

[別紙2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 久 米 英 介

ストレプトゾトシン(SZ)は、当初抗生物質あるいは抗腫瘍剤として開発された。その後、SZの膵島β細胞傷害性が着目され、今日では様々なげっ歯類でインスリン依存性糖尿病、ならびに腎症や白内障等の糖尿病合併症を惹起し、その発現機構を解明したり、糖尿病治療薬の研究・開発段階でその薬理効果を確認したりする目的で汎用されている。

SZは、膵島β細胞傷害性以外に発癌性について以前から知られており、投与後長期間経ってから膵島細胞腫、腎の腺腫等の発生報告がある。肝においてもSZ投与後約2年で肝細胞腫や胆管腫の発生報告がある。こうしたことから、SZは膵島β細胞のみならず肝細胞や胆管上皮細胞に対してもなんらかの傷害作用を及ぼすことが推測されるが、SZの肝毒性そのものを対象に詳細な病理学的検索を行った報告はほとんどない。本研究は、SZによる直接的および二次的な肝傷害の性状を明らかにすることを目的として実施した。

まず、SZ投与4から12週間後の糖尿病惹起後の肝病変を病理学的に明らかにした。最も顕著な変化の一つとして胆管上皮細胞の増生が挙げられ、胆道系への影響が示唆された。胆管腫瘍の発生報告を除けば、SZ投与による胆道系への影響の報告は少ない。肝細胞への影響としては、核膜陥入による核内封入体形成が顕著であった。また、クロマチンの分布やサイズが異なる二核細胞が多く認められ、非常に大きな核を有する肝細胞も認められた。こうした核の変化は、SZによるDNA傷害やSZによる肝腫瘍発生と関連している可能性が考えられる。細胞質に認められた変化としては、グリコーゲンの減少、脂質蓄積などが挙げられるが、最も特徴的な変化はミトコンドリアの増生であった。

次に、SZによる直接的な肝への影響を明らかにする目的で、高血糖が惹起される以前(24時間以内)を中心に、急性期の肝臓の変化を追った。病理組織学的検査では、血糖値が上昇する以前に肝細胞のミトコンドリアの膨化が認められ、SZがミトコンドリアに直接的な傷害を及ぼすこと

が示された。また、この時間帯には、脂質過酸化の指標となる TBARS やリン脂質過酸化物が増加することが確認され、酸化ストレスがミトコンドリア傷害の一因となることが示された。また、このミトコンドリア傷害が SZ 投与 4~12 週後に認められたミトコンドリア増生の一因となっている可能性も考えられる。SZ の細胞分裂抑制および DNA 合成抑制作用については古くから知られているが、今回、糖尿病が惹起される以前の時間帯からすでに PCNA 陽性細胞数の減少および網状赤血球数の減少が生じることが明らかとなった。同時に実施した DNA マイクロアレイによる遺伝子変動解析からも、細胞周期関連、特に細胞周期の停止を起こす遺伝子の up-regulation が認められ、細胞分裂抑制方向にあることが示された。同時に、apoptosis 関連遺伝子の up-regulation も認められた。遺伝子変動解析では、脂質代謝関連の遺伝子の down-regulation も観察され、血中および肝臓中の脂質値の変動の一因となっているものと考えられた。その他、SZ 投与動物でこれまでに報告の無い胆嚢の潰瘍・浮腫が観察された。

さらに、*in vitro* 初代培養肝細胞に SZ を暴露し、肝細胞への直接的影響を観察した。SZ 暴露により、培養肝細胞核クロマチンのマージネーションが観察され、apoptosis 関連遺伝子の up-regulation と関連しているものと考えられた。遺伝子変動解析では、*in vivo* での遺伝子変動と *in vitro* での遺伝子変動の間に、細胞周期関連遺伝子や脂質代謝関連遺伝子の変動など多くの類似性が認められ、*in vivo* の肝で早期に認められる変化は SZ の直接的影響であることが強く示唆された。

以上のことから、SZ は肝に対して、肝細胞ミトコンドリアへの傷害作用および肝細胞核への傷害作用、ならびに胆管上皮への傷害作用を有することが明らかとなり、肝細胞への作用は高血糖による二次的影響ではなく、SZ による直接作用であることが示された。こうした肝毒性の発現メカニズムとしては、酸化的ストレスによる脂質過酸化、DNA 傷害に基づく細胞分裂抑制および apoptosis 関連遺伝子の up-regulation が関与している可能性が強く示唆された。

本研究の成果は、SZ 誘発糖尿病モデルを用いた病態生理学および薬理的な検討を行う際に、SZ のこのような肝毒性の性状を十分に考慮に入れる必要があることを明らかにした点で重要である。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。