

[別紙 2]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉田 敏則

Microcystins (MCs) はアオコの原因となる藍藻由来の肝毒素であり、ヒトを含めた幅広い生態系に悪影響を及ぼす環境毒性物質である。ヒトでは、1996 年、ブラジルで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も証明されている。本研究では、MCs のなかでも毒性の強い Microcystin-LR (MCLR) をマウスに単回投与し、環境モニタリング用の免疫測定法のために開発された抗 MC 抗体を免疫染色に応用し、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。

野外における暴露経路を考慮し、MCLR (純度 95%以上) の雌マウス(Balb/c)に対する経口と腹腔内投与の LD50 を求めた。LD50 は経口投与で 10.9 mg/kg、腹腔内投与で 65.4  $\mu$ g/kg 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、両投与経路による病理学的変化は類似していた。投与 6 時間までの死亡動物では肝臓の出血が、投与 24 時間後の屠殺動物では肝小葉の傍中心性壊死およびアポトーシスが観察された。

MCs は Protein phosphatase 1 および 2A(PP1/2A)の活性阻害を引き起こす。肝臓の免疫ブロッティング・免疫沈降により、抗 MC 抗体は MCLR-PP1/2A adduct を認識することが明らかになった。また、抗 MC 抗体の免疫染色条件を検討したところ、10%中性緩衝ホルマリン固定・パラフィン包埋標本で最も明瞭に陽性反応が観察された。投与経路による染色性の差はなかった。MCLR の陽性反応は肝臓の出血部位に一致して観察された。傍中心性壊死は、MCLR の直接作用による微小出血に関連した循環障害によって拡大していくことが示唆された。投与 24 時間後の肝臓を用いて画像解析装置により染色強度を定量化したところ、染色強度は用量相関性に増加し、小葉中心部>中間部>周辺部の順に高い値を示した。この反応はアポトーシスの発生と関連していた。一方、投与 24 時間以内の経時的観察では、染色強度は投与初期で高く、それ以後、小葉内各部とも経時的に減少した。

これに対しアポトーシスは経時的に増加したため、MCLR の分布以外のアポトーシス発生要因が存在することが示唆された。

MCLR 投与の肝臓における Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の発現を検討したところ、Real-time RT-PCR 法ならびに抗 TNF- $\alpha$ 抗体を用いた免疫染色により、TNF- $\alpha$  mRNA 量および TNF- $\alpha$ 発現細胞数がともに壊死・アポトーシスの発生に関連して経時的に増加した。一部のアポトーシス細胞は抗活性型 Caspase-3 抗体に陽性であった。さらに、cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により、Interleukin 1 $\beta$ , Oncostatin M, Signal transducers and activators of transcription 3, c-Jun, inducible nitric oxide synthase および CD18 の増加が観察され、TNF- $\alpha$ に関連するシグナル伝達が示唆された。また、アポトーシス促進遺伝子の Activin receptor IIB および Protein kinase C  $\delta$ と、抑制遺伝子の SMAD7, Bcl- $\omega$ および Heat shock protein 90 が増加した。さらに、TNF- $\alpha$ 産生細胞である Kupffer 細胞を Gadolinium chloride で阻害したところ、MCLR 誘発性の壊死およびアポトーシスが抑制された。

本研究によって 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。また、本研究で確立された抗 MC 抗体を用いた免疫染色と環境水中の MCs 汚染レベルの把握と組み合わせることで、野外における MCs 中毒症例について有効な疫学調査の展開が期待できる。本研究は MCs 研究の基盤を確立したばかりでなく、その応用面でも重要な成果を挙げ得たと考えられた。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。