

氏 名 (本籍)	宇 野 芳 文 (東京都)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 6 年 3 月 1 4 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	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	環境中の非変異・がん原性物質に対する早期 検出法の検討 ーラット肝複製 DNA 合成 (RDS) 試験法の 確立ー
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 小 川 益 男 副査 帯広畜産大学 教授 品 川 森 一 副査 岩 手 大 学 教 授 松 坂 尚 典 夫 副査 岐 阜 大 学 教 授 金 城 俊 夫 副査 東京農工大学 助教授 金 子 賢 一

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

環境化学物質のがん原性は、現在げっ歯類を用いるがん原性試験で約 3 年の期間を要して評価されている。したがって、このがん原性試験を全ての新規化学物質に適用することは不可能である。このようなことから、がん原性物質の短期スクリーニングとして、変異原性試験が国際的に広く普及し、医薬や農薬の開発ならびに環境汚染のモニタリングに実績をあげてきた。しかしながら現在では、変異原性試験、特に最も検出精度が高いと言われている Ames 試験の結果が陰性であるにもかかわらず、げっ歯類にがん原性を示す、いわゆる非変異原性のがん原性物質 (非変異・がん原性物質) が既知がん原性物質の 30~40% をも占めることが判明するに至り、その短期検出法の確立が急務となっている。

このような非変異・がん原性物質の存在が近年多数報告されるようになった主な原因は、変異原性試験が、多段階発がん誘発説にお

ける発がんイニシエーション作用のみにその検出スペクトルをおき、発がんプロモーション作用を見逃してきたためと推察される。発がんプロモーションの主な作用として細胞増殖作用が近年注目されており、発がんプロモーターが標的臓器に対して細胞増殖を誘発し、この現象が化学物質のがん原性の誘発と極めて密接に関連していることが解明されつつある。また、非変異・がん原性物質の30~80%は、ラットまたはマウスの肝にがん原性を示すことが明らかになっている。したがって、特に非変異・肝がん原性物質が肝細胞の増殖促進作用を有するか否かを測定する手法を確立することがこの物質のスクリーニングに重要な課題と思われる。

本研究は、環境中の非変異・がん原性物質に対する早期検出法を確立することを目的として、肝細胞に対する非変異・肝がん原性物質の増殖促進作用の有無を複製DNA合成(replicative DNA synthesis, RDS)の誘発を指標として検出する試験法を検討したものである。

まず最初に、ラット肝RDSの測定に最適な実験条件を確立する目的で、肝細胞培養密度とラットの週齢ならびに肝RDS自然誘発率の分布と範囲について検討した。次に、代表的な非変異・肝がん原性物質と非がん原性物質を使用して、肝RDS自然誘発率に基づく判定基準を設定した。最後に、ラット肝RDS試験に22種類の非変異・肝がん原性物質と25種類の非がん原性物質を使用して本RDS試験に対する総合検出率を算出し、非変異・肝がん原性物質に対する短期スクリーニング法としての妥当性を評価し、次の結果を得た。

1) ラット肝RDS誘発細胞は、肝細胞培養密度を $2.5 \times 10^4$  生存肝細胞/cm<sup>2</sup>に設定したとき最も高い感度で検出できた。また、9週齢以上の雄性F344ラットを使用することにより安定した肝RDS自然誘発率が得られ、さらに9週齢の雄性F344ラットの肝RDS自然誘発率は1%未満であることが判明した。

2) 検体投与後の肝RDS誘発を経時的および用量反応的に検索することにより、肝RDS誘発率が1%以上の場合を陽性、1%未満の場合を陰性とする判定基準を確立した。

3) 以上の実験条件を組み入れて実施した肝RDS試験法は、22種類の非変異・肝がん原性物質の18種類を陽性(陽性検出率:82%)に、25種類の非がん原性物質の20種類を陰性(陰性検出率:80%)に検出し、総合検出率は81%( $18+20/22+25$ )であった。

この“ラット肝RDS試験法”による非変異・肝がん原性物質の総

合検出率は、これまでに報告されているがん原性物質のスクリーニング法に比べても著しく高いものであり、今後この方法を取り入れることにより環境化学物質のがん原性がより広いスペクトルで簡便かつ高精度に予測可能になるものと確信する。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、最近になってその存在が多数知られるようになった非変異・がん原性物質の短期検出法（ラット肝複製DNA合成試験法、以下ラット肝RDS試験法という）を確立したものである。申請者が本研究を開始するに至った動機及び主な研究成果の内容は次のように要約できる。

申請者が本研究を開始するに至った動機：

申請者は、安全性試験に関する日常の研究業務を迫るなかで、最近、変異原性試験では陰性であるにもかかわらずげっ歯類にがん原性を示す、いわゆる非変異・がん原性物質の存在が多数知られるようになり、それらの短期検出法の確立が緊急かつ重要な課題であることを痛感し、この研究に取りかかった。

がん原性物質の短期スクリーニング試験法としては、現在、変異原性試験が国際的に広く普及し、各種医薬品等の化学物質の開発に応用されている。申請者は、非変異・がん原性物質の存在がこれまで見逃されて来た大きな理由の一つとして、これまでの変異原性試験法の検出スペクトルが、多段階発がん誘発説における発がんイニシエーション作用の検出に偏っており、発がんプロモーション作用の検出には適していなかったからではないかと考えた。そして、発がんプロモーションが標的臓器に細胞増殖を誘発すること、この現象が化学物質のがん原性の誘発と密接に関連すること、肝細胞の増殖促進作用が複製DNA合成の誘発を指標として検出できる可能性の高いこと、非変異・がん原性物質の30～80%はラットまたはマウスの肝にがん原性を有することなどを文献的に整理した。申請者は以上のように、日常業務の中で問題点を拾いあげ、巾広く文献を調べることによって、問題解決へのアプローチの進め方を具体的に整理したが、ここに至るまでの洞察力、着眼点、構想力は高く評価できるものとする。

本研究成果の要約：

### 1. ラット肝RDS試験法の確立に必要な基礎条件の検討

既知の非変異・肝がん原性物質をRDS法で最も感度よく検出するために必要な肝細胞密度は $2.5 \times 10^4$ 生存細胞/cm<sup>2</sup>であること、安定した肝RDSの自然誘発率を得るためには9週齢以上のラット(F344, 雄)が適していること、9週齢の上記ラットの肝RDSの自然誘発率は $0.4 \pm 0.18\%$ (平均±標準偏差)で、最大値でも1.0%未満であることを明らかにした。

### 2. ラット肝RDS試験の判定基準の確立

上記の条件を前提としたラット肝RDS試験法を用いて、検体投与後の肝RDSの誘発を経時的、用量反応的に検索し、肝RDS誘発率が1%以上の場合を陽性、1%未満の場合を陰性と判定できることを明らかにした。

### 3. ラット肝RDS試験による非変異・がん原性物質と非がん原性物質のスクリーニング

本試験法により、22種類の非変異・肝がん原性物質の18種類が陽性（陽性検出率：82%）、25種類の非がん原性物質の20種類が陰性（陰性検出率：80%）と判定できたことから、本試験法の総合検出率が極めて高い（81%）ことを明らかにした。

このように本研究は、R D S 試験法によって非変異・がん原性物質を簡便かつ高精度に検出することを可能にしたものである。これらの成果は、この分野で世界的に評価の高い Toxicology Letters (2報) と Mutation Research (1報) に原著論文として掲載され、国内外で高く評価されている。

当審査委員会は平成6年1月18日の発表会、提出論文等について慎重に審議した結果、本論文は連合獣医学研究科の学位論文にふさわしい内容のものであることを認めた。