

(第6号様式)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	神田 宗欣
審査委員	主査 岩田 久人 副査 国末 達也 副査 野見山 桂

論文名

Effects of exposure to tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) on *ex ovo* chicken embryos

審査結果の要旨

有機リン系難燃剤（OPFR）は、火災の延焼を遅らせる目的で消費財や工業製品に広く使用されている物質である。その使用量は、従来使用されてきたポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE）系の難燃剤が自主的に廃止されたことにより、近年も増加している。リン酸トリス（2-クロロエチル）（TCEP）は、大気・粉塵・河川水・野鳥の組織や卵などの生物相に検出される OPFR の一種である。しかしながら発生段階にある鳥類胚への TCEP 曝露の影響に関する研究はない。経済協力開発機構（OECD）テストガイドラインは化学物質の安全性を試験するための国際的に認められた標準的な方法として制定され、化学物質がヒトの健康や生態系への影響を評価する役割を担っている。一方、OECD の鳥類を対象にした試験ガイドラインは、いずれも成鳥や孵化後の若鳥を対象としており、発生胚に対する影響を調査する試験は含まれていない。そこで本研究では、鳥類胚の殻なし培養法を毒性試験に適用し、新規鳥類胚毒性試験法を確立した。この試験法は鳥類胚の発生を可視化し、化学物質曝露による形態や心血管系への影響の経時的評価を可能にする。

そこで本研究では、殻なし孵化装置で培養したニワトリ胚に TCEP（低用量 50 nmol/g 卵、中用量 250 nmol/g 卵、高用量 500 nmol/g 卵）を投与し、経時的な表現型観察と遺伝子発現プロファイル（トランスクリプトーム）解析を組み合わせることで、TCEP の影響とその作用機序の解明を目的とした。得られた成果は以下のようにまとめられる。

1) 投与試験の結果から、TCEP は低用量曝露であってもニワトリ胚の心拍数低下や胚体外血管の伸長阻害など心血管系機能障害を誘発することが明らかになった。培養9日目のニワトリ胚心臓のトランスクリプトームを解析したところ、13,378 遺伝子のうち 812 遺伝子を発現変動遺伝子（DEG）として検出した。DEG の遺伝子オントロジー解析により、TCEP 曝露したニワトリ胚の心筋収縮、心室心筋組織の形態形成、筋芽細胞分化への影響が予測された。さらに定量的遺伝子発現解析により、Ca²⁺輸送関連遺伝子や筋フィラメントスライド関連遺伝子の発現レベルが

TCEP 曝露により有意に低下すること明らかとなった。これらの結果より、TCEP 曝露によるこれら心筋関連遺伝子の発現レベルの低下が、心血管毒性の一要因であることが示唆された。

2) 次いで、ニワトリ胚の TCEP 曝露による心血管系影響の分子機構を理解するために、表現型影響が最も顕著であった培養5日目のニワトリ胚心臓を対象にトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、TCEP 曝露による心筋伝導および微小管機能に関連する遺伝子の発現低下が認められ、これら遺伝子が心拍数の低下に関与すると予想された。またパスウェイ解析の結果、アクチン細胞骨格の制御、接着結合、Wnt シグナル、血管内皮増殖因子シグナル、上皮間葉転換 (EMT) 経路が顕著に影響を受けていることがわかった。これらの結果から、TCEP 曝露によって初期発達胚の EMT が抑制されたことにより、心筋の分化・発達が阻害され、心拍数を低下させた可能性が示唆された。

3) さらに、TCEP 曝露がニワトリ囊胚形成過程で EMT に影響を与えるかどうかを調べるために、TCEP 曝露したニワトリ胚 (ハンバーガー・ハミルトン ステージ4) の EMT および中胚葉に関連する遺伝子の発現量を測定した。EMT の転写因子である SNAI2 の発現は、すべての TCEP 曝露群で有意に低下した。さらに中胚葉マーカー遺伝子の発現量も、TCEP 曝露濃度依存的に有意に低下した。また、線維芽細胞増殖因子 FGF4 の発現は TCEP 曝露により有意に低下し、FGF4 と SNAI2 および中胚葉マーカー遺伝子の発現には有意な正の相関関係が認められた。これらの結果は、TCEP が FGF4 の発現を低下させることで、ニワトリの囊胚形成過程で EMT の進行と中胚葉細胞への分化を抑制することを示している。

以上、本学位論文は、鳥類胚の殻なし培養法を用いてニワトリ胚に対する TCEP 曝露の影響を経時的に解析し、影響とその作用機序を解明した点が評価される。特に、TCEP 曝露が発生初期胚の EMT に影響を与えることを示した成果は新規性が高い。

本学位論文の公聴会は 2023 年 2 月 14 日に愛媛大学総合研究棟 I 6 階会議室で開催され、口頭で学位論文の内容発表と質疑応答がおこなわれた。提出された学位論文と公聴会での発表内容を審査した結果、本学位論文は愛媛大学大学院理工学研究科の学位審査基準を満たしており、3 名の論文審査委員は全員一致して本学位論文が博士 (理学) の学位を授与するに値するものと判定した。