

## 論文の内容の要旨

論文題目 Pathological studies on calcinosis in ruminants due to plant poisoning  
(植物中毒による反芻動物の石灰沈着症に関する病理学的研究)

氏 名 Eduardo Juan Gimeno

地方病性石灰沈着症 Enzootic calcinosis (EC) は軟部組織への石灰沈着および体調の悪化を特徴とする放牧家畜の慢性植物中毒で、これまでに原因となる植物が多く、南米での EC の発生地域は *Solanum glaucophyllum* (Sg) および *Nierembergia veitchii* (Nv) の自生地の分布と一致しており、EC はブエノスアイレス地方のサラド川周囲の水はけの悪い低地では非常に重篤な問題となっている。また、Sg はアルゼンチン、ブラジル、ボリビア、パラグアイおよびウルグアイにまたがるラプラタ川流域の広い範囲にも自生している。Sg や Nv には 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) がグリコシド誘導体として大量に含まれているほか、ビタミン D<sub>3</sub> や 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> なども含まれている。

中毒動物で早期にみられる兆候としては硬直と削瘦が挙げられ、血管系、肺およびその他の臓器に転移性石灰沈着がみられる。軟部組織では石灰化に先立ち、弾性線維の断片化、プロテオグリカンの細胞外への蓄積および間葉系組織の化生がみられるが、皮膚に関しては、被毛が退色し、粗剛になるという報告がまれにみられるのみで、詳細な病理学的検索報告はない。

ビタミン D はカルシウムの代謝だけでなく、細胞の分化・増殖にも関わっている。本研究は、Sg あるいは Nv による反芻動物の自然発生性あるいは実験誘発性石灰沈着症について、皮膚、大動脈および肺の病理学的検索を通じて、ビタミン D 過剰症の細胞分化に与える影響および EC の発現機序を明らかにすることを目的に実施した。論文は以下の 3 章から成る。

### 第 1 章 牛における *Solanum glaucophyllum* 中毒の皮膚構造および細胞の分化・増殖への影響

*Solanum glaucophyllum* (Sg) の葉の乾燥粉末(25g/head/day x 2/week) を水とともに最長 8 週間強制経口投与した牛および無処置対照牛の皮膚を組織学的に検索した。また、細胞の分化・増殖については cytokeratin 10, 11, involucrin および proliferating cell nuclear antigen (PCNA) を指標に、免疫組織学的に検索した。

Sg 中毒牛の皮膚では、主に中間分化段階にある細胞層の有意な減少による表皮の菲薄化および皮脂腺および汗腺の減数と萎縮がみられた。毛包周期は anagen 期から tellogen 期に移行していた。また、細胞分化の指標の発現強度

と分布も対照牛と Sg 中毒牛で異なっていた。すなわち、involucrin は対照牛では表皮の基底直上層のみで発現していたのに対し、中毒牛では表皮の全層で発現がみられ、表皮での陽性細胞の比率も増加していた。同様の変化は cytokeratin 10 および 11 でもみられた。Sg 中毒は表皮細胞の増殖活性にも影響しており、対照牛では表皮基底層に加え、毛包、皮脂腺および汗腺などの上皮細胞が PCNA 陽性であったのに対し、中毒牛では陽性細胞数が減少していた。

これらの結果から、表皮の菲薄化（特に分化の中間段階にある細胞層）は、基底細胞の増殖抑制というよりも、むしろ基底層直上の表皮細胞の分化が亢進したためであることが示唆された。

## 第2章 *Nierembergia veitchii* 中毒羊の肺と大動脈における細胞分化と骨基質蛋白合成

*Nierembergia veitchii* (Nv)中毒により石灰沈着症を自然発症した羊の肺と大動脈を電子顕微鏡および免疫組織化学的手法を用いて検索した。免疫組織学的検索は、コンドロイチン硫酸ならびに非コラーゲン骨基質蛋白である osteocalcin、osteonectin および osteopontin を対象に行った。

中毒羊の肺および大動脈でみられる電子顕微鏡レベルでの変化は、主に平滑筋細胞 (SMCs) の修飾と間質での線維芽細胞の活性化であった。修飾 SMCs では、粗面小胞体が目立ち、ミトコンドリアと遊離リボソームの増加および筋線維の減少がみられた。また、細胞外基質とカルシウム沈積が増加し、細胞外基質の増加部位では細胞質にカルシウム結晶を有するマクロファージおよび多核巨細胞もみられた。さらに、毛細血管の基底膜の肥厚と重複が顕著であった。骨基質蛋白である osteocalcin、osteonectin ならびに osteopontin は活性化した線維芽細胞の細胞質、修飾 SMCs および細胞外基質で認められたが、コンドロイチン硫酸は気管の硝子軟骨でみられるのみであった。

これらの結果から、Nv に含まれる  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  が間葉系細胞の分化および石灰沈着を起こしやすい非コラーゲン骨基質蛋白の合成を誘導していることが示唆された。

## 第3章 *Solanum glaucophyllum* 中毒牛の大動脈における膠原線維および弾性線維の分布の変化

実験的に *Solanum glaucophyllum* (Sg) (25g/head/day x 2/week)を最長8週間強制経口投与した牛と無処置対照牛の大動脈における膠原線維および弾性線維について定量的解析を行った。膠原線維および細網線維は Picrosirius red 法で染色した切片で検出し、偏光下で鏡検した。また、弾性線維の検出のために3枚の連続切片を用意し、次の一つの方法で染色した。すなわち、Verhoeff's iodine iron haematoxyline 染色、前処置なしの切片に Weigert's resorcin-fuchsin 染色、あるいは oxone で酸化処理した切片に Weigert's resorcin-fuchsin 染色を施した。Verhoeff 法では完全に成熟した弾性線維が選択的に染め出されるが、elaunin や oxytalan 線維は染色されない。一方、

Weigert's resorcin-fuchsin 法はより感受性が高く、(elastin 含量が少ない)elaunin 線維も染め出せる。oxytalan 線維は前処置として酸化を施した Weigert's resorcin-fuchsin 法 (oxona 法)でも染め出されない。

大動脈では、Picrosirius red 法によって、細網線維の特徴である弱い複屈折性で緑色の細い線維と、対照的に膠原線維の特徴である強い複屈折性で黄色～赤色の太い線維束の 2 種類の異なる線維性成分がみられた。膠原線維を反映する赤色成分は対照牛の大動脈では約 20%あったが、Sg 投与 8 週間後には約 4%にまで減少した。一方、対照牛の大動脈で 2.38%前後であった細網線維を反映する緑色成分は、Sg 投与 8 週間後でも 1.41%であった。

これらの結果から、Ag 中毒牛の大動脈では細網線維との比較における膠原線維の相対的な減少および弾性線維の減少がみられた。これらの変化は 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> が高レベルに維持されていることに起因するものと思われるが、一方で、非コラーゲン骨基質やプロテオグリカンの増加による可能性も考えられる。

上述した本研究の成果は、反芻動物の植物中毒性地方病性石灰沈着症の皮膚をはじめ軟部組織の病変の特徴を、構成細胞の動態と細胞外基質の動態の面から明らかにするとともに、病変の発現機序に表皮細胞や間葉系細胞の分化が重要な役割を担っていることを初めて示したものである。