

最終試験結果の要旨	
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	
実施年月日	平成 25 年 8 月 7 日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。） <input type="checkbox"/> 口答・筆答	
<p>主査並びに副査の5名は、平成25年8月7日（水）の公開審査会において、学位申請者本人に対して学位申請論文の内容について説明を求め、その研究内容と関連事項について試問を行った。具体的には、次ページ（No. 2）のような質疑がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は、学位申請者が博士（農学）の学位を受けるに十分な学力並びに識見を有すると認める。</p>	

学位申請者 氏 名	成見 香瑞範
<p>【質問 1】肝細胞はライフスパン（ターンオーバー）の間に細胞分裂を何回くらい繰り返すのか？</p> <p>【回答 1】肝細胞がターンオーバーするまでの分裂回数を正確に評価した実験報告はない。</p> <p>【質問 2】より分裂性の高い幼若動物で実験した場合の染色体異常の誘発感度は？</p> <p>【回答 2】分裂性の高い幼若肝の方が小核誘発頻度は高くなる。</p> <p>【質問 3】分裂細胞の標識に用いた EdU は、常時存在するのか？我々の行った実験では、最初に取り込んだ BrdU は細胞分裂を繰り返すと、1/2、1/4 と減っていく。EdU はどの程度まで検出可能か？</p> <p>【回答 3】EdU は単回腹腔内投与であり、投与初期にのみ存在する。EdU を取り込んだ細胞が分裂増殖したケースは、増殖性の低い成熟ラット肝を用いた今回の実験（残存・蓄積性の検証）では想定していない。核酸アナログを連続投与した場合、細胞に毒性・変異をもたらす懸念もある。残存性の確認を主目的とした今回の実験では、単回投与が妥当であったと考える。</p> <p>【質問 4】実験を n=5 で行っているが、この分野の実験はそれくらいの頭数で良いのか？</p> <p>【回答 4】遺伝毒性試験のガイドラインでは、n=5 以上と規定されている。</p> <p>【質問 5】変異誘発を受けやすい細胞の性質は、何に影響するのか？</p> <p>【回答 5】<i>in vivo</i> 実験で、個々の細胞で感受性を評価した研究はされていない。しかし <i>in vitro</i> 研究では、S 期に遺伝毒性物質に暴露された細胞は変異を誘発しやすいなど、細胞周期に大きく影響することが報告されている。</p> <p>【質問 6】変異誘発した細胞の局在は？散在しているのか、それとも限局的なのか？</p> <p>【回答 6】小核試験では、組織を分散した細胞標本で観察するため、組織中の局在は不明である。</p> <p>【質問 7】小核を保有した細胞の局在と発がん部位との関連性は？</p> <p>【回答 7】変異の誘発部位と発がん部位の関係性は興味深い。今後研究したいテーマである。</p> <p>【質問 8】最初に小核を誘発した細胞は、反復投与による影響を受けるのか？さらなる分裂を行わないのなら、影響を受けないのか？化学物質に対して抵抗性を持つようになるのか？死なないうで残っていくのか？周りの細胞とは違う細胞になっていくのか？</p> <p>【回答 8】小核を誘発した細胞は次の細胞周期において、殆どがアポトーシスを受けて死滅するが、チェックポイントをすり抜けた変異細胞は分裂増殖を繰り返す性質を獲得するものもある。これらの細胞は、反復投与下では、その後も化学物質に暴露され、さらに変異を生じる可能性が考えられる。</p> <p>【質問 9】2,4-DAT の死亡例の解剖所見はあるか？その死因は、n 数が大きくなれば大きな意味合いを持つことになると思うが。</p> <p>【回答 9】見ていない。死亡例は死後時間が長く、適切な所見を得るのは極めて困難である。</p> <p>【質問 10】小核保有肝細胞の残存蓄積実験は組織で見ているのか？組織で見た場合と分離細胞で見た場合で、小核誘発率は一致するか？一致しなければ、分離細胞で見る意義がないのでは？</p> <p>【回答 10】組織標本では断面に小核が存在しない限り、適切に観察評価できない。断面ではなく細胞丸ごと組織から分離して個々の細胞を観察することが、必須要件となる。</p> <p>【質問 11】小核を誘発した細胞と、TUNEL 陽性細胞や GST-P 陽性細胞は一致するか？</p> <p>【回答 11】分離細胞において、TUNEL や GST-P の評価は行ったことがない。ホルマリン浮遊細胞の染色法等が確立されておらず、小核保有細胞を対象として評価するには、数十万の肝細胞を観察しなければ有効なデータが得られないため、現実的ではない。現状は、組織上で観察評価するしかない。</p> <p>【質問 12】小核がアポトーシスで生じるのなら、アポトーシスの中期から後期にかけてだと思うが、TUNEL 陽性反応や GST-P 陽性反応は初期の段階で起こるのでは？</p>	

【回答 12】小核保有細胞は、大きな主核と小さな小核を1つか2つ伴った細胞像であり、アポトーシス像とは明確に異なる。アポトーシスの結果として小核が形成されるわけではなく、小核を保有する細胞に、その後、アポトーシスが誘導されると考えられる。

【質問 13】GST-Pなどの発がんマーカーが、小核誘発とどのくらい一致するのを見る必要はないのか？小核が出なくても発がん陽性が出たりしないのか？それらの関連性を教えて欲しい。この小核は発がん性ではなく、ただ単に細胞障害を見ているのでは？

【回答 13】本研究では、低用量の肝発がん物質の反復投与条件下で見られた肝細胞の小核誘発性と細胞増殖性の増大を発がんプロセスの初期変化として捉え、考察を加えるために、前がん病変マーカーのGST-Pや増殖マーカーのKi-67染色を行ったものである。発がん性を適切に評価するには1年以上の投与期間を要するが、28日間の反復投与試験に肝小核試験を組み込むことで、より早期に肝発がん性のリスクを検出できることが期待される。肝小核試験は肝発がん物質に対して感受性が高いことから、今後、肝小核試験で陽性となった場合は、GST-PやKi-67等による免疫組織学的な検査項目を追加して、診断精度の向上が見込まれる。

【質問 14】今後、小核は発がん検出マーカーの一つとして使えるということか？

【回答 14】そうなり得るものと考えられ、そう期待している。

【質問 15】*in vitro*で肝細胞を同様に処理した場合、増殖中の肝細胞に、同じように小核ができるか？また、その確立は*in vivo*より高くなるのか？

【回答 15】*in vitro*でも小核は同様に形成されるが、*in vitro*実験の場合、処理する化合物の濃度や処理時間によっては分裂抑制や細胞毒性が生じるため、単純ではない。

【質問 16】学位論文中の考察で酸化ストレスについて触れているが、ラットは肝臓でアスコルビン酸を産生するため、酸化ストレスの影響を考えるには、モルモットやミニブタなど、ヒトと抗酸化ストレスの防御機構が同様の動物種を使用した方が良いのでは？

【回答 16】用いた化学発癌物質の主たる変異誘発メカニズムはDNAアダクト生成であるが、速やかに修復されることが知られている。24時間間隔で反復投与した場合、1日当たりの小核誘発率は一定に推移するものと考えられた。しかし、今回の実験では、投与日数の増加に伴い、肝細胞の小核誘発率や増殖性が増大したことから、別のメカニズムを考察する必要があった。DENの単回投与により、酸化損傷レベルが3日後でも高値を持続すると報告されていることから、それとの関連性を考察したものである。ほかの動物種で、酸化損傷と小核誘発の関連性を研究した報告はないと考える。

【質問 17】最近、ノックアウトしたラットやマウスを用いた毒性試験が多くなされているが、必ずしもヒトに当てはまらないと言われている。ヌードマウスなどを用いて種々やっても、ヒトに影響が出ている。種差などを考慮して、より近い動物種を利用することも良いのでは？

【回答 17】そのとおりだと思う。しかし、ヒトと全く同様の薬物代謝・動態を有する試験系には限界がある。医薬品であればヒトでの臨床検査が必須であるが、市販されて初めて使用例の中で得られる所見もある。副作用報告に対して迅速な原因究明を行うなど、開発者側の対応が求められる。

【質問 18】参考データの中で、非変異発がん物質のクロフィブレートが、反復投与肝小核試験では陽性であった。反復投与肝小核試験では、遺伝毒性物質でないものでも検出できるか？

【回答 18】クロフィブレートの発がん機序は記憶が定かではないが、*in vitro*の染色体異常試験で陽性であり、肝臓を発がん標的としていることから、肝小核試験で陽性が得られたことはリーズナブルな結果であると思われる。

【質問 19】反復投与する場合の投与量を事前に設定することはできるか？

【回答 19】基本的には、一般毒性試験で設定される用量で小核誘発性を評価することになる。今後、肝小核試験が反復投与毒性試験の中で実施すべき試験項目として一般化された場合には、肝小核の検出に適した用量を含めて、設定されるようになるかもしれない。

【質問 20】サルなど、ラット以外の動物種に応用し、かつ、ほかの臓器でも評価できるか？

【回答 20】サルにおいて試行した結果が学会報告されていたが、肝組織に脂肪が多いためか、ラットと同じ細胞分離条件では、評価に適した標本を得るのが困難であるとのことであった。また、細胞分裂が盛んな、造血系、消化管、皮膚、精巣などで十分可能である。

以上