

| | |
|---------------|--|
| 氏名（本（国）籍） | 三 枝 由紀恵（東京都） |
| 主 指 導 教 員 名 | 東京農工大学 教授 三 森 国 敏 |
| 学 位 の 種 類 | 博士（獣医） |
| 学 位 記 番 号 | 獣医博甲第302号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成22年3月15日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第3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 | Development of an Evaluation System on Brain Retardation by Developmental Exposure to Chemicals Based on the Mechanism to Impair Neuronal Differentiation (細胞分化機構の障害性に着目した化学物質の発達期暴 露による脳発達障害評価手法の開発) |
| 審 査 委 員 | 主査 東京農工大学 教授 田 谷 一 善 副査 帯広畜産大学 教授 松 井 高 峯 副査 岩 手 大 学 教 授 岡 田 幸 助 副査 東京農工大学 教授 三 森 国 敏 副査 岐 阜 大 学 教 授 柳 井 徳 磨 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究は、発達期甲状腺機能低下による脳発達障害に着目した。抗甲状腺剤を陽性対照に神経発達に關与する鋭敏なエンドポイントに基づく評価系の確立を目的とし、弱い抗甲状腺作用を有する臭素化難燃剤（BFRs）暴露例のニューロン発達障害影響を解析・評価した。

第一に、BFRsであるテトラブプロモビスフェノール A（TBBPA）及びヘキサブプロモシクロデカン（HBCD）を発達期暴露した際の毒性影響を、脳発達障害の形態計測手法を導入して検討した。雌 SD:IGS ラットに妊娠 10 日から離乳時（生後 20 日）まで TBBPA 及び HBCD を各々 100, 1,000, 10,000 ppm の用量で混餌投与した。その結果、TBBP に明らかな甲状腺機能低下作用及び脳発達影響は認めなかった。一方、HBCD では生後 20 日に高用量で、11 週では中間用量以上で弱い甲状腺機能低下がみられ、高用量で発達期甲状腺機能低下の反映を示唆する白質低形成を認めた。

第二に、発達期甲状腺機能低下を介した脳発達障害によるニューロン分化の障害指標遺伝子探索を目的とし、抗甲状腺剤のプロピルチオウラシル（PTU）及びメチマゾール（MMI）を発達期暴露した生後 20 日の雄ラットの脳海馬 CA1 領域特異的な網羅的遺伝子発現解析を行った。両物質の投与により、海馬 CA1 領域の錐体細胞層に細胞移動異常を反映するニューロンのパラツキの発生を既に報告している。マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果をもとに、Efn5 の受容体である EphA5 と Tachykinin receptor 3（Tacr3）の 2 分子について免疫組織学的に検討した結果、

生後 20 日に海馬 CA1 領域に EphA5 及び Tacr3 強陽性細胞を認めた。また、11 週では発現程度は低下したものの Tacr3 陽性細胞は持続的に発現し、これは持続するニューロンの移動異常影響に対する神経保護作用を反映する結果と考えられた。

さらに、PTU 投与群で発現変動がみられた Reelin 分子について検討した。Reelin は甲状腺ホルモン調節遺伝子であり、ニューロンの移動や位置情報を決定する分子である。Reelin の分布を海馬歯状回門（ニューロン新生部位）に着目して、抗甲状腺剤投与ラットの生後 20 日及び 11 週で免疫組織学的に検討した結果、Reelin 陽性細胞は 11 週まで有意に増加した。陽性細胞の特性を検討した結果、増加した Reelin 陽性細胞は GABA 性介在ニューロンと判断された。また、11 週では成熟ニューロンのマーカーである NeuN 陽性細胞の増加を同部位で認めたが、Reelin と NeuN の二重染色の結果、Reelin 陽性細胞は NeuN に弱陽性あるいは陰性を示し、未熟なニューロンの可能性が示唆された。さらに、歯状回のニューロン新生部位である顆粒細胞層下領域では、生後 20 日にアポトーシス小体の増加と増殖細胞の減少がみられ、ニューロン新生障害の可能性が示唆された。以上の結果、発達期甲状腺機能低下は歯状回門に Reelin を産生する未熟 GABA ニューロンの永続的増加を生じ、これはニューロン新生障害と細胞移動異常が成熟後まで持続することを示唆する変化と考えられた。

第三に、上記 3 分子を用いて、3 種の BFRs（デカブロモジフェニルエーテル (DBDE)、TBBPA 及び HBCD）曝露例における脳発達障害影響の検出を試みた。子動物の脳サンプルは、TBBPA 及び HBCD では第 1 章のものを、DBDE では 10, 100, 1,000 ppm のラット発達期暴露により得たものを使用した。DBDE は軽度な甲状腺機能低下作用を認めた。いずれの BFR でも、Reelin 陽性細胞は歯状回門で生後 20 日でのみ低用量あるいは中間用量から有意な増加を認めたが、NeuN 陽性細胞は 11 週で中間用量あるいは高用量から有意に増加した。生後 20 日目に、EphA5 は DBDE の高用量で海馬 CA1 領域に陽性細胞数の増加を認めたが、Tacr3 はいずれの BFR でも変化を認めなかった。また、歯状回の顆粒細胞層下領域では、TBBPA 及び HBCD の高用量でアポトーシス小体の増加によるニューロン新生障害が示唆された。以上の結果、BFRs の発達期暴露により、低用量あるいは中間用量から細胞移動異常を示唆する発達期神経毒性作用を海馬歯状回あるいは CA1 領域で認めた。また、11 週の海馬歯状回門で NeuN 陽性細胞は増加を示したものの、Reelin 産生を継続しておらず、その生物学的意義の解明は今後の課題であるが、成熟後では発達障害が持続していないと考えられた。

以上のように、抗甲状腺剤及び BFRs を用いて海馬におけるニューロンの発達関連分子を見出し、これらの分子の免疫組織学的検索により、ニューロンの発達遅延を基盤とした発達神経毒物の鋭敏な評価系を確立した。特に、歯状回門における Reelin 陽性細胞の分布異常は、その時点における不可逆的なニューロン新生障害及び移動異常の可能性を示唆し、これらの発達異常の鋭敏な指標となる可能性が示唆された。今回の研究成果は、環境中にある神経毒性物質の検出の一助となるものと思われた。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、発達期甲状腺機能低下による脳発達障害に着目した。抗甲状腺剤を陽性対照に神経発達に関与する鋭敏なエンドポイントに基づく評価系の確立を目的とし、弱い抗甲状腺作用を有する臭素化難燃剤（BFRs）曝露例のニューロン発達障害影響を解析・評価した。

第 1 章では、BFRs であるテトラブロモビスフェノール A (TBBPA) 及びヘキサブロモシクロドデカン (HBCD) を発達期暴露した際の毒性影響を、脳発達障害の形態計測手法を導入して検討した。その結果、TBBPA に脳発達障害はみられなかったが、HBCD では発達期甲状腺機能低下の反映を示唆した白質低形成を認めた。

第2章-1では、発達期甲状腺機能低下を介した脳発達障害によるニューロン分化の障害指標遺伝子探索を目的とし、抗甲状腺剤のプロピルチオウラシル (PTU) 及びメチマゾール (MMI) を発達期暴露した際の脳海馬 CA1 領域特異的な遺伝子発現解析を行った。その結果、EfnA5 の受容体である EphA5 と Tachykinin receptor 3 (Tacr3) の2分子を見出し、免疫染色により海馬 CA1 領域に陽性細胞の分布を確認した。また、Tacr3 は成熟期まで持続的な発現を認め、これは持続するニューロンの移動異常影響に対する神経保護作用を反映する結果と考えられた。

第2章-2では、遺伝子発現解析の結果、PTU 投与群で発現変動がみられた Reelin 分子の発現変動を検討した。その結果、甲状腺機能低下により、海馬歯状回門 (ニューロン新生部位) で Reelin を産生する未熟 GABA ニューロンの永続的増加を生じ、これはニューロン新生障害と細胞移動異常が成熟後まで持続することを示唆する変化と考えられた。

第3章では、上記3分子を用いて、3種のBFRs (デカブロモジフェニルエーテル (DBDE), TBBPA 及び HBCD) 曝露例におけるニューロン発達障害影響の検出を試みた。その結果、いずれのBFRでも低用量あるいは中間用量から細胞移動異常を示唆する発達期神経毒性作用を海馬歯状回あるいはCA1領域で認めたが、成熟後までの永続性は認めなかった。

以上の結果から、抗甲状腺剤及びBFRsを用いて海馬におけるニューロンの発達関連分子を見出し、ニューロンの発達障害を基盤とした発達神経毒物の鋭敏な評価系を確立した。本研究成果は、環境中にある神経毒性物質の検出の一助となるものと思われた。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Developmental toxicity of brominated flame retardants, tetrabromobisphenol A and 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane, in rat offspring after maternal exposure from mid-gestation through lactation
著 者 名 : Saegusa, Y., Fujimoto, H., Woo, G-H., Inoue, K., Takahashi, M., Mitsumori, K., Hirose, M., Nishikawa, A. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Reproductive Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 28(4): 456-467, 2009
- 2) 題 目 : Gene expression profiling and cellular distribution of molecules with altered expression in the hippocampal CA1 region after developmental exposure to anti-thyroid agents in rats
著 者 名 : Saegusa, Y., Woo, G-H., Fujimoto, H., Inoue, K., Takahashi, M., Hirose, M., Igarashi, K., Kanno, J., Mitsumori, K., Nishikawa, A. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : β -Naphthoflavone enhances oxidative stress responses and the induction of preneoplastic lesions in a diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis model in partially hepatectomized rats
著 者 名 : Dewa, Y., Nishimura, J., Muguruma, M., Jin, M., Saegusa, Y., Okamura, T., Tasaki, M., Umemura, T. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 244(2-3): 179-189, 2008
- 2) 題 目 : Possible involvement of oxidative stress in fenofibrate-induced hepatocarcinogenesis in rats
著 者 名 : Nishimura, J., Dewa, Y., Okamura, T., Muguruma, M., Jin, M., Saegusa, Y., Umemura, T. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 82(9): 641-654, 2008
- 3) 題 目 : Extremely weak tumor-promoting effect of troglitazone on splenic hemangiosarcomas in rasH2 mice induced by urethane
著 者 名 : Jin, M., Matsumoto, S., Dewa, Y., Nishimura, J., Saekusa, Y., Hasumi, K. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology

- 卷・号・頁・発行年：82(10): 771-777, 2008
- 4) 題 目：Hepatocarcinogenic susceptibility of fenofibrate and its possible mechanism of carcinogenicity in a two-stage hepatocarcinogenesis model of rasH2 mice
著 者 名：Kawai, M., Jin, M., Nishimura, J., Dewa, Y., Saegusa, Y., Matsumoto, S., Taniai, E., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名：Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年：36(7): 950-957, 2008
- 5) 題 目：Role of Nrf2 and oxidative stress on fenofibrate-induced hepatocarcinogenesis in rats
著 者 名：Nishimura, J., Dewa, Y., Okamura, T., Jin, M., Saegusa, Y., Kawai, M., Umemura, T., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名：Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年：106(2): 339-349, 2008
- 6) 題 目：Hepatocarcinogenic susceptibility of rasH2 mice to troglitazone in a two-stage hepatocarcinogenesis model
著 者 名：Jin, M., Saekusa, Y., Dewa, Y., Nishimura, J., Matsumoto, S., Shibutani, M., Hasumi, K. and Mitsumori, K.
学術雑誌名：Archives of Toxicology
卷・号・頁・発行年：83(2): 173-181, 2009
- 7) 題 目：Threshold dose of piperonyl butoxide that induces reactive oxygen species-mediated hepatocarcinogenesis in rats
著 者 名：Muguruma, M., Kawai, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Saegusa, Y., Yasuno, H., Jin, M., Matsumoto, S., Takabatake, M., Arai, K. and Mitsumori, K.
学術雑誌名：Archives of Toxicology
卷・号・頁・発行年：83(2): 183-193, 2009
- 8) 題 目：A case report of a cerebellar neuroblastoma in a *p53* null mutation mouse
著 者 名：Ago, K., Shibutani, M., Saegusa, Y., Shima, T., Taniai, E. and Mitsumori, K.
学術雑誌名：The Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年：71(3): 345-347, 2009
- 9) 題 目：Assessment of developmental effects of hypothyroidism in rats from in utero and lactation exposure to anti-thyroid agents
著 者 名：Shibutani, M., Woo, G-H., Fujimoto, H., Saegusa, Y., Takahashi, M., Inoue, K., Hirose, M. and Nishikawa, A.
学術雑誌名：Reproductive Toxicology
卷・号・頁・発行年：28(3): 297-307, 2009
- 10) 題 目：Crosstalk between PTEN/Akt2 and TGF β signaling involving EGF receptor down-regulation during the tumor promotion process from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model
著 者 名：Taniai, E., Kawai, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Harada, T., Saegusa, Y., Matsumoto, S., Takahashi, M., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名：Cancer Science
卷・号・頁・発行年：100(5): 813-820, 2009
- 11) 題 目：Involvement of oxidative stress in hepatocellular tumor-promoting activity of oxfendazole in rats
著 者 名：Dewa, Y., Nishimura, J., Muguruma, M., Jin, M., Kawai, M., Saegusa, Y., Okamura, T., Umemura, T. and Mitsumori, K.
学術雑誌名：Archives of Toxicology
卷・号・頁・発行年：83(5): 503-511, 2009
- 12) 題 目：Molecular expression analysis of β -Naphthoflavone-induced hepatocellular tumors in rats
著 者 名：Dewa, Y., Nishimura, J., Jin, M., Kawai, M., Saegusa, Y., Harada, T., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名：Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年：37(4): 446-455, 2009
- 13) 題 目：Modification of dietary copper levels on the early stage of tumor-promotion with propylthiouracil in a rat two-stage thyroid carcinogenesis model
著 者 名：Shima, T., Nishimura, J., Dewa, Y., Saegusa, Y., Matsumoto, S., Kawai, M.,

- Harada, T., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
 学術雑誌名 : Chemico-Biological Interactions
 巻・号・頁・発行年 : 180(2): 262-270, 2009
- 14) 題 目 : Induction of liver preneoplastic foci in F344 rats subjected to 28-day oral administration of diheptyl phthalate and its *in vivo* genotoxic potential
 著 者 名 : Jin, M., Dewa, Y., Kawai, M., Nishimura, J., Saegusa, Y., Kemmochi, S., Harada, T., Shibutani, M. and Mitsumori K.
 学術雑誌名 : Toxicology
 巻・号・頁・発行年 : 264(1-2): 16-25, 2009
- 15) 題 目 : Mechanistic study on hepatocarcinogenesis of piperonyl butoxide in mice
 著 者 名 : Kawai, M., Saegusa, Y., Jin, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Harada, T., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
 学術雑誌名 : Toxicologic Pathology
 巻・号・頁・発行年 : 37(6): 761-769, 2009
- 16) 題 目 : Cytokeratin 8/18 is a useful immunohistochemical marker for hepatocellular proliferative lesions in mice
 著 者 名 : Kawai, M., Saegusa, Y., Kemmochi, S., Harada, T., Shimamoto, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
 学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
 巻・号・頁・発行年 : In Press
- 17) 題 目 : Involvement of glycogen synthase kinase-3 β signaling and aberrant nucleocytoplasmic localization of retinoblastoma protein in tumor promotion in a rat two-stage thyroid carcinogenesis model
 著 者 名 : Ago, K., Saegusa, Y., Nishimura, J., Dewa, Y., Kemmochi, S., Kawai, M., Harada, T., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
 学術雑誌名 : Experimental and Toxicologic Pathology
 巻・号・頁・発行年 : In Press
- 18) 題 目 : Rapid deposition of glomerular IgA in BALB/c mice by nivalenol and its modifying effect on high IgA strain (HIGA) mice
 著 者 名 : Dewa, Y., Kemmochi, S., Kawai, M., Saegusa, Y., Harada, T., Shimamoto, K., Mitsumori, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y. and Shibutani, M.
 学術雑誌名 : Experimental and Toxicologic Pathology
 巻・号・頁・発行年 : In Press