

申請者氏名 伊藤 今日子

ニトロフラゾン (NF) は抗生剤の一つで、従来より、その精巢毒性について形態学的研究が行われてきたが、肝臓に対する影響に関する報告はごく少ない。すなわち、高用量の NF はラットに軽度な肝細胞傷害を生じることが知られている。また、低用量の NF の長期投与では、肝重量の増加が報告されており、組織学的変化についての記載はみられないものの、細胞分裂が増加した可能性が考えられている。細胞増殖には大きく分けて、失った細胞を補充するための増殖と考えられている compensatory proliferation および細胞の減少や傷害を伴わない mitogen-induced proliferation の 2 つの種類が知られている。本研究は、高用量と低用量の NF をラットに投与した際の肝臓に対する影響を明らかにすることを目的として行った。また、NF の代謝には還元反応が関与することが知られており、フリーラジカルの発生が推測されることから、NF による肝臓の変化へのフリーラジカルの関与の有無を調べた。さらに、NF 低用量投与時に肝細胞増殖が確認されたため、それに至る経路の一端を解明すべく、肝細胞増殖関連因子の動態を、real time PCR の手法を用いて検討するとともに、各因子の動態に及ぼすフリーラジカルの関与についても調べた。

得られた結果は以下のとおりである。

1. NF を致死量に近い 500 mg/kg の用量で F344 雄ラットに単回経口投与したところ、散在性の肝細胞小壊死巣が観察され、壊死はグルタチオン (GSH) 枯渇剤である diethyl maleate (DEM) の前投与により増悪した。
2. 低用量の NF を F344 雄ラットに単回投与し、投与後 1, 2, 3, および 5 日目の肝臓を調べたところ、肝重量と肝細胞増殖が 2 日間対照群より高値を示し、その後対照群と同程度の値に戻った。
3. 低用量の NF を F344 雄ラットに 1, 2, 3, 5, および 7 日間投与したところ、肝細胞増殖は投与 2 日で最大となり、その後は減少し、投与を継続したにもかかわらず、対照群と同程度の値に戻った。また、肝重量は数日間増加したものの、ある一定の値で停止し、それ以上は増加しなかった。これらの変化には用量依存性が認められた。
4. 肝細胞増殖に先立ち、生化学的にも、組織学的にも、肝細胞傷害はみられなかった。
5. NF の血中濃度は投与後速やかに上昇し、1 時間後に最大となり、その後徐々に低下した。
6. 細胞内グルタチオン濃度を上げ、antioxidant としても作用する N-acetylcysteine (NAC) の前投与により、NF による肝細胞増殖は抑制された。
7. NF 単回投与後の肝細胞増殖関連の遺伝子発現量を RT-PCR で調べたところ、投与後 1, 2 時間目に *c-jun*, *c-myc* が増加し、続いて TNF-alpha および TGF-alpha が投与後 8 時

間目にかけて増加, *c-Ha-ras* が投与後 8- 12 時間目, およびサイクリン E が 16 から 20 時間目にかけて増加した. これらの遺伝子の発現増加は, NAC 前投与により抑えられた.

以上のことから,

1. 高用量 NF は肝毒性物質としての作用を示し, 肝細胞壊死にはフリーラジカルの関与が示唆された.
2. 低用量 NF は mitogen としての作用を有し, その作用は用量依存性, かつ可逆性で, 連続投与してもある時点で停止することが明らかとなった. また, 低用量 NF の mitogen 作用にもフリーラジカルが関与していることが示された.
3. NF の mitogen 作用において, 発現の増加した遺伝子セットは, 他の mitogen として知られる物質によるそれとよく類似しており, フリーラジカル発生 → early response genes が増加, 肝細胞が priming を受ける ( $G_0 \rightarrow G_1$  期の細胞が増える) → TNF-alpha, TGF-alpha の増加による増殖刺激 → *c-Ha-ras* およびサイクリン E の増加 → restriction point 通過と S 期移行 → 肝細胞 DNA 合成という経路を辿る可能性が示された.

上述したように, NF は, 用量によって肝傷害物質としても mitogen としても作用し, いずれにおいてもフリーラジカルが関与していることが明らかとなった. また, mitogen としての作用は可逆的で, 連続投与時でも一過性で, 肝臓は重量が増加した状態で定常状態に至ること, および mitogenic な過程は, 他の mitogen でみられるそれと類似していることも明らかとなった. 本研究の成果は, 化学物質による肝毒性の発現機序を考える上での基礎的知見として極めて重要である. よって審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位を授与するに値するものと認めた.