

論文審査の結果の要旨

氏名：馬場 康司

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：細胞分裂阻害物質コルヒチンのオオミジンコ *Daphnia magna* への繁殖毒性ならびに毒性発現機構

審査委員：(主査) 教授 廣海 十朗
(副査) 教授 上田 眞吾
教授 杉谷 博士
准教授 荒 功一

本研究で扱った動物プランクトンの1分類群である枝角類のオオミジンコは、農薬や一般化学物質の毒性を評価するための試験方法である OECD 試験ガイドラインの推奨種に選定されている。しかし、水生生物に対する毒性試験は、生態系リスク評価に使用するための毒性値を得ることを目的としていることから、毒性の諸症状やその発現機構に関する情報が乏しい。細胞分裂阻害は、殺菌剤あるいは除草剤の作用機序の一つであり、これまでに多くの細胞分裂阻害物質が農薬として開発されてきた。細胞分裂阻害剤は、その作用特性から特に繁殖影響が懸念されるものの、甲殻類に対する影響に関する知見が少ない。本研究の目的は、細胞分裂阻害剤の代表的物質であるコルヒチンのオオミジンコの繁殖に及ぼす①毒性発現機構を解明すること、および②同物質の暴露影響を簡便かつ短期間に評価できる手法を確立することである。得られた主要な成果は以下のとおりである。

(1) 21日間繁殖試験では、成体に対する LC_{50} 値は 2 mg/L 、成長・繁殖に対する NOEC および LOEC はそれぞれ 0.2 および 0.5 mg/L であり、各毒性値は急性遊泳阻害試験結果の約 $1/10\sim 1/30$ であった。(2) 抱卵個体に対するコルヒチンの4日間暴露による短期繁殖試験の結果、繁殖阻害は一過性のものであり、暴露中止後に正常な産仔が認められた。(3) コルヒチンは、特徴的なことに発生の初期段階（卵巣、または産卵直後～6時間以内）に暴露を開始した場合に限り胚の発生を阻害した。さらには胚の崩壊をももたらした。このような毒性発現は、本研究がオオミジンコで初めて見出したものである。(4) 卵巣内で暴露された胚では、卵嚢が産卵後10～24時間経過した時点で阻害されること、コルヒチンが胚のチューブリン重合を阻害する時期は産卵後10時間以降に限定される可能性を、核染色およびチューブリン免疫染色により明らかにした。(5) 電子顕微鏡観察の結果、卵巣内で暴露した胚の卵膜（外膜）は正常胚に比べやや厚かったもの ($p < 0.01$)、産卵後に暴露された崩壊直前の胚では卵膜の表面構造に顕著な変化が認められなかったことから、物理的構造面での脆弱化による崩壊ではないことが窺える。(6) 浸透圧調節に関わる作用点として、 Cl^- チャネルならびに水チャネルの阻害効果を考え検証したところ、いずれのチャネル阻害剤も胚の発生阻害と崩壊をもたらすことが分かった。ただし、 Cl^- チャネル阻害剤ではコルヒチンと異なり奇形が生じた。オオミジンコに対する毒性の発現機構として、(7) 卵巣内暴露ならびに産卵後6時間以内の暴露開始では卵形成は阻害されないが、チューブリン重合が阻害される結果、有糸分裂と卵嚢が妨げられ、胚が死亡すること、および(8) 胚の崩壊には、細胞分裂阻害以外に膜機能（浸透圧調整）の阻害が考えられるが、(6) のことを考慮すれば、水チャネルが阻害されたことにより胚の浸透圧調節が妨げられた結果崩壊が引き起こされた可能性が高い。

以上のとおり、本論文は、細胞分裂阻害物質が持つ本質的な毒性リスクを理解する上で重要な知見を数多く見出した。また、抱卵個体を用いた4日間暴露による短期繁殖試験ならびに胚発生阻害試験の手法は、21日間繁殖試験とほぼ同じ結果を得ることができるので、コルヒチンの暴露影響を短期間かつ簡便に評価できる手法を確立したと言える。さらに、この新たな手法により胚に対する毒性や卵形成への影響も把握できることから、生態毒性の低い新規農薬の開発に向けた応用展開に資するものである。

よって本論文は、博士（生物資源科学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

平成 28 年 11 月 17 日