

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	成見 香瑞範
審査委員	主査 宮崎大学 教授 芦澤 幸二
	副査 宮崎大学 准教授 續木 靖浩
	副査 琉球大学 教授 建本 秀樹
	副査 佐賀大学 教授 尾野 喜孝
	副査 鹿児島大学 教授 岡本 新
審査協力者	
題 目	<p>Developmental Study of Repeated-Dose Liver Micronucleus Assay Using Adult Rats</p> <p>(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)</p>
<p>現代社会において、我々の身の周りには医薬品や食品添加物、農薬など、様々な化学物質が氾濫している。新規に合成、開発される化学物質は人間に対する有害性が未知である。したがって各国は、遺伝毒性試験や一般毒性試験等の安全性試験の実施を義務付けている。また最近、動物福祉の立場から、使用動物の3Rs（削減、代替、改善）が、これら毒性試験にも強く求められている。そのため、遺伝毒性試験を一般毒性試験の中に組み込むことで、使用動物数を削減することは急務である。</p> <p>被験物質が染色体異常を誘発させるか否かは、損傷を受けて生じる染色体断片が細胞分裂時に小核となって現れるかどうかで判定できる。「肝小核試験」は、肝臓を標的とする遺伝毒性発がん物質を高感度に検出できる。ところが、これまで開発された方法では、成熟ラットの肝細胞の低い分裂活性を補うため、部分肝切除や細胞分裂促進物質の投与により人為的に細胞の増殖を亢進させるか、分裂能力の高い若齢動物の肝臓を使用する手法しかなかった。どの試験法においても、肝臓に直接コラゲナーゼ溶液を灌流して肝細胞を分離する <i>in situ</i> 全肝灌流法が採用されている。そのため、無処置の成熟動</p>	

物を用いて行われる一般毒性試験に、肝小核試験を組み込むことは不可能であった。本研究は、これらの課題に対して、簡便かつ信頼性のある新たな肝小核試験法の開発を試みたものである。

著者は、成熟したラット肝細胞の寿命が200日以上と長く、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って小核を誘発した肝細胞 (MNHEP) が蓄積されるか否かを確認するため、肝臓を標的とする化学発がん物質である diethylnitrosamine (DEN) と 2,4-diaminotoluene (2,4-DAT) を雄の成熟ラットに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 が誘発され、その頻度は投与回数に依存して増加することを明らかにした。また著者は、肝組織を他の毒性指標と同時に利用評価できるように、*in situ* 全肝灌流に替わる方法を検討し、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肝細胞の分離法を確立した。

次に著者は、小核を誘発した肝細胞のその後の動態を直接観察できる方法の開発を試みた。DEN を成熟雄ラットに反復経口投与し、チミジン類似化合物である 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て観察したところ、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ることを明らかにした。しかし、EdU で標識された肝細胞のうち、MNHEP の頻度は経日的に減少しており、加えて、肝組織においてアポトーシス誘導を示す TdT-mediated dUTP nick end labeling 陽性細胞の増加が認められたことから、著者は、小核を誘発した細胞は選択的な除去を受けやすいと推察している。また、DEN を投与した各日の MNHEP 頻度の積算値を、経日的な MNHEP 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る値と近似していることを見出した。

これらの結果から、*in situ* 肝灌流法を用いない新たな肝細胞分離法を確立したことにより、一般毒性試験へ肝小核試験を組み込むことが可能になった。また、遺伝毒性を有する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考えられた。したがって著者は、どのような被験物質であっても、成熟ラットの肝臓に14日間以上反復投与することで、小核誘発を高感度に検出できると推察している。

以上のように本研究は、一般毒性試験に組み込む形で、新規化学物質の肝発がん性を簡便かつ高感度に予測できる遺伝毒性評価法をはじめて開発したものであり、遺伝毒性学と動物福祉・資源学上極めて価値のある業績であると認める。さらに、この評価法は、使用する動物数の削減に貢献するばかりではなく、低用量で被験物質の総合的な毒性を評価できるため、近い将来、国際的な試験法ガイドラインに収載され、世界各国の安全性評価に寄与するものと強く示唆された。したがって審査員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として十分に価値あるものと判定した。