

氏 名	はま だ しゅう いち 濱 田 修 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2448 号
学位授与の日付	平 成 14 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	小核試験による遺伝毒性評価法に関する研究 —特に脾臓での異常赤血球除去機能の高い動物への適用—
論文調査委員	(主 査) 教 授 佐 々 木 義 之 教 授 今 井 裕 教 授 宮 本 元

### 論 文 内 容 の 要 旨

遺伝毒性試験は遺伝障害を引き起こす物質を検出するための試験系であり、小核試験は細胞中に出現する小核を指標として染色体異常誘発性を評価する、優れた遺伝毒性試験の一つである。特にマウスの赤血球を用いた小核試験は、本来核をもたない赤血球中の小さな核を評価対象とする、極めて単純で、観察精度の高い試験系である。しかしながら、ラットやヒト、ウシをはじめとする多くの動物では脾臓の機能が発達し、骨髄から末梢血に放出された小核を有する赤血球は、異常赤血球として除去されてしまうため、この遺伝毒性試験を用いることができないとされてきた。

本研究では脾臓機能の発達したラットにおいて、赤血球を用いた小核試験を可能としたものであり、小核試験結果に影響を及ぼす可能性のある因子として使用系統、週齢、性の影響についての検討も行った。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. マウスにおいて遺伝毒性報告のある化合物 (2-acetylaminofluorene, cyclophosphamide, methyl methanesulfonate, potassium bromate, urethane, 1-β-D-arabinofuranosylcytosine, cholchicine) についてラットを用いた短期投与試験を実施し、ラットでも染色法をアクリジンオレンジ染色にして、観察対象を幼若赤血球に絞り込むことで、脾臓におけるトラップ、除去前の小核赤血球を有効に検出できることを明らかにした。

2. ラット短期試験で陽性となった化合物 (2-acetylaminofluorene, benzo [a] pyrene, cyclophosphamide, 1,2-dimethylhydrazine, methyl methanesulfonate, mitomycin C, monocrotaline oil orange SS, phenacetin, potassium bromate, urethane, 1-β-D-arabinofuranosylcytosine, cholchicine, 6-mercaptopurine) について28日間低用量の反復投与による検討を行った。その結果、これらの化合物では、ここで考案した評価法 (投与4日目に末梢血, 28日目の剖検時に骨髄と末梢血をサンプリングして小核誘発性を評価する) を用いることで、一般毒性試験に用いられるような低用量でも小核を誘発することが確認できた。

3. 使用系統による小核試験結果への影響について検討した。使用系統の違いによる小核誘発物質への感受性の差を認めしたが、陽性と陰性の判定が覆ることはなく、いずれのラット系統を用いても赤血球小核試験が実施可能であることを示した。しかし、感受性の高いDRHやスプレイグドレーイなどのラット系統を用いることでより高精度の評価が可能であることを示した。

4. 週齢の小核試験結果への影響について検討した。加齢に伴う感受性の低下を認めしたが、加齢により陽性と陰性の判定が覆ることはなく、いずれの週齢を用いても赤血球小核試験が実施可能であることを示した。また、加齢に伴う感受性の低下は、加齢に伴う造血機能の低下と非常によく相関していることを見出し、より高精度の評価には若齢のラットを用いることが望ましいことを示した。

5. 性の小核試験結果への影響について検討した。感受性において、僅かな性差を認めしたが、性により陽性と陰性の判定が覆ることはなく、いずれの性を用いても赤血球小核試験が実施可能であることを示した。

6. これらの検討を通じて、感受性の系統差、加齢による差、性差は造血機能と強く相関していることを見出し、より高

精度の評価には造血系指標の考慮が重要であることを示した。

### 論文審査の結果の要旨

遺伝毒性試験は遺伝障害を引き起こす物質を検出するための試験系であり、小核試験は細胞中に出現する小核を指標として染色体異常誘発性を評価する、優れた遺伝毒性試験の一つである。特にマウスの赤血球を用いた小核試験は、本来核をもたない赤血球中の小さな核を評価対象とする、極めて単純で、精度の高い試験系である。しかしながら、ラットやヒト、ウシをはじめとする多くの動物では脾臓の機能が発達し、骨髓から末梢血に放出された小核を有する赤血球は、異常赤血球として除去されてしまうため、この遺伝毒性試験を用いることができないとされてきた。

本研究は脾臓機能の発達したラットにおいて、赤血球を用いた小核試験を可能としたものであり、得られた結果の概要は以下の通りである。

1. マウスにおいて遺伝毒性報告のある化合物についてラットを用いた短期投与試験を実施し、ラットでも染色法をアクリジンオレンジ染色とし、観察対象を幼若赤血球に絞り込むことで、脾臓におけるトラップ、除去前の小核赤血球を有効に検出できることを明らかにしている。

2. ラット短期試験で陽性となった化合物について28日間低用量の反復投与による長期投与試験を行い、評価法の改良により、低用量での小核試験に成功している。

3. 小核試験の結果に影響を及ぼす可能性があると考えられる因子として、使用系統、週齢、性に関する検討を行い、これらが小核試験の結果に影響を与えることが判明したが、陽性と陰性の判定が覆ることはなく、使用系統、週齢、性に関わらず、ラット赤血球を用いた小核試験が実施可能であることを示している。

4. これらの変動要因の多くが造血機能の変動と密接に関係していることが判明し、より高精度の評価を行うためには幼若赤血球率などの造血系指標を考慮することが不可欠であるとしている。

以上のように、本研究では脾臓での異常赤血球除去機能の高いラットにおける赤血球を用いた小核試験法を確立している。これによりラットと同じく脾臓での異常赤血球除去機能の高い家畜やヒトにおける赤血球小核試験の可能性に道を拓いたものであり、遺伝毒性学、実験動物学、動物遺伝育種学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年9月24日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。