

「論文の内容の要旨」電子データ

1. 課程・論文博士の別： 課程博士
2. 申請者氏名（ふりがな）： ポアポラテップ・アムナート (POAPOLATHEP・Amnart)
3. 学位の種類： 博士（獣医学）
4. 学位記番号： 博農 第2654号
5. 学位授与年月日： 平成15年9月30日
6. 論文題目： Studies on the Toxicological Characteristics of Nivalenol in Mice  
(マウスにおけるニバレノールの毒性学的特徴に関する研究)
7. リンク先 URL： なし
8. 論文の内容の要旨：

ニバレノール (nivalenol, NIV)は多くのフサリウム族マイコトキシンによって産生されるタイプBトリコテセンマイコトキシンで、世界各地で NIV による穀物の汚染が報告されている。トリコテセンマイコトキシンは一般に蛋白および DNA の合成を阻害し、リンパ造血系組織などの細胞分裂活性の高い組織を傷害することが知られている。NIV は 1968 年に *Fusarium nivale* の代謝産物から初めて分離され、その化学構造も明らかにされている。しかし、NIV によるリンパ系組織傷害の性状および NIV の生体内動態等、NIV の毒性学的特徴については不明な点が多い。本研究ではこれらの点を明らかにする目的で、マウスを用いた実験的検索を実施した。得られた結果は下記の通りである。

1. リンパ系組織における NIV 誘発アポトーシスとアポトーシス関連遺伝子の発現  
まず、5 週齢の ICR:CD1 雄マウスに 0, 5, 10 および 15mg/kg の NIV を経口投与し、48 時間後(HAD)まで経時的にリンパ系組織（胸腺、パイエル板、脾臓）におけるアポトーシスの発現の推移を検索（形態学、*in situ* detection for fragmented DNA(TUNEL 法)）

した。ついで、15mg/kg の NIV を同様に投与したマウスの胸腺におけるアポトーシスの発現の推移（形態学、TUNEL 法、agarose gel 電気泳動法）とアポトーシス関連遺伝子(*Fas*, *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, *p53*, *bcl-2*)の mRNA の発現の推移（RT-PCR 法）を 12HAI まで経時的に検索した。

その結果、リンパ系組織におけるアポトーシス細胞は胸腺およびパイエル板で脾臓よりも早期に発現した。アポトーシス細胞数は用量依存性に増加し、その程度は胸腺およびパイエル板で脾臓よりも高度であった。これらの所見はリンパ組織間で NIV に感受性を示すリンパ球のポピュレーションが異なっていることを示唆している。アポトーシスに陥ったリンパ球は核濃縮あるいは核崩壊を呈し、これらの核は TUNEL 法で強陽性であった。また、電顕的にも細胞体の萎縮、核クロマチンの濃縮や核膜に沿った凝集あるいは細胞体の断片化等、典型的なアポトーシス像を示した。

胸腺では 3 HAI からアポトーシス細胞が出現し、9HAI にピークに達した。また、6 および 9HAI には agarose gel 電気泳動法で明瞭な DNA ladder 形成が観察された。一方、こうしたアポトーシスの発現に先立ち、0.5HAI から *c-fos* および *c-jun* の mRNA の発現量が増加し始め、1HAI でピークに達した。*Fas*, *p53*, *bcl-2* および *c-myc* の mRNA の発現量には変化は見られなかった。

上記の結果から、NIV がリンパ系組織にアポトーシスを誘発すること、ならびに、*c-fos* および *c-jun* が NIV 誘発リンパ球アポトーシスに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

## 2. リンパ系組織および胸腺細胞初代培養系における NIV 誘発早期アポトーシスとリンパ球サブセットの変動

まず、5 週齢の BALB/c 雌マウスに 15mg/kg の NIV を経口投与し、3, 9, 12 および 24HAI に剖検し、胸腺、パイエル板、腸間膜リンパ節および脾臓について FACScan を用いて早期

アポトーシスおよびリンパ球サブセットの変動を解析した。溶媒のみを投与し、12HAI に剖検したマウスを対照として用いた。ついで、Shinozuka et al. (2001)の方法に従い、BALB/c 雄マウスの胸腺から胸腺細胞を分離して作出した初代培養系( $4 \times 10^6$  cells/ml)に異なる用量(0, 0.25, 0.5,  $1.0 \mu\text{g/ml}$ )の NIV を添加し、3, 6, 12 および 24HAI に生細胞数を計数するとともに、各種抗体でラベルした培養細胞を FACSscan を用いて解析し、早期リンパ球アポトーシスおよびリンパ球サブセットの変動を検索した。

その結果、NIV はパイエル板を最初に傷害し、また、胸腺を最も強く障害した。胸腺では、アポトーシスのピーク(9HAI)に続いて 12 および 24HAI に  $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ 細胞の選択的な傷害が観察された。 $\text{CD4}^+$ 細胞は 3HAI にパイエル板で、9HAI 以降に腸間膜リンパ節で、また、3-12HAI に脾臓で、それぞれ明瞭に減少した。 $\text{CD8}^+$ 細胞は 24HAI に腸間膜リンパ節で、また、12HAI に脾臓で、それぞれ有意に減少した。B 細胞サブセットの変動については、腸間膜リンパ節では、 $\text{IgG}^+$ 細胞が 4-12HAI に、また、全ての B 細胞サブセットが 24HAI に有意に減少し、脾臓では  $\text{IgM}^+$ 細胞が 9HAI に有意に減少した。パイエル板では 3HAI に pan-T および pan-B 細胞が有為に減少したのに続き、全ての B 細胞サブセット、特に  $\text{IgA}^+$ 細胞が 9HAI に有意に増加し、その後も  $\text{IgA}^+$ および  $\text{IgM}^+$ 細胞数は対照群のそれより高値を示した。こうしたことから、パイエル板が 3HAI に高度に傷害された後の回復の過程で、NIV とパイエル板との相互作用がこの部位での interleukin の産生を刺激し、9HAI 以降に  $\text{IgA}$  分泌 B 細胞の増殖と分化を引き起こしたものと推察された。

一方、胸腺細胞初代培養系を用いた実験では、生細胞数は 6HAI 以降に用量および時間依存性に減少し、アポトーシス細胞数は 3HAI 以降に全ての NIV 添加群で時間依存性に増加した。 $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ 細胞数は全ての NIV 添加群で時間依存性に明瞭に減少したが、 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$  および  $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$  細胞数は  $1.0 \mu\text{g/ml}$  群のみ 24HAI に低値を示した。こうした所見から、NIV は胸腺細胞を直接傷害し、主に  $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ 細胞にアポトーシスを惹起することが明らかとなった。

### 3. NIV の生体内動態

マウスに<sup>3</sup>H-NIV を経口投与し、その生体内動態（吸収、分布、代謝および排泄）を検索した。すなわち、4週齢のICR:CD-1 雌マウスに<sup>3</sup>H-NIV（20 μg/kg）を強制経口投与した後、代謝ケージを用いて48HAIまで糞便と尿を分離採取した。糞便はオキシダイザーで処理することによって<sup>3</sup>Hを捕捉し、その放射能をシンチレーションカウンターで測定し、また、尿中の放射能は直接シンチレーションカウンターに供することによって測定した。その結果、投与した放射能の大部分は投与後24HAI以内に主に糞便中に排泄され、約1/4が尿中に排泄された。

さらに、<sup>3</sup>H-NIV投与後、経時的に胆汁と尿および各臓器を採取し、含有放射能を、固体試料についてはオキシダイザー処理後に、また、液体試料については直接シンチレーションカウンターで測定した。血漿中放射能レベルは投与後直ちに上昇し、1HAIに最高値を示してから、10HAIまで急激に減少し、以後緩やかに減少した。この血漿レベルの変化から、<sup>3</sup>H-NIVの分布半減期および生物学的半減期はそれぞれ2.53時間および12.34時間であること、また、60HAI以内に97%の<sup>3</sup>H-NIVが排泄されることが明らかになった。各組織中の放射能レベルは消化管を除き、ほぼ血漿中レベルの変化に一致した変化を示した。消化管組織の放射能レベルは、他の組織に比して顕著に高く、胃や十二指腸などの上部消化管においては0.5HAIに最高値を示し、大腸においてはそれより遅れて最高値を示し、その後それぞれ減少した。胆汁中放射能レベルは尿中のそれよりも顕著に低かったことから、消化管組織で認められた高いレベルの放射能は、投与された<sup>3</sup>H-NIVが吸収されずに消化管下部に移行したことによるものと考えられる。糞中および尿中の代謝物をHPLCによって分析した結果、NIVの大部分が代謝変換を受けず排泄されること、従って、未変化のまま各組織に分布することが示された。

以上の結果から、経口投与されたNIVの一部は消化管より吸収され、全組織に速やかに分

布してから、未変化のまま体外に排泄されることが明らかとなった。また、妊娠および哺乳マウスに<sup>3</sup>H-N I Vを経口投与し、母体から胎児および乳児への移行もあわせ検討した結果、胎盤を経由して NIV が胎児に移行することおよび母乳を介して NIV が乳児に移行することがそれぞれ示唆された。

上述した本研究の結果、マウスにおける NIV の毒性学的特徴、特に NIV によるリンパ系組織におけるアポトーシスの発現機構およびリンパ球サブセットの変動ならびに NIV の体内動態（吸収、分布、代謝および排泄）が初めて明らかにされた。本研究の成果は家畜や人における NIV 中毒の毒性学的性状を理解し、また、他種のマイコトキシンの生体内動態およびアポトーシス誘発機構を研究する上でも非常に有用である。