

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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の国で同定されている。南米での EC の発生地域は *Solanum glaucophyllum* (Sg) および *Nierembergia veitchii* (Nv) の自生地との分布と一致しており、非常に重篤な問題となっている。Sg や Nv には 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ (1, 25(OH)₂D₃) がグルコシド誘導体として大量に含まれているほか、ビタミン D₃ や 25-(OH)₂D₃ なども含まれている。ビタミン D 誘導体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。中毒動物では、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が、皮膚に関しては、詳細な病理学的検索結果はない。

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。

第 1 章 牛における Sg 中毒の皮膚構造および細胞の分化・増殖への影響

Sg の葉の乾燥粉末 (25g/head/day × 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。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と汗腺の減数と萎縮がみられた。毛包周期は anagen 期から telogen 期に移行していた。また、細胞分化の指標である 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。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 Nv 中毒牛の肺と大動脈における細胞分化と骨基質蛋白合成

Nv 中毒による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。

中毒羊の肺および大動脈でみられた電子顕微鏡レベルでの変化は、主として平滑筋細胞

(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の沈着が増加し、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と修飾 SMCs の細胞質および細胞外基質で認められた。

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誘導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亢進している可能性が示唆された。

第3章 Sg 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 Sg (25g/head/day × 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形態解析を行った。

大動脈では、Picrosirius red 法によって、細網線維の特徴である弱い緑色複屈折性の細い線維と、膠原線維の特徴である強い黄色～赤色複屈折性の太い線維の 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、Sg 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おこることが明らかになった。これらの変化は $1, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 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た。

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における皮膚および軟部組織病変の特徴を、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、これら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り、南米における植物中毒性石灰沈着症の病態解明に供するところが大きい。よって審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位を授与するに値するものと認めた。