

表4 生存日数確認実験における臓器の相対重量 ([g/g] x10<sup>-3</sup>)

	Soybean	Canola	Fr. 180	Fr. 350	Residue
Brain	14.01 ± 0.61	13.79 ± 0.81	15.0 ± 0.71	13.5 ± 0.61	13.9 ± 0.54
Heart	7.69 ± 0.40	7.39 ± 0.23	7.77 ± 0.35	7.74 ± 0.29	8.36 ± 0.43
Lung	9.37 ± 1.3	9.26 ± 1.4	10.6 ± 1.7	8.26 ± 0.88	<u>11.7</u> ± 1.7
Liver	41.4 ± 2.6	44.6 ± 1.8	42.5 ± 2.0	<u>45.5</u> ± 2.1	<u>47.5</u> ± 2.5
Spleen	2.39 ± 0.32	<u>3.22</u> ± 0.27	<u>3.25</u> ± 0.48	<u>3.73</u> ± 0.50	4.26 ± 0.70*
Kidneys	13.3 ± 0.46	<u>14.6</u> ± 1.0	<u>14.7</u> ± 0.70	13.4 ± 0.54	<u>15.2</u> ± 0.83
Adrenal glands	0.417± 0.019	0.474± 0.037	0.471± 0.033	0.447± 0.027	<u>0.528± 0.042</u>
Testes	7.01 ± 0.59	6.76 ± 0.33	7.64 ± 0.59	6.76 ± 0.40	6.92 ± 0.42
Prostate	1.23 ± 0.18	1.11 ± 0.10	0.923± 0.072	1.80 ± 0.45	1.38 ± 0.45

Soybean、大豆油群; Canola、カノーラ油群; Fr. 180 および Fr. 350、カノーラ油の超臨界抽出 180bar 分画および 350bar 分画群; Residue、抽出残渣群。

\*p<0.05、大豆油群に対して有意な差(Dunnett's検定)。N=20。下線は増大傾向の見られるもの。

表5 生存日数確認実験における死亡例の所見

Organ	Group Animal no.	Soybean		Canola		Fr. 180		Fr. 350		Residue		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>(Heart)</b>												
	Myocardial necrosis	++	++	+	++	++	-	++	-	+	+	-
	Myocardial degeneration/fibrosis	±	++	+	+	+	++	++	++	++	+	+
	Fibrous thickening of arteriolar/arterial wall	±	++	+	±	++	+	+	+	+	+	-
	Organized thrombus of arteriole	-	+	±	+	+	++	++	++	+	+	+
	Mineralization of degenerating myocardium?	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<b>(Lung)</b>												
	Edema	+++	+	-	+++	+++	-	+++	-	±	-	-
	Alveolar hemorrhage	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	±
<b>(Liver)</b>												
	Fresh necrosis of hepatocyte in central zone	-	-	-	-	-	+	-	-	±	+	-
	Fibrous thickening of arteriolar wall	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<b>(Spleen)</b>												
	Extramedullary hematopoiesis	++	++	+++	++	++	+++	++	++	++	+++	+
	Atrophy of follicle	+	++	++	-	+	+++	+	++	++	-	++
	Fibrous thickening of arteriolar wall	+	++	++	±	±	++	+	+	+	+	+
<b>(Kidney)</b>												
	Chronic nephropathy	+	++	++	++	+	+++	++	++	++	++	++
	Fibrous thickening of arteriolar wall	+	+++	++	++	+	+++	+	++	+++	+++	+++
	Infiltration of neutrophils in the pelvis	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
<b>(Testis)</b>												
	Degeneration of germ cell	-	+	±	-	-	++	-	++	+	++	+++
	Fibrous thickening of arterial wall	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	+
<b>(Epididymis)</b>												
	Cell debris in lumen	NE	++	+	-	±	++	NE	++	++	++	-
	Fibrous thickening of arterial wall	NE	+	+	-	-	+	NE	-	-	-	+
<b>(Prostate)</b>												
	Neutrophilic cell infiltration	-	+++	-	-	-	-	-	++	-	+++	-
	Atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++
<b>(Brain)</b>												
	Intracerebral hematoma	-	+	-	-	-	++	++	++	+	++	+++
	Petechial hemorrhage	-	-	±	±	-	-	±	-	±	±	+
	Laminar necrosis/degeneration of cortex	-	+	-	-	±	++	+	+	+	++	++

Soybean、大豆油群；Canola、カノーラ油群；Fr. 180 および Fr. 350、カノーラ油の超臨界抽出 180bar 分画および 350bar 分画群；Residue、抽出残渣群。

±、+、++、+++は、傷害や病変の程度、それぞれ、極く軽度、軽度、中等度、重度 を示す。新鮮な状態で剖検できたもののみ。

表6 カノーラ油分画8週間摂取後に解剖した動物の血液生化学検査所見(脂質のパラメータ)

	Soybean	Canola	Fr. 180	Fr. 350	Residue
TC(mg/dL)	74.3 ± 6.3	73.4 ± 4.3	<u>83.8</u> ± 7.5	75.6 ± 4.5	<u>83.6</u> ± 4.8
TG(mg/dL)	33.9 ± 6.3	35.8 ± 7.5	<u>47.0</u> ± 10	<u>52.3</u> ± 16	125 ± 43*
FC(mg/dL)	19.8 ± 1.9	18.9 ± 1.1	22.3 ± 2.9	19.4 ± 1.5	23.1 ± 2.2
FFA(mg/dL)	0.713 ± 0.097	0.663 ± 0.050	0.688 ± 0.064	0.838 ± 0.11	0.650 ± 0.053
PL(mg/dL)	119 ± 8.5	114 ± 6.9	<u>142</u> ± 19	<u>124</u> ± 8.4	<u>147</u> ± 13
HDL-C(mg/dL)	46.9 ± 4.4	46.6 ± 2.7	52.6 ± 3.1	43.3 ± 4.1	48.0 ± 3.0
LDL-C(mg/dL)	10.9 ± 2.1	10.6 ± 1.5	10.3 ± 1.6	9.75 ± 1.5	11.0 ± 1.7
ALP(U/L)	197 ± 27	<u>236</u> ± 27	<u>220</u> ± 23	<u>233</u> ± 25	<u>222</u> ± 25

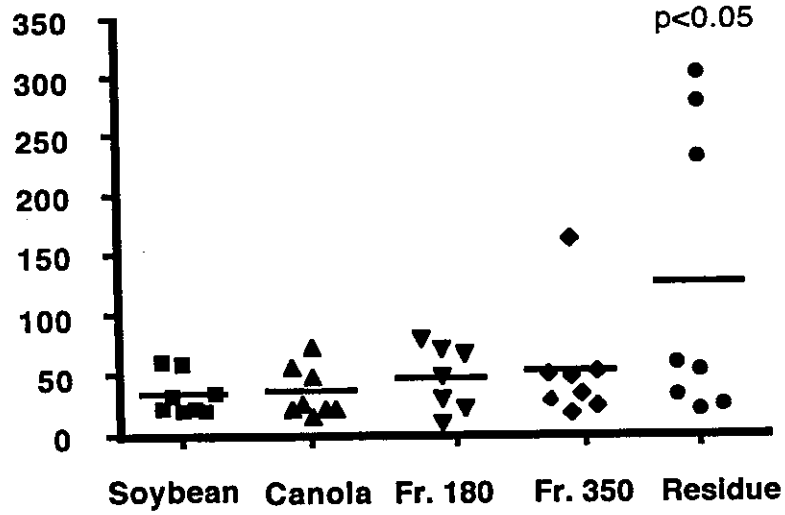
Soybean、大豆油群; Canola、カノーラ油群; Fr. 180 および Fr. 350、カノーラ油の超臨界抽出 180bar 分画および 350bar 分画群; Residue、抽出残渣群。

TC、総コレステロール濃度; TG、トリグリセリド濃度; FC、遊離コレステロール濃度; FFA、遊離脂肪酸濃度; PL、リン脂質濃度; HDL-C、HDLコレステロール濃度; LDL-C、LDコレステロール濃度; ALP、アルカリ性フォスファターゼ活性。

\*p<0.05、大豆油群に対して有意な差(Dunnett's検定)、N=8。

下線は増大傾向を示したものの。

### TG (mg/dL)



### Glucose (mg/dL)

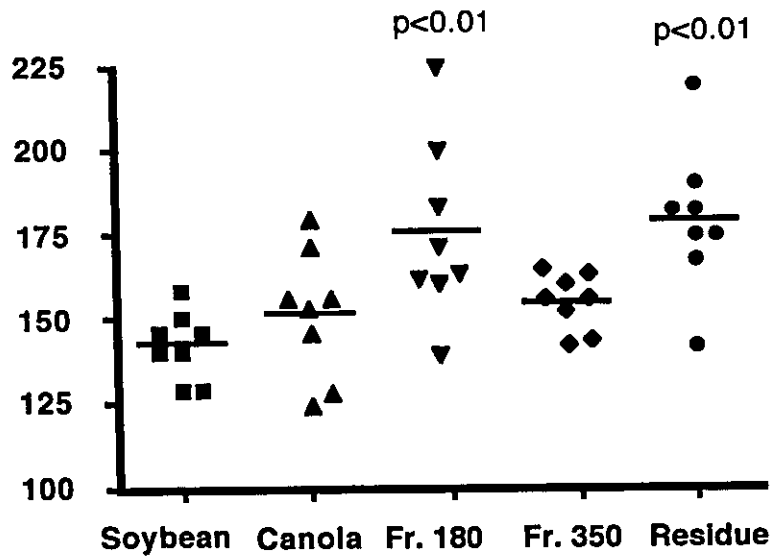


図3 カノーラ油分画8週間摂取後に解剖した動物の血中トリグリセリドおよび血糖の変化  
 Soybean、大豆油群；Canola、カノーラ油群；Fr. 180 および Fr. 350、カノーラ油の超臨界抽出 180bar  
 分画および 350bar分画群；Residue、抽出残渣群。  
 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、大豆油群に対して有意な差(Dunnett's検定)、 $N=8$ 。

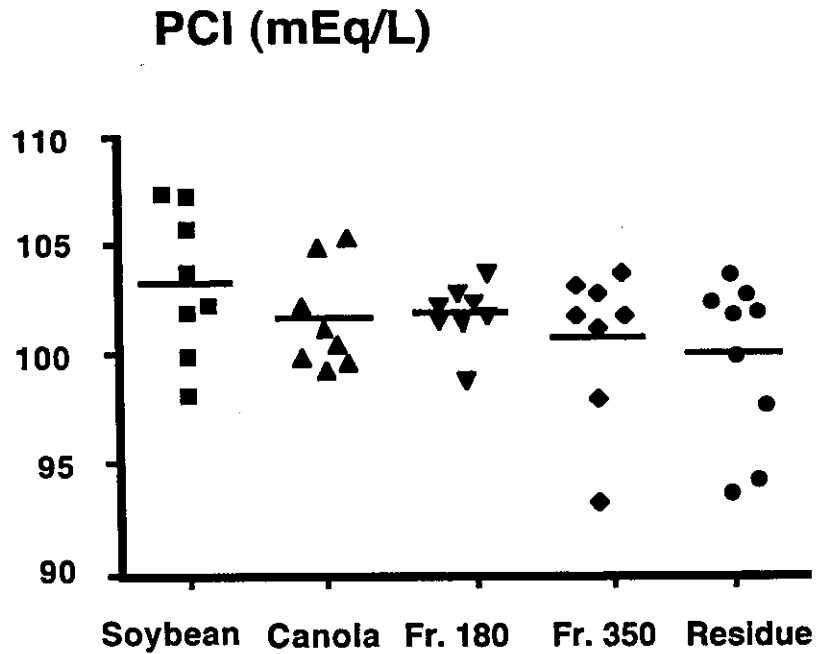


図4 カノーラ油分画8週間摂取後に解剖した動物の血中塩素イオン濃度の変化  
 Soybean、大豆油群；Canola、カノーラ油群；Fr. 180 および Fr. 350、カノーラ油の超臨界抽出 180bar 分画および 350bar 分画群；Residue、抽出残渣群。N=8。

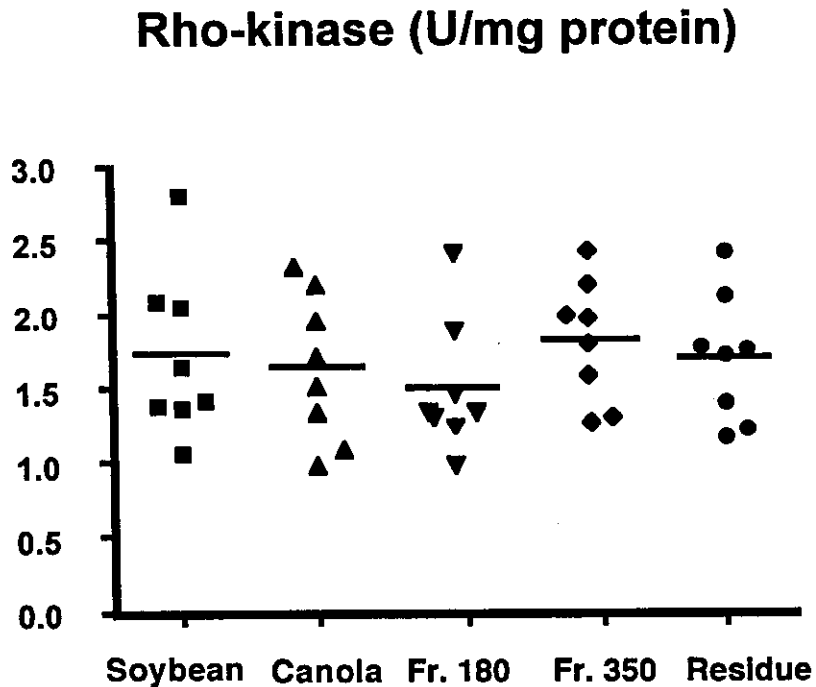


図5 カノーラ油分画8週間摂取後に解剖した動物の胸部大動脈における Rho-kinase 活性  
 Soybean、大豆油群；Canola、カノーラ油群；Fr. 180 および Fr. 350、カノーラ油の超臨界抽出 180bar 分画および 350bar 分画群；Residue、抽出残渣群。N=8。

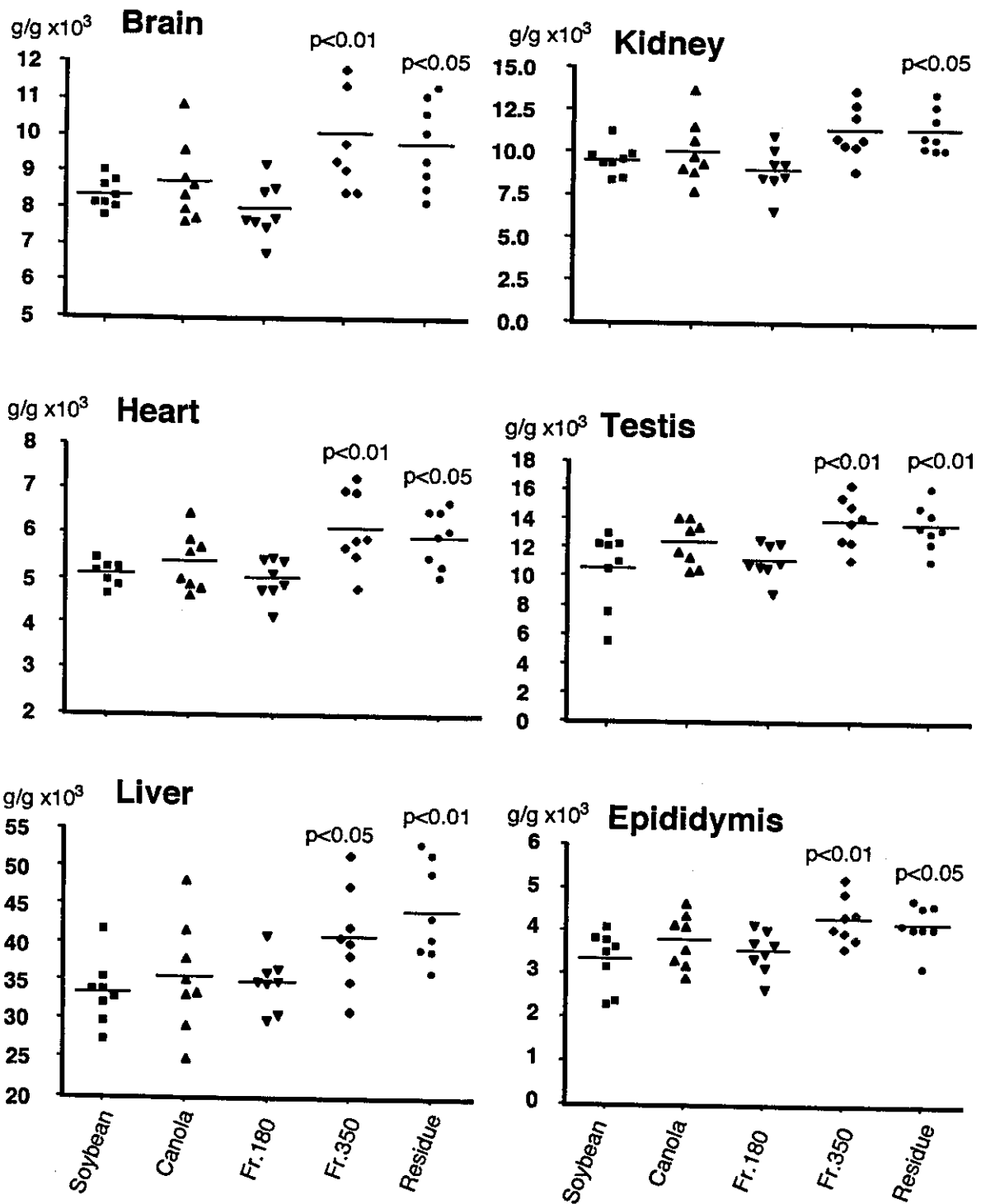


図6 カノーラ油分画8週間摂取後に解剖した動物において相対重量に変化が見られた器官  
Soybean、大豆油群；Canola、カノーラ油群；Fr.180およびFr.350、カノーラ油の超臨界抽出180bar  
分画および350bar分画群；Residue、抽出残渣群。

p < 0.05、p < 0.01、大豆油群に対して有意な差(Dunnett's検定)。N=8。



表 8 カノーラ油分画 8 週間摂取後に解剖した動物の病理所見(中等度以上の変化の頻度)

Group	<u>Soybean</u>	<u>Canola</u>	<u>Fr. 180</u>	<u>Fr. 350</u>	<u>Residue</u>
(Brain)					
Intracerebral hematoma			1		
Necrosis of cerebral cortex				1	
Gliosis, astrocytic			1		
(Heart)					
Myocardial degeneration/necrosis/fibrosis	3	2		2	2
Fibrous thickening of arteriolar wall				1	
(Lung)					
Edema			1		
(Spleen)					
Extramedullary hematopoiesis	4	4	4	3	5
Fibrous thickening of arteriolar wall			3	1	1
(Kidney)					
Chronic nephropathy	5	6	5	5	5
Fibrous thickening of arteriolar wall	2	2	4	1	3
(Testis)					
Degeneration of germ cell	2				
Fibrous thickening of arteriolar wall	1				
(Epididymis)					
Cell debris in lumen	2				
(Prostate)					
Infiltration of neutrophils	2				
(Adrenal gland)					
Necrosis of cortex	1				

Soybean、大豆油群；Canola、カノーラ油群；Fr. 180 および Fr. 350、カノーラ油の超臨界抽出 180bar 分画および 350bar 分画群；Residue、抽出残渣群。 中等度以上の異常所見が見られた例数。N=8。



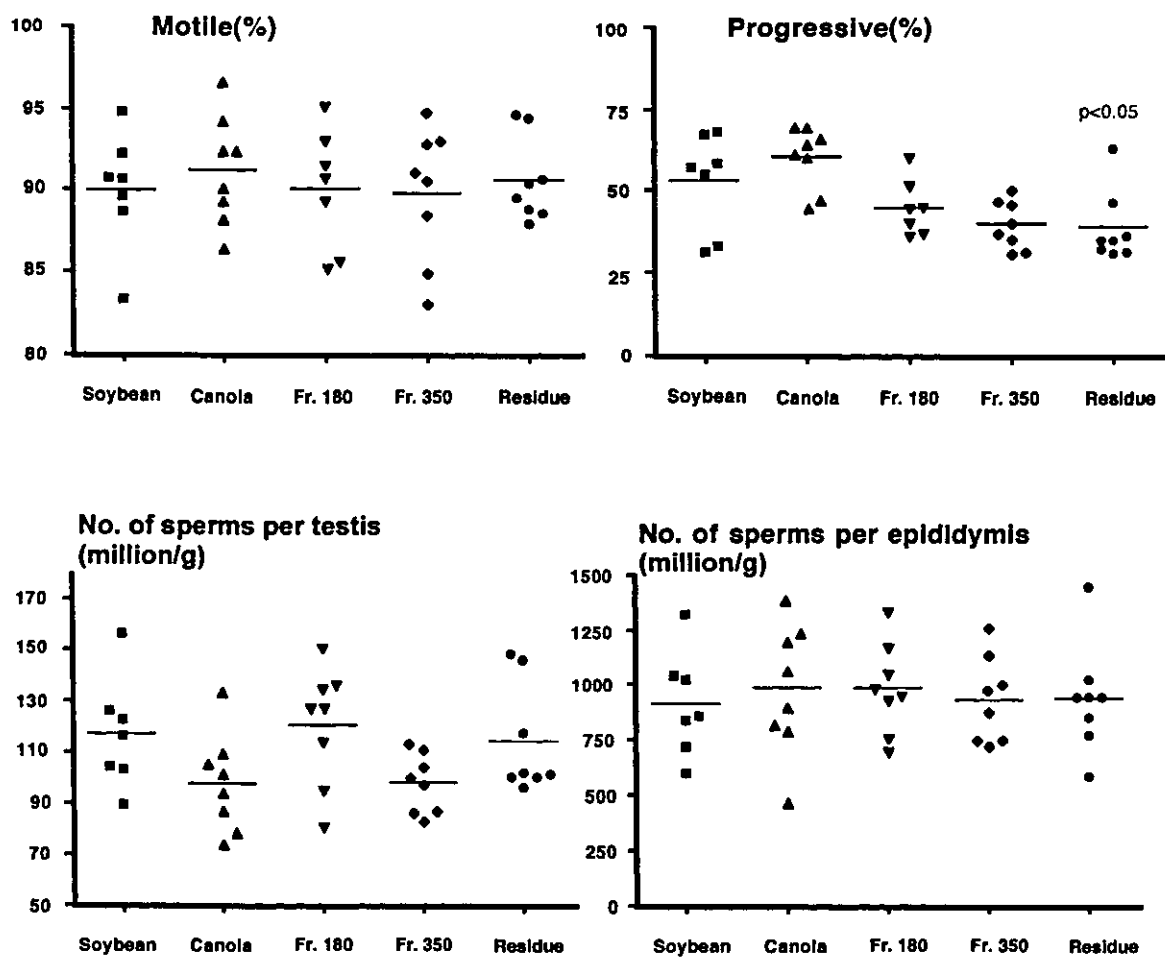


図7 カノーラ油分画を8週間摂取した動物における精子運動(上段)と精子数(下段)

Soybean、大豆油群；Canola、カノーラ油群；Fr. 180 および Fr. 350、カノーラ油の超臨界抽出 180bar 分画および 350bar 分画群；Residue、抽出残渣群。N=8。Motile、運動精子の割合；Progressive、直線性運動する精子の割合。

SHRSP の生存日数に対するカノーラ油ゲル濾過分画の作用

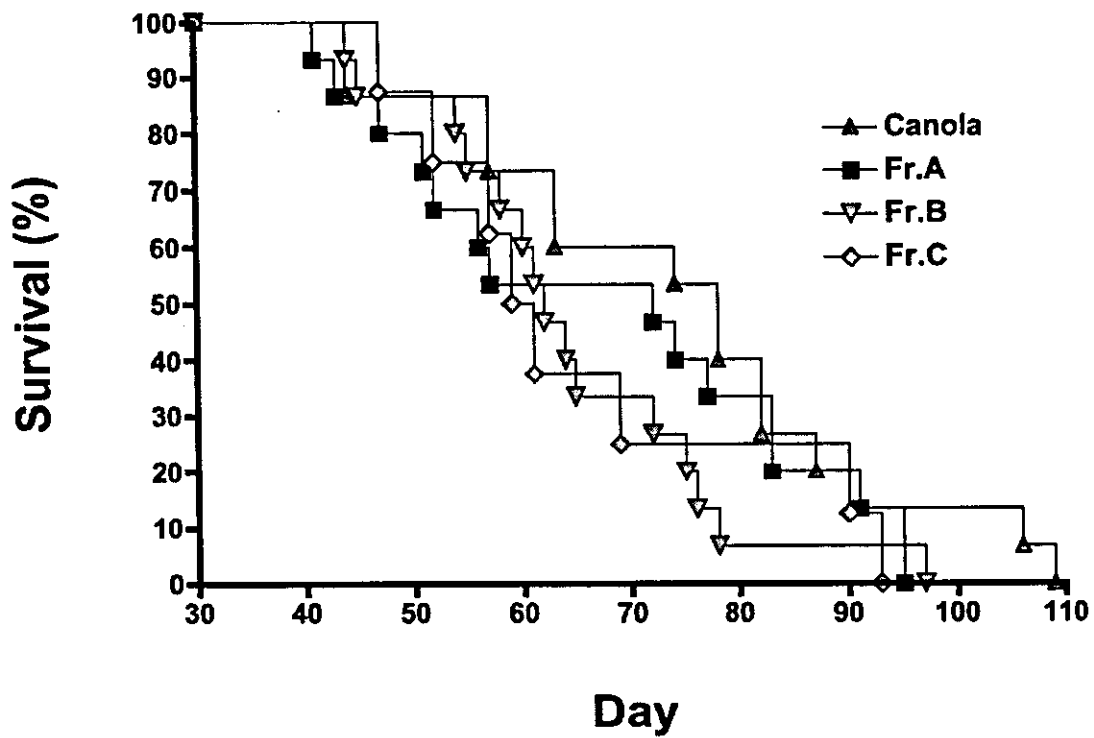


図8 カノーラ油のゲル濾過分画を与えた SHRSP の生存日数

縦軸は生存個体数の割合。横軸は混餌による油脂摂取開始後の日数。

Canola、カノーラ油群；Fr. A Fr. B および Fr. C、カノーラ油のゲル濾過分画、分子サイズの大きい順に、Fr. A 群、Fr. B 群および Fr. C 群。N=15、Fr. C 群のみ N=8。

平均生存日数：Canola=74±5 days (N=15)；Fr. A=68±5 days (N=15)；Fr. B=64±3 days (N=15)；Fr. C=66±6 days (N=8)。

植物ステロールと生存日数の関係

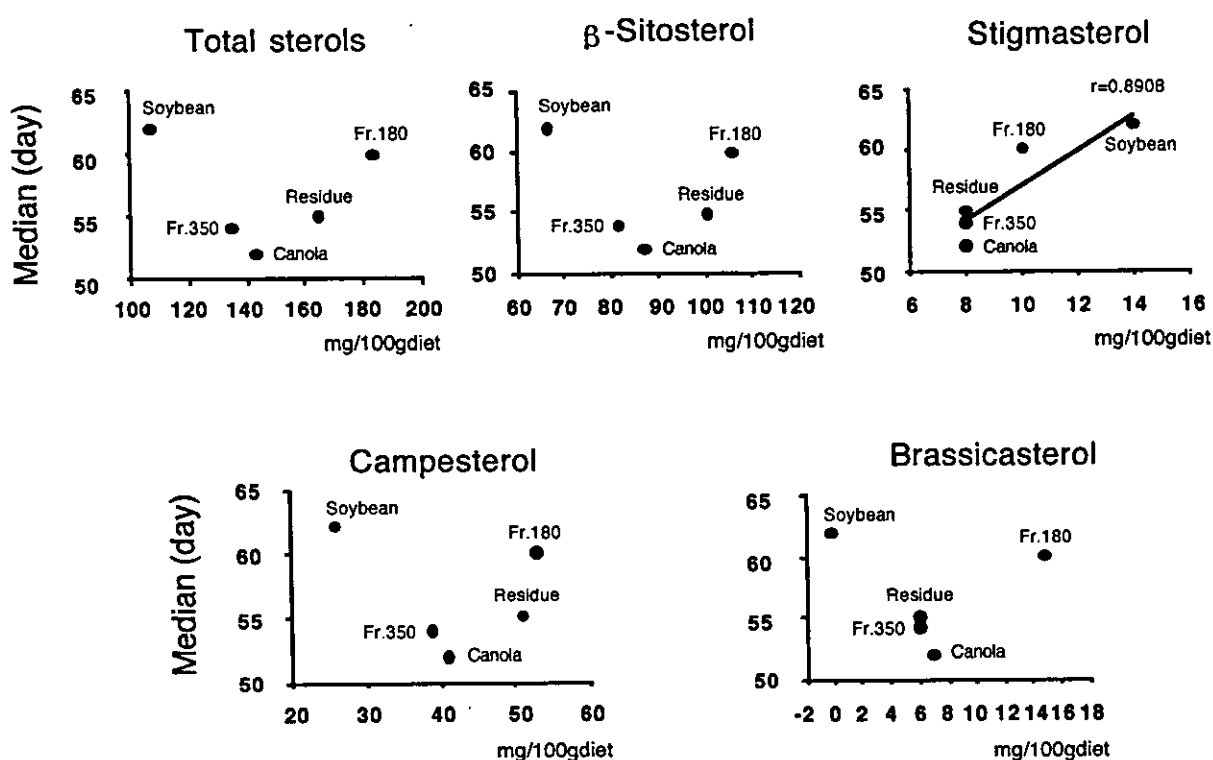


図9 カノーラ油およびその超臨界抽出分画添加飼料中の総植物ステロールおよび主要なステロール含量とそれらの飼料で飼育した SHRSF の生存日数中央値の関係  
Soybean、大豆油群；Canola、カノーラ油群；Fr. 180 および Fr. 350、カノーラ油の超臨界抽出 180bar 分画および 350bar 分画群；Residue、抽出残渣群。

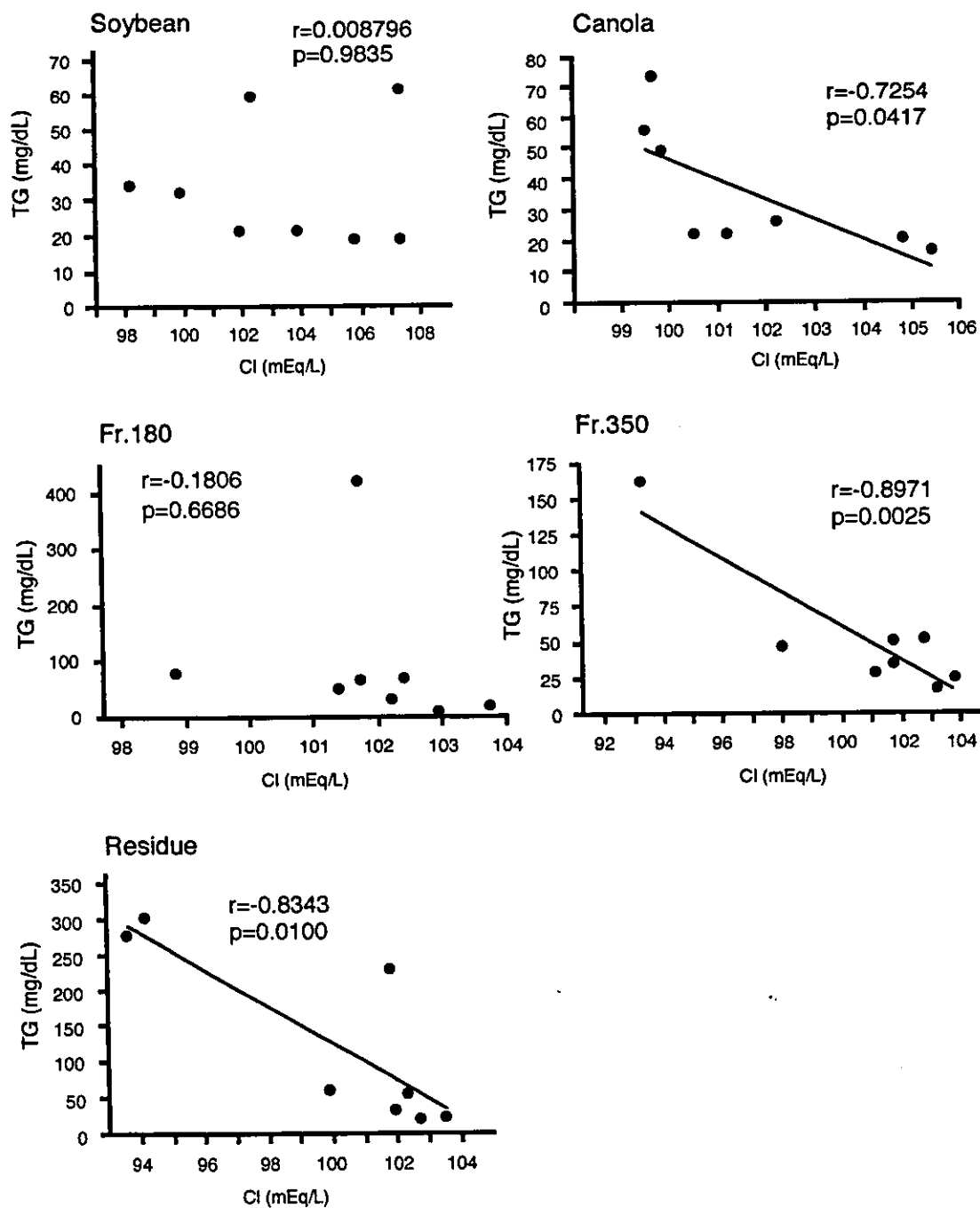


図 10 カノーラ油分画 8 週間摂取後に屠殺した SHRSP の血中トリグリセリド濃度と塩素イオン濃度の関係

Soybean、大豆油群；Canola、カノーラ油群；Fr. 180 および Fr. 350、カノーラ油の超臨界抽出 180bar 分画および 350bar 分画群；Residue、抽出残渣群。N=8。

プリオンタンパク発現に及ぼすカノーラ含有飼料の影響と  
in vitro におけるプリオンタンパクの発現制御機構

分担研究者 小野寄菊夫 名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授  
研究協力者 野々垣知行 名古屋市立大学大学院薬学研究科 修士2年

【研究要旨】

伝達性海綿状脳症は、ヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病や動物におけるスクレイピー、牛海綿状脳症(BSE)などの致死的な神経変性疾患である。これらの病気はその発症にプリオンタンパクが深く関与しているため、プリオン病とも呼ばれる。プリオン病患者やBSEの脳組織内には異常プリオンタンパク(PrP<sup>Sc</sup>)が蓄積している。

当研究室では食用油が脳卒中易発症性高血圧ラット(SHRSP)ラットの寿命に与える影響について調べてきた。食用油の中でも特にカノーラ(菜種)油にはSHRSPラットの寿命を著しく短縮することが判明し、カノーラ油に脂肪酸以外の有害因子が含まれている可能性が示唆された。この現象とプリオンタンパクの関連性を調べるため以下の仮説を立て実験を行った。

カノーラは、土壌中の硫黄(S)やモリブデン(Mo)などの重金属を吸収、蓄積しやすい傾向がある。そのためカノーラを摂食することで生体内の金属バランスが崩れる可能性がある。PrP<sup>C</sup>のN末側に存在する octapeptide repeat region は Cu と親和性が高く、通常は2~3個のCuと結合している。またPrP<sup>C</sup>はCuの細胞内輸送にも関与している。金属バランスの崩壊、特にCuの欠乏、Mn過剰の状態に陥れば、プリオンタンパクはPrP<sup>Sc</sup>様の性質を示すようになるという報告もある。この状態ではCu/Zn-SOD(super oxide dismutase)活性の低下を導き、酸化ストレスに対し脆弱になるかもしれない。そこで本実験では(1)大豆とカノーラの摂食によってPrP<sup>Sc</sup>が発生するか、あるいは生体内でのPrP<sup>C</sup>発現量に変化がみられるか、(2)培養細胞において金属イオン除去がPrP<sup>C</sup>の発現に影響するか、の2点について検討を行った。

(1) SHRSPラットに大豆油、カノーラ油、大豆粕、カノーラ粕を含む飼料を摂食させて寿命を測定したところ、カノーラ油摂食群は大豆油摂食群と比較し、有意に寿命が短かった。また大豆油摂食群よりもさらに両粕摂食群は寿命が長かった。両粕摂食群の間には寿命の差がなかった。これらの結果から、カノーラの寿命短縮有害因子はカノーラの油の方にあると考えた。次に先の4食餌群について16週齢の時点で脳を採取し、Western blotting法によりPrP<sup>C</sup>及びPrP<sup>Sc</sup>の発現量を調べた。その結果、PrP<sup>Sc</sup>はどの群にも検出されず、また両油摂食群のPrP<sup>C</sup>発現量にも差がなかった。次に両油摂食群について、血液中のCu濃度及びセルロプラスミン濃度を測定した。その結果、カノーラ油摂食群が大豆油摂食群と比較し有意に血中Cu濃度が高かった。またそれに比例し、血中セルロプラスミン濃度もカノーラ油摂食群で有意に高かった。

(2) 培養細胞としてマウス神経線維芽細胞株 Neuro2a、ヒト胎児性2倍体神経線維芽細胞株 MRC-5、MRC-5にSV40(Simian Virus)をトランスフェクションさせ不死化させた MRC-5 SVTG1、神経細

胞のモデル細胞株であるラット副腎髄質由来株化細胞 PC12、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 の 5 種類の細胞を用い、Western blotting 法によりそれぞれの PrP<sup>C</sup> 発現量を比較検討した。その結果、いずれの細胞にも PrP<sup>C</sup> の発現が見られたが、特に MRC-5 細胞において強い発現が認められた。一方、神経系の細胞株である Neuro2a や PC12 では発現の程度は比較的低いことが明らかとなった。

金属イオンとプリオンタンパクの関係を探るため、FBS(牛胎児血清)の金属を予め除いた FBS 存在下で培養すると、未処理 FBS 存在下で培養した時と比較し、MRC-5、Neuro2a 細胞では PrP<sup>C</sup> の発現量が高くなることがわかった。このことからなんらかの金属、あるいは金属を含むタンパク質が PrP<sup>C</sup> の発現制御に関与していると考えられた。

以上の結果、カノーラの寿命を短縮させる有害因子は粕ではなく油の方にあると考えられた。今回カノーラ油摂食では異常プリオン(PrP<sup>Sc</sup>)の発現は見られなかったものの、血中の Cu、セロプラスミン濃度が変化したため、カノーラ油が PrP<sup>C</sup> に影響を及ぼす可能性は完全には否定できなかった。培養細胞の実験からは、金属によって PrP<sup>C</sup> の発現量が増える可能性が示された。本研究では PrP<sup>Sc</sup> の検出法が適切であったかどうかの疑問が残っており、この点の解決が 1 つの課題である。今後この問題を解決すると共に、長期にわたるカノーラ油の摂食によりプリオンタンパクに及ぼす影響を検討していく必要があると思われる。

#### A. 研究目的

伝達性海綿状脳症は、ヒトにおける Creutzfeldt-Jakob 病(CJD)、致死性家族性不眠症(FFI)、Gerstmann-Straussler-Scheinker 症候群(GSS)や動物におけるスクレイピー、牛海綿状脳症(BSE)などの致死的な神経変性疾患である。これらの病気はその発症にプリオンタンパクが深く関与しているため、プリオン病とも呼ばれる。カリフォルニア州立大学のスタンリー・プルシナーが初めて「核酸ではなくタンパク質であるプリオンが病原体となってスクレイピーが伝染する」と唱えたのは 1982 年のことである(1)。当時この「スクレイピーのプリオン説」は奇抜なアイデアとして一部の学者からしか注目を集めなかったが、研究が発展するにつれて今日ではこのプリオン説が有力となっており、その分子機構も研究されつつある。

1986 年、英国で確認された BSE は、餌に混入していた肉骨粉が原因であり、疫学的調査によりこれが感染を広げているのではないかと推測された。そのため 1988 年、反芻動物の餌としての肉骨粉の使用が禁止された。しかしこの規制は、牛以外のブタ、ニワトリには、発病がみ

られなかったため適用されなかった。このためブタとニワトリ用の餌がウシの餌に各種の経路で混入することとなった。肉骨粉使用禁止前に肉骨粉を摂食した牛はすでに PrP<sup>Sc</sup> に感染しており、88 年以降も BSE が増加し続け、92 年にピークを迎えた。このことは動物衛生研究所(NIAH: National Institute of Animal Health)による各国 BSE 報告件数(Fig.1)からもよくわかる。その後 1996 年によくブタ、ニワトリ、サカナを含めた肉骨粉の使用が全面的に禁止された。

ヨーロッパの他の国では 2000~2002 年に BSE 発症数のピークを迎えている国が多い(Fig.1)。この理由としては、1)BSE に対して関心が集まり、また PrP<sup>Sc</sup> を検出する方法の確立、検出感度の上昇により検出数が増えてきた、2)96 年以前の肉骨粉の摂取により BSE が増えてきた、という可能性が考えられる。

日本では 2001 年 9 月に千葉県で第 1 頭目の BSE が発見された。第 1 頭目の BSE は 1996 年以前に輸入された肉骨粉からの PrP<sup>Sc</sup> 感染が約 5 年間の潜伏期で発病したと推測された。しかし日本でその後も BSE の発見が相次ぎ、現在では 14 頭確認されている。その中には肉骨粉が全面的に禁止された後に生まれた牛も含まれていることから、BSE の発症には肉骨粉以外の原因も考えられている。

最近、米国コロラド州の北部の中央地帯においてプリオン病の一種であるシカの慢性消耗性疾患(CWD)からヒトへ感染したと報告され、あらたな関心を集めている(3)。2001年アメリカで、CWDから感染したと考えられるシカ肉を食べた若年者のCJDが3例も報告されている(4)。ごく最近日本においてもイギリスに渡航経験のある男性が変異型CJD(vCJD)で死亡したことが報道されている。しかし、プリオン病が大きく注目されたのは、1996年3月にイギリスで10人のvCJDの患者が見出され、この新しいCJDははっきりした確証はないものの、BSEを発症した牛肉や牛製品を食したことが原因らしいと報告された。その後、イギリスでは100人以上のvCJD患者が確認され、ごく最近になってプリオン病患者の脳組織内に異常プリオンタンパク(PrP<sup>Sc</sup>)が蓄積していることがわかってきた。PrP<sup>Sc</sup>は1)プロテアーゼ分解酵素に対して部分抵抗性を示す、2)界面活性剤への不溶性、3)感染性、増殖性を有する、などの点で正常プリオンタンパク(PrP<sup>C</sup>)と異なる。この違いはアミノ酸配列の違いによるものではなく、タンパク質の高次構造が大きく異なることに起因する。PrP<sup>C</sup>が42%の $\alpha$ ヘリックスと3%の $\beta$ シート構造を有するのに対し、PrP<sup>Sc</sup>は30%の $\alpha$ ヘリックスと43%の $\beta$ シート構造を有することがわかっている(2)。これらのことから、プリオン病は立体構造の変化したPrP(PrP<sup>Sc</sup>)が脳神経細胞に凝集、蓄積することで細胞死を導き、神経障害などが起こると考えられている。

カナダのアルバータ州では近年BSEが3頭見つかった。しかし患畜とされ、食肉市場に出ることなく、処分されている牛の実数は不明である。アルバータ州はカノーラの主要な生産州である。カナダは世界の約1/5のカノーラを生産しており、うちアルバータ州はその1/3程度を生産している。日本国内で食用油として使用されているカノーラ油のほとんどはカナダから輸入されたものである。

当研究室では数種の食用油がSHRSPラットの寿命を短縮させることを明らかとしている(5-10)。食用油の中でも特にカノーラ油がこの寿命短縮活性が強く、

カノーラ油中にはなんらかの有害因子が含まれている可能性が示唆されている。

一方、カノーラは、土壌中の硫黄(S)やモリブデン(Mo)などの重金属を吸収、蓄積しやすい傾向があり、SやMoはCuと強く結合することも知られている。銅(Cu)含量の少ない地域や土壌中のS、Mo、マンガン(Mn)含量の多い地域で飼育された牛、羊、ヤギはCu欠乏症になりやすい(11,12)。そのような状況下でさらにカノーラ油粕を多量に摂取することにより、金属イオン代謝が障害を受ける可能性がある。PrP<sup>C</sup>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、通常glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)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。PrP<sup>C</sup>のN末側に存在するoctapeptide repeat regionはCuと親和性が高く(13)、通常は2~3個のCuと結合している。PrP<sup>C</sup>のノックアウトマウスはCu/Zn-SOD活性が低下することから(14,15)、PrP<sup>C</sup>は細胞外でCuと結合し、Cu/Zn-SODにCuを受け渡す役目を果たしていると考えられている。SやMoは、PrP<sup>C</sup>とCuとの結合を阻害し、PrP<sup>C</sup>を介した細胞内へのCuの取り込みを阻害する。また細胞外Cu含量の低下している状況下では、MnがCuと競合的にPrP<sup>C</sup>に結合し、Cu欠乏症を増強する。PrP<sup>C</sup>には抗酸化作用もあるが(14)、Mnと結合することで抗酸化作用は阻害される(16)。Cu欠乏症になった細胞は、Cuを必要とする酵素類、特にCu/Zn-SOD活性の活性低下をもたらす。Cu/Zn-SOD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、またMnが小胞体ストレスを誘導するため、アポトーシスを起こしやすくなる。立体構造の異なるPrP<sup>Sc</sup>の発現はその結果であるとも考えられる(17,18)。金属とPrPの関係を表す報告はいくつかあり、BSEの脳ではMn濃度が高く、Cu,Zn濃度が低いという報告もみられる(12)。

本実験でカノーラによるSHRSPラットの寿命短縮化に、このPrPの関与があるかどうかを検討するため、対照として大豆を選び、PrP<sup>C</sup>の発現や機能、あるいはPrP<sup>Sc</sup>の誘導等への影響があるかどうかを動物あるいは細胞を用いて比較、検討した。

## B. 研究方法

実験動物としては SHRSP ラットを用いた。SHRSP ラットはセアック吉富 (福岡)より購入し、SPF 環境下(室温  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、及び湿度  $50 \pm 10\%$ に制御されたクリーン環境)で繁殖、飼育を行なった。クローズドコロニーの状態 で交配し、出産したものを 用いた。交配開始から離乳まではペレット化した繁殖用飼料 CA-1(日本クレア株式会社、東京)を給餌した。

寿命測定実験には 3 週齢で離乳した雄を 1 週間ペレット化した普通飼料 CE-2(日本クレア株式会社、東京)で予備飼育した。4 週齢に達した時点で同腹子をできる限り各食餌群に振り分けるよう、また各食餌群の体重の平均値が等しくなるようランダムに割り振った。実験飼料は 4 週齢に達した時点から与え始めた。また、飲用水には限外濾過水に食塩濃度が 0.5% となるよう食塩(海水由来の >99%塩化 Na:財団法人塩事業センター、東京)を溶解したものを 用いた。

組織サンプル調製用の実験では、3 週齢にて離乳した雄を 2 週間ペレット化した普通飼料 CE-2 で予備飼育した。5 週齢に達した時点で同腹子をできる限りランダムに各食餌群に振り分けるよう、また各食餌群の体重の平均値が等しくなるように割り振った。実験飼料は 5 週齢に達した時点から与え始めた。飲用水には限外濾過水を用いた。

実験飼料について、ラット普通飼料 CE-2 中には 12~13%の大豆粕が含まれているので、これを大豆粕の飼料として 用いた。またカノーラ粕の飼料は、日本クレアに依頼し CE-2 中の大豆粕の代わりにカノーラ粕を加えて調製してもらったものを 用いた。油の飼料は CE-2 に各種油脂を重量比で 10% となるよう加えて、ペレット化した餌(日本クレア)、あるいは研究室で調製した餌(SK ミキサー 101S、エスケーミキサー、兵庫)を用いて、粉末普通飼料 CE-2 と油脂が均一になるまで最低速で 30 分間練合し、さらに蒸留水を  $\{(CE-2+油脂)kg \times 0.7L\}$  加えて 10 分間練合し、およそ 100 g/個の団子状に製したものを 用いた。カノーラ油は味の素(株)(東京)、カノーラ粕は木徳神糧(株)(横浜)より購入し、大豆油は太田油脂

(株)(岡崎)から供与された。ペレット化した飼料は  $4^{\circ}\text{C}$ で真空容器に、研究室で調製した団子状飼料は  $-20^{\circ}\text{C}$ 、窒素封入下で保存した。

寿命測定実験では生涯プラスチック製床敷ケージにて 3~4 匹/ケージで飼育した。

その他の実験では、親の交配から仔の実験飼料給餌開始まで、プラスチック製床敷ケージを使用し、実験開始から 16 週齢時までは金属製ハンギングケージにて 3~4 匹/ケージで飼育した。

## C. 研究結果

### 第 1 章 カノーラが SHRSP ラットに及ぼす影響

#### 1-1 カノーラが寿命に及ぼす影響

大豆油、大豆粕およびカノーラ油、カノーラ粕を含んだ餌について。摂取させた実験飼料である大豆油(Soy oil)、カノーラ油(Can oil)、大豆粕(Soy cake)、カノーラ粕(Can cake)を含んだ餌の中に含まれる脂肪酸の組成と含量を Table 1 に示した。使用した粕は脂肪酸含量は少なく、ヘキサン脱脂粕であることがわかった。

これらの実験飼料と共に 0.5%食塩水を、雄性 SHRSP ラットに 4 週齢から自由摂取させ、生存率を測定した。実験動物の飼育は SPF 環境下 (室温  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、及び湿度  $50 \pm 3\%$ )で行った。結果は Fig.2 に示した。Table 2 に示すように、大豆油、カノーラ油は有意な差が見られた。また大豆油の群よりもさらに両粕群は寿命が長かった。

#### 1-2 カノーラが脳プリオンタンパクに及ぼす影響

カノーラが SHRSP ラットの脳プリオンタンパクにどのような影響を及ぼすのかを検討した。

雄性 SHRSP ラットを基本飼料 CE-2 で 3 週齢から 2 週間予備飼育した後、5 週齢から大豆白絞油(Soy oil)、カノーラ油(Can oil)、大豆粕(Soy cake)、カノーラ粕を含む(Can cake)の餌を給餌し、16 週齢の時点で脳を採取した。個々のラットから脳ホモジェネートを作成し、群ごとに脳ホモジェネートをプールした。そして群ごとに Western blot を行い



脳中の PrP<sup>Sc</sup> 発現の有無、および PrP<sup>C</sup> 発現量の違いを検討した。

PrP<sup>Sc</sup> は多くの場合、立体構造の変化により、タンパク分解酵素 Proteinase K (PK) に対して部分的に耐性を獲得することが明らかにされている。そこでそれぞれのサンプルを PK(40mg/mL) で処理したところ、Fig.3 に示すようにバンドは完全に消失し、PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった。また PrP<sup>C</sup> は群間で大きな差が認められなかった。さらに油摂取群だけ同様の飼育条件で育て、個々の SHRSP ラット脳について Western blot を行って見たが、Fig.4 に示すとおり、個々においてもほとんど差が見られなかった。

### 1-3 カノーラが血中 Cu 濃度に及ぼす影響

Cu は生体内で骨代謝、造血などに重要な役割を果たしている。そのため生体にとって微量(2.5mg/day)の Cu は必須である。経口摂取された Cu は、その約半分が腸で吸収され、アルブミンと結合して肝臓に運ばれる。肝臓で貯蔵されるほか、セルロプラスミンと結合して血中に分泌される。また Cu は主として胆汁中に排泄され、体外へ出て行く。

生体内では Cu の 70% が血漿中に存在し、血清中では約 94% がセルロプラスミンと、また約 4% がアルブミンと結合している。セルロプラスミンは電気泳動上  $\alpha 2$  グロブリン分画に属し、分子量約 13.4 万、青色の糖蛋白で、1 分子当たり 6~7 個の Cu イオンと結合する。そのため血清 Cu とセルロプラスミンのレベルは強い正の相関を示す。セルロプラスミンは Cu の輸送タンパクとして働いているほか、活性酸素種のスカベンジャーとして抗酸化作用をもつと考えられている。

プリオンタンパクは通常 Cu と結合しており、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、プリオンタンパクを介した細胞内への Cu の取り込みを阻害する。そのため細胞内へ Cu を取り込むことができなくなり、血中の Cu が増加すると考えられる。このような背景から、カノーラ油が血中の Cu 及びセルロプラスミンに及

ぼす影響を検討した。

血中 Cu 濃度を原子吸光法により測定したところ、カノーラ油を 11 週間摂取させた群は大豆油を摂取させた群と比較して有意に高くなった(Fig.5)。またセルロプラスミンの量も血中 Cu 濃度と同様にカノーラ油を摂取させた群は大豆油を摂取させた群と比較して有意に高くなった(Fig.6)。

## 第 2 章 プリオンタンパクの発現機構

### 2-1 培養細胞の PrP 発現量の違い

BSE 問題が顕在化し、プリオン病が感染性を持つことから、食品、医薬品関係などさまざまな分野で安全対策がとられている。この中で医薬品・化粧品の安全対策としては、1996 年に WHO がスクレイピーのデータをもとに感染性の程度により臓器を 4 つのカテゴリーに分類した。これを EU 医薬品庁が一部修正したものが Table 3 である。これによると臓器の中では中枢神経系は感染性が高い傾向が見られる。また免疫系の臓器も一部高いリスクを有している。これは臓器によって PrP<sup>C</sup> の発現量に差があるためである可能性が考えられる。プリオンタンパクの発現機構を調べるにあたり、臓器レベルで解析するのは難しいことから、細胞レベルでの検討を行うこととした。まず、どのような細胞で PrP<sup>C</sup> が多く発現しているか、様々な培養細胞を用いて調べることにした。培養細胞としてマウス神経線維芽細胞株 Neuro2a、ヒト胎児性 2 倍体線維芽細胞株 MRC-5、MRC-5 に SV40(Simian Virus)をトランスフェクションさせ不死化させた MRC-5 SVTG1、神経細胞のモデル細胞株であるラット副腎髄質由来株化細胞 PC12、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 の 5 種類の細胞を用い、Western blot によりそれぞれの PrP<sup>C</sup> 発現量を比較検討した(Fig.7)。総タンパク量をあわせて検討したところ、いずれの細胞にも PrP の発現が見られたが、特にヒト線維芽細胞株 MRC-5 において強い発現が認められた。一方、神経系の細胞株である Neuro2a や PC12 では発現の程度は比較的低いことが明らかとなった。

## 2-2 金属によるプリオンタンパクの発現制御

プリオンタンパクのN末側に存在する octapeptide repeat region は Cu との親和性が高く(13)、通常は2~3個の Cu と結合している。PrP<sup>C</sup>は Cu との結合により SOD 様活性を有し、抗酸化作用を示すことが知られている。PrP<sup>C</sup>は Mn、Zn、Ni とともに親和性が見られ、Cu と置換して結合することができる(16)。Mn と置き換わると PrP<sup>C</sup> の SOD 活性は著しく低下するとともに、PK に対して抵抗性を示すようになる。また Cu を過剰に加えると PrP<sup>C</sup> の発現量が上昇すること(24)、Cu の特異的なキレート剤をプリオン感染動物に投与するとその発症までの日数が延長することなどが報告され(25)、プリオンタンパクの発現、及びプリオン病の発症には金属イオンが密接に関係していると考えられる。そこで今回培養液中に添加されている FBS 中に含まれる金属を除去するため、2つの方法を試みた。1つは無血清培地を用いた培養する方法、もう1つは金属イオンのキレート剤が支持体に結合した Chelex100 を用いて FBS 中の金属を取り除き、その FBS を用いて培養する方法である。そこで培養細胞として神経系の細胞である Neuro2a、PC12 と PrP<sup>C</sup> の発現量が一番高かった MRC-5、SV40 を用いて不死化した MRC-5 SVTG1 を用い、上記の2つの条件で培養し、PrP<sup>C</sup> の発現を調べた。

まず 24h 無血清培地で培養し、細胞内の2価金属イオンを減らした後、2日間 FBS10%を含む培地、無血清培地、及び Chelex100 処理をした FBS を 10%含む培地で培養した。その結果、Fig.8 に示すように、MRC-5、Neuro2a 両細胞では Chelex 処理をした FBS を 10%含む培地で培養することで PrP<sup>C</sup> の発現量の上昇が見られた。また、PC12、MRC-5 SVTG1 両細胞は Chelex 処理の有無に関わらず 10%FBS を含む培地で培養することで PrP<sup>C</sup> は同程度に発現していることがわかった。一方無血清培地で培養することにより、いずれの細胞においても血清 10%添加時に比べ PrP<sup>C</sup> の発現が増強していることが見出された。

## D. 考察

### 第1章

Table 2 に示すように、大豆油飼料摂食群、カノーラ油飼料摂食群との間には生存率に有意な差が見られた。また大豆油飼料摂食群よりもさらに大豆、カノーラ両粕摂食群の寿命は長いことがわかった。油摂食群よりも粕摂食群の方が寿命が長くなった原因の1つとして、摂食カロリーの違いが考えられる。米国の14年間に及ぶ犬に与える餌の違いと健康に関する研究によれば、カロリー制限された犬は制限されなかった犬より平均寿命が延長し、変形性関節症にも陥りにくくなることが示されている(19)。また、自己免疫疾患発症マウスを用いた実験では、カロリー制限により寿命は延長し、さらに脂肪摂取量を制限することでさらに延長が見られた、という報告もある(20)。今回実験で用いた餌のカロリーを粗蛋白質 4、粗脂肪 9、可燃性無窒素物 4 で計算してみると、油の飼料は 398.0kcal/100g diet、粕の飼料は 342.2kcal/100g diet となった。このカロリーの違いが SHRSP ラットの寿命に影響したのかもしれない。

カノーラ油飼料摂食群とカノーラ粕摂食群との間には寿命に有意な差が見られたのに対し、大豆粕摂食群とカノーラ粕摂食群の間には有意差は見られなかった(Fig.2, Table 2)。この結果は、カノーラの寿命短縮因子は脂溶性であることを示している。寿命を短縮させる有害因子が胎盤あるいは授乳を介して親から仔へと移行する可能性が示唆された(21)ことから、脂溶性である可能性が高い。また脂溶性ならば BBB を通過して脳にも影響を及ぼしている可能性も考えられる。

Fig.3のPK処理をした脳ホモジェネートでは PrP バンドが検出されなかったことから、11週間の種々の飼料摂食では PrP<sup>Sc</sup>は誘導されない、あるいは誘導されていても極微量で検出限界以下であったと考えられる。また各群間の PrP<sup>C</sup> の発現量はバンドの濃さに若干の違いは見られたものの、4群の間で大きな差は見られなかった。Fig.4の結果から、大豆油、あるいはカノーラ油飼料摂食群での PrP<sup>C</sup> の発現量は個々のラットの脳で調べても違いは認められなかった。プリオン病の発症の原

因は未だ不明な点が多く、PrP<sup>Sc</sup>による感染でなければ、その発症にはある程度の長い期間が必要であると考えられている。今回の実験のように 11 週間という短い期間では変化が現れなかったが、更に長い期間カノーラ油を摂取することにより PrP<sup>Sc</sup> が誘導される可能性は否定できない。

カノーラ油飼料摂食群では大豆油飼料摂食群と比較して血中の Cu 濃度が高くなることが明らかとなった。また血中 Cu 濃度に相関して、セルロプラスミン濃度の有意な上昇も認められた。カノーラの外殻繊維には金属をキレートするような物質が含まれていることが以前報告されているが(22)、大豆粕摂食群(n=4)、カノーラ粕摂食群(n=6)の血中 Cu 濃度はそれぞれ 151±12、165±23 mg/dL (平均値±SEM)と、大豆油飼料摂食群との間に有意な差は認められず、カノーラ油飼料摂食群のみ有意な上昇が認められた。カノーラ油飼料摂食群が他の群に比べて血中 Cu 濃度が高くなった原因として、以下の3つの可能性が考えられる。

1) 先述のカノーラに含まれる金属のキレート活性が粕ではなく油の方に移行しやすく、そのため血中で Cu をキレートし、細胞内への吸収を阻害した。

2) カノーラに含まれる寿命短縮因子(おそらくそれは脂溶性)が PrP<sup>C</sup>の Cu の細胞内取り込み作用を阻害することにより、血中 Cu 濃度が上昇した。そこで細胞内に Cu を取り込もうと体内に貯蔵されている Cu を運搬するため、セルロプラスミンの量が増加した。

3) カノーラが硫黄(S)やモリブデン(Mo)を多く含有し、これが PrP<sup>C</sup>と Cu との結合を阻害し、細胞内 Cu の取り込み低下による血中 Cu 濃度が上昇した。

いずれも未だ推論の域を脱していないので、さらなる検討が必要であると思われる。

カノーラに Cu を添加することでラットに対するカノーラの毒性(摂食量減少、体重減少、肝臓重量の増加、甲状腺肥大等)が軽減したと報告されている(23)。また、in vitro において Cu を投与すると PrP<sup>Sc</sup> 感染によるプリオン病の発症が遅

れるという報告(24)や、逆にマウスに Cu のキレート剤を投与するとプリオン病の発症が遅れるという報告(25)もなされており、Cu がプリオン病の発症や増悪に関与している可能性は高いが、Cu の量が多い方が良いのか、低い方が良いのかは今のところ結論は出ていない。従ってカノーラ摂食群で血中 Cu 濃度が高くなり、この状態が続くことで PrP<sup>Sc</sup> が誘導されるのか、あるいは抑制されるのか、現在のところ不明である。

## 第2章

Fig.8 の結果から、Neuro2a、MRC-5 両細胞では Chelex100 処理により除かれたものが PrP<sup>C</sup> の発現量を制御していることが示唆された。Chelex100 処理では何らかの金属イオン、あるいはその金属イオンに結合しているタンパク質が除去(不活性化)されている可能性が考えられ、金属イオンにより PrP<sup>C</sup> の発現が制御を受けている可能性が示唆された。

PrP に関する論文の中で以下のものが、金属と PrP の関係を示している。Neuro2a 細胞に外から CuSO<sub>4</sub> を加え 48h 処理すると、濃度依存的(0, 100, 300mM)に PrP<sup>C</sup> の発現量がタンパクレベルでは増加するのに対し、mRNA は変化しなかったという報告(24)。GN11 細胞(LHRH 分泌神経細胞株)に外から 40mM の CuSO<sub>4</sub> を加えると時間依存的(0, 24, 48, 72, 96h)に PrP<sup>C</sup> の発現量がタンパクレベルでは減少し、特に 24h で約半分に減少し、96h 処理をすると mRNA は CuSO<sub>4</sub> 濃度依存的(5-40mM)に PrP<sup>C</sup> が減少すると報告している。この時、40mM の Mg や Zn を加えてもタンパク、mRNA いずれでもその発現量に変化は見られなかったと述べている(26)。上記の2つの論文は、PrP<sup>C</sup> が金属の中でも特に Cu によってその発現が制御されていることを示している。細胞の違いこそあるが、この2つの報告が同じ現象を示しているとすれば、ある一定濃度以下の Cu では PrP<sup>C</sup> の発現は低下するが、それ以上の Cu では逆に毒性のためか、PrP<sup>C</sup> 発現が増強する可能性が考えられる。もちろん細胞種の違いによって PrP<sup>C</sup> 発現に及ぼす Cu の作用が異なっている可能性も十分考えられる。

Chelex100 処理した FBS 中の Cu 濃度は原子吸光法により測定してみると、未処理の

FBS の約 60%に低下していることが明らかとなった(未処理 FBS:22.2mg/dL, Chelex100 処理 FBS: 13.7 mg/dL)。Fig.8の結果は、血清中の約 40%の Cu が除かれたことで PrP<sup>C</sup> 発現が上がった可能性が考えられる。無血清培地で Cu 濃度がほぼ0になった状態で PrP<sup>C</sup>の発現量がさらに増加する結果は、その仮説を支持するものである。

一方、PC-12 細胞は Neuro2a、MRC-5 細胞と異なり Chelex100 処理 FBS で 24h 培養しても変化が見られなかったことから、PrP<sup>C</sup> 発現の Cu の濃度による制御は細胞種によってその感受性が異なっていると考えられる。

MRC-5 SVTG1 細胞も Chelex100 処理による PrP<sup>C</sup> 発現の変化はみられなかった。親株の MRC-5 と比較するとその増殖が速く、また形状も異なる。PrP<sup>C</sup> の発現は細胞周期、特に G1 期に依存しているという報告(27)も見られることから、SV40 でトランスフォームしたことにより細胞周期が変化したため、PrP<sup>C</sup> 発現の変化が認められなかった可能性もある。

#### E. 結論

今回の実験から以下のことが示された。

- 1) カノーラに含まれる SHRSP ラット寿命短縮因子は粕ではなく油中に存在する。
- 2) 脳内異常プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) は 11 週間の大豆及びカノーラの油、または粕を含んだ飼料の摂取では検出できなかった。
- 3) 脳内正常プリオンタンパク (PrP<sup>C</sup>) の発現量も 11 週間の大豆油及びカノーラ油含有飼料の摂取では変化がなかった。
- 4) 血中 Cu 濃度はカノーラ油飼料摂食群の方が大豆油飼料摂食群に比べて有意に高かった。また、血清中のセロプラスミン濃度もカノーラ油飼料摂食群の方が有意に高かった。
- 5) マウス神経線維芽細胞株 Neuro2a、及びヒト胎児性肺線維芽細胞株 MRC-5 において、金属イオンキレート剤処理 FBS で培養することにより、細胞内

PrP<sup>C</sup> の発現が増加したことから、何らかの金属イオン濃度がその発現を制御していることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

本研究の結果からは健康に対する危険性との関連を示すことは出来ない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Inoue, Y, Kitagawa, M., Onozaki, K., and Hayashi H.

Contribution of the constitutive and inducible degradation of Smad3 by the ubiquitin-proteasome pathway to transforming growth factor  $\beta$  signalling.

J. Interferon Cytokine Res. 24: 43-54, 2004.

2. Tyamaki, A., Hayashi H., Nakajima H., Takii, T., Katagiri D., Miyazawa, K., Hirose, K., and Onozaki, K.

Polyaromatic hydrocarbon increases mRNA level for interleukin 1 beta in human fibroblast-like synoviocyte line via aryl hydrocarbon receptor.

Biol. Pharm. Bull. 27(3): 407-410, 2004.

3. Matsumura, T., Hayashi, H., Takii, T., Thorn, C.F. Whitehead, A.S., Inoue, J. and Onozaki, K. TGF $\beta$  down-regulates IL-1 $\alpha$ -induced functional TLR2 expression in murine hepatocytes.

J. Leuk. Biol. 75(6):1056-1061, 2004.

4. Ootsubo, M., Chiba, T., Kobayashi, Y., Hayashi, H., Hayashi, A., and Onozaki, K.

Synthesis and biological activities *in vitro* and *in vivo* of glycosylated human interleukin-1 $\alpha$  neoglyco IL-1 $\alpha$ . coupled with N-acetylneuraminy-galactose.

Glycoconjugate J. 20(2):119-131 2004.