

博士学位論文の要約

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

名古屋大学大学院生命農学研究科 応用分子生命科学専攻

バイオモデリング講座 動物行動統御学研究分野

井上 歩美

2014年 9月

日本でも多種の化学物質が汎用されている近年では、LD、ADHD、自閉症児が増加し、文部科学省調査ではADHD児は全学童の6.5%程度に達している。このように化学物質は世界中で汎用され、次世代の子供達の知能や行動などの脳の機能発達に異常を引き起こし、知能低下や行動異常を誘発している可能性を無視できない現状にある。しかし、ヒトの脳の高次機能や行動発達のメカニズムとその障害は未知の部分が多い。医薬品の安全性試験においては、1種類の動物種を用いて生殖発生毒性試験を実施し、次世代の出生児の行動、記憶学習を評価することが求められており、これには主としてげっ歯類が用いられてきた。しかしながら、系統発生的及び繁殖生理学的にヒトに近く、高次脳機能を支える極度に複雑化した神経系の発達は霊長類にしか生じない。また、ヒトの社会的行動を含む微妙な脳の機能発達を観察する心理・行動学実験はげっ歯類では困難なので、ヒトへのリスク評価にはサル類を用いるのが理想的である。一方で、サル類を用いた評価系は、いくつか興味深い提案がみられるが未だ確立された手法の言及はないため、次世代の行動発達及び記憶学習能を評価するための検査手法の早期確立が望まれている。

そこで本研究では、ヒトにおける行動発達におけるリスクを妥当に評価し得る評価系を確立するため、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・記憶学習検査法をカニクイザルの出生児を用いて確立すると共に、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することを目的とした。出生児の神経発達に影響を及ぼす可能性が示唆

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、その出生児の行動発達及び記憶学習能に及ぼす影響を調べた。本研究では、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陽性物質として選択した。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薬物である。チアマゾールについての動物実験はラットの報告はあるが、ヒトにより近縁なサルに関する報告はない。

【第2章】

チアマゾールの妊娠カニクイザルに対する毒性情報を得るため、ヒト臨床投与量である 1 mg/kg/day（成人の重症患者の場合）の 20 倍にあたる 20 mg/kg/day のチアマゾールを妊娠カニクイザルに経口投与し、チアマゾールの妊娠カニクイザルへの影響を予備的に調べたところ、ヒト臨床用量の 20 倍にあたるチアマゾール 20 mg/kg/day を 10 例の妊娠カニクイザルの妊娠 50 日から経口投与したところ、妊娠 69 日で 1 例が死亡した。また、母動物の一般状態、体重及び摂餌量に異常がみられ、チアマゾール 20 mg/kg/day は妊娠カニクイザルに対して過剰量であった。そこで、チアマゾールの投与量を 5 mg/kg/day に減量して、1 日 2 回、妊娠カニクイザルの妊娠 50～150 日に経口投与したところ、母動物の体重及び摂餌量の低値がみられ、また、流産、胎児死亡、新生児死亡が多発し、生存出生児は 9 例中 1 例のみであった。同群の死亡児及び生存児全例では咽頭部の腫脹がみられ、剖検結果より、咽頭部の腫脹は甲状腺の腫脹（甲状腺腫）によるものであった。

【第3章】

出生児の評価に十分な例数の出生児を得ることが必要であるため、第 2 章の結果から、妊娠カニクイザルに対するチアマゾールの投与量は高用量を 3.5 mg/kg/day、低用量を 2 mg/kg/day に設定した。投与は胎児の神経細胞増殖のピーク期であると考えられる妊娠後期（妊娠 120 日～150 日）とし、母動物への影響について調べた。またその時の血清中の甲状腺ホルモン及び TSH の濃度についても調べた。その結果、チアマゾール 3.5 mg/kg/day では、一般状態、哺育状況、体重推移ならびに妊娠期間の長さに変化はみられなかったが、流産、胎児死亡、死産ならびに新生児死亡が対照群と比較して多かった。チアマゾール 2 mg/kg/day では、9 例の妊娠 120 日～150 日に妊娠カニクイザルに投与したところ、一般状態、哺育状況、体重推移、妊娠維持、妊娠期間の長

さならびに分娩状況に明らかな変化はみられなかった。母動物及び出生児の血清中 T3、T4 及び TSH 濃度にチアマゾール投与起因の変化はみられなかったが、チアマゾール群の出生児全例に甲状腺腫がみられ、生後約 1 歳齢の甲状腺重量は対照群の 3.5~4.4 倍も高値であり、胎児の甲状腺機能異常が推察された。

【第 4 章】

第 3 章で得られた生存出生児について、母子間行動観察及びアイコンタクトテストを用いて行動発達検査を、指迷路テストを用いて記憶学習検査を実施した。行動発達検査においては、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みられ、サルの緊張度が高かった。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、行動発達遅延の可能性が推察された。このため、離乳後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ところ、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、チアマゾール 3.5 mg/kg 群では、実験ケージの中で、うずくまったまま、観察者を見る行動をなかった動物もあり、臨床での自閉症に似た行動がみられており、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何らかの影響を及ぼしたと考えられる。神経系発達は妊娠後期及び出生後の甲状腺ホルモンの影響を強く受けるため、その感受性の高い時期に胎児及び母動物からの十分な甲状腺ホルモンの放出がチアマゾール曝露で抑制されたことが出生後のサルの行動発達遅延の原因となっている可能性がある。

記憶学習能への影響を評価するため、本研究で考案した指迷路テストを実施したところ、チアマゾール 3.5 mg/kg 群の Memory test の成功率が対照群と比較して有意に低く、長期記憶障害と推察される記憶力の低下が示唆された。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につながる。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、記憶障害に影響を及ぼ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が明らかとなった。

【第 5 章】

本研究でみられた出生児の行動異常あるいは記憶障害について、脳との関連性を調べるため、大脳を採取し、形態学的に観察したが、脳の委縮などの形態学的異常はみられなかった。記憶には海馬と海馬歯状回の新生ニューロンが大きく関与しているおり、海馬について病理組織学的検査を実施したところ、正常範囲内ではあるが、ラットの結果と類似した傾向がみられた。妊娠後期にチアマゾールに曝露された出生児では、ヒトの精神発達遅滞に類似した行動異常がみられ、また、長期記憶障害の可能性が考えられたが、免疫組織学的検査では、明らかな異常は認められなかった。

【第6章】

本研究では記憶学習検査方法として指迷路テストを新しく考案し、カニクイザル出生児の長期記憶障害を検出することが可能であった。そこで、基礎的データ収集の一環として、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。幼若動物・若齢動物の指迷路テストの結果から、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かった。若齢動物は、記憶学習テストで優れた成績を示し、雌雄共に、報酬への執着心や装置に対する興味関心が高かった。若齢動物は特に警戒心と興味関心のバランスが良かった。指迷路テストは幼若動物～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、サルの記憶学習能検査が短期間で可能と結論した。本研究で提案した新しい指迷路テストはPPND試験の記憶学習能の検査方法だけでなく、小児用医薬品のための安全性試験における記憶学習能の評価方法としての有用性が明らかになった。

以上の結果から、本研究で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な方法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、今後、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動物実験の報告はラットのみであったため、よりヒトに近いカニクイザルを用いた本実験から、新しい知見が得られた。これらの研究で得られたデータは、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る。