

論文の内容の要旨

論文題目 **Studies on T-2 Toxin-Induced Toxicity in Pregnant Rats**
(妊娠ラットにおける T-2 トキシンの毒性に関する研究)

氏名 瀬畑 信哉

T-2 toxin は *Fusarium* 属の真菌により産生されるマイコトキシンである。T-2 toxin による汚染は食物、飼料、農産物に認められ、その発生は世界中で報告されている。T-2 toxin による疾病としては、ヒトの白血球減少症および赤かび中毒、ウシ出血症候群、ウマ豆穀中毒症等が知られており、今日でも依然として重要な問題となっている。実験的には、T-2 toxin を種々の動物に投与すると、胸腺をはじめとするリンパ系臓器、造血器、消化管、肝臓等にアポトーシスが生じることが知られている。また、T-2 toxin は遺伝毒性に加え胎児毒性も有し、胎児死亡および奇形が認められることが報告されている。しかし、妊娠動物における毒性については報告が少なく、毒性発現のメカニズムについては未だ不明である。そこで、本研究では、T-2 toxin を妊娠ラットに投与して、肝臓、胎盤、胎児肝臓および胎児脳を対象に、病理組織学的変化と遺伝子発現の変化を検索し、妊娠ラットにおける T-2 toxin の毒性発現のメカニズムの解明を試みた。

まず初めに、器官形成期にあたる妊娠 13 日齢の Wistar ラットに T-2 toxin (2 mg/kg) を単回経口投与し、投与 24 および 48 時間後に解剖し、病理学的検査を実施した。その結果、胸腺、脾臓、肝臓、胃、小腸陰窩上皮、唾液腺および膵臓外分泌腺等に単細胞壊死の増数が認められた。肝臓では肝細胞の脂肪化も認められた。また、消化管粘膜では出血も認められた。胎盤では栄養膜細胞に単細胞壊死の増数が認められた。胎児では、肝臓の肝細胞および造血細胞、神経上皮細胞、軟骨細胞、消化管上皮細胞等に単細胞壊死の増数が認められた。また、投与 48 時間後の前胃では、扁平上皮細胞の過形成が認められ、修復反応が生じていると考えられた。これらの結果から、T-2 toxin を妊娠ラットに投与すると、親組織、胎盤および胎児組織で同様な性状の変化、すなわち単細胞壊死が誘導されることが明らかになった。

これら親組織、胎盤および胎児組織に認められた単細胞壊死は、TUNEL 染色結果から、アポトーシスであると考えられた。なお、T-2 toxin は胎盤を容易に通過して胎児組織に分布することが報告されていることから、胎児の変化は母体の変化の二次的作用というより、直接作用による可能性が示唆された。

次に、T-2 toxin のより詳細な毒性発現メカニズムを検索するため、経時的な形態学的変化とその際の遺伝子発現プロファイルの解析を実施した。すなわち、妊娠ラットに T-2 toxin (2 mg/kg)を単回経口投与し、投与 1, 3, 6, 9, 12 および 24 時間後に解剖し、肝臓、胎盤および胎児肝臓を採材した。病理組織学的検査では、TUNEL 陽性アポトーシス細胞数が投与後から増加し、肝臓では投与 6 時間後および胎盤では投与 12 時間後にそれぞれピークに達し、胎児肝臓では投与 9 時間後にプラトーに達した。この結果を基に、各組織でアポトーシス細胞数のピーク時 (6 あるいは 12 時間後)、その前 (3 時間後) および投与 24 時間後の 3 ポイントを選択して、マイクロアレイ解析を実施した。チップは Affymetrix Rat Genome U34A チップを用いた。データは標準化後、 ± 1.5 倍の発現量を示し、かつ、統計検定で有意差を示した遺伝子プローブを選択した。その結果、酸化ストレス関連遺伝子 (*heat shock protein 70*, *heme oxygenase*, *metallothionein-1 and -2* 等)、アポトーシス関連遺伝子、脂質代謝および薬物代謝関連遺伝子 (*P450*, *GST* 等) の発現の変化が、これら 3 つの組織に共通して認められた。また、アポトーシス関連遺伝子としては、*p53*, *GADD45*, *p21*, *cyclin D1*, *cyclin G*, *NF-kappa B*, *Bax-alpha*, *BOD-L*, *mdm2*, *c-jun*, *MEKK1*, *p38 MAPK* および *ERK3* の発現の増加が認められた。これら遺伝子のなかには、細胞周期を抑制し、*growth arrest* に関わる遺伝子や、細胞の生存に関わる遺伝子も多く、T-2 toxin の投与により、アポトーシスのみならず、細胞の修復・生存反応も同時に生じていることを示唆している。さらに、上記アポトーシス関連遺伝子のなかでは、特に *c-jun* の発現の増加が、肝臓、胎盤および胎児肝臓に共通して検出された。このため、MAPK 経路の活性化を経て、*c-jun* 遺伝子の発現増加によりアポトーシスが生じることが推察された。マイクロアレイで認められた変化を確認するため、酸化ストレス関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子および薬物代謝酵素遺伝子を選択して半定量的 RT-PCR あるいは real-time RT-PCR を実施したところ、マイクロアレイの結果をとほぼ一致していることが確認された。以上の病理組織学的検査結果とマイクロアレイ解析結果から、T-2 toxin は酸化ストレスを誘導し、脂質代謝をはじめとする代謝の変化等により細胞内環境が変化し、MAPK, *c-jun* 経路が活性化してアポトーシスが誘導されたものと推察された。

T-2 toxin は神経系にも作用することが知られている。成熟動物では、T-2 toxin 投与により活動性の低下や *monoamine oxidase* 活性の変化を引き起こすことが示されているが、病理学的な変化は報告されていない。一方、前述したように、ラット胎児では、T-2 toxin 投与により終脳の神経上皮細胞を中心にアポトーシスが誘導された。しかし、その発現メカニズムについては解明されていない。著者は、ラット胎児脳における毒性発現のメカニズムを解明する目的で、以下の実験を行った。上記試験と同様に、妊娠 13 日齢の Wistar ラットに、T-2 toxin (2 mg/kg)を単回経口投与し、投与 1, 3, 6, 9, 12 および 24 時間後に解剖した。病理組織学的検査および TUNEL 染色の結果、終脳の神経上皮細胞のアポトーシスが、投与直後から増加し、投与 12 時間後にピークに達した。そこで、遺伝子発現プロファイルを検索するため、投与 6, 12 および 24 時間後の 3 ポイントを選択し、マイクロアレイ解析を実施した。その結果、アポトーシス細胞数がピークを示した投与 12 時間後では、酸化ストレス関連遺伝子 (*HSP70*,

heme oxygenase 等) の強い発現が認められた。アポトーシス関連遺伝子については、MAPK 経路のひとつである *MEKK1* および *c-jun* の発現の増加が認められた。また、その他のアポトーシス関連遺伝子である *caspase-2*, *tissue inhibitor of metalloproteinase 3* と *insulin-like growth factor-binding protein-3* の発現の増加もみとめられた。マイクロアレイ解析の結果を確認するため、酸化ストレス関連遺伝子およびアポトーシス関連遺伝子について、real-time RT-PCR で検証したところ、おおむねマイクロアレイ解析の結果と一致していた。以上の結果から、ラット胎児脳においては、T-2 toxin 投与により、酸化ストレスが誘導され、その結果、MAPK 経路の活性化が生じて、アポトーシスが誘導されるものと推察された。

以上の研究結果をまとめると、妊娠ラットに T-2 toxin を投与すると、肝臓、胎盤および胎児組織にアポトーシスが生じることが明らかとなった。マイクロアレイ解析では、肝臓、胎盤および胎児肝臓において共通して、酸化ストレス関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、脂質代謝および薬物代謝関連遺伝子の発現の変化が認められた。なかでも、MAPK 経路の活性化が特徴として挙げられ、*MEKK1* および *c-jun* の発現の増加の結果、アポトーシスが生じるものと推察された。これらの結果と、T-2 toxin が胎盤を容易に通過するという報告から、胎児組織に観察される変化は T-2 toxin の直接作用によるものであると推察される。一方、胎児脳においても、神経上皮細胞にアポトーシスが誘導された。胎児脳のマイクロアレイ解析の結果から、肝臓等と同様に酸化ストレス関連遺伝子の発現増加が認められ、*MEKK1* および *c-jun* の MAPK 経路の活性化からアポトーシスが生じているものと推察された。

以上の結果、T-2 toxin 投与により、親肝臓、胎盤、胎児肝臓および胎児脳に共通した変化として、酸化ストレスおよびアポトーシスの誘導が認められ、妊娠ラットにおける T-2 toxin の毒性発現のメカニズムとして、T-2 toxin 投与により酸化ストレスの発生と、その結果生じる MAPK, *c-jun* 経路の活性化によるアポトーシスの誘導が重要であることが示唆された(図 1)。

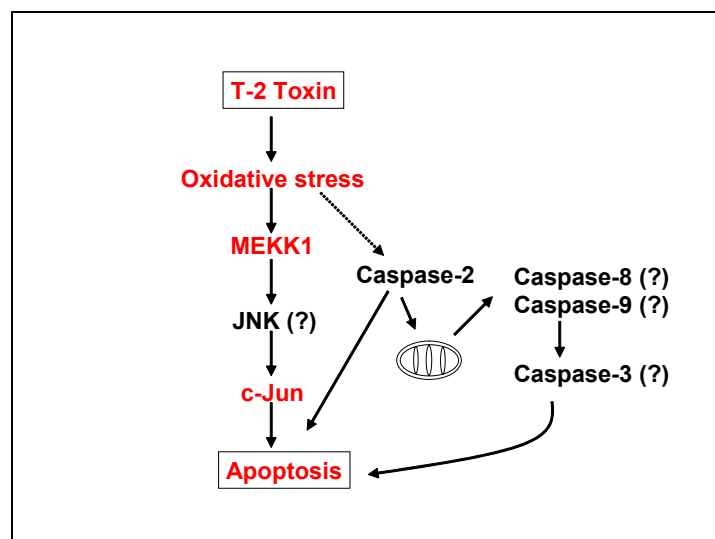


図 1. 妊娠ラットにおける T-2 toxin 毒性発現メカニズム(仮説)。