

学位論文要旨	
氏名	成見 香瑞範
題目	成熟ラットを用いた反復投与肝小核試験法の開発に関する研究 (Developmental Study of Repeated-Dose Liver Micronucleus Assay Using Adult Rats)
<p>肝小核試験（小核の誘発を指標として染色体損傷を検出する試験法）は、肝発がん性を高感度に予測できる試験法であり、肝臓を標的とする遺伝的毒性物質の評価に有用である。近年、使用動物の3Rs（削減、代替、改善）を唱える動物福祉の趨勢は、規制毒性試験にも向けられ、遺伝毒性指標の反復投与毒性試験への組み込みが求められつつある。しかし、これまでに開発された肝小核試験では、成熟ラットの肝細胞の低い分裂活性を補うため、部分肝切除やマイトジェン投与により人為的に増殖を亢進させるか、若齢動物の肝臓を使用する方法しかなかった。また、いずれの試験法においても、<i>in situ</i> 全肝灌流による肝細胞分離法が採用されている。したがって、無処置の成熟動物を用いて行われる反復投与一般毒性試験に、肝小核試験を組み込むことは不可能であった。</p> <p>本研究では、成熟ラット肝細胞の寿命が長く（200日以上）、細胞交替が緩慢なことに着目した。まず、肝発がん物質の反復投与により、小核を誘発した肝細胞（MNHEP）が蓄積するか否かを確認するため、diethylnitrosamine（DEN）と2,4-diaminotoluene（2,4-DAT）を雄成熟ラットに5、14、28日間反復経口投与した。その結果、DENは5日間以上、2,4-DATは14日間以上投与することによりMNHEPを誘発し、その頻度は投与回数に依存して増加した。また、肝組織を他の毒性指標と同時に利用評価できるように、<i>in situ</i> 肝灌流に替わる方法を検討したところ、肝臓の一部を遠心管内でコラゲナーゼ処理するだけの極めて簡便な分離法が確立できた。</p> <p>次に、小核を誘発した肝細胞のその後の動態を直接観察するため、DENを成熟雄ラットに反復経口投与し、チミジンアナログである5-ethynyl-2'-deoxyuridine（EdU）をDEN投与の1、7、14日目に腹腔内注射した。EdU注射24時間、1、2週間後に肝細胞を分離し観察した。その結果、1日目にEdU標識されたMNHEPはDEN投与2週間目まで残存していた。しかし、EdUで標識された肝細胞の内、MNHEPの頻度は経日的に減少した。加えて、肝組織においてTUNEL陽性細胞数の増加が認められたことから、小核を誘発した細胞が選択的に除去される可能性が示唆された。また、DENを投与した各日のMNHEP頻度の積算値を、消失率を考慮して理論的に求めた結果、肝小核試験で実際に観察された値と近似していた。</p> <p>以上の結果から、(1) <i>in situ</i> 肝灌流法を用いない肝細胞分離法の確立により、肝小核試験の一般毒性試験への組み込みが可能になった。(2) 遺伝毒性肝発がん物質により小核を誘発した肝細胞は選択的に除去され得るが、一定の割合で長期間残存するため、反復投与により蓄積し、その頻度を増加させることが示唆された。(3) 成熟ラットの肝臓であっても、14日間以上反復投与することで被験物質の小核誘発性を高感度に検出できることが明らかになった。</p> <p>本研究で開発した反復投与肝小核試験法は、使用動物数の削減に貢献するだけでなく、被験物質の総合的な毒性評価を比較的低用量において可能とするものである。</p>	