

別添1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究
(21KD1004)

令和3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中西 剛

令和4年(2022年)5月

研究報告書目次レイアウト (参考)

目 次	
I. 総括研究報告	
○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ に関する研究	----- 1
厚生太郎	
(資料) ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ のアンケート調査用紙	
II. 分担研究報告	
1. △ △ △ △ △ △ △ △ に関する研究	----- 30
厚生一郎	
(資料) 資料名	
2. □ □ □ □ □ □ □ □ に関する研究	----- 60
厚生二郎	
(資料) 資料名	
3. ▽ ▽ ▽ ▽ ▽ ▽ ▽ ▽ に関する研究	----- 80
厚生三郎	
(資料) 資料名	
4. ◎ ◎ ◎ ◎ ◎ ◎ ◎ ◎ に関する研究	----- 100
厚生四郎	
(資料) 資料名	
5. ◇ ◇ ◇ ◇ ◇ ◇ ◇ ◇ に関する研究	----- 120
厚生五郎	
(資料) 資料名	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 140

研究報告書レイアウト（参考）

（具体的かつ詳細に記入すること）

○○○○○補助金（○○○研究事業）
（総括・分担）研究報告書

○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○に関する研究

研究代表者又は研究分担者 厚生 太郎 ○○○○○病院長

研究要旨

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名
（分担研究報告書の場合は、省略）

A. 研究目的
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○。

B. 研究方法
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○。
（倫理面への配慮）
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

C. 研究結果
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○。

D. 考察
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○。

○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○。

E. 結論
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○。

F. 健康危険情報
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
（分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入）

G. 研究発表
1. 論文発表
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
2. 学会発表
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）
1. 特許取得
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
2. 実用新案登録
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
3. その他
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

作成上の留意事項

1. 「A. 研究目的」について
 - ・厚生労働行政の課題との関連性を含めて記入すること。
2. 「B. 研究方法」について
 - (1) 実施経過が分かるように具体的に記入すること。
 - (2) 「(倫理面への配慮)」には、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意(インフォームド・コンセント)に関わる状況、実験に動物に対する動物愛護上の配慮など、当該研究を行った際に実施した倫理面への配慮の内容及び方法について、具体的に記入すること。倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記すること。

なお、人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(令和3年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、遺伝子治療等臨床研究に関する指針(平成31年厚生労働省告示第48号)、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続を行うこと。
3. 「C. 研究結果」について
 - ・当該年度の研究成果が明らかになるように具体的に記入すること。
4. 「F. 健康危険情報」について
 - ・研究分担者や研究協力者の把握した情報・意見等についても研究代表者がとりまとめて総括研究報告書に記入すること。
5. その他
 - (1) 日本産業規格A列4番の用紙を用いること。
 - (2) 文字の大きさは、10～12ポイント程度とする。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kana Yamamoto, Toshihiko Kurihara, Kensuke Minami, Kazumasa Nagayasu, Yoshinori Tsurusaki, Noriko Miyake, Hidenaga Yamamori, Yukio Yasuda, Michiko Fujimoto, Mikiya Fujiwara, Masayuki Baba, Kohei Kitagawa, Tomoya Takemoto, Nanaka Gotoda-Nishimura, Tomohiro Takada, Kaoru Seiriki, Atsuko Hayata-Takano, Atsushi Kasai, Yukio Ago, Satoshi Kida, Kazuhiro Takuma, Fumihito Ono, Naomichi Matsumoto, Ryota Hashimoto, Hitoshi Hashimoto & Takanobu Nakazawa	Multiple alterations in glutamatergic transmission and dopamine D2 receptor signaling in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with familial schizophrenia	Translational Psychiatry	11	548	2021

<p>Kohei Kitagawa, Kensuke Matsumura, Masayuki Baba, Momoka Kondo, Tomoya Takemoto, Kazuki Nagayasu, Yukio Ago, Kaoru Seiriki, Atsuko Hayata-Takano, Atsushi Kasai, Kazuhiro Takuma, Ryo Hashimoto, Hitoshi Hashimoto, Takanoobu Nakazawa</p>	<p>Intranasal oxytocin administration ameliorates social behavioral deficits in a <i>POGZ^{WT/Q1038R}</i> mouse model of autism spectrum disorder</p>	<p>Molecular Brain</p>	<p>14</p>	<p>56</p>	<p>2021</p>
<p>中西 剛</p>	<p>内分泌かく乱に起因する生殖発生毒性評価の問題点とその将来展望 (総説)</p>	<p>ファルマシア</p>	<p>58</p>	<p>44-49</p>	<p>2022</p>

別添6

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和4年 5月30日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 岐阜薬科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 原 英彰

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク事業

2. 研究課題名 化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬学部・教授

(氏名・フリガナ) 中西 剛・ナカニシ ツヨシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

別添6

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和4年 3月31日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク事業

2. 研究課題名 化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬理部・部長

(氏名・フリガナ) 諫田 泰成・カンダ ヤスナリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

別添6

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和4年 5月23日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人大阪大学

所属研究機関長 職名 大学院歯学研究科長

氏名 今里 聡

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク事業

2. 研究課題名 化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院歯学研究科・教授

(氏名・フリガナ) 田熊 一敬・タクマ カズヒロ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

別添6

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和4年 5月30日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 岐阜薬科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 原 英彰

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク事業

2. 研究課題名 化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬学部・講師

(氏名・フリガナ) 松丸 大輔・マツマル ダイスケ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

別添6

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和4年 5月30日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 岩手医科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 祖父江 憲治

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク事業

2. 研究課題名 化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学部・講師

(氏名・フリガナ) 村嶋 亜紀・ムラシマ アキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

目 次

I. 総括研究報告書	1
化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究	
中西 剛	2
II. 研究分担報告書	11
1. 妊娠期の甲状腺ホルモン関連指標変動による次世代影響の検討～SynRep マウスの基礎データの収集～	
中西 剛、村嶋亜紀	12
2. DNT 陽性対照物質を用いたレポーターマウスの有用性の検証～バルプロ酸を用いた検討～	
田熊一敬	25
3. 妊娠期の甲状腺ホルモン関連指標変動による次世代影響の検討～抗甲状腺薬を用いた甲状腺機能低下条件の検証～	
松丸大輔	41
4. 甲状腺関連指標の変動を考慮したヒト細胞試験法の構築	
諫田泰成	51
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	59

令和 3 年度 厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

I. 総括研究報告書

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

研究課題名：化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究
(21KD1004)

研究代表者：中西 剛（岐阜薬科大学 薬学部・教授）、

研究要旨

近年、ヒトでは妊娠期の甲状腺機能低下が児の脳発達に悪影響を与えることが疫学調査により明らかとなった。このような背景を踏まえ、化学物質の毒性評価を行う各関連ガイドライン試験法においても、甲状腺ホルモン関連指標の検討が追加された。しかしこれら関連指標の変動と化学物質の児動物における毒性学的意義、特に発達神経毒性（DNT）については不明な点が数多く取り残されている。化学物質曝露により誘導される妊娠期の甲状腺機能関連指標の変動をリスク評価に生かすためには、DNT評価等の次世代影響を効果的に進めるための新たな技術を導入し、母体の甲状腺機能関連指標の変動と毒性との関係を明確にすることで、学術的基盤を堅固なものにする必要がある。

今年度は、甲状腺機能低下によって誘導されるDNT評価を効果的に進めるために、神経細胞の分化状態を非侵襲的にトレースできることが期待されるSyn-RepマウスのDNT研究における有用性を検証するとともに、Syn-Repマウスを用いて妊娠中に甲状腺機能低下を誘導した際の次世代影響について検討を試みた。また得られたデータを効果的に化学物質リスク管理に繋げるためには、甲状腺機能低下の影響を*in vitro*で評価できるアッセイ系を構築することが重要である。そこで今年度は、甲状腺機能低下モデルのヒトiPS細胞の作製を行い、DNT陽性対照物質を曝露した際の影響を検証することで、甲状腺機能低下モデル細胞として有用性を検討した。

その結果、今年度は以下のことを明かにした。

- Syn-Repマウスのレポーター分子は、脳の高次機能に関わる部位に存在する神経細胞特異的に発現していた。またその発現プロファイルは出生前から発現し始め、出生後4日～1週間でピークを迎えた後に急激に減少し、離乳期以降は低いレベルで定常状態となった。さらにこのレポーター分子の発現は*in vivo*イメージングにより定量的に検出することが可能であった。以上から、Syn-Repマウスのレポーター分子をトレースすることで、非侵襲的に神経細胞の分化状態を検証できる可能性が示された。
- DNT陽性対照物質であるバルプロ酸を用い、DNTが誘導される条件で妊娠期のSyn-Repマウスに投与したところ、児動物脳のレポーター分子の発現量が有意に低下した。またレポーター分子の発現量は成熟期脳の神経細胞数と平行であったことから、レポーター分子を*in vivo*イメージングでトレースすることで非侵襲的にDNTを評価できる可能性が示された。
- マウスにおける妊娠期甲状腺機能低下にはラットで有効性が確認されているプロピルチオウラシル（PTU）の混餌投与系が望ましい可能性が示唆された。またPTUを妊娠期のSyn-Repマウスに投与して妊娠期甲状腺機能低下を誘導したところ、児動物脳においてレポーター分子の発現上昇が認められ、ヒトで報告されている児のIQ低下を反映したものである可能性が示唆された。
- 甲状腺ホルモン受容体 α をノックダウンしたヒトiPS細胞は、甲状腺機能低下時における化学物質の発達神経毒性を評価できる有効なモデルとなる可能性が示唆された

以上より、Syn-RepマウスおよびヒトiPS細胞を用いた*in vitro*系を組み合わせることで、妊娠期の甲状腺機能低下時やDNT陽性対照物質の脳神経系構築への影響評価やメカニズム解明を効果的に行うことができる可能性が示された。

今後はSyn-Repマウスを用いて、妊娠中に甲状腺機能を低下させた際の、脳神経系構築への影響を解明すると共に、各種行動試験との紐付けを行うことで、妊娠母体の甲状腺関連指標の変動と脳神経ネットワークの形成不全との因果関係（Adverse Outcome Pathway：AOP）の解明を試みる。最終的には国際標準となりうるガイドライン試験のためのエンドポイントの同定に繋がりたいと考えている。また*in vivo*実験で得られた結果を基に、ヒトiPS細胞などを用いた*in vitro*試験でも用いることが可能な有効なマーカー分子を見出し、これを用いた*in vitro*評価法の構築を目指す予定である。

分担研究者

諫田泰成	国立医薬品食品衛生研究所・部長
田熊一敬	大阪大学 大学院歯学研究科・教授
松丸大輔	岐阜薬科大学 薬学部・講師
村嶋亜紀	岩手医科大学 医学部・助教

A. 研究目的

ヒトでは妊娠初期における胎児の甲状腺ホルモンが母親からの供給に 100%依存していることから、妊娠期における甲状腺機能低下は、妊娠維持や出生後の児の発育に影響が及ぶ可能性が懸念されている。現在のところ、児の出生時体重の異常や周産期死亡率の頻度の上昇との因果関係については賛否が分かれているが、児の脳の発達については母体の甲状腺刺激ホルモン (TSH) の上昇を伴うトリヨードチロニン (T3) /チロキシン (T4) の低下と IQ 低下との間に明確な相関がみられることが大規模疫学調査から明らかとなっている。このような背景を踏まえ、妊娠期間中に母親の甲状腺機能低下を引き起こす化学物質のヒトに対するリスクをより厳密に評価するために、2018 年に既存の OECD ガイドライン試験において甲状腺ホルモン関連指標の検討が追加された。また甲状腺に対する何らかの影響が観察された化合物について発達神経毒性 (DNT) 試験実施の必要性を判断するために、Comparative Thyroid Assay (CTA) という新たな *in vivo* 試験法が提案され、試験実施の trigger やこれらの試験で得られるデータの解釈について、各国のリスク評価当局者による議論や意見交換が続いているのが現状である。しかし、母動物の甲状腺機能関連指標の変動と発達期における脳神経系への影響 (発達神経毒性: DNT) との詳細な因果関係が不明であることから、追加された検討項目に関する毒性学的意義については不明な点が数多く取り残されている。特に脳神経系の毒性に関しては、一般的な毒性評価には有効とされている病理組織学的解析での判定が極めて困難であると

いう問題がある。したがって、妊娠期の化学物質曝露により誘導される甲状腺機能関連指標の変動をリスク評価に生かすためには、DNT 評価の困難性を含む諸問題をブレイクスルーできる新たな技術を導入し、母体の甲状腺機能関連指標の変動と次世代影響との関係に関する学術的基盤を堅固なものにする必要がある。

我々は化学物質によって誘導される次世代影響の中でも最も評価が難しい項目の一つである DNT の評価やその作用メカニズム解明を効率よく行うために、成熟神経細胞のマーカーとして神経細胞分化の最終段階であるシナプス構築ステージにおいて発現するシナプシン 1 (Syn1) に着目し、Syn1 プロモーターの下流にルシフェラーゼ (Luc2) と LacZ の融合遺伝子をレポーター遺伝子に有するトランスジェニックマウス (Syn-Rep マウス) を独自に開発した。このマウスでは、成熟神経細胞のシナプス形成への影響 (Key Event: KE) を *in vivo* イメージングにより非侵襲的にトレースできることが期待され、また同一個体で行動試験 (Adverse Outcome: AO) までを行うことができる利点を有する。すなわち同一個体で時間軸の異なる Key Event (KE) と AO を直接紐付けることが期待される。

一方で、得られたデータを効果的に化学物質リスク管理に繋げるためには、甲状腺機能低下の影響を *in vitro* で評価できるアッセイ系を構築することが重要である。このようなアッセイ系の構築は、化学物質の影響をメカニズムベースで解析できるのみならず、3Rs の促進にもつながることが期待される。このような背景のもと、ヒト iPS 細胞はヒト発生過程を *in vitro* で模倣できることから、化学物質の神経毒性を検出できることが示唆されているため、甲状腺機能低下症に認められる化学物質影響にも応用できる可能性がある。

そこで本研究では、甲状腺機能低下によって誘導される DNT 評価を効果的に進めるツールとして期待される Syn-Rep マウスの

DNT 評価における有用性を、DNT 陽性対照物質のリストから選定したバルプロ酸 (VPA) を用いて検証することと共に、このマウスを用いて妊娠中に甲状腺機能低下を誘導した際の次世代影響について検討を試みた。また甲状腺機能低下モデルのヒト iPS 細胞の作製を行い、VPA をモデル化合物として曝露した際の影響を検証することで、甲状腺機能低下モデル細胞として有用性を検討した。

B. 研究方法 (図表については、各分担研究報告書の該当ページのもの参照されたい。)

1. 動物

実験には ICR 系の妊娠マウス、ならびに雄性 Syn-Rep マウスと野生型雌性 ICR マウスを交配することで得られた妊娠マウスを用いた。動物実験の実施に関しては、岐阜薬科大学・大阪大学において遺伝子組換え実験および動物実験に関する承認を得て行った。また動物実験における動物保護および倫理指針を遵守し、わが国における「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律」(法律第 68 号・平成 18 年 6 月 1 日施行) また WHO の医学研究顧問委員会の勧告に基づく「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則」に準拠して以後の実験を行った。各臓器の摘出は、イソフルランガス麻酔を用いて安楽死をさせた後に行った。

2. in vitro ルシフェラーゼアッセイ

Syn-Rep マウスを安楽死させた後に各臓器を摘出した。ホモジナイズ処理後、上清を回収した。黒色の 96 穴プレートに上清を添加し、これに D-luciferin 緩衝液を添加後、60 秒以内に IVIS Lumina II (住商ファーマ) にて測定をした。サンプルの発光量からブランクの発光量を引き、タンパク質 1 μg 量当たりのルシフェラーゼ活性 (photons/second/ μg protein) を算出した。

3. 組織学的解析

脳における LacZ 活性を指標にしたレポーターの発現部位の同定は、X-gal 染色法により行った。摘出した脳を 2 mm の厚さでトリミングし、前固定液中で振盪した。PBS で洗浄後、X-gal 染色用発色液中で振盪した。室温で 2 日間、4% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク) で後固定後、実体顕微鏡 (ライカ) にて観察した。

また脳の組織形態学的変化は、8 週齢での Nissl 染色法により解析した。被験マウスをリン酸緩衝液の全身灌流により脱血後、4% パラホルムアルデヒドで組織を固定した。全脳をパラフィン包埋し、厚さ 5 μm の冠状切片を作製した。切片を MAS coating slide glass に貼付し、洗浄および浸漬した後、0.1% クレシルバイオレット溶液で 10 分染色した。染色切片を洗浄および脱水した後、封入し、Nissl 陽性細胞数を測定した。

4. in vivo イメージング解析

発達期 (4~22 日齢、以後 P4~P22) または 4 週齢および 8 週齢において、経時的に *in vivo* イメージングを行った。*in vivo* イメージングを行う際には、児の成長の不均一性を排除するために OECD ガイドラインに準じて、出生後に得られた児動物を P4 時に 1 匹の母体から合計 8 匹 (雌 4 匹・雄 4 匹) となるように間引きを行った。2% イソフルランガスで麻酔後、D-luciferin 溶液を 10 mL/kg 体重で腹腔内に投与した。D-luciferin 投与直後から、25 分後までの頭部の発光量を背中側から 1 分毎に連続測定した。発光量測定には IVIS Lumina II (住商ファーマ、東京) を使用した。各日齢における発光量の変化を表したグラフには、連続測定で得られたデータのうち発光量がピークを示した時点の値を使用した。得られたデータについて Living Image (住商ファーマ) を用いて解析し、頭部の発光強度を Total flux (photon/second) として定量化した。

5. 抗甲状腺薬の投与

プロピオチオウラシル (PTU: 6-プロピル-2-チオウラシル、Sigma-Aldrich #P3755) 混餌投与は、PTU を完全調整食の AIN-93M (日本クレア) に 10 ppm (w/w) となるように混餌し、妊娠 Syn-Rep マウスに E6.5 より自由摂取させることで行なった。児動物の出生後も母動物に PTU 混餌食を継続して与えた。P13~P21 の期間は児動物の摂食も始まるため、混餌食の PTU 濃度を 5 ppm (w/w) に変更した (P49、図 5A)。出生後、得られた児動物については、児の成長の不均一性を排除するために OECD ガイドラインに準じて、P4 において 1 匹の母体から合計 8 匹 (雌 4 匹・雄 4 匹) となるように間引きを行った。

6. 行動薬理学的解析

児動物の行動解析は生後 8 週齢で実施した。自発行動変化は、オープンフィールド試験により評価した。透明なアクリル板と黒色プレキシガラス製の床からなるオープンフィールド装置 (45 cm × 45 cm × 30 cm, 床敷き無し) に被験マウスを入れ、この新奇環境における移動距離、立ち上がり回数、中央付近の区画を横切った回数を Acti-Track System (Panlab) を用いて 90 分間測定した。

社会性行動変化は、社会性相互作用試験により評価した。被験マウス (resident マウス) を新たな透明ポリカーボネート製ケージ (38 × 22 × 20 cm) 内で 60 分馴化させた後、異なるケージで飼育した同性同系統かつ体重が同程度の侵入マウス (intruder マウス) を入れ、被験マウスの侵入マウスに対する行動を観察した。嗅覚行動 (face sniff および anogenital sniff)、毛づくろい行動 (上体を起こし前肢あるいは鼻を侵入マウスに接触させる行動)、ならびに攻撃行動 (biting、pushing under、sideways posturing および aggressive grooming) を社会性行動の指標として、各行動の総時間を計測した。行動試験はいずれも明期 (8:00~20:00) に行った。

7. 細胞実験

ヒト iPS 細胞株 253G1 [Nakagawa et al., *Nat.*

Biotechnol., 2008] は、TeSR-E8 培地 (Stem Cell Technologies) にてフィーダーフリー [マトリゲル (BD Biosciences) コート] の条件で培養した。外胚葉への分化は Dual smad 阻害法 [Chambers et al., *Nat. Biotechnol.*, 2009] に従い、BMP シグナル阻害剤 LDN193189 (Wako) 及び Activin シグナル阻害剤 SB431542 (Wako) を用いてヒト iPS 細胞を 4 日間培養した。ノックダウン細胞は、shRNA をレンチウイルス (SIGMA) で導入することで作製した。ヒト iPS 細胞にウイルスを moi 1 で感染させた。さらに 24 時間後にピューロマイシンを添加して感染細胞のセレクションを行った。

8. 統計学的解析

データは全て「平均値±標準誤差」で表し、統計学的処理には解析ソフト SPSS 15.0J for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) もしくは Prism 9 for Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いた。対応のない t 検定を行い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

C. 研究結果 (図表については、各分担研究報告書の該当ページのもの参照されたい。)

1. Syn-Rep マウスにおける Luc2 発現の検討

Syn-Rep マウスのレポーター遺伝子には、Luc2 と LacZ 遺伝子を用いているが、*in vivo* イメージングを行うには定常状態における Luc2 の発現状態が重要になってくる。そこで本項では、まず各臓器における Luc2 の発現パターンについて解析を行った (P17、図 1)。

その結果、成体マウスでは雌雄ともに、大脳皮質前部、大脳皮質後部で非常に強い活性が認められた。また線条体、海馬で大脳皮質の半分程度の活性が認められ、雄においては精巣で線条体や海馬と同程度の活性が認められた。

2. 出生直前から離乳期脳の各部位における Luc2 発現の経時変化

出生直前から離乳期にかけての Luc2 の発現状況を検討するために、胎齢 18.5 日 (E18.5) および P4、P7、P13、P22 と 11 週齢以降の各

脳部位についてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、雌雄共に P4 および P7 の大脳皮質前部、大脳皮質後部で最も高い発現が認められた (P18、図 2A-D)。またその経時的な発現変動は、E18.5 から P7 にかけて上昇し、その後急激に発現が低下するパターンを示した (P18、図 2A, B)。さらに線条体、海馬においても大脳皮質の 1/3~1/4 程度の活性が認められた。雌雄間で Luc2 の発現に特段の差は認められず、経時的な発現変動も P4~P13 で発現のピークを迎え、その後発現が低下するパターンを示した。

Luc2 と同時に発現するもう一つのレポーター分子である LacZ の発現について、脳スライスを X-gal 染色することで解析を行ったところ、Luc2 の発現パターンと同様の傾向が認められた。

3. 発達期の脳における *in vivo* イメージングの検討

次に発達期の脳を対象にした *in vivo* イメージングを行った。その結果、雌雄ともに P4 を最大値としてその後 P13 にかけて急激に減少し、P13 から P22 にかけては緩やかに減少した (P20、図 4)。また、発達期脳の発光パターンは定常状態では性差が無いことも明らかとなった。発達期脳におけるこれらの発光の経時変化のパターンは、先に示した脳の各構成部位における Luc2 活性の経時変化のパターンや脳スライスを用いた X-gal 染色の結果と一致するものであった。

4. 胎生期 VPA 曝露に対する SynRep マウスのレポーター応答性の検証

SynRep マウスを用いて、E12.5 に VPA を投与した雌雄児動物の影響について解析を行った。体重増加に関して、一部の日齢で有意差な低下が認められたものの、出生後から 8 週齢までの期間全体を通して VPA 曝露による顕著な影響は認められなかった。この条件下で発達期の脳を対象にした *in vivo* イメージングを行ったところ、VPA 曝露群では対照群と比較して、P4~P13 におけるレポーター

の発現が有意に低下した (P32、図 2 A, B)。またこの傾向は雌雄ともに確認された。

また 8 週齢時の児動物の脳 (図 3 A: Bregma +1.94 mm の領域) の組織学的解析を行った。その結果、VPA 曝露群で前頭前皮質の上層 (II/III 層) における神経細胞数の有意な減少が確認された (P33、図 3 B, C)。このときの前頭前皮質の Luc2 活性についても検討したところ、対照群と比べて有意に低下していた (P33、図 3 D)。

5. 胎生期 VPA 曝露を受けた児動物の行動薬理学的解析

この投与条件における VPA の児動物への影響について行動薬理学的解析を行った。新奇環境下での自発運動に及ぼす VPA 曝露の影響をオープンフィールド試験により検討した (P35、図 5)。VPA 曝露群では、生後 8 週齢において、経時的な移動距離、総移動距離および立ち上がり回数が対照群と比べて有意に減少していた。また児動物の社会性行動に及ぼす影響を社会的相互作用試験により検討した (P37、図 7)。VPA 曝露群では、8 週齢において、対照群と比べて初めて遭遇した intruder マウスに対する嗅覚行動時間が有意に減少していた (P37、図 7A)。また、VPA 曝露群では毛づくろい行動 (P37、図 7B) および攻撃行動 (P37、図 7C) は有意ではないものの、増加傾向が認められた。

6. 抗甲状腺薬を用いた妊娠期甲状腺機能低下時における SynRep マウスのレポーター応答性の検証

抗甲状腺薬を用いて、妊娠期に甲状腺機能低下を誘導した際の SynRep マウスの応答性の検証を行った。最近、ラットを用いた検討で PTU を混餌投与することで TSH の上昇を伴う T3/T4 の低下状態を再現できることが報告された [須藤英典ら、第 48 回日本毒理学学会学術年会]。そこで本検討では、この条件下で甲状腺機能低下の誘導ができることを期待して、SynRep マウスの *in vivo* イメージング解析を行った。

膾プラグを確認した母動物に E6.5 より 10 ppm PTU 混餌投与を行なったところ、妊娠期の母動物体重増加は対照群よりも有意に高かったが、授乳期においてはそのような傾向は観察されなかった (P49、図 5B)。母動物の摂餌量に関しては、妊娠期、授乳期ともに特段の影響は認められなかった (P49、図 5C)。一方で児動物では、雌雄共に PTU 投与群で体重が有意に小さかった (P50、図 6A)。またこのような児動物の脳における *in vivo* イメージング解析では、雌雄共にレポーター遺伝子の発現が高くなる傾向が認められ、特に P4~P7 については有意な上昇が観察された (P50、図 6B)。

7. ヒト iPS 細胞を用いた甲状腺機能低下モデルの作製と VPA 曝露時の影響の検証

ヒト iPS 細胞を用いて、甲状腺機能低下モデル細胞の構築を試みた。未分化のヒト iPS 細胞には甲状腺ホルモン受容体 (THR) α と β の両方のアイソフォームが発現していることを qPCR で確認した。またこの細胞を神経分化へと分化させた際の THR α 、 β の発現変化を調べたところ、THR α のみ発現亢進が観察された

そこで次に shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて THR α のノックダウンを行った。qPCR を行って発現量を確認した結果、scramble control を導入した細胞に比べて THR α が約 93% ノックダウンされた細胞を得ることができた。

さらに THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞に VPA を曝露 (100 μ M) し、神経 (外胚葉) 分化能に対する影響を調べた。ヒト iPS 細胞の神経分化時に VPA を曝露したところ、分化マーカーである PAX6 の発現はわずかに減少した (P58、図 5, left panel)。一方、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に VPA を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて分化マーカーである PAX6 の発現が約 64% 抑制された (P58、図 5, right panel)。したがって、THR α は VPA の発達神経毒性に関与している可能性が考

えられた。

以上より、甲状腺機能低下症のモデルとして THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞が有用である可能性が示唆された。

D. 考察 (図表については、各分担研究報告書の該当ページのもの参照されたい。)

1. SynRep マウスの基礎データの収集について

本研究で用いる SynRep マウスは、神経細胞の分化マーカーとして汎用されており、神経細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスでもよく用いられている Syn1 プロモーター下にレポーター遺伝子として、V5 タグ付き Luc2 と LacZ を自己融解ペプチドで連結させたものを搭載している。今年度は、Syn-Rep マウスを DNT 評価に活用する前に、レポーターの発現に関する Characterization を行った。

その結果、脳で高い Luc2 発現を有することが確認できた。ただ雄においては精巣でも発現が認められた。これまでも Syn1 プロモーター制御下でクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT、以後 Syn1-CAT マウス) や Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスが作製されているが、マウスにおいても脳以外にも脊髄や精巣での発現が認められていたことが報告されている。今回、Syn-Rep マウスの雄において精巣での高い発現が確認されたが、過去の報告においても精巣で発現が認められるマウスラインが存在しており、Syn1 プロモーターを用いて作製したトランスジェニックマウスに認められる普遍的な傾向と考えられる。この結果は Syn-Rep マウスが脳特異的な影響を検出できるツールとなることを示しており、今回の研究目的を達成する上で有用である可能性を示している。

また脳についてはレポーターの発現時期についても詳細な検討を行った。その結果、Luc2 および LacZ の発現は出生前から認められ、P4~P7 でピークを迎えた後に、急激に減少することが明らかとなった (P20、図 4)。

脳の部位別の検討においては、大脳皮質での発現が非常に高く、海馬、線条体、視床下部でも高い発現が認められたが、いずれの部位においても離乳期までに発現がかなり衰退するパターンを示した。Syn1-CAT マウスにおいても同じような発現のパターンであることが報告されていることから、SynRep マウスにおけるレポーター分子の発現制御に問題はないと考えられた。

さらに SynRep マウスの発達期の脳に対する *in vivo* イメージングでは、大脳皮質をはじめとする脳の各構成部位におけるルシフェラーゼアッセイの結果を反映して、良好に検出することができた。またこれらの発光の経時変化のパターンは、ルシフェラーゼアッセイの経時変化のパターンと一致するものであったことから、発達期の脳を対象とした生体 *in vivo* イメージングは、組織レベルでのレポーターアッセイの結果を反映したものであるとともに、レポーター分子をトレースすることで成熟神経細胞の形成を非侵襲的に検出できる可能性が示された。

2. VPA を用いたレポーターマウスの有用性の検証

得られた Syn-Rep マウスの基礎データを基に、DNT 評価における SynRep マウスの有用性を妊娠期に VPA を投与する DNT モデルで検証を行った。その結果、VPA 曝露群では P4~P13 で *in vivo* イメージングにおける発光が有意に低下したことから、VPA 曝露が脳神経系に影響を及ぼす時期は P4~P13 である可能性が Syn-Rep マウスを用いることで確認できた。また VPA 曝露群では 8 週齢の児動物の前頭前皮質において神経細胞数の有意な減少が確認されたことに加えて、Luc2 活性も有意に低下していたことから、この時期においてもレポーター分子は神経細胞の構築状態を反映した指標となりうることを確認された。

さらに今回用いた条件下での胎生期 VPA 曝露は、雌雄児動物の自発運動量の低下、雄の児動物においては ASD 様の社会性行動異

常を誘導した。また本総括研究報告書では触れていないが、雌雄児動物の不安行動の増加、学習記憶能の低下も観察されたことから、レポーター遺伝子の発現変動が行動異常を捉える指標となる可能性が示された。

Syn-Rep マウスのレポーター分子はシナプス構築タンパク質 Syn1 のプロモーターで発現制御されていることから、VPA 曝露による頭部発光の低下はシナプス構築状態の異常を反映していると考えられる。一方でヒトにおいても ASD をはじめとする神経発達症においては、発達期のシナプス構築状態が異常な経時変化パターンを示すことが知られている。このことから Syn-Rep マウスのレポーター分子の発現パターンの経時的モニタリングは、妊娠期の甲状腺機能低下による脳への影響のみならず、神経発達症の様々な候補遺伝子の影響の検証にも応用可能である可能性が考えられた。しかしその一方で化学物質による DNT や神経発達症の発症メカニズムは非常に複雑で決して単一の経路で誘導されるものではない。今後は SynRep マウスが様々な誘導メカニズムの DNT や神経発達症にも対応可能であるのかを検証して行く必要があると考えられる。このような観点から、次年度以降も、DNT 陽性対照化学物質である鉛やクロルピリホスについても検討を行っていく予定である。

3. 抗甲状腺薬を用いた甲状腺機能低下条件の検証

マウスにおける抗甲状腺薬を用いた妊娠期甲状腺機能低下の誘導は、チアマゾール (MMI) を用いた飲水投与が報告されているため、当初はこの系を用いて検討を行う予定であった。しかし MMI には極度の苦味があるために、MMI 投与群では飲水量が対照群の半分程度にまで減少するという問題が起こった。このように飲水量に影響が及ぶと投与量を予測することが難しい上に、用量依存性の検討も難しくなることから、投与系の変更を行った。

最近、ラットを用いた検討で PTU を混餌

投与することで TSH の上昇を伴う T3/T4 の低下を誘導することが報告された [須藤英典ら、第 48 回日本毒性学会学術年会]。ことから、マウスにおいてもこの条件で甲状腺機能低下の誘導ができることを期待して、この系を採用した。胎生期に PTU を曝露した児動物脳の *in vivo* イメージング解析を行ったところ、雌雄共に P4~P7 で有意な発光の上昇が確認された。したがって SynRep マウスは、妊娠期の甲状腺機能低下による児動物脳への影響を検出できる可能性が示された。一方で、PTU を曝露した児動物脳の *in vivo* イメージングの発光パターンは、DNT 陽性対照物質である VPA を曝露した結果（発光減少）とは対称的な結果となった。このことは、DNT に至るメカニズムが決して単一なものではなく、多様であることを支持していると考えられる。今後は、SynRep マウスを用いることで影響を受ける部位を同定し、これらの系の相違・類似性を、遺伝子発現や組織学的手法を用いて解析・整理する必要があると考えられる。

PTU は MMI よりも抗甲状腺作用は弱いとされているものの、本検討においては混餌投与した際の摂餌量に影響が認められなかった。このことから、PTU の混餌投与系の方が今後用量依存性等を検討するのにも適していることが示唆された。また PTU 混餌投与系は、ラットにおいても妊娠期の甲状腺機能低下を再現できることが明らかになっていることから、Syn-Rep マウスで得られた結果をラットに落とし込める可能性が期待される。さらに MMI 飲水投与系よりも投与期間が短いので、試験期間も短くて済む。これらの利点を考慮して今後は PTU 混餌投与の系を用いて、マウスにおける甲状腺関連指標の検討等を進めていくとともに、妊娠期甲状腺機能低下による次世代影響の詳細を検討する予定である。

4. ヒト iPS 細胞を用いた甲状腺機能低下モデルにおける VPA 曝露の影響

今年度は、THR α をノックダウンしたヒト

iPS 細胞を用いて、本研究班で共通の DNT 陽性対照物質として使用している VPA の影響を解析した。ATP 産生を指標とした解析では iPS 細胞、THR α ノックダウンした iPS 細胞において VPA に対する細胞応答には大きな違いは認められなかったが、神経分化を指標とした解析では THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞では、VPA による神経分化抑制が認められた。このことから、VPA によるヒト発達期の神経毒性に THR α が関与していることが示唆された。

THR には α と β のアイソフォームが存在しており、ノックアウトマウスを用いた研究では、THR α は神経発生に関係するが、脳における THR β はフェノタイプが認められていない (Krieger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2019)。また、分化誘導にともない THR α の発現が選択的に亢進したことから、今回は THR α を優先的に評価した。しかしながら、THR α と β の機能的な違いについては明らかにされておらず、甲状腺機能低下による子どもの影響を考慮する上でどちらがより重要であるのかは慎重に検討する必要がある。

今後は、鉛等の重金属やクロルピリホスを初めとする農薬など発生毒性や神経毒性が懸念されている他の化学物質に焦点を当てて同様に曝露影響の解析を行い、本モデルの有用性を明らかにしていく予定である。

E. 結論

1. Syn-Rep マウスは、妊娠期の甲状腺機能低下時や DNT 陽性対照物質の脳神経系構築への影響を非侵襲的に評価することができる、非常に有効なツールとなる可能性が示された。
2. PTU の混餌投与系を用いた妊娠期甲状腺機能低下モデルは、マウスにおいても甲状腺機能低下の影響を検討する上で有効である可能性が示された。
3. THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、甲状腺機能低下時における化学物質の発達神経毒性を評価できる有効なモ

デルとなる可能性が示唆された。

以上、Syn-Rep マウスおよびヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 系を組み合わせることで、妊娠期の甲状腺機能低下時や DNT 陽性対照物質の脳神経系構築への影響評価やメカニズム解明を効果的に行うことができる可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **中西 剛**：内分泌かく乱に起因する生殖発生毒性評価の問題点とその将来展望（総説），*ファルマシア* 58:44 (2022)

2. 学会発表

1. 今戸瑛二、浅野智志、中村庸輝、中島一恵、森岡徳光、津賀一弘、入船正浩、**田熊一徹**、吾郷由希夫：胎生期バルプロ酸投与マウスは熱刺激およびカプサイシン誘発痛の増大と機械的アロディニアを示す，第 139 回日本薬理学会近畿部会，

Web 開催，2021 年 6 月

2. 石田慶士、南川祥輝、森 一馬、**松丸大輔**、**中西 剛**：新規発達神経毒性評価系開発に向けた神経分化トレーサーマウスの解析，第 48 回日本毒性学会学術年会，神戸／Web，2021 年 7 月
3. 諫田泰成：インビトロ発達神経毒性評価法の現状と今後の課題，第 61 回日本先天異常学会学術集会シンポジウム、Web 開催、2021 年 8 月
4. 南川祥輝、石田慶士、森 一馬、辰巳佳乃子、**松丸大輔**、**田熊一徹**、**中西 剛**：神経分化トレーサーマウスを用いた新規発達神経毒性評価系の有用性検証，フォーラム 2021：衛生薬学・環境トキシコロジー，船橋／Web，2021 年 9 月
5. 諫田泰成、安彦行人：ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性評価法の現状と今後の展望、日本薬学会第 142 年会シンポジウム、Web 開催、2022 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

令和 3 年度 厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

Ⅱ. 分担研究報告書

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究
(21KD1004)

分担研究課題名：妊娠期の甲状腺ホルモン関連指標変動による次世代影響の検討

～SynRep マウスの基礎データの収集～

研究代表者：中西 剛（岐阜薬科大学 薬学部・教授）

研究分担者；村嶋 亜紀（岩手医科大学 医学部・助教）

研究要旨

近年、ヒトでは妊娠期の甲状腺機能低下が児の脳発達に悪影響を与えることが疫学調査により明らかとなった。このような背景を踏まえ、化学物質の毒性評価を行う各関連ガイドライン試験法においても、甲状腺ホルモン関連指標の検討が追加された。しかしこれら関連指標の変動と化学物質の児動物における毒性学的意義、特に発達神経毒性（DNT）については不明な点が数多く取り残されている。化学物質曝露により誘導される妊娠期の甲状腺機能関連指標の変動をリスク評価に生かすためには、DNT評価を効果的に進めるための新たな技術を導入し、母体の甲状腺機能関連指標の変動と毒性との関係を明確にすることで、学術的基盤を堅固なものにする必要がある。本分担研究では、甲状腺機能低下によって誘導されるDNT評価を効果的に進めるために、神経細胞の分化状態を非侵襲的にトレースできることが期待されるSyn-RepマウスのDNT研究における有用性を確認するための基礎データの収集を行った。成熟期の雌雄において大脳皮質等の脳高次機能を担う部位において高いレポーター遺伝子（Luc2）の発現が認められた。脳以外の組織については、雄の精巣において高いLuc2活性が認められたが、その他の臓器ではほとんど検出されなかった。脳におけるLuc2発現は雌雄共に出生直後にピークを迎え、日齢が進むとともに急激に低下した。また脳スライスをX-gal染色して、LacZ遺伝子の発現を確認したところ、LacZについてもLuc2と同様の発現パターンを示した。これらの結果から、Luc2およびLacZの発現パターンは、神経細胞の分化状態を反映したものである可能性を示さるとともに、Syn-Repマウスを用いた*in vivo*イメージングにより、発達期脳の神経細胞分化状態を非侵襲的にトレースできる可能性が示された。

A. 研究目的

近年の疫学調査により、ヒトでは妊娠初期における胎児脳の発達が母親から供給される甲状腺ホルモンに100%依存し、母体の甲状腺刺激ホルモン（TSH）の上昇を伴うトリヨードチロニン（T3）／チロキシン（T4）の低下と児のIQ低下との間に明確な相関がみられることが明らかとなってきている。また実験動物においても母体の甲状腺機能低下と児の行動発達の相関性に関する報告が散見される。このような背景を踏まえ、妊娠期間中に甲状腺機能低下を引き起こす化学物質のヒトに対するリスクをより厳密に評価するために、OECDガイドラインの実験動物を用いた各関連試験法において甲状腺ホルモン関連指標（TSH／T3／T4の血中濃度、

甲状腺の重量および病理組織学的評価）の検討が追加された。これは妊娠期間中に母体の甲状腺機能低下を引き起こす化合物のヒトに対するリスク、すなわち発達神経毒性（DNT）のリスクをより厳密に評価することを主たる目的としたものであると推察される。その一方で、追加された検討項目に関する毒性学的意義については不明な点が数多く取り残されている。さらに一般的な毒性評価には非常に有効とされている病理組織学的解析を用いても、脳神経系の毒性に関しては判定が極めて難しいという問題もある。我々は化学物質のDNT評価やその作用メカニズム解明を効率よく行うために、成熟神経細胞のマーカーとして神経細胞分化の最終段階であるシナプス構築ステージにおいて

発現する Syn1 に着目し、Syn1 プロモーターの下流にルシフェラーゼ (Luc2) と LacZ の融合遺伝子をレポーター遺伝子に有するトランスジェニックマウス (Syn-Rep マウス) を独自に開発した。このマウスでは、成熟神経細胞のシナプス形成への影響 (Key Event : KE) を *in vivo* イメージングにより非侵襲的にトレースできることが期待され、また同一個体で行動試験 (Adverse Outcome : AO) までを行うことができる利点を有する。すなわち同一個体で時間軸の異なる Key Event (KE) と AO を直接紐付けることが期待される。そこで本研究では、甲状腺機能低下によって誘導される DNT 評価を効果的に進めるツールとして期待される Syn-Rep マウスの DNT 評価における有用性について検証することを目的に、レポーター (Luc2 および LacZ) の発現に関する基礎データの収集を行った。

B. 研究方法

1. 動物

実験には ICR 系の妊娠マウス、ならびに雄性 Syn-Rep マウスと野生型雌性 ICR マウスを交配することで得られた妊娠マウスを用いた。動物実験の実施に関しては、岐阜薬科大学において遺伝子組換え実験および動物実験に関する承認を得て行った。また動物実験における動物保護および倫理指針を遵守し、わが国における「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律」(法律第 68 号・平成 18 年 6 月 1 日施行) また WHO の医学研究顧問委員会の勧告に基づく「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則」に準拠して以後の実験を行った。各臓器の摘出は、イソフルランガス麻酔を用いて安楽死をさせた後に行った。

2. *in vitro* ルシフェラーゼアッセイ

各臓器のルシフェラーゼアッセイは、Syn-Rep マウスを安楽死させた後に各臓器を摘出し、300 μ L のホモジナイズ緩衝液を加え、

ホモジナイズ処理した。4°C、15000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。黒色の 96 穴プレートに 10 μ L/well となるように上清を添加し、これに D-luciferin 緩衝液を 50 μ L/well で添加後、60 秒以内に IVIS Lumina II (住商ファーマ) にて測定をした。サンプルの発光量からブランクの発光量を引き、タンパク質 1 μ g 量当たりのルシフェラーゼ活性 (photons/second/ μ g protein) を算出した。

3. 組織学的解析

脳における LacZ 活性を指標にしたレポーターの発現部位の同定は、X-gal 染色法により行った。摘出した脳を 2 mm の厚さでトリミングし、4 °C で 60 分間、前固定液中で振盪した。PBS で洗浄後 (4°C 15 分間)、30 °C で 2 日間、X-gal 染色用発色液中で振盪した。室温で 2 日間、4% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク) で後固定後、実体顕微鏡 (ライカ) にて観察した。

4. *in vivo* イメージング解析

発達期 (4~22 日齢、以後 P4~P22) において経時的に *in vivo* イメージングを行った。*in vivo* イメージングを行う際には、児の成長の不均一性を排除するために OECD ガイドラインに準じて、出生後に得られた児動物を P4 時に 1 匹の母体から合計 8 匹 (雌 4 匹・雄 4 匹) となるように間引きを行った。2% イソフルランガスで麻酔後、D-luciferin 溶液を 10 mL/kg 体重で腹腔内に投与した。D-luciferin 投与直後から、25 分後までの頭部の発光量を背中側から 1 分毎に連続測定した。発光量測定には IVIS Lumina II (住商ファーマ) を使用した。各日齢における発光量の変化を表したグラフには、連続測定で得られたデータのうち発光量がピークを示した時点の値を使用した。得られたデータについて Living Image (住商ファーマ) を用いて解析し、頭部の発光強度を Total flux (photon/second) として定量化した。

C. 研究結果

1. 成体 Syn-Rep マウスの各臓器における Luc2 発現の検討

Syn-Rep マウスのレポーター遺伝子には、Luc2 と LacZ 遺伝子を用いているが、*in vivo* イメージングを行うには定常状態における Luc2 の発現状態が重要になってくる。そこで本項では、まず各臓器における Luc2 の発現パターンについて解析を行った。

F1 または F2 世代の雌雄仔マウスを用いて解析を行った (図 1)。9~10 週齢の各仔マウスの脳、胸腺、肺、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、膵臓、胃、大腸、小腸、脂肪、筋、下垂体、脊髄について Luc2 活性を測定した。また脳については、発現部位における詳細な情報を得るために視床下部、小脳、嗅球、海馬、線条体、大脳皮質前部、大脳皮質後部に分割して検討を行った。さらに雄においては精巣、精巣上体、精嚢を、雌においては子宮、卵巣についても検討を行った。その結果、雌雄ともに、大脳皮質前部、大脳皮質後部で非常に強い活性が認められた (図 1)。また線条体、海馬で大脳皮質の半分程度の活性が認められ、わずかではあるが胃と視床下部でも活性が確認された (図 1)。さらに雄においては精巣で線条体や海馬と同程度の活性が認められた (図 1B)。

2. 出生直前から離乳期脳各部位における Luc2 発現の経時変化

出生直前から離乳期にかけての Luc2 の発現状況を検討するために、E18.5 および P4、P7、P13、P22 と 11 週齢以降の各脳部位についてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、雌雄共に P4 および P7 の大脳皮質前部、大脳皮質後部で最も高い発現が認められた (図 2A-D)。またその経時的な発現変動は、E18.5 から P7 にかけて上昇し、その後急激に発現が低下するパターンを示した (図 2A, B)。それ以外の部位では、線条体、海馬においてピークで大脳皮質の 1/3~1/4 程度の活性が認められた。さらにわずかではあるが、視床下部と小脳でも活性が認められた。嗅球でも活性は認められたが、大脳皮質と比較す

るとごくわずかであった。大脳皮質以外の部位においても雌雄間に特段の差は認められず、経時的な発現変動も P4~P13 で発現のピークを迎え、その後発現が低下するパターンを示した。

3. 脳各部位における LacZ 発現の経時変化に関する組織学的解析

Syn-Rep マウスのレポーター遺伝子は、Luc2 遺伝子に加え LacZ 遺伝子をタンデムに発現するように設計されている。そこで Syn-Rep マウスの各時期の脳における LacZ の発現状態を検討し、今後の解析における有用性についての検証を行った。E11.5、E14.5、E18.5 日の胎仔と P5、P13、P15、P22 の児動物について脳スライスを作成し、X-gal 染色による解析を行った (図 3)。その結果、E11.5 においては染色が全く検出されず、E14.5 においても脊髄を中心にわずかに染色が認められる程度であった。一方で E18.5 では大脳皮質で強い染色が確認され、海馬周辺でも染色が確認された。さらに染色の強さは P5 でピークとなり、その後経日的に低下した。

4. 発達期の脳における *in vivo* イメージングの検討

次に発達期の脳を対象にした *in vivo* イメージングを行った。DNT 陽性化学物質の中にはその影響に雌雄差が存在するものが報告されているため、Syn-Rep マウスを用いた DNT 評価を行う場面を想定して、雌雄別に定常状態での評価を行った。その結果、雌雄ともに出生 4 日後 (P4) を最大値としてその後 P13 にかけて急激に減少し、P13 から P22 にかけては緩やかに減少した (図 4)。また、発達期脳の発光パターンは雌雄差が無いことも明らかとなった。発達期脳におけるこれらの発光の経時変化のパターンは、先に示した脳各構成部位における Luc2 活性の経時変化のパターンや脳スライスを用いた X-gal 染色の結果と一致するものであった。

5. 発達期の脳における *in vivo* イメージング

と体重との相関に関する検討

発達期における児の体重の不均一性は、毒性評価に影響を与える可能性が懸念される。また脳の *in vivo* イメージングにおいても、その結果が児の体重に影響を受ける可能性が考えられる。そこで本項では発達期の体重の差が *in vivo* イメージングの結果に与える影響を検証するために、*in vivo* イメージングの結果と体重との相関性について検討を加えた。P4 から P22 までの各日齢において、横軸には体重を、縦軸には *in vivo* イメージングにより得られた脳部位の発光量を示すグラフを作成し、相関性を表す R^2 値を算出した。その結果、雌雄別・雌雄混合のいずれのグラフにおいても R^2 値は低い値を示し、全ての日齢において体重と発光は相関が無いことが明らかとなった (図 5)。以上より、*in vivo* イメージングにおける脳の発光量は、体重に依存しないパラメーターであることが確認された。

D. 考察

本研究で用いる SynRep マウスは、神経細胞の分化マーカーとして汎用されており、神経細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスでもよく用いられている Syn1 プロモーター下にレポーター遺伝子として、V5 タグ付き Luc2 と LacZ を自己融解ペプチドで連結させたものを搭載している。今年度は、Syn-Rep マウスを DNT 評価に活用する前に、レポーターの発現に関する Characterization を行った。

その結果、脳で高い Luc2 発現を有することが確認できた。ただ雄においては精巣でも発現が認められた (図 2B)。用いるプロモーター領域は我々のものとは少し異なっているが、これまでも Syn1 プロモーター制御下でクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) や Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスが作製されている。これらのマウスにおいても大脳皮質や海馬、視床下部、扁桃体などの脳組織で導入遺伝子の発現が確認されている。ま

た脳以外にも脊髄や精巣での発現が認められるラインも存在していたと報告されている。今回、Syn-Rep マウスの雄において精巣での高い発現が確認されたが、過去の報告においても精巣で発現が認められるマウスラインが存在しており、Syn1 プロモーターを用いて作製したトランスジェニックマウスに認められる普遍的な傾向と考えられる。一方で過去の報告では脊髄での発現が認められていたが、Syn-Rep マウスでは発現が確認されなかった。この結果は Syn-Rep マウスが脳特異的な影響を検出できるツールとなることを示しており、今回の研究目的を達成する上で有用である可能性を示している。

また脳についてはレポーターの発現時期についても詳細な検討を行った。その結果、Luc2 の発現は出生前から認められ、P4~P7 でピークを迎えた後に、急激に減少することが明らかとなった (図 4)。脳の部位別の検討においては、大脳皮質での発現が非常に高く、海馬、線条体、視床下部でも高い発現が認められたが、いずれの部位においても離乳期までに発現が衰退するパターンを示した。Syn1 プロモーター制御下で CAT を発現するトランスジェニックマウスにおいても、頭部の CAT 活性を指標にレポーター遺伝子の発現の経時変化について検討されている。各マウスラインによって若干発現のパターンは異なるものの、いずれのマウスラインにおいても胎生期での活性はほとんど認められないが、出生後から少しずつ活性が認められ始め、P15~P20 当たりで発現のピークを迎えている。今回の結果は、概ね過去の報告と一致した発現のパターンとなったと考えられ、SynRep マウスにおけるレポーター分子の発現制御に問題はないと考えられた。

さらに LacZ 遺伝子の有用性を検討するために、胎生期および出生後の脳スライスについて X-gal 染色を行った。その結果、Luc2 活性と同様に大脳皮質周辺に強い染色像が認められるとともに、P5 で最も強い染色が認められ、その後は発現が減衰していく染色パターンを示した (図 3)。自己融解ペプチドを

用いて遺伝子を発現させると、理論的には1対1の割合で連結した分子が発現するとされているが、今回の結果でLuc2とLacZの発現がパラレルであったことから、Syn-Repマウスは当初の期待通りに遺伝子発現が制御できていると考えられた。

発達期の脳における*in vivo*イメージングは大脳皮質をはじめとする脳の各構成部位におけるルシフェラーゼアッセイの結果を反映して、良好に検出することができた。またこれらの発光の経時変化のパターンは、ルシフェラーゼアッセイの経時変化のパターンと一致するものであったことから、発達期の脳を対象とした生体*in vivo*イメージングは、組織レベルでのレポーターアッセイの結果を反映したものであるとともに、レポーター分子をトレースすることで成熟神経細胞の形成を非侵襲的に検出できる可能性が示された。

一方で本研究課題では*in vivo*イメージング解析の対象が出生後間もない児動物であるため、体重差や個体の大きさによる個体間のデータのバラツキが懸念される。特に毒性試験においては被験物質の投与による非特異的な影響も懸念されるため、個体の大きさや体重に*in vivo*イメージングの結果が左右されてしまうと、被験物質の脳に対する特異的な影響を検出できない可能性が懸念される。しかし今回の検討において、*in vivo*イメージングの結果と児動物の体重には全く相関が認められなかった(図5)。一般的に脳部位は他の部位と比較して成長しても大きさが変化しないと言われている。また生まれて間もない時期は、体重全体に占める脳の重量比も成獣よりも大きいことから、これがデータのバラツキを少なくしている可能性が考えられた。

生後発達期の神経系におけるシナプス形成は、出生直後に過剰に行われその数はピークを迎える。その後、環境や経験に依存して必要なシナプスは強められて残り、不要なシナプスは除去されることが知られている。この現象を「シナプス刈り込み」と呼び、機能

的で無駄の少ない神経回路を作るための基本的過程であると考えられている。最近、ヒトにおいても自閉スペクトラム症や統合失調症といった精神神経疾患とシナプス刈り込みの異常との関連が注目されている。Syn-Repマウスの脳の発光においても、出生直後をピークにピークを迎え、その後日齢に依存して減弱が認められたが、この減弱は「シナプス刈り込み」を反映したものである可能性が考えられる。このレポーター遺伝子の発現パターンが生理学的に何を意味するものなのかはさらなる精査が必要であるが、Syn-Repマウスにおいては神経細胞の分化のみならず、いわゆる「シナプス刈り込み」をも評価できるのかもしれない。

E. 結論

Syn-Repマウスは、妊娠期の甲状腺機能低下時やDNT陽性対象物質の脳神経系構築への影響を非侵襲的に評価することができる、非常に有効なツールとなる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. **中西 剛**：内分泌かく乱に起因する生殖発生毒性評価の問題点とその将来展望(総説), *ファルマシア* 58:44 (2022)

2. 学会発表

1. 石田慶士、南川祥輝、森 一馬、**松丸大輔**、**中西 剛**：新規発達神経毒性評価系開発に向けた神経分化トレーサーマウスの解析, 第48回日本毒性学会学術年会, 神戸/Web, 2021年7月
2. 南川祥輝、石田慶士、森 一馬、辰巳佳乃子、**松丸大輔**、**田熊一徹**、**中西 剛**：神経分化トレーサーマウスを用いた新規発達神経毒性評価系の有用性検証, フォーラム2021: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 船橋/Web, 2021年9月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

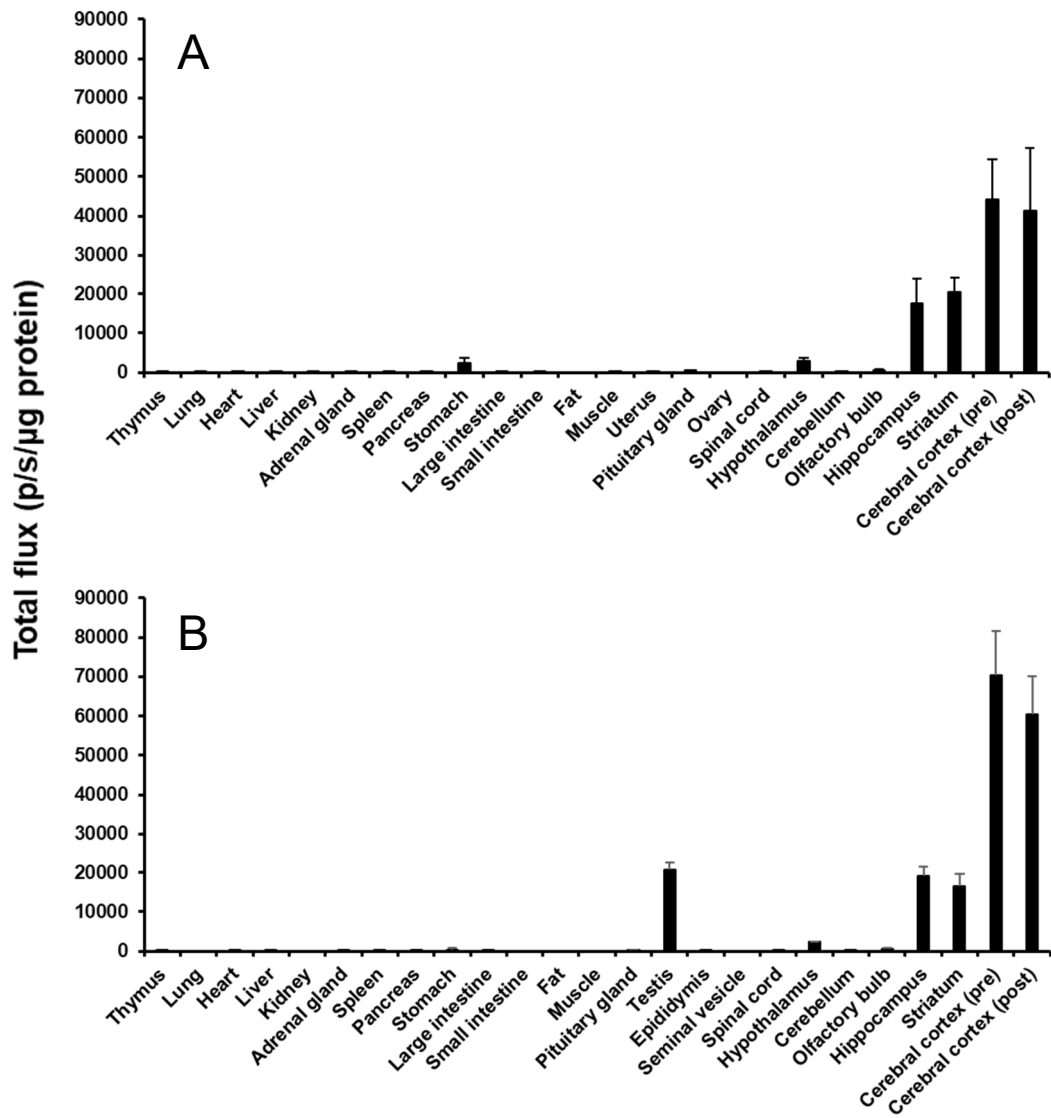


図1 Syn-Rep マウス雌 (A) および雄 (B) の各臓器における Luc2 活性
Data are expressed as mean \pm S.E.M (n=3)

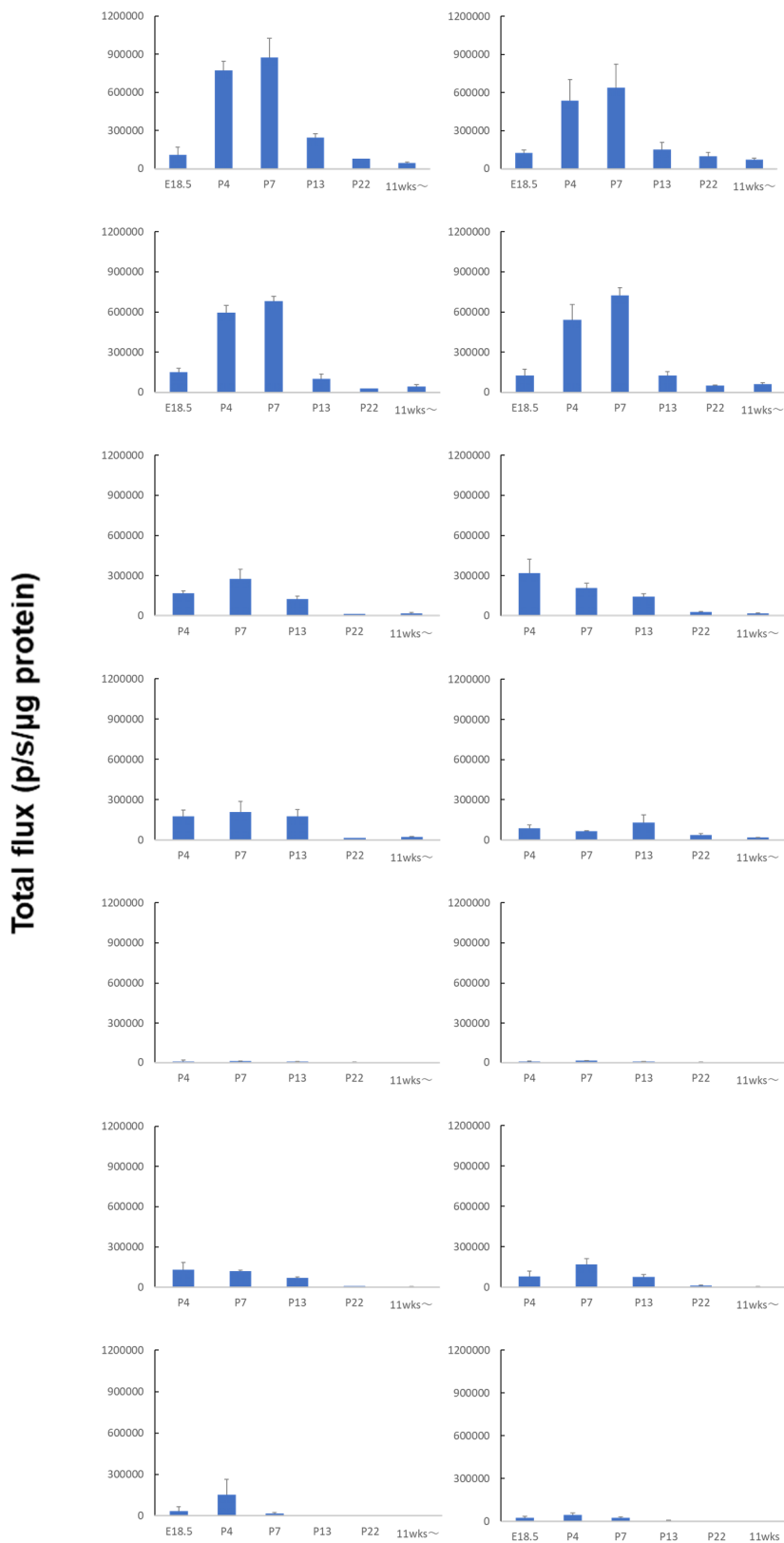


図2 Syn-Rep マウス (ライン#1) の出生直前から離乳期の脳における Luc2 活性
 雌 (A, C, E, G, I, K, M) および雄 (B, D, F, H, J, LN) の各時期における大脳皮質前部 (A, B)、大脳皮質後部 (C, D)、海馬 (E, F)、線条体 (G, H)、嗅球 (I, J)、視床下部 (K, L)、小脳 (M, N) の Luc2 活性を測定した。
 Data are expressed as mean \pm S.E.M (n=3-7)

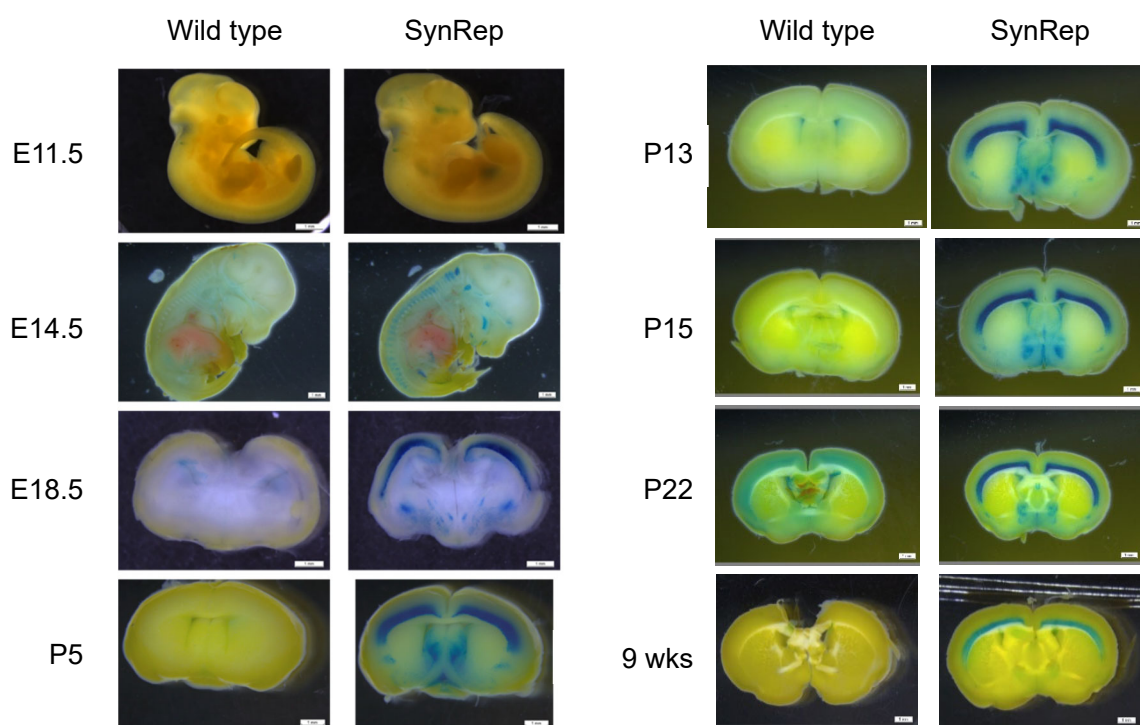


図3 X-gal 染色を用いた Syn-Rep マウスの脳における LacZ 発現の経時変化に関する組織学的解析

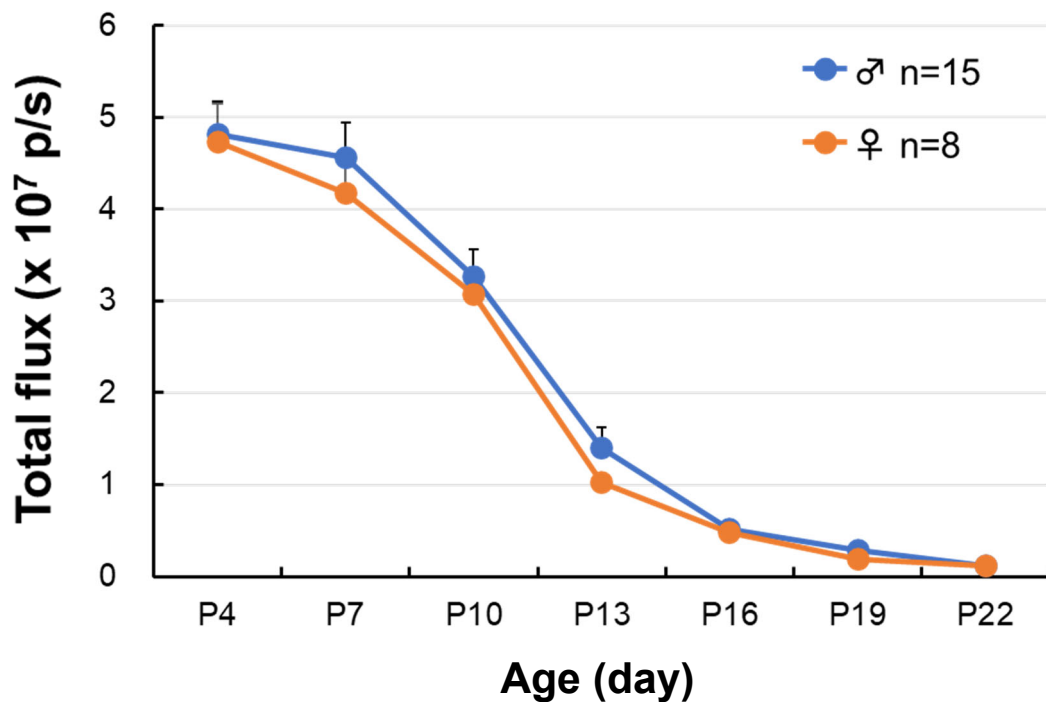
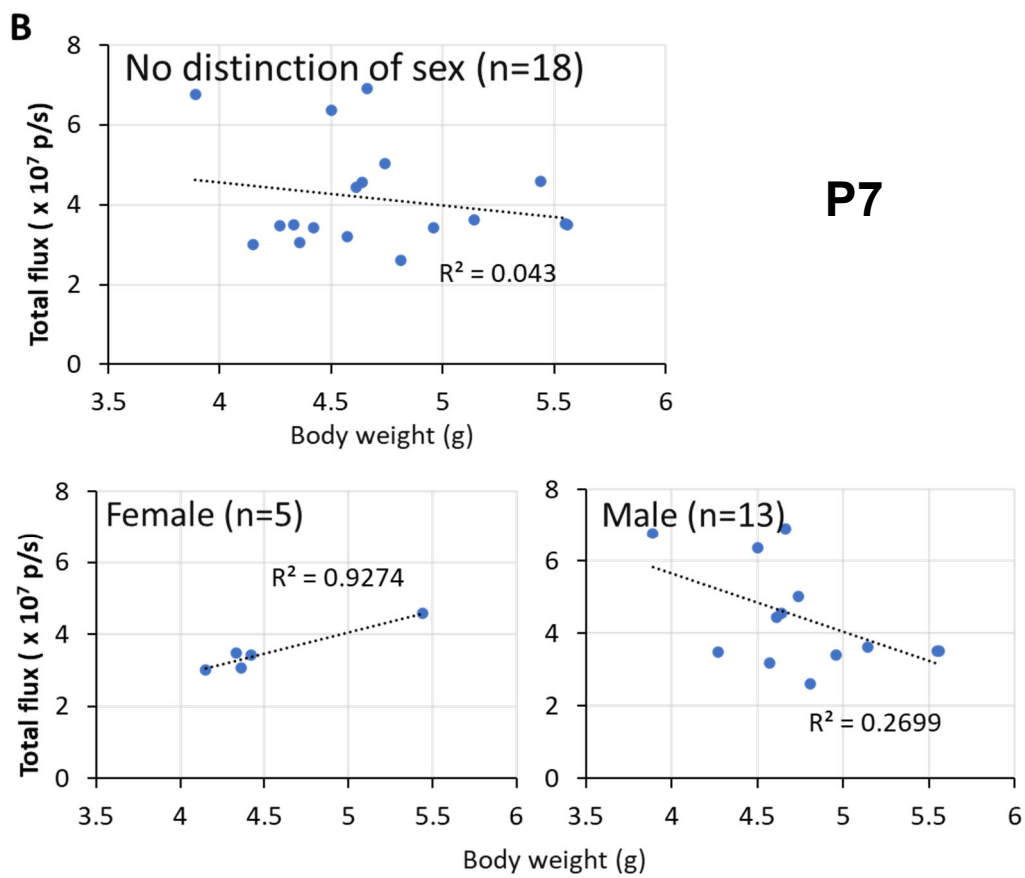
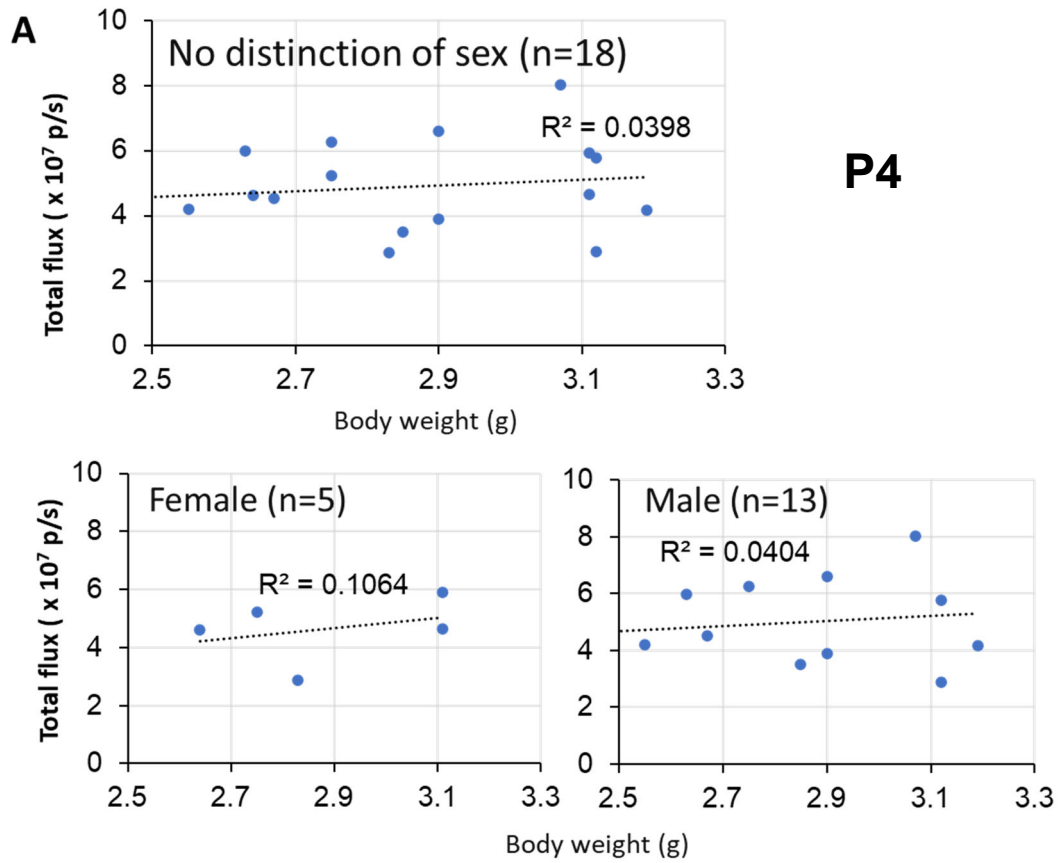


図4 雌雄 Syn-Rep マウスの発達期の頭部に対する *in vivo* イメージング解析

4 腹の母体から生まれた Syn-Rep マウスに対し、出生 4 日後 (P4) において児の数が 8 匹 (雌 4 匹/雄 4 匹) となるように間引きを行い、P4 から P22 における発達期の頭部に対する *in vivo* イメージングを行った。D-luciferin/PBS 溶液を i.p 投与直後から 1 分毎の連続測定を行い、発光量が頭打ちになるまでおよそ 25 分間測定を継続した。また得られたデータについて Living Image を用いて解析し、頭部の発光強度を Total flux として定量化した。また、連続測定で得られたデータのうち発光量がピークを示した時点の値を使用し、発達期の各日齢における発光量の変化を表した。Data are expressed as mean \pm S.E.M (n=8 - 13)



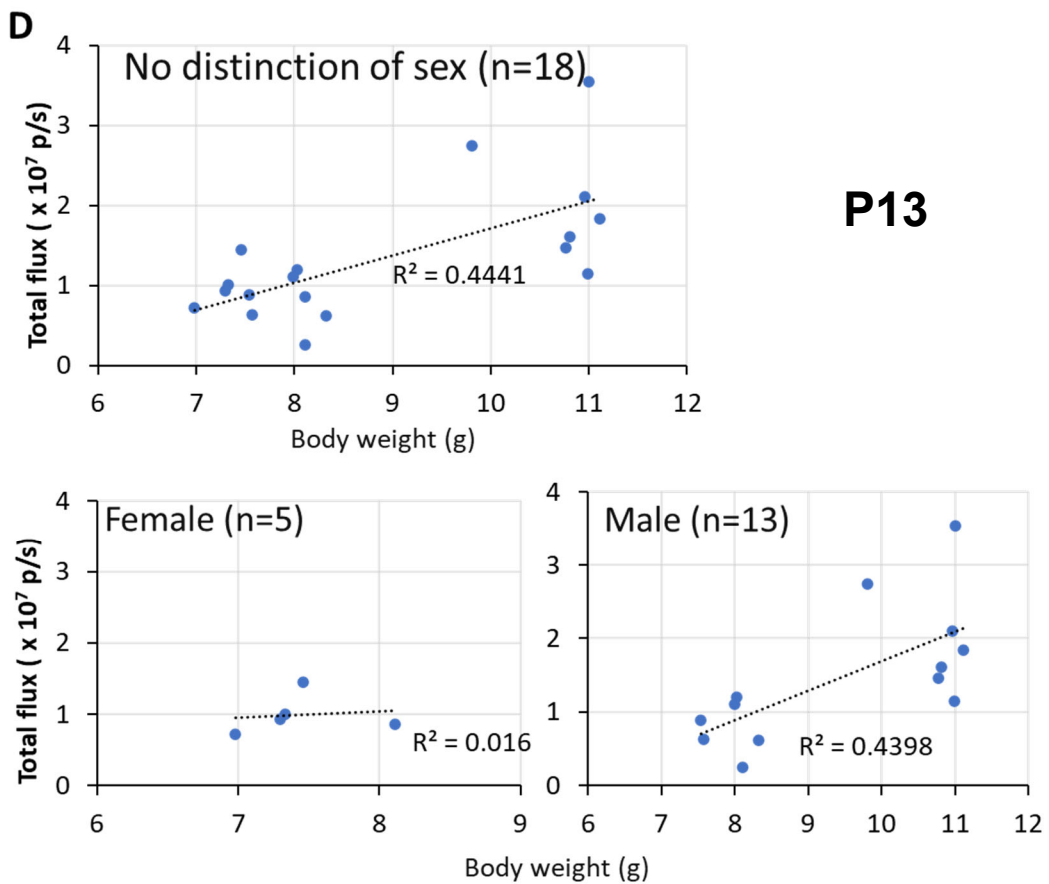
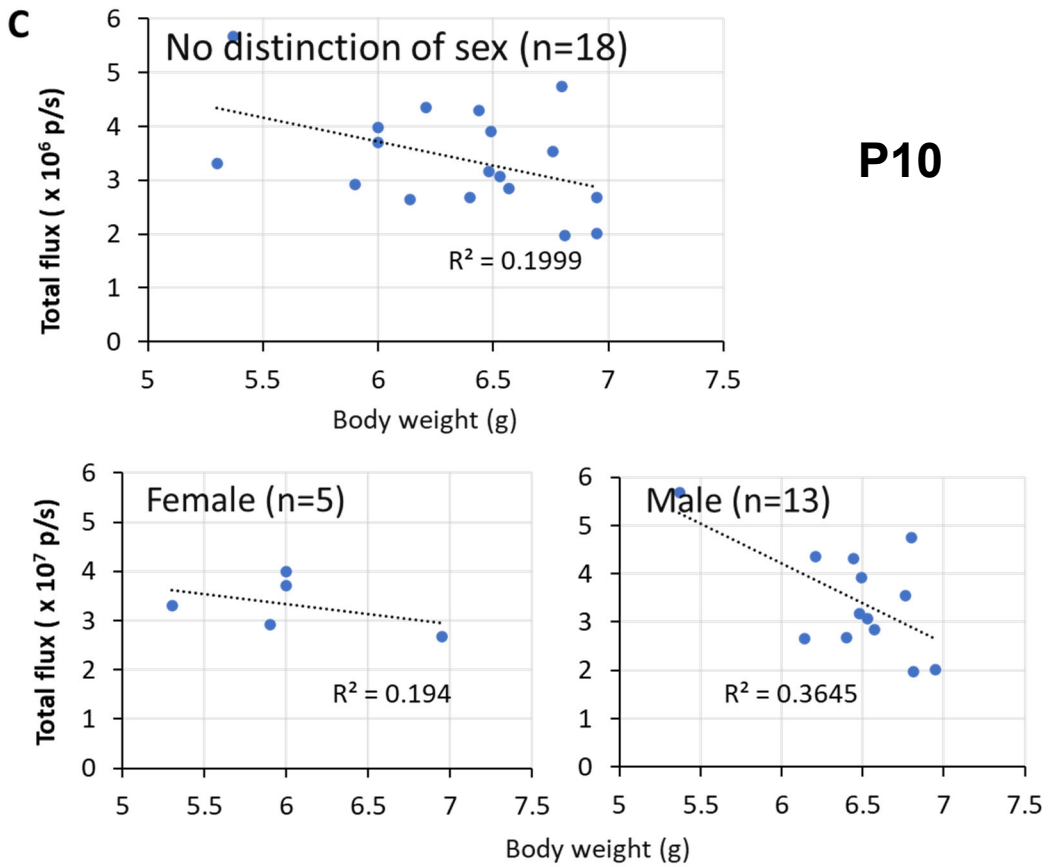


図5 続き

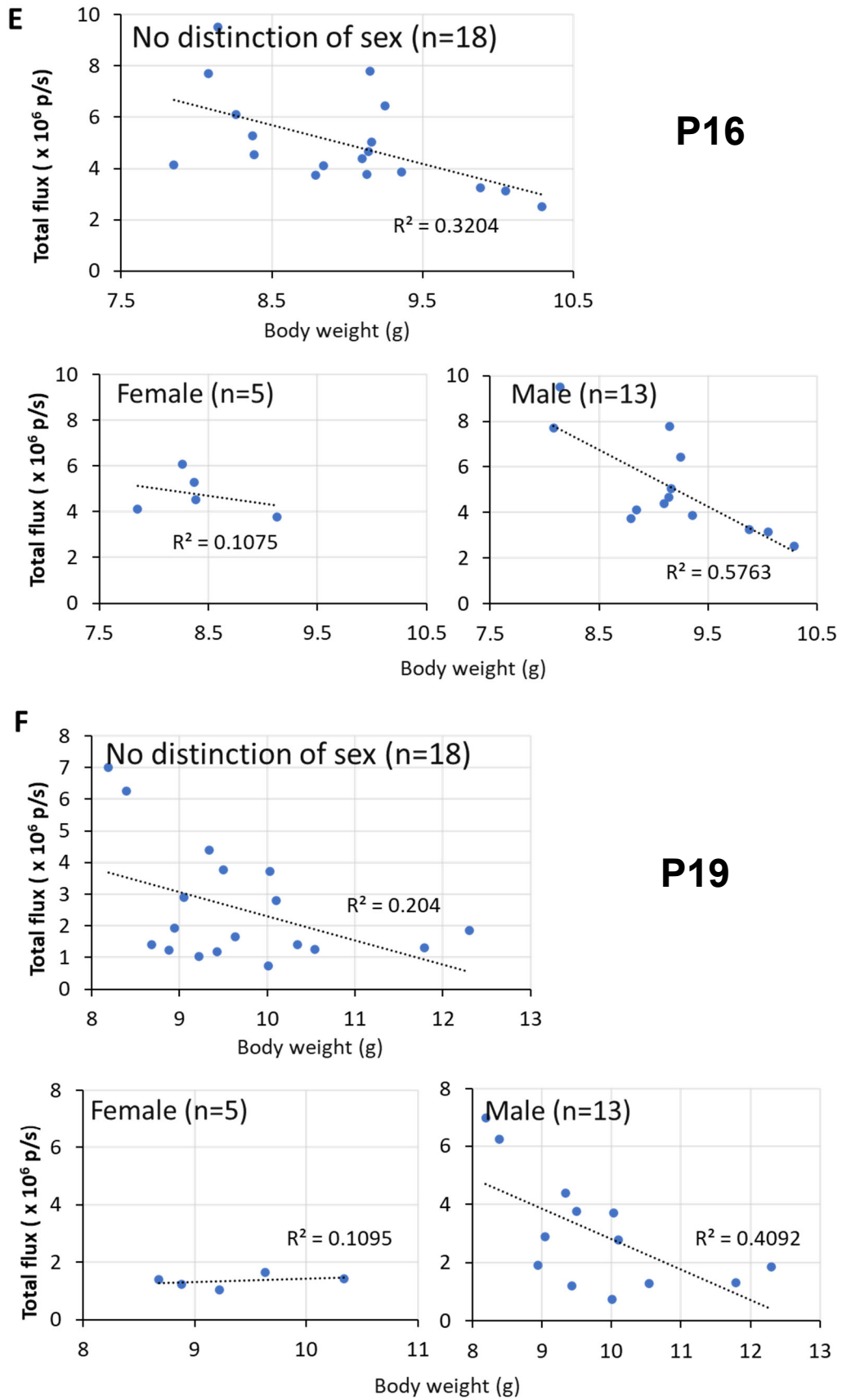


図 5 続き

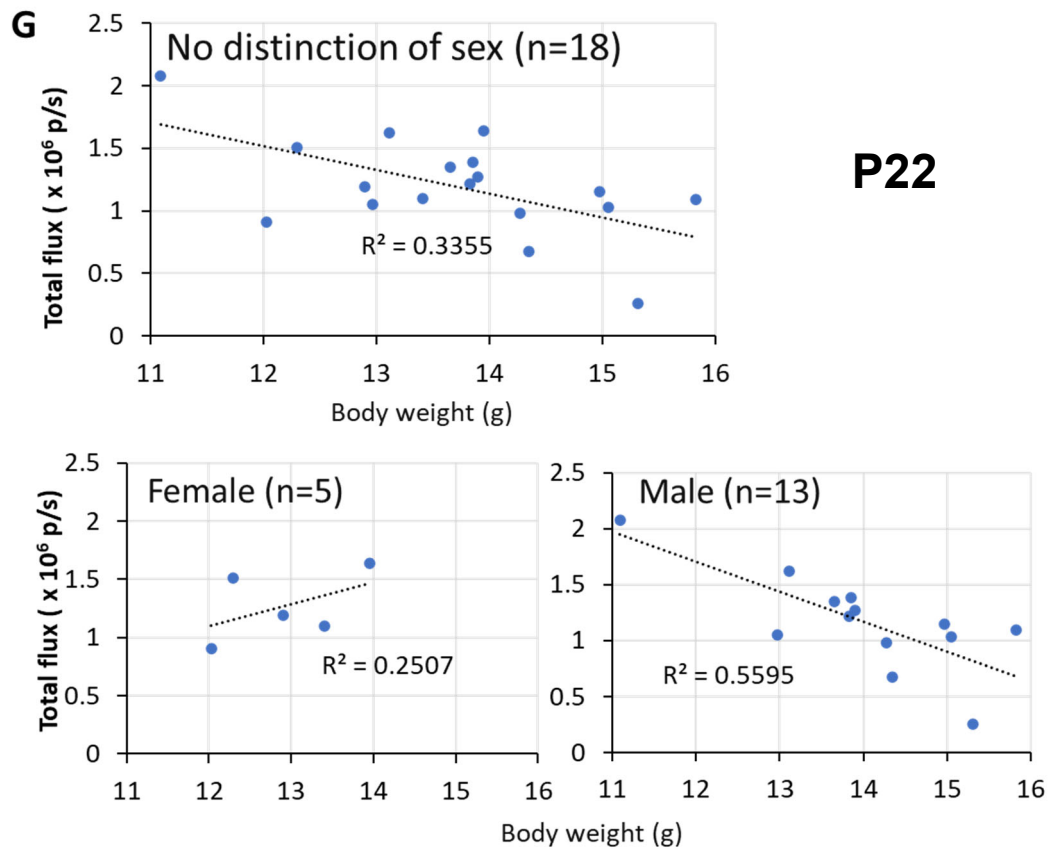


図 5 各日齢における頭部の発光と体重の相関性

Syn-Rep マウスに対し、P4 (A)、P7 (B)、P10 (C)、P13 (D)、P16 (E)、P19 (F) および P22 (G) における頭部の発光強度 (Total flux) と体重の相関性を R^2 値として算出した。Data are expressed as mean \pm S.E.M (n=5 - 18)

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究
(21KD1004)

分担研究課題名：DNT 陽性対照物質を用いたレポーターマウスの有用性の検証
～バルプロ酸を用いた検討～

研究分担者：田熊 一徹（大阪大学 大学院歯学研究科・教授）

研究要旨

近年の大規模疫学調査により、妊娠期における甲状腺機能低下が児のIQ低下を誘導することが明らかとなった。これを踏まえ、OECDガイドライン試験において甲状腺ホルモン関連指標の検討が追加されたが、追加された検討項目に関する毒性学的意義、特に発達神経毒性（DNT）については不明な点が数多く取り残されている。化学物質曝露により誘導される妊娠期の甲状腺機能関連指標の変動をリスク評価に活かす生かすためには、DNT評価を効果的に進めるための新たな技術を導入し、母体の甲状腺機能関連指標の変動と毒性との関係を明確にすることで、学術的基盤を堅固なものにする必要がある。本分担研究では、その候補として期待されるSyn-Repマウスについて、DNT陽性対象対照物質であるバルプロ酸（VPA）を用い、DNT評価における有用性を検証した。DNTが誘導される条件で妊娠期にVPAを曝露したところ、4～13日齢の雌雄児動物の脳におけるレポーター遺伝子（Luc2）活性の発現が有意に低下した。また成熟期（8週齢）における脳組織への影響をLuc2活性と病理組織学的解析により確認したところ、VPA曝露群で脳皮質におけるLuc2活性の有意な低下と、神経細胞数の有意な減少が確認された。さらに行動試験解析では、自発運動量の低下、不安様行動の増加および社会性行動の低下など、自閉スペクトラム症（ASD）様の行動異常が認められた。以上の結果から、Syn-RepマウスはDNTを検出できる有用なツールとなる可能性が示された。

A. 研究目的

ヒトでは妊娠初期における胎児の甲状腺ホルモンが母親からの供給に100%依存していることから、妊娠期における甲状腺機能低下は、妊娠維持や出生後の児の発育に影響が及ぶ可能性が懸念されている。現在のところ、児の出生時体重の異常や周産期死亡率の頻度の上昇との因果関係については賛否が分かれているが、児の脳の発達についてはIQ低下との間に明確な相関がみられることが大規模疫学調査から明らかとなっている。このような背景を踏まえ、妊娠期間中に母親の甲状腺機能低下を引き起こす化学物質のヒトに対するリスクをより厳密に評価するために、2018年に既存のOECDガイドライン試験において甲状腺ホルモン関連指標の検討が追加された。しかし、母動物の甲状腺機能関連指標の変動と発達期における脳神経系への影響（発達神経毒性：DNT）との詳細な因果関係が不明であることから、追加され

た検討項目に関する毒性学的意義については不明な点が数多く取り残されている。特に脳神経系の毒性に関しては、一般的な毒性評価には有効とされている病理組織学的解析での判定が極めて困難であるという問題もある。したがって、妊娠期の化学物質曝露により誘導される甲状腺機能関連指標の変動をリスク評価に活かすためには、この問題をブレイクスルーできる新たな技術を導入し、母体の甲状腺機能関連指標の変動とDNTとの関係に関する学術的基盤を堅固なものにする必要がある。

このような背景のもと我々は、化学物質のDNT評価やその作用メカニズム解明を効率よく行うために、成熟神経細胞のマーカーとして神経細胞分化の最終段階であるシナプス構築ステージにおいて発現するSyn1に着目し、Syn1プロモーターの下流にルシフェラーゼ（Luc2）とLacZの融合遺伝子をレポーター遺伝子に有するSyn-Repマウスを独

自に開発した。このマウスでは、成熟神経細胞のシナプス形成への影響 (Key Event: KE) を *in vivo* イメージングにより非侵襲的にトレースできることが期待され、また同一個体で行動試験 (Adverse Outcome: AO) までを行うことができる利点を有する。すなわち同一個体で時間軸の異なる Key Event (KE) と AO を直接紐付けることが期待される。

そこで本研究では、甲状腺機能低下によって誘導される DNT 評価を効果的に進めるツールとして期待される Syn-Rep マウスの DNT 評価における有用性について検討を行う。実験には、DNT 陽性対照物質とされているバルプロ酸ナトリウム (VPA) を用いる。VPA は、てんかん、てんかんに伴う性格行動障害、躁病および躁うつ病の躁状態などの治療に用いられる薬物であるが、妊娠中の服用により催奇形性や胎児性 VPA 症候群など重篤な毒性がもたらされること、ならびに出生児において自閉スペクトラム症 (ASD) や精神遅滞といった発達障害の発症リスクを増大させることが報告されている。今年度は VPA による Syn-Rep マウスのレポーター遺伝子の発現変動が、成熟期の組織形成への影響 (時間軸の異なる KE)、さらには異常行動 (AO) を反映したものであるのか (すなわち紐付けが可能であるのか) を検証した。

B. 研究方法

1. 動物

実験には ICR 系の妊娠マウス、ならびに雄性 Syn-Rep マウスと野生型雌性 ICR マウスを交配することで得られた妊娠マウスを用いた。動物実験の実施に関しては、大阪大学において遺伝子組換え実験および動物実験に関する承認を得て行った。また動物実験における動物保護および倫理指針を遵守し、わが国における「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律」(法律第 68 号・平成 18 年 6 月 1 日施行) また WHO の医学研究顧問委員会の勧告に基づく

「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則」に準拠して以後の実験を行った。

2. VPA の投与

VPA の投与は自閉スペクトラム症様の症状を呈するとされる条件で行った。胎齢 12.5 日 (E12.5) 時に VPA 500 mg/kg を腹腔内に単回投与した。対照群には生理食塩水を投与した。出生後、得られた児動物については、児の成長の不均一性を排除するために OECD ガイドラインに準じて、4 日齢 (P4) において 1 匹の母体から合計 8 匹 (雌 4 匹・雄 4 匹) となるように間引きを行った。

3. *in vivo* イメージング解析

発達期 (P4~P22) および 4 週齢、8 週齢において経時的に *in vivo* イメージングを行った。2%イソフルランガスで麻酔後、D-luciferin 溶液を 10 mL/kg 体重で腹腔内に投与した。D-luciferin 投与直後から、25 分後までの頭部の発光量を背中側から 1 分毎に連続測定した。発光量測定には IVIS Lumina II (住商ファーマ) を使用した。各日齢における発光量の変化を表したグラフには、連続測定で得られたデータのうち発光量がピークを示した時点の値を使用した。得られたデータについて Living Image (住商ファーマ) を用いて解析し、頭部の発光強度を Total flux (photon/second) として定量化した。

4. *in vitro* ルシフェラーゼアッセイ

前頭前皮質のルシフェラーゼアッセイは、*in vivo* イメージングが終了した 8 週齢の Syn-Rep マウスから大脳皮質を摘出し、300 μ L のホモジナイズ緩衝液を加え、ホモジナイズ処理した。4°C、15000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。黒色の 96 穴プレートに 10 μ L/well となるように上清を添加し、これに D-luciferin 緩衝液を 50 μ L/well で添加後、60 秒以内に IVIS Lumina II (住商ファーマ) にて測定をした。サンプルの発光量からブランクの発光量を引き、タンパク質 1 μ g 量当たりのルシフェラーゼ活性 (photons/second/ μ g

protein) を算出した。

5. 組織学的解析

脳の組織形態学的変化は、8 週齢での Nissl 染色法により解析した。被験マウスをリン酸緩衝液の全身灌流により脱血後、4% パラホルムアルデヒドで組織を固定した。全脳をパラフィン包埋し、厚さ 5 μm の冠状切片を作製した。切片を MAS coating slide glass に貼付し、洗浄および浸漬した後、0.1%クレシルバイオレット溶液で 10 分染色した。染色切片を洗浄および脱水した後、封入した。Nissl 陽性細胞数は、Nuance Fx マルチスペクトルイメージングシステム (PerkinElmer) を用いて取得した画像を用いてマニュアル計測し、1 mm^2 当たりの平均値で示した。

6. 行動薬理学的解析

母動物の養育行動は、出産 9 日後に評価した。母動物を飼育ケージより取り出し児動物から 10 分間分離した。飼育ケージの 3 コーナーに児動物を 1 匹ずつ配置し、母動物をケージ内に戻した後の 20 分間の養育行動時間を測定した。

児動物の行動解析は生後 8 週齢で実施した。自発行動変化は、オープンフィールド試験により評価した。透明なアクリル板と黒色プレキシガラス製の床からなるオープンフィールド装置 (45 cm \times 45 cm \times 30 cm, 床敷き無し) に被験マウスを入れ、この新奇環境における移動距離、立ち上がり回数、中央付近の区画を横切った回数を Acti-Track System (Panlab) を用いて 90 分間測定した。

不安様行動変化は、高架式十字迷路試験により評価した。装置は、それぞれ走路幅 5 cm、長さ 30 cm の白色不透明の直交する 2 本のオープンアームと 2 本のクローズドアームからなり、クローズドアームには高さ 20 cm の不透明の側壁を付け、40 cm の高さに設置した。装置の中央に被験マウスの頭がオープンアームの方向となるように置き、その後 5 分間の行動を観察し、オープンアームおよびクローズドアームにおける滞在時間、および

各アームへの進入回数を計測した。なお、各アームでの滞在時間は、四肢全てがアームに入った時点から中央区画に出た時点までとした。

社会性行動変化は、社会性相互作用試験により評価した。被験マウス (resident マウス) を新たな透明ポリカーボネート製ケージ (38 \times 22 \times 20 cm) 内で 60 分馴化させた後、異なるケージで飼育した同性同系統かつ体重が同程度の侵入マウス (intruder マウス) を入れ、被験マウスの侵入マウスに対する行動を観察した。嗅覚行動 (face sniff および anogenital sniff)、毛づくろい行動 (上体を起こし前肢あるいは鼻を侵入マウスに接触させる行動)、ならびに攻撃行動 (biting、pushing under、sideways posturing および aggressive grooming) を社会性行動の指標として、各行動の総時間を計測した。行動試験はいずれも明期 (8:00~20:00) に行った。

学習記憶能の変化は、新奇物体認識試験により評価した。本試験は、馴化、訓練試行および試験試行の 3 つのセッションで構成した。まず、物体を設置せず床敷きのみを敷いたプレキシガラス製ボックス (30 \times 30 \times 35 cm) に 3 日間 (10 分間/日) 動物を馴化させた後、壁から 8 cm 離れた位置に 2 つの物体を置いた装置内で 10 分間自由に探索させた (訓練試行)。その 1 または 24 時間後に、2 つの物体のうち、1 つを新奇物体と置換した装置内で 5 分間自由に探索させた (保持試行)。訓練試行および保持試行における動物の行動を観察し、2 つの物体に対するそれぞれの探索時間を測定した。訓練試行時においては、総探索時間に対するいずれかの 1 物体への探索時間の割合 (%) を、保持試行時においては、総探索時間に対する新奇物体への探索時間の割合 (%) を探索嗜好性 (exploratory preference) として示した。

7. 統計学的解析

データは全て「平均値 \pm 標準誤差」で表し、統計学的処理には解析ソフト SPSS 15.0J for Windows (SPSS) もしくは Prism 9 for Mac

OS X (GraphPad Software) を用いた。対応のない t 検定を行い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

C. 研究結果

1. 児動物の体重増加への影響

E12.5 に VPA を投与した雌雄児動物の体重増加に関して、一部の日齢で有意差な低下が認められたものの、出生後から 8 週齢までの期間全体を通して VPA 曝露による顕著な影響は認められなかった (図 1 A, B)。

2. 児動物脳の *in vivo* イメージングへの影響

VPA 投与による児動物脳のレポーター発現プロファイルへの影響を *in vivo* イメージングにより解析した。VPA 曝露群では対照群と比較して、P4~P13 におけるレポーターの発現が有意に低下した (図 2 A, B)。またこの傾向は雌雄ともに確認された。

3. 児動物脳の組織学的解析

8 週齢時の児動物の脳 (図 3 A : Bregma +1.94 mm の領域) の組織学的解析を行った。その結果、VPA 曝露群で前頭前皮質の上層 (II/III 層) における神経細胞数の有意な減少が確認された (図 3 B, C)。またこのときの前頭前皮質の Luc2 活性についても検討したところ、対照群と比べて有意に低下していた (図 3 D)。

4 母動物および児動物の行動薬理学的解析

出産 9 日後に母マウスの養育行動 (児運びおよび授乳行動) を観察したところ、妊娠 12.5 日の VPA 投与による影響は認められなかった (図 4)。

VPA 曝露が児動物の新奇環境下での自発運動に及ぼす影響をオープンフィールド試験により検討した (図 5)。VPA 曝露群では、生後 8 週齢において、経時的な移動距離 (図 5A)、総移動距離 (図 5B) および立ち上がり回数 (図 5C) が対照群と比べて有意に減少していた。次に、不安様行動変化に及ぼす影響を高架式十字迷路試験により検討した (図

6)。VPA 曝露群では、8 週齢において、オープンアーム滞在時間の有意な減少 (図 6A)、クローズドアーム滞在時間の有意な増加 (図 6B)、ならびにオープンアーム滞在時間の割合の有意な低下を示した (図に示さず)。さらに、児動物の社会性行動に及ぼす影響を社会的相互作用試験により検討した (図 7)。VPA 曝露群では、8 週齢において、対照群と比べて初めて遭遇した intruder マウスに対する嗅覚行動時間が有意に減少していた (図 7A)。また、VPA 曝露群では毛づくろい行動 (図 7B) および攻撃行動 (図 7C) は有意ではないものの、増加傾向が認められた。

さらに児動物の学習記憶能に及ぼす影響を新奇物体認識試験より検討した (図 8)。訓練試行において、VPA 曝露群と対照群とも 2 物体に対して 50% の探索嗜好性を示した (図 8 左)。1 時間後の試験試行において、VPA 曝露群と対照群の新奇物体への探索嗜好性に差は認められなかった (図 8 中) が、24 時間後の試験試行においては、対照群に比べて VPA 曝露群では新奇物体への探索嗜好性が有意に低下していた (図 8 右)。

ASD は男児に発症が多くみられるという性差が知られている。VPA による DNT は ASD 様の症状を示すとされていることから、雌雄の児動物における行動変化の違いに着目して検討した。雌雄の児動物ともに VPA 曝露群では、総移動距離の減少 (図 9A) ならびにオープンアーム滞在時間の減少 (図 9B) を示した。一方、社会性相互作用試験においては、雄性の児動物で嗅覚行動時間が有意に減少していたのに対して、雌性の児動物では増加していた (図 10)。

D. 考察

DNT 評価における SynRep マウスの有用性を妊娠期に VPA を投与する DNT モデルで検証を行った。その結果、VPA 曝露群では P4~P13 で *in vivo* イメージングにおける発光が有意に低下したことから、VPA 曝露が脳神経系に影響を及ぼす時期は P4~P13 である可能性が Syn-Rep マウスを用いることで

確認できた。VPA 曝露群では 8 週齢の児動物の前頭前皮質において神経細胞数の有意な減少が確認されたことに加えて、Luc2 活性も有意に低下していたことから、この時期においてもレポーター分子は神経細胞の構築状態を反映した指標となりうることが確認された。さらに今回用いた条件下での胎生期 VPA 曝露は、雌雄児動物の自発運動量の低下、不安行動の増加、学習記憶能の低下が観察されたことに加え、雄の児動物においては ASD 様の社会性行動異常が認められたことから、レポーター遺伝子の発現変動が行動異常を捉える指標となる可能性も示された。

行動試験の結果に関して、E12.5 に VPA 曝露した児動物は、成体期にオープンフィールド試験で自発運動量の低下を、高架式十字迷路試験において、オープンアーム滞在時間の減少および総滞在時間におけるオープンアーム滞在時間割合の低下を示した。高架式十字迷路試験でのオープンアーム滞在時間とその割合の減少は、不安症状の指標とされていることから、不安、恐怖の発現が自発運動量に対して抑制的に作用したことが考えられた。

また、社会的相互作用試験においては、E12.5 の VPA 曝露により、intruder 動物に対して示す嗅覚行動時間が減少することを示した。すなわち、社会性行動が低下していることを認めた。さらに、これらの成績より、E12.5 の VPA 曝露が児動物において成体期に ASD 様の情動行動異常を引き起こすことが示された。また、母親マウスの養育行動は VPA 投与による影響を受けなかったことから、VPA 曝露群の児動物で認められた行動異常は母親マウスの養育行動の変化によるものではないことが示された。

ASD は男児に発症が多くみられるという性差が知られていることから、行動試験の結果を雌雄差に着目して検証したところ、雄の児動物でのみ ASD 様の社会性行動異常が認められた。VPA 曝露による Syn-Rep マウスのレポーター遺伝子の発現低下に性差は認められなかったものの、臨界期の P4~13 に

おける病態を詳細に検証することで、ヒトでの ASD 発症頻度の性差の解明にもつながることが期待される。

Syn-Rep マウスのレポーター分子はシナプス構築タンパク質 Syn1 のプロモーターで発現制御されていることから、VPA 曝露による頭部発光の低下はシナプス構築状態の異常を反映していると考えられる。一方でヒトにおいても ASD をはじめとする神経発達症においては、発達期のシナプス構築状態が異常な経時変化パターンを示すことが知られている。このことから Syn-Rep マウスのレポーター分子の発現パターンの経時的モニタリングは、妊娠期の甲状腺機能低下による脳への影響のみならず、神経発達症の様々な候補遺伝子の影響の検証にも応用可能である可能性が考えられた。しかしその一方で化学物質による DNT や神経発達症の発症メカニズムは非常に複雑で決して単一の経路で誘導されるものではない。今後は SynRep マウスが様々な誘導メカニズムの DNT や神経発達症にも対応可能であるのかを検証して行く必要があると考えられる。このような観点から、次年度以降も、DNT 陽性対照化学物質である鉛やクロルピリホスについても検討を行っていく予定である。

E. 結論

Syn-Rep マウスのレポーター遺伝子の発現をトレースすることで、成熟期の組織形成への影響（時間軸の異なる KE）さらには異常行動（AO）を紐付けできる可能性が示されるとともに、DNT 研究における Syn-Rep マウスの有用性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

1. 今戸瑛二、浅野智志、中村庸輝、中島一恵、森岡徳光、津賀一弘、入船正浩、**田熊一敏**、吾郷由希夫：胎生期バルプロ酸投与マウスは熱刺激およびカプサイシン誘発痛の増大と機械的アロディニア

- を示す, 第 139 回日本薬理学会近畿部会,
Web 開催, 2021 年 6 月
2. 石田慶士、南川祥輝、森 一馬、松丸大輔、中西 剛 : 新規発達神経毒性評価系開発に向けた神経分化トレーサーマウスの解析, 第 48 回日本毒性学会学術年会, 神戸/Web, 2021 年 7 月
 3. 南川祥輝、石田慶士、森 一馬、辰巳佳乃子、松丸大輔、田熊一敬、中西 剛 : 神経

分化トレーサーマウスを用いた新規発達神経毒性評価系の有用性検証, フォーラム 2021 : 衛生薬学・環境トキシロジー, 船橋/Web, 2021 年 9 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

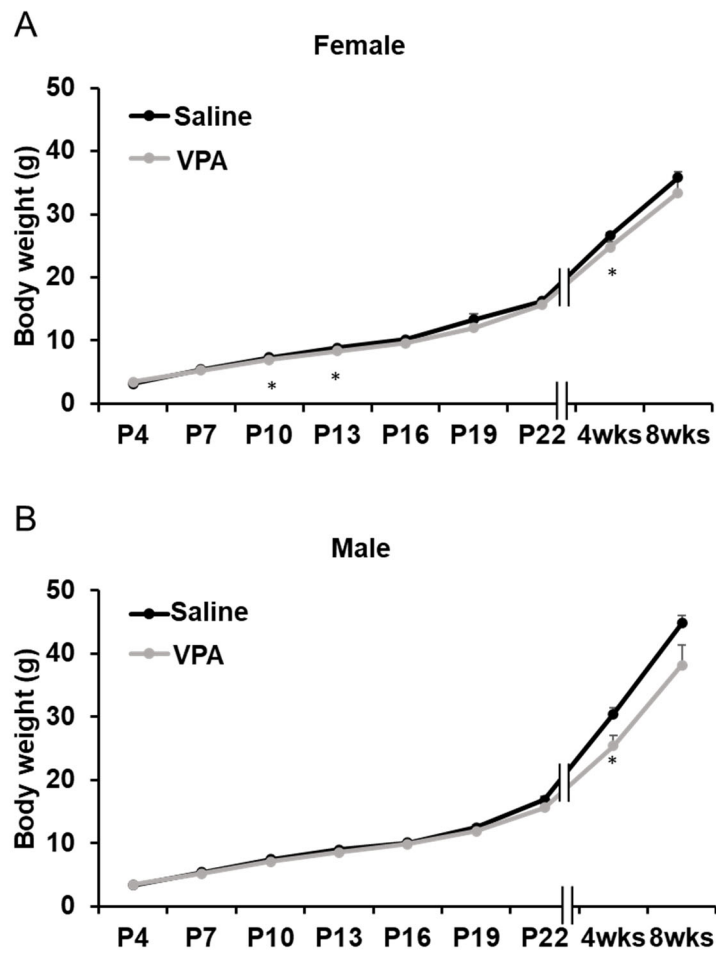


図1 E12.5にVPAを曝露したSyn-Repマウス児の体重変化

P4、P7、P10、P13、P16、P19、P22 および4、8週齢における児マウス（A：雌、B：雄）の体重を測定した。* $P < 0.05$ (unpaired t test)。

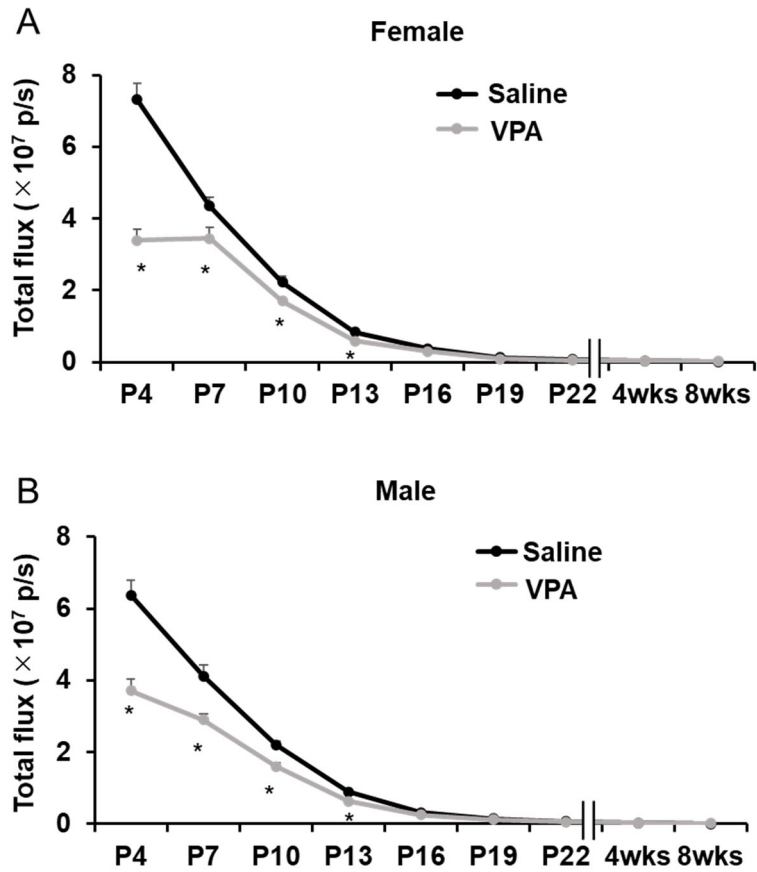


図2 E12.5にVPAを曝露したSyn-Rep児動物頭部の*in vivo*イメージング経時変化

P4、P7、P10、P13、P16、P19、P22 および4、8週齢の児マウス（A：雌、B：雄）に対して経時的に*in vivo*イメージングを行った。発光量測定にはIVIS Lumina IIを使用し、頭部の発光強度をTotal fluxとして定量化した。* $P < 0.05$ (unpaired t test)。

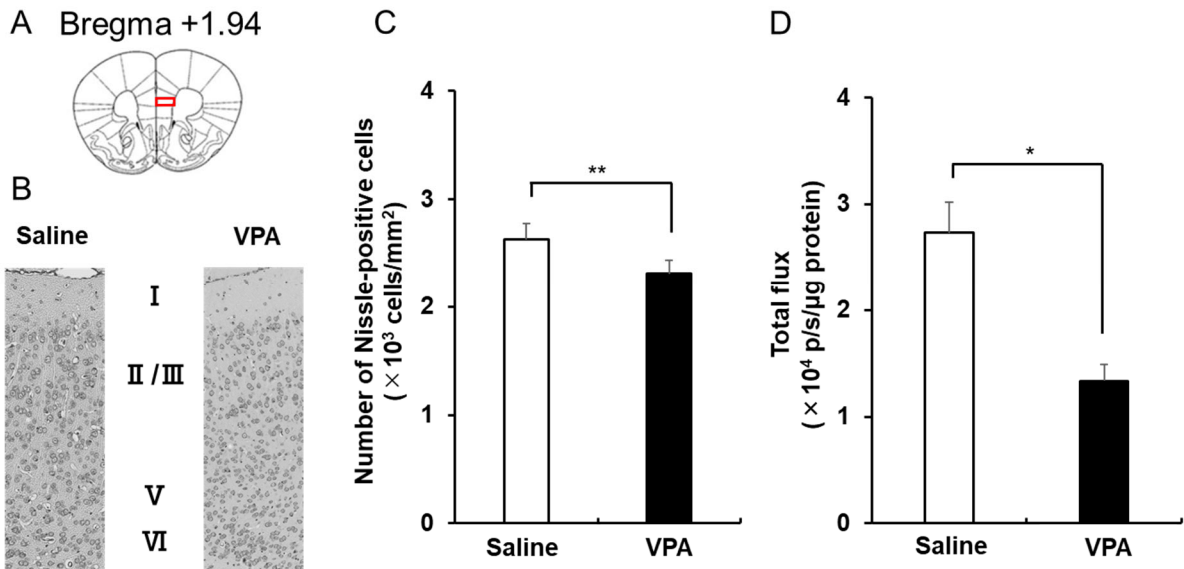


図3 E12.5にVPAを曝露した児動物の大脳皮質におけるNissl陽性細胞数とルシフェラーゼ活性評価

(A-C) 8週齢の雌の児動物において、4%パラホルムアルデヒドの全身灌流により組織を固定後、全脳を摘出してパラフィン切片を作製した。切片を0.1%クレシルバイオレット溶液で染色し、洗浄および脱水した後封入した。前頭前皮質を含む超薄切片中のNissl陽性細胞像を蛍光顕微鏡システムを用いて取得し、マニュアル計測にて1mm²当たりのNissl陽性細胞数を算出した。A：冠状切片の模式図。B：雌性の児動物の切片より得られた典型的なNissl染色像。I～VIの数字は大脳皮質の層を示す。C：単位面積当たりのNissl陽性細胞数。(D) 8週齢の雌のSyn-Rep児動物において脳を摘出し、前頭前皮質におけるルシフェラーゼ活性をIVIS Lumina IIにて測定をした。サンプルの発光量からブランクの発光量を引き、タンパク質1 μ g量当たりのルシフェラーゼ活性を算出した。* $P < 0.05$ (unpaired t test)。

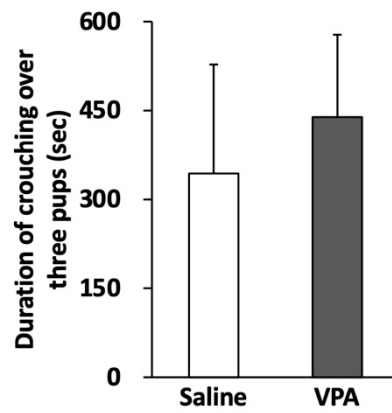


図 4 母動物の養育行動に対する VPA 投与の影響

P9 に母動物を飼育ケージより取り出し、児動物から 10 分間分離した。飼育ケージの 3 コーナーに児動物を 1 匹ずつ配置し、母動物をケージ内に戻した後の 20 分間の養育行動時間を測定した。

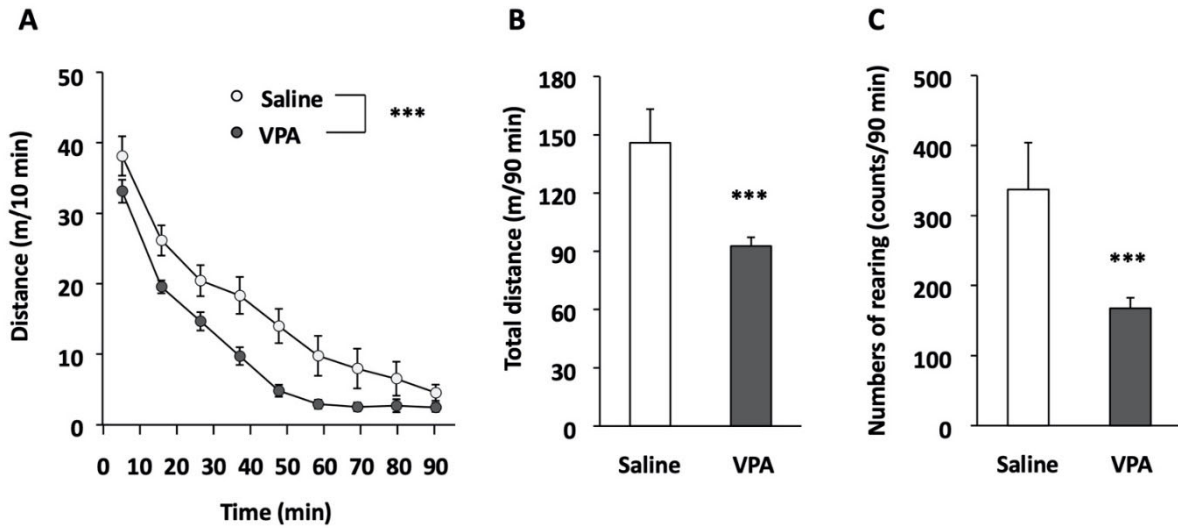


図 5 E12.5 に VPA を曝露した児動物の自発行動変化

自発行動変化はオープンフィールド試験により評価した。8 週齢の雄性の児動物をオープンフィールド装置に入れ、この新奇環境における移動距離 (A, B)、および立ち上がり回数 (C) を Acti-Track System を用いて 90 分間測定した。生理食塩投与 (対照) 群と比較して、 $***P < 0.001$ (A: repeated measures ANOVA; B, C: unpaired t test)。

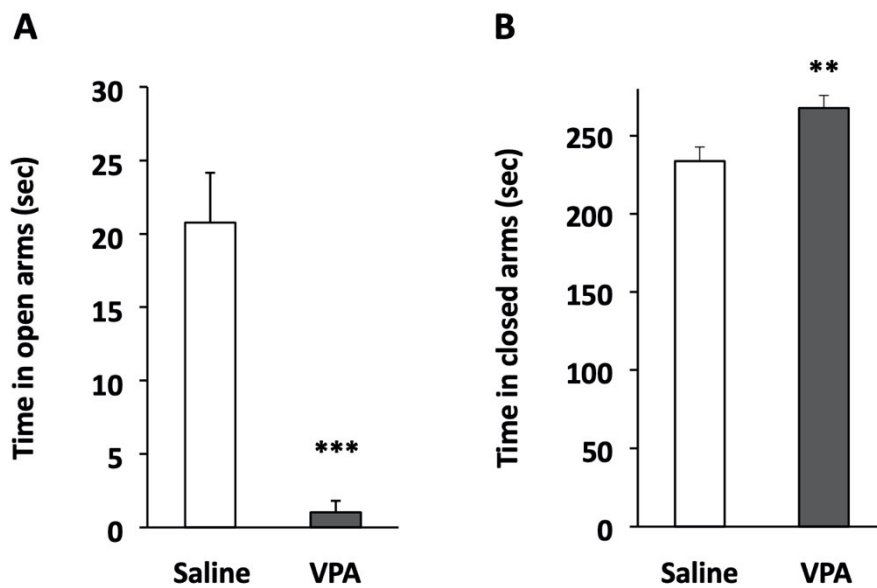


図 6 E12.5 に VPA を曝露した児動物の不安様行動の変化

不安様行動変化は高架式十字迷路試験により評価した。8 週齢の雄性の児動物を高架式十字迷路装置の中央に頭がオープンアームの方向となるように置き、その後 5 分間の行動を観察し、オープンアーム (A) およびクローズドアームにおける滞在時間 (B) を計測した。なお、各アームでの滞在時間は、四肢全てがアームに入った時点から中央区画に出た時点までとした。生理食塩投与 (対照) 群と比較して、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (A, B: unpaired t test)。

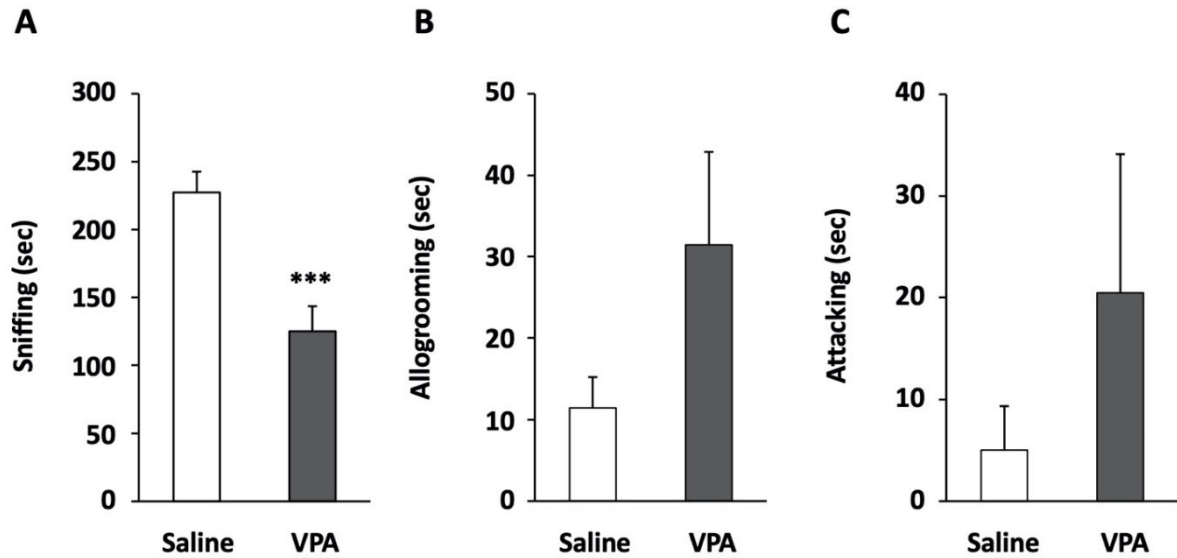


図7 E12.5にVPAを曝露した児動物の社会性行動の変化

社会性行動変化は社会性相互作用試験により評価した。8週齢の雄性の児動物（被験マウス）を新たな透明ポリカーボネート製ケージ内で60分馴化させた後、異なるケージで飼育した同性同系統かつ体重が同程度の侵入マウスを入れ、被験マウスの侵入マウスに対する行動を観察した。嗅覚行動（A）、毛づくろい行動（B）および攻撃行動（C）を社会性行動の指標として、各行動の総時間を計測した。生理食塩投与（対照）群と比較して、*** $P < 0.001$ (A: unpaired t test)。

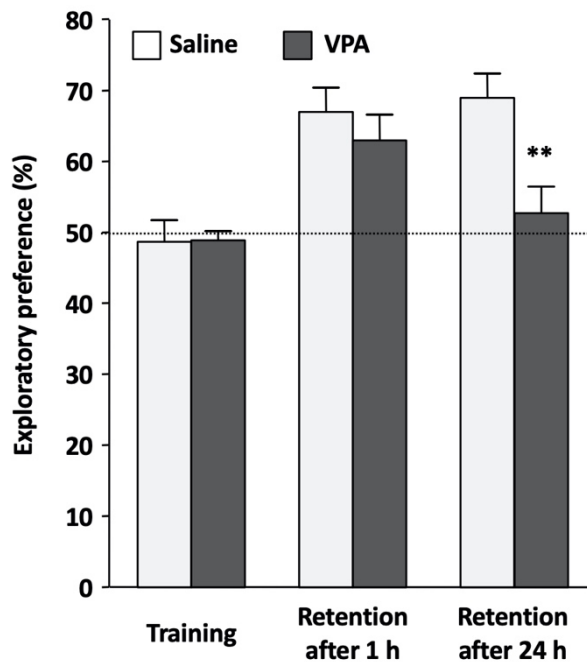


図8 E12.5にVPAを曝露した児動物の学習記憶能の変化

8週齢の雄性の児動物を、まず、物体を設置せず床敷きのみを敷いたプレキシグガラス製ボックスに3日間(10分間/日)馴化させた後、2つの物体を置いた装置内で10分間自由に探索させた(訓練試行)。その1または24時間後に、2つの物体のうち、1つを新奇物体と置換した装置内で5分間自由に探索させた(保持試行)。訓練試行および保持試行における動物の行動を観察し、2つの物体に対するそれぞれの探索時間を測定した。訓練試行時には、総探索時間に対するいずれかの1物体への探索時間の割合(%)を、保持試行時には、総探索時間に対する新奇物体への探索時間の割合(%)を探索嗜好性(exploratory preference)として示した。生理食塩投与(対照)群と比較して、** $P < 0.01$ (unpaired t test)。

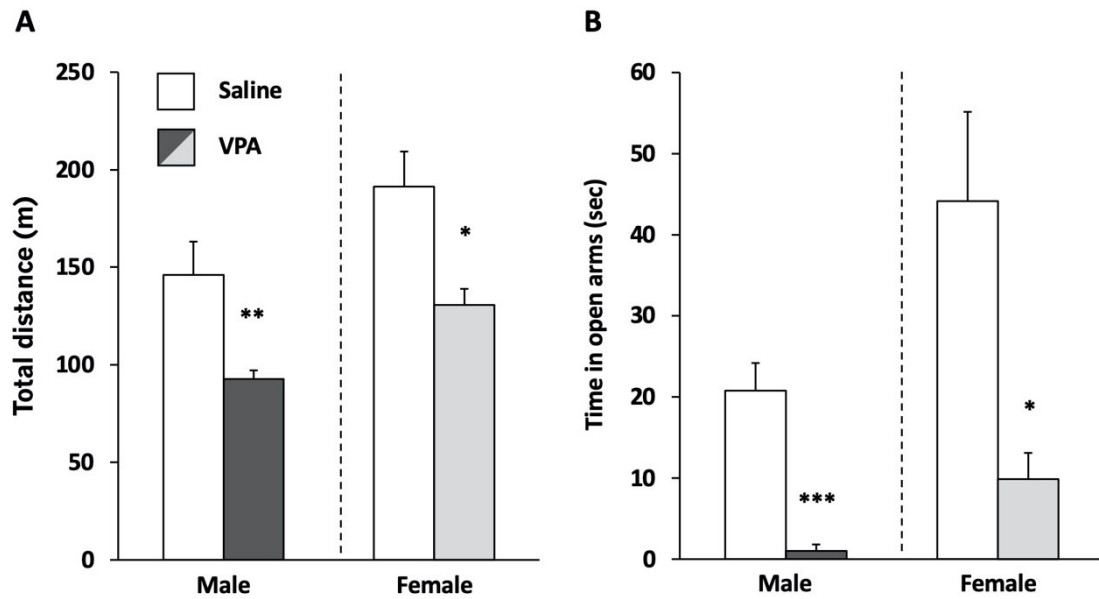


図9 E12.5にVPAを曝露した児動物の自発行動および不安様行動の性差

自発行動変化および不安様行動変化は図2および図3と同様の方法で評価した。A: 8週齢の雌雄の児動物をオープンフィールド装置に入れ、この新奇環境における自発行動をActi-Track Systemを用いて計測し、90分間の総移動距離を算出した。B: 8週齢の雌雄の児動物を高架式十字迷路装置の中央に頭がオープンアームの方向となるように置き、その後5分間の行動を観察し、オープンアームにおける滞在時間を計測した。生理食塩投与(対照)群と比較して、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (A, B: unpaired t test)。

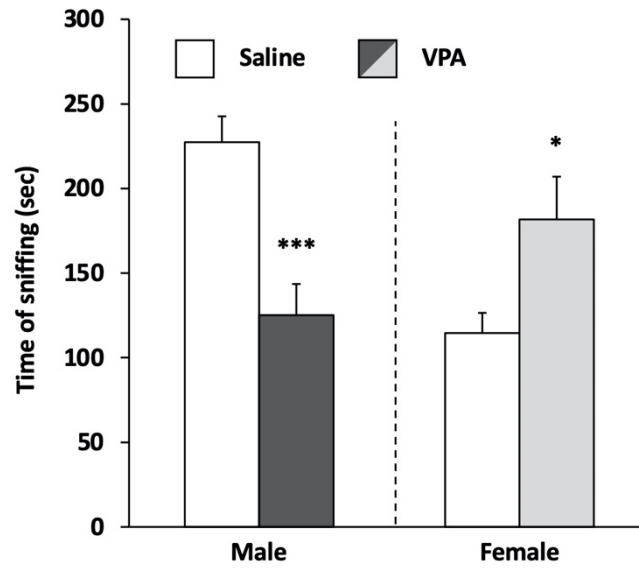


図 10 E12.5 に VPA を曝露した児動物の自発行動および社会性行動の性差

社会性行動変化は図 4 と同様の方法で評価した。8 週齢の雌雄の児動物（被験マウス）を新たな透明ポリカーボネート製ケージ内で 60 分馴化させた後、異なるケージで飼育した同性同系統かつ体重が同程度の侵入マウスを入れ、被験マウスの侵入マウスに対する嗅覚行動の総時間を計測した。生理食塩投与（対照）群と比較して、* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ (unpaired t test)。

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究
(21KD1004)

分担研究課題名：妊娠期の甲状腺ホルモン関連指標変動による次世代影響の検討
～抗甲状腺薬を用いた甲状腺機能低下条件の検証～

研究分担者：松丸 大輔（岐阜薬科大学 薬学部・講師）

研究要旨

大規模疫学調査によって母体の甲状腺刺激ホルモン（TSH）の上昇を伴うトリヨードチロニン（T3）／チロキシシン（T4）の低下と児のIQ低下との間に明確な相関がみられるが、TSHの上昇を伴わないT3／T4の低下との相関は認められないことが報告されている。したがって本研究の目的を達成するためには、このような甲状腺機能低下状態を再現した条件で児動物への影響を検討する必要がある。本分担研究では、マウスに抗甲状腺薬を投与してヒトの妊娠期における甲状腺機能低下を再現し、DNTを初めとする次世代影響の検討を試みる事を目的としている。今年度は、妊娠マウスで甲状腺機能低下を再現するために、抗甲状腺薬のチアマゾール（MMI）とプロピルチオウラシル（PTU）を用いて投与条件の検討を行った。既報の投与条件に従って行ったMMIの飲水投与系およびPTUの混餌投与系ともに児動物の脳におけるレポーター遺伝子の発現が上昇傾向を示し、神経細胞の分化・成熟に何らかの影響がある可能性が示された。しかしMMIの検討では飲水量の顕著の減少が確認されるとともに、飲水中のMMI濃度依存的な影響が認められない結果となり、一方のPTUの検討では摂餌量の変化などは観察されなかった。甲状腺機能低下の影響を解析するためにはPTUを用いた解析を行なう方が理に適っていると考えられた。今後はこの投与条件における甲状腺関連指標の測定を行うと共に、Syn-Repマウスを用いてPTUの用量依存性、既存のDNT陽性対照物質との類似・相違性の解析などを行なっていく予定である。

A. 研究目的

大規模疫学調査によって母体の甲状腺刺激ホルモン（TSH）の上昇を伴うトリヨードチロニン（T3）／チロキシシン（T4）の低下と児のIQ低下との間に明確な相関がみられるが、TSHの上昇を伴わないT3／T4の低下との相関は認められないことが報告されている。したがって本研究の目的を達成するためには、このような甲状腺機能低下状態を再現した条件で児動物への影響を検討する必要がある。既に先行研究[Kawahori et al., *Thyroid* 28:395 (2018)]により、抗甲状腺薬であるMMIを飲水投与した母動物でTSHの上昇を伴わない軽度T3／T4の低下を誘導できる条件が報告されていることから、この条件を基に投与するMMIの用量を変動させて児動物への影響の評価を試みた。一方で最近、抗甲状腺薬であるPTUを妊娠ラットに投与した検討において、TSHの上昇を伴うT3／T4低

下を誘導することが報告された[須藤英典ら、第48回日本毒性学会学術年会]。そこで本研究成果のガイドライン試験への適用を考慮して、マウスにおいても同様のPTU投与条件で甲状腺機能低下状態を再現できるのかについても検討を行った。

B. 研究方法

1. 動物

実験には雄性Syn-Repマウスと野生型雌性ICRマウスを交配することで得られた妊娠マウスを用いた。動物実験の実施に関しては、岐阜薬科大学において遺伝子組換え実験および動物実験に関する承認を得て行った。また動物実験における動物保護および倫理指針を遵守し、わが国における「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改

正する法律」(法律第 68 号・平成 18 年 6 月 1 日施行) また WHO の医学研究顧問委員会の勧告に基づく「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則」に準拠して以後の実験を行った。

2. 抗甲状腺薬の投与

チアマゾール (MMI: 2-メルカプト-1-メチルイミダゾール、Sigma-Aldrich) 飲水投与は、雌性 Syn-Rep マウスに MMI を 0.025、0.1% (w/v) 含有する滅菌済み水道水を交配開始 2 週間前から自由摂取することにより行なった。交配後膈プラグが確認されたマウスを胎齢 0.5 日 (E0.5) とし、引き続き児動物の出生まで MMI 含有水を与えた (図 1A)。プロピオチオウラシル (PTU: 6-プロピル-2-チオウラシル、Sigma-Aldrich) 混餌投与は、PTU を完全調整食の AIN-93M (日本クレア) に 10 ppm (w/w) となるように混餌し、妊娠 Syn-Rep マウスに E6.5 より自由摂取させることで行なった。児動物の出生後も母動物に PTU 混餌食を継続して与えた。生後 13 日齢 (P13) ~P21 の期間は児動物の摂食も始まるため、混餌食の PTU 濃度を 5 ppm (w/w) に変更した (図 5A)。出生後、得られた児動物については、児の成長の不均一性を排除するために OECD ガイドラインに準じて、P4 において 1 匹の母体から合計 8 匹 (雌 4 匹・雄 4 匹) となるように間引きを行った。

3. *in vivo* イメージング解析

発達期 (P4~22) において経時的に *in vivo* イメージングを行った。2%イソフルランガスで麻酔後、D-luciferin 溶液を 10 mL/kg 体重で腹腔内に投与した。D-luciferin 投与直後から、25 分後までの頭部の発光量を背中側から 1 分毎に連続測定した。発光量測定には IVIS Lumina II (住商ファーマ) を使用した。各日齢における発光量の変化を表したグラフには、連続測定で得られたデータのうち発光量がピークを示した時点の値を使用した。得られたデータについて Living Image (住商ファーマ) を用いて解析し、頭部の発光強度

を Total flux (photon/second) として定量化した。

4. 統計学的解析

データは全て平均値±標準誤差で表し、統計学的処理には解析ソフト SPSS 15.0J for Windows (SPSS) を用いた。対応のない t 検定を行い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

C. 研究結果

1. MMI 飲水投与系を用いた検討

マウスを用いた妊娠期の甲状腺機能低下の誘導については、MMI を用いた先行研究 [Kawahori et al., *Thyroid* 28:395 (2018)] が報告されていたため、まずはこれに準じて検討を行った。0.025% MMI を飲水投与して検討を行ったところ、母動物の体重増加への影響は確認されなかった (図 1B)。しかし母動物の飲水量に関しては、対照群の半分程度であった (図 2A)。児動物では、雌雄ともに 0.025% MMI 投与群で P10~P16 の数ステージにおける体重の増加傾向が観察された (図 3A)。これらの児動物の脳について *in vivo* イメージング解析を行ったところ、P4~P13 の出生後間もない時期において 0.025% MMI 投与群でレポーター遺伝子の発現が高くなる傾向が認められ、雄では P7 と P19 で、雌では P4 で有意な上昇が確認された (図 3B)。

先行研究 [Kawahori et al., *Thyroid* 28:395 (2018)] によると、0.025% MMI 飲水投与では軽微な甲状腺機能低下 (すなわち母体の T3/T4 の低下は誘導されるが、TSH の上昇は伴わない状態) の誘導に留まっていると報告されているため、TSH の上昇を伴う甲状腺機能低下を誘導するために、飲水中の MMI 濃度を 0.01% に引き上げて実験を行った。体重増加への影響については、交配前には確認されなかったが、交配後は若干の抑制傾向が認められた (図 1C)。母動物の飲水量に関しては、0.025% MMI 投与時と同様に対照群の半分程度であった (図 2B)。児動物では、0.025% MMI 投与群で確認されたような体重の増加傾向は観察されなかった (図 4A)。またこれ

らの児動物の脳における *in vivo* イメージング解析についても、対照群と比較して特段の変化は確認できなかった (図 4B)。

2. PTU 混餌投与系を用いた検討

前項の検討で、MMI 飲水投与においては、児動物の脳の *in vivo* イメージングへの影響に MMI の用量依存性が確認されなかったが、母動物の飲水量に有意な減少が観察され (図 2)、その影響が懸念された。一方で最近、ラットを用いた検討で PTU を混餌投与することで TSH の上昇を伴う T3/T4 の低下を誘導することが報告された [須藤英典ら、第 48 回日本毒性学会学術年会]。そこでマウスにおいてもこの条件で甲状腺機能低下の誘導ができることを期待して、*in vivo* イメージング解析を行った。

膾プラグを確認した母動物に胎齢 6.5 日 (E6.5) より 10 ppm PTU 混餌投与を行なったところ、妊娠期の母動物体重増加は対照群よりも有意に高かったが、授乳期においてはそのような傾向は観察されなかった (図 5B)。母動物の摂餌量に関しては、妊娠期、授乳期ともに特段の影響は認められなかった (図 5C)。一方で児動物では、雌雄共に PTU 投与群で体重が有意に小さかった (図 6A)。またこのような児動物の脳における *in vivo* イメージング解析では、雌雄共にレポーターの発現が高くなる傾向が認められ、特に P4~P7 については 0.025% MMI 投与時よりも明確かつ有意な上昇が観察された (図 6B)。

D. 考察

抗甲状腺薬により児動物の脳のレポーター遺伝子の発現上昇が認められたことから、神経細胞分化・成熟に何らかの影響がある可能性が示された。MMI の飲水投与では飲水量が対照群の半分程度にまで減少していたが、これは MMI に苦味があることが原因であると考えられた。MMI 投与による用量依存性を観察することができなかった理由として、0.025% 飲水投与時より 0.1% 飲水投与時の方が飲水量が若干少なく、この影響のよ

り総摂取量としてはほとんど変わらなかったことが考えられた。また、一般に、妊娠期には非妊娠期よりも多めの水分補給が推奨されており、本モデルマウス群の飲水量減少は児動物へ甲状腺機能低下以外の羊水の過少等に起因する二次的な影響を与える可能性が考えられた。加えて、MMI は催奇形性も懸念されていることから、甲状腺機能低下の影響のみによる次世代影響評価は PTU を用いる方が好ましいと判断された。

MMI 飲水投与系、PTU 混餌投与系で得られた甲状腺機能低下の児動物への影響としては、1. 妊娠マウスの体重増加減少傾向、2. 生後直後~P10 にかけての Syn-Rep マウスレポーター遺伝子発現増強傾向が挙げられる。したがって SynRep マウスは、妊娠期の甲状腺機能低下による児動物脳への影響を検出できる可能性が示された。一方で、児動物の体重へに影響に関しては両者で一貫した結果は得られておらず、さらなる検討が必要と考えられた。

PTU を曝露した児動物脳の *in vivo* イメージングの発光パターンは、DNT 陽性対照物質である VPA を曝露した結果 (発光減少) とは対称的な結果となった。このことは、DNT に至るメカニズムが決して単一なものではなく、多様であることを支持していると考えられる。今後は、SynRep マウスを用いることで影響を受ける部位を同定し、これらの系の相違・類似性を、遺伝子発現や組織学的手法を用いて解析・整理する必要があると考えられる。

PTU は MMI よりも抗甲状腺作用は弱いとされているものの、本検討においては混餌投与した際の摂餌量に影響が認められなかった。このことから、PTU の混餌投与系の方が今後用量依存性等を検討するのにも適していることが示唆された。また PTU 混餌投与系は、ラットにおいても妊娠期の甲状腺機能低下を再現できることが明らかになっていることから、Syn-Rep マウスで得られた結果をラットに落とし込める可能性が期待される。さらに MMI 飲水投与系よりも投与期

間が短いので、試験期間も短くて済む。これらの利点を考慮して今後は PTU 混餌投与の系を用いて、マウスにおける甲状腺関連指標の検討等を進めていく予定である。

E. 結論

抗甲状腺薬は、妊娠期のマウスに甲状腺機能低下をもたらす結果、児動物の脳の神経細胞分化・成熟に何らかの影響を与える可能性が示唆された。Syn-Rep マウスは妊娠期甲状腺機能低下時における児動物脳への影響を検出する有効なツールとなる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

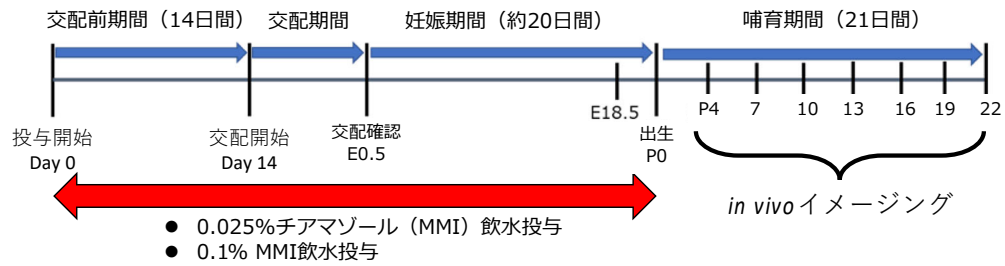
2. 学会発表

1. 石田慶士、南川祥輝、森 一馬、**松丸大輔**、**中西 剛**：新規発達神経毒性評価系開発に向けた神経分化トレーサーマウスの解析，第 48 回日本毒性学会学術年会，神戸／Web，2021 年 7 月
2. 南川祥輝、石田慶士、森 一馬、辰巳佳乃子、**松丸大輔**、**田熊一徹**、**中西 剛**：神経分化トレーサーマウスを用いた新規発達神経毒性評価系の有用性検証，フォーラム 2021：衛生薬学・環境トキシコロジー，船橋／Web，2021 年 9 月

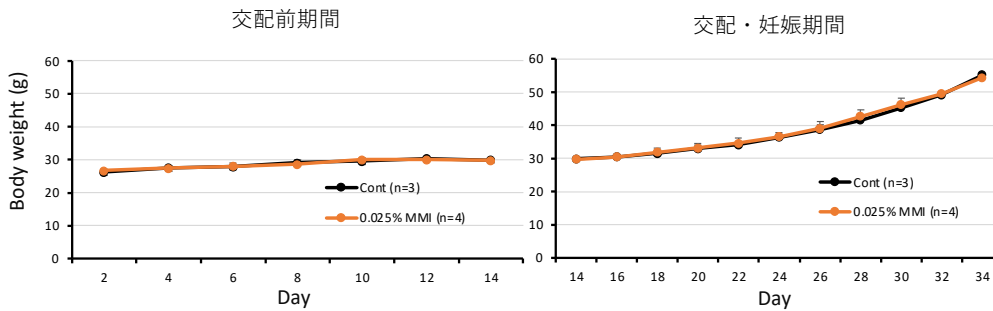
G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

A. チアマゾール (MMI) 飲水投与プロトコール



B. 0.025% MMI投与 母動物の体重変化



C. 0.1% MMI投与 母動物の体重変化

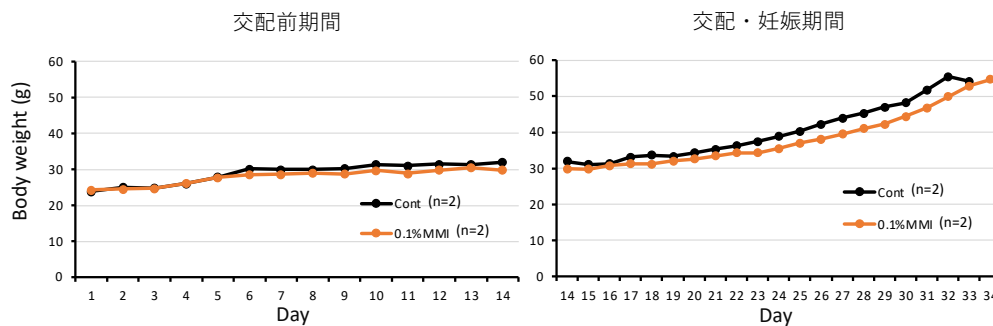
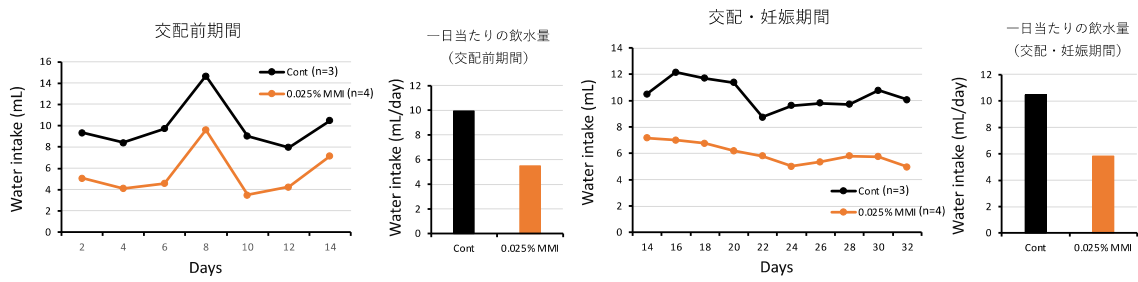


図1 MMI 飲水投与系甲状腺機能低下モデルの投与スケジュールと母動物の体重変化

MMI 飲水投与による甲状腺機能低下誘導モデルの作成プロトコール (A)。MMI 飲水投与を開始し、交配開始までの14日間 (B、C：左側) 及び交配を開始してからの母動物の体重を測定した。解析した母動物の数は B. 0.025%投与群：n=4、対照群：n=3；C. 0.1%投与群：n=2、対照群：n=2 であった。

A. 0.025% MMI投与 母動物の飲水量変化



B. 0.1% MMI投与 母動物の飲水量変化

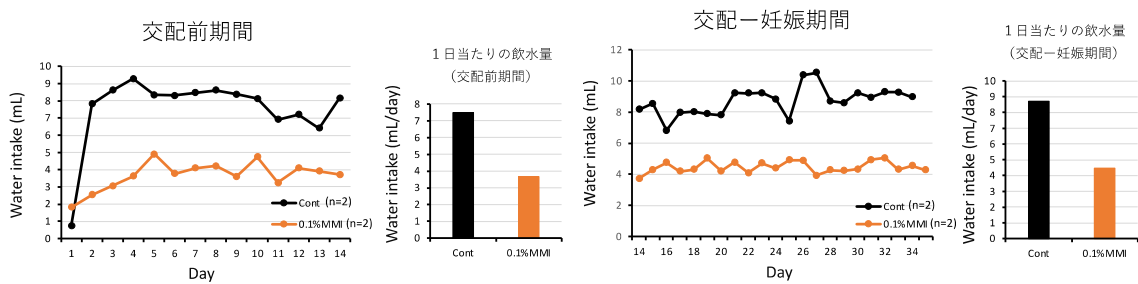
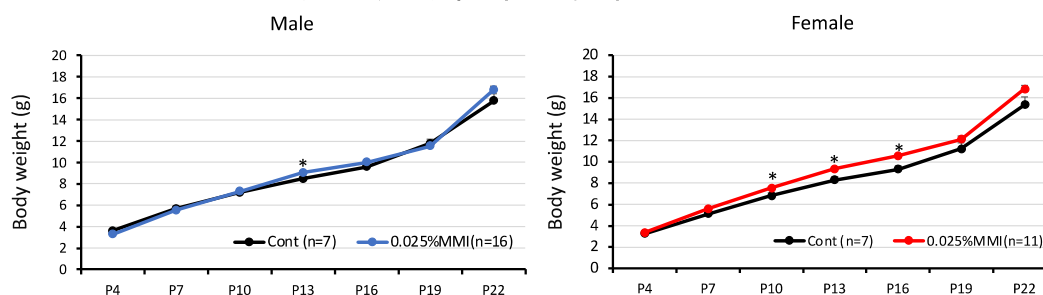


図2 MMI投与母動物における飲水量の変化

交配前期間（左）、及び交配・妊娠期間（右）における母動物の飲水量を測定した。解析した母動物の数は A. 0.025%投与群：n=4、対照群：n=3；B. 0.1%投与群：n=2、対照群：n=2であった。

A. 0.025% MMI投与 児動物 体重変化



B. 0.025% MMI投与 児動物 *in vivo* イメージング

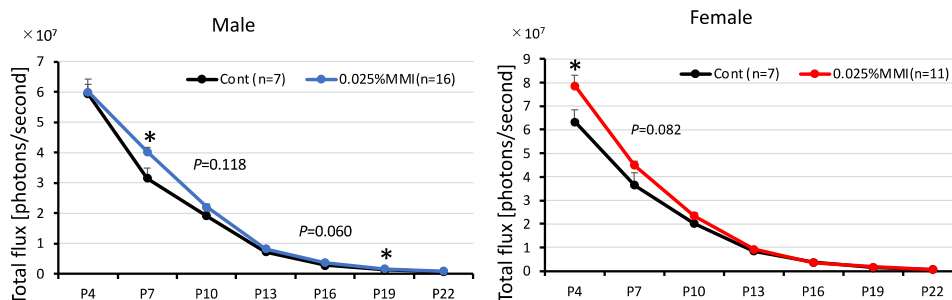
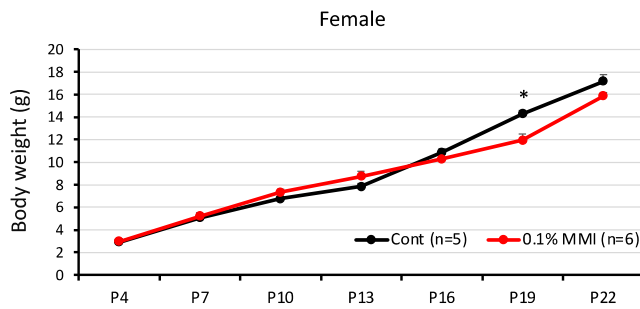


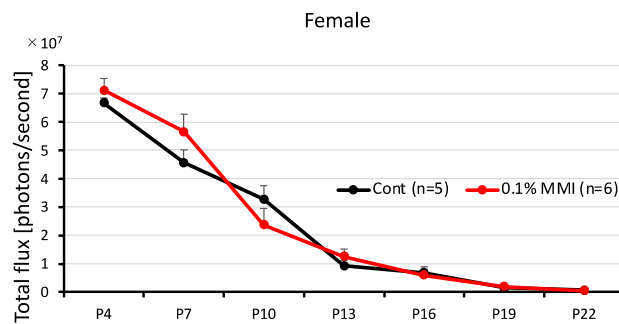
図3 0.025% MMI 飲水投与をした児動物の体重変化及び脳部位の *in vivo* イメージング解析

0.025%のMMIを飲水投与した母動物より産まれた児動物の出生後4、7、10、13、16、19、P22における体重変化の測定(A、左側：雄性、右側：雌性)及び脳部位の経時的な*in vivo*イメージング解析(B、左側：雄性、右側：雌性)を行なった。*in vivo*イメージング解析は、D-luciferin/PBS溶液をi.p投与して行い、頭部の発光強度をTotal fluxとして定量化した。* $P < 0.05$ (unpaired t test)。解析した児動物の数は0.025%投与群：雄性 n=16、雌性 n=11、対照群：雄性 n=7、雌性 n=7であった。

A. 0.1% MMI投与 児動物 体重変化



B. 0.1% MMI投与 児動物 *in vivo* イメージング

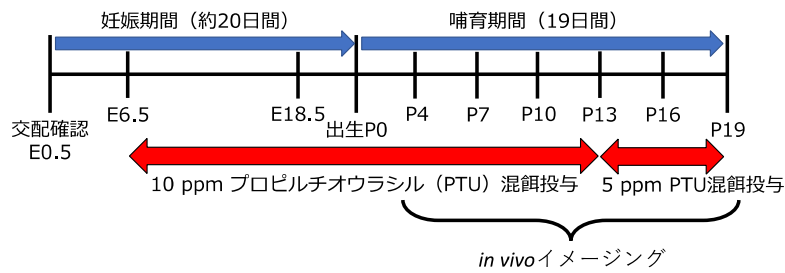


※♂は投与群がn=1であるため、データを示していない

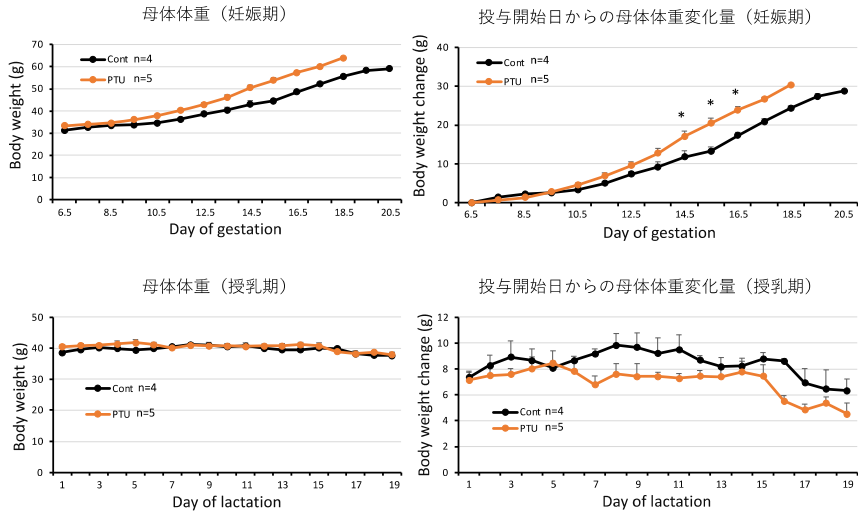
図4 0.01% MMI 飲水投与した雌性児動物の体重変化および脳部位の *in vivo* イメージング解析

0.01%の MMI を飲水投与した母動物より産まれた雌性児動物の P4、P7、P10、P13、P16、P19、P22 における体重変化の測定 (A) 及び脳部位の経時的な *in vivo* イメージング解析 (B) を行なった。*in vivo* イメージング解析は、D-luciferin/PBS 溶液を i.p 投与して行い、頭部の発光強度を Total flux として定量化した。* $P < 0.05$ (unpaired t test)。解析した児動物の数は 0.1%投与群：雌性 n=6、対照群：雌性 n=5 であった。

A. プロピオチオウラシル (PTU) 混餌投与プロトコール



B. PTU混餌投与 母動物の体重変化



C. PTU混餌投与 母動物の摂餌量

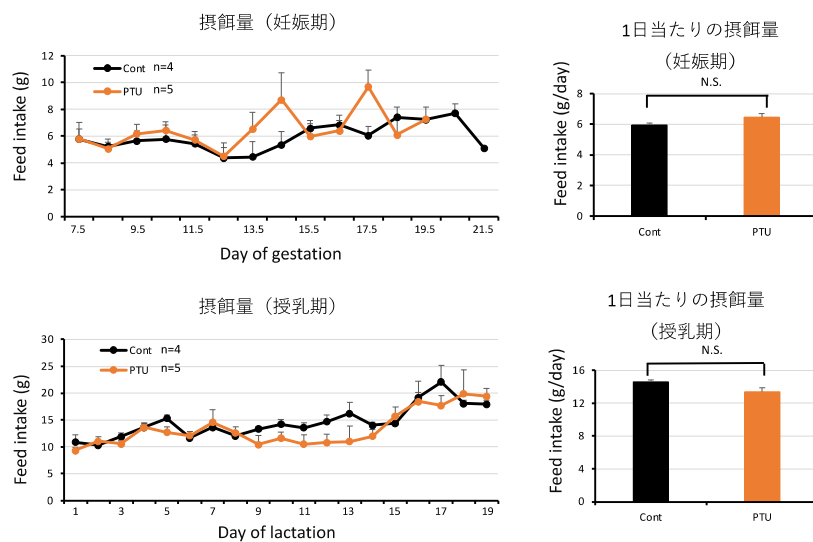
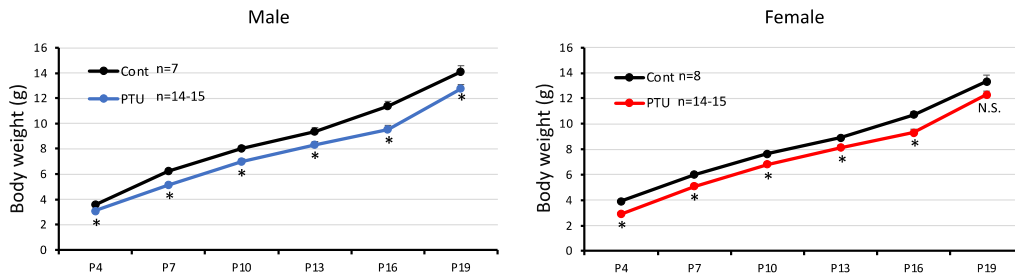


図5 PTU混餌投与系甲状腺機能低下モデルの投与スケジュールと母動物への影響

PTU 混餌投与による甲状腺機能低下誘導モデルの作成プロトコール (A)。胎齢 6.5 日 (E6.5) より PTU 混餌投与を開始し、児動物出生まで (B: 上側)、授乳期 (B: 下側) の母動物の体重を測定し変化量を解析した。また、児動物出生まで (C: 上側)、授乳期 (C: 下側) の母動物の摂餌量を測定し、1日あたりの摂餌量を算出した。解析した母動物の数は PTU 投与群: n=5、対照群: n=4 であった。N.S.: not significant、*P < 0.05 (unpaired t test)。

A. PTU混餌投与 児動物の体重変化



B. PTU混餌投与 児動物 *in vivo* イメージング

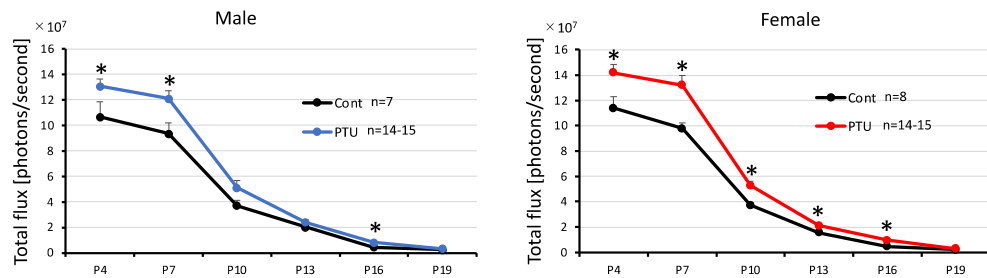


図6 PTU混餌投与した雌性児動物の体重変化および脳部位の *in vivo* イメージング解析

PTUを混餌投与した児動物のP4、P7、P10、P13、P16、P19、P22における体重変化測定(A)及び脳部位の経時的な *in vivo* イメージング解析(B)を行なった。*in vivo* イメージング解析は、D-luciferin/PBS溶液をi.p投与して行い、頭部の発光強度をTotal fluxとして定量化した。 $*P < 0.05$ (unpaired t test)。解析した児動物の数はPTU投与群：雄性n=14-15、雌性n=7、対照群：雄性n=14-15、雌性n=7であった。

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究
(21KD1004)

分担研究課題名：甲状腺ホルモン関連指標の変動を考慮したヒト細胞試験法の構築
研究分担者：諫田 泰成（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部・部長）

研究要旨

大規模疫学調査によって妊婦の甲状腺ホルモン低下と出生児の知能低下との間に明らかな相関性が認められたことに関する懸念が高まっており、様々な化合物の毒性を評価するOECDの試験法ガイドラインでも発生毒性試験やその他の試験で動物（発生毒性試験においては母動物）の甲状腺ホルモン及び甲状腺刺激ホルモンの定量的評価を追加する等の措置が取られた。

本分担研究では、ヒトiPS細胞に着目して甲状腺機能影響を評価可能な*in vitro*評価法の確立を目指している。初年度の令和3年度は、まずヒトiPS細胞を用いて甲状腺ホルモン受容体（THR）の発現をリアルタイムPCRにより検討した。その結果、未分化のヒトiPS細胞にはTHR α とTHR β の両方のアイソフォームが発現していることが明らかになった。神経分化におけるTHR β の発現変化について検討したところ、分化誘導にともないTHR α の発現亢進が観察されたが、THR β には影響が認められなかった。次に、ヒトiPS細胞を用いて甲状腺ホルモン受容体THR α のノックダウンを行い、甲状腺機能低下モデルを作製した。本モデルを用いて神経分化能の検討を行った結果、発達神経毒性が懸念されている医薬品バルプロ酸（VPA）曝露によりTHR α をノックダウンしたヒトiPS細胞の神経分化阻害が認められた。従って、本モデルは甲状腺機能低下時の化学物質影響を評価できる可能性が示唆された。

今後、他の化学物質の影響を調べて、本モデルの有用性を明らかにする必要がある。

A. 研究目的

欧米諸国では、大規模疫学調査によって妊婦の甲状腺ホルモン低下と出生児の知能低下との間に明らかな相関性が認められたことに関する懸念が高まっており（Gilbert et al., *Neurotoxicology*, 2012）、様々な化合物の毒性を評価するOECDの試験法ガイドラインでも発生毒性試験やその他の試験で動物（発生毒性試験においては母動物）の甲状腺ホルモン及び甲状腺刺激ホルモンの定量的評価を追加する等の措置が取られた。

また甲状腺に対する何らかの影響が観察された化合物について、発達神経毒性（DNT）試験実施の必要性を判断するために、Comparative Thyroid Assay（CTA）という新たな*in vivo*試験法が提案され、試験実施のtriggerやこれらの試験で得られるデータの解釈について、各国のリスク評価当局者による議論や意見交換が続いている。

このような背景のもと、*in vitro*で甲状腺機能低下の影響を評価できるアッセイ系があれば、メカニズムベースに機能解析が進み、また3Rsの促進にもつながることが期待さ

れる。

ヒトiPS細胞はヒト発生過程を*in vitro*で模倣できることから、化学物質の神経毒性を検出できることが示唆されているため、甲状腺機能低下症に認められる化学物質影響にも応用できる可能性がある。

そこで、本研究では、甲状腺機能低下モデルのヒトiPS細胞の作製を行った。未分化のヒトiPS細胞にはTHR α とTHR β の両方のアイソフォームが発現していること、神経分化誘導にともないTHR α のみ発現亢進が観察されたことから、甲状腺ホルモン受容体THR α をノックダウンしたヒトiPS細胞を作製した。さらに、本研究班で共通の化学物質として発達神経毒性の陽性対照物質のリストから選定したバルプロ酸（VPA）を用いて、ATP産生能や神経分化能を指標に化学物質の影響を検討した。

B. 研究方法

1. 細胞

ヒトiPS細胞株253G1（Nakagawa et al., *Nat. Biotechnol.*, 2008）は、TeSR-E8培地（Stem Cell

Technologies) にてフィーダーフリー [マトリゲル (BD Biosciences) コート] の条件で培養した。

2. 外胚葉分化

外胚葉への分化は Dual smad 阻害法 (Chambers et al., *Nat. Biotechnol.*, 2009) に従い、BMP シグナル阻害剤 LDN193189 (Wako) 及び Activin シグナル阻害剤 SB431542 (Wako) を用いてヒト iPS 細胞を 4 日間培養した。

3. ATP 量

ATP determination kit (Thermo Fisher Scientific) によるルシフェラーゼ法に基づいて定量した。

4. qPCR

TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用いて RNA を抽出した。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN)、ABI PRISM 7900HT を用いて qPCR を行った。

5. shRNA によるノックダウン

shRNA 導入はレンチウイルス (SIGMA) を用いた。ヒト iPS 細胞にウイルスを moi 1 で感染させた。さらに 24 時間後にピューロマイシンを添加して感染細胞のセレクションを行った。

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞における THR α 、 β の発現

ヒト iPS 細胞には THR α と THR β の両方のアイソフォームが発現していることを qPCR で確認した (図 1)。比較として未分化マーカーである Nanog を示した。

2. ヒト iPS 細胞に神経分化に伴う THR α 、 β の発現変化

次に、ヒト iPS 細胞に神経分化に伴う THR α と THR β の発現変化を調べた。その結果、神経分化誘導にともない THR α のみ発現亢進が観察された (図 2)。

3. shRNA を用いたヒト iPS 細胞における THR α のノックダウン

まずヒト iPS 細胞の化学物質に対する応答性に対する THR α の影響を検討するために、shRNA を用いて THR α のノックダウンを行った。レンチウイルスを用いて iPS 細胞に THR α shRNA を導入した後、感染細胞をピューロマイシンで選択した。さらに 3 日後に RNA を回収して qPCR を行った結果、scramble control を導入した細胞に比べて約 93% の THR α ノックダウンが認められた (図 3)。

4. THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の ATP 産生に対する VPA 曝露の影響

次に、THR α をノックダウンした iPS 細胞に VPA (100 μ M) を曝露し、ATP 産生能に対する影響を調べた。ヒト iPS 細胞へ VPA を曝露しても ATP 産生に影響は無かった (図 4, left panel)。また THR α ノックダウンした iPS 細胞に VPA 曝露しても、scramble control を導入した細胞と比べて ATP 産生に変化は無かった (図 4, right panel)。

5. THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経分化に対する VPA 曝露の影響

さらに THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞に VPA を曝露 (100 μ M) し、神経 (外胚葉) 分化能に対する影響を調べた。ヒト iPS 細胞の神経分化時に VPA を曝露したところ、分化マーカーである PAX6 の発現はわずかに減少した (図 5, left panel)。一方、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に VPA を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて分化マーカーである PAX6 の発現が約 64% 抑制された (図 5, right panel)。したがって、THR α は VPA の発達神経毒性に関与している可能性が考えられた。

以上より、甲状腺機能低下症のモデルとして THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞が有用である可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、 $THR\alpha$ をノックダウンしたヒト iPS 細胞を用いて、本研究班で共通の DNT 陽性対照物質として使用している VPA の影響を解析した。エンドポイントとして ATP 産生を指標とした解析では iPS 細胞、 $THR\alpha$ ノックダウンした iPS 細胞において VPA に対する細胞応答には大きな違いは認められなかった。一方、神経分化を指標とした解析では $THR\alpha$ ノックダウンしたヒト iPS 細胞では、VPA による神経分化抑制が認められた。このことから、VPA によるヒト発達期の神経毒性に $THR\alpha$ が関与していることが示唆される。

THR には α と β のアイソフォームが存在しており、ノックアウトマウスを用いた研究では、 $THR\alpha$ は神経発生に関係するが、脳における $THR\beta$ はフェノタイプが認められていない (Krieger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2019)。また、分化誘導にともない $THR\alpha$ の発現が選択的に亢進したことから、今回は $THR\alpha$ を優先的に評価した。しかしながら、 $THR\alpha$ と β の機能的な違いについては明らかにされておらず、甲状腺機能低下による子どもの影響を考慮する上でどちらがより重要であるのかは慎重に検討する必要がある。

今後は、鉛等の重金属やクロルピリホスを初めとする農薬など発生毒性や神経毒性が懸念されている他の化学物質に焦点を当て

て同様に曝露影響の解析を行い、本モデルの有用性を明らかにしていく予定である。

E. 結論

$THR\alpha$ をノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経分化を指標にして、甲状腺機能低下時における化学物質の発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。本モデルは甲状腺機能低下時の化学物質影響を評価できることが考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 諫田 泰成、安彦 行人：ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性評価法の現状と今後の展望、日本薬学会第 142 年会シンポジウム、オンライン、2022 年 3 月 27 日
2. 諫田 泰成：インビトロ発達神経毒性評価法の現状と今後の課題、第 61 回日本先天異常学会学術集会シンポジウム、オンライン、2021 年 8 月 8 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

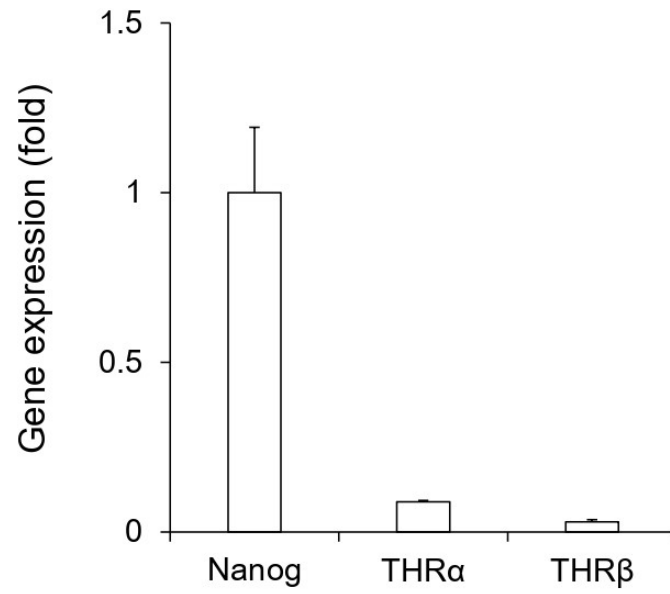


図1 ヒト iPS 細胞における THR の発現

ヒト iPS 細胞における THRα, THRβ の発現を qPCR で調べた。比較として未分化マーカー Nanog を用いた。

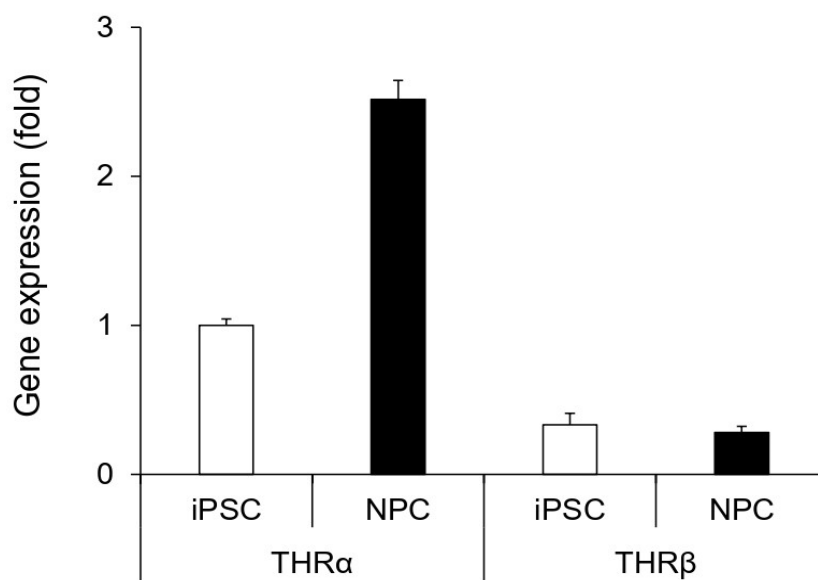


図2 ヒト iPS 細胞の神経分化による THR の発現変化

ヒト iPS 細胞の THR α , THR β の発現を神経分化前後で比較検討した。

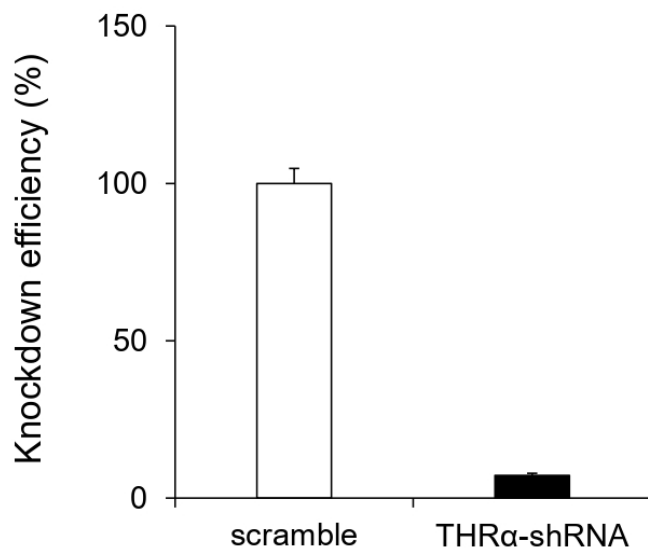


図3 ヒト iPS 細胞の THRα ノックダウン

ヒト iPS 細胞に THRα に対するレンチウイルス shRNA を導入後した後、THRα のノックダウン効率を qPCR により調べた。

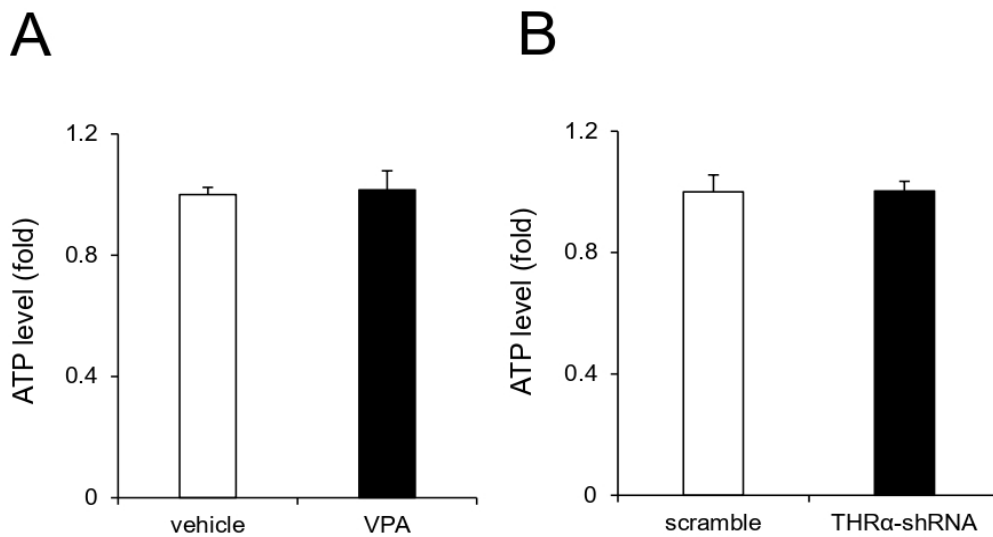


図4 THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の ATP 産生に対する VPA 曝露の影響

ヒト iPS 細胞に VPA (100 μ M) を曝露して 24 時間後に細胞内 ATP 量を調べた。

(A) ヒト iPS 細胞に対する VPA 曝露の影響

(B) THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対する VPA 曝露の影響

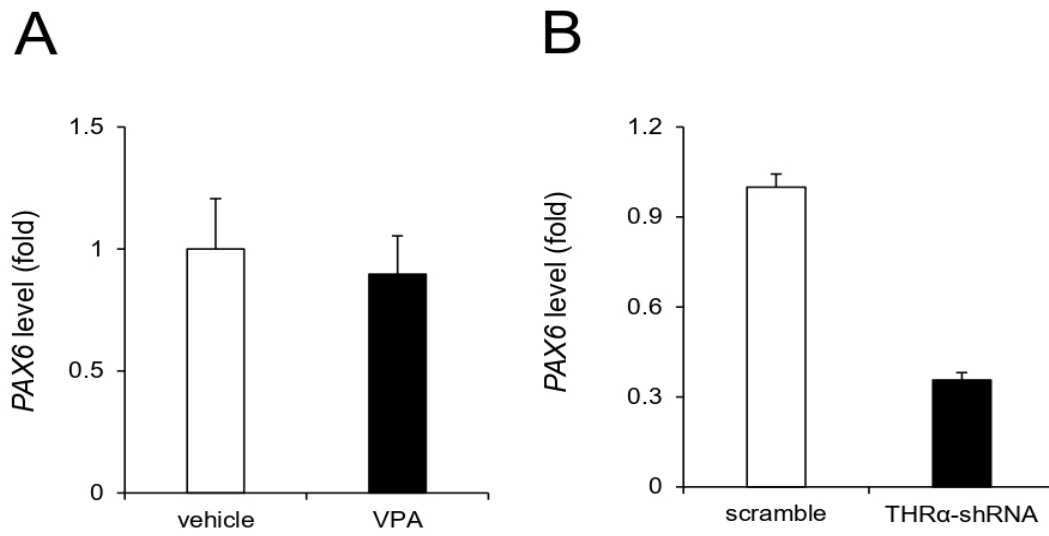


図 5 THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経分化に対する VPA 曝露の影響

VPA (100 μ M) を曝露したヒト iPS 細胞に神経分化誘導を行い、4 日目に神経分化マーカー PAX6 の発現を調べた。

(C) ヒト iPS 細胞に対する VPA 曝露の影響

(D) THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対する VPA 曝露の影響

別添5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
中西 剛	内分泌かく乱に起因する生殖発生毒性評価の問題点とその将来展望 (総説)	ファルマシア	58	44-49	2022

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 岐阜薬科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 原 英彰

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬学部・教授
(氏名・フリガナ) 中西 剛・ナカニシ ツヨシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 岩手医科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 祖父江 憲治

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 医学部・助教
(氏名・フリガナ) 村嶋亜紀・ムラシマ アキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人 大阪大学

所属研究機関長 職 名 大学院歯学研究科長

氏 名 今里 聡

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院歯学研究科・教授

(氏名・フリガナ) 田熊 一徹・タクマ カズヒロ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 岐阜薬科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 原 英彰

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 薬学部・講師
(氏名・フリガナ) 松丸 大輔・マツマル ダイスケ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬理部・部長
(氏名・フリガナ) 諫田 泰成・カンダ ヤスナリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。