

氏名(本(国)籍)	白木彩子(東京都)
主指導教員氏名	東京農工大学 教授 渋谷 淳
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第454号
学位授与年月日	平成28年3月14日
学位授与の要件	学位規則第3条第2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	抗甲状腺剤を用いた一般毒性試験の枠組みでの発達神経毒性評価指標の確立に関する研究
審査委員	主査 東京農工大学 教授 下田 実 副査 帯広畜産大学 教授 古林 与志安 副査 岩手大学 教授 御領 政信 副査 東京農工大学 教授 渋谷 淳 副査 岐阜大学 教授 柳井 徳磨

#### 学位論文の内容の要旨

発達神経毒性試験は、現行のガイドラインでは1物質の評価に多大なコストがかかるため、より効率的な評価システムの構築が求められている。本研究は、成熟期動物を対象とした一般毒性試験の枠組みでの発達神経毒性評価法を確立することを目標として、神経発達を様々な機序で障害する抗甲状腺剤のプロピルチオウラシル(6-propyl-2-thiouracil: PTU)を用いたラット発達期曝露実験及び28日間反復投与実験を行い、海馬歯状回におけるニューロン新生障害影響とともに、海馬歯状回を含む複数の脳部位での遺伝子発現プロファイルを比較し、網羅的な指標開発を行った。

第1章では、ラットに対し胎齢6日目から生後21日目の離乳時までPTUの0, 1, 3, 10 ppmの濃度での母動物への飲水投与による発達期曝露実験を行い、離乳時及び成熟時での海馬歯状回顆粒細胞層下帯(SGZ)におけるニューロン新生に与える影響を検討した。その結果、生後21日目の雄子動物において、10 ppm群でglial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性幹細胞、3 ppm以上群で分化初期のpaired box 6 陽性細胞及び分化後期のdoublecortin (DCX) 陽性細胞が減少した。さらに歯状回門における $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) 性介在ニューロンに関して、10 ppm群でsomatostatin (SST) 陽性細胞の増加、3 ppm以上群でreelin (RELN) 及びcalbindin-D-29K (CALB2) の増加及びparvalbumin (PVALB) 陽性細胞の減少が認められた。これらの変動の一部は生後77日目でも持続していた。以上より、PTUのラット発達期曝露がSGZにおける分化初期段階からの不可逆的なニューロン新生障害を誘発することが示された。

第2章では、生後5週齢のラットに対するPTUの0, 0.1及び10 mg/kgの用量での28日間反復経口投与を行い、海馬歯状回のニューロン新生に与える影響を検討した。その結果、SGZにおいて10 mg/kg群でDCX 陽性細胞数が減少し、歯状回門において10 mg/kg群でRELN, 0.1及び10 mg/kg群でSST 陽性細胞数が増加した。これらの結果より、成熟期動物への曝露によっても海馬歯状回SGZでのニューロン新生が障害され、顆粒細胞系譜及びGABA 性介在ニューロンの指標を用いた免疫組織化学染色により、障害を検出できる可能性が示された。

第3章では、発達期曝露実験及び28日間反復投与実験で得られた脳サンプルを用い、海馬歯状回、大脳皮質、脳梁、小脳の4部位について、マイクロアレイによる脳部位特異的な網羅的遺伝子発現解析及び、遺伝子発現プロファイルの比較を行った。その結果、発達期曝露ではエフリンシグナリング系やGABA性介在ニューロン指標等、神経発達関連遺伝子が複数の部位で共通して変動した。また、ミエリン形成・グリア発達関連遺伝子群は、脳梁及び大脳皮質に局限して変動した。一方、28日間反復投与では、神経発達に関わる遺伝子群は海馬歯状回と大脳皮質、ミエリン形成に関わる遺伝子群は海馬歯状回で発現が変動し、特に発達期曝露と共通の変動遺伝子は海馬歯状回で多く認められた。これらの結果より、28日間反復投与試験の枠組みで遺伝子発現により発達神経毒性を評価する上では、海馬歯状回の感受性が高いことが示唆された。

第4章では、第3章で獲得した遺伝子発現プロファイルを基に、免疫組織化学的に評価可能な障害指標分子を探索した。その結果、発達期曝露実験の生後21日目の子動物において、シナプスの可塑性に関わる分子として、3ppm以上群で海馬歯状回のcyclooxygenase-2、10ppm群でactivity-regulated cytoskeleton-associated protein、3ppm以上群で海馬歯状回と大脳皮質のEph receptor A4 (EPHA4)陽性顆粒細胞数が減少した。また、GABA性介在ニューロン指標について、生後21日目の大脳皮質で、10ppm群でRELN及びCALB2陽性細胞数が増加し、3ppm以上群でPVALB及びneuropeptide Y陽性細胞数が減少した。小脳においても、10ppm群でRELN及びSST陽性細胞数が増加し、3ppm以上群でPVALB陽性細胞数が減少した。これらの変動の多くは生後77日目でも持続していた。ミエリン形成関連分子としては、生後21日目の3ppm以上群で、脳梁及び大脳皮質におけるmyelin basic proteinの染色性が低下した。グリア発達関連分子としては、生後21日目の脳梁において、1ppm以上群でvimentin、10ppm群でGFAP陽性の未熟なアストロサイトが増加し、1ppm以上群でoligodendrocyte transcription factor 2陽性グリア細胞が減少した。しかし、28日間反復投与実験においては、これらの分子のいずれも免疫染色による差は見出せなかった。これらの結果より、発達期曝露実験では、シナプス可塑性、GABA性介在ニューロン、ミエリン形成及びグリア発達に対する障害性について、免疫組織化学的解析により評価可能な分子を見出したものの、海馬歯状回のニューロン新生障害に関連したGABA性介在ニューロンの変動以外、成熟動物への曝露による障害性を評価する上では有用でないと考えられた。

以上より、一般毒性試験の枠組みで発達神経毒性を評価する上では海馬歯状回が高感受性であり、SGZにおける顆粒細胞系譜及び歯状回門におけるGABA性介在ニューロン指標の免疫組織化学的解析により、ニューロン新生に対する影響が評価可能であることが示唆された。また、発達神経毒性実験によって、網羅的遺伝子発現解析よりシナプス可塑性、ミエリン形成及びグリア発達障害の指標候補分子が得られ、これらの分子の免疫組織化学的評価により、現行の試験の精度向上への貢献が期待される。さらに、GABA性介在ニューロン指標が複数の脳部位で発達神経毒性物質の不可逆的な影響を評価に有用と考えられた。

## 審査結果の要旨

本研究は、成熟期動物を対象とした一般毒性試験の枠組みでの発達神経毒性評価法を確立することを目標とし、発達神経毒性が既知の抗甲状腺剤であるプロピルチオウラシル (PTU) を用いたラット発達期曝露実験及び28日間反復投与実験を行った。海馬歯状回におけるニューロン新生障害影響及び、複数の脳部位での遺伝子発現プロファイルの比較により、網羅的な指標開発を目指した。

第1章では、PTUの妊娠期・授乳期曝露を行った。その結果、生後21日目の顆粒細胞層下帯 (SGZ) における幹細胞の段階からの顆粒細胞系譜の減少と、歯状回門における多数の介在ニューロンサブポピュレーションの分布異常を見出した。これらの変化の一部は生後

77日目でも持続していた。これらの結果より、PTUの発達期曝露がSGZの分化初期段階からの不可逆的なニューロン新生障害を誘発する可能性を示した。

第2章では、成熟期ラットを用いたPTUの28日間反復投与を行った。その結果、SGZで分化後期の前駆細胞が減少し、歯状回門で複数のGABA性介在ニューロンサブポピュレーションが変動した。これらの結果より、成熟期動物への曝露によってもSGZのニューロン新生障害が生じ、顆粒細胞系譜及びGABA性介在ニューロンの指標が評価法として有用であることを示した。

第3章では、1, 2章の実験の脳サンプルを用い、マイクロアレイによる脳部位特異的な網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、発達期曝露では神経発達に関わる遺伝子変動は複数の部位で共通し、ミエリン形成やグリア発達に関わる遺伝子変動は、脳梁及び大脳皮質に局限していた。一方28日間反復投与では、これらの変動は主に海馬歯状回で認められた。以上より、28日間反復投与試験で発達神経毒性を評価する上で、海馬歯状回の感受性が高いと考えられた。

第4章では、第3章で得られた遺伝子発現プロファイルから、免疫組織化学的に評価可能な障害指標分子を探索した。その結果、発達期曝露実験では、海馬歯状回で、シナプスの可塑性に関わるCOX2、海馬歯状回及び大脳皮質でEPHA4及びARC陽性顆粒細胞数が減少した。また、多数のGABA性介在ニューロン指標が大脳皮質及び小脳で不可逆的に変動した。これらの変化は28日間反復投与によっては認められなかった。

以上より、一般毒性試験の枠組みで発達神経毒性を評価する上では海馬歯状回が高感受性であり、海馬歯状回の顆粒細胞系譜とGABA性介在ニューロンが有用な指標と考えられた。また、シナプス可塑性、ミエリン形成及びグリア発達障害の指標候補分子の免疫組織化学的評価による、現行の発達神経毒性試験の精度向上への貢献が期待される。さらに、GABA性介在ニューロン指標が複数の脳部位で発達神経毒性物質の不可逆的な影響評価に有用と考えられた。

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: Expression alterations of genes on both neuronal and glial development in rats after developmental exposure to 6-propyl-2-thiouracil  
著 者 名: Shiraki, A., Saito, F., Akane, H., Takeyoshi, M., Imatanaka, N., Itahashi, M., Yoshida, T. and Shibutani, M.  
学術雑誌名: Toxicology Letters  
巻・号・頁・発行年: 228 (3): 225-234, 2014
- 2) 題 目: Gene expression profiling of the hippocampal dentate gyrus in an adult toxicity study captures a variety of neurodevelopmental dysfunctions in rat models of hypothyroidism  
著 者 名: Shiraki, A., Saito, F., Akane, H., Akahori, Y., Imatanaka, N., Itahashi, M., Yoshida, T. and Shibutani, M.  
学術雑誌名: Journal of Applied Toxicology  
巻・号・頁・発行年: 36 (1): 24-34, 2016

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Reversible aberration of neurogenesis affecting late-stage differentiation in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to manganese chloride  
著 者 名 : Ohishi, T., Wang, L., Akane, H., Shiraki, A., Goto, K., Ikarashi, Y., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M.  
学術雑誌名 : Reproductive Toxicology  
卷・号・頁・発行年 : 34 (3) : 408-419, 2012
- 2) 題 目 : Direct progression of capsular invasive carcinomas from subcapsular focal hyperplasias induced by hypothyroidism-mediated tumor promotion in a rat two-stage thyroid carcinogenesis model  
著 者 名 : Ago, K., Kemmochi, S., Morita, R., Yafune, A., Shiraki, A., Mitsumori, K. and Shibutani, M.  
学術雑誌名 : Journal of Cancer Research and Clinical Oncology  
卷・号・頁・発行年 : 139 (3) : 395-401, 2012
- 3) 題 目 : Reversible effect of developmental exposure to chlorpyrifos on late-stage neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus in mouse offspring  
著 者 名 : Wang, L., Ohishi, T., Akane, H., Shiraki, A., Itahashi, M., Mitsumori, K. and Shibutani, M.  
学術雑誌名 : Reproductive Toxicology  
卷・号・頁・発行年 : 38 : 25-36, 2013
- 4) 題 目 : Glycidol induces axonopathy by adult-stage exposure and aberration of hippocampal neurogenesis affecting late-stage differentiation by developmental exposure in rats  
著 者 名 : Akane, H., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Itahashi, M., Ohishi, T., Mitsumori, K. and Shibutani, M.  
学術雑誌名 : Toxicological Sciences  
卷・号・頁・発行年 : 134 (1) : 140-154, 2013
- 5) 題 目 : Methacarn as a whole brain fixative for gene and protein expression analyses of specific brain regions in rats  
著 者 名 : Akane, H., Saito, F., Yamanaka, H., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Morita, R., Mitsumori, K. and Shibutani, M.  
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences  
卷・号・頁・発行年 : 38 (3) : 431-443, 2013
- 6) 題 目 : Enhanced liver tumor promotion activity in rats subjected to combined administration of phenobarbital and orphenadrine  
著 者 名 : Morita, R., Yafune, A., Shiraki, A., Itahashi, M., Akane, H., Nakane, F., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences  
卷・号・頁・発行年 : 38 (3) : 415-424, 2013
- 7) 題 目 : Liver tumor promoting effect of orphenadrine in rats and its possible mechanism of action including CAR activation and oxidative stress  
著 者 名 : Morita, R., Yafune, A., Shiraki, A., Itahashi, M., Ishii, Y., Akane, H., Nakane, F., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.

- 学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences  
卷・号・頁・発行年 : 38 (3) : 403-413, 2013
- 8) 題 目 : Aberration in epigenetic gene regulation in hippocampal neurogenesis by developmental exposure to manganese chloride in mice  
著 者 名 : Wang, L., Shiraki, A., Itahashi, M., Akane, H., Abe, H., Mitsumori, K. and Shibutani, M.  
学術雑誌名 : Toxicological Sciences  
卷・号・頁・発行年 : 136 (1) : 154-165, 2013
- 9) 題 目 : Suppressive effect of liver tumor-promoting activities in rats subjected to combined administration of phenobarbital and piperonyl butoxide  
著 者 名 : Morita, R., Yafune, A., Shiraki, A., Itahashi, M., Akane, H., Nakane, F., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences  
卷・号・頁・発行年 : 38 (5) : 679-688, 2013
- 10) 題 目 : Glycidol induces axonopathy and aberrations of hippocampal neurogenesis affecting late-stage differentiation by exposure to rats in a framework of 28-day toxicity study  
著 者 名 : Akane, H., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Itahashi, M., Abe, H. and Shibutani, M.  
学術雑誌名 : Toxicology Letters  
卷・号・頁・発行年 : 224 (3) : 424-432, 2013
- 11) 題 目 : Gene expression profile of brain regions reflecting aberrations in nervous system development targeting the process of neurite extension of rat offspring exposed developmentally to glycidol  
著 者 名 : Akane, H., Saito, F., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Itahashi, M., Wang, L. and Shibutani, M.  
学術雑誌名 : Journal of Applied Toxicology  
卷・号・頁・発行年 : 34 (12) : 1389-1399, 2014
- 12) 題 目 : Transient suppression of late-stage neuronal progenitor cell differentiation in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to nicotine  
著 者 名 : Ohishi, T., Wang, L., Akane, H., Shiraki, A., Itahashi, M., Mitsumori, K. and Shibutani, M.  
学術雑誌名 : Archives of Toxicology  
卷・号・頁・発行年 : 88 (2) : 443-454, 2014
- 13) 題 目 : Expression of protein gene product 9.5 and Sal-like protein 4 in canine seminomas  
著 者 名 : Hara, S., Morita, R., Shiraki, A., Segawa, R., Ogawa, T., Takimoto, N., Suzuki, K., Nomura, K. and Shibutani, M.  
学術雑誌名 : Journal of Comparative Pathology  
卷・号・頁・発行年 : 151 (1) : 10-18, 2014
- 14) 題 目 : *N*-methyl-*N*-nitrosourea during late gestation results in concomitant but reversible progenitor cell reduction and delayed neurogenesis in the hippocampus of rats

著者名：Itahashi, M., Wang, L., Shiraki, A., Abe, H., Tanaka, T., Murakami, T., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名：Toxicology Letters

巻・号・頁・発行年：226 (3) : 285-293, 2014

- 15) 題 目：Exposure to  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  during development induces activation of microglial and perivascular macrophage populations in the hippocampal dentate gyrus of rats

著者名：Abe, H., Ohishi, T., Nakane, F., Shiraki, A., Tanaka, T., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名：Journal of Applied Toxicology

巻・号・頁・発行年：35 (5) : 529-535, 2014

- 16) 題 目：Downregulation of immediate-early genes linking to suppression of neuronal plasticity in rats after 28-day exposure to glycidol

著者名：Akane, H., Saito, F., Shiraki, A., Takeyoshi, M., Imatanaka, N., Itahashi, M., Murakami, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名：Toxicology and Applied Pharmacology

巻・号・頁・発行年：279 (2) : 150-162, 2014