

図 3 Canola 油、同 180bar 分画、同 350bar 分画、同残渣、大豆油を 10w/w%含有する飼料または対照飼料 (CE-2) を 42 日間与えた SHRSP から得た赤血球の浸透圧脆弱性

系列希釈したリン酸緩衝生理食塩液と溶血率変化が直線関係になる、0.60 および 0.65%における溶血率

N=5、詳細は本文参照。

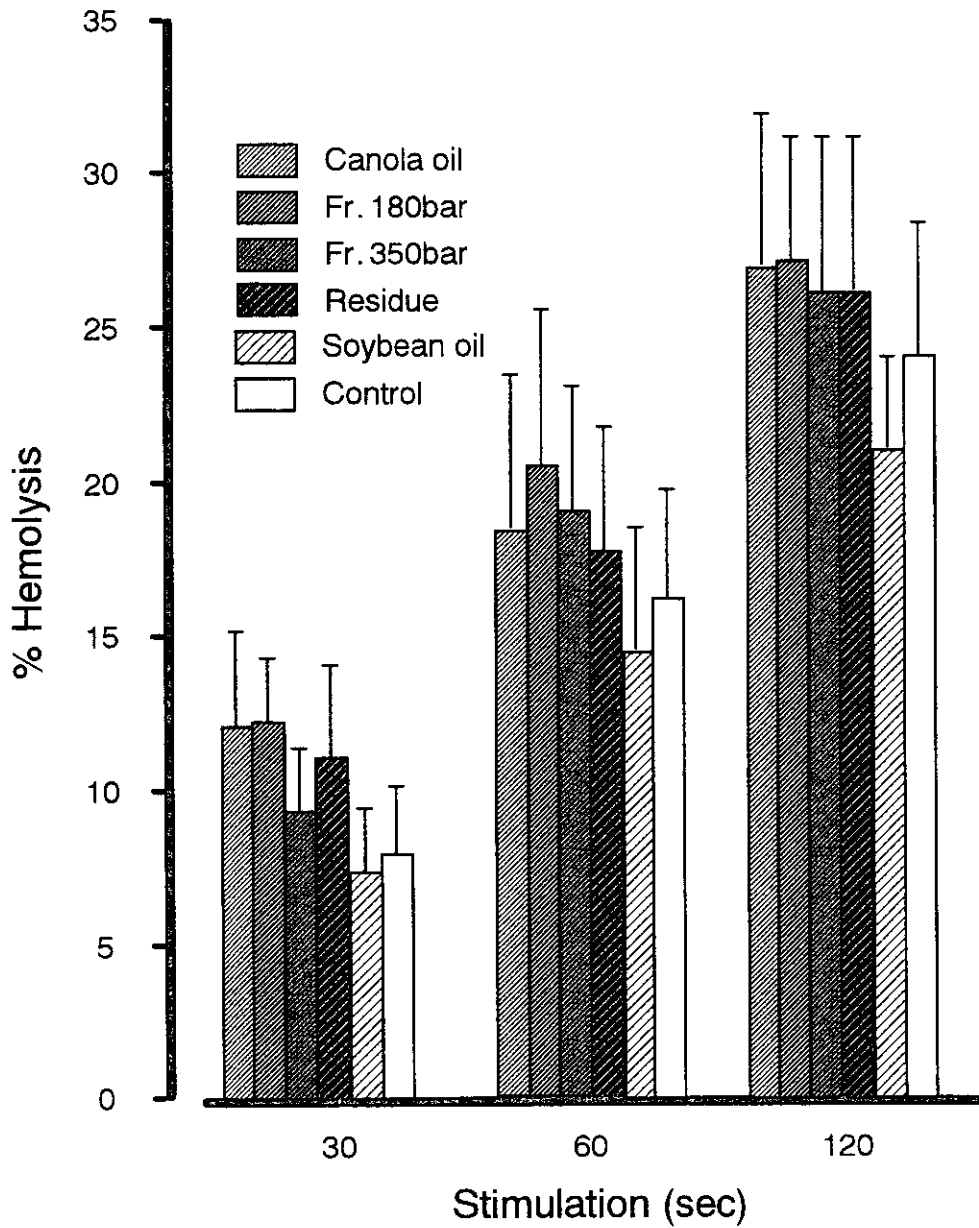


図 4 Canola 油、同 180bar 分画、同 350bar 分画、同残渣、大豆油を 10w/w%含有する飼料または対照飼料 (CE-2) を 42 日間与えた SHRSP から得た赤血球の機械的刺激による溶血
 機械的刺激の持続時間と溶血率変化が直線関係になる、30、60 および 120 秒間刺激における溶血率
 N=5、詳細は本文参照。

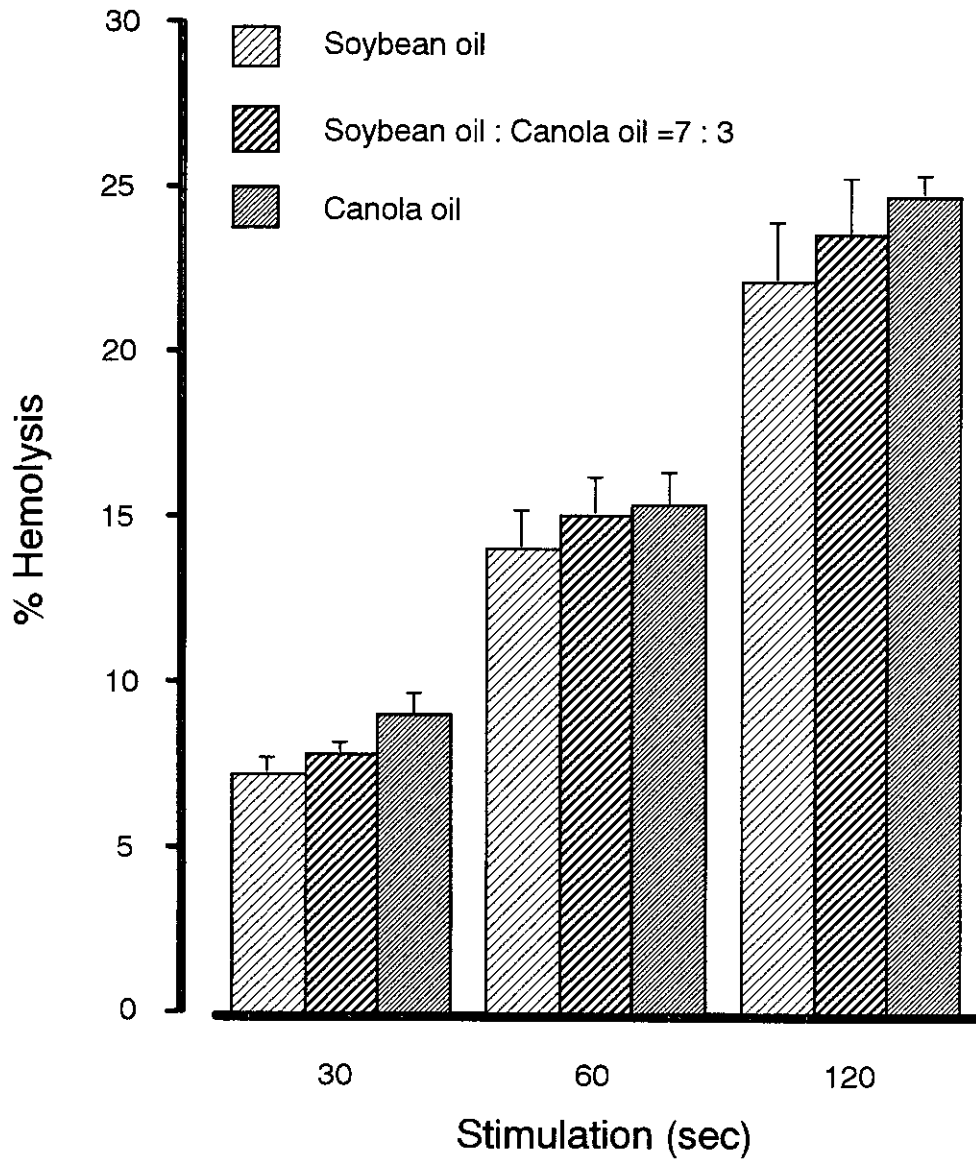


図 5 大豆油、大豆油 : Canola 油 = 7 : 3 の混合油または大豆油を 1 日摂餌量の 10w/w%、1 日 1 回、4 週間経口投与した SHRSP から得た赤血球の機械的刺激による溶血
 機械的刺激の持続時間と溶血率変化が直線関係になる、30、60 および 120 秒間刺激における溶血率
 N=5、詳細は本文参照。

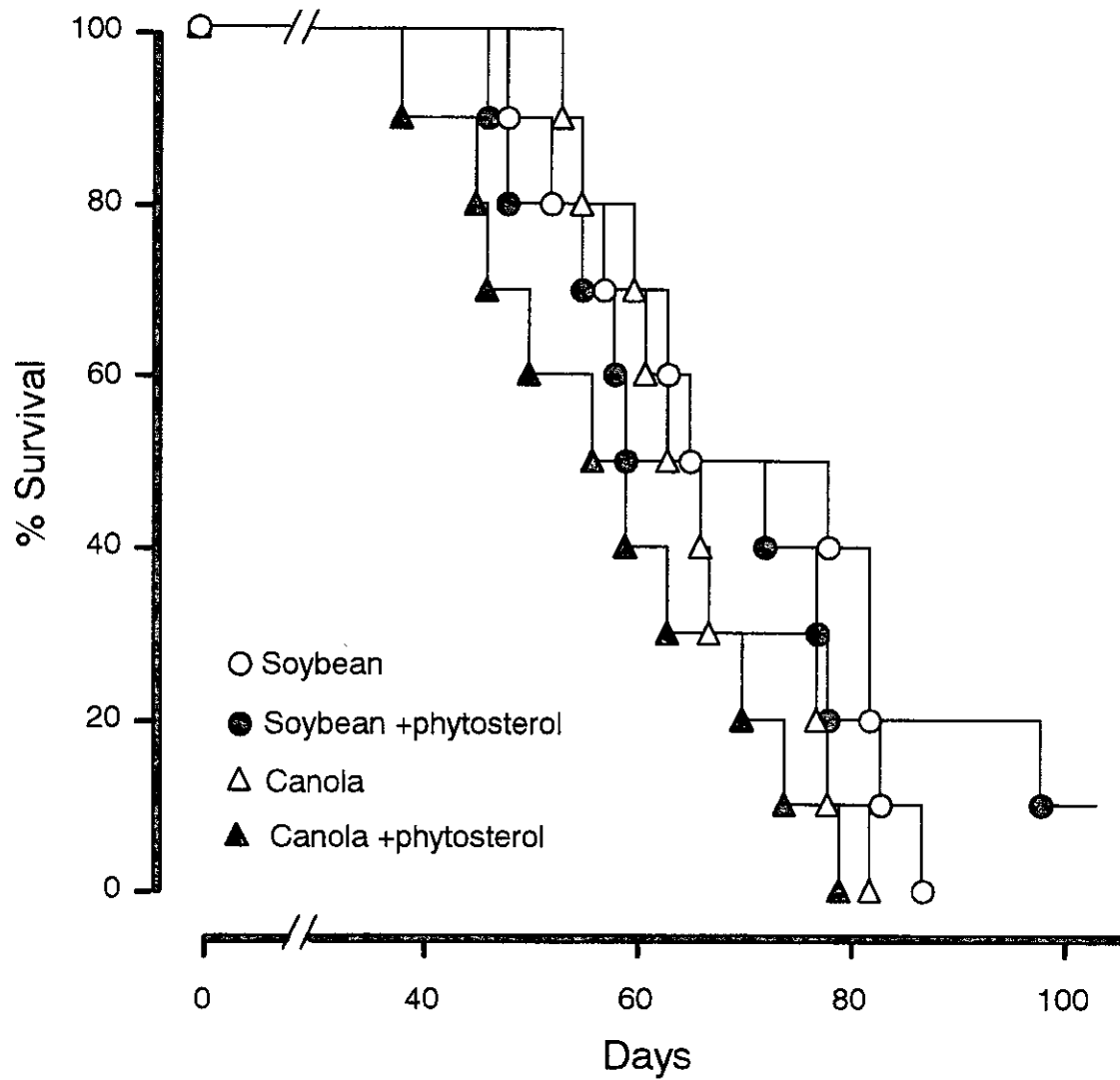


図 6 油脂を含まない精製飼料に大豆油、植物ステロール添加大豆油、Canola 油または植物ステロール添加 Canola 油を与えた SHRSP における給餌日数と生存率の関係
N=10、詳細は本文参照。

大豆硬化油・植物ステロールの評価・生化学的評価に関する研究

分担研究者 今泉勝己 九州大学大学院 教授

【研究要旨】

硬化大豆油や菜種油は大豆油と比較して脳卒中易発症性自然発症高血圧（SHRSP）ラットの寿命を短縮させるという報告がある。その理由として、硬化大豆油ではトランス型脂肪酸が原因と考えられている。菜種油では大豆油に比べ多く存在している植物ステロールが考えられているが、このラットでは他の種に比べ植物ステロールの高吸収・高蓄積がみられ、体内のコレステロールが少ないことが原因の1つと思われる。そこで本研究では SHRSP ラットに、硬化大豆油、超臨界抽出硬化大豆油（低圧による超臨界油と高圧による超臨界油）とその残渣油を与え、飲料水として 0.5% 食塩水を投与し、それぞれの寿命短縮効果について検討を行った。また、大豆油と大豆油に植物ステロール（ β -シトステロール、シトスタノール）を添加した群、またこの植物ステロールの酸化物を添加した群についても同様に寿命の比較を行った。現段階では硬化大豆油と低圧による超臨界大豆油群で寿命が短くなる傾向がみられた。また、大豆油群に比べ植物ステロールを添加した群で寿命が短かった。今後、それぞれの群の各臓器の成分分析と脳・心臓などの臓器について病理解剖を行い、寿命短縮との関連性について検討を行っていく予定である。

A. 研究目的

硬化大豆油や菜種油は大豆油と比較して SHRSP ラットの寿命を短縮させるという報告があり、その原因として硬化油ではトランス型脂肪酸が、菜種油では植物ステロールが他の油に比べ高含有であることが考えられている。そこで本研究では、SHRSP ラットに硬化大豆油、また大豆油に植物ステロールを添加した純化食を与え、食塩水負荷の基、寿命にどのような影響を与えるかについて検討する。

B. 研究方法

実験動物として 3 週齢の雄 SHRSP ラットを用いた。飼育条件は室温 21~24°C 12 時間のライトサイクルとした。1 週間の予備飼育後、1. 硬化大豆油を与えた群、低圧超臨界抽出油を与えた群、その後高圧にて再び超臨界抽出した油を与えた群、そしてその残渣油を与えた群に分け、0.5% 食塩水を飲料水として、それぞれの群の寿命を比較した。また、2. 大豆油を与えた群、大豆油に植物ステロール（ β -シトステロール、 β -シトスタノール）を添加した群、あるいは植物ステロールの酸化物を添加した群に分け、それぞれの群の寿命について比較を行った。死亡したラットから脳や心臓などの臓器を摘出し、病理解剖を行うため、ホルマリンにて保存した。

（倫理面への配慮）

本実験は九州大学の実験動物取り扱い規定に基づいて行われた。

C. 研究結果

1. 現段階では硬化大豆油、低圧超臨界抽出油で

寿命が短い傾向がみられた。脳の障害によると思われる下半身麻痺などの症状が見られるラットの時期や匹数には、現段階では違いはみられていない。

2. 大豆油群に比べ、植物ステロールを添加した群で寿命が短いラットが多かった。植物ステロール添加群は大豆油群に比べ、麻痺などがみられるラットの時期も早く、また目や鼻からの出血、体重減少などの症状がみられ、寿命の短いラットも多かった。植物ステロールの酸化物と大豆油群との間には現在、寿命・症状などに顕著な違いはみられていない。

D. 考察

硬化大豆油及びそれを低圧で超臨界処理して抽出した油を給餌すると、寿命が短いラットの割合が多い傾向がみられた。このことより、超臨界低圧処理の段階で回収される油区分に寿命短縮効果を示す成分が含まれるのではないかと推測される。しかし現段階では、死亡しているラットの匹数がまだ少ないため、これらの油に有意な寿命短縮効果がみられると断言するのは難しい。

今回の実験では、植物油に最も多く存在するステロールである β -シトステロールを主成分とするものを実験に供した。SHRSP ラットにおける寿命短縮の原因として、植物ステロールの高吸収が血球細胞膜や組織細胞膜におけるコレステロールの逸脱と植物ステロールの過剰置換を招き、細胞膜の恒常性機能に異常をもたらしていることが考えられる。

今後、各種臓器の分析を行い、寿命短縮効果がある植物ステロールやトランス型脂肪酸の組織分布を明らかにする。また脳や心臓などの病理解剖を行い、寿命短縮の原因となる所見がみられるか等について追求していく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyuki Ando, Hiroko Tomoyori and Katsumi Imaizumi (2002)

Dietary cholesterol-oxidation products accumulate in liver in apolipoprotein E-deficient mice, but do not accelerate atherosclerosis. British Journal of Nutrition, 88, 339-345

2. 学会発表

市 育代、友寄博子、岩本昌子、佐藤匡央、今泉勝己 (2002) 加熱により生成する酸化植物ステロールの測定；第 56 回日本栄養・食糧学会西日本支部大会

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

腫瘍誘導血管新生抑制物質探索を目的とした *in vitro* および *in vivo* 実験系の確立と
その応用

分担研究者 加治和彦 静岡県立大学 教授

【研究要旨】

Folkman は血管新生を抑制することによる癌の新たな治療法を提唱した。これは血管新生を阻害して固形腫瘍の増殖や転移を抑制することを念頭においたもので、癌治療の新しい戦略として注目されている。抗血管新生剤は、抗癌剤とは異なり内皮細胞に作用するため薬剤耐性が生じにくいことが期待される。今回この実験方法を確立し、食用油中に含まれる有害物質の探索と同定を試みた。(1) *in vitro* のアッセイ：ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて行った。HUVEC 用標準培養液は基礎培養液 MCDB-104 に 10%FBS、成長因子カクテル、EEP (FGF を主とする) を必要時にその都度添加し用いた。コラーゲンゲル(KOKENCELLGEN タイプ・コラーゲン溶液より調整) 間に HUVEC をサンドイッチした。または、bFGF+VEGF+PMA という組み合わせで、典型的な管腔を形成した。(2) *in vivo* のアッセイ：マウス背部に癌細胞(S180)を移植し、誘導される新生血管について検討した。細胞チャンバーを移植したマウスはフィブリン層が分厚くなり、新生血管が誘導された。(3) 菜種油、大豆油の内皮細胞の増殖と管腔形成に及ぼす影響：HUVEC の増殖は菜種油、大豆油ともに 50 $\mu\text{g/ml}$ で増殖阻害活性をチェックしたが、DMSO のみ添加のコントロールと差がほとんどでなかった。管腔形成はサンプル濃度を 3.125 $\mu\text{g/ml}$ ~ 10mg/ml(final)の範囲で添加し、添加方法も直接培地に添加、培地とゲル両方に混ぜて添加、DMSO に溶かして添加など、条件を様々に変えて阻害活性をチェックしたが、この方法では菜種油、大豆油ともに阻害活性はほとんど見られなかった。

A. 研究目的

1970 年代の初頭に Folkman によって、固形腫瘍の発育は腫瘍血管新生に依存しており、癌細胞から血管新生を誘導する因子が放出されているという仮説が立てられ、ここから固形腫瘍における血管新生と病態の進展との関連が注目されるようになった。80 年代に入ると血管新生を促進あるいは抑制する因子が培養系を用いて相次いで同定されるなど、血管新生の研究は細胞レベル、分子レベルで解析が進み、今日ではこの成果が発生工学の手法を用いて個体レベルで検証されてきている。また、近年になって癌の転移と血管新生との関連も明らかにされつつある。

さらに Folkman は血管新生を抑制することによる癌の新たな治療法を提唱した。これは血管新生を阻害して固形腫瘍の増殖や転移を抑制することを念頭においたもので、癌治療の新しい戦略と

して注目されている。抗血管新生剤は、抗癌剤とは異なり内皮細胞に作用するため薬剤耐性が生じにくいことが期待される。またすべての固形腫瘍が血管新生を必要とすることから、様々な固形腫瘍の治療に共通して用いることができると考えられ、その目的に即した薬剤の臨床治験も始められている。

成熟個体の血管新生は、まず壁細胞が内皮細胞から剥離する過程から始まる。次に血管新生因子の刺激に反応して内皮細胞がプロテアーゼを産生して血管の基底膜やその周辺の細胞外マトリックスを消化し、刺激の方向へと遊走を開始する。このようにして血管基底膜を破壊して間質へと浸潤を開始した内皮細胞は遊走と増殖とによってその細胞数を増す。さらに内皮細胞は VE カドヘリンやクロロディン-5 などによって互いに連結し管腔構造を形成する。最後に壁細胞も内皮細胞

胞に続いて遊走・増殖し、形成された管腔構造の周囲を取り囲み、新しい血管基底膜が形成されて成熟した血管が構築される。一方腫瘍の誘導による新生血管は、壁細胞の欠如した未熟な血管構造である。

これまで当研究室において、緑茶に含まれるカテキン類が血管新生を抑制するのに有効か否かについて実験検討を行ってきた。これまでの解析で、いずれのカテキン類も血管新生の重要な過程である内皮細胞の増殖、遊走、および管腔形成をいずれも濃度依存的に抑制することが明らかとなった。

本研究ではこの実験方法を用いて、食用油中に含まれる有害物質の探索と同定を目的とするものである。当年度は主に研究方法の確立を目指した。

B. 研究方法

① *in vitro* のアッセイ：ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて行った。HUVEC 用標準培養液は基礎培養液 MCDB-104 に 10%FBS、成長因子カクテル、EEP (FGF を主とする) を必要時にその都度添加し用いた。

1) 細胞増殖阻害

HUVEC の増殖を、コールターカウンタを用いて細胞数をカウントすることにより測定した。サンプル濃度は 50 $\mu\text{g/ml}$ (final) になるように DMSO で溶かして添加し、阻害活性の有無をチェックした。

2) *in vitro* 管腔形成阻害

0.21%コラーゲンゲル (KOKENCELLGEN タイプ I コラーゲン溶液より調整) を 24 穴マルチプレートに下層 150 $\mu\text{l/well}$ と上層 100 $\mu\text{l/well}$ とに分けて添加し、その間に 1.2×10^5 cells/well の細胞をサンドイッチする。これに bFGF (10 ng/ml)、PMA (8 nM) を添加した培養液を加えて管腔形成を誘導し、48 時間後に観察した。

管腔形成誘導開始時にサンプルを 3.125 $\mu\text{g/ml}$ 10 mg/ml (final) になるように添加し、阻害活性の有無をチェックした。

② *in vivo* のアッセイ

本方法はマウス背部に癌細胞 (S180) を移植し、誘導される新生血管について検討するものである。マウス背部皮下法を用いて、体内に投与された被検サンプルが癌細胞により誘導された新生血管にどのような影響を及ぼすかを検討するために重要な基本となる手技を検討した。

①移植チャンバーの作製：マウスに S180 細胞を

腹腔内移植し 7 日後、腹水を約 5~7ml 採取し、細胞数を測定した。細胞濃度を PBS(-) で調整し、細胞懸濁液を作製した。エチレンオキサイドガス滅菌済みの移植チャンバーに細胞懸濁液を 0.15ml ずつ入れた。リングの孔にナイロン栓ではみださないように栓をし、氷浴上のハンクス液に浸した。陰性コントロールとして、PBS(-) (0.15ml/chamber) 含有チャンバーを作製した。

②マウス背部皮下法：麻酔後、マウスを手術板上にうつ伏せに固定しマウス、背部皮下に空気を約 10ml 注入し、膨らませた。膨らんだ皮膚をピンセットで摘み上げ、解剖バサミで切開し、チャンバーを背部皮下に周囲に触れないように挿入した。外科用ホッチキスを用いて上下の皮膚を 3 箇所以上閉じた。移植後マウスは 1 匹につき 1 ケージで床飼いをした。術後 4 日目に背部標的皮膚組織の摘出を行った。チャンバーの位置を確認し、外科用ホッチキスで留めた切開部のすぐ上 (5mm 以上) にハサミを入れ、チャンバーと皮下が離れないようにピンセットでチャンバーと皮膚をはさみ固定し、その周囲を切り取った。切除した皮膚の皮下側を上に向けて、コルク板にのせて固定した。チャンバーが置かれている位置に目印をつけて、チャンバーを丁寧にはずし同位置にクリアチャンバーリングを置いた。実体顕微鏡で観察し、新生血管の本数を測定した。

③癌誘導新生血管：蛇行していることを新生血管の目安とした。これに対し、既存血管は、蛇行が見られずほぼ真っ直ぐに走っている。多くの新生血管はチャンバー下に形成された不溶性ゲル (フィブリン) の中に走っていることが多いが、フィブリン層の中ではなく、皮下に位置する血管でも蛇行していれば新生血管とみなした。実体顕微鏡下で観察し、長さ 3mm 以上の新生血管を計数した。

(倫理面への配慮) 本実験に用いたヒト臍帯静脈内皮細胞は、約 10 年前に東京都老人総合研究所で分離したものであり、口頭によるインフォームドコンセントを得ているので問題はない。

C. 研究結果

① *in vitro* アッセイ法の確立

bFGF+PMA または、bFGF+VEGF+PMA という組み合わせで、典型的な管腔を形成した。これまで、当研究室で用いてきた EEP+PMA という組み合わせよりも本来の姿に近い管を形成しており、管周囲のアポトーシスも少なかった。また、これ以外の条件では、因子を単独で添加したときよりは管腔形

成に多少時間がかかったが、24時間目にはアポトーシスを管の端の方から起こしはじめた。単独添加よりは管が長時間維持されたが、管の崩壊は防げなかった。管腔を構成する細胞と、その核の凝集、断片化を観察すると、bFGF+PMA と bFGF+VEGF+PMA の組み合わせが最もアポトーシスが少なく、いくつかの細胞が融合し細い管腔を形成していた。他の条件では、核の断片化が多く観察された。

② in vivo アッセイ法の確立

マウス背部皮下法の当研究室における確立のため、S180細胞による誘導新生血管の確認をした。さらに、チャンバー移植後の背部標的皮膚組織の摘出日数と S180細胞の適したチャンバー注入細胞数を検討した。

PBS(-)および S180細胞を注入したチャンバーを作製し、マウスの背部に移植した。3日目、4日目、5日目にチャンバーを移植した皮下を摘出し観察した。3日目では PBS(-)と S180細胞による誘導新生血管は観察されなかった。4日目、5日目になると PBS(-)では誘導されなかったのに対し、S180細胞チャンバーを移植したマウスはフィブリン層が分厚くなり、新生血管が誘導された。3、4、5日目の S180細胞による新生血管の平均本数は 0.8、3.8、3.3 で 4日目に最も誘導されていた。

次にチャンバーに注入する S180細胞の濃度の検討をおこなった。皮下の摘出を4日目におこない、測定したところ、 2.5×10^6 cells/0.15ml PBS(-)の濃度までは濃度依存的に新生血管を誘導したが、それ以上の濃度では逆に減少傾向を示した。

今後のマウス背部皮下法において当研究室では背部標的皮膚組織の摘出は4日目におこない、S180細胞のチャンバーは 2.5×10^6 cells/0.15ml PBS(-)の濃度で作製することが確立された。

③ 菜種油、大豆油の内皮細胞の増殖と管腔形成に及ぼす影響

1) 増殖：菜種油、大豆油ともに $50 \mu\text{g/ml}$ で増殖阻害活性をチェックしたが、DMSOのみ添加のコントロールと差がほとんどでなかった。

2) サンプル濃度を $3.125 \mu\text{g/ml}$ 10 mg/ml (final)の範囲で添加し、添加方法も直接培地に添加、培地とゲル両方に混ぜて添加、DMSOに溶かして添加など、条件を様々に変えて阻害活性をチェックしたが、この方法では菜種油、大豆油ともに阻害活性はほとんど見られなかった。

D. 考察

天然物質や人工物質のヒトへの影響とその作用機構を検討する上で、ヒトの正常細胞を用いることは非常に求められている。今回我々は、培養ヒト血管内皮細胞の培養とそれが in vitro において毛細血管様管腔構造を形成する系を確立した。いっぽう、in vivo における検討はヒト個体を用いることができないことから、実験動物、マウスを用いることとし、腫瘍誘導血管新生の阻害物質を検定する方法を確立した。これらの方法を駆使して今後本主題の植物油に含まれる生体の有害物質の同定とその作用機構を検討していく予定である。

菜種油と大豆油を用いて血管内皮細胞増殖、管腔形成に対する影響をチェックしたが、コントロールとの差はあまり観察されず、どちらの油でも血管新生を阻害する活性は検出されなかった。今後の検討課題として、油の溶かし方が重要であると考えられる。すなわち、油に溶けている有害な微量成分が水に溶けにくいために活性が検出されない可能性が考えられる。ある程度精製した微量成分を、確実に可溶化できる方法が確立できれば、より明白な結論が導き出せると考えられる。別の方策として、細胞を予め油で処理しておくことで、可溶化せずに活性を検出する方法も検討したい。

油を安定に分散させる方法の一つとして、高分子ミセルを形成するキトサン誘導体を用いることを検討している。キトサン (chitosan)はキチンの脱アセチル化物であり、その誘導体である S-Cn-Chitosan は高分子ミセルを形成する。この安定なミセルの中に油を含有させることが可能であり、不溶性の脂質のキャリアーとして用いられる。これは培養液中に安定に分散されていることを確認した。さらにミセル中の脂質が細胞に取り込まれ、細胞にその脂質による影響が観察できるかを検討している。

E. 結論

天然物の生体有害性を検討する in vitro および in vivo の実験系を確立した。菜種油と大豆油のどちらの油でも血管新生を阻害する活性は検出されなかった。油に溶けている有害な微量成分が水に溶けにくいために活性が検出されない可能性が考えられ、ある程度精製した微量成分を確実に可溶化できる方法を確立することが今後必要である。

F. 健康危険情報

現段階では健康危険情報は特にない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1 Kondo, T., Ohta, T., Igura, K., Hara, Y. and Kaji, K. Tea catechins inhibit angiogenesis in vitro, measured by human endothelial cell growth, migration and tube formation, through inhibition of VEGF receptor binding. Cancer Letters. (2002) 180: 139-144.

2. 学会発表

1. 小林智美、太田敏郎、近藤貴子、伊倉宏一、江頭登、原征彦、加治和彦 In vitro ヒト血管モデルにおける EGCG の血管抑制作用の生化学的解析. 2002 年日本農芸化学会大会講演要旨集(76 巻、臨時増刊号)、pp103、(2002).

2. 平柳武、小林智美、太田敏郎、加治和彦 In vitro ヒト血管モデルを用いた血管新生シグナル伝達の解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集、pp925、(2002).

3. 宮風真一、鈴木昭夫、太田敏郎、加治和彦 アポトーシスのシグナル伝達を中心としたヒト血管の虚血障害の解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集、pp1085、(2002).

4. 小林智美、太田敏郎、江頭登、原征彦、加治和彦 食品成分による血管新生抑制とその分子機構. 第 61 回日本癌学会総会記事、pp329、(2002).

H. 知的財産権の出願・登録状況

特にない。

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

狂牛病飼料の油糧種子成分調査

研究分担者 小野崙菊夫 名古屋市立大学大学院・薬学研究科・教授

【研究要旨】

本邦における牛海綿状脳症（BSE）の原因は、当初、海外から輸入された異常プリオンに汚染された肉骨粉が原因ではないかと推測された。しかし、農水省による調査の結果、肉骨粉とは別の原因が考えられている。菜種油には、有害物質が含まれていることから、BSE ならびに羊や山羊のスクレイピーと菜種との関連について調査を行った。その結果、BSE を発症した牛に与えた飼料中の多くに菜種油粕が含まれていることが明らかになった。現在提唱されているいくつかの説と、プリオンの生理的作用を考え合わせると、次のような仮説が考えられた。菜種は、土壌中の硫黄(S)やモリブデン(Mo)やマンガン(Mn)などの重金属を吸収、蓄積しやすい。菜種油粕を過剰に摂取することにより、S や Mo は銅(Cu)と強固に結合し、プリオンを介した細胞内への Cu の取り込みを阻害する。Cu 欠乏症になった細胞は、Cu/ZnSOD 活性が低下し酸化ストレスに対し脆弱になり、アポトーシスを起こしやすくなる。Mn は Cu と競合的にプリオンに結合し、Cu 欠乏症を増強する。異常プリオンの発現はその結果であるかもしれない。

A. 研究の目的

本邦における BSE の原因は、当初、海外から輸入された異常プリオンに汚染された肉骨粉が原因ではないかと推測された。しかし、農水省による調査の結果、BSE 汚染国からは肉骨粉が輸入されていなかったことから、別の原因が考えられている。菜種油には、奥山らの研究により有害物質が含まれていることから、BSE ならびに羊や山羊のスクレイピーと菜種との関連について調査を行った。

B. 研究方法

国内外の狂牛病、スクレイピーに関する発表調査、論文に基づいて調査を行った。

C. 研究結果

1. 世界における狂牛病の発生

表1に示すように BSE の発生の最も多いのは英国であり、ヨーロッパ各国など世界各国で発生している。統計上主要な畜産国で BSE の発生のないのはオーストラリアとニュージーランドである。

2. 本邦における BSE の発生

本邦における BSE の発生は現在までに7例報告されている。いずれも雌の乳牛である。肉牛は2年程度の飼育で市場に出されるので、BSE の発生以前にと畜されるために発症例がないと思われる。第3例目以外はいずれも北海道産である。

第1例の感染牛は、1996年3月に北海道で産生され1998年に千葉県に移動し、2001年8月にと蓄(5歳4ヶ月)された。

第2例の感染牛は、1996年4月に北海道で産生され、2001年11月にと蓄(5歳7ヶ月)された。

第3例の感染牛は、1996年3月に群馬県で産生され、2001年11月にと蓄(5歳8ヶ月)された。

第4例の感染牛は、1996年3月に北海道で産生され、2002年5月にと蓄(6歳1ヶ月)された。

第5例の感染牛は、1995年12月に神奈川県で産生され、2002年8月にと蓄(6歳8ヶ月)された。

第6例の感染牛は、1996年2月に北海道で産生され、1999年和歌山県に移動し、2003年1月にと蓄(6歳11ヶ月)された。

第7例の感染牛は、1996年3月に北海道で

産生され、2003年1月にと蓄（6歳9ヶ月）された。

4. 肉骨粉との関連

BSE の潜伏期間から、最も感染の可能性の高い時期は生後1年、長くても2年と考えられる。上記3例に関しての農水省の調査結果によれば、当初疑われていた感染国からの肉骨粉は当該酪農農家が使用していた配合飼料や補助飼料には使用されていなかった。しかし、飼料を生産していた工場は肉骨粉を含んだ豚や鶏用飼料を製造しており、製造ラインを共用していたことから、牛用飼料が混入していた可能性が考えられた。しかし、肉骨粉の原料は、一部がBSA発症例のない豪州とニュージーランドからの輸入マトン、ラムの食品加工残渣である以外は、国内産であることが明らかになった。

一方、3例の農家に共通して、同一の飼料工場で製造された代用乳が用いられており、その原料として、オランダ産の動物性油脂が使用されていた。現在この動物性油脂が疑わしいとされている。しかし、上記の動物性油脂を製造している会社の製品は、オランダでは非常に大きいシェア（約50%）を占めていること、オランダにおけるBSEの発症数は、2001年までに28例と他の欧州諸国に比べれば低いことから、本油脂が原因であるとも説明しがたい。

5. 飼料と菜種油粕

BSE 発症牛に与えた飼料に関しては第6例までが農水省によって調査がなされている。飼料は代用乳、離乳用飼料、育成用飼料を含む配合飼料、単味飼料、ビタミン・ミネラルなどの補助飼料からなっている。1例目に与えられた飼料を例として示す（表2）。

表3は1例目に与えられた飼料成分である。BSE 感染が疑われている代用乳（ミルフードAスーパー）には感染源の可能性が高いと疑われている動物性脂肪が含まれている。これには菜種油粕は含まれていない。一方、配合飼料中の大多数（幼牛グリーン、若牛グリーン、若牛リード、新若牛リード、新若牛リード24、ニューリード18、北見特配18、スーパーゴールド18）には菜種油粕が含まれていた。1例目では、配合飼料8種類中6種類に菜種油粕が含まれていた。単身飼料、補助飼料には含まれていない。同様に、第2例目に付いては配合飼料、9種類中4種類（パワーエース75W、ニューリード18、ニューサン

ラッキー18、ビッグ18）に、第3例目では9種類中4種類（くみあい配合飼料乳牛用ミルク75、くみあいマル群乳牛17ペレット17N、くみあい配合飼料ハイテックス28、明治配合飼料プレミアムメイスターター）に、第4例目では6種類中3種類（ニューステップ16、くしろ18、根釧18、ニューリード18）に、第5例目には4種類中1種類（メイバイパス40）に、第6例目では4種類中2種類（サポート70、ニューリード18）に菜種油粕が含まれていた。

6. 狂牛病と菜種油粕の因果関係

インターネットで菜種油（Canola oil, Rape seed oil）と狂牛病（BSE）を検索すると、欧米ではその因果関係について非常に注目を浴びていることが明らかになった。それは、John Tomas が菜種油の種々の危険性、毒性を本や Web site で指摘しており、インターネット上で賛否両論の意見が述べられているものである。内容は、基本的に菜種油は、健康にとり危険であるというものであるが、BSE との関係で興味あることが書いてある。その内容は、「1986年から、1991年にかけて英国や欧州ではひろく菜種油が家畜の飼料に加えられた。興味深いことに飼料から菜種油を除いたらスクレイピーが消えてしまった、また、新たなBSEの発生の報告もない」というものである。もし真実ならば重要なことなので、英国におけるBSEに関しての家畜飼料に関する規制について調べてみた。詳細な飼料の内容については公表されていないので菜種油または菜種油粕に関しては不明であるが、英国では、1988年反芻動物由来の蛋白を反芻動物に与えることを禁止した。しかしその後もBSEの発生は止まず、1996年からは哺乳動物由来たんぱく質を鳥や魚も含めたすべての家畜動物に対する飼料に加えることを禁止した。

英国におけるBSEの発生状況を見ると、現在もBSEの発生は続いていることから、先述に関しては本の記述は正しくないことがわかる。また、BSEの発生は減少していることから、1996年以降の規制が効果を現しているように思える。そこで、英国における羊やヤギのスクレイピーの発生に関して調べてみた。そうすると、表4に示すように、スクレイピーの発生はBSEに比べて早期に発生していることがわかる。早いものでは生後1年以内でも発生が見られる。さらに、重要なことはスクレイピーの発生は全く減少していないことである。すなわち、家畜飼料に対する規制は効果がないことは明らかである。

7. 菜種油粕と狂牛病、スクレイピーに関する仮説

アメリカの科学者、Murray McBride は狂牛病、スクレイピーの発生原因に関して興味深い仮説を提唱している。菜種の油粕との関連で内容を要約する以下のようなものである。

- 1) BSE/スクレイピーの発生には地域特異性がある。(図1参考)
- 2) オーストラリア、ニュージーランドでは BSE/スクレイピーの発生がない。
- 3) 動物の遺伝的違いの問題ではない。
- 4) 土壌や餌が原因ではないか。
- 5) 菜種は硫黄を多く含み土壌中から有害な金属(モリブデン)を吸収する。
- 6) 硫黄やモリブデンは銅と強く結合し銅欠乏症を起こす。

また、英国の科学者、M. Purdey もさらに土壌中の Mn を考慮し、同様な仮説を提唱している。事実、調べてみるとヤギにおける銅欠乏症は、BSE やスクレイピーと同様な神経障害や運動障害を示すこと、さらに脳の空砲形成も見られることが明らかにされている。また、アメリカ、カナダにおいて、野生や農場における大規模な鹿の慢性消耗性疾患(Chronic Wasting Disease: 鹿のスクレイピーとされている)が流行し、人への感染が危惧されている。

D. 考察

以上の調査の結果を基にすると、以下の仮説が考えられた。

菜種は、土壌中の硫黄(S)、モリブデン(Mo)やマンガン(Mn)などの重金属を吸収、蓄積しやすい。Cu 含量の少ない地域や土壌中の S や Mo, Mn 含量の多い地域で飼育された牛、羊、ヤギは銅欠乏症になりやすい。そのような状況下でさらに菜種油粕を過剰に摂取することにより、菜種中の S や Mo は Cu と強固に結合することになる。正常プリオンは、PI アンカーを介して細胞膜のラフトと呼ばれるコレステロール含量の多い部分に存在している。プリオンは、脳の神経細胞やアストロサイト、免疫担当細胞に多く発現している。プリオンは特に Cu と親和性が高く、Cu の細胞内輸送に働いている。S や Mo は、プリオンと Cu との結合を阻害し、プリオンを介した細胞内への Cu の取り込みを阻害する。細胞外 Cu 含量の低下している状況下では、Mn は Cu と競合的にプリオンに結合し、Cu 欠乏症を増強する。Cu 欠乏症になった細

胞は、Cu を必要とする酵素類、特に Cu/ZnSOD 活性の活性低下をもたらす。Cu/ZnSOD 活性が低下した神経細胞は酸化ストレスに対し脆弱になり、アポトーシスを起こしやすくなる。異常プリオンの発現はその結果であるかもしれない。事実、厚生省の発表では、原因は明らかではないが疑わしい神経症状を呈する牛はかなりの数に上り、その中で1次検査陽性の牛もかなりの数に上っている(表5)。異常プリオンがその検出に必要なレベルに達するのがかなり末期であると仮定すると、その前の段階でプリオンによらない疾患牛もかなりいることが予想される。

E. 結論

調査の結果、少なくともスクレイピーに関しては肉骨粉や動物性油脂は関係ないと結論できる。土壌や飼料を考えると菜種油粕の関与は可能性はある。菜種は栄養状態の悪い土壌においても生育し、土壌中に深い根を張って生育する植物である。土壌中の有害重金属を蓄積する可能性は十分に考えられる。また、菜種油粕は高たんぱく飼料であり、生体に何らかの悪影響を与える可能性もある。乳牛は常にストレスにさらされた状態にあることから、ストレスの関与も今後は仮説を実験的に証明することが必要である。

9. 文献、資料

1. BSE 1-3 例に関する資料: 牛海綿状脳症(BSE)の感染源及び感染経路の調査について 第2次中間報告、農林水産省生産局 平成14年3月
2. BSE 4 例目に関する資料: 牛海綿状脳症(BSE)の患畜に関する情報 北海道農政部 平成14年5月
3. BSE 5 例目に関する資料: 牛海綿状脳症(BSE)発せい農家の調査状況について 農林水産省生産局 平成14年9月
4. BSE 6 例目に関する資料: BSA 患畜(第6例目)に関する情報(第2報) 農林水産省生産局 平成15年1月
5. BSE 7 例目に関する資料: BSA 患畜(第7例目)に関する情報(第2報) 農林水産省生産局 平成15年1月
6. 菜種油と狂牛病に関してインターネット上で議論を巻き起こしている資料: *Young Again: How to Reverse the Aging Process* by John Thomas, 1994 Plexus Press.
7. 英国における BSE/スクレイピーに関

する資料

: Department for Environment Food
and Rural Affairs.

<http://www.defra.gov.uk/>.

8. Trace element (nutritional) theory of
"mad cow" disease. Mbm7@cornell.edu
9. Purdey M. British Cattle Veterinary
Association journal *CATTLE PRACTICE*
VOL10 PART 4, 2002
10. BSE のスクリーニング検査結果につ
いて：厚生労働省発表資料
平成15年3月4日

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Matsumura T., Degawa, T., Takii, T., Hayashi,
H., Okamoto, T., Inoue, J. and Onozaki, K.
TRAF6-NF- κ B Pathway is Essential for
IL-1-induced TLR2 Expression and Its
Functional Response to TLR2 Ligand in Murine
Hepatocytes.
Immunology 2003 in press

Hattori, T., Ohoka, N., Inoue, Y., Hayashi, H.
and Onozaki, K.
C/EBP family transcription factors are

degraded by the proteasome but stabilized by
forming dimer.

Oncogenes 2003 22(9): 1273-1280.

Hayashi, H., Inoue, Y., Tsutsui, H., Okamura,
H., Nakanishi, K. and Onozaki, K.

TGF down-regulates IFN- production in
IL-18 treated NK cell line LNK5E6

Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003 300(4):
980-985.

Takii, T., Kawashima, S., Chiba, T., Hayashi,
H., Hayashi, M., Hiroma, H., Kimura, H., Inukai,

Y., Shibata, Y., Nagatsu, A., Sakakibara, J.,
Oomoto, Y., Hirose, K. and Onozaki, K. Multiple

mechanisms involved in the inhibition of
proinflammatory cytokine production

Internatl. Immunophar. 2003 3(2): 273-277.

Takii, T., Yamamoto, Y., Chiba, T., Abe, C.,
Belisle, J.T., Brennan, P.J. and Onozaki, K.

Simple fibroblast-based assay for screening of
new antimicrobial drugs against *Mycobacterium*
tuberculosis.

Antimicrob Agents Chemother. 2002
6(8):2533-2539.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1

牛海绵状脳症 (BSE) の発生状況

年	各国の発生状況													輸入動物でのみ発生報告のある国			
	英国	748カド	USA	FRG	ITA	ESP	IRE	UK	FIN	GER	NET	USA	UK	USA	UK	USA	UK
1986	446 (1987 年以 前)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1987	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1988	2,514	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1989	7,228	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1990	14,407	14	2	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1991	25,359	17	8	5	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1992	37,280	18	15	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1993	35,090	16	29	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1994	24,436	19	64	4	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1995	14,562	16	68	3	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1996	8,149	73	45	12	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1997	4,393	80	38	6	30	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1998	3,235	83	14	18	106	6	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1999	2,300	91	50	31	170	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	1,443	149	33	161	163	9	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2001	526	242	37	258	98	46	0	20	0	6	125	82	1	48	2	5	3
累計	181,368	833	403	499	628	65	1	28	2	8	138	84	1	49	2	5	3

出典：国際獣疫事務局 (OIE) 2002年3月7日現在 (イ英国) については、2001年11月21日現在、「輸入動物でのみ発生報告のある国」については、2001年7月13日現在)

(注) 感染が確定した年で計上。イタリック体は輸入牛で発生、下線付は輸入牛での発生を含む。
網掛けは、国内での初発年

表2

OBSE発生農家における飼料給与状況調べ

(北海道1割目)

	飼料銘柄	製造業社又は取り扱い業者名
配合飼料	ミルフードAスーパー	豚科学飼料研究所高橋工場
	ミルフードBフレック	ホクレンくみあい飼料株式会社商港工場
	幼牛グリーン	ホクレンくみあい飼料株式会社北見工場
	若牛リード	ホクレンくみあい飼料株式会社北見工場
	新若牛リード24	ホクレンくみあい飼料株式会社北見工場
	ニューリード18	ホクレンくみあい飼料株式会社北見工場
	北見特配18	ホクレンくみあい飼料株式会社北見工場
	スーパーゴールド18	日本農産工業株式会社小樽工場
種用飼料	アンコーナーザ	日産合成工業株式会社園田工場
	イーヌロン	アサヒビール株式会社松本工場
	スーパーリンガル18	メルシャン株式会社小牧工場
	スーパーマグ55	東洋電化工業株式会社
	ハイマグ255	東洋電化工業株式会社
種用飼料	生バルブ	北海道酪業株式会社製糖所
	還元バルブ	北海道酪業株式会社製糖所
	一筋バルブ	北海道酪業株式会社製糖所
	輸入ビートバルブ	酪水乳業株式会社北海道支所通経支所
	ビートバルブ	北海道酪業株式会社製糖所
種用飼料	ミニキューブバラ	ホクレン畜産協同組合連合会

表3-1

北海道の農家(1例目)が給与した飼料成分一覧 NO. 1

配合飼料	ミルフードムスーパー (政科学飼料研究所高松工場)	脱脂粉乳、濃縮ホエイ蛋白、血しょう蛋白(籾田米)、フィッシュオリゴ糖吸着飼料、乾燥ホエイ、カゼイン、動物性油脂、ブドウ糖、植物性ガム物質、フラクトオリゴ糖シロップ、食塩、トコイ富、飼料用酵母、発酵米粉末、酵母粉末、コーンシロップ、ケイ酸、酸化アルミニウム
	ミルフードBプレーク (ホクレンくみあい飼料株式会社新潟工場)	トウモロコシ、小麦粉、エン麦、ふすま、魚粉、大豆油かす、おまに油かす、糖蜜、炭酸カルシウム(動物由来)、食塩、リン酸カルシウム(動物由来)、動物性油脂、アルファルファミール、飼料用酵母、プロピオン酸カルシウム(動物由来)
	若牛グリーン (ホクレンくみあい飼料株式会社新潟工場)	トウモロコシ、ライ麦、マイロ、米粉、ふすま、コーングルテンフィード、スクリーニングペレット、大豆油かす、なたね油かす、コーングルテンミール、魚粉、アルファルファ、アルファルファミール、糖蜜、炭酸カルシウム(動物由来)、食塩、プロピオン酸カルシウム(動物由来)
	若牛リード (ホクレンくみあい飼料株式会社新潟工場)	トウモロコシ、ライ麦、小麦、マイロ、ふすま、コーングルテンフィード、スクリーニングペレット、大豆油かす、なたね油かす、アルファルファミール、糖蜜、炭酸カルシウム(動物由来)、食塩、プロピオン酸カルシウム(動物由来)
	新着牛リード24 (ホクレンくみあい飼料株式会社新潟工場)	トウモロコシ、ライ麦、小麦、マイロ、ふすま、コーングルテンフィード、大豆油かす、なたね油かす、コーングルテンミール、魚粉、アルファルファミール、糖蜜、炭酸カルシウム(動物由来)、食塩、プロピオン酸カルシウム(動物由来)
	ニューリード18 (ホクレンくみあい飼料株式会社新潟工場)	トウモロコシ、ライ麦、エクストールダ糖蜜大豆、ルーピン、小麦、マイロ、ふすま、コーングルテンフィード、スクリーニングペレット、大豆油かす、なたね油かす、糖蜜、炭酸カルシウム(動物由来)、食塩、アルファルファミール、リン酸カルシウム(動物由来)、プロピオン酸カルシウム(動物由来)

表3-2

北海道の農家(1例目)が給与した飼料成分一覧 No. 2

配合飼料	北見特製18 (ホクレンくみあい飼料 株式会社)	トウモロコシ、マイロ、ライ素、ルーピン、小麦、ふすま、コーングルテンフィード、スクリーニングペレット、大豆油かす、なたね油かす、糖蜜、炭酸カルシウム(動物由来)、食塩、プロピオン酸カルシウム(動物由来)
	スーパーゴールド18 (日本農業工業株式会社)	とうもろこし、加熱処理大豆、マイロ、ライ素、小麦、大麦、大豆油かす、なたね油かす、ふすま、スクリーニングペレット、米ぬか、コーングルテンフィード、糖蜜、炭酸カルシウム、食塩、アルファルファミール、リン酸カルシウム
補助飼料	ケンコーオーザ (日産合成工業株式会社)	米ぬか油かす、カゼイン、炭酸バクサイン、アルファルファミール、ビタミンE、ニコチン酸、パントテン酸カルシウム、(動物由来)、硫酸鉄、硫酸銅、硫酸亜鉛、硫酸マンガン、ヨウ化カリウム、酸化マグネシウム、硫酸亜鉛メチオニン
	イースロン (アサセビール食品株式会社)	ビール酵母エキス、エチルアルコール、クエン酸
	スーパーリンカル15 (メルシャン株式会社)	リン酸カルシウム(動物及び植物由来)、糖蜜、アルファルファミール、炭酸カルシウム(動物由来)、あまに油かす(植物由来)、コンブ粉末、酸化マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅、硫酸亜鉛、硫酸マンガン、硫酸亜鉛メチオニン、硫酸コバルト、ヨウ素酸カルシウム(動物または無機化学薬品)、着色剤
	スーパーマグ55 (東洋電化工業株式会社)	リン酸カルシウム(動物由来)、炭酸カルシウム(動物由来)、糖蜜、アルファルファミール、酸化マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅、硫酸亜鉛、硫酸マンガン、硫酸コバルト、ヨウ素酸カルシウム(動物または無機化学薬品)
	ハイマグ255 (東洋電化工業株式会社)	リン酸カルシウム(動物由来)、炭酸カルシウム(動物由来)、糖蜜、アルファルファミール、酸化マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅、硫酸亜鉛、硫酸マンガン、硫酸コバルト、ヨウ素酸カルシウム(動物または無機化学薬品)

表4

AGE DISTRIBUTION OF CASES FOR SCRAPIE IN SHEEP AND GOATS
(HISTORICAL DATA UP TO 28 JULY 1986)

Age range	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
Unknown	23	28	31	26	45	27	30	29	24	21	101	471	289	71	21	128	129	130	28
0 < 1	2	0	3	2	2	0	2	4	3	3	5	3	0	0	0	0	0	0	0
1 < 2	13	19	28	21	33	24	31	25	46	51	62	99	90	5	3	3	14	0	4
2 < 3	24	25	34	44	28	26	45	54	56	68	99	149	105	63	60	41	93	122	35
3 < 4	16	16	16	24	30	19	26	24	43	23	50	94	72	82	45	36	95	109	80
4 < 5	20	0	13	25	21	24	23	27	21	28	30	60	63	53	28	23	74	81	44
5 < 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38	18	14	25	21	27
6 < 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	5	5	11	18	13
7 < 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	5	8	6
8 < 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	3	2	0
9 < 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
10 < 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	5
11 < 12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
12 < 13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
13 < 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
14 < 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 < 16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Yearly Total	85	104	127	142	159	136	153	173	211	252	347	906	595	328	235	284	459	508	248



牛海綿状脳症（BSE）のスクリーニング検査結果について（週報）

◎これまでにBSEと診断された牛は5頭。その他のスクリーニング検査の結果は以下の通り。

搬入日	症状を呈する牛 ※1				生後30ヶ月齢以上の牛				その他の牛				計			
	陰性	陽性	検査中	検査中	陰性	陽性	検査中	検査中	陰性	陽性	検査中	検査中	陰性	陽性	検査中	計
平成13年10月18日～10月31日	339	0	0	0	10,955	0	0	0	15,334	7	0	0	26,628	7	0	26,635
11月1日～11月30日	466	0	0	0	43,506	9	0	0	56,286	11	0	0	100,258	20	0	100,278
12月1日～12月31日	190	0	0	0	38,627	3	0	0	56,943	9	0	0	95,760	12	0	95,772
平成14年1月1日～1月31日	217	0	0	0	36,966	3	0	0	57,555	6	0	0	94,738	9	0	94,747
2月1日～2月28日	196	0	0	0	38,336	1	0	0	57,836	4	0	0	96,368	5	0	96,373
3月1日～3月31日	443	0	0	0	47,227	3	0	0	62,400	3	0	0	110,070	6	0	110,076
4月1日～4月30日	234	0	0	0	51,646	4	0	0	66,384	13	0	0	118,264	17	0	118,281
5月1日～5月31日	220	1	0	0	46,201	4	0	0	62,158	1	0	0	108,579	6	0	108,585
6月1日～6月30日	170	0	0	0	38,233	4	0	0	54,982	0	0	0	93,385	4	0	93,389
7月1日～7月31日	252	0	0	0	47,642	3	0	0	66,069	1	0	0	113,963	4	0	113,967
8月1日～8月31日	246	1	0	0	40,840	3	0	0	58,144	3	0	0	99,230	7	0	99,237
9月1日～9月30日	234	0	0	0	39,367	0	0	0	59,484	0	0	0	99,085	0	0	99,085
10月1日～10月31日	237	0	0	0	45,873	0	0	0	64,549	0	0	0	110,659	0	0	110,659
11月1日～11月30日	253	0	0	0	50,885	0	0	0	71,683	0	0	0	122,821	0	0	122,821
12月1日～12月31日	223	0	0	0	47,399	2	0	0	68,232	0	0	0	115,854	2	0	115,856
平成15年1月1日～1月31日	299	1	0	0	35,654	2	0	0	50,100	0	0	0	86,053	3	0	86,056
2月1日	8	0	0	0	26	0	0	0	137	0	0	0	171	0	0	171
2月2日～2月8日	63	0	0	0	8,696	1	0	0	14,719	0	0	0	23,478	1	0	23,479
2月9日～2月15日	70	0	0	0	8,104	0	0	0	12,280	0	0	0	20,454	0	0	20,454
2月16日～2月22日	67	0	0	0	9,680	0	0	0	15,101	0	0	0	24,848	0	0	24,848
2月23日～2月28日	72	0	0	0	9,707	0	0	0	13,908	0	0	0	23,687	0	0	23,687
3月1日	2	0	0	0	41	0	0	0	61	0	0	0	104	0	0	104
計	4,501	3	0	0	695,611	42	0	0	984,345	58	0	0	1,684,457	103	0	1,684,560

※1 生後24ヶ月齢以上の牛のうち、生体検査において運動障害、知覚障害、反射又は意識障害等の神経症状が疑われたもの及び全身症状を呈する牛

※2 BSE陽性牛2頭を含む ※4 BSE陽性牛

※3 BSE陽性牛1頭を含む ※5 BSE確認検査中

(注) 平成13年10月18日～平成15年3月1日までにBSEの疑いがあるためとさつ禁止措置を講じた件数 2件