

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ポアポラテップ サランヤー

アフラトキシン B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) はヒトや動物に対して肝毒性と肝臓がんを招来するカビ毒であり、これら毒性影響に、肝臓チトクローム酵素 (CYP) による AFB<sub>1</sub> の AFB<sub>1</sub>-エポキシド (AFBO) への変換が重要な役割を果たすことが知られている。すなわち、この反応性に富む代謝物は、細胞内 DNA と共有結合により AFB<sub>1</sub>-DNA 付加体を生成するが、この反応が発がんに必要なプロセスとされている。また、DNA を含め細胞内高分子化合物への AFBO の結合が AFB<sub>1</sub> の急性毒性を引き起こすものと考えられている。また、肝臓 CYP は、AFB<sub>1</sub> をアフラトキシン Q<sub>1</sub> (AFQ<sub>1</sub>)、P<sub>1</sub> (AFP<sub>1</sub>)、M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) に、肝臓サイトゾールのリダクターゼはアフラトキコールにそれぞれ代謝変換するが、これら代謝物の毒性および発がん性は AFB<sub>1</sub> よりも低いことが知られている。さらに AFB<sub>1</sub> の解毒過程として、肝臓サイトゾールのグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) による AFBO のグルタチオン抱合化が知られている。

本研究の目的は、エストロゲン活性をもつ天然化合物として大豆等の食品に含まれているゲニスタイン (GS) および *Fusarium* により産生されるカビ毒ゼアラレノール ( $\alpha$ -ZOL) を用い、新生児ラットへのこれら化合物の暴露が、成熟後の AFB<sub>1</sub> の毒性と発がん性に及ぼす影響を究明することにある。

第一章では、成熟ラットの肝臓における AFB<sub>1</sub> の代謝に及ぼす新生時の GS または  $\alpha$ -ZOL の投与の影響を明らかにするために、生後 2 日目のラットに GS または  $\alpha$ -ZOL を皮下投与した後に、6 週令時または 2 ヶ月令時に肝臓を搾取し、それら組織の分画について AFB<sub>1</sub> 代謝に関わる酵素活性を *in vitro* 試験系を用いて調べた。その結果、新生時に GS 投与を受けた 2 ヶ月令ラットにおいては、肝マイクロゾームの AFB<sub>1</sub>-DNA 付加体生成活性の上昇が雄ラットにおいて、しかし、肝サイトゾールの AFB<sub>1</sub>-DNA 付加体生成阻害活性の上昇および肝ポストミトコンドリア分画の AFB<sub>1</sub>-DNA 付加体生成活性の低下が両性ラットにそれぞれ認められた。また新生時に  $\alpha$ -ZOL 投与を受けた 2 ヶ月令ラットにおいては、肝マイクロゾームの AFB<sub>1</sub>-DNA 付加体生成活性の上昇および雌ラットにおける肝サイトゾールの AFB<sub>1</sub>-DNA 付加体生成活性の上昇が認められたが、肝ポストミトコンドリア分画の AFB<sub>1</sub>-DNA 付加体生成活性については対照ラットと比較して差異が認められなかった。1-Chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB) 等を基質として用いた 2 ヶ月令時における肝サイトゾールの GST 活性は、GS および  $\alpha$ -ZOL の新生時投与により上昇することが、また雄ラットにおいては肝サイトゾールの AFB<sub>1</sub> のアフラトキコール (AFL) への変換活性も同処理によって上昇することが認められた。加えて、肝マイクロゾームによる AFB<sub>1</sub> から AFM<sub>1</sub> 等の脂溶性化合物への代謝変換も、新生時 GS または  $\alpha$ -ZOL 投与によって促進されることが認められた。

以上により、新生時における GS または  $\alpha$ -ZOL への暴露は、成熟ラットの肝臓における AFB<sub>1</sub> の代謝活性に著しい変化を招来すること、即ち、アフラトキシンの活性化に関わる CYP の AFBO 生成を促進するが、解毒に関するサイトゾール GST、リダクターゼ活性および CYP の AFB<sub>1</sub> 水酸化活性も促進

することが判明した。

第二章では、成熟ラットにおける AFB<sub>1</sub> の急性毒性に及ぼす新生時 GS または  $\alpha$ -ZOL 投与の影響を究明するために、第一章の方法により 2 日令のラットに GS または  $\alpha$ -ZOL を投与した後、2 ヶ月令時に 0.5mg/kg 体重または 2.5 mg/kg 体重の AFB<sub>1</sub> を経口投与し、48 時間目に血液と肝臓を採取し、それぞれ血液生化学検査と病理組織学的検査に供した。その結果、1.5mg/kg 体重の AFB<sub>1</sub> 投与によって血漿 gamma glutamyl transpeptidase (GGT) 等の血液生化学パラメータのレベルが顕著に上昇すること、しかしこの上昇は、とくに肝細胞障害の指標であるパラメータについては、新生時 GS または  $\alpha$ -ZOL 投与によって有意に抑制されることが認められた。また、AFB<sub>1</sub> 投与によって引き起こされた肝臓の出血と壊死を含む病理組織学的変化も、新生時 GS および  $\alpha$ -ZOL 投与によって抑制されることが認められた。0.5mg/kg 体重の AFB<sub>1</sub> 投与は、軽微な毒性を招来したが、これに対しては、GS と  $\alpha$ -ZOL ともに有意な影響をもたらさなかった。

以上の成績より、新生時における GS または  $\alpha$ -ZOL への暴露は、成熟ラットに対する AFB<sub>1</sub> の急性毒性を抑制することが示唆された。

第三章においては、成熟ラットにおける AFB<sub>1</sub> の慢性毒性に及ぼす新生時 GS および  $\alpha$ -ZOL の影響を究明するために、前章と同じ方法により 2 日令ラットに GS または  $\alpha$ -ZOL を投与した後、2 ヶ月令時に 0.2mg/kg 体重の AFB<sub>1</sub> を 1 日 1 回、週 5 日間、2 週間にわたって経口投与してから 18 週間後に血液と肝臓を採取し、それぞれ血液生化学検査と肝組織中 GST-P 陽性 foci の測定に供した。その結果、AFB<sub>1</sub> 投与によって血漿 ALT レベルの上昇と肝組織における GST-P 陽性細胞と同 foci の生成が誘起されることが見出された。しかし、AFB<sub>1</sub> によるこれらの変化は、新生時 GS 投与により抑制されることが認められた。一方、新生時  $\alpha$ -ZOL 投与は、そのみで成熟時肝組織に GST-P 陽性細胞の出現を招くことが見出された。さらに AFB<sub>1</sub> 投与により引き起こされた血漿 ALT レベルの上昇と肝組織 GST-P 陽性細胞と同 foci の生成に対しては、新生時  $\alpha$ -ZOL 投与の影響は認められなかった。以上の成績から、新生時における GS への暴露は成熟ラットにおける AFB<sub>1</sub> の慢性毒性を抑制するが、 $\alpha$ -ZOL にその効果がないことが示唆された。

以上第一章から三章までの研究により、成熟ラットにおける AFB<sub>1</sub> の活性化と解毒に関わる肝臓代謝機能は新生時期における GS および  $\alpha$ -ZOL への暴露による影響を受けることが明らかにされた。すなわち新生時 GS および  $\alpha$ -ZOL 投与は肝臓のサイトゾール GST および同リダクターゼ活性の上昇を引き起こすとともに、AFB<sub>1</sub> の急性毒性影響の軽減を招来した。それと一致し、新生時 GS 投与は、成熟ラットにおける AFB<sub>1</sub> の慢性毒性を抑制したのに対し、 $\alpha$ -ZOL 投与は逆に AFB<sub>1</sub> の慢性毒性を促進することが見出された。

以上、本研究により、成熟ラットにおける AFB<sub>1</sub> の活性化と解毒に関わる肝臓代謝機能および AFB<sub>1</sub> の毒性に及ぼす新生時期の天然エストロゲン GS および  $\alpha$ -ZOL への暴露の影響について今まで不明であった重要な知見が得られた。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位を授与するのに値するものと認めた。