

論文の内容の要旨

論文題目 マウスにおける藍藻肝毒素 Microcystin-LR の毒性病理学的研究

氏名 吉田敏則

Microcystins (MCs) はアオコの原因となる一部の藍藻の産生する肝毒性物質であり、日本を含めた世界各地の湖沼、ダム湖、河川で検出され、野生動物、家畜、魚類、両生類ならびにヒトを含む生態系に広く悪影響を及ぼしている。ヒトでは、1996年、ブラジル、カルアルの透析病院における透析液への汚染事故により100人以上が発症し、半数以上が死亡する大惨事が発生した。また、中国の肝癌多発地帯におけるMCsの汚染報告とともに実験的に肝発癌性が証明され、ヒトの健康に悪影響を及ぼす重要な環境汚染物質として位置付けられている。このような背景をもとに世界保健機構 (WHO) は、1998年、最も普遍的に存在する Microcystin-LR (MCLR) について、飲料水中の許容基準値を $1.0 \mu\text{g/L}$ に設定している。ブラジルの症例では、MCLR を含めて平均 $19.5 \mu\text{g/L}$ の汚染透析液が静脈内投与され、これはマウスにおける $100 \mu\text{g/kg}$ の腹腔内投与に相当する量であるという。

永田および堤らは、MCs に高親和性を持つ抗 MC モノクローナル抗体 (抗 MC 抗体) を作製し、MCs の環境モニタリングを目的とした免疫測定法を確立した。本法

は、従来の分析手段である高速液体クロマトグラフィー(HPLC)より簡便かつ高感度であり、世界中の環境水での汚染状況の報告により成果をあげつつある。本研究では、マウスにおける MCLR 単回投与の病理像を把握し、この抗体を免疫染色に応用して染色強度を定量化することにより、MCLR の分布を考慮した新たな視点からの病理学的解析を試みた。さらに、肝障害における遺伝子発現を調べ、あわせて Kupffer 細胞の関与についても検討した。

実験動物に MCs を投与すると、肝出血により動物は死亡するが、この変化は Protein phosphatase 1 および 2A (PP1/2A) の活性阻害による中間径フィラメントをはじめとする各種タンパク質の脱リン酸化阻害に起因することが示されている。この場合、少量の投与量で再現が可能な腹腔内あるいは静脈内投与が行われることが多い。しかし、一般的な野外における暴露経路を考慮すると経口投与による実験結果の集積が望まれる。そこで、MCLR (純度 95%以上) の雌マウス (Balb/c) に対する LD50 を経口と腹腔内投与により求め、投与経路による毒性発現の違いを病理学的に比較検討した。死亡はいずれの投与経路とも投与後 6 時間以内に観察された。LD50 は経口投与で 10.9 mg/kg (Up-and-down 法)、腹腔内投与で 65.4 μ g/kg (Moving average 法) であり、その差は 167 倍であった。これは MCLR の肝臓に対する集積率の差によるものと考えられた。しかし、MCLR の経口および腹腔内投与による病理学的変化は極めて類似していた。投与 6 時間以内の死亡動物では、肝小葉中心部から中間部にわたる出血が認められた。肝内静脈内には脱落肝細胞がみられ、肺泡毛細血管には肝細胞由来と考えられる塞栓が観察された。投与 24 時間後の屠殺動物では、巣状、層状あるいは塊状の壊死が観察された。壊死は肝小葉中間部に主座し、中心静脈へ突出するように広がる傍中心性壊死に相当した。中心静脈周囲および壊死周囲では単細胞壊死および TUNEL 法陽性のアポトーシスが観察された。超微形態像では、肝細胞の壊死およびアポトーシスに加え、炎症反応および微小循環障害を示唆する変化が観察された。ブラジルにおけるヒトの死亡例においても、肝臓に壊死、アポトーシス、炎症反応などが観察されており、それらの変化は実験動物での肝病変に類似していることが報告されている。従って、マウスの肝病変の観察結果はヒトへの暴露を考える上でも有益な情報を提供するものと考えられる。

従来、MCLR の局在観察には放射性同位元素標識の毒素が用いられていたが、抗

MC 抗体を免疫染色に応用することで、容易に MCLR の分布を観察できる。種々の固定液での染色条件の検討の結果、陽性反応は 10% 中性緩衝ホルマリン固定標本で最も明瞭に観察された。MCLR を経口あるいは腹腔内投与したマウスの組織にビオチン化 MC 抗体を用いた免疫染色を行い、MCLR の組織内分布と病理学的変化の関連性を調べた。経口投与および腹腔内投与とも同様の染色パターンを示した。投与 6 時間以内に死亡したマウスの肝臓では、抗 MC 抗体に対する陽性反応は出血を呈する小葉中心部から中間部の肝細胞の細胞質および核に認められた。肝内静脈および肺毛細血管内の遊離あるいは変性肝細胞も陽性であった。投与 24 時間後に屠殺したマウスの肝臓では、陽性反応は小葉中心部でみられ、アポトーシスの発生部位と一致した。しかし、傍中心性壊死の発生部位とはかならずしも一致しなかった。肝臓の免疫プロットングでは、約 40 kDa の抗 MC 抗体陽性バンドが認められ、抗 MC 抗体で免疫沈降した試料の解析により、本抗体が MCLR-PP1/2A adduct を認識していることが示唆された。HPLC により遊離 MCLR が確認できたが、これは定量限界値以下であった。

MCLR の肝小葉内分布をさらに詳細に観察するため、画像解析装置を用いて MCLR の染色強度を定量化し、病理学的変化との関連性を調べた。0~57.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量でマウスに単回腹腔内投与し、24 時間後に剖検したマウスの肝臓では、抗 MC 抗体の染色強度は用量相関性に増加し、各用量とも小葉中心部>中間部>周辺部の順に高い値を示した。アポトーシスは 57.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与マウスの小葉中心部および中間部、48.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与マウスの小葉中心部で増加し、MCLR の小葉内分布と濃度に関連して発生することが示唆された。一方、60.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で単回腹腔内投与し、投与 7~21 時間後に剖検したマウスの肝臓では、MCLR はいずれの観察時点においても小葉中心部>中間部>周辺部の順に高い値を示した。しかし、染色強度は投与 7 および 11 時間で既に高く、それ以後、小葉内各部とも経時的に減少した。投与 7 時間では小葉中心部および中間部に多発性の微小出血がみられ、投与 11 時間以降に傍中心性壊死に移行した。巣状の傍中心性壊死は、微小出血による循環障害によりもたらされ、層状あるいは塊状壊死に進展した場合には MCLR の分布とは関係なく観察されることが明らかとなった。壊死に伴いアポトーシスが増加したが、MCLR の染色強度の減少に伴う現象であるため、MCLR の分布以外にアポト

ーシスの発生に関与する因子が存在することが示唆された。

アオコの粗抽出物をマウスに投与すると血清 Tumor necrosis factor- α (TNF- α) が上昇し、抗 TNF- α 抗体の前投与により粗抽出物によるマウスの死亡が抑制されることが報告されている。しかし、この実験で精製された毒素は 7-desmethyl-MCLR であり、MCLR による肝毒性に TNF- α が一義的に関与しているか否かは明らかではない。そこで、MCLR をマウスに 60.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で単回腹腔内投与し、7 および 17 時間後に採取した肝臓における TNF- α の発現を検討した。Real-time RT-PCR 法による TNF- α mRNA 量は、投与 7 および 17 時間後で、それぞれ対照群の 1.5 倍ならびに 3.3 倍に増加した。抗 TNF- α 抗体を用いた免疫染色でも、TNF- α 発現細胞数がそれぞれの時期に 3.6 倍ならびに 8.7 倍に増加した。TNF- α 発現細胞は壊死巣で頻繁に観察され、好中球浸潤との関連を示唆していた。一部のアポトーシス細胞は抗活性型 Caspase-3 抗体に陽性を示し、Caspase cascade が活性化していることを示していた。cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、投与 7 時間目に Interleukin 1 β , Oncostatin M, Signal transducer and activator of transcription 3, c-Jun, inducible nitric oxide synthase および CD18 の増加が観察され、TNF- α に関連する細胞内シグナル伝達が示唆された。また、この他、アポトーシス促進遺伝子として Activin receptor IIB および Protein kinase C δ が、アポトーシス抑制遺伝子として SMAD7, Bcl- ω および Heat shock protein 90 の増加が観察された。さらに TNF- α の主たる産生細胞である Kupffer 細胞の関与を調べるため、Kupffer 細胞阻害剤である Gadolinium chloride を前投与したところ、MCLR 投与による壊死およびアポトーシスが抑制された。以上の結果より、TNF- α を含む種々の遺伝子の発現が MCLR による肝障害の発生に関連しており、Kupffer 細胞の活性化がその一因を担っていることが示唆された。

以上、本研究の結果、MCLR による肝障害の発現メカニズムの詳細が明らかにされた。さらに、抗 MC 抗体の免疫染色は病理研究室で一般的に用いられる 10% 中性緩衝ホルマリン固定標本で最も明瞭に観察されることから、野外において MCs 中毒が疑われる症例について、当該環境水中の汚染レベルの把握と組み合わせることで、非常に有効な疫学調査の展開が期待できるなど、本研究は応用面でも重要な成果を挙げ得た。