

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成21年度博士課程 入学

氏名 スチトラ ガンボンサ

指導教員名 局 博一

論文題目 Studies on cardiovascular and autonomic nervous effects of
trichothecene mycotoxin in the rat

(トリコテセンマイコトキシンのラット心臓血管系および自律神経系に及ぼす影響に関する研究)

第1章 序論

カビ毒（マイコトキシン）は様々な真菌から産生される自然毒の一種であり、一定量の摂取によりヒトや家畜に急性あるいは慢性の健康障害をもたらすことが知られている。障害は、嘔吐、消化管炎症、発癌、神経症状、循環器症状、泌尿生殖器障害、内分泌器障害など多岐にわたるが、その発現性はカビ毒の種類によって異なる。近年、国内産食品および輸入食品（トウモロコシ、小麦、大麦などの穀類およびそれらの加工食品）中に赤カビ（フザリウム属菌）が産生する毒素であるトリコテセン系マイコトキシンが20%を上回る高い頻度で検出されており、当該マイコトキシンによる健康影響が危惧されている。トリコテセン系マイコトキシンはその化学構造中にトリコテセン環を有し、約100種類の存在が知られているが、食品や飼料における分布の広さ、汚染濃度および毒性の強さの点で、T-2トキシン、T-2トキシンの代謝産物であるHT-2トキシン、デオキシニバレノール（DON）、ニバレノールが重要視されている。

本研究は、トリコテセン系マイコトキシンの代表的なカビ毒であるT-2トキシンおよびDONの生体影響のうち、とくに知見が乏しい循環器ならびに自律神経系に対する作用に注目して、急性実験、亜急性実験ならびに*in vivo* および*in vitro*の実験系を通じて、両カビ毒の毒性を体系的に解明することを目的に行われた。

第2章 DON および T-2 トキシンの投与による心拍数、血圧および心電図波形の急性反応

全身麻酔下の成熟ラット (Wistar, 雄) を用いて、DON (0.5、1、2 mg/kg) および T-2 トキシン (0.1、0.5、1 mg/kg) の皮下投与による血圧および心電図の変化を3時間にわたって記録した。上記の DON および T-2 トキシンの投与によって、DON では投与後90分以降で対照群 (溶媒のみ投与群) に比べて心拍数の有意な減少、T-2 トキシンでは有意な増加が認められた。大腿動脈の平均血圧は、いずれのトキシンも投与後30分以降で有意な上昇が観察された。DON では、用量依存性の上昇であったが、T-2 トキシンでは0.5 mg/kg で上昇がもっとも明瞭であった。また、心電図の波形解析では、T-2 トキシンにおけるQT間隔の延長、両トキシンによるR波の増高ないし減高などの変化が認められた。さらに、DON では1、2 mg/kg で期外収縮、T-2 トキシンでは0.5 mg/kg で心室頻拍といった不整脈の発現がみられた。

第3章 無麻酔、無拘束ラットにおける DON および T-2 トキシンの循環機能および自律神経機能への影響

前章の実験結果から、DON および T-2 トキシンは循環器系に影響をもたらすことが示唆された。しかしながら、麻酔下における短時間の観察のみでは、自律神経系機能の変化など、より詳細な変化を明らかにすることは困難である。そこで本章では、テレメトリ送信機を体内に埋入したラットを用いて、無麻酔、自由行動下における心電図変化および自律神経機能変化を長時間にわたって連続記録、観察を行った。すなわち、1週間の術後回復期を経た後に、DON (0.5、1、2 mg/kg) あるいは T-2 トキシン (0.1、0.5 mg/kg) を3日間隔で2回皮下投与した。投与直後の心拍数は、いずれのトキシンも投与後90分以降で用量依存性の増加が示されたが、DON は投与後3時間で回復傾向を示したのに対して、T-2 トキシンではその後の2日間にわたって増加傾向が示された。DON では投与後3日間のQT間隔は高用量の2 mg/kg で延長傾向が示された。T-2 トキシンでは、QRS持続時間の延長が認められた。また、両トキシンの投与後の3日間において、第2度房室ブロック、洞性徐脈、上室性期外収縮、心室期外収縮、心室頻拍などの不整脈の発現が多く観察された。また、心拍変動解析の結果、両トキシンで自律神経機能の変化が生じることが明らかになった。DON では投与直後の90分を中心にしてLFパワー、HFパワー、LF/HF比、トータルパワーの低下が、T-2 トキシンでは120分目以降でHFパワーおよびトータルパワーの低下が観察された。

次いで、上記の変化に自律神経機能がどのように関与しているかを明らかにするために、自律神経遮断薬の効果を調べた。すなわちアトロピン（副交感神経遮断薬）またはプロプラノロール（交感神経遮断薬）を含む浸透圧型ミニポンプを体内に埋入したラットにおいて、DON および T-2 トキシンの投与効果を観察した。アトロピンによって DON (2 mg/kg) および T-2 トキシシ (0.5 mg/kg) のいずれも LF パワー、HF パワー、LF/HF 比の低下が、またプロプラノロールによって DON では LF/HF 比の上昇とトータルパワーの上昇が認められ、T-2 トキシシでは LF パワー、LF/HF 比の低下、トータルパワーの上昇が認められた。一方、不整脈の発現性では、第 2 度房室ブロックおよび洞性徐脈がアトロピンおよびプロプラノロールによって減少し消失した。しかしながら自律神経遮断を行っても消失しない不整脈もみられ、心室期外収縮の出現頻度はアトロピンによってむしろ増大した。

第 4 章 T-2 トキシシによる循環動態および血中酸化ストレスの変化

前章の実験によって、DON および T-2 トキシシは不整脈を含む循環器障害をもたらすことが明らかになったが、心臓および末梢血管系全体の循環動態がどのように変化しているかを明らかにする必要がある。そこで心エコー・ドプラー法を用いた観察によって T-2 トキシシによる循環動態の変化を T-2 トキシシ(0.1、0.5 mg/kg)の皮下投与後 48 時間後に調べた。その結果、一回拍出量、駆出率には有意な変化が観察されなかったが、左室内径短縮率、心拍出量は増加が示された。また大腿動脈の血流速、末梢血管抵抗（拍動指数 (PI)、抵抗指数 (RI)）には有意な変化が示されなかったが、総頸動脈の平均血流速は有意に増加した。

上記の測定を行ったラットの血液の酸化ストレス度を分析した。活性酸素量を反映する指標である d-ROMs 値は T-2 トキシシの用量依存性増加、抗酸化能を反映する BAP 値は無変化、また相対的な酸化ストレス度を示す d-ROMs/BAP 比は有意な増加が示された。

第 5 章 心筋細胞におけるミトコンドリアの電子伝達系への T-2 トキシシおよび DON の毒性

前章までの実験で、DON および T-2 トキシシの心臓影響には自律神経が関与する場合のほか自律神経が関与しない機序で毒性をもたらす可能性も示唆された。そこで、これらの毒素の心臓への直接作用の有無を明らかにする目的で、新生子ラットから分離された一次培養心筋細胞を用いて細胞の呼吸機能（酸素消費量、OCR）に対する両毒素の作用を調べた。72 時間培養心筋細胞の OCR は濃度

依存性の減少を示し、DONは0.78 μM 、T-2トキシンは 6×10^{-5} μM の濃度で明らかな減少が示された。ミトコンドリアにおけるATP合成酵素の阻害薬であるオリゴマイシンの作用に対するOCR反応性はDONで0.78 μM 、T-2トキシンは 6×10^{-5} μM 、プロトンイオノフォアであるFCCPに対するOCR反応性はDONで3.13 μM 、T-2トキシンは 6×10^{-5} μM で有意な減少が示された。

以上の実験成績から、DONおよびT-2トキシンはいずれも不整脈の誘発を含む明瞭な心臓血管系毒性を有し、その毒性は自律神経系への影響および心筋細胞への直接作用によって生じること、その機序として酸化ストレスおよびミトコンドリア障害による細胞毒性の関与の可能性が示唆された。また、T-2トキシンの毒性閾値はDONの毒性閾値に比べて明らかに低いことが明らかになった。本研究成果は、食品中のトリコテセン系カビ毒による健康リスクを評価する上で有益な情報をもたらすものと考えられた。