

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石 上 紀 明

T2トキシシン (T2) はFusarium属真菌により産生されるマイコトキシシンで、ヒト、家畜、家禽に、リンパ・造血機能の抑制、消化器症状、神経症状、繁殖障害、新生仔奇形などの中毒症状を引き起こし、公衆衛生・家畜衛生上重要な問題となっている。Fusarium属カビ毒の毒性機構についてはこれまで多数の動物種で様々な実験がなされているが、胎仔毒性の発現のメカニズムについては不明な点が多い。申請者はT2による胎仔毒性の特徴とその発現メカニズムを明らかにした。

1) 発育胎仔におけるT2誘発アポトーシス

妊娠11日目のマウスにT2を経口投与し、24時間後に胎仔を採取、形態的検索を行った。T2投与群では終脳、間脳、髄脳、脊索周囲の椎板後半の細胞、舌後部から咽喉頭領域、気管および顔面の間葉系細胞に、核濃縮や核崩壊像が観察された。終脳では核濃縮や核崩壊を示す神経上皮細胞はperi-ventricular zoneに観察された。TUNEL法ではこれらの細胞核に一致して陽性反応が示され、電顕的観察では核クロマチンの凝集、核の断片化などのアポトーシスに特徴的な変化が観察された。以上のことから、T2誘発胎仔組織細胞死はアポトーシスであることが明らかになった。また細胞増殖活性の評価では、T2投与群とコントロール群間でPCNA陽性細胞数に有意差はみられなかった。TUNEL陽性領域とPCNA陽性領域は同一であった。従って、T2の標的は細胞増殖活性の高い細胞と考えられた。

2) T2の投与時期による胎仔組織のアポトーシスおよび骨格奇形の誘発

妊娠8.5~16.5日目にT2を投与し、24時間後の胎仔組織アポトーシスの有無と、妊娠17.5日目における胎仔骨格奇形の有無を調べた。さらに蛋白合成阻害剤cycloheximide (CHX) をT2投与直前に投与し、17.5日目に剖検して胎仔の骨格奇形について検索した。T2投与群では神経上皮細胞、リンパ系細胞、造血系細胞、軟骨芽細胞、腎臓被膜直下の未分化細胞、未分化間葉系細胞、間質細胞等でアポトーシスの発現が認められたが、その発現頻度や組織分布はT2の投与時期によって異なっていた。従って、T2による胎仔組織アポトーシスの発現には胎仔の成長に伴う何らかの因子が関与している可能性が示唆された。骨格観察の結果、骨化遅延、肋骨湾曲、肩甲骨短縮が、観察された。しかし、肋骨湾曲が生じる部位でのTUNEL陽性細胞数増加は認められなかった。またCHX前処置により骨格奇形の発生率が顕著に低下した。従って、T2投与新生仔の骨格奇形は細胞のアポトーシスが原因ではなく、ある種の蛋白の発現が関与している可能性が示唆された。

3) アポトーシス関連遺伝子の発現と蛋白合成阻害剤の影響

T2投与胎仔の終脳において、CHX前処置のアポトーシス発現に対する影響とアポトーシス関連遺伝子の発現を調べた。T2投与の12時間後にアポトーシスが観察され、アポトーシス細胞数は24時間後に

ピークに達し、その後減少した。このアポトーシスはCHX前処置によって顕著に抑制された。RT-PCR法を用いて胎仔終脳におけるFas、*bcl-2*、*caspase-3*、*c-fos*、*c-jun*、*c-myc*および*p53*のmRNAの発現量の推移を調べたところ、T2投与後4から9時間目にFasの発現量の増加が認められた。一方、Fas欠損ミュータント *lpr/lpr* 妊娠マウスにT2を投与したところ胎仔終脳でのアポトーシスは抑制されなかった。以上から、検索した以外の遺伝子産物の発現がアポトーシスの発現に関与している可能性が示唆された。

本研究によりT2が胎仔組織にアポトーシスを誘発することが初めて明らかにされた。このアポトーシスの誘導には検索したアポトーシス関連遺伝子以外の何らかの蛋白の発現が関与していることが強く示唆された。本研究の成果は、妊婦や妊娠動物におけるT2中毒のメカニズムの解明のみならず、広く化学物質による発生毒性の発現機構を解明するための基礎資料として極めて重要であると考えられる。したがって、審査委員一同は申請者が博士（獣医学）の学位を授与されるにふさわしいと判断した。