1-1. 調製飼料の脂肪酸含量

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、これ

を添加した HR 飼料中に、カプリル酸 (8:0) およびカプリン酸 (10:0) がそれぞれ 8.4 および 2.8% の割合で含有していた (Table 2 および Figure 1)。一方、その他の Cont 飼料、HC 飼料および KS 飼料にはどちらの脂肪酸も含有しなかった。また、4 飼料中の n-3 系不飽和脂肪酸である α -リノレン酸は、4~10% の範囲で含有していたが、n-6 系不飽和脂肪酸であるリノール酸は Cont 飼料および KS 飼料で約 53% 含有していたのに対し、HR 飼料で最も低く 18.1% であった。これらをもとに算出した n-3/n-6 比は、Cont 飼料、HR 飼料、HC 飼料および KS 飼料で、それぞれ 0.128、0.409、0.155 および 0.188 であり、HR 飼料で最も高かった。

1-2. 調製飼料のステロール類含量

測定結果を Table 3 および Figure 2 に示した。飼料中のコレステロール含量は、4 飼料とも同量であった (6 mg/100 g)。HC 飼料および KS 飼料には、それぞれ植物ステロールが強化された HC および KS が 7w/w% が含有する。HC 飼料および KS 飼料中の総植物ステロール量は、それぞれ 259 および 108 mg/100 g であった。なお、メーカー情報である各食用油中の植物ステロール量と、本研究で測定した Cont 飼料中の植物ステロール量をもとに算出した理論値は、HC 飼料で 246 mg/100 g、KS 飼料で 140 mg/100 g であった。HC および KS 飼料では、どちらも主に β -シトステロールが多かった。以下、HC 飼料では、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロールの

順に、KS 飼料では、カンペステロール、スチグマステロール、7-スチグマステロールの順に多く含まれていた。また、植物ステロール/コレステロール比を比較したところ、Cont 飼料で 3.5、HR 飼料で 7.5 であったのに対し、植物ステロール強化植物油を添加した HC 飼料および KS 飼料では、それぞれ 43.2 および 18.0 であった (Figure 3)。また、HR は植物ステロール強化を謳っていないが、HR 飼料中の植物ステロール量は、Cont 飼料の約 2 倍量であることがわかった。

1-3. 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。

1-4. 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 4 および Figure 5 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。

1-5. 血圧および心拍数

摂取期間中の血圧（収縮期、拡張期および平均）および心拍数の変化を Figure 6~9 に示した。SHRSP では、HC 群および KS 群の拡張期および平均血圧は、摂取 3 および 4 週に有意に高値を示した。しかし収縮期血圧および心拍数には、群間差が認められなかった。WKY においては、期間を通して血圧および心拍数に群間差は認められなかった。

1-6. 尿検査

両系統とも、尿量および尿比重に群間差は認められなかった (Figure 10

および 11)。

1-7. 器官重量

SHRSP の KS 群の相対心臓重量は、Cont 群と比較して有意に高値を示した。また肝臓重量は、SHRSP の HC 群および KS 群、WKY ラットの HR および HC 群において、それぞれ Cont 群と比較して有意に高かった。SHRSP の HC 群の脾臓重量および KS 群の心臓重量も高値を示した。その他、腎臓、副腎、精巣、精巣上体周囲脂肪および脳 (SHRSP) の相対重量には、群間差が無かった (Figure 12~19)。

1-8. 血漿脂質および血糖値

血漿中総コレステロールレベルは、SHRSP において Cont 群と比較して、HR、HC および KS 群でそれぞれ有意に高かった (Figure 20)。これは HDL-コレステロールの増加によるものであった (Figure 21)。WKY ラットではどちらも群間差がなかった。また、トリグリセリドおよびグルコースレベルは、両系統において群間差が認められなかった (Figure 22 および 23)。非 HDL コレステロール値は、どちらの系統においても群間差が無かった (Figure 24)。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、SHRSP と WKY ラットの Cont 群と比較すると、SHRSP の Cont 群が高かった (SHRSP: 0.45 ± 0.02 、WKY ラット: 0.26 ± 0.02 、 $p < 0.001$)。SHRSP の HC 群の AI は、Cont 群と比較して有意に低値を示した (0.31 ± 0.03) が、SHRSP のその他の群および WKY ラットにおいては有意差が認められなかつ

た (Figure 25)。

1-9. 遺伝子発現の変化

マイクロアレイの結果、Cont 群と比較して発現が4倍以上変化して遺伝子数をまとめた (Table 4)。WKY ラットにおいては、増加および減少した遺伝子数に差はなかったが、SHRSP ではどの群においても減少した遺伝子数が増加した遺伝子数よりも多かった。Cont 群と比較して、減少した遺伝子数は、HR、HC および KS 群でそれぞれ 18、15 および 60 であり、増加した遺伝子数はそれぞれ 4、1 および 2 であった。パスウェイ解析等の詳細な解析は進行中である。

2. 平成 25 年度の研究成果

2-1. ラット肝遺伝子発現解析 (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 26 に図の説明、Figure 27～43 にパスウェイ)。

脂肪酸代謝に関与する経路 [脂肪酸合成 (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] 等が認められた。

2-2. ob/ob マウスの実験結果

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 44 および Figure 45 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。

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 46 に示した。各測定時における血糖値は群間差が無かった。

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 47～50)。

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 51)。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 52)。

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 53~58)。

7) HbA1c 値

HbA1c 値は、両系統において群間差が無かった (Figure 59)。

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 60~65)。

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 66~69)。

3. 平成 26 年度の研究結果

3-1. 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。

3-2. 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 70、71 および 72 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。

3-3. 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 73~78)。

3-4. 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 79)。

3-5. 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 80~86)。

3-6. 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 7)。

3-7. 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 8~12)。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

平成24年度

トクホの植物油を4週間SHRSPおよびWKYラットに自由摂取させると、一般状態を悪化させるような作用はないことがこれまでに得られた結果からわかった。

HRは中鎖脂肪酸が強化された食用油であるが、調製飼料の化学分析の結果から、Cont飼料では検出されなかった中鎖脂肪酸が検出された。また、n-6系不飽和脂肪酸であるリノール酸の割合が低くなっていることが分かった。これにより、脂肪酸のn-3/n-6比がCont飼料よりも高かった。循環器系疾患の原因となる高脂血症や血栓等の予防効果の報告があるn-3系脂肪酸は、摂取が推奨されると同時に、摂取するn-6系脂肪酸との比率も重要で

あるということもいわれている。この観点からHRはこれらの疾患を予防する効果が期待できる脂肪酸組成となっている可能性がある。

「身体に脂肪がつきにくい」HRを添加したHR飼料の摂取は、SHRSPおよびWKYラットにおいて体重、血漿トリグリセリドレベルおよび内臓脂肪(精巣周囲)に影響を与えなかった。これらに対する影響を調べるには摂取期間延長や高脂肪食負荷を与える等の条件を変えることが必要かもしれないが、肥満状態ではない動物の体重を減少させる等の有害作用は無いことが本研究によって明らかとなった。

「コレステロールが高めの方に適する」HCまたはKSを添加したHC飼料またはKS飼料の摂取は、SHRSPでHDLコレステロールレベル上昇と、それに伴う総コレステロールレベルの上昇を誘導した。したがって、本研究条件下では、これらの植物油摂取による総コレステロールおよび非HDLコレステロールの低下作用は認められないことがわかった。

SHRSPはWKYラットと比較しコレステロールレベルは低い、AI値は高いことがわかった。この動脈硬化の危険度を示すAIは、SHRSPのHC群は、Cont群と比較して低値を示した。このことから、HC摂取は、動脈硬化の危険度を低減させる作用を有することが示唆された。

SHRSPのHCおよびKS群の摂取第3および4週の拡張期および平均血圧が高くなることが明らかとなった。KS

群の心重量が増加したこととの関連は、現在行っている解析結果とあわせて考察する予定である。

SHRSP の HC および KS 群、WKY ラットの HR および HC 群では、相対肝臓重量が増加した。進行中の病理組織検査およびトランスクリプトーム解析の結果と合わせて考察する予定である。SHRSP の HC 群の脾臓重量が高くなった原因は、これまで得られたデータからは明らかとならなかった。

トランスクリプトーム解析は現在進行中であるが、Cont 群と比較したトクホ植物油摂取群における遺伝子発現の変動は、WKY ラットよりも SHRSP でより多いことがわかった。パスウェイ解析等により詳細に調べる予定である。

平成 25 年度

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。HR 群での肝重量の増加との関連は明らかとならなかった。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、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。

平成 26 年度

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 群の体重および精巢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。

研究期間全体をまとめると、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 (SHRSP、WKY ラット、ob/ob マウスおよび C57BL/6J マウス) または 20 週間 (ApoE KO マウスおよび C57BL/6J マウス) 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が、SHRSP における HC、KS 摂取による拡張期血圧の上昇および KS 摂取による心重量増加、ob/ob および ApoE KO マウスにおける HR 摂取による肝重量増加については、背景メカニズムを調べる必要があると考える。また、各トクホに表示され、有効性が期待される内容について焦点

をあててみたところ、正常動物には影響を及ぼさないことが明らかとなった。疾患モデル動物では、ob/ob マウスにおいて HR 摂取による白色脂肪重量の減少、SHRSP において各植物油摂取による HDL-コレステロールの増加が認められた以外、顕著な作用は認められなかった。その他、血糖値に対する有効性が、ob/ob および C57BL/6J マウスで認められた (HR および HC 摂取 ob/ob マウス、HR および KS 摂取 C57BL/6J マウス)。この作用についてはさらに検討を進めたいと考えている。

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。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。

E. 結論

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 HR、HC および KS を 4 週間 (SHRSP、WKY ラット、ob/ob マウスおよび C57BL/6J マウス) または 20 週間 (ApoE KO マウスおよび 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、SHRSP での各植物油摂取による HDL-コレステロールの増加と、ob/ob マウスでの HR 摂取による白色脂肪重量の減少が認められたが、それ以外に顕著な作用はなかった。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についてはさらに検討が必要であると考ええる。

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。したがって、さらにその他の食品についても検討することにより、食品の安全性試験・研究に新規の解析手法としてニュートリゲノミクス解析を取り入れることの有用性を確立できると考える。

(参考文献)

1. Czech MP. 2013. Obesity notches up fatty liver. *Nat Med.* 19 (8): 969-971.
2. Pajvani UB et al. 2013. Inhibition of Notch uncouples Akt activation from hepatic lipid accumulation by decreasing mTORc1 stability. *Nat Med.* 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) 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.

2. 学会発表

- 1) 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.

2) 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.

3) 翁華春、紀旭、内藤由紀子、岩井直温：Pex11 α 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)。

4) Yukiko Naito, Xiao Ma, Kosuke Endo, Xu Ji, Huachun Weng, Naoharu Iwai: Effects of ω -3 and ω -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.

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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) Depressed production by rape-
seed oil ingestion of testosterone
is partially due to decreased ex-
pression 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)

11) Effects of n-3 polyunsaturated
fatty acid intake on type II dia-
betes with ob
esity mice, Yukiko Naito, Huachun
Weng, Naoharu Iwai, The 88th Annual
Meeting of the Japanese Pharmaco-
logical Society (No. P3-135, Na-
goya, 2015. 3. 18-20)

H. 知的所有権の取得状況
なし

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¹⁾）

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)

Table 1-2 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¹⁾）〔続き〕

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
関与成分	中鎖脂肪酸 1.6 g/14 g	植物ステロール 0.45 g/14 g	植物ステロール 238 mg、1回平均 使用量 14 g（大さじ1）あたり
	中鎖脂肪酸（カプリル酸、カプリン酸）は、ヒトの母乳中に脂肪酸含量の1.5～2.9%、牛乳等の乳製品中に4.0～4.7%、ヤシ油中に13.9%、パーム核油中に7.1%含まれるきわめて日常的に摂取される食品成分または乳成分である。	植物ステロールは、植物の原形質膜の構成成分であり、 β -シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロールを主成分とする、炭素数28～29のステロール類である。市販される食用植物油、特に米サラダ油、ナタネ油、コーン油、ごま油に多く含まれ（約0.5～1%）、通常植物油中では、遊離体または脂肪酸エステル体として存在する。	

Table 1-3 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¹⁾）〔続き〕

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
作用・効能・機序	<p>中鎖脂肪酸は、吸収・代謝において、菜種油、大豆油のような一般的な食用油（長鎖脂肪酸）と比較して、以下の特長が知られている。</p> <p>「消化管内での分解が極めて早く、速やかに吸収される。」「腸管膜内でトリグリセリドへ再合成されることなく脂肪酸の形態で門脈から肝臓に移行される。」「ミトコンドリア内外膜通過時にカルニチン輸送系に依存しない。」「吸収、酸化が早くエネルギーとして利用されやすい。」「食後の熱産生を増大する。」</p>	<p>植物ステロールは食事由来のコレステロール吸収を阻害することにより、血中総コレステロール (TC) および低比重リポ蛋白コレステロール (LDL-C) 低下作用を示すことが広く知られている。そのメカニズムは、植物ステロールが、コレステロールの胆汁酸ミセルへの溶解を阻害する為と一般的に認められている。</p>	<p>コレステロールは小腸内腔で胆汁酸ミセルに溶解することが必須である。胆汁酸ミセルには限られた量のステロールしか溶解できないため、コレステロール同様、胆汁酸ミセルに溶解する働きを持つ植物ステロールが存在すると相対的にコレステロールの溶解量が減少し、吸収が抑制される。</p>

Table 1-4 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¹⁾）〔続き〕。

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
ヒト試験 (安全性)	静脈経腸栄養 17, 1-7 (2002)	Circ Res 6, 373-382, 1958 Pediatrics 89, 138-142, 1992 Food Chem Toxicol 37, 1127-1138, 1999 Eur J Clin Nutr 53, 319-3287, 1999 J Oleo Sci 52, 205-213, 2003	J Oleo Sci 50, 649-655, 2001 J Oleo Sci 53, 9-16, 2004
動物・その他の試験 (安全性)	応用薬理 4, 871-882 (1970) Food Chem Toxicol 38, 79-98, 2000	Circ Res 6, 373-382, 1958 Food Chem Toxicol 37, 521-532, 1999 社内報告書, 2002 社内報告書, 2002	Food Chem Toxicol 37, 521-532, 1999 Food Chem Toxicol 37, 683-696, 1999
ヒト試験 (有効性)	Asia Pacific J Clin Nutr 12, 151-160, 2003	J Oleo Sci 52, 285-294, 2003 Asia pacific J Clin Nutr 12, 282-291, 2003	J Oleo Sci 50, 649-655, 2001 J Oleo Sci 53, 9-16, 2004
動物・その他の試験 (有効性)	J Oleo Sci 51, 699-703, 2002	J Oleo Sci 52, 229-237, 2003	J Oleo Sci 50, 217-223, 2001

1) ホームページ : https://hfnet.nih.go.jp/contents/sp_health.php

Table 2 Fatty acid compositions in the diets (%)

	Fatty acids	Control	HR	HC	KS
8:0	Caprylic acid	0	8.4	0	0
10:0	Capric acid	0	2.8	0	0
14:0	Myristic acid	0	0	0.3	0.2
16:0	Palmitic acid	11.4	5.1	13.5	12.1
16:1	Palmitoleic acid	0	0.2	0.2	0
18:0	Stearic acid	4.1	1.8	2.0	4.0
18:1	Oleic acid	22.4	53.5	47.9	19.0
18:2 n-6	Linoleic acid	53.7	18.1	29.0	53.1
18:3 n-3	α -Linolenic acid	6.9	7.4	4.5	10.0
20:0	Arachidic acid	0.3	0.5	0.7	0.3
20:1	Eicosenoic acid	0.2	1.0	0.8	0.2
22:0	Behenic acid	0.3	0.3	0.3	0.3
24:0	Lignoceric acid	0.1	0.2	0.3	0.2
24:1	Tetracosenoic acid	0	0.1	0	0
	Unidentified	0.6	0.6	0.5	0.6
	n-3/n-6 ratio	0.128	0.409	0.155	0.188

Table 3 Sterols in the diets (mg/100 g)

Sterols	Cont	HR	HC	KS
Cholesterol	6	6	6	6
Brassicasterol	0	5	14	0
Campesterol	5	15	62	10
Stigmasterol	4	0	42	8
7-Ergosterol	0	0	2	0
β -Sitosterol	12	23	123	72
Isofukosterol	0	2	10	5
7-Stigmastenol	0	0	4	7
Avenasterol	0	0	2	6
Total phytosterol	21	45	259	108
Phytosterol/ Cholesterol ratio	3.5	7.5	43.2	18.0

Table 4

SHRSP

	Ratio	Up	Down
Cont : HR	HR/Cont	4 (2)	18 (2)
Cont : HC	HC/Cont	1 (0)	15 (2)
Cont : KS	KS/Cont	2 (2)	60 (1)

WKY rats

	Ratio	Up	Down
Cont : HR	HR/Cont	2 (1)	5 (1)
Cont : HC	HC/Cont	6 (3)	3 (0)
Cont : KS	KS/Cont	2 (0)	5 (2)

Up: Cont 群と比較して、発現レベルが 4 倍以上増加する遺伝子数

Down: Cont 群と比較して、発現レベルが 1/4 倍以上減少する遺伝子数

これらのうち、8 倍以上増加または 1/8 倍以上減少する遺伝子数をカッコ内に示す。

Table 5 Pathway analyses in SHRSP fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 4 weeks

Group	Name		Figure No.
HR	Fatty acid beta oxidation	Up	5
	Fatty acid biosynthesis	Up	6
	Prostaglandin synthesis and regulation	Down	9
	Androgen receptor signaling pathway	Down	13
HC	Statin pathway	Up	7
	Estrogen pathway	Up	8
	Prostaglandin synthesis and regulation	Down	9
	Apoptosis mechanisms	Down	10
	Androgen receptor signaling pathway	Down	13
	Apoptosis	Down	15
KS	G1 to S cell cycle control	Down	12
	Notch signaling pathway	Down	14
	Cell cycle	Down	11

Up: Cont 群と比較して、2 倍以上発現が上昇する遺伝子で有意とされるパスウェイ

Down: Cont 群と比較して、0.5 倍以上発現が低下する遺伝子で有意とされるパスウェイ