

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	トランス脂肪酸による動脈硬化性疾患の発生病序の解明と健康影響評価手法の確立（課題番号：1009） （研究期間：平成22年度～平成24年度）
主任研究者名	研究者名：平田 健一 所属機関：国立大学法人神戸大学

工業的に生産されたトランス脂肪酸は、心血管系疾患のリスク因子の1つとなることから、欧米では食品に表示義務があり、摂取が厳しく制限されている。本研究において、冠動脈疾患患者と非冠動脈疾患患者の血清中トランス脂肪酸濃度を測定し、59歳以下の比較的若年の冠動脈疾患患者は血清中トランス脂肪酸濃度が高いことを確認した。日本人でもトランス脂肪酸摂取過多は、冠動脈疾患リスクとなることを初めて報告し、食品へのトランス脂肪酸量の表示義務の必要性を、我々のデータは支持する。また、動物モデルにおいて、トランス脂肪酸が、冠動脈疾患を発症させる機序も解明した。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	トランス脂肪酸による動脈硬化性疾患の発生机序の解明と健康影響評価手法の確立（研究期間：平成22年度～平成24年度）
主任研究者名	所属：国立大学法人神戸大学 氏名：平田 健一（研究課題番号：1009）

I 研究の期間及び研究目標等

1 研究期間

平成22年度～平成24年度（3年間）

2 研究目的

欧米人に対して実施されてきた疫学研究・介入試験により、トランス脂肪酸の高摂取が心血管系疾患のリスク因子の1つとなることが示され、欧米ではWHO, FAO, FDA等の公的機関が策定するガイドラインにより摂取総量の上限目標（1日当たりの総エネルギー摂取量の1%未満）が設定されるようになった。一方、国内においては平成18年、内閣府食品安全委員会から、国内に流通している食品のトランス脂肪酸含有量、並びに日本人1日あたりの平均的なトランス脂肪酸摂取量が推計され、日本人1日当たりのトランス脂肪酸摂取量は平均0.7g（摂取エネルギー換算では0.3%）と報告された。

しかし、これらの推計は国民健康・栄養調査の平均値を使用しているため、個々人が摂取しているトランス脂肪酸量を評価したものではない。また、ヒト脂質の脂肪酸組成は食生活スタイルの影響を大きく受けており、欧米でのガイドラインをそのまま日本人に外挿することには問題がある。このため日本人を対象として食事内容調査や採血サンプル調査を行い、個々人のトランス脂肪酸摂取量を客観的に評価し、各摂取レベルにおける健康への影響等に関する新たな知見を集積していく必要がある。

また、トランス脂肪酸の高摂取がリポ蛋白組成を動脈硬化促進的なりポ蛋白組成へと変化させ、全身の炎症性変化を亢進させるという報告はあるものの、なぜ、トランス脂肪酸の高摂取がそのような変化を生じるのかという機序および心血管系疾患が増悪する機序の詳細は不明である。これらの問題を解決するために、どの程度のトランス脂肪酸負荷が生体の代謝恒常性に変化をもたらすのか小動物実験モデルを用いて検討する。新規オミックスであるメタボロミックスを解析手法として包括的に評価し、トランス脂肪酸の高摂取が生体へ悪影響を与える機序を解明する。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
1) トランス脂肪酸の動脈硬化性疾患（冠動脈疾患）へ与えるリスクの検討	ア) トランス脂肪酸食負荷による血清トランス脂肪酸濃度変化の検討	平田健一（神戸大学） 波多野直哉（神戸大学）
	イ) 非冠動脈疾患群における血中トランス脂肪酸濃度・食事内容の検討	吉田優（神戸大学） 波多野直哉（神戸大学）
	ウ) 冠動脈疾患群における血中トランス脂肪酸濃度・食事内容の検討	平田健一（神戸大学） 波多野直哉（神戸大学）
	エ) 栄養指導介入による血清トランス脂肪酸濃度・食事内容変化の検討	平田健一（神戸大学） 波多野直哉（神戸大学）
2) 小動物疾患モデルを用いたトランス脂肪酸負荷の影響の検討	オ) 動脈硬化モデルマウスを用いたトランス脂肪酸負荷の影響の検討	平田健一（神戸大学） 篠原正和（神戸大学）

4 倫理面への配慮について

本研究の実施に関して、臨床検体を使用する場合には患者より適切なインフォームドコンセントを得たうえで、神戸大学大学院医学研究科等倫理委員会の規約を遵守し、学内の現有設備を用いて研究を実施する。患者の個人情報機関外に漏洩せぬよう試料や解析データは厳重に管理する。特に、個人情報は神戸大学医学部附属病院電子カルテシステム内部のみで管理し、連結可能な匿名化を実施した上で多変量解析などのデータ解析に供する。また、成果のとりまとめを行い、内外の学会や学術雑誌に積極的に研究成果の発表を行う予定であるが、発表に際しては個人情報が漏洩することがないように、さらに、患者やその家族に不利益のないように十分配慮する。

本研究計画に基づき実施する遺伝子組替え実験（低比重リポ蛋白受容体欠損マウス（LDLR-KO マウス）の使用）は、神戸大学遺伝子組替え実験安全委員会の承認を得たものであり、カルタヘナ法に則して神戸大学遺伝子組替え実験実施規則に基づき、これを遵守して行う。また、動物実験を行う場合には学内の動物実験委員会の承認を得たうえで、諸規則に則り動物愛護の精神を持って行う。

II 研究内容及び成果等

1 研究内容及び方法

(1) 研究項目名 1: トランス脂肪酸の動脈硬化性疾患（冠動脈疾患）へ与えるリスクの

検討（臨床研究）（研究担当者名：平田健一・神戸大学／波多野直哉・神戸大学／吉田優・神戸大学）

1) 個別課題名ア：トランス脂肪酸食負荷による血清トランス脂肪酸濃度変化の検討

本課題においては健常ボランティア群を対象とし、トランス脂肪酸高含有食品（マーガリン）を1週間負荷する。負荷前、並びに負荷後1日おきに空腹時採血を行い、採取された採血検体のトランス脂肪酸濃度の経時的変化を検討する。負荷に用いるマーガリンは同一の商品を選択し、前もってガスクロマトグラフ質量分析計にて含有されるトランス脂肪酸量を定量する。分析方法に関しては、平成18年の食品安全確保総合調査「食品に含まれるトランス脂肪酸の評価基礎資料調査」にならい分析を行う。負荷前、並びに負荷後の採血検体の分析では、まず、血清全脂質中の脂肪酸を加水分解後、メチル誘導体化してトランス脂肪酸を測定するが、さらに、固相抽出・遠心分離などを組み合わせて遊離脂肪酸・低密度リポ蛋白(LDL)・高密度リポ蛋白(HDL)・赤血球・血小板に分離し、それぞれの成分におけるトランス脂肪酸濃度を検討する。リポ蛋白においては、さらに構成脂質をFolch法により抽出して神戸大学医学研究科質量分析総合センターで運用されている液体クロマトグラフィー質量分析計での分析(LC-MS/MS分析)に供し、脂質全体の構成成分のプロファイリングを実施する。このような解析により、ヒトに負荷されたトランス脂肪酸がどの程度の早さで吸収され、血中のどの成分に取り込まれているのかという基礎的データを得ることができる。

本課題は平成22年度に行い、実際の患者血清を用いた解析の予備実験と位置づける。参加登録症例数は約10名を計画している。

2) 個別課題名イ：非冠動脈疾患群における血中トランス脂肪酸濃度・食事内容の検討

本課題においては消化器内科病棟入院症例を対象とする。入院初日に適切なインフォームドコンセントを取得後、入院までの直近1週間の食生活に関して食事内容アンケートを実施する。アンケートの結果と、平成18年に内閣府食品安全委員会より発表された食品安全確保総合調査「食品に含まれるトランス脂肪酸の評価基礎資料調査」とを用いて、入院までの食生活におけるトランス脂肪酸摂取量を推計する。インフォームドコンセントの取得とアンケートの実施・集計に関し、分担研究者のもとで実験助手を1名雇用する。また、臨床診療情報（既往歴、内服歴、既知の冠動脈危険因子）に関しても神戸大学医学部附属病院電子カルテシステムより入手し、分担研究者 吉田優の指導の下、データ整理に当たる。入院2日目の早朝、空腹時採血を実施し、雇用した実験助手により遠心分離・血清分離を行い、分注後分析までの間、 -80°C で超低温保存する。血清中のトランス脂肪酸分析は、医学研究科質量分析総合センターにおいて、分担研究者波多野直哉が実施する。多数のサンプル数を処理する必要があることから、血清中の脂肪酸抽出、メチルエステル誘導体化には脂肪酸メチル化キット/メチル化脂肪酸精製キット（ナカライテスク株式会社）を使用する。血清 50 μl に内部標準物質としてノナデカン酸(C19:0)を加え、本キットにより総脂質脂肪酸の抽出・誘導体化・精製を行う。精製後のメチル化脂肪酸溶液を100 μl のノルマルヘキサンに溶解し、分析に供する。

トランス脂肪酸の分析に関しては株式会社島津製作所ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP2010ULTRA を使用する。脂肪酸の分析には通常ガスクロマトグラフを使用し、分離された保持時間情報のみで同定定量する実験系が多いが、本研究ではガスクロマトグラフ質量分析計を使用し、質量分析による脂肪酸の崩壊パターン（フラグメントパターン）も脂肪酸同定のための情報として用いる。脂肪酸分離のためのキャピラリーカラムには Sigma-Aldrich 社製 SP-2560（100m x 内径 0.25mm x 膜厚 0.20 μ m）を使用し、カラムオープン温度は 140 $^{\circ}$ C から 240 $^{\circ}$ C までの昇温を行い、分離された脂肪酸メチルエステルを質量分析計で検出する。トランス脂肪酸の分析対象として、本研究では標準物質が入手可能な炭素数 18 のモノエン、ジエン、トリエントランス脂肪酸とした（下記参照）。

SupelcoTM 37 Component FAME Mix (No. 18919-1AMP)

Sigma-AldrichTM

cis-6-Octadecenoic (Petroselinic) (No. 47198)

trans-6-Octadecenoic (Petroselaidic) (No. 47199)

cis-7-Octadecenoic (No. 46900-U)

cis-11-Octadecenoic (cis-Vaccenic) (No. 46904)

trans-11-Octadecenoic (trans-Vaccenic) (No. 46905-U)

cis-12-Octadecenoic (No. 46906)

trans-12-Octadecenoic (No. 46907-U)

cis-9,12-Octadecadienoic (No. 46950-U)

trans-9,12-Octadecadienoic (No. 46951-U)

Linoleic Acid Methyl Ester cis/trans Isomer Mix 4 components (No. 47791)

trans-9, trans-12-Octadecadienoic

cis-9, trans-12-Octadecadienoic

trans-9, cis-12-Octadecadienoic

cis-9, cis-12-Octadecadienoic

Linolenic Acid Methyl Ester Isomer Mix 6 components (No. 47792)

trans-9, trans-12, trans-15-Octadecatrienoic

trans-9, trans-12, cis-15-Octadecatrienoic

trans-9, cis-12, trans-15-Octadecatrienoic

cis-9, trans-12, trans-15-Octadecatrienoic

cis-9, cis-12, trans-15-Octadecatrienoic

cis-9, trans-12, cis-15-Octadecatrienoic

trans-9, cis-12, cis-15-Octadecatrienoic

cis-9, cis-12, cis-15-Octadecatrienoic

入院 2 日目の早朝空腹時採血分析により得られた血清中の各トランス脂肪酸濃度と、食事内容アンケート調査の結果を対比し、どのような相関を示すか検討する。また、下記の臨床診療情報を加えた多変量解析を行い、血清中の各トランス脂肪酸濃度が冠動脈疾患の有意なリスク因子となっているか、個別課題ウ「冠動脈疾患群における血中トランス脂肪酸濃度・食事内容の検討」と合わせて検討する。

患者背景因子として用いる診療情報

既往歴；担癌症例、過去の冠動脈疾患既往症例は除外する。

性別、年齢

身長、体重、肥満度(BMI)

合併症；高血圧、糖尿病、脂質異常症の有無

喫煙歴

入院時の内服；抗血小板薬（アスピリン、クロピドグレル、チクロピジン、シロスタゾール）、アンギオテンシン受容体拮抗薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、カルシウム拮抗薬、β遮断薬、利尿薬、スタチン製剤、EPA製剤、エゼチミブ、プロブコール、フィブラート系薬剤、ニコチン酸、ピオグリタゾン、スルフォニルウレア製剤、ビグアナイド製剤、αGI阻害薬

生化学的検査所見

腎機能；尿素窒素、クレアチニン値

炎症所見；高感度CRP、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)、血清アミロイドA(SAA)、IL-6

脂質；総コレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸、リン脂質、Lp(a)、レムナント様パーティクルコレステロール(RLP-C)、アポ蛋白、アディポネクチン、PON-1、PAF-AH

耐糖能；グルコース、インスリン、ヘモグロビンA1c

肝機能；AST、ALT、γGTP、ALP、LDH

栄養状態；総蛋白、アルブミン

本研究課題は、平成22年後半より開始し、24年度前半まで継続する。多因子疾患である冠動脈疾患に対するトランス脂肪酸摂取量、並びにトランス脂肪酸血中濃度のリスク評価を行うために、本課題にて解析する症例は対照群となる。このため多変量解析に耐えうる十分な症例数が必要である。消化器内科への年間入院症例数は約1000症例であり、その中で適切なインフォームドコンセントを実施後、研究に同意して頂けた患者の参加を得る。1年間で約800症例の参加登録を見込んでおり、実質研究期間2年間の間で約1600症例分のデータを分析する。

3) 個別課題名ウ：冠動脈疾患群における血中トランス脂肪酸濃度・食事内容の検討

本課題においては循環器内科病棟入院症例を対象とする。入院初日に適切なインフォームドコンセントを取得後、入院までの直近1週間の食生活に関して食事内容アンケートを実施する。アンケートの結果と、平成18年に内閣府食品安全委員会より発表された食品安全確保総合調査「食品に含まれるトランス脂肪酸の評価基礎資料調査」とを用いて、入院までの食生活におけるトランス脂肪酸摂取量を推計する。インフォームドコンセントの取得、アンケートの実施・集計に関し、主任研究者のもとで実験助手を1名雇用する。また、臨床診療情報（既往歴、内服歴、既知の冠動脈危険因子）に関しても神戸大学医学部附属病院電子カルテシステムより入手し、主任研究者 平田健一の指導の下、データ整理に当たる。入院2日目の早朝、空腹時採血を実施し、雇用した実験助手により遠心分離・血清分離を行い、分注後分析までの間、-80℃で超低温保存する。

血清中のトランス脂肪酸分析は、医学研究科質量分析総合センターにおいて、分担研究者波多野直哉が実施し、分析対象は個別課題イ「非冠動脈疾患群における血中トランス脂肪酸濃度・食事内容の検討」と同様に設定する。入院2日目の早朝空腹時採血分析により得られた血清中の各トランス脂肪酸濃度と、食事内容アンケート調査の結果を対比し、どのような相関を示すか検討する。また、下記の臨床診療情報を加えた多変量解析を行い、血清中の各トランス脂肪酸濃度が冠動脈疾患の有意なリスク因子となっているか検討する。

患者背景因子として用いる診療情報

性別、年齢

冠動脈疾患の有無

初回病変か、カテーテル治療後か、ステント内再狭窄か

バイパス術後か、病変血管数、病変部位

身長、体重、肥満度(BMI)

合併症；高血圧、糖尿病、脂質異常症の有無

喫煙歴

入院時の内服；抗血小板薬（アスピリン、クロピドグレル、チクロピジン、シロスタロール）、アンギオテンシン受容体拮抗薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、カルシウム拮抗薬、β遮断薬、利尿薬、スタチン製剤、EPA製剤、エゼチミブ、プロブコール、フィブラート系薬剤、ニコチン酸、ピオグリタゾン、スルフォニルウレア製剤、ビグアナイド製剤、αGI阻害薬

生化学的検査所見

腎機能；尿素窒素、クレアチニン値

炎症所見；高感度CRP、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)、血清アミロイドA(SAA)、IL-6
脂質；総コレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸、リン脂質、Lp(a)、レムナント様パーティクルコレステロール(RLP-C)、アポ蛋白、アディポネクチン、PON-1、PAF-AH

耐糖能；グルコース、インスリン、ヘモグロビンA1c

肝機能；AST、ALT、γGTP、ALP、LDH

栄養状態；総蛋白、アルブミン

本研究課題は、平成22年後半より開始し、24年度前半まで継続する。多因子疾患である冠動脈疾患に対するトランス脂肪酸摂取量、並びにトランス脂肪酸血中濃度のリスク評価を行うためには、多変量解析に耐えうる十分な症例数が必要である。循環器内科への年間入院症例数は約1000症例であり、その中で適切なインフォームドコンセントを実施後、研究に同意して頂けた患者の参加を得る。1年間で約800症例の参加登録を見込んでおり、実質研究期間2年間の間で約1600症例分のデータを分析する。

4) 個別課題名エ：栄養指導介入による血清トランス脂肪酸濃度・食事内容変化の検討

本課題においては、循環器内科病棟入院症例の中で、退院後は大学病院の外来通院予定であり、かつ食事管理に積極的な患者を対象とする。循環器内科入院後、同意頂けた

患者には院内栄養管理室で実施している栄養指導を実施する。以前より、院内栄養管理室の運営には循環器内科学分野も関わっていることから、通常の減塩・摂取カロリー制限といった栄養指導に加え、トランス脂肪酸含有量の多い食品を低減させるよう指導を行う。退院1ヶ月後に初回大学病院外来受診日を設定し、大学病院外来受診日には、受診前1週間の食事内容アンケートを実施する。また、初回外来受診日は通常朝食絶食の空腹時採血を実施し、冠動脈危険因子の管理を行っていることから、適切なインフォームドコンセントの取得後、外来受診時の空腹時採血血清を用いて、血中トランス脂肪酸濃度の分析を行う。分析方法は個別課題ウ「冠動脈疾患群における血中トランス脂肪酸濃度・食事内容の検討」と同様の分析を行う。このような前向き介入試験を行うことにより、栄養指導介入がトランス脂肪酸摂取量、並びに血中トランス脂肪酸濃度にどのような効果を与えるか検討できる。

本研究課題は平成23年度、平成24年度での実施を予定している。高度先進医療機関としての大学病院の性格上、入院症例の多くはもともと通院していた病院・医院へ逆紹介する病院連携体制をとっており、入院症例全例を退院後は大学病院外来において経過観察しているわけではない。したがって、本研究課題への参加登録症例数は2年間で約50症例程度と見込まれる。

(2) 研究項目名2: 小動物疾患モデルを用いたトランス脂肪酸負荷の影響の検討 (研究担当者名: 平田健一・神戸大学/篠原正和・神戸大学)

1) 個別課題名オ: 動脈硬化モデルマウスを用いたトランス脂肪酸負荷の影響の検討

本課題においては、低比重リポ蛋白受容体欠損マウス (LDLR-KO マウス) を使用する。LDLDR-KO マウスは6-8週齢から、0.5-1.0%前後のコレステロール負荷を8週間-12週間行うことで、大動脈の動脈硬化性疾患が形成される疾患モデルマウスである。トランス脂肪酸負荷として、主要なトランス脂肪酸であるエライジン酸 (C18:1, 9-trans) の負荷実験を行う。コントロール群には投与カロリーが同一となるようにオレイン酸 (C18:1, 9-cis) を投与する。これまでにエライジン酸負荷量と血中濃度の関係に関して予備実験を実施した。エライジン酸を重量比1.25%、2.5%、5.0%でエサに1週間混餌負荷し、空腹時での血清全脂質脂肪酸分析を実施した。血清中エライジン酸濃度はそれぞれ約200 μ M、300 μ M、400 μ Mとなり、ヒト血中でのエライジン酸濃度 (50-200 μ M) と比較しても十分な負荷を得ることが可能であった。

平成22年度では、6週齢のLDLDR-KOマウスに対し、トランス脂肪酸負荷群・シス脂肪酸負荷群を設定し、それぞれ重量比0.5%のコレステロール負荷に加え、重量比5%でエライジン酸・オレイン酸負荷を行う。また脂肪酸負荷なしのコントロール群も作成し、コントロール群では重量比0.5%のコレステロール負荷のみを実施する。負荷後8週間 (14週齢)、12週間後 (18週齢) にてマウスを安楽死処置し、以下の解析を行う。

動脈硬化病変の解析

大動脈起始部、腕頭動脈の動脈硬化病変の薄切切片を作製し、組織学的な定量評価により、動脈硬化病変の進行に対するエライジン酸・オレイン酸負荷の影響を評価する。動脈硬化病変組成の評価として、病理組織学的に脂質染色、線維成分染色、各種免疫染

色を実施し、動脈硬化病変組成に対するエライジン酸・オレイン酸負荷の影響を評価する。また、動脈硬化病変、周辺正常血管を回収し、低分子代謝物の網羅的解析とメタボロミクス（メタボローム解析）に供する。

脂溶性代謝物解析（リポドミクス）では、回収された各部位組織から Folch 法により全脂質を抽出する。動脈硬化病変のどの部位に投与したトランス脂肪酸が分布しているかを解析するため、組織から抽出された全脂質中の脂肪酸を加水分解し、メチル誘導体化してガスクロマトグラフ質量分析計で分析する。さらに、組織から抽出された全脂質を固相抽出により脂質分画（中性脂質、リン脂質、遊離脂肪酸）を分けたのち、メチル誘導体化してガスクロマトグラフ質量分析計にて分析する。また、全脂質の一部は、神戸大学医学研究科質量分析総合センターで運用されている液体クロマトグラフィー質量分析計での分析（LC-MS/MS 分析）に供し、脂質全体の構成成分のプロファイリングを実施する。

水溶性代謝物解析では、回収された各部位組織から Bligh & Dyer 法により水溶性低分子代謝物を回収し、凍結乾燥後ピリジンに再溶解して誘導体化後（オキシム化+トリメチルシリル化（TMS 化））、低極性キャピラリーカラムを装着したガスクロマトグラフ質量分析計で分析する。水溶性代謝物を解析するガスクロマトグラフ質量分析計は既に本学質量分析総合センターで運用されており、生体組織中の微量なアミノ酸・有機酸の定量的評価が可能となっている。

このような脂溶性代謝物分析と水溶性代謝物解析をエライジン酸負荷群とオレイン酸負荷群とを対比させながら実施することにより、動脈硬化病変のどの部位の、どの脂質分画に負荷したトランス脂肪酸が取り込まれているかを知ることができるとともに、トランス脂肪酸負荷に伴う代謝異常を鋭敏に評価することが可能である。トランス脂肪酸負荷に伴う代謝異常が検出されれば、その代謝パスウェイに関係する酵素蛋白質の発現・活性等を検討して行くことで、トランス脂肪酸が動脈硬化病変の機序にどのように関わっているかを明らかにすることが可能となる。

低比重リポ蛋白（LDL）の機能解析

マウス血漿より比重超遠心法により低比重リポ蛋白（LDL）を分離し、以下の解析に供する。

1. LDL を構成する脂質解析

LDL 分画より Folch 法により全脂質を抽出する。負荷されたトランス脂肪酸の取り込みを分析するために、全脂質中の脂肪酸を加水分解し、メチル誘導体化してガスクロマトグラフ質量分析計で分析する。さらに、抽出された全脂質を固相抽出により脂質分画（中性脂質、リン脂質）を分けたのち、メチル誘導体化してガスクロマトグラフ質量分析計にて分析する。また、全脂質の一部は、液体クロマトグラフィー質量分析計での分析（LC-MS/MS 分析）に供し、脂質全体の構成成分のプロファイリングを実施するとともに、ガスクロマトグラフ質量分析計では分析が困難な酸化修飾脂質の定量的評価を行う。

2. LDL の易酸化性の解析

3 群のモデル動物より分取した LDL 分画に硫酸銅を加え、経時的に産生される共役ジエンを吸光度としてモニタリングし、LDL の易酸化性の解析を行う。また一定時間 LDL を酸化させ、酸化 LDL をアガロース電気泳動に供し、その移動度の分析、並びに酸化ス

トレス応答性の蛍光プローブ試薬 (DCF) を用いることで LDL の酸化修飾を定量的に評価する。さらに液体クロマトグラフィー質量分析計を用いて、酸化修飾にて生じた LDL 中のヒドロキシ体 (9-HODE、13-HODE) の定量的解析を実施する。エライジン酸負荷群、オレイン酸負荷群、並びにコントロール (脂肪酸負荷なし) 群を対比させることで、トランス脂肪酸負荷の LDL 易酸化性へ与える影響を検討する。

高比重リポ蛋白 (HDL) の機能解析

マウス血漿より比重超遠心法により高比重リポ蛋白 (HDL) を分離し、以下の解析に供する。

1. HDL を構成する脂質解析

HDL 分画より Folch 法により全脂質を抽出する。負荷されたトランス脂肪酸の取り込みを分析するために、全脂質中の脂肪酸を加水分解し、メチル誘導体化してガスクロマトグラフ質量分析計で分析する。また、抽出された全脂質を固相抽出により脂質分画 (中性脂質、リン脂質) を分けたのち、メチル誘導体化してガスクロマトグラフ質量分析計にて分析する。また、全脂質の一部は、液体クロマトグラフィー質量分析計での分析 (LC-MS/MS 分析) に供し、脂質全体の構成成分のプロファイリングを実施するとともに、ガスクロマトグラフ質量分析計では分析が困難な酸化修飾脂質の定量的評価を行う。

2. コレステロール逆転送系の評価

培養系単球細胞 (THP-1) を PMA 刺激にてマクロファージに分化させ、放射性同位元素ラベルしたコレステロールを取り込ませ、泡沫細胞を形成させる。培養液中に適切な濃度の HDL を添加し、一定期間培養を継続させることにより HDL のコレステロール逆転送機能を評価する。エライジン酸負荷群、オレイン酸負荷群、並びにコントロール (脂肪酸負荷なし) 群の HDL 機能を対比させることで、トランス脂肪酸負荷のコレステロール逆転送系へ与える影響を検討する。

3. 抗炎症作用の評価

HDL は生体内にて重要な抗炎症作用を持つことが示されており、トランス脂肪酸負荷によりその保護的作用がどのような影響を受けるか評価する。

培養系内皮細胞を適切な濃度の炎症性サイトカイン (TNF- α 等) で刺激すると、炎症性シグナルの NF- κ B 活性化、接着因子の発現 (VCAM-1、ICAM-1) 等が観察される。また、培養系単球細胞 (THP-1) に炎症性刺激 (LPS 投与等) を行うと、培養液中へ TNF- α 等各種の炎症性サイトカインが分泌される。このような炎症性応答反応に対し、培養液中に HDL を加えると抗炎症作用を示すことが広く知られている。したがって、エライジン酸負荷群、オレイン酸負荷群、並びにコントロール (脂肪酸負荷なし) 群の HDL を用い、それぞれの抗炎症作用を比較することで、トランス脂肪酸負荷が HDL の抗炎症作用にどのような影響を与えるか検討できる。

4. 抗酸化作用の評価

標準品として準備した LDL に対し、エライジン酸負荷群、オレイン酸負荷群、並びにコントロール (脂肪酸負荷なし) 群の HDL を添加してから、硫酸銅による酸化実験を実施する。LDL 酸化の定量的評価は、前項 LDL の機能解析 2. LDL の易酸化性の解析 に記載した方法を用いる。この解析により、トランス脂肪酸負荷が HDL の抗酸化作用にどのような影響を与えるか検討する。

血球成分（血小板・白血球）機能解析

動脈硬化性疾患では血小板凝集能の亢進、全身の炎症性反応の亢進も重要な機序である。全血より遠心分離によって血小板、白血球分画を採取し、それぞれの血球成分に取り込まれているトランス脂肪酸負荷量と、それぞれの血球機能異常との関連性を評価する。まず血小板に対しては凝集反応の観察、白血球に対しては炎症性刺激への応答性を観察し、エライジン酸負荷群、オレイン酸負荷群、並びにコントロール（脂肪酸負荷なし）群それぞれ由来の血小板、白血球の機能解析を行う。次に、各血球成分に対し、低分子代謝物の網羅的解析、メタボロミクス（メタボローム解析）を実施することで、トランス脂肪酸負荷が血小板、白血球に何らかの代謝異常を引き起こしているか検討する。

脂溶性代謝物解析（リピドミクス）では、回収された血球分画から Folch 法により全脂質を抽出し、全脂質中の脂肪酸を加水分解し、メチル誘導体化してガスクロマトグラフ質量分析計で分析する。さらに、抽出された全脂質を固相抽出により脂質分画（中性脂質、リン脂質、遊離脂肪酸）を分けたのち、メチル誘導体化してガスクロマトグラフ質量分析計にて分析する。また、全脂質の一部は、液体クロマトグラフィー質量分析計での分析（LC-MS/MS 分析）に供し、脂質全体の構成成分のプロファイリングを実施する。

水溶性代謝物解析では、回収された血球分画から Bligh & Dyer 法により水溶性低分子代謝物を回収し、凍結乾燥後ピリジンに再溶解し、誘導体化後（オキシム化+トリメチルシリル化（TMS 化））、低極性キャピラリーカラムを装着したガスクロマトグラフ質量分析計で分析する。

このような脂溶性代謝物分析、水溶性代謝物解析をエライジン酸負荷群と、オレイン酸負荷群とを対比させながら実施することにより、どの脂質分画に負荷したトランス脂肪酸が分布しているかを知ることができ、トランス脂肪酸負荷に伴う代謝異常を鋭敏に評価することが可能である。トランス脂肪酸負荷に伴う代謝異常が検出されれば、その代謝パスウェイに関係する酵素蛋白質の発現・活性等を検討して行くことで、トランス脂肪酸が血小板機能・白血球機能の異常にどのように関わっているかを明らかにすることが可能となる。

他臓器でのトランス脂肪酸負荷による影響の検討（肝臓・脂肪組織・骨格筋）

動脈硬化病変の評価のためにマウスを安楽死処置する際に、肝臓・脂肪組織（皮下脂肪・内臓脂肪）・骨格筋も解析試料として回収する。組織はまず薄切切片を作成し、組織学的な異常がないかを検討する。次に組織中の低分子代謝物の網羅的解析、メタボロミクス（メタボローム解析）を行い、脂溶性代謝物・水溶性代謝物の解析から何らかの代謝変化が生じているか検討する。

本個別課題は平成 22 年より分担研究者篠原正和のもとで順次開始し、研究期間として 3 年間で計画している。

2 研究成果、考察、今後の課題

- (1) 研究項目名 1：トランス脂肪酸の動脈硬化性疾患（冠動脈疾患）へ与えるリスクの検討（臨床研究）（研究担当者名：平田健一・神戸大学／波多野直哉・神戸大学／吉田優・神戸大学）

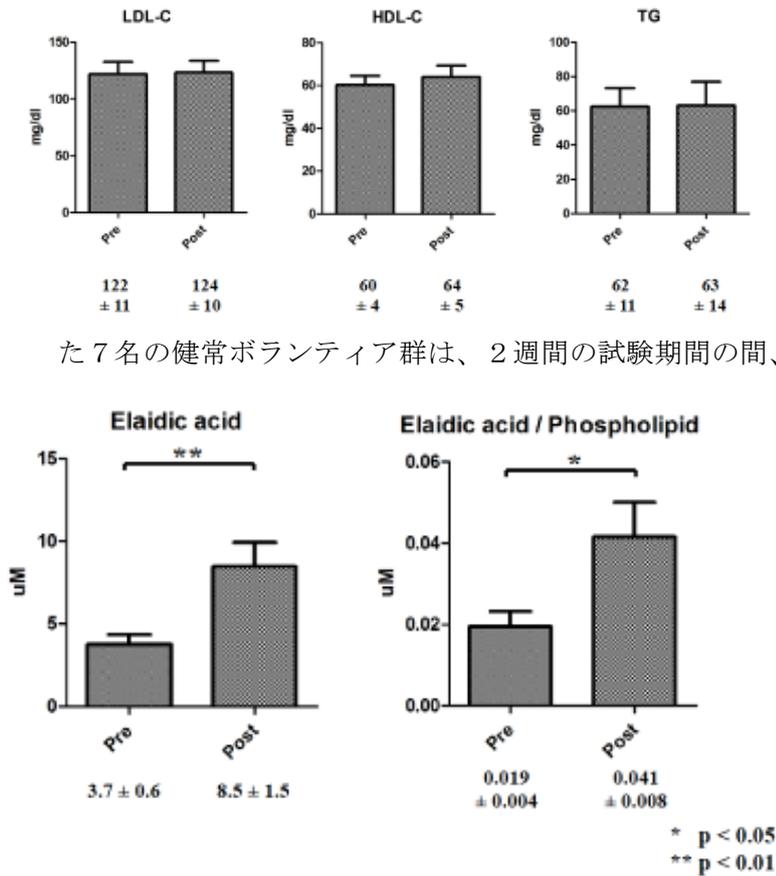
- 1) 個別課題名ア：トランス脂肪酸食負荷による血清トランス脂肪酸濃度変化の検

討

個別研究課題名ア

トランス脂肪酸食負荷による血清トランス脂肪酸濃度変化の検討

健常ボランティア（男性7名、平均年齢 32.7 ± 1.0 歳）に対し、トランス脂肪酸含有が食品分析にて確認されたクッキー9枚（トランス脂肪酸含有量 0.37g）を2週間投与し、その前後の脂質プロファイル、血清中エライジン酸濃度を分析した。



左図に示す通り、2週間のトランス脂肪酸負荷によってはLDLコレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪の脂質プロファイルには変動が見られなかった。

この結果より、本研究に参加した7名の健常ボランティア群は、2週間の試験期間の間、

食生活スタイルはほぼ一定に保たれていることが示唆され、試験期間前後の採血検体はトランス脂肪酸負荷の影響を良好に反映していると考えられる。

血清エライジン酸濃度、エライジン酸/リン脂質比を左図に示す。2週間のトランス脂肪酸負荷により共に2倍程度の有意な上昇を示し、血中トランス脂肪酸濃度はトランス脂肪酸摂取量を鋭敏に反映した指標であると考えられる。

考察および結論

研究課題名イ、ウにおいて、個々人のトランス脂肪酸負荷量を客観的に判断する指標として血中トランス脂肪酸濃度を分析対象として用いている。本検討結果から、血中トランス脂肪酸濃度という指標が妥当なものであると評価できる。

2) 個別課題名イ：非冠動脈疾患群における血中トランス脂肪酸濃度・食事内容の検討

3) 個別課題名ウ：冠動脈疾患群における血中トランス脂肪酸濃度・食事内容の検討

当大学病院循環器内科入院患者において、当院倫理委員会承認の元、入院翌日空腹時

採血を行い、血清を精製し測定まで -80°C にて保管した。脂肪酸濃度の測定は、「研究内容」の欄に前述通りにガスクロマトグラフ質量分析計にて行った。

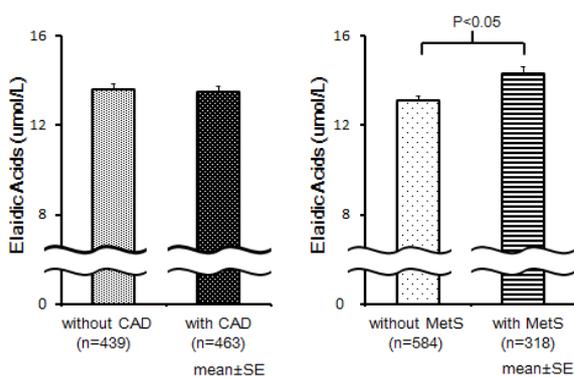
検体採取は、2008年7月から2013年3月まで行った。除外基準は、5年以内の癌罹患患者、慢性腎不全、透析患者、炎症所見陽性患者、NYHAIVの重症心不全患者、中性脂肪 400mg/dL 以上の高度な脂質異常症患者である。結果、今回の検討に用いた患者検体数は902検体である。年齢の平均値は64.7歳で、最年少が21歳、最高齢が91歳であった。男性が624人、女性が278人であった。心臓カテーテル検査において、冠動脈病変が確認された患者を冠動脈疾患(coronary artery disease; CAD)群とし、それ以外の不整脈、弁膜症患者を非CAD(without CAD)群とした。トランス脂肪酸の代表として、オレイン酸のトランス体であるエライジン酸、またはリノール酸のトランス体であるリノエライジン酸を測定した。

まず、検体全数にて、CAD群と、非CAD群に分類し、危険因子の有無や脂質プロファイルについて、検討をした。当院入院患者において、既知の冠動脈疾患危険因子である、男性、高血圧、糖尿病、脂質異常症に関しては、有意に合併している率が高値であった。喫煙や心臓病の家族歴に関しても、有意に冠動脈疾患群で高率に認めた。脂質プロファイルにおいて、HDL-Cや中性脂肪は有意に冠動脈疾患群で高値であったが、LDL-C値に関しては、冠動脈疾患群で有意に低値を示した。この逆転現象は、現在冠動脈疾患の二次予防に、スタチンによるLDL低下療法が有用であることが周知されており、当院通院中の患者も総じて、スタチン内服率が高く、二次予防の目標値である 100mg/dL 以下にコントロールされている結果を反映している。総じて、冠動脈疾患患者の方が、多くの薬剤を処方されていることが確認された。

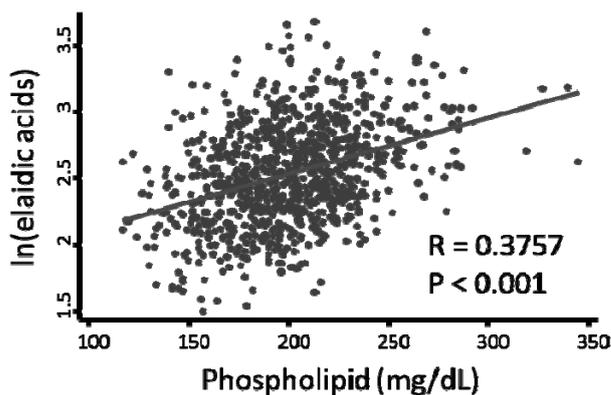
エライジン酸と、リノエライジン酸について、総数比較において冠動脈疾患群と非冠動脈疾患群で有意差が認められなかった。むしろ、エライジン酸に関しては冠動脈疾患群でやや低い傾向を示した。その理由として、トランス脂肪酸を含む脂肪酸は、血液中において約95%は、リポ蛋白中に存在していることが報告されている。上記のように、冠動脈疾患群において、上記のように積極的脂質低下療法が行われており、血中リポ蛋白が減少していることが一因と考えられた。そのため、何らかのデータの補正が必要であり、血中リポ蛋白量を反映するリン脂質値で補正した。リン脂質値とエライジン酸、リノエライジン酸値は有意な正相関を示した。新たな指標として、エライジン酸/リン脂質比を導入し、解析を行ったところ、冠動脈疾患群やメタボリック症候群患者において、それら疾患を有していない群と比較し、有意に高値を認めた。全数調査にて、エライジン酸/リン脂質比が、冠動脈疾患の独立した因子と成り得るかを多変量解析を行ったが、高血圧、糖尿病、HDL-Cといった既知の危険因子は有意であったが、エライジン酸は有意な独立した危険因子では無かった。

The characteristics	without CAD		with CAD		p
	value or no	SD or %	value or no	SD or %	
number	439	48.67	463	51.33	n.s
Male, n (%)	252	57.4	372	80.35	p < 0.05
Age (years)	61.19	13.09	67.95	10.11	p < 0.05
Metabolic syndrome, n (%)	75	17.08	243	52.48	p < 0.05
Hypertension, n (%)	192	43.74	381	82.29	p < 0.05
Diabetes Melitus, n (%)	58	13.21	225	48.6	p < 0.05
Dyslipidemia, n (%)	165	37.59	381	82.29	p < 0.05
CAD, n (%)	0	0	463	100	p < 0.05
Alcohol, n (%)					n.s
none	225	51.25	252	54.43	
moderate	164	37.36	179	38.66	
excessive	50	11.39	32	6.91	
Smoking, n (%)					p < 0.05
never	233	53.08	133	28.73	
former	120	27.33	232	50.11	
current	86	19.59	98	21.17	
Family history of CAD, n (%)	68	15.49	130	28.08	p < 0.05
History of stroke yes, n (%)	30	6.83	37	7.99	n.s
Concomitant medication, n (%)					
Aspirin	81	18.45	407	87.9	p < 0.05
Clopidogrel	11	2.51	232	50.11	p < 0.05
Ticlopidine	2	0.46	20	4.32	p < 0.05
Cilostazol	11	2.51	30	6.48	p < 0.05
Warfarin	150	34.17	65	14.04	p < 0.05
other anticoagulant drugs	18	4.1	1	0.22	p < 0.05
ARB	152	34.62	253	54.64	p < 0.05
ACE-I	34	7.74	49	10.58	n.s
α -blocker	15	3.42	19	4.1	n.s
β -blocker	125	28.47	216	46.65	p < 0.05
Calcium channel blocker	146	33.26	212	45.79	p < 0.05
Nitrate	21	4.78	135	29.16	p < 0.05
Nicorandil	10	2.28	68	14.69	p < 0.05
Diuretics	109	24.83	96	20.73	n.s
Lipid lowering drug, n (%)					
Statin	94	21.41	310	66.95	p < 0.05
Fibrate	9	2.05	10	2.16	n.s
EPA	4	0.91	34	7.34	p < 0.05
Ezetimibe	4	0.91	17	3.67	p < 0.05
Nicotinate	9	2.05	10	2.16	n.s
Probucol	1	0.23	1	0.22	n.s
					p
Total cholesterol (mg/dl)	188.22	34.92	167.37	34.50	p < 0.05
HDL-C (mg/dl)	56.36	16.31	47.44	13.29	p < 0.05
LDL-C (mg/dl)	111.14	29.57	98.06	29.26	p < 0.05
non HDL-C (mg/dl)	131.89	34.55	119.84	33.40	p < 0.05
LDL/HDL	2.14	0.85	2.22	0.91	n.s
TG (mg/dl)	120.67	62.35	133.99	63.73	p < 0.05
FFA	508.81	416.31	413.64	219.61	p < 0.05
Phospholipids (mg/dl)	209.78	32.70	190.78	30.77	p < 0.05
RLP-C (mg/dl)	7.37	4.78	7.66	4.93	n.s
FPG (mg/dl)	95.47	18.66	106.65	29.21	p < 0.05
IRI (μ U/ml)	7.15	7.10	9.01	11.40	p < 0.05
HOMA-IR(all)	1.84	3.35	2.61	4.49	p < 0.05
HOMA-IR(noDM)	1.62	1.80	1.88	1.97	n.s
HOMA-beta					
eGFR (ml/min/1.73m ²)	69.96	29.05	53.80	22.00	p < 0.05
hs-CRP (mg/dl)	0.12	0.18	0.14	0.21	n.s
Elaidic acid (uM)	13.58	5.17	13.46	5.53	n.s
Linolelaidic acid (uM)	0.71	0.23	0.70	0.24	n.s

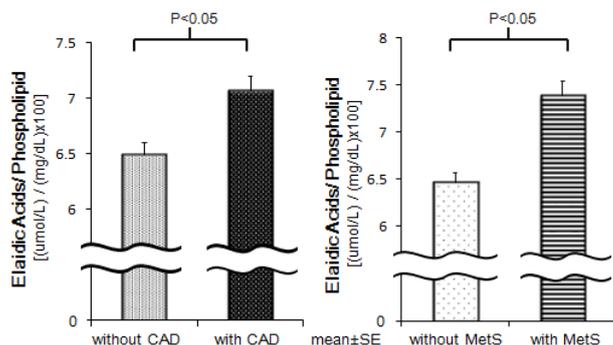
表 1、非冠動脈疾患群 (without CAD) と冠動脈疾患群 (with CAD) の比較



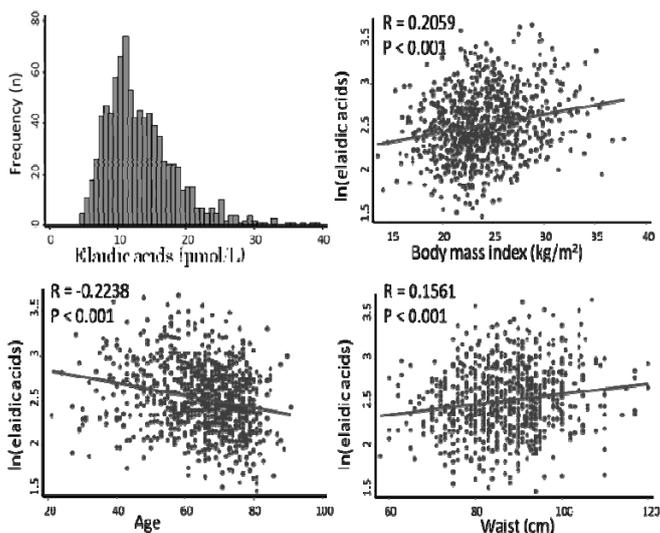
図、冠動脈疾患の有無とエライジン酸濃度は相関なく、メタボリック症候群患者では有意にエライジン酸濃度は高値であった。



図；エライジン酸濃度は、リン脂質濃度と有意な正相関を示す。



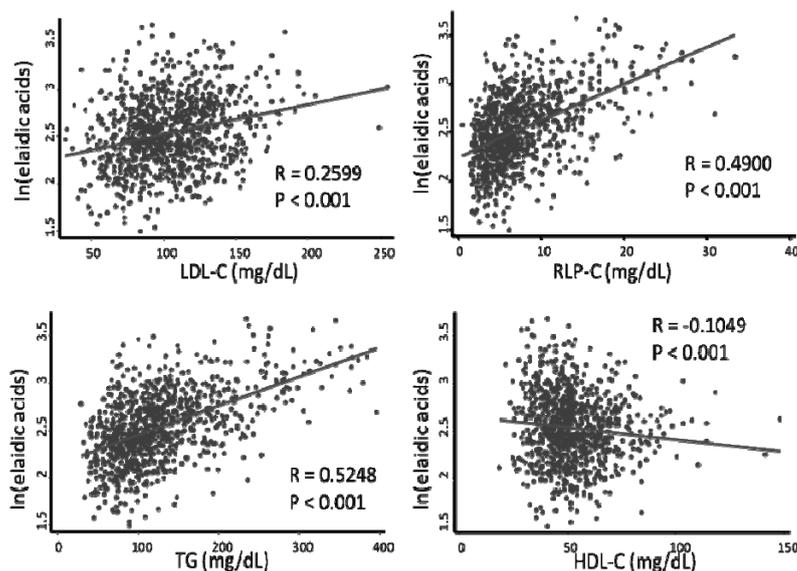
図；エライジン酸／リン脂質比は、冠動脈疾患群やメタボリック症候群患者において、それら疾患を有していない群と比較し、有意に高値を認めた。



図；エライジン酸濃度は、年齢と逆相関し、BMI、腹囲と正相関を認めた。

ついで、エライジン酸濃度と、どのようなパラメーターが相関するかについて、検証を行った。左図に示すように、エライジン濃度の分布は正規分布を取らず、左(小さい)に偏移しているため、以後の解析は、対数表記にて行った。エライジン酸濃度は、BMIや腹囲と正相関を示し、年齢と逆相関を認めた。これらの結果から若年者でかつ肥満患者で高い傾向

を示すことが判明した。また、エライジン酸濃度は、悪玉と呼ばれる動脈硬化惹起性の LDL-C、RLP-C、TG と有意な正相関を示し、善玉と呼ばれる冠動脈疾患の危険因子である HDL-C と有意な逆相関を示した。この結果からは、エライジン酸濃度は、動脈硬化惹起性脂質プロファイルと強い関係があることが判明した。



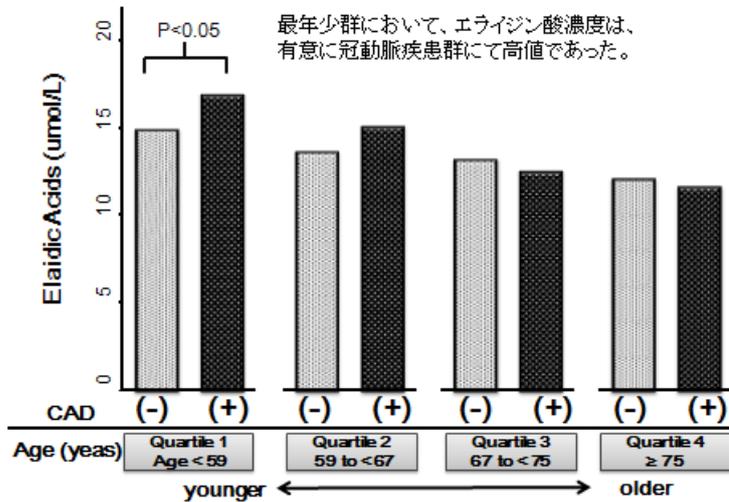
エライジン酸濃度は、動脈硬化惹起性リポタンパク濃度と正相関を示した。

年齢とエライジン酸濃度が逆相関を認めたことから、より若年層に的を絞って解析を行えば、より冠動脈疾患との関係が明確になるのではと予想し、年齢別に全体を4群に分けて、解析を行った。

The characteristics	Quartile 1	Quartile 2	Quartile 3	Quartile 4
	< 59 years old	59 to < 67 years old	67 to < 75 years old	≥ 75 years old
	value or no SD or %	value or no SD or %	value or no SD or %	value or no SD or %
Male, n (%)	173 (72.1)	161 (74.5)	154 (61.6)	136 (69.4)
Age (years)	48.40±8.2	62.94±2.3	70.76±2.3	78.70±3.2
Hypertension, n (%)	103 (42.9)	152 (70.4)	169 (67.6)	149 (76.0)
Diabetes Mellitus, n (%)	48 (20.0)	75 (34.7)	88 (35.2)	72 (36.7)
Dyslipidemia, n (%)	113 (47.1)	141 (65.3)	169 (67.6)	123 (62.8)
CAD, n (%)	77 (32.1)	117 (54.2)	132 (52.8)	137 (69.9)
Smoking, n (%)	90 (37.5)	74 (34.3)	112 (44.8)	90 (45.9)
Statin	70 (29.2)	102 (47.2)	134 (53.6)	98 (50.0)
Fibrate	7 (2.92)	4 (1.9)	7 (2.8)	1 (0.5)
EPA	6 (2.5)	15 (6.9)	7 (2.8)	10 (5.1)
Ezetimibe	5 (2.1)	4 (1.9)	6 (2.4)	6 (3.1)
Total cholesterol (mg/dl)	187.3±36.7	178.7±38.0	177.6±33.3	164.2±33.4
HDL-C (mg/dl)	52.9±17.1	51.5±15.0	52.6±15.6	49.6±13.4
LDL-C (mg/dl)	110.4±30.4	105.1±32.6	104.5±28.3	96.3±27.4
TG (mg/dl)	146.7±79.5	136.6±65.6	117.2±51.7	107.1±39.3
HOMA-IR (noDM)	1.7±1.2	2.00±2.9	1.6±1.5	1.6±1.6
Elaidic acid (uM)	15.4±6.4	13.8±5.1	12.8±4.6	11.7±4.3
Elaidic acid / PL [uM/(mg/dl)x100]	7.4±3.0	6.9±2.4	6.5±2.3	6.4±2.3

最少年齢群でも59歳未満となったが、年齢が下がるにつれて、エライジン酸濃度は高値を示した。

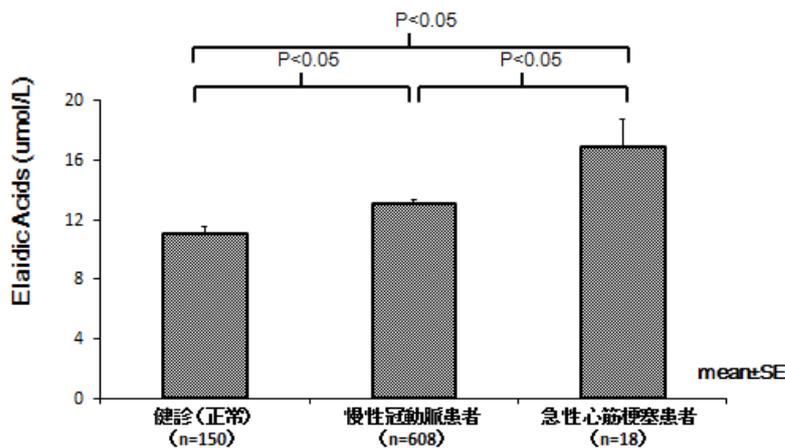
年齢区分ごとに、冠動脈疾患の有無とエライジン酸濃度を調べたところ、最年少群 (Quartile 1) において、エライジン酸濃度は、有意に冠動脈疾患群で高値であった。同様の傾向は、メタボリック症候群患者でも認められた。



今までのデータは、当院入院患者における解析データのみである。入院患者である時点で何らかの疾病を抱えており、データに影響を与えている可能性もあるため、全くの健常人における健診サンプルにおいても、エライジン酸濃度を測定した。

健診サンプルの総数は、150人、年齢の平均は42.9歳と入院患者と比較すると若い。女性の比率が63%であった。後述する心筋梗塞患者のデータとまとめて、表を示す。

健診サンプルは年齢が若いにも関わらず、冠動脈疾患群と比較して、有意にエライジン酸濃度が低かった。この解析にはリン脂質の補正は必要ではなかった。



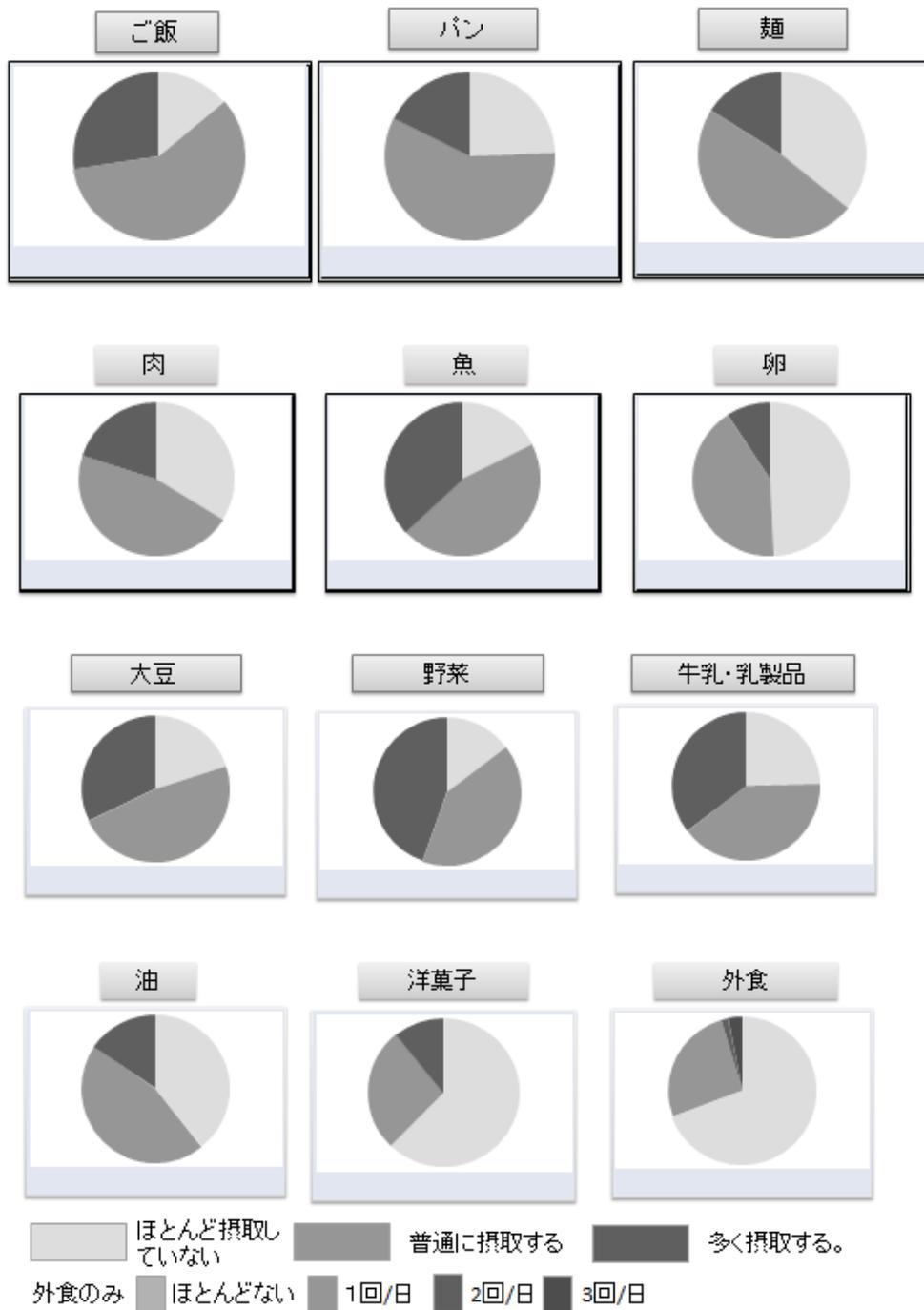
食事内容とエライジン酸濃度との関連を調べるため、冠動脈入院患者において、食事アンケートを行った。人数は、131人を対象とし、65歳以上の患者が多く含まれている。研究開始当初は、栄養指導を絡めてより詳細なデータ解析を目指したが、一人あたりに費やす時間がかかりすぎ、検証に十分な人数を得ることが困難と思われたため、入院日でのアンケートに変更して解析を行った。

食事アンケートの内容

1、食品摂取頻度

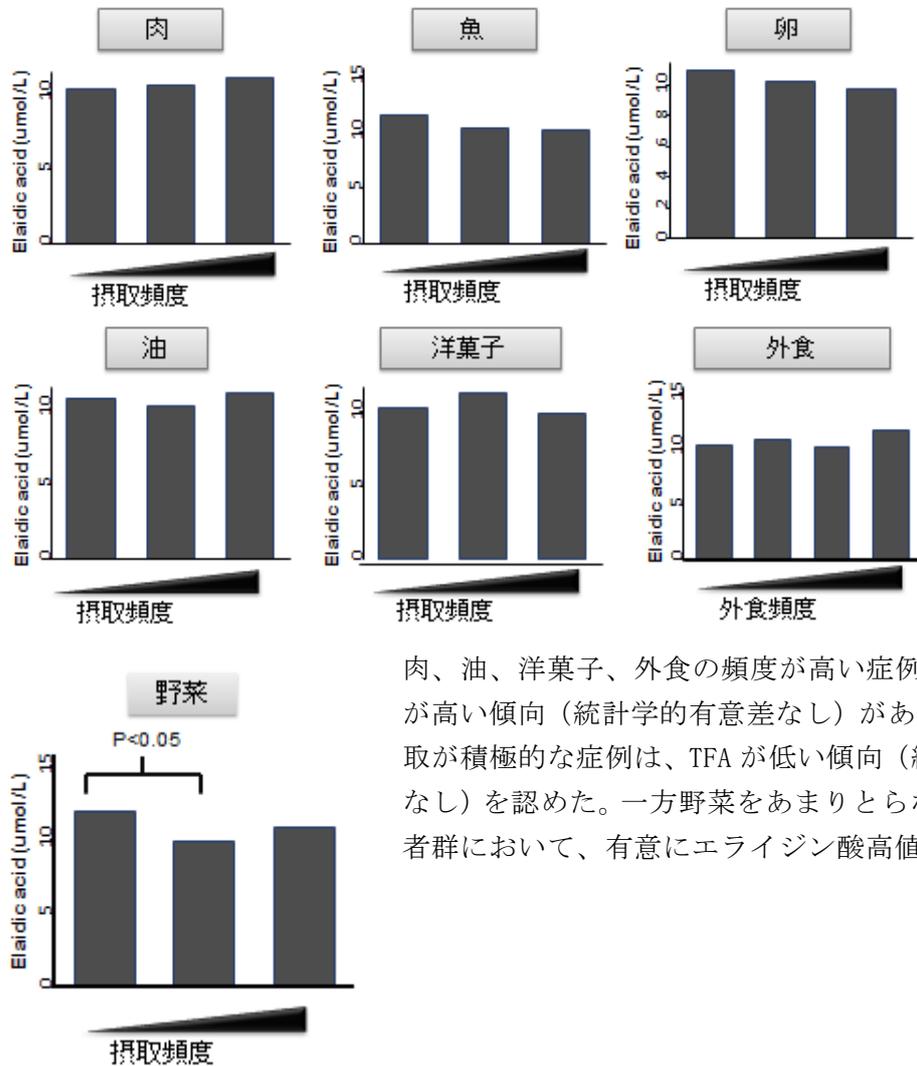
ご飯、パン、麺、肉、魚、卵、大豆、野菜、乳製品、油、洋菓子、外食回数について、頻度をアンケートに記載してもらった。

摂取頻度は1、全くあるいはほとんど取らない。2、普通に摂取する。3、多く摂取する の3段階で記載してもらい、外食に関しては、回数を記載してもらった。アンケート結果を以下に示す。



冠動脈疾患治療後の確認検査目的で入院となる患者群のため、卵摂取を控えており、油料理や外食回数もそれほど多くは無かった。

食事アンケート結果と、エライジン酸濃度の相関について以下に表を示す。



肉、油、洋菓子、外食の頻度が高い症例において、TFAが高い傾向（統計学的有意差なし）があり、魚、卵の摂取が積極的な症例は、TFAが低い傾向（統計学的有意差なし）を認めた。一方野菜をあまりとらないと答えた患者群において、有意にエライジン酸高値を認めた。

より深く食生活とエライジン酸濃度との関連を調べるため、以下のようにトランス脂肪酸摂取に関する食生活をスコア化し、実際の血中エライジン酸濃度との相関を調べた。スコア化（点数高値が、トランス脂肪酸摂取機会多い）

1：トランス脂肪酸摂取量が高い食生活（ほぼ欧米食）

－ 肉類、パン、洋菓子、脂質を多く含む食事

1点：全くあるいはほとんど取らない。

2点：普通に摂取する。

3点：多く摂取する。

外食頻度が多い場合（一日当たり）

0点：ほとんどない

1点：1回

2点：2回

3点：3回

2：トランス脂肪酸摂取量が低い食生活（ほぼ和食）

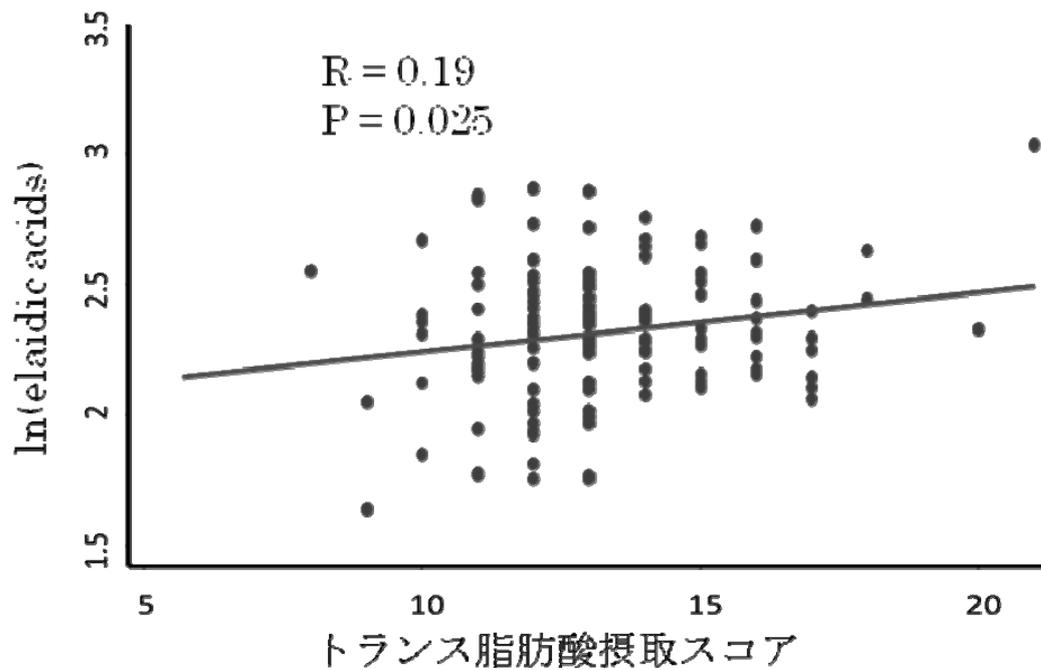
— 魚、卵、野菜

1点：多く摂取する。

2点：普通に摂取する。

3点：全くあるいはほとんど取らない。

このように、個人において、トランス脂肪酸摂取スコアを独自に算定し、実際のエライジン酸濃度との相関を検討した。



このように、トランス脂肪酸摂取スコアと血中エライジン酸濃度が有意な正相関を示した。このことから、食生活上トランス脂肪酸過多がアンケートから示唆された患者群（トランス脂肪酸摂取スコアが高値）において、血中エライジン酸濃度が高値であった。

4) 個別課題名エ：栄養指導介入による血清トランス脂肪酸濃度・食事内容変化の検討

外食頻度が高いほど、血中トランス脂肪酸濃度が高い傾向を示した。そのため、外食を中心にトランス脂肪酸濃度測定を日本食品分析センターに外注した。最終結果を以下の表に示す。

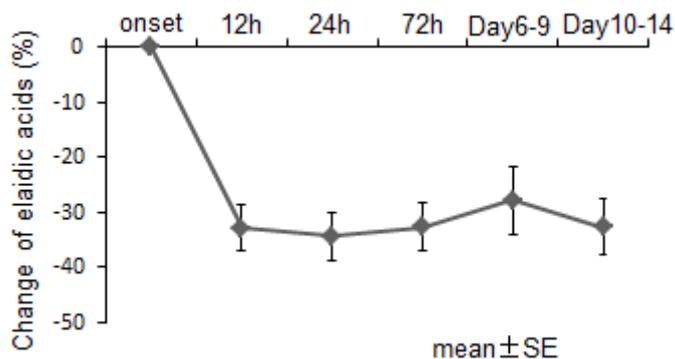
ファーストフード、外食	g TFA/ 100g	菓子類(スーパーなど)	g TFA/ 100g	インスタント食品	g TFA/ 100g
フライドポテト1	0.43	イチゴショート	0.21	ラーメン	検出せず
フライドポテト2	検出せず	シュークリーム	1.6	やきそば	検出せず
ハンバーガー1	0.29	フライドチキン	0.12	マヨネーズ	1.09
ハンバーガー2	0.2	ピザ	0.26	マーガリン	0.72
牛丼(肉のみ)	1.23	スーパー 魚の天ぷら	0.27	飲料(スーパー購入)	
牛丼(肉のみ)	1.35	のり弁当	0.05	カフェラテ	0.06
餃子	検出せず	冷蔵ピザ	0.1	コーヒーフレッシュ	0.06
唐揚げ	検出せず	冷凍唐揚げ	検出せず		
ポークカレー	検出せず	ソーセージ	0.08	当院給食使用食品	
ドーナツ1	0.18	クリーム菓子	0.11	厚揚げ	検出せず
ドーナツ2	検出せず	キャラメル味菓子	検出せず	ヒロウス①	検出せず
コロッケ	0.07	揚げ菓子	0.34	すし揚①	0.55
とんかつ	0.28	揚げ菓子	検出せず	食パン	検出せず
ロールケーキ	0.92	揚げ菓子	6.42	ロールパン	0.08
クロワッサン	0.11	チョコレート菓子	0.54	レーズンパン	0.06
コンビニ		ビスケット	0.21	黒糖食パン	検出せず
生パスタ	検出せず	チョコレート菓子	1.26	和風ドレッシング	検出せず
焼き鳥	0.11	チョコレート菓子	0.17	純正ごま油	0.31
ロールケーキ	0.35	ココア飲料	検出せず	白絞油	2.28
パニラアイス	0.22	チョコレートパイ1	0.95	やきそば	検出せず
弁当(唐揚げのみ)	検出せず	チョコレートパイ2	0.14	デミグラスソース	検出せず
菓子類(スーパー購入)		ラーメン風菓子	検出せず	ビーナッツネオソフト	0.25
クッキー1	0.39	ワッフル	0.21	平天	検出せず
クッキー1(アメリカ販売)	検出せず	チーズ入りクラッカー	0.75	ごぼう天	検出せず
チョコレート菓子	0.08	細切りチーズ	0.57	サウザンアイランド	0.41
クリーム菓子	0.19	クリームパン	0.6	コンソメ粉末(業務用)	0.12
ポテトチップス1	0.17	メロンパン	0.48	サラダ油	1.07
ポテトチップス2	0.13	食パン	検出せず		
シュークリーム	0.12	ヨーグルト	検出せず		
チョコレート菓子	0.2	シチュールー	1.16		
揚げ菓子	0.31	中華調味料	0.27		

既報告と比較しても、食材中に含まれるトランス脂肪酸量は、著明に減少しており、特にファーストフード・外食・菓子類に関してトランス脂肪酸量の減少が著しい。また、日本食品分析センターでの分析手法では、人工的なエライジン酸とウシの体内で産生されるバクセン酸の区別ができず、牛脂を含む食材ではトランス脂肪酸高値が認められた。上の表において、牛丼に関しては、ウシが体内にて産生するバクセン酸も含まれてしまうため、高値になっている可能性がある。

しかしながら、一部の牛肉を含まない菓子において、トランス脂肪酸濃度異常高値を認め、アメリカと同一ブランドのクッキーもアメリカ販売分ではトランス脂肪酸フリーも、日本発売分では、トランス脂肪酸が含まれている。

一方、当院給食使用食品でのトランス脂肪酸濃度は概して低値であった。そこで、心筋梗塞で入院患者が、必然的に栄養コントロールされた病院食を数日間以上摂取することになるため、入院中の頻回の採血検体において、トランス脂肪酸濃度を測定し、その増減を

検証した。



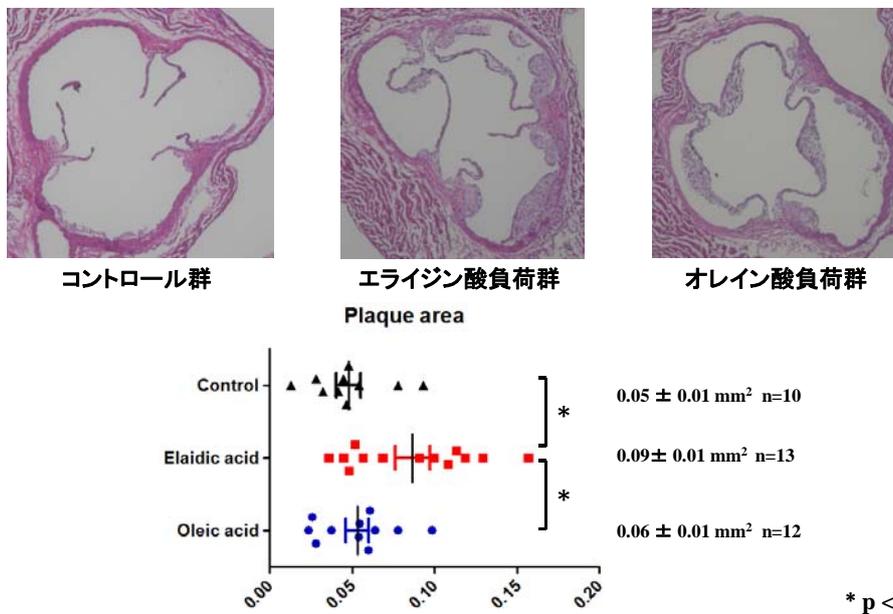
この表に示すように、心筋梗塞発症時には、高値であったエライジン酸濃度は、入院により半ば強制的に栄養管理された病院食を摂取することで、速やかに低下することが確認できた。

(2) 研究項目名 2: 小動物疾患モデルを用いたトランス脂肪酸負荷の影響の検討 (研究担当者名: 平田健一・神戸大学/篠原正和・神戸大学)

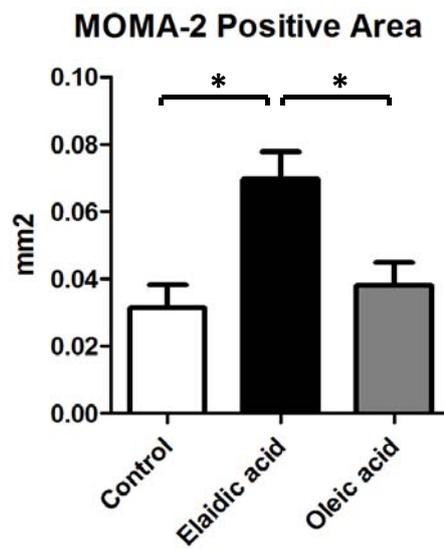
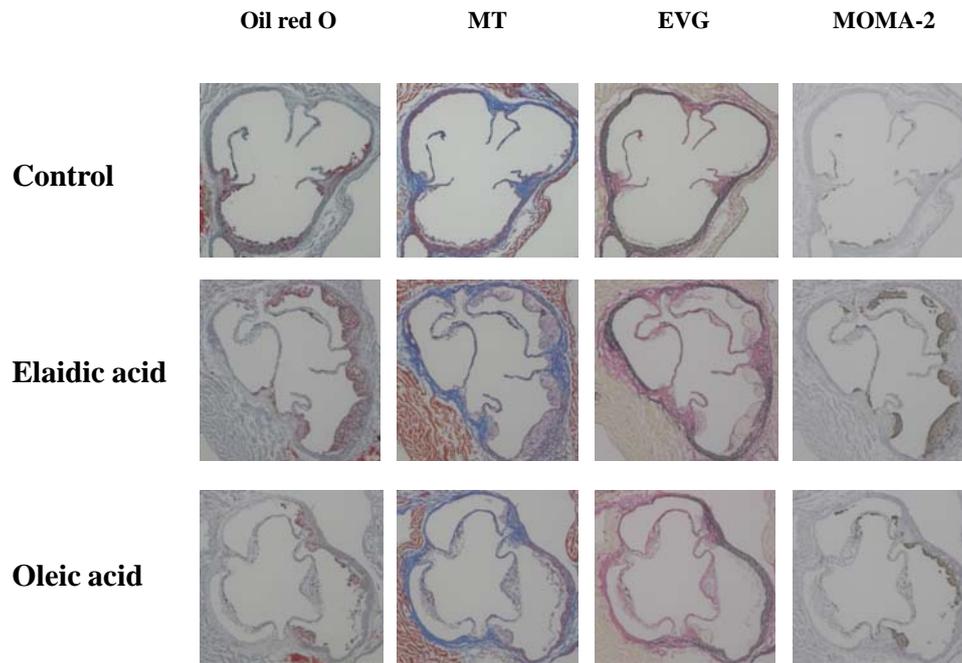
1) 個別課題名オ: 動脈硬化モデルマウスを用いたトランス脂肪酸負荷の影響の検討

動脈硬化モデルマウスとして広く使用されている低比重リポ蛋白受容体欠損マウス (LDLR-KOマウス、) オス個体を使用した。生後6週齢より8週間、0.5%のコレステロール負荷を実施して動脈硬化病変を作成した。この同期間に、エライジン酸負荷群では重量比5%のエライジン酸を、オレイン酸負荷群では重量比5%のオレイン酸を同時に負荷した。またコントロール群では脂肪酸の添加を行わなかった。

14週齢の時点での動脈硬化病変の定量的評価を、大動脈起始部を用いた組織学的手法にて実施した。エライジン酸負荷群で動脈硬化病変の統計学的有意な増悪が認められた。

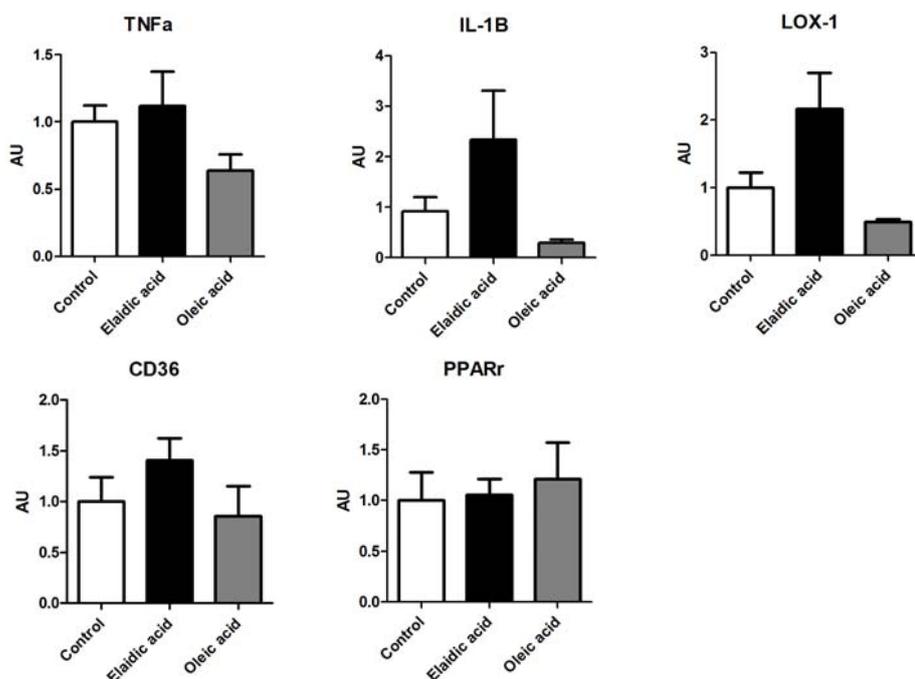


各種組織学的染色 (Oil red O染色、Masson trichrome染色、Elastica van gieson染色) 及び免疫学的染色 (MOMA-2染色) も施行したが、エライジン酸負荷群で動脈硬化病変に一致したマクロファージの集積亢進が確認された。



* p < 0.05

動脈硬化病変にマクロファージが関与している可能性が示されたことから、各群でマウスの腹腔内マクロファージを回収し、炎症性サイトカインや酸化LDL受容体蛋白のmRNA発現を検討した。計5種類の蛋白(TNF α , IL-1B, LOX-1, CD36, PPAR γ)のmRNA発現を測定した結果、3群間で統計学的有意差は認められなかったが、TNF α ・IL-1B・LOX-1・CD36の4種類はエライジン酸負荷群で高い傾向が認められた。



エライジン酸負荷に伴う肝臓組織の組織学的変化を検討したところ、脂肪酸負荷なし群(コントロール群)・エライジン酸負荷群・オレイン酸負荷群の3群間で明らかな組織学的変化は認められなかった。また、肝臓組織中の脂質含有量も測定したが、コレステロール値及びトリグリセリド値の値に有意な差は認められなかった。

**マウス肝臓
組織染色**

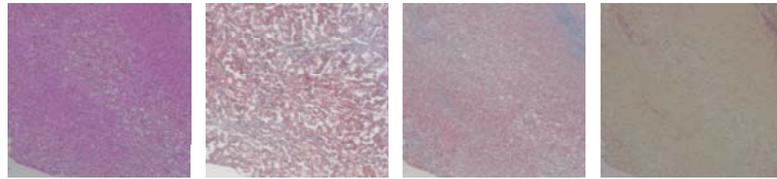
HE

Oil red O

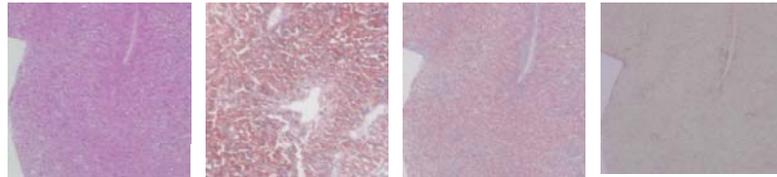
MT

EVG

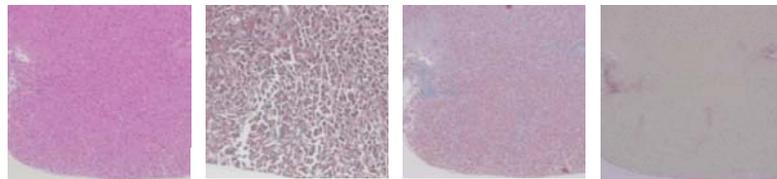
Control



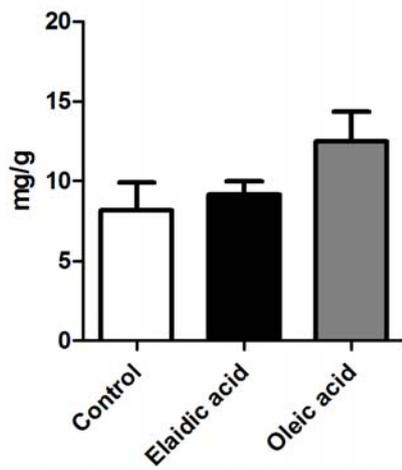
Elaidic acid



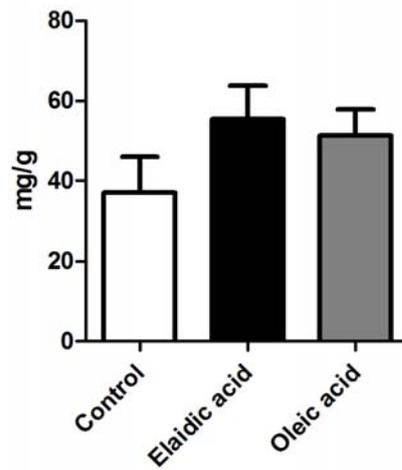
Oleic acid



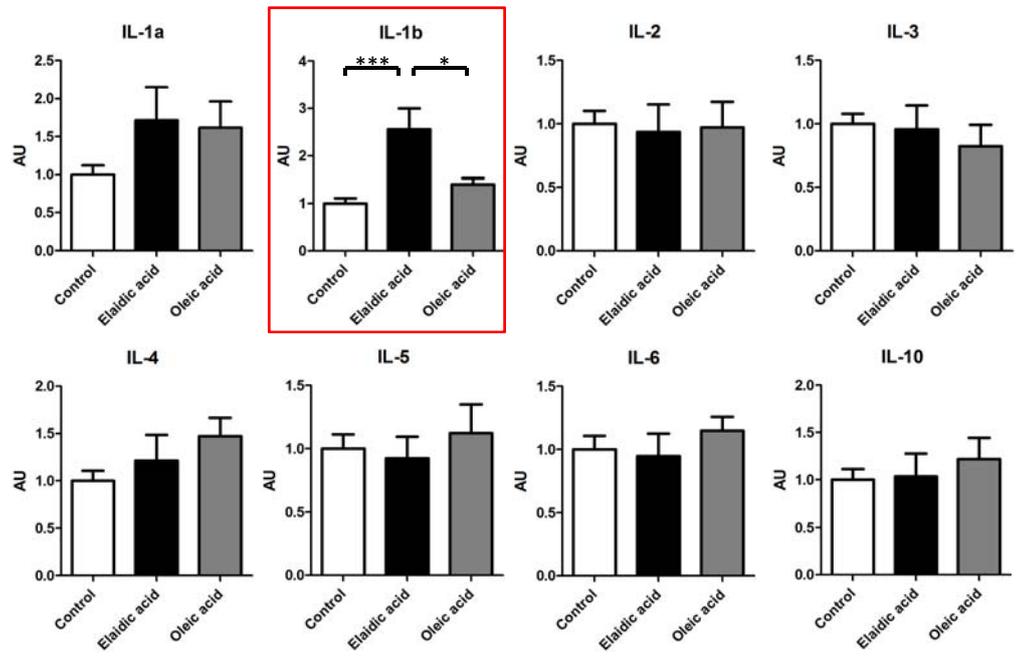
Cholesterol



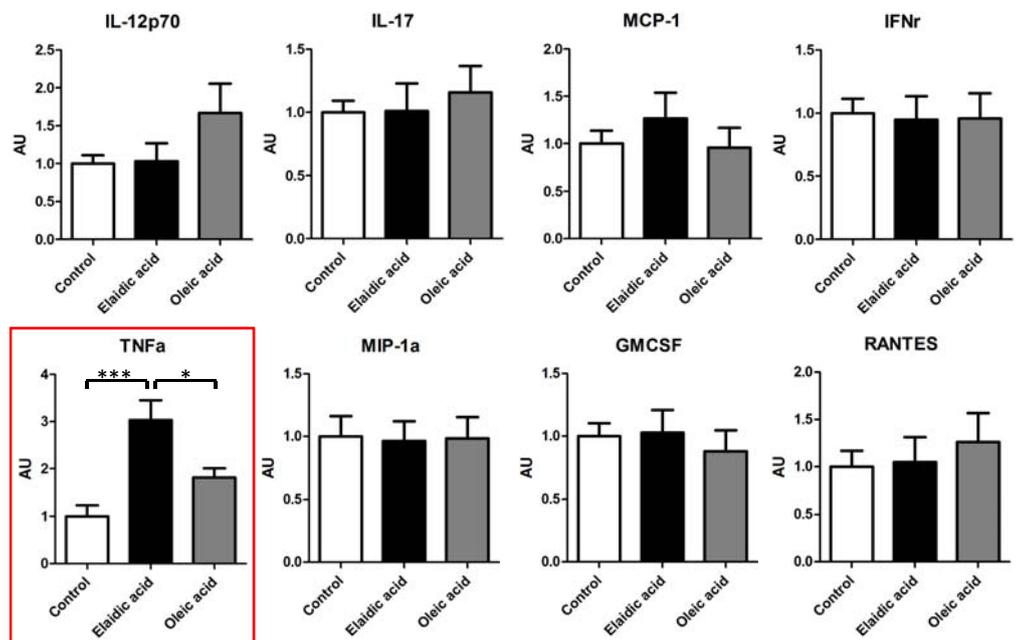
Triglyceride



血漿炎症性マーカーのサイトカインアレイを行った結果、16種類の炎症性サイトカインのうちTNF α 及びIL-1 β の2種類が、エライジン酸負荷群血漿で有意に高値を呈した。



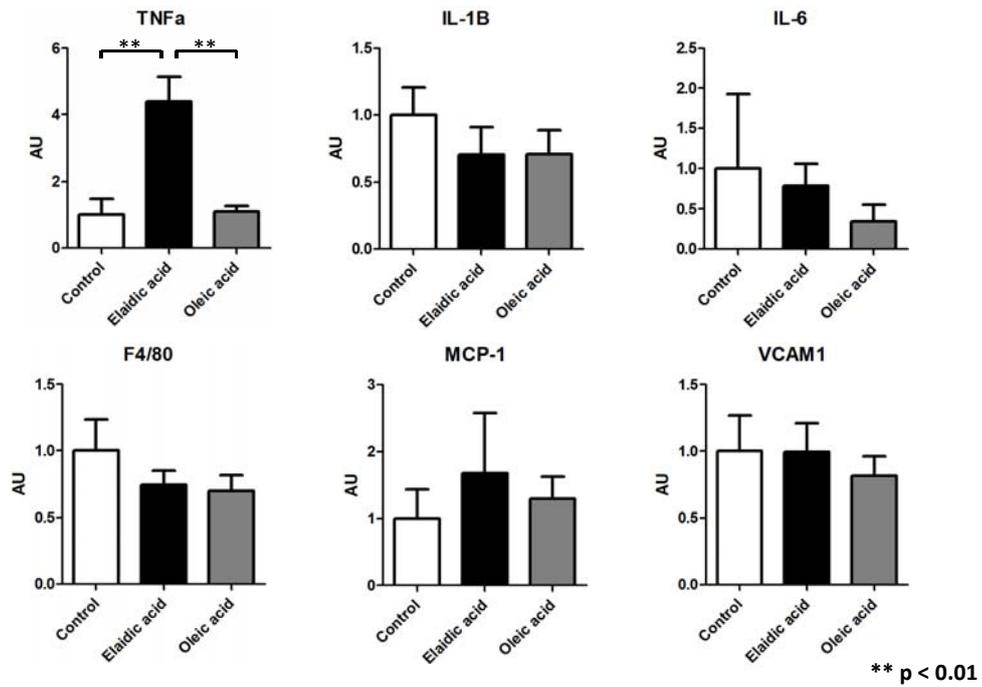
* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$



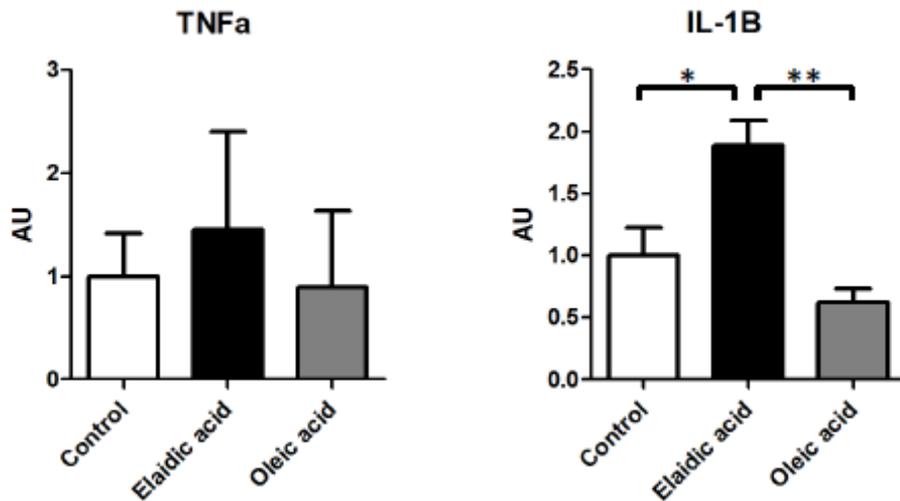
* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

また、肝臓及び大動脈組織ホモジネート中においてTNF α のmRNA発現が、内臓脂肪組織においてIL-1 β のmRNA発現が、エライジン酸負荷群で有意に亢進していた。これら血漿及び各組織における炎症性サイトカイン発現の亢進は、エライジン酸が動脈硬化病変を増悪させる機序のひとつとなりうるかもしれない。

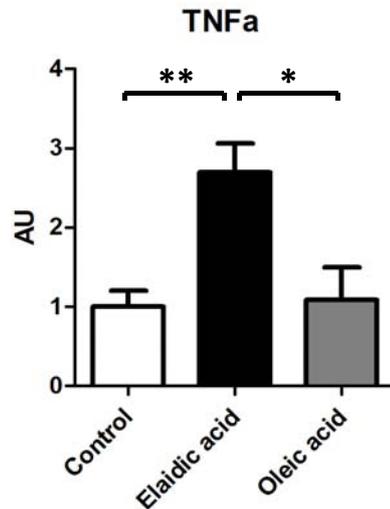
肝臓組織中の炎症性サイトカインmRNA発現



内臓脂肪組織中の炎症性サイトカインmRNA発現 *p < 0.05, **p < 0.01



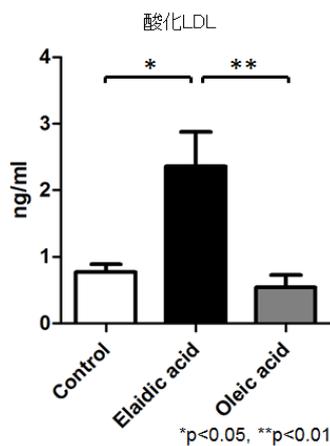
大動脈組織中の炎症性サイトカインmRNA発現



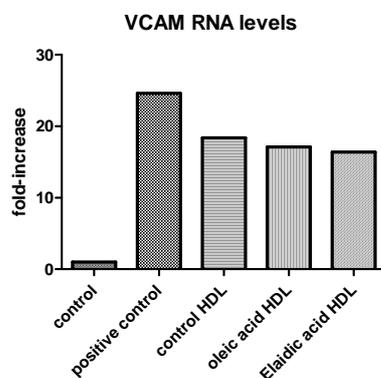
* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

さらに、エライジン酸負荷マウスにおけるリポ蛋白の質的解析を行った。低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) は、動脈硬化危険因子として認識されている。LDLは酸化修飾を受け(酸化LDL)、血管壁局所に貯まり動脈硬化を進展させる。エライジン酸に起因する動脈硬化進展にも、酸化LDL増加が関連していると予想し、血中濃度を調べた。エライジン酸負荷マウスにおいて有意に血中酸化LDL濃度の増加が認められた。ついで、動脈硬化の負の危険因子として認識されているHDLの抗動脈硬化作用について、検証した。



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$



エライジン酸負荷マウス、オレイン酸負荷マウス、脂肪酸負荷なしのコントロールマウスから、採血し、pooled plasmaから、超遠心法にてHDLを精製した。血管内皮細胞 (HUVEC) に炎症性サイトカイン $\text{TNF-}\alpha$ を刺激すると動脈硬化進展に重要な接着因子VCAMの発現が増加する。HDLは、このVCAM発現を弱め、抗動脈硬化作用を示すと報告されている。今回の我々の検討では、エライジン酸負荷マウス由来のHDLでもオレイン酸負荷やコントロールマウス由来HDLと同様にVCAM発現を抑えた。すなわち、エライジン酸負荷で、HDLの抗動脈硬化作用に悪影響は認められなかった。

野生型マウスに、2または4週間の脂肪酸負荷なしの通常食群、2%のエライジン酸食負荷群またはオレイン酸負荷食群、血栓形成に関しての検証を行った。この検証において、体重増加については、3群間で有意差は認めなかった。血清脂質解析では、通常食群と比較し、脂肪酸負荷群で中性脂肪値が有意に増加しており、オレイン酸投与群で顕著であった。コレステロール値に関しては、3群間で有意差は認められなかった。動脈硬化モデルLDL-R KOマウスと同様に、それぞれの脂肪酸負荷群において、血清中脂肪酸値は有意に増加しており、脂肪酸負荷が問題なく行えていることを確認し得た。

血栓形成の評価は、マウスの頸動脈にHe-Neレーザーを照射することで血栓形成を誘導し、この方法により作成される血栓は、作られては消失を繰り返すため継続的なビデオ撮影にて、10分間の血栓量を血栓のサイズと存在時間の乗にて測定した。結果は、オレイン酸負荷にては、血栓形成に影響は認められなかったが、エライジン酸負荷マウスにおいて有意に血栓形成が誘導された。

エライジン酸投与マウスでは、伝統的な凝固系測定因子であるプロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) は変化なく、唯一血栓形成に関連のあるD-dimerレベルのみ、増加を認めた。

ついで、エライジン酸の血栓形成における活性化機序を調べるために、マウス大動脈のmRNAを回収し、抗血栓因子、催血栓因子の発現レベルを検証した。エライジン酸投与マウスでは、抗血栓因子であるトロンボモジュリン、組織因子経路阻害因子の発現が低下しており、催血栓因子であるPAI-1や組織因子の発現は増強していた。この傾向は、ELISAによる血漿中蛋白解析においても確認できた。動脈硬化モデルマウス同様、エライジン酸負荷マウスにて、炎症性サイトカインであるTNF- α の遺伝子、蛋白レベルでの増加を

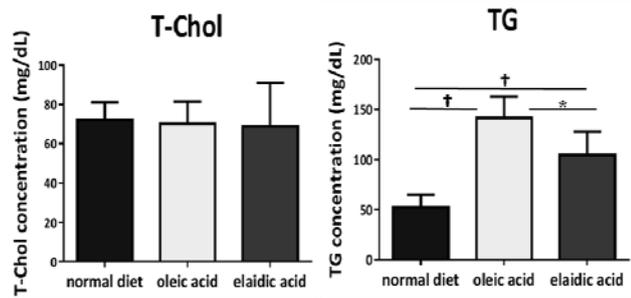


図4: 4週間oleic acid(オレイン酸)、elaidic acid (エライジン酸) 負荷後の血漿中総コレステロール (T-chol)、中性脂肪 (TG) 濃度を測定した。

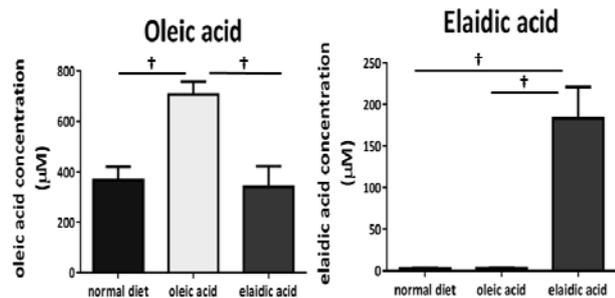


図5: 4週間oleic acid(オレイン酸)、elaidic acid (エライジン酸) 負荷後の血漿中各脂肪酸濃度の解析をGC-MSにて行った。

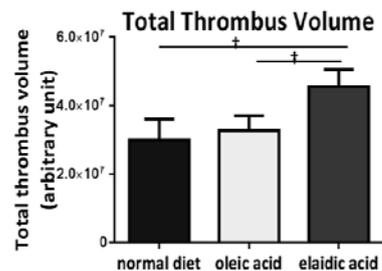


図6: 4週間oleic acid(オレイン酸)、elaidic acid (エライジン酸) 負荷のマウスに頸動脈切断後、He-Neレーザー照射にて血栓形成を惹起し、10分間に形成された血栓の量を示す。*p < 0.01

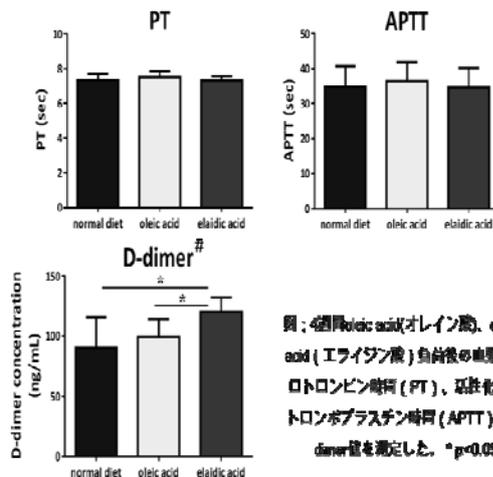
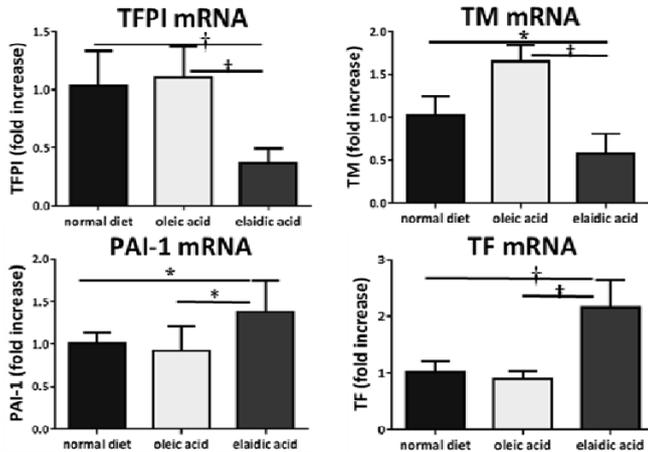


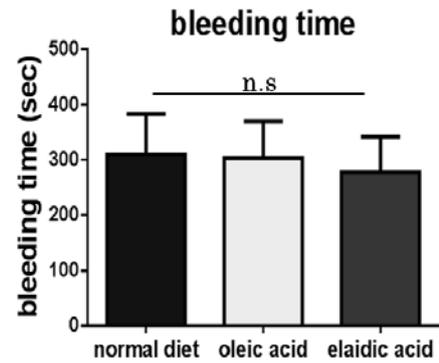
図7: 4週間oleic acid(オレイン酸)、elaidic acid (エライジン酸) 負荷後の血漿中プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、D-dimer量を測定した。*p < 0.05

認めた。



図：4週間oleic acid(オレイン酸)、elaidic acid(エライジン酸)負荷後マウスの大動脈からRNAを回収し、組織因子経路抑制因子(TFPI)、トロンボモデュリン(TM)、プラスミノゲン活性化抑制因子(PAI-1)、組織因子(TF)の遺伝子発現をReal-Time PCR法にて検証した。

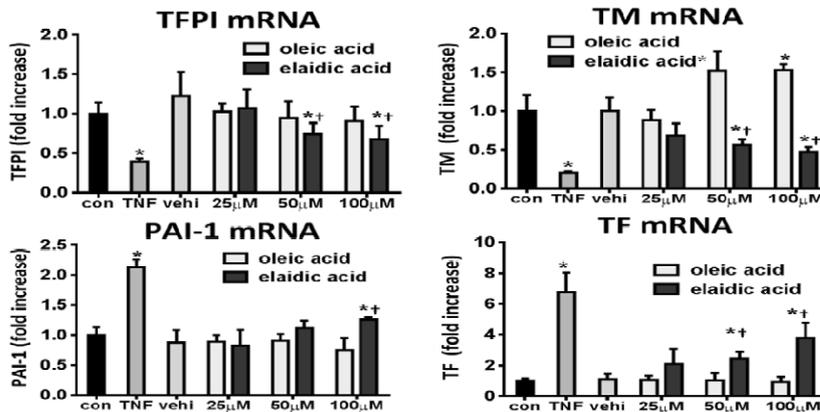
血栓形成の主役の一つである血小板機能におけるエライジン酸負荷の影響も検証した。マウスのしっぽを切断して行う出血時間の測定では、エライジン酸負荷の影響は認められなかった。大阪大学の輸血部との共同研究で行った血小板凝集能測定では、低濃度コラーゲン負荷においては、エライジン酸負荷による凝集能亢進が認められず、高濃度でのみ軽度亢進が認められた。血小板中のエライジン酸濃度の上昇は高度であるにもかかわらず、凝集能に与える影響は軽微であった。



図：4週間oleic acid(オレイン酸)、elaidic acid(エライジン酸)負荷後のマウスのしっぽを麻酔下で切断し、出血が止まるまでの時間(bleeding time)を測定した。

マウス大動脈解析において、血管内皮細胞由来の血栓関連因子の発現レベルの変動が認められたことから、細胞実験においても同様の結果が得られるかの確認のため、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)を用いて、エライジン酸の負荷実験を行った。in vivoでの検証と同様に、エライジン酸投与にてHUVECにおける抗血栓因子であるトロンボモジュリン、組織因子

経路阻害因子の発現が低下しており、催血栓因子であるPAI-1や組織因子の発現は増強していた。



図：血管内皮細胞(HUVEC)に各濃度の脂肪酸を24時間刺激し、各遺伝子の発現をReal-time PCR法で測定した。

考察及び結論

動脈硬化モデルマウス(LDL受容体欠損マウス)に脂肪酸負荷なし、5%オレイン

酸、エライジン酸それぞれを8週間負荷する群を設定することで、脂肪酸負荷なしコントロール群・オレイン酸負荷群・エライジン酸負荷群の3群を設定した。この3群間では体重・血圧・空腹時血糖値・リポ蛋白プロファイルには有意差を認めておらず、脂肪酸プロファイルの差異がそのまま観察可能な実験系となった。

動脈硬化病変の評価に関しては、エライジン酸負荷群において動脈硬化病変の統計学的有意な増悪が認められた。各種組織学的染色(Oil red O染色、Masson trichrome染色、Elastica van gieson染色)において、弾性線維や結合組織の有意な変化はみられなかったが、MOMA-2抗体を用いた免疫染色により、エライジン酸負荷群において動脈硬化病変に一致したマクロファージの集積亢進が認められた。マクロファージは貪食能を有する大型細胞で、通常は炎症局所に遊走してくることから、エライジン酸が動脈硬化病変を進展させた要因のひとつとして、炎症が惹起された可能性が示唆された。さらに、マウスの腹腔内マクロファージを回収し、5種類の蛋白(TNF α 、IL-1B、LOX-1、CD36、PPAR γ)のmRNA発現を測定した。3群間で統計学的有意な差は認められなかったが、TNF α ・IL-1B・LOX-1・CD36に関しては、エライジン酸負荷群で高い傾向が認められた。エライジン酸負荷によりマクロファージの性質が催動脈硬化的に変化する可能性については今後さらに検討していく余地がある。

また、エライジン酸負荷に伴い肝組織にエライジン酸が著明に蓄積されたことは前年度報告したが、今年度は組織学的変化についても検討した。Oil-red O染色・Masson trichrome染色・Elastica van gieson染色において、3群間で有意な変化は認められず、組織中のコレステロール及びトリグリセリド含量にも有意な差は認められなかった。組織中のトランス脂肪酸濃度が著明に増加していたにも関わらず、線維化や脂肪変性などの変化がみられなかったことは興味深い。

動脈硬化進展の機序解析の為、血漿炎症性マーカーのサイトカインアレイを行った。その結果、16種類の炎症性サイトカインのうちTNF α 及びIL-1 β の2種類が、エライジン酸負荷群血漿で有意に高値を呈した。また、肝臓及び大動脈組織ホモジネート中においてTNF α のmRNA発現が、内臓脂肪組織においてIL-1 β のmRNA発現が、エライジン酸負荷群で有意に亢進していた。これら血漿及び各組織における炎症性サイトカイン発現の亢進は、エライジン酸が動脈硬化病変を増悪させる機序のひとつとなりうるかもしれない。

野生型マウスに脂肪酸負荷なし、5%オレイン酸、エライジン酸それぞれを2または4週間負荷する群を設定することで、脂肪酸負荷なしコントロール群・オレイン酸負荷群・エライジン酸負荷群の3群を設定した。

血栓形成は、エライジン酸において有意に誘導され、トランス脂肪酸摂取が、急性心筋梗塞、肺血栓塞栓症、脳梗塞の発症原因となる血栓形成を誘導することを確認することができた。マウス大動脈の遺伝子解析、マウス血漿解析、血小板凝集能解析、さらにHUVECを用いた細胞実験結果から、エライジン酸の催血栓作用は、血小板機能異常ではなく、血管内皮による血栓形成制御機構の破綻であることが判明した。

(3) 研究全体の成果、考察及び結論

今回、我々の臨床研究において、循環器病棟入院、すなわち心血管病患者は健常人と比較して、血中トランス脂肪酸濃度は有意に高く、特に59歳以下の比較的若年層を対象

にした検討で、冠動脈疾患患者では薬剤投与にも関わらず、血中トランス脂肪酸濃度が有意に非冠動脈疾患患者と比較して高値であった。予備検討から、トランス脂肪酸摂取量と血清濃度が一致することが確認されており、冠動脈発症若年者において、トランス脂肪酸摂取が有意な危険因子となることが確認できた。実際、本邦において若年発症の冠動脈疾患は増加傾向にあり、その一因としてトランス脂肪酸摂取過多が潜在している可能性が示唆された。海外の国々において、食品ごとにトランス脂肪酸含有量が明記されており、自己の責任によって摂取量を減らすことが可能である。日本の現状は、今まで危険性が指摘されてきたフライドポテトやマーガリンのトランス脂肪酸含有量は企業努力により有意に低下傾向を認めている。しかし、我々の解析では、一部の菓子類において依然としてトランス脂肪酸含有量が多いものが存在していることが判明した。同じブランドであっても、米国発売品ではトランス脂肪酸フリーなものが、日本発売品では含まれているものもある。我々の研究成果や世界の潮流からも、トランス脂肪酸含有量明記を義務付ける必要が示唆された。また、トランス脂肪酸摂取が心血管病のリスクとなることは、多くの疫学研究から確認されているが、機序に関しては未だ不明であった。我々の基礎実験において、炎症を惹起することで、血管内皮や全身の臓器障害を引き起こし、動脈硬化の進展や急性冠症候群の主因である血栓形成を促すことが確認された。

今回の受託研究では、トランス脂肪酸のみに焦点を絞って研究を進めたが、他の脂肪酸、例えば飽和脂肪酸であるパルミチン酸も炎症、動脈硬化惹起性を有することが報告されている。トランス脂肪酸摂取制限が、パルミチン酸多量摂取に繋がっては、本末転倒となりかねない。食事アンケート結果から、統計学的有意差は認められなかったが、魚、野菜を多くとる群においてトランス脂肪酸が低い傾向を示し、外食が多い患者群では、高い傾向が認められた。急性心筋梗塞患者においては、来院時トランス脂肪酸濃度は高い傾向であったが、規則正しく栄養バランスに優れた病院食摂取において、改善傾向が認められた。これらの結果より、適切な食事、栄養指導によりトランス脂肪酸摂取量を減らすことが可能で、トランス脂肪酸に起因する動脈硬化予防が可能であることを証明できた。この栄養指導の資料のため、食品中のトランス脂肪酸含有量表示を義務づける必要がある。我々、医師のみではできることに限りがあるため、この研究結果を世間に広く公開し、栄養管理士、看護師といったコメディカルの教育や、患者、患者予備軍の意識改革にまで至ることができたなら、我々の研究は成功したといえるであろう。

Ⅲ 本研究を基に発表した論文等

1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

該当なし

2 本研究を基にした学会発表の実績

近藤健介、平田健一ら、 Excessive Intake of Trans-fatty acid Accelerates Thrombus Formation in vivo through Inhibiting Endothelial Anti-thrombogenic actions 第 77 回日本循環器学会学術集会 2013 年 3 月 15 日 横浜

森健太、平田健一ら、 Serum Trans Fatty Acid concentration is a Risk Factors for Coronary Artery Disease in Japan 第77回日本循環器学会学術集会 2013年3月17日 横浜

破磯川実、平田健一ら Trans Fatty Acids Promote Atherosclerotic Vascular Diseases by Modulating Serum Lipoprotein Quantity and Quality in Hyperlipidemic Mice and Humans 第77回日本循環器学会学術集会 2013年3月17日 横浜

3 特許及び特許出願の数と概要

該当なし

4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

日経メディカルオンライン(ホームページ)に、森健太、平田健一ら、 Serum Trans Fatty Acid concentration is a Risk Factors for Coronary Artery Disease in Japan 第77回日本循環器学会学術集会 2013年3月17日 横浜の発表についての記事が記載された。

IV 主任研究者による研究全体の自己評価

項目	評価結果	評価コメント
1 研究の妥当性	5	日本人において、心血管病は増加傾向にあり、その原因究明は緊急の課題である。
2 研究目標の達成度	4	日本人、特に最近心筋梗塞が増加している若年者層にトランス脂肪酸が高いことを証明でき、機序を基礎研究で詰めることができた。 食事アンケート解析で難渋し、より踏み込んだ解析ができなかったことが反省点である。
3 研究成果の有用性	5	我々の研究成果から、トランス脂肪酸濃度表示を義務づけるべき基本データを提示することができた。
合計	14	
総合コメント		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述する。