

Figure 72 Water intake in ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

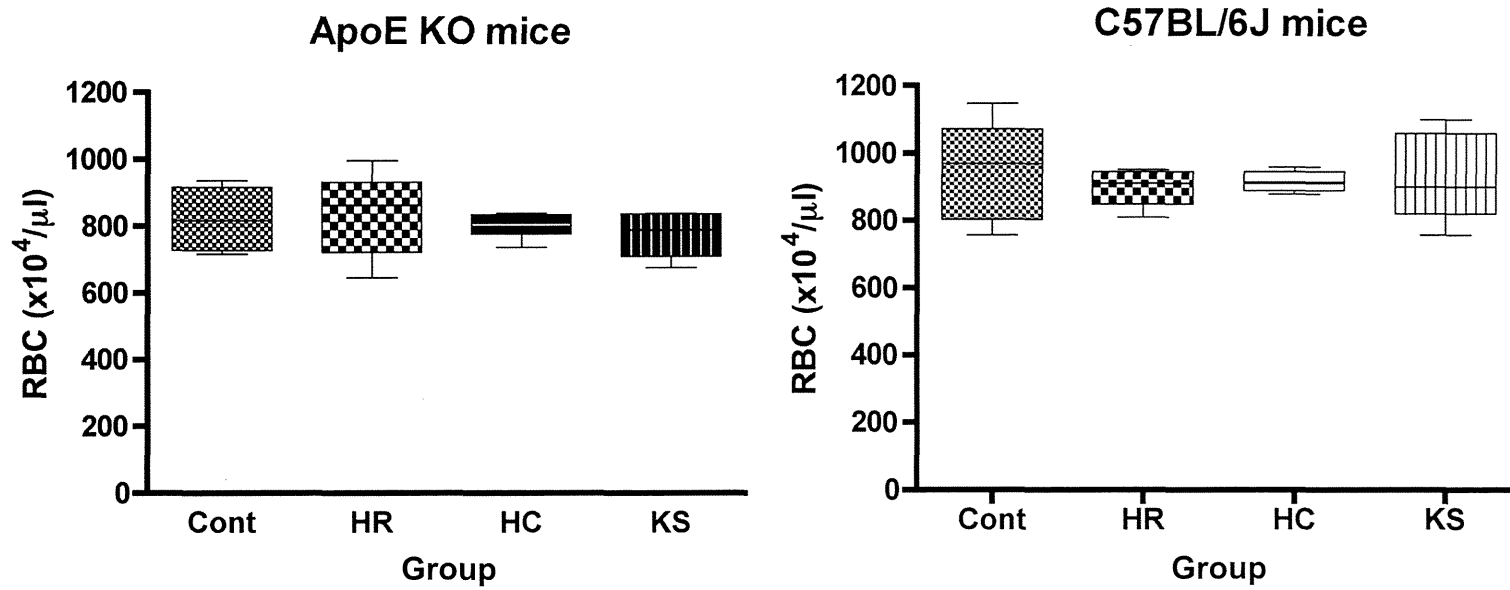


Figure 73 RBC of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuyo oils for 20 weeks
RBC, red blood cells

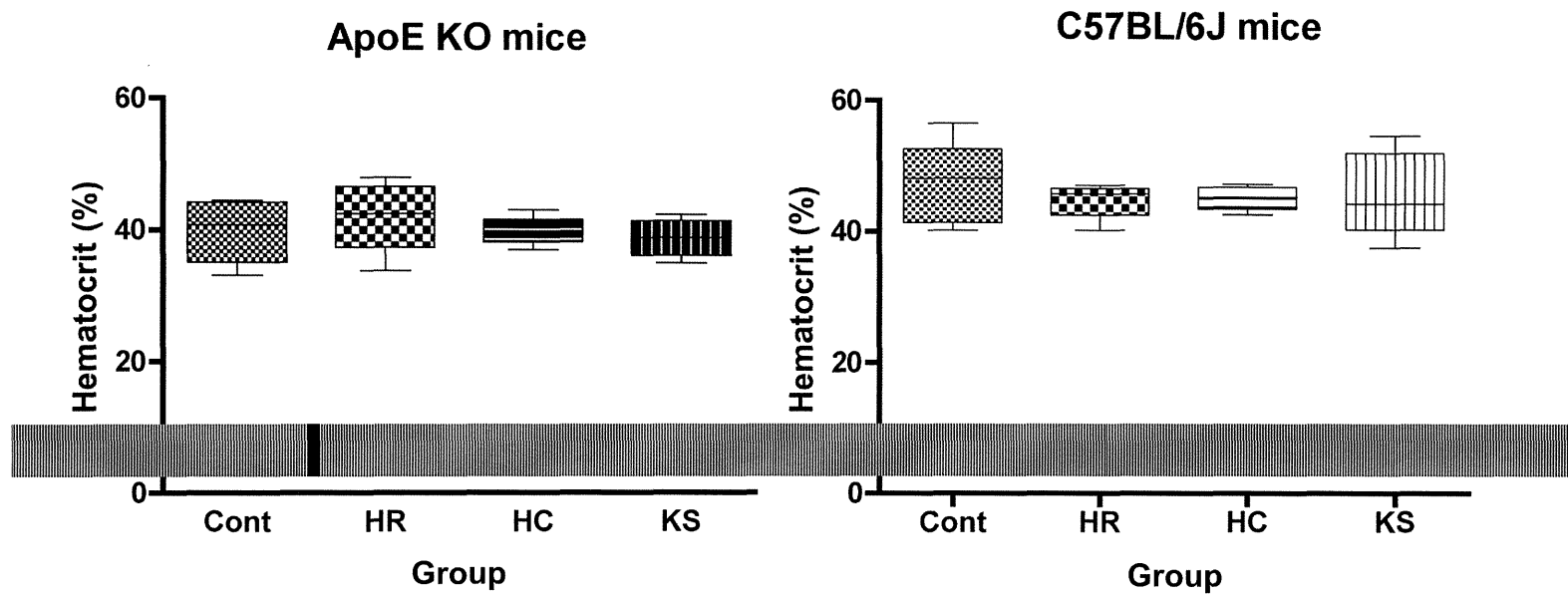


Figure 74 Hematocrit of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

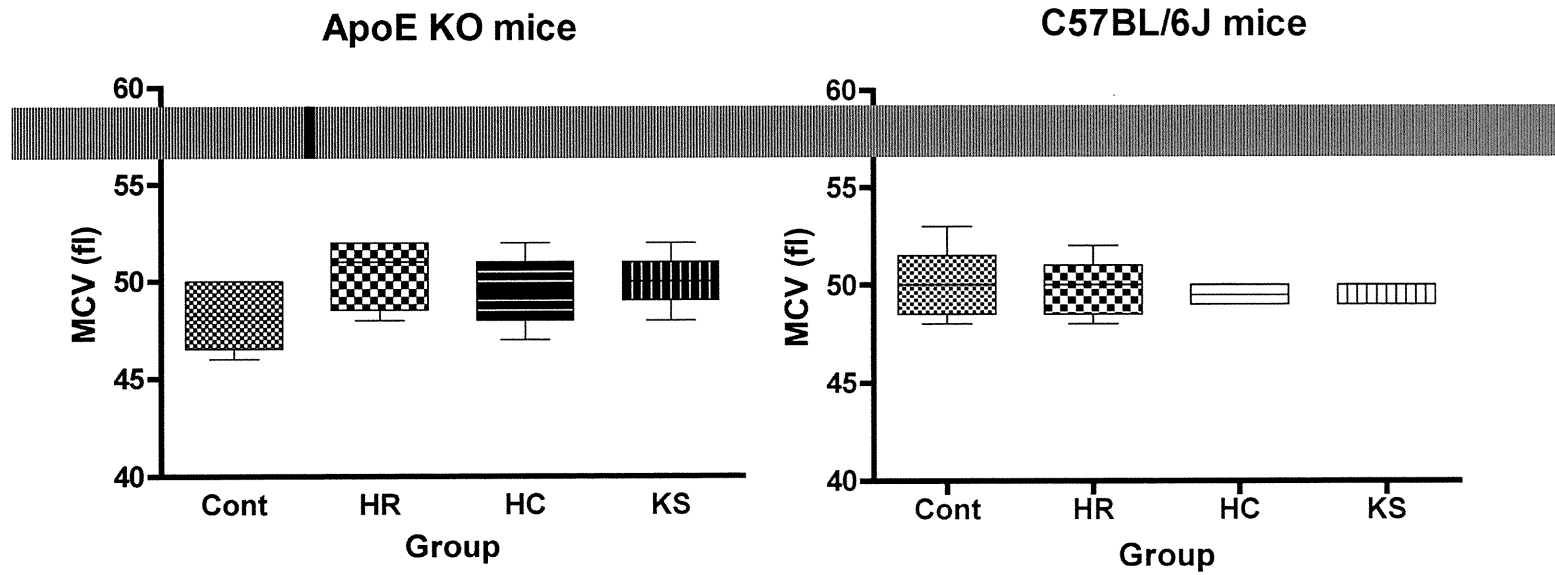


Figure 75 MCV of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks
MCV, mean corpuscular volume

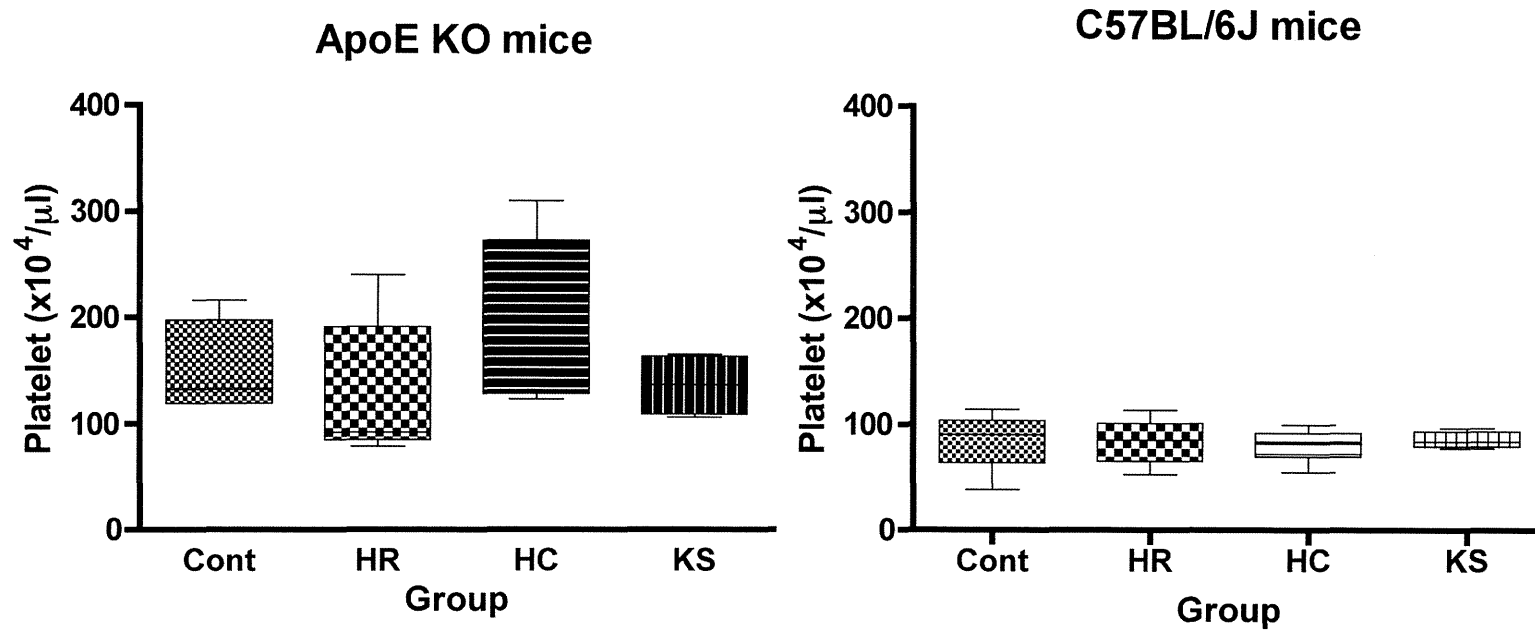


Figure 76 Platelet of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

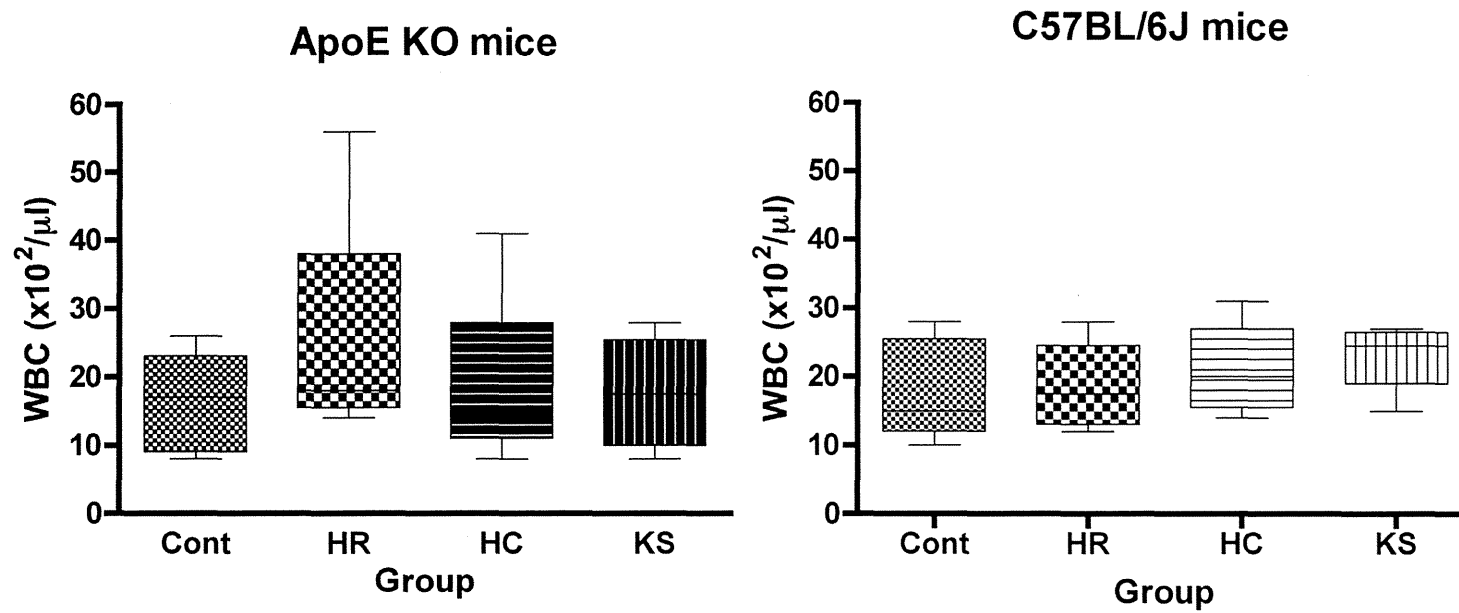


Figure 77 WBC of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuyo oils for 20 weeks
WBC, white blood cells

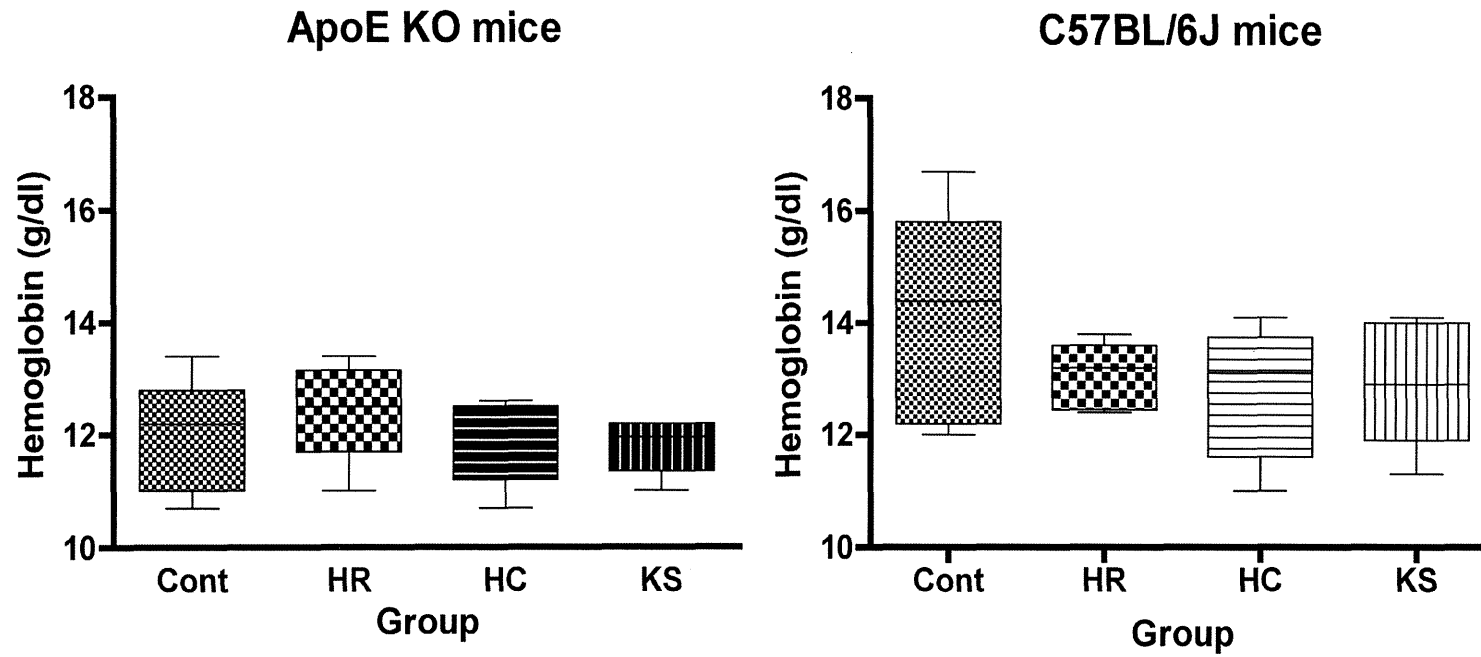


Figure 78 Hemoglobin of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

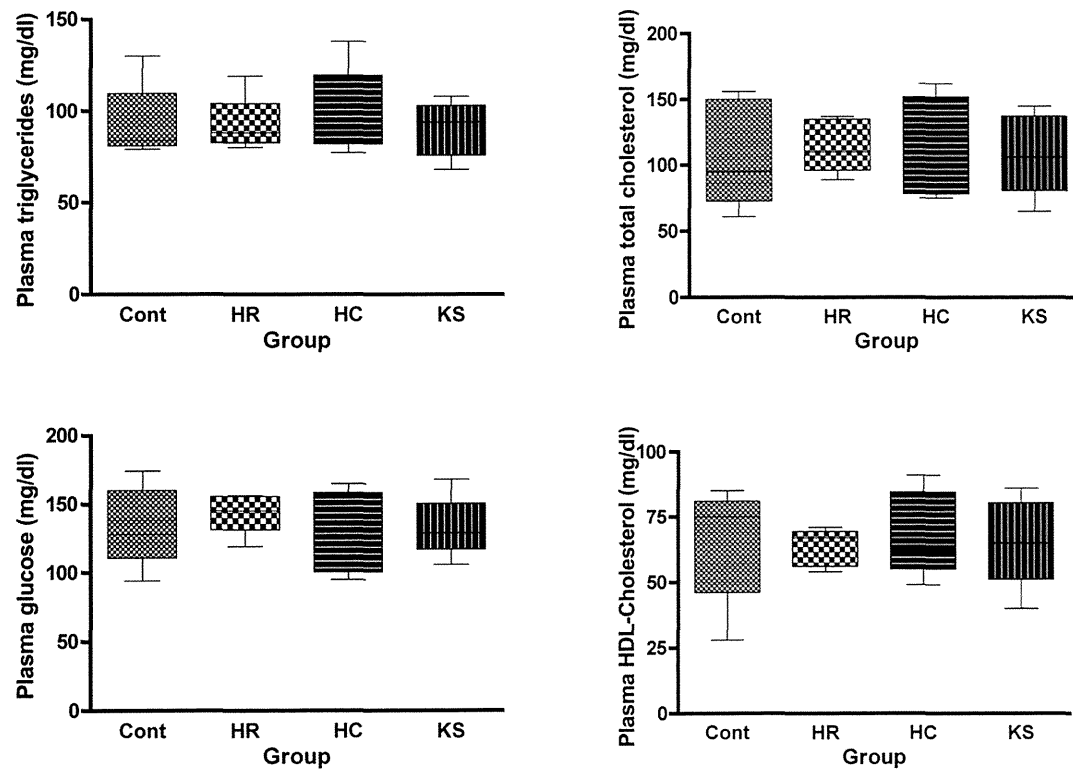


Figure 79 Blood biochemistry of C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuh oils for 20 weeks

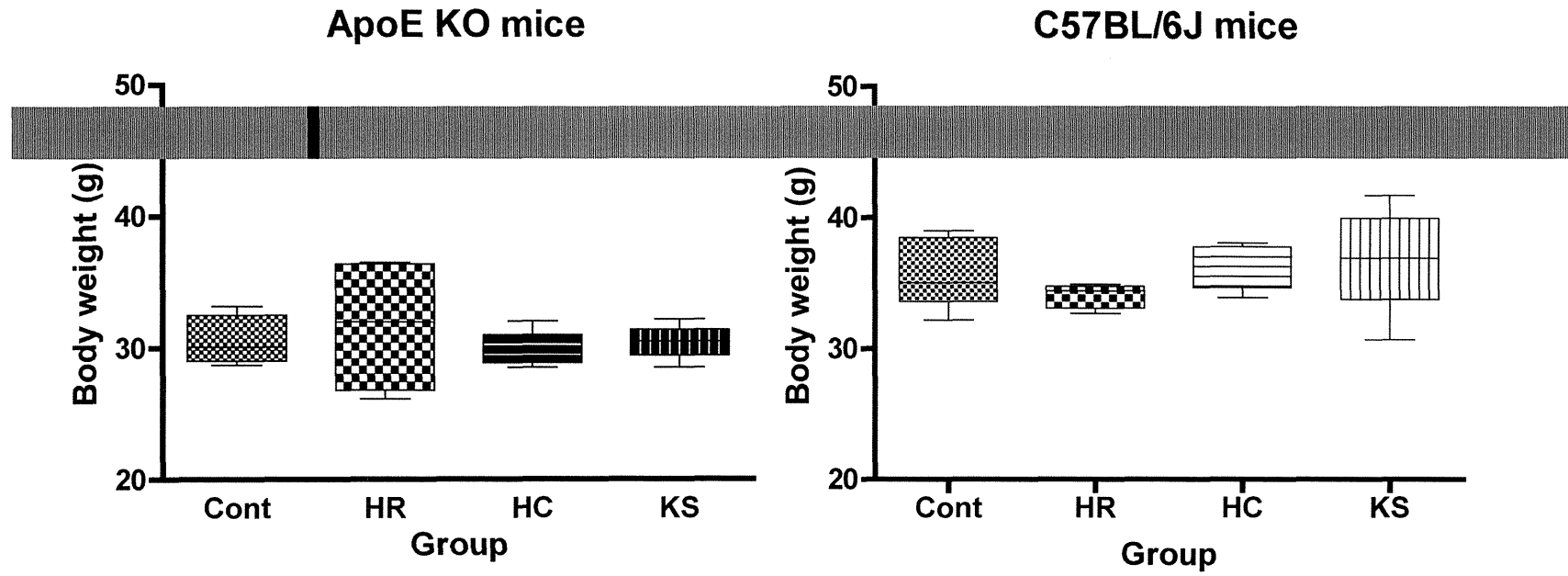


Figure 80 Body weights of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

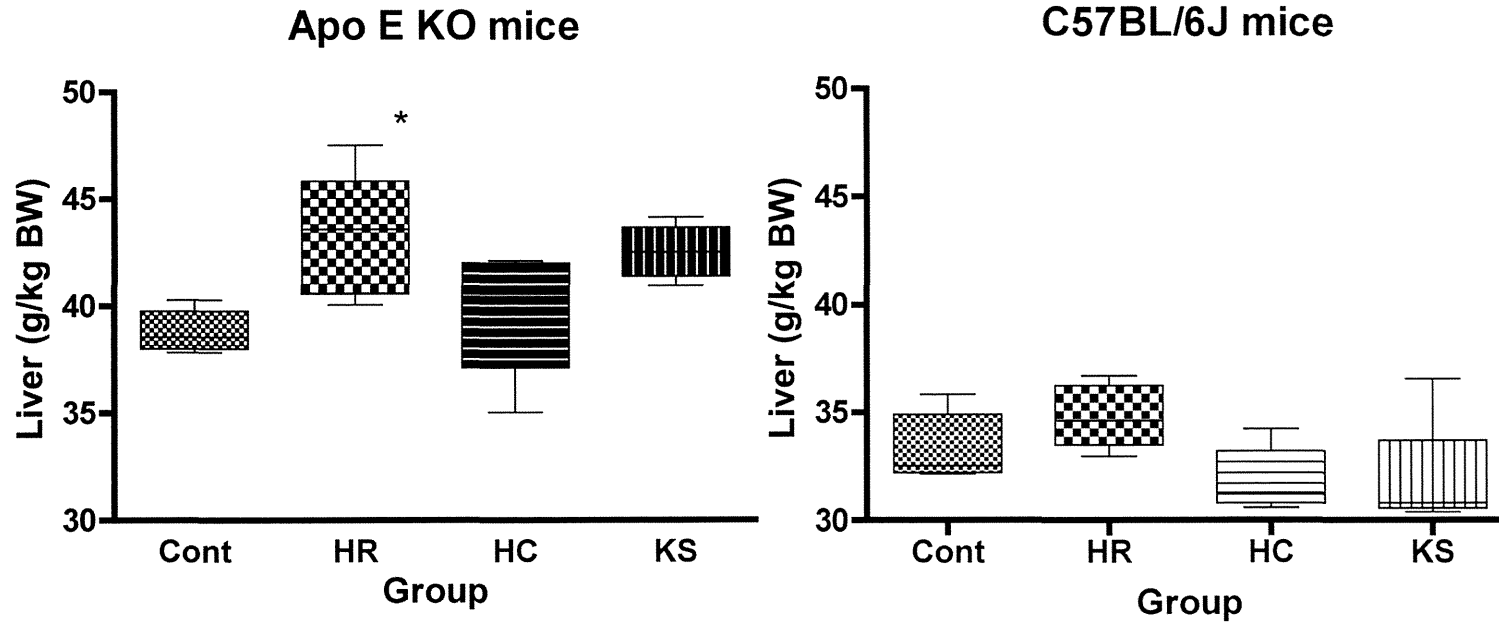


Figure 81 Relative liver weights of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

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

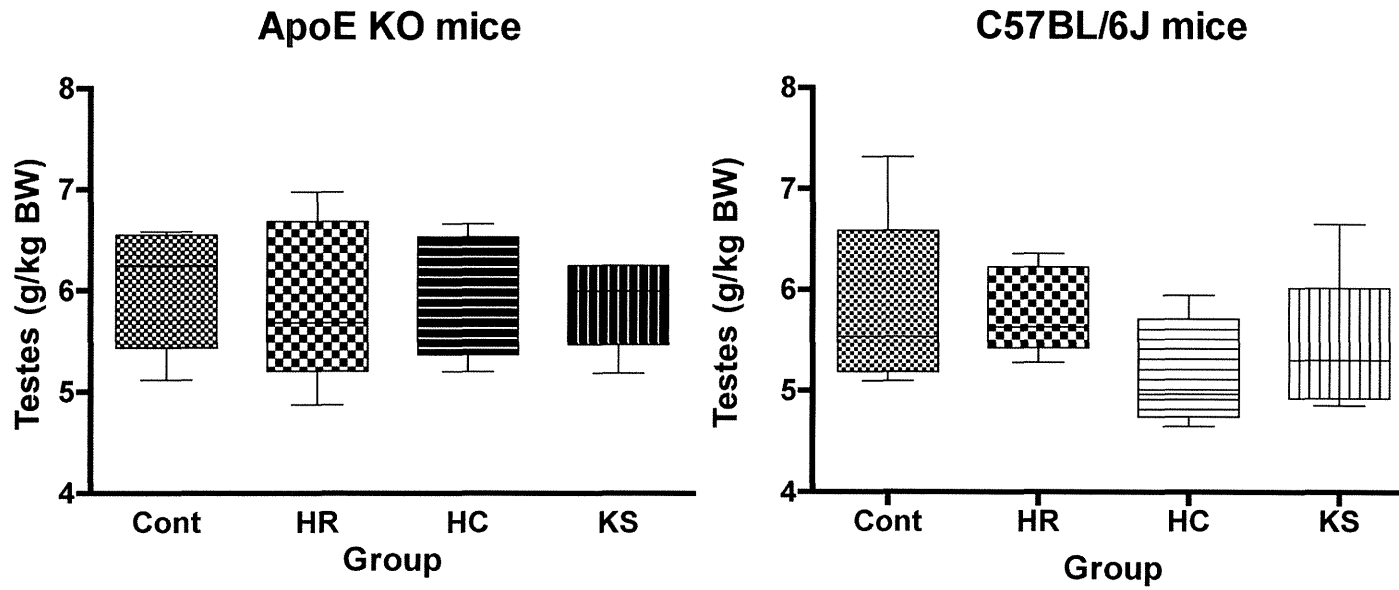


Figure 82 Relative testis weights of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

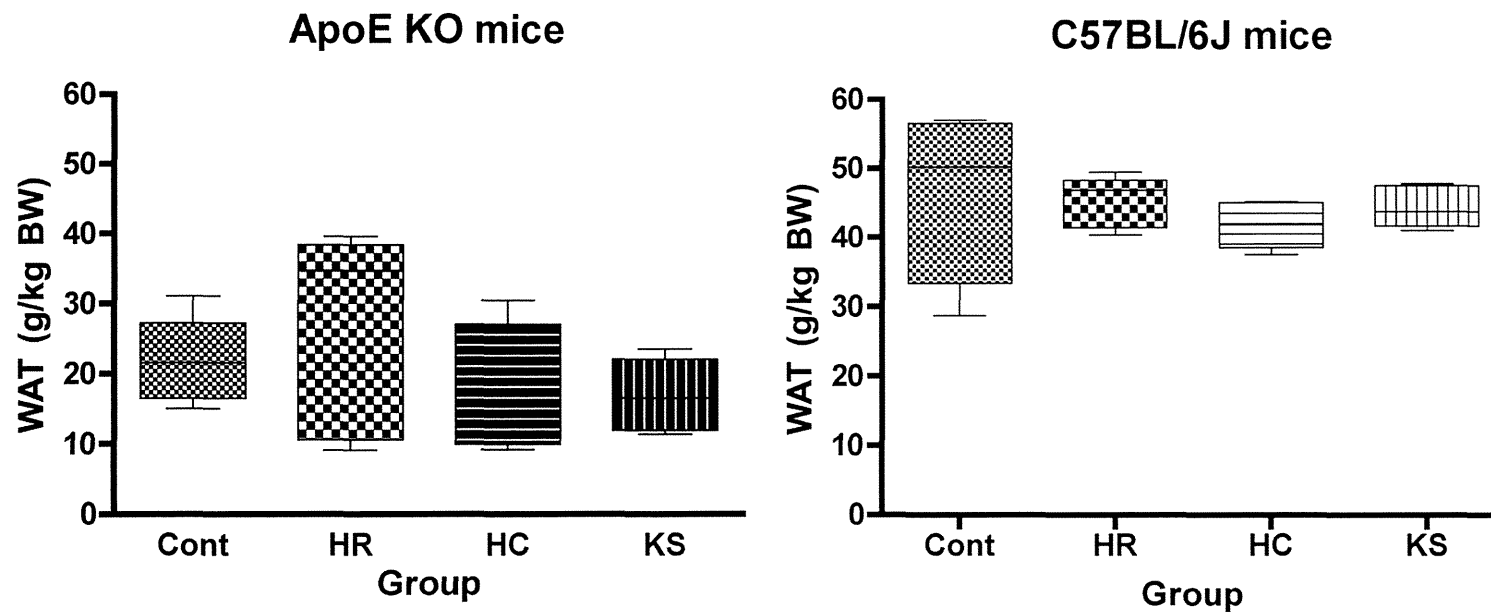


Figure 83 Relative WAT weights of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks
WAT, white adipose tissues

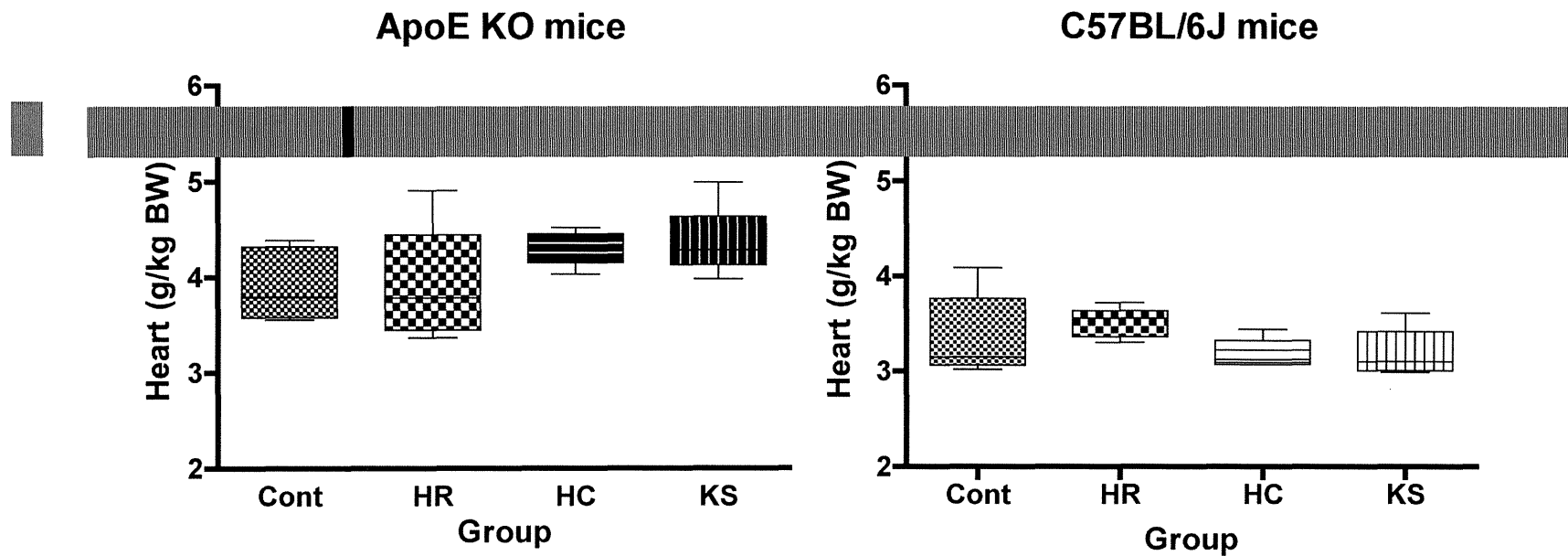


Figure 84 Relative heart weights of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

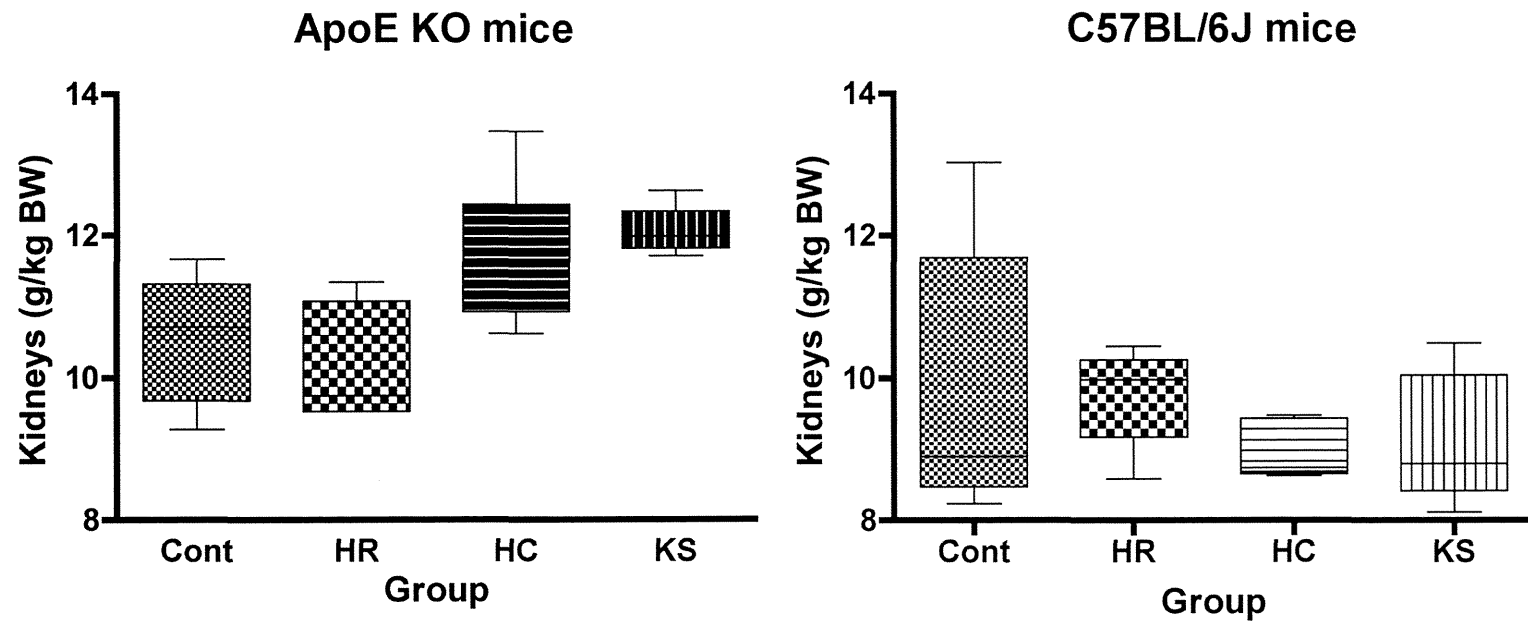


Figure 85 Relative kidney weights of ApoE KO and C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

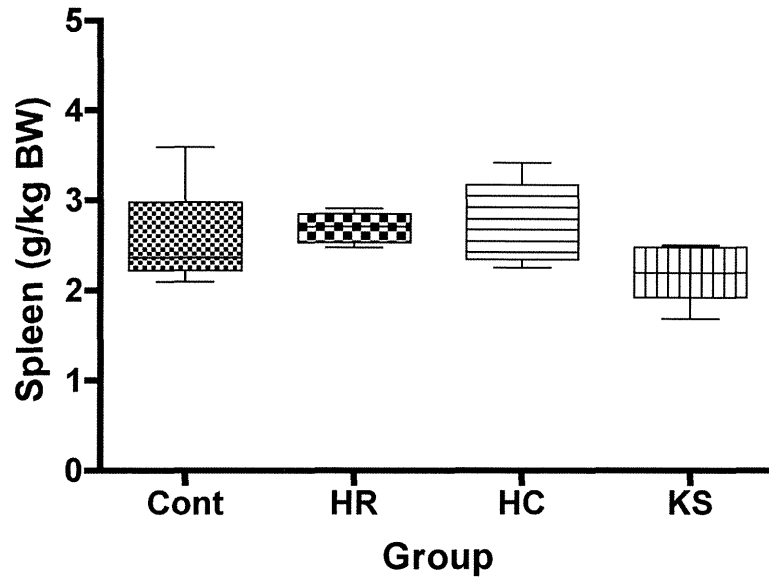


Figure 86 Relative spleen weights of C57BL/6J mice fed diets containing 7 w/w% Tokuho oils for 20 weeks

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進事業）
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
ー 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 ー

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

特定保健用食品（トクホ）として市販されている植物油製品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）、健康サララ[®]（KS、味の素）は、それぞれ異なる原料油脂を用いているが、一部にはカノーラ（菜種）油も含まれている。カノーラ油は脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）で様々な有害効果を示すことが確認されているため、本研究では、これらのトクホ油脂摂取によって、カノーラ油摂取で認められると同様の有害効果が見られるか否かを調べた。

1. 油脂を含まないAIN-93組成飼料に、HR、HCおよびKSのいずれかを7w/w%の割合で加え、雄性SHRSPに4週間自由摂取させた後、精巢中プレグネノロン、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見られなかった。

2. 1同様の飼料を雄性糖尿病モデル（ob/ob）マウスに4週間摂取させ、肝の遺伝子発現情報をパスウェイ解析した。対照（ダイズ油摂取）群と比較し、HR摂取群とHC摂取群で共通した3つの代謝経路に関わる遺伝子の発現促進、HC摂取群とKS摂取群に共通した4つの代謝経路に関わる遺伝子の発現促進がそれぞれ示された。一方、HR摂取群とHC摂取群に共通して3つの代謝経路に関わる遺伝子の発現が抑制されることが示された。HC摂取群とKS摂取群に共通した影響は認められなかった。HRとHCは、原料にカノーラ油が用いられている。HR摂取群とHC摂取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。

3. 油脂を含まないAIN-93組成の飼料にカノーラ油またはダイズ油を唯一の脂肪源として10w/w%の割合で加え、雄性SHRSPに8週間自由摂取させた（ダイズ油を対照とした）後、精巢中CYP11Aの発現を、PCRおよびWestern blotting で調べた。カノーラ油摂取群のStAR、CYP11AおよびCYP17遺伝子の発現は、ダイズ油摂取群と比較して有意に抑制された。CYP11Aは、タンパク質発現も抑制された。

4. 1同様の飼料を雄性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週間摂取させた後、肝グルコース・6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PD）活性を測定したが、いずれのトクホ油脂によっても、影響は認められなかった。カノーラ油摂取は、高血圧自然発症ラット（SHR）およびその由来系統のWKYラットの肝G6PD活性を顕著に増大させるが、今回のトクホ油脂にカノーラ油を主な原料として含むものがあるものの、マウスでは変化が見られなかつ

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、対照であるダイズ油摂取群と比較し、顕著なG6PD活性の上昇が確認された。一方、カノーラ油を18ヶ月間摂取させたミニブタの肝の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

平成24年度の研究

雄性脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) では、カノーラ油摂取によって生存期間が短縮し、このとき、昇圧促進、腎傷害促進などの有害効果に加え、顕著な血漿中および精巣中テストステロン濃度の低下 (1) と血漿中アルドステロン濃度の上昇が認められている (学会報告 1-3)。本研究では、雄性 SHRSP を用い、特定保健用食品 (トクホ) である 3 製品、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) または健康サララ® (KS、味の素) を摂取させた際の安全性を、ステロイドホルモンへの影響に注目して検討した。

これまでに、トクホとして承認された植物油製品の安全性を SHRSP のような病態モデルで検討した報告はないが、HR は、菜種油にココナッツ油やパーム油を配合することで中鎖脂肪酸含量を増した製品であり、HC は米油に、菜種油や植物胚芽に含まれるステロールを加えた製品であることから、雄性 SHRSP でみられたカノーラ油摂取による有害効果と同様の効果があるか否かを確認すること、また、カノーラ油の有害性の原因物質が植物ステロールの量に依存するという報告があることから (2)、菜種油由来の植物ステロールの影響の有無を確認することは、これらの製品の安全性を評価するうえで意義があると考えた。KS はダイズ油にダイズ胚芽ステロールを添加した製品で、菜種油由来の成分を含まないため、SHRSP におけるカノーラ油摂取による有害効果が大量の植物ステロール摂取によって起こるとする説 (2) の正否を確認できる可能性がある。

平成 25 年度の研究

SHRSP の精巣においては、カノーラ油摂取による顕著なテストステロンの低下など、ステロイドホルモン代謝への影響が見られるので、カノーラ油摂取 SHRSP の精巣におけるステロイド産生急性調節タンパク質 (StAR)、CYP11A、CYP17 遺伝子の発現をダイズ油摂取 (対照) 群と比較することを目的とした。

糖尿病モデル (ob/ob) マウスに、HR、HC または KS を唯一の脂肪源として与えた場合の肝における遺伝子発現のパスウェイ解析をし、ステロイドホルモン代謝、脂質代謝や血圧調節に関わる遺伝子発現に影響がないか、確認することを目的とした。また、精巣におけるステロイドホルモン代謝に対する影響の有無を調べるために、摂取期間終了後に精巣を摘出して凍結保管した。

平成 26 年度の研究

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肝グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) 活性が上昇することが確認されており (3)、G6PD は肝の脂質合成にかかわる酵素の一つであるため、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 G6PD 活性を測定した。また、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、マウスを用いた精巣テストステロン量の測定を計画していたが、年度内に実施することができなかった。

B. 研究方法

平成24年度の研究

6週齢の雄 SHRSP 24匹を1群6匹からなる4群に分け、それぞれの群に、AIN-93 G組成の標準精製飼料、AIN-93 G組成の標準精製飼料の油脂成分をダイズ油に代えて、HR、HCまたはKSとした飼料を4週間与え、標準精製飼料摂取群を対照群とした。飼料、飲水は自由摂取とした。飼料中の油脂量は、7 w/w%とした。

摂取期間終了後、精巢を摘出し、精巢組織ホモジネート1 mLに3 mLのジエチルエーテルを加えて混和し、エーテル層を蒸発乾固させた後、1 mLアセトニトリル、3 mLヘキサン中で分配させ、アセトニトリル層を蒸発乾固させた。これを1 mL 5%炭酸水素ナトリウム液、0.25 mL エタノール中に溶解し、Bond Elute C18カラムに載せた。メタノール洗浄後、アセトニトリルで溶出し、これを蒸発乾固して、炭酸水素ナトリウムでアルカリ性とし、飼料中のステロイドをLC-MS/MS (API-4000) で同定した。HPLC分析カラムにはCadenza CD-C18 3 μ m 3 \times 250 mmを用い、移動相は0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル、カラム温度は45 $^{\circ}$ C、流量は0.5 mL/minとした。サンプルはアセトニトリル：精製水=40：60溶液として20 μ Lを注入した。MS/MSのイオン化はESI (Positive)とした。

平成25年度の研究

SHRSPを用いたカノーラ油とダイズ油のステロイドホルモン代謝に及ぼす影響の検討

5週齢の雄 SHRSP (Izm、エスエルシー) 6匹を、3匹ずつ2群に分け、それぞれの群に、AIN-93 G組成の標準精製飼料の油脂成分をダイズ油に代えた飼料(対照)またはカノーラ油に代えた飼料(日本クレア)を8週間自由摂取させた。飲水も自由摂取とした。飼料中の油脂量は10w/w%とした。

摂取期間終了後、動物をペントバルビ

タルナトリウムで麻酔し、精巢を摘出して、実験実施まで -80° Cで凍結保存した。

SHRSP 精巢のミトコンドリア中CYP11AのWestern blot

精巢組織を3倍量のリン酸緩衝液中でホモジナイズし、1000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心した上清を分取した。沈渣を再懸濁して同条件で遠心し、上清を得た。この操作を延べ3回繰り返し、プールした上清を10000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで45分間遠心し、沈渣のミトコンドリア分画を採取した。ミトコンドリア分画は、リン酸緩衝液に懸濁して適宜希釈してタンパク質濃度を測定した。

タンパク質量として4 μ gのミトコンドリア分画をミニプロテアングエル(バイオラッド)にロードして泳動し、PVDFメンブレンにブロット後、抗ラットP450 Sec 抗体(ミリポア)を用いて検出した。タンパク質量の相対発現量は、ハウスキープینگ遺伝子タンパク質のCOXIVおよび β -アクチンを用いて算出した。

PCRによるSHRSP 精巢のStAR、CYP11AおよびCYP17遺伝子発現の比較

精巢組織からTrizol (Ambion) でtotalRNAを抽出、定量後、High Capacity RNA-to-DNA kit (ABI) を用いて逆転写し、生成したcDNAとTaqMan[®] Assay (ABI) を用い、StAR、CYP11AおよびCYP17遺伝子の発現量をPrism 7300 (ABI) で増幅、比較した。対照にはGADPH遺伝子を用いた。

マウスを用いた検討

雄性ob/obマウスおよびB57CL/6Jマウス(5週齢)を日本エスエルシーから購入し、それぞれを1群10~11匹からなる4群に分けた。これらを対照、HR、HCおよびKS群とし、それぞれの油脂を唯一の脂肪源として7w/w%含有するAIN-93組成の飼料(オリエンタル酵母工業)を

4週間自由摂取させた。対照群にはダイズ油含有飼料を与えた。摂取期間終了後、肝を摘出し、Trizol (Ambion) でmRNAを抽出、精製して群毎にプールし、約20000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(3D-Gene、東レ)。

平成26年度の研究

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、日本チャールスリバー) 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。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、肝を摘出し、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ダイズ油摂取群とした。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%に当たるダイズ油(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、肝を摘出し、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是对応のないt-検定で、3群以上の平均値の群間比較は、ANOVAの後DunnettあるいはTurkeyの多重比較で評価した。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

平成24年度

HR、HCまたはKSを摂取したSHRSP 精巢のステロイドホルモン

測定結果を Table 1、Figure 1～6
に示す。

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は、
対照群と比較し、いずれの群でも高値を
示す傾向がみられたが、統計学的有意差
が認められた群はなかった (Dunnett の
多重比較)。一方、対照群と各処置群の 2
群間で t 検定をした結果 (Figure 4～6)、
HC 群のプレグネノロンが対照群に比べ
有意に高値となった (Figure 5)。

平成25年度

SHRSP 精巢における 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、ダイズ油群と比較し、有意に
低下した (Figure 7～9)。

SHRSP 精巢における StAR、CYP11A および CYP17 遺伝子の発現

カノーラ油摂取群の精巢における
StAR、CYP11A および CYP17 遺伝子発
現はいずれもダイズ群と比較して有意に
抑制された (Figure 10～12)。

マウスの肝における遺伝子発現のパス ウェイ解析

対照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、HR 群では 8、
HC 群では 19、KS 群では 15 認められた。
一方、対照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
現の低下によって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 (Figure 13)、ブラジキニ
ン受容体の発現低下によるアンジオテ
ン II 作用の相対的強化 (Figure 14)、
エストロゲンの分解抑制 (Figure 15) の
可能性が示唆された。

平成 26 年度

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 ± 12.49 U/g protein、HR
群では 103.7 ± 8.166 U/g protein、HC
群では 119.4 ± 15.15 U/g protein、KS 群
では 99.99 ± 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 16)。

ApoE ノックアウトマウスでは、対照
群で 19.89 ± 2.160 U/g protein (N=5)、
HR 群では 24.85 ± 4.138 U/g protein
(N=5)、HC 群では 21.56 ± 1.992 U/g
protein (N=4)、KS 群では 21.85 ± 1.852
U/g protein (N=4) であり、群間に差は
認められなかった (Figure 17)。

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、ダイズ油群で 52.0 ± 3.34 U/g pro
tein、カノーラ油群で 91.1 ± 5.47 U/g
protein となり、カノーラ油群の G6PD
活性が有意に高いことが確認された
(N=10, $p < 0.001$) (Figure 18)。

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、ダ
イズ油摂取群で 28.0 ± 1.54 U/g protein、