

論文の内容の要旨

論文題目：Busulfan のラット胎子及び新生子に対する毒性、
特に中枢神経毒性に関する病理学的研究

氏 名 大 平 東 子

Busulfan (BUS) は DNA 傷害物質の一種で、二官能性アルキル化剤であり、細胞内の核酸および蛋白質の SH 基と結合して 2 個の求核部をアルキル化することにより作用を示すことから、成人および小児を対象に、慢性骨髄性白血病の治療薬あるいは造血幹細胞移植の前治療薬として使用されている。

BUS は一方で、ヒトに毒性を示すことが知られている。例えば、BUS を処方された成人では慢性間質性肺線維症、非特異的胃腸炎、痙攣等の急性神経症状などが報告され、同様な肺病変および神経症状は小児でも報告されている。さらに、BUS を処方された妊婦では、胎児・新生児の発生異常が報告されている。

BUS の安全性（毒性）評価に関する前臨床試験は、従来、ラットやマウスの成熟個体を対象に実施され、報告も多い。一方、BUS の胎子および新生子を含む幼若動物に対する毒性、特に、中枢神経系を含む全身組織に惹起される病変に関する詳細かつ系統的な検索報告はごく少なく、ヒトの胎児および小児における安全性（毒性）を予測する上で大きな問題となっている。

本研究は、上述した実情を踏まえ、胎子および新生子に対する BUS の毒性を病理学的観点から解明することを目的に、妊娠ラットおよび新生子に BUS を単回投与し、まず、全身組織における病変の性状、分布および推移について系統的に検索し、ついで、発育期の中枢神経系における病変の性状と発現機序について検索した。得られた結果は下記の通りである。

1. BUS のラット胎子に及ぼす影響

1-1. 胎子の全身組織における病変の性状、分布および推移

妊娠 13 日の SD 系ラットに 30 mg/kg の BUS を単回腹腔内投与し、投与 6~96 時間後 (hours after treatment, HAT) に、胎子の全身組織を病理組織学的に検索した。

その結果、構成細胞の核濃縮を特徴とする病変が、脳 (終脳、間脳、中脳、後脳)、脊髄、神経節、眼球、肺、消化管、肝臓、膵臓、腎臓、頭蓋顔面組織、下顎骨、肢芽および尾部に認められた。核濃縮細胞の核は TUNEL 染色で陽性を示し、また、電顕観察で核の断片化が確認されたことから、アポトーシスと考えられた。アポトーシスは、脳、特に終脳で高度、脊髄および眼球で中等度、その他の組織では軽度ないし軽微であった。アポトーシスは 24 HAT から出現し、36 ないし 48 HAT でピークに達し、96 HAT には消失した。96 HAT には、終脳の脳室帯、脊髄の背側層および眼球の網膜の幅の減少が認められた。

以上の結果から、妊娠ラットに投与された BUS は胎盤を介して胎子に移行し、胎子の広範な組織にアポトーシスを惹起することが明らかになった。また、終脳の脳室帯、脊髄の背側層および網膜の幅の減少は、構成細胞の高度のアポトーシスにより正常な組織形成が阻害された結果であると考えられた。

1-2. 胎子の脳病変の性状と発現機序

30 mg/kg の BUS を 1-1 と同様に投与した SD 系妊娠ラットから、12~96 HAT に胎子を採用し、中枢神経系の中で病変が最も高度であった終脳を対象に、病理組織学的および免疫組織化学的検索 (cleaved caspase-3 (CAS3)、p21、p53、BrdU、phospho-histone H3 (PH3)) ならびにフローサイトメトリーおよび Real-time RT-PCR による解析 (*puma*、*p21*、*Cyclin D1*、*Cdc20*、*Cyclin B1*) を行った。また、各剖検時の 1 時間前に BrdU を単回腹腔内投与した。

その結果、終脳の神経前駆細胞のアポトーシス (CAS3 陽性) が最初脳室帯の中間層に出現し、ついで背側層および腹側層に拡大した。アポトーシスは 24 HAT から出現して 48 HAT にピークに達する一方、核分裂像ならびに BrdU 陽性 (S 期) および PH3 陽性 (M 期) 細胞は 24 HAT から減少して 48 HAT に最低値を示した。p53 および p21 陽性細胞のピークは 36 HAT であった。また、フローサイトメトリーによる細胞周期解析では、48 および 72 HAT にアポトーシス細胞の顕著な増加、G0/G1 期細胞の減少、S 期細胞の増加および G2/M 期細胞の減少が認められた。さらに、Real-time RT-PCR 解析では、36~72 HAT に、p53 の転写標的因子である *puma* mRNA (内因性アポトーシス経路に関与) およびの *p21* mRNA (G1/S 期での細胞周期停止に関

与)の発現が有意に増加していた。

以上の結果から、BUSに曝露されたラット胎子の終脳では、神経前駆細胞に増殖抑制およびp53依存性の内因性経路によるアポトーシスが惹起されることが明らかになり、また、G1/S期で細胞周期停止が起こることが示唆された。

2. BUSのラット新生子に及ぼす影響

2-1. 新生子の全身組織における病変の性状、分布および推移

6日齢のSD系雄ラットに20 mg/kgのBUSを単回背部皮下に投与し、投与1~14日後(days after treatment, DAT)に全身組織を病理組織学的に検索した。

その結果、構成細胞の核濃縮を主体とする病変が、小脳、眼球、心臓、肺、消化管、肝臓、腎臓、精巣、精巣上体、リンパ・造血組織、皮膚および骨に認められ、特に精巣、骨髄、眼球および小脳で高度であった。核濃縮細胞はCAS3陽性を示し、アポトーシスと考えられた。アポトーシスは、上記の各組織で1~7 DATに観察され、胸腺では1 DATに、また、他の組織では2ないし4 DATにピークに達した。14 DATには、精巣で精細管の萎縮、骨髄で造血細胞の減少、眼球で網膜の異形成、水晶体の変性と上皮の部分的欠損および小脳で顆粒細胞の外顆粒層から内顆粒層への移動の障害が観察された。

以上の結果から、BUSを投与されたラット新生子では、全身の広範な組織でアポトーシスが惹起され、また、精巣、骨髄、眼球および小脳では構成細胞の高度のアポトーシスに起因すると考えられる病変が誘発されることが明らかになった。

2-2. 新生子の小脳病変の性状および発現機序

6日齢のSD系雄ラットに10~50 mg/kgのBUSを単回皮下投与し、1~14 DATに脳を採取して病理組織学的に検索した。小脳については、TUNEL法および免疫組織化学的検索(CAS3、p21、p53、PH3など)も実施した。さらに、6日齢の雄ラットに30 mg/kgのBUSを同様に投与し、6~48 HAT(2 DAT)に小脳を採材し、Real-time RT-PCR(*puma*、*p21*、*Cyclin D1*、*Cdc20*、*Cyclin B1*)による解析を行った。

その結果、肉眼的には7 DAT以降に20 mg/kg以上の投与量群で明瞭な小脳の萎縮が観察された。病理組織学的検索では、大脳には著変は認められなかった。一方、小脳では、皮質の外顆粒層、深部小脳核および小脳白質に、用量依存性に以下に述べる病変が観察され、特に外顆粒層で顕著であった。

BUS投与群の外顆粒層では、2 DATにp53およびp21陽性細胞の増加と相俟ってアポトーシス細胞(核濃縮、TUNELおよびCAS3陽性)が増加し、

核分裂細胞は逆に減少した。また、Real-time RT-PCR 解析で、36 および 48 HAT に *puma* mRNA の発現が有意に増加し、*p21* mRNA の発現にも増加傾向が認められた。さらに、48 HAT には、G2/M 期での細胞周期停止に係る *Cyclin B1* mRNA の発現量も有意に増加した。

小脳外顆粒層の顆粒細胞の動態については、対照群では顆粒細胞は外顆粒層で増殖した後 14 DAT (20 日齢)までに内顆粒層に移動し、外顆粒層は消失した。10 mg/kg 群では 4 DAT 以降は対照群と同様な動態を示したが、20 および 30 mg/kg 群では 14 DAT に至っても菲薄化した外顆粒層が残存しており、同時に、内顆粒層で細胞密度の低下を伴う軽度の幅の減少が認められた。なお、50 mg/kg 群では 14 DAT までに全例が死亡したため、14 DAT の検索は出来なかった。

深部小脳核では、グリア細胞のアポトーシスが 1 DAT に出現し、2 DAT に増加した。さらに、4 DAT には”mitotic catastrophe”類似の異常な核分裂像を呈する細胞が出現したが、その発現機序については不明である。また、小脳白質では、2 ~7 DAT に傍片葉にほぼ限局して水腫様変化が観察された。

以上の結果から、BUS 投与群の小脳では、外顆粒層、深部小脳核および小脳白質にそれぞれ特徴的な病理組織学的変化が用量依存性に観察され、特に外顆粒層で顕著であること、および、外顆粒層では顆粒細胞に増殖抑制と p53 依存性の内因性経路によるアポトーシスが惹起されることが明らかになった。また、G2/M 期で細胞周期停止が誘導されることが示唆された。さらに、顆粒細胞の外顆粒層から内顆粒層への移動の阻害が起こることが示された。

上述したように、本研究によって、BUS に暴露されたラットの胎子および新生子の全身組織における病変の性状、分布および推移の詳細が初めて明らかにされた。その成果は BUS のヒト胎児および新生児に対する毒性発現の予測、ひいては安全性の評価に貢献するところが大きい。また、本研究で明らかにされたラット胎子脳および新生子小脳における BUS 誘発病変の病理組織学的性状および推移ならびにその発現機序に関する一連の知見は、各種の DNA 傷害物質について従来報告されている知見と併せ、DNA 傷害物質による発育期の中樞神経傷害のより一層詳細な発現機序を明らかにする上で貴重である。