

審査の結果の要旨

氏名 大平 東子

Busulfan (BUS) は、白血病等の治療薬や造血幹細胞移植の前治療薬として使用されている二官能性アルキル化剤である。本薬の毒性作用は、主に成熟個体で評価され、胎子及び新生子に関する情報は少ない。本研究は、ラットの胎子及び新生子に対するBUSの作用について、中枢神経を中心として病理学的に解明することを目的として行われた。

1. BUSのラット胎子に及ぼす影響

1-1. 胎子における病変の性状、分布及び推移

妊娠13日のSDラットに30 mg/kgのBUSを腹腔内に単回投与し、投与6~96時間後(hours after treatment, HAT)に、胎子組織を検索した。

その結果、核濃縮細胞が全身の種々な組織に出現し、特に終脳、脊髄及び眼球で顕著であった。上記変化は、細胞核がTUNEL染色で陽性及び電顕的に断片化を示したことから、アポトーシスと判断した。この変化は、24HATに始まり、36又は48HATでピークに達した。また、96HATでは終脳の脳室帯、脊髄背側層及び眼球網膜の菲薄化が観察され、高度なアポトーシスによる形成不全が示唆された。

1-2. 胎子の脳病変の性状と発現機序

前記と同様の実験より得た胎子終脳を免疫組織化学(cleaved caspase-3 (CAS3)、p21、p53、BrdU、phospho-histone H3 (PH3))、フローサイトメトリー及びReal-time RT-PCR(*puma*、*p21*、*Cyclin D1*、*Cdc20*、*Cyclin B1*)により検索した。

その結果、終脳の神経前駆細胞のアポトーシス(CAS3陽性)が24HATに脳室帯中間層に出現後、背側及び腹側層へ拡がり、48HATでピークに達した一方、核分裂像、BrdU及びPH3標識率は48HATに最低値を示した。p53及びp21陽性細胞のピークは36HATであった。また、フローサイトメトリーでは、48~72HATにアポトーシス細胞の顕著な増加、G0/G1及びG2/M期細胞の減少、S期細胞の増加がみとめられ、Real-time RT-PCR解析では、p53の転写標的因子の*puma* mRNA(内因性アポトーシス経路に関与)及び*p21* mRNA(G1/S期での細胞周期停止に関与)の増加が36~72HATにみられた。

以上、BUSに暴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及び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となった。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. 新生子における病変の性状、分布及び推移

6日齢のSD系雄ラットに20 mg/kgのBUSを背部皮下に単回投与し、投与1~14日後(days after treatment, DAT)に全身組織を検索した。

その結果、核濃縮細胞が全身の種々な組織にみられ、特に精巣、骨髄、眼球及び小脳で顕著であった。核濃縮細胞は、CAS3陽性でアポトーシスと判断され、各組織で1~7DATに観察された。14DATには、精巣で精細管萎縮、骨髄で造血細胞の著減、眼球で網膜異形成、水晶体変性と上皮細胞の部分的欠失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障害がみされた。

2-2. 新生子の小脳病変の性状及び発現機序

6日齢のSD系雄ラットに10~50 mg/kgのBUSを背部皮下に単回投与し、1~14DATに小脳を病理組織学的及び免疫組織化学的に検索した。30 mg/kg群については、投与6~48時間後にReal-time RT-PCR解析(前記同様)も行った。

その結果、50 mg/kg群では14DATまでに骨髄抑制により全例が死亡した。20 mg/kg以上の群では、肉眼的に小脳萎縮がみられ、組織学的には2DATに外顆粒層でp53及びp21陽性細胞が増加すると共に、アポトーシス細胞も増加したが、核分裂像は減少した。また、正常では14DAT(20日齢)までに消失する外顆粒層が僅かに残存していた。その他、深部小脳核のグリア細胞のアポトーシスが2DATに増加し、分裂期カタストロフィー様細胞が4DATに、傍片葉の水腫が2~7DATにみられた。

また、30 mg/kg群で36と48HATに*puma* mRNA及び*p21* mRNA量が増加し、さらに48HATではG2/M期の細胞周期停止に係る*Cyclin B1* mRNA量が増加した。

以上、BUSは新生子小脳において、外顆粒層顆粒細胞の増殖抑制とp53依存性の内因性経路によるアポトーシス、G2/M期での細胞周期停止を惹起し、また外顆粒層顆粒細胞の内顆粒層への移動を障害することが示唆された。

本研究の成果は、ヒト胎児及び新生児に対するBUSの毒性発現予測、ひいては安全性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及び新生子小脳におけるBUS誘発病変の病理組織学的性状、推移、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中枢神経傷害の詳細な発現機序を明らかにする上で貴重であると考えられた。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(獣医学)の学位論文として価値あるものと認めた。