＜総説＞

ラットに対するカノーラ油および水素添加大豆油の有害作用と 油中の微量因子 —ジヒドロビタミンK 1様物質の関与の可能性—

大原直樹¹⁾、内藤由紀子²⁾、奥山治美¹⁾

¹⁾ 金城学院大学薬学部、²⁾ 国立循環器病研究センター研究所病態ゲノム医学部
〒463-8521 愛知県名古屋市守山区大森二丁目 1723

Tel: 052-798-0180, Fax: 052-798-0754, E-mail: oharan@kinjo-u.ac.jp

キーワード：カノーラ油、水素添加大豆油、有害効果、微量因子、ビタミンK

Adverse effects of dietary canola and hydrogenated soybean oil in the rat

Possible involvement of dihydrovitamin K1-like substance

Naoki Ohara¹⁾, Yukiko Naito²⁾, Harumi Okuyama¹⁾

¹⁾Kinjo Gakuin University, College of Pharmacy, ²⁾National Cerebral and Cardiovascular
Center Research Institute, Department of Genome Medicine

2-1723 Omori, Moriyamaku, Nagoya, Aichi 463-8521, Japan

Summary

Since the survival-shortening activity of some vegetable oils, including canola and hydrogenated soybean oil, was reported in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP), several studies have been carried out to identify the causatives, but without success. We evaluated changes in pathophysiological parameters in several strains of rats caused by canola and/or hydrogenated soybean oil to help identify the causatives. No single target organ was found for canola oil, but several changes were observed in the parameters. That is, a diet containing 10% canola oil, which shortens the life of SHRSP and similar survival-shortening

is also caused by hydrogenated soybean oil, increased blood pressure; decreased platelet counts; enhanced blood coagulation; increased hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, with an elevation of plasma lipids; altered Na^+ , K^+ -ATPase activities; decreased antioxidant enzyme activities; and increased plasma aldosterone levels, with a decrease in plasma and/or testicular testosterone levels in several strains of rats. Moreover, histochemical examinations revealed increased expression of cyclooxygenase 2 in macula densa cells in the kidney. In this review, the physiological and pathological changes are summarized in relation to canola oil-induced exacerbation of the hypertension-related conditions in SHR and SHRSP. In addition, possible involvement of dihydro-vitamin K1-like substance is discussed in relation to the observed changes.

Key words : canola oil、adverse effect、unidentified factors、vitamin K

1. はじめに (背景)

カノーラ油をはじめとするいくつかの植物油と水素添加大豆油の摂取によって脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の生存日数が短縮する。(以下の記載を含め、大豆油を対照としている。国内のマウス・ラット用標準飼料に配合される植物油は大豆油である)。これを報じた奥山らの研究結果^{1, 2)}を追認するため、財団法人食品薬品安全センター秦野研究所で厚生科学研究費による実験を始めたのは1994年であった。この仕事は1998年まで続き、その間、特にカノーラ油に関しては当時「奥山問題」と呼ばれたこの報告にどのように対応するかが、二度にわたり開催された日加合同「なたね油の栄養問題の検討会」(奥山教授はメンバーでなかった)で話し合われた。そこで市場から撤退した場合の経済的損失の試算などが(その必要はないとしながらも)話題になったことは、なたね油の有害性への懸念が常にどこかにあったのではないかと疑わせる。なたね粕の毒性については、1975年に峯苔ら³⁾による、ニワトリにおける詳細な研究報告がある。そこには、かねてから有害性が認められていた抗甲状腺物質(oxazolidine-2-thioneやisothiocyanate)含量の異なるなたね粕により、これ

らの物質の含量には関連なく肝臓の異常出血と死亡が高頻度で認められたことが報じられている。この研究の続報は公表されなかった模様だが、その後 SHRSP の寿命短縮効果が確認されたことで食用油中の微量有害因子の探索が始まった。この研究は、SHRSP の寿命を指標に n-3 脂肪酸摂取の有用性が示される中で、比較的 n-3 脂肪酸含量が高いカノーラ油摂取による寿命短縮が認められたことが発端であった。

原因物質として脂肪酸以外の微量因子が疑われたが、一方で 2000 年には、この寿命短縮作用がステロール代謝の異常な SHRSP に植物ステロールの多い油脂を摂取させたことで起こる特殊な事例であるという報告⁴⁻⁶⁾ が出て、原因究明は済んだかに受け止められた。カノーラ油を摂取した SHRSP では赤血球膜に取り込まれた植物ステロールが、種類、量ともに食餌中のそれをよく反映することと、低張液中におけるこの赤血球の浸透圧耐性低下がコレステロール添加飼料の摂取によって改善すること⁷⁾ から、植物ステロールの影響を全く否定はしないが、リパーゼ処理によって短命化効果が消失したこと²⁾、カノーラ油に比べ遥かに植物ステロール含量の低いオリーブ油摂取によってもカノーラ油と同等の短命化が認められたこと⁴⁾、油中植物ステロール含量と短命化には相関が認められない^{8, 9)} ことから、脂肪酸組成や植物ステロールとは関係のない何らかの微量因子の存在が疑われる。

本稿では、これまでに得られているラットにおけるカノーラ油摂取の有害効果のうち、われわれが得た結果を中心に概略を紹介する。カノーラ油を含め、短命化をもたらす油脂の安全性評価の際に参考になると思う。また、植物油の水素添加の際に生成する 2', 3'ジヒドロビタミン K 1 様物質が有害因子として関与する可能性について触れる。

2. カノーラ油摂取により SHRSP で認められる有害効果

品種改良により心毒性のあるエルシン酸や甲状腺毒性のあるグルコシノレートをほとんど含まないカノーラ油の摂取で認められた SHRSP の短命化の原因は不明のままである。一方、この短命化の原因は SHRSP の体内ステロール動態の特殊

性と油中植物ステロール量との関係にあるとする一部の研究報告に基づき、日常の食生活における摂取では危惧に値しないとする考え方もあることは先に触れた。種差、系統差については、確かに、SHRSP およびその由来系統である高血圧自然発症ラット (SHR) や Wistar-Kyoto (WKY) ラットで共通に認められる血液中脂質の有意な上昇や血小板数の減少が、他系統のラットでは明らかではないこと (Wistar ラットにおける 10 週間摂取および Fisher ラットにおける 26 週間摂取での知見)、老化促進マウスでは寿命短縮が認められないこと¹¹⁾ が確認されている。しかし、生存日数との関連は明らかでないまでも、Fisher ラットにおける血中脂質の上昇傾向、Wistar ラットにおけるアルドステロンレベルの上昇などは、SHRSP、SHR および WKY ラットと共通の所見であり、これらの原因を解明しておくことは、安全性評価の上で重要である。

これまでにわれわれが得ている、ラットにおけるカノーラ油摂取による有害効果の主なものを Table 1 に示す。血圧への影響は認められなかったとする報告¹⁾ もあるが、WKY ラット、SHR および SHRSP において、カノーラ油摂取による昇圧が食塩負荷の有無にかかわらず認められ、同時に心臓相対重量の増大¹¹⁻¹³⁾ が認められた。SHRSP ではカノーラ油摂取によって胸部大動脈の K^+ -free 収縮が増大し、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性が上昇した¹³⁾。肝臓における DNA マイクロアレイ解析で TASK3 K-channel の発現が大豆油摂取動物に比べ 30 倍の高値を示したことから、カノーラ油摂取による膜の電解質透過性の変化が推察される。また、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性には用量依存的な低下が認められる場合があり、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性抑制による血管収縮が昇圧に関わる可能性も除外できない。これらの変動については、内因性ウアバインの関与を疑ったが、LC-MS/MS による測定では、SHRSP 血漿中の内因性ウアバインレベルは測定限界以下であった。上述の血漿中アルドステロンレベルの上昇も循環血液量の増大による昇圧につながる可能性がある。また、血中脂質レベルの上昇とともに認められた肝臓におけるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) 活性の上昇は、NADPH 供給の増大による脂肪合成の亢進と酸化ストレスの増大を介して血管傷害を増悪する可能性があり、血小板数の減少は、血管傷害による末梢での出血もしくは血栓形成亢進を反映しているのかもしれない。

ラットで観察されたカノーラ油摂取による異常所見

昇圧 → 心肥大	
Na ⁺ , K ⁺ -ATPase活性の変動	
血小板数の減少	WKYrat, SHR, SHRSP
血液凝固時間の短縮	
血中脂質(コレステロール、TG、リン脂質)の上昇	
肝G6PD活性の上昇	
肝、赤血球 SOD、catalase活性の低下	WKYrat, SHR
尿中8-isoprostane、8-OHdGの上昇	SHRSP, Fisher rat
インスリン感受性の低下	SHRSP
腎血管傷害と血漿中アルドステロンレベルの上昇	Wistar rat, SHRSP
精巣、血漿中テストステロンレベルの低下	SHRSP

Table 1. カノーラ油摂取によって、ラットで認められた有害効果

3. G6PD 活性上昇と脂質合成促進、酸化ストレス増大とインスリン抵抗性

10w/w%のカノーラ油添加飼料で26週間飼育したSHRおよび同飼料で13週間飼育したWKYラットでは肝臓のG6PD活性が有意に上昇し^{14, 15)}、同飼料で8週間飼育したSHRSPにおいても同様の影響が確認された。G6PDはペントースリン酸回路の律速酵素でNADPHの主たる供給源であり、肝臓における脂肪合成にかかわる酵素の一つであるが、カノーラ油摂取によるG6PD活性の有意な上昇と血漿中トリグリセリド、コレステロールおよびリン脂質レベルの上昇^{11, 12)}は、既に血管傷害を生じている加齢SHRSPにおいては、その傷害に促進的に関与する可能性がある。しかしながら、血漿中脂質レベルはSHRおよびSHRSPにおいてはもともと低く、血脂レベルの上昇と血管傷害の関連については今後検討が必要である。

G6PD による NADPH の供給は、血管内皮細胞等における一酸化窒素合成酵素 (NOS) による NO 生成において電子供与体の役割をし、血管においては一酸化窒素が抗動脈硬化的に働くが、一方、スーパーオキシドと反応することで生じるパーオキシナイトライト (ONOO^-) は血管を傷害する。また、高血圧症が進展した加齢 SHR や SHRSP においては、NADPH オキシダーゼ活性化、NOS のアンカップリングが生じ、カノーラ油摂取による G6PD 活性増大がスーパーオキシドや ONOO^- の産生を促進し、酸化ストレスの増大により病態を悪化させ寿命を短縮する可能性がある。

G6PD は脂質代謝とインスリン耐性の間の調節障害に深く関わっており、肥満や糖尿病モデルマウスでは脂肪細胞において G6PD が過剰発現し、インスリン依存性のグルコース取り込みが抑制される¹⁶⁾。先に触れた 10w/w% のカノーラ油添加飼料を 8 週間与えた SHRSP では、血漿中および精巣中テストステロンレベルの低下と血漿中アルドステロンレベルの上昇とともに、肝臓の G6PD 活性の上昇が認められた。この動物では、血漿脂肪 (トリグリセリド、コレステロール、リン脂質) の上昇、血圧の上昇とともに、糖負荷実験においてインスリン感受性の低下が認められた (Figure 1)。ジヒドロエピアンドロステロンは G6PD の内因性非競合的阻害物質であるが¹⁷⁾、テストステロンの低下に伴い、精巣のジヒドロエピアンドロステロンには低下傾向が認められた。したがって、少なくとも雄 SHRSP においては、カノーラ油摂取による性ホルモン産生の低下が、これまでに観察された病態悪化の促進と関連している可能性が高い。

SHR ではカノーラ油摂取によって肝臓の G6PD 活性上昇とともにスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) およびカタラーゼの活性低下が認められた¹⁴⁾。カノーラ油摂取が抗酸化酵素活性を直接阻害する可能性、過大に生成した活性酸素の影響などが推測されるが、機序は不明である。酸化ストレスが増していると考えられる加齢 SHR や SHRSP において、カノーラ油摂取による抗酸化酵素の活性低下は、血管傷害の促進につながる可能性がある。実際、内藤らによると、カノーラ油添加飼料を 6 週間与えた SHRSP および WKY ではリン脂質酸化の指標である尿中 8-isoprostane の有意な上昇が認められた。

Fig.1. Changes in plasma insulin and glucose levels after oral glucose administration in SHRSP fed on diet containing soybean oil or canola oil. Male SHRSP given AIN-93 diet containing 10 w/w% soybean oil or 10w/w% canola oil as the sole dietary fat for 8 weeks were administered with 3 g/kg glucose, and time courses of plasma insulin level (upper panel) and glucose level (lower panel) were monitored. $p < 0.05$, significantly different from the values at corresponding time points in the animals given soybean oil. N=10.

4. ジヒドロビタミンK 1 様物質の原因物質としての可能性

カノーラ油摂取によって認められる SHRSP の血小板数の減少は、骨髄における巨核球の減少と脾臓における髄外造血が認められたことから、腎臓および肝臓機能障害を介した毒性が疑われる。しかし、SHRSP における骨髄像および脾臓の病理組織学的観察では異常が認められないこともあり、これはカノーラ油摂取によって血小板数の減少が認められた SHR おとび WKY ラットにおいても共通している。カノーラ油の骨髄作用は今後検討する必要がある。血小板数の減少が骨髄作用によらないとすれば、末梢血管における出血または血栓形成による消費などが疑われ、これらは SHRSP の脳卒中による死亡促進にかかわる変化であるが、ここで興味深いのは、ビタミンKとの関連である。植物油の水素添加の過程では、本来植物油に含まれるビタミンK 1 の側鎖にも水素添加が起これ、2', 3'ジヒドロビタミンK 1 が生成する可能性がある。ジヒドロビタミンK 1 様物質が SHRSP の生存日数短縮の原因物質の一つであろうことは、奥山らによって予測されていた¹⁸⁾。ジヒドロビタミンK 1 は体内でビタミンK 2 に変換されず、ビタミンK作用を阻害する¹⁹⁾。

ジヒドロビタミンK 1 によってビタミンK作用が阻害されると、血液凝固の阻害によって出血傾向が促進される一方、マトリックス Gla タンパク質による血管石灰化の抑制が妨げられ、動脈硬化を促進する可能性がある。また、逆にビタミンK依存性のプロテインCおよびその補酵素のプロテインSの活性が低下することは、血管内血液凝固の促進を意味する。実際、SHRSP で血液凝固時間の短縮が認められている⁷⁾。したがって、血小板数低下が出血あるいは血栓形成のいずれに起因するにせよ、ビタミンKの活性抑制はその原因となり得る。水素添加大豆油およびカノーラ油が同じように SHRSP の生存日数を短縮したことから、有害微量因子としてジヒドロビタミンK 1 の様なビタミンK活性抑制物質の関与も疑われる。

5. テストステロンおよびアルドステロンレベルの変化とビタミンK

カノーラ油摂取によって SHRSP の血漿中および精巣中テストステロンレベルが低下することが Okuyama ら²⁰⁾によって報告されている。一方、ビタミンK欠乏がラットにおいて、コレステロール側鎖切断酵素発現を阻害することによりコレステロールの産生律速段階を抑えてテストステロン生成を阻害することが報告されている²¹⁾。さらに、Kau ら²²⁾は、SD ラット副腎球状層細胞において、テストステロンがミトコンドリアの steroidogenic acute regulatory protein (StAR) およびアルドステロン合成酵素を阻害することによってアルドステロン産生が抑制されることを報告している。われ

Fig.2. Plasma levels of aldosterone and testosterone, and testicular testosterone in SHRSP given diet containing soybean oil or canola oil. Plasma and testicular tissue samples were obtained from male SHRSP given AIN-93 diet containing 10w/w% soybean oil or 10w/w% canola oil as the sole dietary fat for 8 weeks. Aldosterone and testosterone concentrations were determined by LC-MS/MS. * $p < 0.05$, significantly different from the values in the soybean oil group. N=10.

われは10w/w%のカノーラ油を添加した無脂肪AIN-93 飼料を8~10 週間摂取させたWistar ラットおよびSHRSPにおいて血漿中アルドステロンレベルの上昇を認め、さらに、SHRSP ではこの血中アルドステロンレベルの上昇がテストステロンの低下と平行して起こることを見出した (Figure 2)。アルドステロンレベルの上昇は血圧上昇、血管傷害と深く関わり、特に SHRSP においてカノーラ油摂取で認められた遺伝的病態 (高血圧、血管傷害等) の悪化促進と関連することが示唆される。あくまでも推定ではあるが、カノーラ油摂取による SHRSP の病態悪化の背景には、ジヒドロビタミンK 1のようなビタミンK作用阻害物質の関与を含め、Figure 3のような機序が考えられる。

アルドステロンは古典的な体液量増大の機序によって昇圧を招くほか、血管においても産生される局所のアルドステロン²³⁾ がミネラルコルチコイド受容体を介して血管の炎症を引き起こすことが知られている²⁴⁾。このアルドステロンの局所作用により内皮依存性血管弛緩反応は低下するので²⁵⁾、カノーラ油を長期摂取した SHR の血管においてアセチルコリンによる内皮依存性弛緩に影響が認められなかったこと¹¹⁾ を考えると、カノーラ油摂取による血圧上昇には古典的なアルドステロン作用が関与している可能性がある。しかし、腎臓、心臓において顕著に認められた血管傷害との関連は不明である。今後はカノーラ油摂取が血管におけるアルドステロン生成に及ぼす影響も検討する必要がある。さらに、カノーラ油を摂取した SHR では、腎緻密斑の COX2 発現が亢進していることが免疫化学染色によって認められたが¹⁴⁾、これはプロスタグランジン産生を介したレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の活性化につながる変化と考えられ、昇圧や血管傷害の一因である可能性がある。カノーラ油摂取 SHRSP ではアンジオテンシン II に対する血管反応性に変化が認められなかったこと¹³⁾ と肺および腎組織における ACE 活性には変化を認めなかったことから、アンジオテンシン II 受容体を介した血管傷害作用についての検討はしていないが、今後、血管におけるアンジオテンシン II 受容体を介したアルドステロン産生や、局所におけるアンジオテンシンとアルドステロンの相互作用への影響についても検討する必要がある。

SHRSP の生存日数短縮の背景機序

Fig.3. SHRSP の短命化に関わる機序の推定：ビタミンK作用の阻害と性ホルモンのアルドステロン調節への影響。

6. おわりに

ラットを用いたこれまでの毒性学的検討では、カノーラ油摂取による有害効果の標的器官は明確ではなく、SHRSP の短命化は、その遺伝的背景病態（高血圧、血管傷害など）の増悪促進で起こることがわかっている²⁶⁾。カノーラ油を摂取した SHRSP で認められた、血漿中アルドステロンレベルの上昇と昇圧、肝臓の G6PD 活性上昇と血漿脂質の上昇に伴うインスリン感受性の低下、酸化ストレスの増大はいずれも SHRSP の病態悪化を促進すると考えられる。アルドステロンレベルと逆相関したテストステロンレベルの調節にビタミン K 作用の阻害が関与しているとすれば、今後、有害効果をビタミン K 作用あるいはジヒドロビタミン K 1 の様な物質によるビタミン K 阻害作用との関連で調べることで、毒性作用機序の解明が進み、原因物質の同定につながることを期待される。

カノーラ油についてはある程度の毒性データが得られているが、カノーラ油同様に SHRSP を短命化するオリーブ油、水素添加大豆油およびコーン油等ではカノーラ油ほど詳細な毒性学的検討がなされていない。今後はこれらの油でもカノーラ油同様の有害効果が認められるか否かを検討する必要がある。また、カノーラ油摂取の有害効果は、主に雄動物で検討されたが、テストステロンレベルの関連を示唆する結果が得られていることから、今後は、作用の性差を比較することが必要である。さらに系統差、種差の検討も必要であるが、現在、ミニブタを用いた研究が進行中であり、有害効果の原因・機序解明に新たな知見が得られることを期待している。

参考文献

1. Huang M-Z, Naito Y, Watanabe S, Kobayashi T, Kanai H, Nagai H and Okuyama H. Biol Pharm Bull, 19: 554-557, 1996.
2. Miyazaki M, Huang M-Z, Takemura N, Watanabe S and Okuyama H. Lipids, 33: 655-661, 1998.

3. 峯苔稔三, 黒田修平, 日浅文男, 檜橋綱雄, 伊藤隆, 赤山照也. 全農飼料畜産中央研究所報, 3: 37-96, 1975.
4. Ratnayake, W M N, L' Abbé MR, Mueller R, Hayward S, Plouffe L, Hollywood R and Trick K. J Nutr, 130: 1166-1178, 2000.
5. Ogawa H, Yamamoto K, Kamisako T and Meguro T. Clin Exp Pharmacol Physiol, 30: 919-924, 2003.
6. Ikeda I, Nakagiri H, Sugano M, Ohara S, Hamada T, Nonaka M and Imaizumi K. Metabolism, 50: 1361-1368, 2001.
7. Naito Y, Konishi, C and Ohara N. Toxicology Letters, 117: 209-215, 2000.
8. Tatematsu K, Fuma SY, Nagase T, Ichikawa Y and Okuyama H. Food and Chem Toxicol, 42: 1443-1451, 2004.
9. Ohara N, Naito Y, Nagata T, Tatematsu K, Fuma S-Y, Tachibana S and Okuyama H. Food and Chem Toxicol, 44: 952-963, 2006.
10. Iwata T, Nakajima S, Yagi T, Yokomizo K, Momiyama K, Sagi N, Ito T, Maeda S and Hamashima M. J Oleo Sci, 54: 89-94, 2004.
11. Naito Y, Yoshida H, Nagata T, Tanaka A, Ono H and Ohara N. Toxicology, 146:197-208, 2000.
12. Naito Y, Kasama K, Yoshida H and Ohara N. Food and Chem Toxicology, 38:811-816, 2000.
13. Naito Y, Konishi C, Katsumura H and Ohara N. Pharmacology and Toxicology, 87:144-148, 2000.
14. Ohara N, Kasama K, Naito Y, Nagata T, Saito Y, Kuwagata M and Okuyama H. Food Chem Toxicol, 46: 2573-2579, 2008.
15. Ohara N, Naito Y, Kasama K, Shindo T, Yoshida H, Nagata T and Okuyama H. Food Chem Toxicol, 47: 157-162, 2009.
16. Park J, Rho H K. Kim K H, Choe S S, Lee Y S and Kim J B. Mol Cell Biol, 25: 5146-5157, 2005.
17. Schwartz A G and Pashko L L. Ageing Res Rev, 3: 171-187, 2004.

18. 奥山治美, 國枝英子, 市川裕子. 油の正しい選び方・摂り方, pp.112-129, 健康双書, 農文協, 2008.
19. Booth SL, Lichtenstein A H, O' Brien-Morse M, Mckeown N M, Wood R J, Saltzman E and Gundberg C M. *Am J Clin Nutr*, 74: 783-790, 2001.
20. Okuyama H, Ohara N, Tatematsu K, Fuma S, Nonogaki T, Yamada K, Ichikawa Y, Miyazawa D, Yasui Y and Honma S. *J Toxicol Sci*, 35: 743-747, 2010.
21. Shirakawa H, Ohsaki Y, Minegishi Y, Takumi N, Ohinata K, Furukawa Y, Mizutani T and Komai M. *Biochim Biophys Acta*, 1760: 1482-1488, 2006.
22. Kau M-M, Lo M-J, Wang S-W, Tsai S-C, Chen J-J, Chiao Y-C, Yeh J-Y, Lin H, Shum, A Y-C, Fang V S, Ho L-T and Wang P S. *Metabolism*, 48: 108-1114, 1999.
23. Takeda Y. *Mol Cell Endocrinol*, 217: 75-79, 2004.
24. Rocha R, Rudolph A E, Friedrich G E, Nachowiak D A, Kekec B K, Blomme E A, McMahon E G and Delyani J A. *Am J Physiol*, 283: H1802-H1810, 2002.
25. 長田太助, 平田恭信. *YAKUGAKU ZASSHI*, 127: 1339-1346, 2007.
26. Naito Y, Nagata T, Takano Y, Nagatsu T and Ohara N. *Toxicology*, 187: 205-216, 2003.