

## 学位論文題名

Study on the effects of acute exposure to deoxynivalenol  
on the liver and immune system of pigs

（デオキシニバレノールの急性暴露が豚の肝臓および  
免疫系に与える影響に関する研究）

## 学位論文内容の要旨

デオキシニバレノール（DON）は穀物を汚染する主要なマイコトキシンの一つである。消化管から吸収された後、DONの一部は肝臓で無毒化され排泄される。豚は最もDONに感受性の高い動物であるが、肝臓や免疫系に対する急性暴露の影響については確立されていない。

第1章では、DONの豚肝細胞に対する細胞毒性について検討した。初代培養肝細胞の細胞死がDON添加6時間後からDON 100, 10 µg/ml群で認められ、24時間後にはDON 100, 10, 1, 0.1 µg/ml群で濃度依存性にみられた。細胞死した肝細胞はアポトーシスに特徴的な形態学的変化を呈し、TUNEL法で核が陽性を示した。また、カスパーゼ-3活性の上昇がDON 100, 10, 1 µg/ml群で認められた。培地中へのアルブミン分泌はDON 100, 10, 1, 0.1, 0.01 µg/ml群で有意に減少した。これらの結果から、DONはカスパーゼ-3の活性化を介する経路でアポトーシスを誘導し、また豚肝細胞に機能的な障害を引き起こすことが明らかになった。これらはDONの肝毒性を示唆するものである。

第2章では、*in vivo*でアポトーシスに注目しDONの肝毒性および免疫毒性を確認するため、1ヵ月齢の豚6頭にDONを静脈内投与した。DON投与豚の病理組織学的検査では、全身のリンパ組織でリンパ球のアポトーシスが認められ、肝臓では肝細胞のアポトーシスが観察された。リンパ球と肝細胞のアポトーシスは、TUNEL法と一本鎖DNAおよび活性型カスパーゼ-3に対する免疫組織化学的染色により証明された。胸腺と回腸パイエル板のTUNEL陽性細胞数は、DON投与6時間後よりも24時間後に増加したが、肝臓では6時間後がピークであった。これらの結果から、豚で

DON の急性暴露により誘導された肝細胞のアポトーシスは DON の潜在的肝毒性を示すものであり、加えて、全身のリンパ組織におけるリンパ球のアポトーシスは免疫毒性を示すものであると考えられた。

第 3 章では、まずリンパ組織における炎症性サイトカインの遺伝子発現を異なる発育段階の豚で比較し、発現のベースラインを調べた。続いて DON 投与豚でこれらのサイトカイン発現を検討した。脾臓、胸腺、扁桃、膝窩リンパ節および腸間膜リンパ節のインターロイキン (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 および腫瘍壊死因子 (TNF)- $\alpha$  の発現を調べたところ、サイトカイン遺伝子の発現は豚の年齢およびリンパ組織の部位により異なることが示された。DON 投与豚では、脾臓で投与 6 時間後に IL-1 $\beta$  遺伝子発現の上昇と 24 時間後に IL-18 発現の低下がみられた。胸腺では 6 時間後に IL-1 $\beta$  および IL-6 発現の上昇が認められ、腸間膜リンパ節では 6 時間後に TNF- $\alpha$  発現が低下した。以上から、豚で DON の急性暴露により、リンパ組織の炎症性サイトカイン遺伝子発現は変調をきたすことが明らかになった。

第 4 章では、DON の急性暴露が炎症反応に与える影響を調べるため、ミニブタに DON を投与し、白血球数、血液中のサイトカインおよび急性期タンパク濃度の動態および末梢血好中球の化学発光能について検討した。白血球数は、好中球数の増加により投与 3, 6 および 12 時間後に一過性の増加がみられた。好中球の化学発光能は投与 24 時間後に有意に上昇し、好中球の殺菌能の活性化が示唆された。また、投与 3 時間後には血液中 IL-8 および TNF- $\alpha$  濃度の上昇、6 時間後には IL-6 濃度の上昇、24 時間後にはハプトグロビンおよび血清アミロイド A 濃度の上昇が有意に認められた。これらの結果から、DON は末梢血中に IL-8 による好中球の一過性動員とそれに引き続く殺菌能の活性化を誘導するとともに、炎症性サイトカインおよび急性期タンパク濃度の上昇を引き起こすことが明らかとなり、DON の急性暴露による豚への免疫変調作用が示された。

本研究では、*in vitro* で DON の豚肝細胞に対するアルブミン分泌の抑制とアポトーシスという形での細胞毒性について明らかにした。さらに、*in vivo* でも肝細胞およびリンパ球のアポトーシスが認められることを DON 投与豚で証明し、DON の肝毒性および免疫毒性を示した。また、DON は豚のリンパ組織で炎症性サイトカイン遺伝子発現を変調させた。加えて、DON は血液中炎症性サイトカインおよび急性期タンパクを誘導し、好中球を活性化させることを豚で初めて明らかにした。これらの

知見は、DONの毒性の包括的理解だけでなく、ヒトや動物における急性中毒の病態解明にも貢献するものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 梅 村 孝 司  
副 査 教 授 木 村 和 宏  
副 査 教 授 大 橋 和 彦  
副 査 教 授 石 塚 真由美

## 学位論文題名

### Study on the effects of acute exposure to deoxynivalenol on the liver and immune system of pigs

(デオキシニバレノールの急性暴露が豚の肝臓および  
免疫系に与える影響に関する研究)

デオキシニバレノール (DON) は穀物を汚染する主要なマイコトキシンの一つである。消化管から吸収後、DONの一部は肝臓で代謝され排泄される。豚は最もDONに感受性の高い動物であるが、肝臓や免疫系に対する急性暴露の影響については確立されていない。

第1章では、DONの豚肝細胞に対する細胞毒性について初代培養肝細胞を用いて検討した。その結果、DONはカスパーゼ-3の活性化を介する経路で肝細胞のアポトーシスを濃度依存性に誘導し、また肝細胞に機能的な障害を引き起こすことを明らかにした。

第2章では、DONを豚に投与し*in vivo*で肝毒性および免疫毒性を確認した。DON投与豚の病理組織学的・免疫組織化学的検査では、肝臓で肝細胞のアポトーシスが認められ、全身のリンパ組織で広範にリンパ球のアポトーシスが観察されたことから、DONの豚における肝毒性および免疫毒性が示唆された。

第3章および第4章では、DONの急性暴露が豚の免疫系に与える影響をさらに調べるため、リンパ組織における炎症性サイトカインの遺伝子発現を検討した。この発現のベースラインは豚の年齢およびリンパ組織の部位により異なるが、DON投与豚では炎症性サイトカイン遺伝子発現が変動することを明らかにした。

加えて、DONは投与豚にIL-8による末梢血好中球の一過性動員とそれに引き続く殺菌能の活性化を誘導すること、炎症性サイトカインおよび急性期タンパク濃度の上昇を引き起こすことを見だし、DONの急性暴露による免疫変調作用を示した。

DONの肝毒性を*in vitro*および*in vivo*で示し、またDONの急性暴露が豚の免疫系、特に炎症反応に与える影響を明らかにした本研究は、DONの毒性の包括的理解だけでなく、ヒトや動物における急性中毒の病態解明にも貢献するものと判断された。よって、審査員一同は、上記学位論文提出者三上 修氏が博士(獣医学)の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。