

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 井上 歩美

論文題目

カニクイザル出生児を用いた行動発達及  
び記憶学習に関する研究

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	海老原	史樹文
委員	名古屋大学教授	堀尾	文彦
委員	名古屋大学教授	松田	洋一
委員	名古屋大学教授	吉村	崇

医薬品の安全性を確保するために、生殖発生毒性試験において、次世代の出生児の行動や記憶学習を評価することが求められている。この試験の多くは、齧歯類により行われているが、高次脳機能に対する微妙な影響を見逃さないようにするためには、より高度な神経機能を持つサル類を用いた評価系の確立が望まれる。本研究は、医薬品開発においてヒトの行動発達に対するリスク評価のための検査手法を、カニクイザル出生児を用いて確立することを目的とした。すなわち、医薬品開発における非臨床試験のガイドラインで定められている「出生前及び出生後の発生ならびに母動物の機能に関する試験」において実施すべき出生児の行動・記憶学習検査法を確立すると共に、甲状腺機能亢進症の治療薬としてヒト臨床で汎用されているチアマゾールを妊娠カニクイザルに経口投与し、出生児の行動発達及び記憶学習能に及ぼす影響について検討したものである。

チアマゾールは出生児の神経発達に影響を及ぼすことが示唆されており、妊娠中に母体が服用した場合、出生児の発育遅延あるいは精神発達遅滞を引き起こす可能性が知られている。本薬物については、ラットの報告はあるものの、サルに関しての報告はない。そこで、まずチアマゾールの妊娠カニクイザルに対する適正な投与量を調べた。その結果、出生児の評価に十分な例数を得られる適切な投与量は 5 mg/kg/day 未満であることが分かった。この結果をもとに、低容量として 2 mg/kg、高用量を 3.5 mg/kg としてチアマゾールを 1 日 1 回、カニクイザルの妊娠 120～150 日に経口投与し、母動物の一般状態、保育状況、体重推移、妊娠期間の長さ、血清中 T3、T4、TSH 濃度などへの影響を調べた。その結果、2 mg/kg/day の場合、一般状態、保育状況、体重推移、妊娠維持、妊娠期間の長さ及び分娩状況に明らかな変化はみられなかったが、3.5 mg/kg/day の場合には、流産、胎児死亡、死産及び新生児死亡が対照群と比較して多くみられた。また、T3、T4、TSH 濃度への影響はいずれの投与量でも認められなかった。

次に、上に記した妊娠後期にチアマゾールを投与された母動物より生まれた出生児を対象に甲状腺ホルモンレベルや行動観察などの各種検査を行った。その結果、T3、T4、TSH レベルに影響はみられなかったが、甲状腺重量は対照群の 3.5～4.4 倍の高値を示した。行動に関しては、母子間行動観察及びアイコンタクトテストを、また、記憶力を調べるために、指迷路テストを考案して実験を行った。その結果、チアマゾール群は母動物との接触時間の増加と探索行動の減少がみられ、対照群と比較して警戒心が強い傾向が認められた。また、母親から離れず単独行動をしなかったことから、自発運動が乏しい、あるいは周囲の環境に対する興味関心がない状態と考えられた。これらの結果から、行動発達遅延の可能性が推察された。そこで次に、新奇環境における興味関心あるいはヒトに対する警戒心を

調べるため、アイコンタクトテストを実施した。その結果、チアマゾール群のアイコンタクト回数は対照群と比較して有意に少なく、警戒心の欠如あるいは外界刺激に対する興味関心が乏しい可能性が考えられた。特に 3.5 mg/kg 群のチアマゾールを投与された群では、実験ケージの中でうずくまったまま観察者を見ようとしない、ヒトの自閉症に似た行動がみられた。これらの結果は、胎生期のチアマゾール曝露が出生児の生後の行動発達に影響を及ぼすことを示している。また、記憶学習能への影響を評価する指迷路テストでは、チアマゾール 3.5 mg/kg 群の成功率が対照群と比較して有意に低く、記憶力の低下（長期記憶障害と推察される）が示唆された。胎児期の甲状腺ホルモン不足は、出生後の刺激への低反応や、学習はできるが記憶ができないなどの表現型をもたらすことがあり、本実験においても、胎児期のチアマゾール曝露により胎児期の甲状腺ホルモンが低下した結果、記憶障害を引き起こした可能性が考えられた。以上の結果から、胎生期のチアマゾール曝露はカニクイザルの次世代の行動発達及び記憶学習能に影響を及ぼすこと示された。

次に、出生児の行動異常や記憶障害をもたらす脳機能の異常を探るために、脳の形態学的観察を行った。しかし、大脳（前頭葉、側頭葉、頭頂葉）、小脳、脳幹及び延髄の肉眼的観察では特筆すべき異常は認められなかった。また、HE 染色標本観察でも異常は認められなかった。さらに、海馬歯状回を NeuN、Msh1 及び Reelin 抗体で免疫染色した観察でも明らかな異常を検出することは出来なかった。しかし、組織学的に異常が検出されない場合でも、神経伝達などの異常が生じる可能性は十分考えられるので、神経化学的手法や電気生理学的手法など様々な手法を用いる必要があることを論じた。

最後に、様々な年齢層のサル（1 歳齢未満の幼若動物、3 歳齢の若齢動物及び 5 歳以上の成熟動物）の指迷路テストの結果を収集し、記憶・学習能の発達における年齢差及び性差の有無について検討した。その結果、3 歳齢までの記憶・学習能に関する生後発達には性差はなく、記憶学習テストで優れた成績を示し、報酬への執着心や装置に対する興味関心が高いことが分かった。すなわち、指迷路テストは幼若動物から成熟動物まで幅広い年齢のサルの記憶学習検査を実施可能であるが、特に雌雄ともに 3 歳齢までの若齢動物を用いると、サルの記憶学習能が短期間で検査可能であると結論した。

以上のように、本研究で新規に考案した母子間行動観察、アイコンタクトテスト及び指迷路テストは、出生児の神経行動発達の検査方法として有用であることが示された。特に、これらの行動発達の検査方法を用いてヒト臨床での症例と類似した症状がサルにおいても再現されたことから、化学物質の次世代への影響を評価する上で、信頼性の高い実験方法が確立できたといえる。また、チアマゾールが母体を介して出生児の行動発達に影響を及ぼすことが、ヒトに近いカニクイザルで確認された点において、本成果は霊長類の生後発達を研究するための貴重

なデータとなり得ると考えられ、学術的にも高い価値を有している。よって、本審査委員会は、本論文の内容が博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものと認め、合格と判定した。