

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 スチトラ ガンボンサ

カビ毒は様々な真菌から産生される自然毒の一種であり、その食品および飼料への汚染は食品衛生および家畜衛生上の大きな問題になっている。本論文では、穀類における汚染域の広がりや毒性の強さの面から危惧されている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 トキシンおよびデオキシニバレノール (DON) の生体影響を明らかにするために、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ものである。

まず、全身麻酔下の成熟雄ラットを用いて急性実験を行った。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 時間にわたって観察したところ、両トキシンによる血圧上昇、心拍数の減少または増加、不整脈の出現および心電図波形成分の変化が観察された。

次いで、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をテレメトリー法を用いて長時間の観察を行った。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 OT 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。さらに、上記の変化に関する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。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ないし消失した。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。また、心拍変動解析においても各パワー成分に明瞭な変化が認められた。

前章までの実験によって、DON および T-2 トキシン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ために、カラードプラー・心エコー法を用いた観察を行った。対照群および T-2 トキシン(0.02、0.1、0.5 mg/kg)の皮下投与後 48 時間後に調べた結果、0.02 mg/kg で総頸動脈収縮期血流速および心拍数の有意な上昇、0.5 mg/kg で総頸動脈平均血流速の有意な上昇が認められたものの、その他の心機能指標、末梢血管指標には有意な変化は観察されなかった。

さらに、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 トキシンの用量依存性増加 (0.1 mg/kg 以上で有意な増加)、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 0.5 mg/kg で有意な増加が示された。

前章までの実験で、DON および T-2 トキシンの心臓影響には自律神経が関与する場合のほかにも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  $0.78 \mu\text{M}$ 、T-2 トキシンは  $6 \times 10^{-4} \mu\text{M}$  の濃度で有意な減少が示された。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  $0.78 \mu\text{M}$ 、T-2 トキシンは  $6 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ 、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  $3.13 \mu\text{M}$ 、T-2 トキシンは  $6 \times 10^{-5} \mu\text{M}$  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。本研究結果は、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。

以上を要するに、本研究は、現在食品および飼料への汚染が問題となっている重要なカビ毒であるデオキシニバレノールと T-2 トキシンの循環器毒性を定性的、定量的に明らかにしたものであり、本研究結果は公衆衛生ならびに家畜衛生の向上に資するところが大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。