

ヒドロキシウレア (HU) は抗癌剤や HIV ウイルス複製阻害薬として用いられてきた。HU はリボヌクレオチド還元酵素阻害剤で、主に増殖している S 期細胞で DNA 合成を抑制するが、RNA と蛋白の合成には影響を与えない。HU による副作用としては、発熱、新生児呼吸不全などが知られている。一方、HU は哺乳動物に強い催奇形性を有し、増殖中の胎仔細胞の DNA 合成を阻害する。HU を妊娠実験動物に投与すると、新生仔の脳、四肢、頭骨などに奇形を生じることが知られている。本研究の目的は、HU による胎仔毒性の発現機構の解明を通じ胎仔毒性と催奇形性の関連を明らかにすることである。

1. HU によるマウス胎仔組織におけるアポトーシスの発現

400 mg/kg の HU を妊娠 13 日目のマウスに投与したところ、投与 6 時間後と 12 時間後に、CNS と肺で核濃縮を呈する細胞の中等度から重度の増数が認められた。このような細胞の核はアポトーシスの検出に広く用いられている TUNEL 法に陽性を示し、また、同細胞はアポトーシス細胞に特徴的な電子顕微鏡的所見を示した。この結果から、HU は胎仔組織に過剰なアポトーシスをおこすことが示され、さらに、このような過剰な細胞死が、これまでにこれらの組織で報告されている新生仔の形態学的な発生異常と関連していることが示唆された。

2. 出生前 HU 投与の出生仔マウスへの影響

妊娠 13 日目に 400 mg/kg あるいは 800 mg/kg の HU を投与した母マウスから生まれた仔マウスを生後 0 日目と 10 週目に調べた。HU 投与群の仔マウスは対照群と比較して成長が遅延し、小脳症、水頭症および尾椎の湾曲が観察された。体重増加、奇形出現頻度については両投与量群間で差はなかったが、奇形の程度は 400 mg/kg 群よりも 800 mg/kg 群で重度であった。前項で明らかになった胎仔組織におけるアポトーシスによる過剰な細胞死が仔マウスの対応する組織に形態学的異常を引き起こすことが示された。

3. HU によるマウス胎仔中枢神経細胞におけるアポトーシスの発現機構

妊娠 13 日目の母マウスに HU を投与し、胎仔の終脳におけるアポトーシスの発現機構を検索した。TUNEL 陽性神経上皮細胞は HU 投与後 3 時間で増加し始め、12 時間でピークに達した。また、1 時間から 6 時間後にかけて、免疫組織化学で p53 陽性神経上皮細胞が検出され、同時に Western blot 解析でも p53 タンパクの発現が認められた。同時に、p53 の標的遺伝子でアポトーシス関連 (*fas*, *fasL*, および *bax*) および細胞周期関連遺伝子 (*p21*) の mRNAs の有意な発現の上昇が終脳で検出された。これらの標的遺伝子の発現の程度と推移は、*fas*, *fasL*, *mdm2* および *p21* のタンパク発現の動態と同様であった。フローサイトメーターによる解析結果から、神経上皮細胞は投与 3 から 6 時間後にかけて S 期

で、また、12 時間後に G2/M 期で、それぞれ細胞周期停止を起こしたことが示された。上述の結果から、HU による胎仔脳神経上皮細胞のアポトーシスは p53 によって誘導されることが示された。

4. HU によるマウス胎仔肺におけるアポトーシスの発現機構

妊娠 13 日目の母マウスに HU を投与し、胎仔の肺でのアポトーシスの発現機構について検索した。TUNEL 陽性細胞数は投与の 3 時間後に増加を始め、6 時間後にピークに達し、その後減少した。活性化カスパーゼ 3 陽性細胞数の変化も TUNEL 陽性細胞の変動と一致していた。TUNEL や活性化カスパーゼ 3 の発現は、主として肺の間葉系細胞で観察された。胎仔の肺における p53 陽性細胞の数は HU 投与後 1 時間と 3 時間で著しく増加した。さらに、リン酸化 p53 タンパクの発現が同じ時期に認められた。p53 の転写標的遺伝子の中で、*p21*, *bax*, および *cyclin G* の mRNAs の発現レベルは対照群に比べて有意に上昇し、また、*fas* mRNA の発現レベルも対照群と比較して高い傾向を示した。また、フローサイトメーターにより HU 投与 3 時間後に S 期で細胞周期停止が起こった可能性が示唆された。この結果から、マウス胎仔の肺における HU によるアポトーシスも p53 と密接に関連していることが示唆された。

上記の結果より、HU によるマウス胎仔組織の毒性発現には、アポトーシス誘導と細胞周期の停止が重要な役割を果たしており、これらの変化は *p53* によって媒介されていることが示唆された。また、こうした胎仔組織におけるアポトーシスによる過剰な細胞死は出生仔の対応組織における形態異常の発生と密接に関係しているものと考えられた。本研究の成果は薬剤の胎仔毒性評価の際に大いに参考になる知見をもたらした。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位を授与するに値するものと認めた。