



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

マウス卵子の体外成熟を応用した遺伝毒性試験法の開発に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 田中, 亮太 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2695

氏名(本国籍)	田中亮太(静岡県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第354号
学位授与年月日	平成17年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	マウス卵子の体外成熟を応用した遺伝毒性試験法の 開発に関する研究
審査委員会	主査 静岡大学 教授 森 誠 副査 静岡大学 教授 鳥山 優 副査 信州大学 教授 小野 珠 乙 副査 岐阜大学 教授 伊藤 慎 一

論文の内容の要旨

本学位論文は、農薬、医薬品、化粧品、食品添加物をはじめとする合成化学物質の安全性評価法としての遺伝毒性試験法を、哺乳類の体外成熟卵子を用いて開発し、この方法が実用化された時に問題となる点について検討を加えたものである。

全体を大きく5章にわけて記述しているが、それぞれを要約すると次のようになる。

第1章では、遺伝毒性を含めた変異原試験法の歴史と現状の紹介に始まり、ダウン症のような染色体異常を引き起こす可能性のある合成化学物質の遺伝毒性試験は、生殖細胞を対象とする必要があることを強調し、そのためには新たな遺伝毒性試験法の研究・開発が求められていることを説明している。体細胞分裂と減数分裂ではその機構が異なるため、体細胞には影響が認められなくても生殖細胞に障害を引き起こす物質が存在する可能性も例示している。哺乳類卵子は、胎児期に体細胞分裂を完了し、出生直後にはすべての卵子が第一減数分裂前期(ディアキネシス期)で分裂を停止しており、適当な培養液中で卵胞からこの時期の卵子を遊離すると減数分裂が再開され、第一減数分裂が終了し、第二減数分裂中期まで進行し、再び減数分裂が停止する。このような培養系は、減数分裂の各ステージを容易に確認できることから、減数分裂の進行を指標として合成化学物質の毒性をスクリーニングするには有用な方法と考えられる。ヒトの染色体に関する研究によると臨床的に検出される異数性のほとんどが第一減数分裂中期における染色体不分離に起因したものであることが知られている。

第2章では、マウス卵子の減数分裂の進行を指標とした合成化学物質の遺伝毒性スクリーニング法の確立を目的として、体細胞では有糸分裂阻害剤として知られているカーベンダジムとグリセオフルビンをモデル被験物質としてマウス卵子の減数分裂に対する影響を調べた。3から4週齢のICR雌マウスにPMSGを投与し、48時間後に卵丘細胞に包まれた卵子を採取し、修正Whitten's mediumを用いて5%二酸化炭素、37°Cの条件下で15時間まで培養した。その結果、このような条件で卵子を培養すると、培養開始後30分から1時間半の間に第一減数分裂前期の卵子の割合が急速に減少し、培養6時間でほとんどの卵子は第一減数分裂中期となり、培養15時間でほとんどの卵子が第二減数分裂中期となることを示した。

カーベンダジムを添加して15時間培養した結果、第一減数分裂中期で停止する卵子の割合が用量依存的に増加し、グリセオフルビンの添加では第一減数分裂前期または中期で停止する卵子の割合が増加した。このようなカーベンダジムとグリセオフルビンの違いは、従来の方法では検出できなかった新たな発見である。また以上のような効果は15時間培養の後半8時間の暴露のみでも同様に認められた。

第3章では染色体の正常な分離に対するカーベンダジムとグリセオフルビンの効果を調べた。これらの被験物質を培養液に添加して15時間培養後、卵丘細胞を除去して卵子を観察するとともに、分裂中期の卵子について染色体の伸展標本を作製しDAPIあるいはCバンド染色することによって染色体像を観察、染色体数を数えた。その結果、カーベンダジムの添加においてhyperploidyあるいはdiploidyの卵子が有意に増加した。グリセオフルビンとともに15時間培養した場合には、1および3 μ g/mlの濃度でdiploidyの卵子が有意に増加した。カーベンダジムとグリセオフルビンは、ともに15時間培養の後半8時間の暴露のみで染色体の数的異常を誘発した。グリセオフルビンは15時間培養の前半7時間の暴露で染色体あるいは相同染色体の分離異常を誘発した。

第4章では、以上の研究結果を踏まえた上で、本試験法を実用化する場合の問題点を洗い出し以下のような研究を行った。まず、マウス卵子を第一減数分裂前期にどのくらいの時間留め置くことが可能かを検討した結果、cAMPの代謝阻害剤の存在下で6時間までならその後の分裂に影響を与えないことがわかった。またジエチルstilbestrolをモデル被験物質とした実験によって、近年問題となっている内分泌かく乱物質にも応用可能なことを示した。さらに15時間の培養期間のうちの3時間の暴露でも異常の検出が可能であることを示した。最後に蛍光抗体法による紡錘体の観察を行なった。

第5章では、以上の結果を総合的に考察し、この方法が既存のインビボの試験に先立ち、卵子の減数分裂の進行や染色体の分離におよぼす合成化学物質の影響を調べるプレスクリーニングとして有用な方法であることを示した。さらにこの方法を応用すると合成化学物質の作用機序を詳細に調べることが可能であると結論している。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は化学物質の安全性評価法のひとつとして、哺乳類の体外成熟卵子を用いた遺伝毒性試験法を開発し、さらにこの方法を実用化する上で問題となるであろう点を洗い出し、その解決策に関する一連の細胞生物学的研究をとりまとめたものである。

本論文の公開学位論文発表会は、審査委員全員を含む関連教官や学生の出席のもと、平成17年1月24日(月)午後2時より静岡大学農学部B棟205教室において実施された。発表の内容は充実しており、本申請者は質問に対してほぼ的確に応答した。終了後引き続き、論文内容を中心に審査委員会を開催した。

農薬、医薬品、化粧品、食品添加物をはじめとする合成化学物質の遺伝毒性の検出には、特定の時期の体細胞に被験物質を暴露し、細胞周期の異常や染色体の異常を指標として評価する方法が用いられてきた。しかしながら、体細胞分裂と減数分裂ではその機構が異なるため、体細胞には影響が認められなくても生殖細胞に障害を引き起こす物質が存在する可能性がある。そこで体外で減数分裂の進行を観察することが容易な生殖細胞として哺乳類の卵子を用いて、減数分裂の進行と染色体不分離を指標とした合成化学物質の遺伝毒性スクリーニング法の確立を目的として、体細胞では有糸分裂阻害剤として知られているカーベンダジムとグリセオフルピンをモデル被験物質としてマウス卵子の減数分裂に対する影響を調べた。得られた成果は以下のように要約できる。

- (1) カーベンダジムを含む培養液でマウス卵子を15時間培養すると、本来なら第二減数分裂中期に達するはずの卵子が、第一減数分裂中期で停止した。グリセオフルピンで同様の実験をすると、第一減数分裂前期で停止した。
- (2) 分裂中期に染色体の数的異常について調べたところ、これらの被験物質によって異数体の割合が用量依存的に増加することがわかった。
- (3) このような結果は15時間の連続した暴露のみならず、特定の時間帯に暴露した場合にも観察され、このスクリーニング法が従来のインビボ試験法よりも詳細に合成化学物質の遺伝毒性を特定できることを確認した。
- (4) 染色体の数的異常は紡錘体の形態異常を伴っており、暴露時間と紡錘体形成の時間的關係を明らかにした。

以上のように本論文は、マウス卵子の体外成熟を応用した遺伝毒性試験法の開発を目指したもので、得られた知見は合成化学物質の安全性評価法として有用な、実用性の高い研究であるが、学術的にも高い価値があるものと判定された。また、論文の構成は論理的であり、内容は独創性に富み、結果に対する科学的考察も十分なされていると判断した。慎

重に審議した結果、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の博士（農学）の学位論文として十分価値があるものと認めた。

なお、学位論文の基礎となる学術論文は以下の通りである。

1) Ryota Tanaka, Tomohiro Sasanami, Masaru Toriyama & Makoto Mori

A Novel Assay System of Chemicals Using In-vitro Maturation of Mouse Oocytes:
Effects of Carbendazim and Griseofulvin.

Journal of Mammalian Ova Research, 21 巻 3号: 123 頁-127 頁, 2004 年 10 月

2) Ryota Tanaka, Tomohiro Sasanami, Masaru Toriyama Fukutaro Mizuhashi &
Makoto Mori

Aneugenic Effects of Carbendazim and Griseofulvin as Assayed in the In Vitro
Maturation System of Mouse Oocyte.

Environmental Mutagen Research, 26 巻 3号: 203 頁-206 頁, 2004 年 12 月