

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4年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中西 剛

令和4年（2023年）5月

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 .....	16
1. 妊娠期～離乳期の甲状腺機能変動による次世代影響の検討～妊娠期の甲状腺機能低下時における胎児発生への影響～	
中西 剛、村嶋亜紀 .....	17
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	
田熊一敬 .....	40
3. 妊娠期～離乳期の甲状腺機能変動による次世代影響の検討～Syn-Rep マウスを用いた児動物脳発達に対する影響の検証～	
松丸大輔 .....	59
4. 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	
諫田泰成 .....	66
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	75

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 厚生太郎 (資料) ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ のアンケート調査用紙	----- 1
II. 分担研究報告	
1. △ △ △ △ △ △ △ △ に関する研究 厚生一郎 (資料) 資料名	----- 30
2. □ □ □ □ □ □ □ □ に関する研究 厚生二郎 (資料) 資料名	----- 60
3. ▽ ▽ ▽ ▽ ▽ ▽ ▽ ▽ に関する研究 厚生三郎 (資料) 資料名	----- 80
4. ◎ ◎ ◎ ◎ ◎ ◎ ◎ ◎ に関する研究 厚生四郎 (資料) 資料名	----- 100
5. ◇ ◇ ◇ ◇ ◇ ◇ ◇ ◇ に関する研究 厚生五郎 (資料) 資料名	----- 120
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 Matsumura, Kazuki Nagayasu, Yoshinori Tsurusaki, Noriko Miyake, Hidenaga Yamamori, Yukia 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>PCGZ<sup>WT/Q103R</sup></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 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 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		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。

「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。

令和4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4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、マウスにおいて抗甲状腺薬プロピルチオウラシル（PTU）を様々な用量で母動物に曝露し、妊娠期から甲状腺機能を低下させた際の甲状腺関連指標の変動と児動物への影響の相関を検討した。特に脳発達への影響については、児動物脳の神経発達状態を非侵襲的にトレースできると期待されるレポータートランスジェニックマウス（Syn-Repマウス）を用いて検討を行った。また前述の *in vivo* 実験で得られた結果を基に、ヒトiPS細胞などを用いて甲状腺関連指標の変動による次世代影響を評価できる *in vitro* 試験法の構築を試みると共に、甲状腺機能低下時における遺伝子発現変動の網羅的解析も試みた。

その結果、今年度は以下のことを明かにした。

1. 出生前発生毒性試験（TG414）の結果、妊娠中に母体の甲状腺機能が完全に抑制されても、児の着床や骨格・臓器形成等にはほとんど影響がないことが確認された。
2. 妊娠期の母体甲状腺機能低下における次世代影響を評価するための最適なPTUの投与条件見出し、ラットとの種差について議論できるデータを得た。
3. Syn-Repマウスは、発達期脳の神経細胞の構築状態を非侵襲的にトレースできたことから、DNT評価におけるNew Approach Methodology（NAM）としての有用性が示された。
4. Syn-Repマウスを用いた検討により、児動物脳への影響は母体血中の甲状腺関連ホルモンに変動が認められない軽度の甲状腺機能低下時においても起こる可能性が示唆された。
5. ヒトiPS細胞を用いた神経細胞分化誘導モデルにより、甲状腺ホルモン受容体（THR） $\alpha$ が神経細胞分化に重要であるとともに、THR $\alpha$ の発現抑制がDNT陽性対照化学物質に対して併用効果を示すことが確認された。

以上より、甲状腺機能低下による次世代影響は、脳以外では認められなかったことから、妊娠～離乳期の母体甲状腺機能低下における次世代影響は脳が最も鋭敏なエンドポイントである可能性が示された。また 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～離乳期に甲状腺機能を低下させた際の、脳神経系構築への影響の詳細を解明すると共に、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）の全容解明を試みる。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・准教授
村嶋亜紀	岩手医科大学 医学部・講師

## 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) の上昇および/または遊離チロキシン (fT4) 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 年に既存の経済協力開発機構 (OECD) 関連ガイドライン試験において甲状腺関連指標の検討が追加された。しかし発達神経毒性 (DNT) の有無を判定するガイドライン試験 (TG426 など) を実施するには、多大な資源と労力 (コスト) が掛かることから、甲状腺関連指標の変動を化学物質のリスク管理に活用するためのスキームの確立には至っていない。またこの問題を解決するために、米国環境保護庁 (EPA) が 2005 年にガイダンスとして提唱した Comparative Thyroid Assay (CTA) が DNT スクリーニング試験として有望視されているが、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。

この場合の議論の対象となる影響は、決して先天性甲状腺機能低下症 (クレチン症) のような極端な症状を誘導するものではなく、甲状腺ホルモンが児の発達に必要とされる

臨界期にホメオスタシスの許容範囲を超えて変動する程度の影響である。また甲状腺機能低下の影響は、種差が大きいことも考慮する必要がある。したがって化学物質曝露により誘導される甲状腺関連指標の変動をリスク評価に生かすためには、母体の甲状腺関連指標の変動と次世代影響、特に脳発達との因果関係を明らかにするとともに、種差をも考慮した学術的基盤を構築する必要があると考えられる。

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、DNT や発生毒性を初め、化学物質による発達期の甲状腺機能低下時の毒性評価系構築や作用機構解明への応用も期待される。

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を、DNT 陽性対照物質のリストから選定したバルプロ酸ナトリウム (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、DNT 陽性対照物質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。また全ての実験において、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 ガイドライン試験に準じて、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。

### **2. 抗甲状腺薬の投与**

PTU (6-プロピル-2-チオウラシル、Sigma-Aldrich #P3755) の混餌投与は、PTU を完全調整食の AIN-93M (日本クレア) に各濃度に

なるように混餌し、妊娠マウスに妊娠 6 日目 (GD6) から自由摂取させた。出生後も母動物に PTU 混餌食を継続して与える場合は、P13~P21 の期間は児動物の摂食も始まるため、混餌食の PTU 濃度を各群 1/2 に減量した (P63:図 1A)。

### **3. 薬物の投与**

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ある GD12.5 日時に VPA 500 mg/kg を腹腔内に単回投与した。MIA モデルマウス作製には合成二本鎖アナログである Polyinosinic acid-polycytidylic acid (Poly(I:C)) するウイルス感染模倣モデルを用いた。Poly(I:C) の投与は MIA の誘導が報告されている GD12.5 に 20 mg/kg を腹腔内に単回投与した。いずれの実験も、対照群には生理食塩水を投与した。

### **4. 出生前発生毒性試験**

出生前発生毒性試験は ICR マウスを用い、OECD TG414 のプロトコールに準じて実施した。PTU 混餌食 (2、10、50 および 250 ppm (w/w)) を GD6 から GD18 まで自由摂取させた。GD18 に母体をイソフルラン深麻酔下で開腹し、後大静脈より全採血して安楽死させた。放血致死後に速やかに子宮を摘出した。主要臓器の異常の有無を肉眼で観察し、甲状腺及び異常の認められた器官は 4%パラホルムアルデヒド (PFA、ナカライテスク) で固定後、パラフィン切片を作成し、組織像を HE 染色で観察した。

母動物の子宮、卵巣および胎盤は、状態を外側から肉眼的に観察した後、重量を測定した。子宮については着床数を数え、胎仔を摘出後に、胚死亡または胎仔死亡および生存胎仔の数を調べた。受胎産物の相対死亡時期を推定するために、吸収の程度を観察した。

胎仔については、性別の確認と重量測定を行い、生存胎仔については肛門・生殖結節間距離 (AGD) の測定と、実体顕微鏡 (ライカ) にて外表異常の有無を検査した。また生存胎仔については、イソフルラン深麻酔下で固定



液に浸漬または放血により安楽死させ、骨格および内臓の異常（変異および奇形・異常など）の有無を検査した。

## 5. 血清中マーカーの測定

血清中の各甲状腺関連ホルモンの測定は残留農薬研究所に依頼した。また血清中の各種生化学的パラメーターの測定はオリエンタル酵母に依頼した。

## 6. 血清中 IL-6 の測定

血清中の各甲状腺関連ホルモンの測定は残留農薬研究所に依頼した。また血清中の各種生化学マーカーの測定はオリエンタル酵母に依頼した。

## 7. *in vitro* ルシフェラーゼアッセイ

母動物または Syn-Rep マウス児動物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  $\mu\text{g}$  量当たりのルシフェラーゼ活性（photons/second/ $\mu\text{g}$  protein）を算出した。

## 8. 脳の組織学的解析

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% PFA 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、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% PFA で組織を固定した。全脳をパラフィン包埋し、厚さ 5  $\mu\text{m}$  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。

## 9. *in vivo* イメージング解析

出生後から発達期（P4~P22）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。

## 10. 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  $\times$  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。

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。

## 11. 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。

細胞内の ATP の定量は、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。

## 12. mRNA 発現量の評価

培養細胞については、TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用いて mRNA を抽出した。各種神経系マーカーの mRNA 発現量評価は、QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN)、ABI PRISM 7900HT を用いて qPCR を行った。

## 13. NGS 解析

THR $\alpha$  ノックダウンした細胞 (外胚葉) より mRNA 抽出を行い、Novogene 社に委託した。scramble control に対して THR $\alpha$  ノックダウンした細胞 (外胚葉) で発現が低下している遺伝子の探索を行った。

## 14. 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) もしくは Prism 9 (GraphPad Software) を用いた。母動物データ・胎児データ及び化骨進行度については Bartlett 検定を実施し、有意であった場合は Steel 検定を、

有意でなかった場合には Dunnett 検定を実施した。肉眼的病理検査、外表検査、内臓検査及び骨格検査については、Fischer の直接確率法により検定した。データは全て「平均値±標準偏差」で表し、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. 母体甲状腺機能低下時における胎児発生への影響

#### 1-1. PTU 投与による母体甲状腺関連指標への影響

PTU を投与した母動物の GD18 における血清中甲状腺ホルモンレベルについて検討を行ったところ、50、250 ppm 投与群においてトリヨードチロニン (T3)、チロキシン (T4) の有意な低下および TSH の有意な上昇が認められた (P26:図 1)。また甲状腺の組織学的解析についても検討を行ったところ、血清中甲状腺ホルモンレベルの変動を反映して、色調変化、濾胞細胞の顕著な肥厚、コロイド部分の欠失が観察された (P27:図 2)。以上の結果より、PTU 50、250 ppm では顕著な甲状腺機能低下が誘導されることが明らかとなった。さらに甲状腺の組織学的解析においては、これらの用量群に加え、10 ppm においても濾胞細胞のわずかな肥厚が観察された。

#### 1-2. PTU 投与による母体へのその他の影響

PTU を投与した母動物の体重や子宮重量について、顕著な変化は認められなかった (P29:表 1、P30:表 3)。母動物の摂餌量については、GD6 から GD18 までの総摂餌量が PTU 250 ppm 投与群で対照群と比べて有意な減少が認められたが、PTU 2、10、50 ppm 投与群では変化は認められなかった (P30:表 2)。

また血清中の生化学的パラメーターについても評価を行ったところ、50、250 ppm で Ca の低下 (P28:図 3H)、250 ppm で総コレステロール (P28:図 3O) および LDL コレステロール (P28:図 3Q) の上昇が認められた。ま

た、50 ppm で尿素窒素の低下 (P28:図 3C)、10 ppm で総ビリルビンの上昇 (P28:図 3S) が認められた。

### 1-3. PTU 投与による胎仔発生への影響

妊娠状況および胎仔への影響について、雄の AGD については、50、250 ppm PTU 投与群で有意な延長が認められたものの、着床数、胎仔数、胎仔重量、胎盤重量等に PTU 投与による顕著な変化は認められなかった (P31:表 4)。また、外表検査 (P32:表 5)・内臓検査 (P33:表 6) においても PTU 投与による異常は確認されなかった。さらに、骨格検査においても PTU 投与による明らかな異常は認められなかった (P33:表 7、P34:表 8)。以上より、母体の甲状腺機能低下は胎児の臓器・骨格形成等にほとんど影響が無いことが示された。

## 2. Syn-Rep マウスの DNT 評価系としての有用性の検討

### 2-1. 成熟期 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 (P35:図 4)。

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。

### 2-2. 出生直前から離乳期脳の各部位におけるレポーター分子発現の経時変化

出生直前から離乳期にかけてのレポーター分子の発現状況を検討するために、各日齢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 Luc2 の発現が認められた (P36:図 5A)。またその経時的な発現変動は、胎齢 18.5 日 (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 (P36:図 5A)。それ以外の部位では、海馬、中脳においてピークで大脳皮質の 1/3~1/5 程度の Luc2 活性が認められ (P36:図 5B、C)、わずかではあるが小脳でも Luc2 活性が認められた。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 E18.5~P7 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 の発現についても、脳スライスを X-gal 染色することで解析を行ったが、Luc2 の発現パターンと同様の傾向が認められた。

### 2-3. 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 (P38:図 7)。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。

また毒性試験においては、被験物質が非特異的に児動物の体重抑制を誘導する可能性があり、その結果、脳に直接影響が認められなくとも発光の低下が起こる可能性が懸念される。そこで発達期の体重差が *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の検討を加えた。その結果、P22 の雄 ( $R^2 = 0.6617, P = 0.0002$ ) (P39:図 8D) を除いて、雌雄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 8)。以上より、*in vivo* イメージングに

おける脳の発光量は、少なくとも出生後早い時期において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。

#### 2-4. 胎生期 VPA 曝露に対する Syn-Rep マウスのレポーター分子応答性の検証

Syn-Rep 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 (P48: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 (P49: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 (P49:図 3 D)。

#### 2-5. 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 (P50:図 4)。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 (P52:図 6)。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 (P52:図 6A)。また、VPA 曝露群では毛づくろい行動 (P52:図 6B) および攻撃行動 (P52:図 6C) は有意ではないものの、

増加傾向が認められた。

### 3. Syn-Rep マウスを用いた母体甲状腺機能低下時における児動物脳発達への影響の検証

#### 3-1. PTU 曝露時における Syn-Rep マウス児動物脳のレポーター分子発現の検証

研究結果 第 2 項で確立した Syn-Rep マウスを用いて、PTU で妊娠期から母体の甲状腺機能低下を誘導した際の児動物脳への影響について検討を行った。第 1 項の研究結果を基に、PTU による甲状腺機能低下誘導の閾値と考えられる 10 ppm と、完全に甲状腺機能を抑制すると考えられる 250 ppm の 2 用量で検討を行った。

その結果、出生後、陰性対照群の児動物に比べて、PTU 投与条件下の児動物は雌雄共に体重増加の抑制傾向が観察された (P65:図 3A)。しかしこの影響に用量依存性は認められなかった。また児動物の脳における *in vivo* イメージング解析では、甲状腺機能低下条件下ではどちらの用量も雌雄共にレポーター分子の発現が高くなった (P65:図 3B, C)。しかしその発現パターンは用量によって異なっており、生後直後~7 日齢までは 10 ppm 投与母動物に由来する児動物の方が 250 ppm 群より高値を示し、P10 以降は 250 ppm 投与の方が高値となった (P65:図 3B, C)。すなわち、P10 以降は PTU 用量依存的なレポーター分子の発現上昇が観察された。

#### 3-2. Poly(I:C)を用いた MIA 誘導時における Syn-Rep マウス児動物脳のレポーター分子発現の検証

妊娠期~離乳期における Syn-Rep マウスの甲状腺機能低下は、児動物脳のレポーター分子の発現を上昇させる結果となったが、この応答が VPA 曝露時とは真逆であったことから、VPA で誘導される神経細胞死とは異なった毒性発現機構 (MoAs) で誘導されることが示唆される。またヒトの甲状腺機能低下症患者や成体動物で甲状腺機能が低下すると血中の炎症性サイトカインが上昇したり、

脳内のミクログリア細胞が活性化される、いわゆる神経炎症が起こる可能性が指摘されている。そこで、甲状腺機能低下時に児動物脳で誘導されるレポーター分子の発現上昇にも MIA が関与しているのではないかと考え、胎生期に曝露すると MIA による神経発達症様症状を誘導することが知られている Poly(I:C)の影響を Syn-Rep マウスを用いて予試験的に検討した。Poly(I:C) 投与 3 時間後の母体血清 IL-6 レベルを測定したところ、顕著に増加していた (P55:図 9) ことから、Poly(I:C) 投与により MIA が誘導されたことが確認された。この条件下で生まれてきた児動物の脳について *in vivo* イメージングにて解析したところ、Poly(I:C) 投与群雌では P4、P7、P13、P16 において、雄では P4、P7 において、脳のレポーター分子の発現が有意に上昇した (P57:図 11A, B)。なお Poly(I:C)投与による母動物の体重や摂餌量、児動物の体重増加への顕著な影響は認められなかった (P54:図 8、P56:図 10)。

#### 4. ヒト iPS 細胞を用いた甲状腺機能低下モデルにおける神経細胞分化への影響の解析

##### 4-1. THR $\alpha$ ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経 (外胚葉) 分化に対する DNT 陽性化学物質曝露の影響

前年度はヒト iPS 細胞にて THR $\alpha$  のノックダウンを行い、甲状腺機能低下モデルの作製を行った。本年度は、THR $\alpha$  ノックダウン iPS 細胞を用いて、DNT 陽性化学物質を曝露し、甲状腺機能低下が化学物質による神経 (外胚葉) 分化抑制に対して与える影響の検証を行った。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞の神経分化時に CPF 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 (P71:図 2)。THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、CPF を曝露すると、control の細胞と比べて PAX6 の発現が約 50% 抑制されることを見出した (P71:図 2)。したがって、THR $\alpha$  は CPF による発達神経毒性に関与している可能性が考えられた。また以上より、甲状腺機能低下症のモデルとして

THR $\alpha$  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。

##### 4-2. THR $\alpha$ の下流で神経 (外胚葉) 分化に関わる遺伝子の探索 (NGS 解析)

THR $\alpha$  ノックダウンしたヒト iPS 細胞を神経 (外胚葉) 分化させたところ、scramble shRNA を導入した細胞と比べて分化マーカーである PAX6 の発現は約 30%減少した (P71:図 2)。従って、THR $\alpha$  は神経 (外胚葉) 分化に関与すると考えられる。そこで NGS 解析により、THR $\alpha$  の下流で神経 (外胚葉) 分化に関わる遺伝子の探索を試みた。THR $\alpha$  ノックダウン細胞で発現が低下している遺伝子を探索した結果、神経分化に関わる因子 A、B (P72:図 3)、軸索伸展に関わる因子 C (P73:図 4)、D (P74:図 5) などの遺伝子を抽出することができた。

#### 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. マウスにおける PTU 反応性とラットとの種差について

甲状腺ホルモンの産生と機能については、生理学的なフィードバック機構によって制御される等、げっ歯類とヒトで類似している点が多い。しかしその一方で、輸送と代謝にはいくつかの重要な種差が存在することが明らかとなっており、化学物質による甲状腺機能低下の種差の原因となっている[*Environ. Health Perspect.* 112:363-68 (2004)]。例えばラットの方がヒトよりも抗甲状腺薬等に対する感受性が高いと言われているが、これは血中の T4 結合タンパク質の有無に起因すると考えられている。一方マウスについても、ラットと感受性が異なると考えられているものの具体的にどの程度の差があるのかを系統立てて示したデータは存在しない。本研究では、マウスにおける PTU の用量の設定を行うとともに、マウスラット間における種差の議論を可能とするために、妊娠 ICR マウスにおける PTU の用量反応性について、先行研究[*Regul Toxicol Pharmacol.* 137:105283

(2023)]と同様の投与条件 (Comparative Thyroid hormone Assay に準じた投与スケジュール) で検討を行った。その結果、SD ラットでは強い甲状腺機能低下が誘導される 10 ppm の PTU 混餌投与において、ICR マウスでは T4 のみが 50%程度抑制される軽微な甲状腺機能低下に留まった (P64:図 2)。そこでマウスにおいて甲状腺機能低下を誘導する PTU の用量域を同定するために、同様の投与スケジュールで PTU の用量を変化させて検討を行った。その結果、出産直前のタイミングにおいて、ラットと同様の甲状腺機能低下を誘導するには 50~250 ppm 程度の用量が必要であり、PTU に対するマウスの感受性はラットの 1/5~1/25 であることが明らかとなった (P26:図 1)。

これまで毒性試験における甲状腺機能関連指標の変動が化学物質のリスク評価に十分に活用されていない原因の一つに、血中甲状腺関連ホルモンの測定法が統一されていない問題が挙げられる。現在、関連ガイドライン試験において、血中の甲状腺関連ホルモンの測定を行うことになってはいるものの、この問題により各実験動物において毒性指標となる閾値は設定されていない [Crit. Rev. Toxicol. 51:328-58 (2021)]。また散在している甲状腺機能かく乱に関する過去のデータを同列で比較することも困難である [Crit. Rev. Toxicol. 51:328-58 (2021)]。今回我々は、先行研究 [Regul Toxicol Pharmacol. 137:105283 (2023)]と同一の投与条件に加え、残留農薬研究所で血中甲状腺関連ホルモンの測定を行うことで、マウスとラットにおける PTU の感受性の種差について初めて議論をすることを可能にした。基本的に毒性試験はラットで行われるが、遺伝子欠損動物などを用いたメカニズム解明にはマウスが用いられることが多い。今回の我々のデータは、マウスにおける結果をラット実験に落とし込むための重要な情報であり、今後、甲状腺機能低下を誘導する化学物質のリスク管理に少なからず貢献するものと考えている。

マウスにおいて 50 ppm 以上の PTU で十分

な甲状腺機能低下を誘導できることが明らかとなった。一方、PTU 10 ppm においては血清中の甲状腺関連ホルモンは T4 が低下する個体がいくつか見られる程度の微妙な影響であるが、甲状腺の組織学的検査では全個体で濾胞細胞の肥厚が認められ、甲状腺機能低下が誘導されていることが示唆された (P27:図 2)。過去の報告で、ラットにおいて甲状腺組織学的検査は、血中甲状腺関連ホルモンよりも鋭敏な甲状腺機能低下を示すバイオマーカーであることが報告されている [Environ. Health Perspect. 112:363-68 (2004)]が、今回の結果はマウスにおいてもそれが再現されたことを示すとともに、10 ppm が PTU による甲状腺機能低下の閾値であると考えられた。

## 2. マウスにおける妊娠期甲状腺機能低下の胎児発生・器官/骨格形成への影響について

PTU 250 ppm の実質的な投与量については、表 2 の摂餌量 (6.25 g/日) からマウスの体重を 40 g として算出した値を、マウスのヒト等価用量 12.3 で補正すると、ヒトの場合およそ 3 mg/kg/日 (体重 50 kg とすると 150 mg/日) に相当する。ヒトへの臨床用量は、プロピルチオウラシルとして、通常妊婦に対しては初期量 150 - 300 mg/日を使用しているため、本研究で妊娠マウスに対して用いた 250 ppm の混餌投与は妊娠女性に対する臨床用量とほぼ同等の用量であると考えられる。この用量 (250 ppm) においては、妊娠 ICR マウスで強力な甲状腺機能低下が誘導されていたが、母動物の体重変化には特に影響は認められなかった (P29:表 1)。また着床数や胎児の生存数、胎児の体重にも影響は認められなかった (P31:表 4)。本研究結果より、妊娠期における臨床用量の PTU 摂取は、胎児の臓器や骨格形成等の胎児発生にはほとんど影響が無いことが示された。一方、出生後の児動物については PTU 10 ppm 投与群、250 ppm 投与群双方で有意な体重低下が認められている (松丸の「分担研究報告書」を参照)。このことから、甲状腺機能低下の次世代影響

は、胎児期よりも出生後の発達への影響の方が大きい可能性が示された。次年度は出生後の児動物の一般毒性についても評価を行う予定である。

### 3. Syn-Rep マウスの DNT 評価における New Approach Methodology (NAM) としての有用性について

本研究で用いる Syn-Rep マウスでは、レポーター分子である Luc2 および LacZ の脳における発現が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 (P36:図 5、P37:図 6)。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 (P36:図 5)。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、Syn-Rep 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 Syn-Rep 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、経時的変化を良好に検出することができた (P38:図 7)。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。

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 Syn-Rep 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 (P48:図 2)。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 (P49:図 3)。

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 (P50:図 4、P52:図 6)。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 Syn-Rep 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 陽性対照化学物質についても検討を行っていく予定である。

### 4. 母体甲状腺機能低下時における児動物脳発達への影響について

Syn-Rep マウスを用いた検討で、妊娠期か

ら PTU を投与した児動物脳においてレポーター分子の発現が上昇していたことから、甲状腺機能低下によって誘導される DNT ではレポーター分子の発現上昇をもたらす可能性が示された。また本検討では、PTU 10 ppm 投与群でもレポーター分子の発現が上昇することを確認しているが (P65:図 3)、これは本研究の最も特筆すべき成果の一つであると考えている。すなわちこの結果は、母体血清中の甲状腺関連ホルモンに変動が認められない程度の甲状腺機能低下 (PTU 10 ppm) でも児動物脳の発達には何らかの影響を与える可能性を示すとともに、ガイドライン試験で追加された母体血清中の甲状腺関連ホルモンの定量では、甲状腺機能低下時に最も懸念される DNT を捉えることができない可能性を示唆している。今後、レポーター分子の発現変動が行動異常などの AO とどのような関係にあるのかを定量的に検証する必要があるものの、レポーター分子の発現が、甲状腺機能低下時に誘導される DNT を精度良く予測するためのバイオマーカーの候補になる可能性が示された。また甲状腺関連ホルモン変動の閾値付近で誘導される程度の甲状腺機能低下で DNT が誘導されるのであれば、今後は甲状腺関連ホルモンに変わる新たな血清バイオマーカーを探索する必要があると考えられる。

一方で、Syn-Rep マウスレポーター分子は、PTU の用量依存的な発現上昇を示したものの、その経時的な発現プロファイルは 10 ppm 投与群と 250 ppm 投与群では異なっており、レポーター分子の発現のピークが高用量の方が遅れて起こるようなパターンを示した (P65:図 3)。特に生後直後～P7 周辺の日齢においては 10 ppm 投与群の方がレポーター分子の発現が高くなる逆転現象が起こった。これらの用量では、段階的な甲状腺機能低下が誘導されたにも関わらず、このような逆転現象を引き起こした原因としては、甲状腺ホルモン濃度の上昇と正の相関がある要素と負の相関がある要素が存在する可能性、あるいは成長段階によってその影響が変化する

可能性など、複数が影響しあっている可能性が考えられた。また脳神経系の構成細胞には神経細胞の他に、アストロサイト、オリゴグロンドロサイト、ミクログリアがあり、甲状腺ホルモンはこれらの細胞に対しても成熟の段階と脳内の局在に応じて、分化等を促進することが報告されている [*J. Endocrinol.* 189: 189-97 (2006), *J. Neurobiol.* 40: 497-512 (1999), *J. Neurosci.* 21: 2028-38 (2001)]。またこれらの細胞が影響を受ける甲状腺ホルモンの濃度域は、細胞によっても異なる可能性もある。さらに甲状腺機能低下によって炎症・炎症性サイトカインの上昇が誘導されたり [*PLoS ONE.* 9: e109753 (2014), *Mol. Cell. Endocrinol.* 499:110594 (2020)]、グリア系細胞の活性化が示唆されている [*Int. J. Mol. Sci.* 23:11938 (2022)] ことから、今後は神経細胞以外の脳構成細胞にも注目して、甲状腺機能低下による影響を多角的に解析する必要があると考えられる。

また我々は、前述の通り DNT 陽性対照物質である VPA を妊娠期に投与した際の Syn-Rep マウス応答性についても解析を行っているが、PTU の結果とは逆に、レポーター分子の発現が有意に低下した (P48:図 2)。これは VPA が発達期の神経細胞数を減少させることから、この結果はそれを反映したものであるが、本研究の結果から、甲状腺機能低下によって誘導される DNT は少なくとも VPA とは異なるメカニズムによって誘導されるものと考えられる。一方で、胎生期に曝露すると MIA による神経発達症様症状を誘導することが知られている Poly(I:C) 投与の影響を予試験的に検討したところ、P4～P7 の児動物脳においてレポーター分子の発現量は上昇しており、PTU 10 ppm 曝露群と類似の発現パターンを示した (P57:図 11)。MIA 誘導性 ASD のメカニズムについては、母体の炎症性サイトカイン誘導と、それに伴う胎児脳のミクログリア活性化の関与が報告されている。母体の甲状腺機能低下と MIA による児の神経発達に対する影響には、炎症性サイトカイン誘導や胎児脳のミクログリア



活性化等共通したメカニズムが関与する可能性が考えられた。

化学物質によって誘導される DNT には、それに至るまでの多様なメカニズムが存在すると考えられているが、Syn-Rep マウスを用いた DNT 評価はこの多様な影響にも対応して検出できる可能性を示唆している。今後は様々な化合物等についても検討を行うとともに、これらの作用機構の相違・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ている。

## 5 ヒト iPS 細胞を用いた甲状腺機能低下モデルの確立について

今年度は、THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞を用いて、本研究班で選定した DNT 陽性対照物質 CPF 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 CPF に対する細胞応答には大きな違いは認められなかった (P70:図 1)。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、CPF による神経分化抑制が認められた (P71:図 2)。このことから、ヒト発達期における神経毒性に THR $\alpha$  が関与していることが示唆される。

THR には  $\alpha$  と  $\beta$  のアイソフォームが存在することが知られている。ノックアウトマウスを用いた研究により、 $\alpha$  は神経発生に関係するが、 $\beta$  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、神経分化に影響があることを明らかにした。しかしながら、THR $\alpha$  と  $\beta$  の機能的な違いについては明らかになっておらず、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重要であるのかを慎重に検討する必要がある。さらに神経分化時に THR $\alpha$  の下流で働く可能性のある遺伝子を探索した結果、神経分化や軸索伸長に関与する遺伝子を同定した (P72~74: 図 3~5)。こうした遺伝子と甲状腺機能低下

の関連についても検討を進め *in vivo* でも機能するのか検証する必要がある。

今後は、金属などの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する必要がある。

## E. 結論

1. 出生前発生毒性試験 (TG414) の結果、妊娠中に母体の甲状腺機能が完全に抑制されても、児の着床や骨格・臓器形成等にはほとんど影響がないことが確認された。
2. 妊娠期の母体甲状腺機能低下における次世代影響を評価するための最適な PTU の投与条件見出し、ラットとの種差について議論できるデータを得た。
3. Syn-Rep マウスは、発達期脳の神経細胞の構築状態を非侵襲的にトレースできたことから、DNT 評価における NAM としての有用性が示された。
4. Syn-Rep マウスを用いた検討により、児動物脳への影響は母体血中の甲状腺関連ホルモンに変動が認められない軽度の甲状腺機能低下時においても起こる可能性が示唆された。
5. ヒト iPS 細胞を用いた神経細胞分化誘導モデルにより、甲状腺ホルモン受容体 (THR)  $\alpha$  が神経細胞分化に重要であるとともに、THR $\alpha$  の発現抑制が DNT 陽性対照化学物質に対して併用効果を示すことが確認された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ishida K, Furukawa M, Kunitani M, Yamagiwa R, Hiromori Y, **Matsumaru D**, Hu J, Nagase H, **Nakanishi T (責任著者)**, Novel, highly sensitive, *in vivo* screening method detects estrogenic activity at low doses of bisphenol A, *J Hazard Mater* 445: 130461 (2023)
- 2) Ishida K, Tatsumi K, Minamigawa Y, Mori K, **Matsumaru D**, Nagase H, **Kanda Y**,

- Takuma K, Nakanishi T (責任著者)**, Neuronal differentiation reporter mice as a new methodology for detecting *in vivo* developmental neurotoxicity, *Biochem Pharmacol* 206: 115332 (2022)
- 3) Ishida K, **Matsumaru D**, Shimizu S, Hiromori Y, Hisamitsu Nagase H, **Nakanishi T (責任著者)**, Evaluation of the estrogenic action potential of royal jelly by genomic signaling pathway *in vitro* and *in vivo*, *Biol Pharm Bull* 45: 1510-1517 (2022)
  - 4) Acebedo AR, Alcantara MC, **Nakanishi T**, Ogawa T, Yamada G, Suzuki K, Exposure to the organophosphate pesticide fenitrothion directly induced defects in mouse embryonic external genitalia, *Toxicol. Sci* 190: 13-22 (2022)
  - 5) Jia Y, Zhang H, Hu W, Wang L, Kang Q, Liu J, **Nakanishi T**, Hiromori Y, Kimura T, Tao S, Hu J, Discovery of contaminants with antagonistic activity against retinoic acid receptor in house dust, *J Hazard Mater* 426:127847 (2022)
  - 6) Abe S, **Murashima A (共同筆頭著者, 共同責任著者)**, Kimura E, Ema M, Hitomi J, Early development of the pulmonary vascular system: An anatomical and histochemical reinvestigation of the pulmonary venous return development in mice, *Acta Histochem* 124: 151840 (2022)
  - 7) Imado E, Sun S, Abawa AR, Tahara T, Kochi T, Huynh TNB, Asano S, Hasebe S, Nakamura Y, Hisaoka-Nakashima K, Kotake Y, Irifune M, Tsuga K, **Takuma K**, Morioka N, Kiguchi N, Ago Y, Prenatal exposure to valproic acid causes allodynia associated with spinal microglial activation, *Neurochem Int* 160: 105415 (2022)
  - 8) Takemoto T, Baba M, Yokoyama K, Kitagawa K, Nagayasu K, Ago Y, Seiriki K, Hayata-Takano A, Kasai A, Mori D, Ozaki N, **Takuma K**, Hashimoto R, Hashimoto H, Oxytocin ameliorates impaired social behavior in a mouse model of 3q29 deletion syndrome, *Mol Brain* 15:26 (2022)
  - 9) Yasuhiko Y, Ishigami M, Machino S, Fujii T, Aoki M, Irie F, **Kanda Y**, Yoshida M. Comparison of the lower limit of benchmark dose confidence interval with no-observed-adverse-effect level by applying four different software for tumorigenicity testing of pesticides in Japan, *Regul Toxicol Pharmacol* 133:105201 (2022).
- ## 2. 学会発表
- 1) Ishida K *et al.* : Validation of brain neuronal differentiation reporter mice for improved developmental neurotoxicity evaluation, 2022 ICCA-LRI & NITE Workshop, Yokohama/Japan, June 2022
  - 2) 辰巳 佳乃子 他：発達神経毒性評価の効率化に向けた脳神経分化トレーサーマウスの有用性検証、第49回日本毒性学会学術年会、札幌、2022年6-7月
  - 3) 森 一馬 他：妊娠期甲状腺機能低下モデルにおける児動物脳のイメージング解析、第49回日本毒性学会学術年会、札幌、2022年6-7月
  - 4) 諫田泰成：化学物質のインビトロ発達神経毒性評価—甲状腺ホルモンの影響評価の取り組み、第49回日本毒性学会学術年会、札幌、2022年7月
  - 5) 石田 慶士 他：化学物質の発達神経毒性評価の効率化に向けた神経分化トレーサーマウスの有用性検証、第68回日本薬学会東海支部総会・大会、名古屋、2022年7月
  - 6) 石田 慶士 他：発達神経毒性評価の効率化に向けた *in vivo* 神経細胞分化トレーサー系の構築、第62回日本先天異常学会学術集会、金沢/Web、2022年7月
  - 7) 石田 慶士 他：DOHaD学説からみた甲状腺機能低下：児の神経発達へのリスク評価を目指して、フォーラム2022：衛生薬学・環境トキシコロジー、熊本、2022年8月
  - 8) 諫田泰成：甲状腺機能を考慮したインビトロ神経毒性試験法の開発、フォーラム2022 衛生薬学・環境トキシコロジー、熊本、2022年8月
  - 9) 山際 頼 他：代替ビスフェノール 9,9-Bis(4-hydroxyphenyl)-fluorene の内分泌かく乱作用に関する検討、フォーラム2022：衛生薬学・環境トキシコロジー、熊本、2022年8月
  - 10) 山際 頼 他：代替ビスフェノール 9,9-

- Bis(4-hydroxyphenyl)-fluorene の女性ホルモン様作用に関する検討、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2022, 静岡, 2022年11月
- 11) 辰巳 佳乃子 他：化学物質の発達神経毒性評価系としての神経分化トレーサーマウスの有用性検証、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2022, 静岡, 2022年11月
  - 12) Kitagawa K *et al.* : Intranasal oxytocin administration suppresses social contact-induced neural activity in a POGZ-Q1038R mutant mouse model of autism spectrum disorder, *Neuroscience* 2022, San Diego/USA, Nov. 2022
  - 13) Ishida K *et al.* : Neuronal differentiation reporter mice as a new methodology for detecting *in vivo* developmental neurotoxicity, *In vivo* イメージングフォーラム 2022, 東京, 2022年12月
  - 14) 諫田泰成、安彦行人：新たなアプローチによる薬理試験の展開、第96回日本薬理学会年会、横浜、2022年12月
  - 15) Kanda Y: Current status and future challenge of developmental neurotoxicity, 3rd Asian Congress for Alternative to Animal Experiment, 済州, 2022年12月
  - 16) Kanda Y: hiPSC-derived neural cells for chemical toxicity evaluation, Inaugural International Scientific Conference of the SAAT- SL, コロンボ, 2023年2月
  - 17) 糟谷佐保里 他：母体甲状腺機能低下によって惹起される胎児発生毒性の評価、日本薬学会第143年会、札幌、2023年3月

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし

令和 4 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4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～離乳期の甲状腺機能変動による次世代影響の検討

～妊娠期の甲状腺機能低下時における胎児発生への影響～

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・講師）

## 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。本分担研究では、抗甲状腺薬プロピオチオウラシル（PTU）による甲状腺機能低下の誘導条件の確定と、妊娠期の甲状腺機能低下時における胎児の脳発達以外への影響（器官形成・骨格形成等への影響）について、マウスを用いた出生前発生毒性試験（TG414）により検討した。妊娠母体における血中甲状腺ホルモンの抑制は、ラットを用いた先行研究で甲状腺機能が完全に低下する条件の5～25倍程度の用量で認められた。一方で母体の甲状腺機能を完全に低下させても、児動物の器官形成や骨格形成には影響は認められなかったことから、妊娠期の母体甲状腺機能低下は、胎児の器官形成や骨格形成には影響を与えないことが明らかとなった。また甲状腺機能低下による脳発達への影響を検討するために、シナプス構築の最終段階に神経細胞において発現するSynapsin 1（Syn1）のプロモーター制御下でレポーター分子を発現するトランスジェニックマウス（Syn-Repマウス）を作成し、その基礎データの収集を行った。脳におけるレポーター分子の発現は脳高次機能を担う部位において高く、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。以上の結果から、*in vivo*イメージングを用いてSyn-Repマウスのレポーター分子の発現をトレースすることで、神経細胞の分化状態を非侵襲的に把握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依存し、母体の甲状腺刺激ホルモン（TSH）の上昇および／または遊離チロキシン（fT4）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。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／トリヨードチロニン（T3）／チロ

キシン（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。しかしながら、甲状腺機能低下を誘導する化学物質のリスク管理に資するスキームの確立には繋がっていない。したがって、化学物質曝露により誘導される甲状腺関連指標の変動をリスク評価に活かすためには、母体の甲状腺関連指標の変動と次世代影響、特に脳発達との因果関係を明らかにし、種差をも考慮した学術的基盤を構築する必要がある。

上記問題を解決するために、本分担研究では、抗甲状腺薬プロピオチオウラシル（PTU）による甲状腺機能低下の誘導条件の確定と、妊娠期の甲状腺機能低下時における胎児の脳発達以外への影響（器官形成・骨格形成等への影響）について、マウスを用いた出生前

発生毒性試験 (TG414) による検討を行った。また脳に対する影響については、シナプス構築の最終段階に神経細胞において発現する Synapsin 1 (Syn1) の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 マウスを独自に作成し、これを用いた検討を行う。このマウスでは、神経細胞の構築状態 (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。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) 出生前発生毒性試験

#### 1-1. 動物

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。出生前発生毒性試験は ICR マウスを用い、OECD TG414 のプロトコールに準じて実施した。

#### 1-2. PTU の投与

PTU の投与は、完全調整食の AIN-93M (日

本クレア) に 2、10、50 および 250 ppm、となるように混餌し、妊娠 6 日目 (GD6) から GD18 まで自由摂取させることで行った。

#### 1-3. 母動物の観察および剖検

GD18 に母体をイソフルラン深麻酔下で開腹し、後大静脈より全採血を行った。血液は凝固促進剤・血清分離剤入りの採血管に移し転倒混和する。30 分静置し凝固させた後、3000g 10 分の条件で遠心分離し血清を -80°C で保存した。放血致死後に速やかに子宮を摘出した。主要臓器の異常の有無を肉眼で観察し、甲状腺及び異常の認められた器官は 4% パラホルムアルデヒド (PFA) で固定しパラフィンブロックを作製した。

#### 1-4. 子宮内容物の検査

摘出した子宮・卵巣は、状態を外側から肉眼的に観察した後、頸部を含む妊娠子宮の重量を測定した。妊娠動物については着床数を数え、胎仔を摘出した。胎盤は肉眼的観察を行い重量の測定を行った。子宮内容物について、胚死亡または胎仔死亡および生存胎仔の数を調べた。受胎産物の相対死亡時期を推定するために、吸収の程度を観察した。

#### 1-5. 胎仔の観察および外表・内臓検査

各胎仔の性別および体重を調べ、生存胎仔についてはすべて、肛門・生殖結節間距離 (AGD) を測定した。各胎仔について実体顕微鏡 (ライカ) にて外表異常の有無を検査した。胎仔をイソフルラン深麻酔下で固定液に浸漬または放血により安楽死させ、骨格および内臓の異常 (変異および奇形・異常など) の有無を検査した。内臓検査はブアン液で 1 週間以上固定した後、数回水洗し、実体顕微鏡 (ライカ) にて行った。また、雄の胎仔については不完全な精巣下降/停留精巣の徴候にも注意した。

#### 1-6. 骨格検査および骨染色

胎仔を深麻酔下で安楽死させ、剥皮し内臓を取り除いた後、95%エタノールで 7 日以上

固定した。1~3 日間アセトンで脱脂し、二重染色液に 37°C で 2~3 日間浸した。70%エタノール洗浄後、1%KOH に 2~5 日間浸漬し、段階的にグリセリン置換を行った後、100%グリセリン中で保存、実体顕微鏡（ライカ）にて観察した。

#### 1-7. 血清中マーカーの測定

血清中の各甲状腺関連ホルモンの測定は残留農薬研究所に依頼した。また血清中の各種生化学マーカーの測定はオリエンタル酵母に依頼した。

#### 1-8. 甲状腺組織学的解析

母動物の甲状腺はパラフィン切片を作成し、組織像を HE 染色で観察した。

#### 1-9. 統計学的解析

母動物データ・胎児データ及び化骨進行度については Bartlett 検定を実施し、有意であった場合は Steel 検定を、有意でなかった場合には Dunnett 検定を実施した。肉眼的病理検査、外表検査、内臓検査及び骨格検査については、Fischer の直接確率法により検定した。データは全て「平均値±標準偏差」で表し、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

### 2) Syn-Rep マウスにおけるレポーター分子の発現解析

#### 2-1. 動物

動物実験の実施に関しては、1-1 に記載の通り実施した。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。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。

#### 2-2. *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  $\mu$ 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  $\mu$ L/well となるように上清を添加し、これに D-luciferin 緩衝液を 50  $\mu$ 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  $\mu$ g 量当たりのルシフェラーゼ活性（photons/second/ $\mu$ g protein）を算出した。

#### 2-3. X-gal 染色

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% PFA で後固定後、実体顕微鏡（ライカ）にて観察した。

#### 2-4. *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（5 mg/mL）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. 母体甲状腺機能低下時における胎児発生への影響

### 1-1. PTU 投与による母体甲状腺関連指標への影響

PTU を投与した母動物の GD18 における血清中甲状腺ホルモンレベルについて検討を行ったところ、50、250 ppm 投与群において T3、T4 の有意な低下および TSH の有意な上昇が認められた (図 1)。また甲状腺の組織学的解析についても検討を行ったところ、血清中甲状腺ホルモンレベルの変動を反映して、色調変化、濾胞細胞の顕著な肥厚、コロイド部分の欠失が観察された (図 2)。以上の結果より、PTU 50、250 ppm では顕著な甲状腺機能低下が誘導されることが明らかとなった。さらに甲状腺の組織学的解析においては、これらの用量群に加え、10 ppm においても濾胞細胞のわずかな肥厚が観察された。

### 1-2. PTU 投与による母体血清中の生化学的パラメーターへの影響

一部の血清中生化学パラメーターは甲状腺機能低下と相関して変動することが報告されている。そこで、PTU を投与した母動物の GD18 における血清中生化学パラメーターを測定したところ、50、250 ppm で Ca の低下 (図 3H)、250 ppm で総コレステロール (図 3O) および LDL コレステロール (図 3Q) の上昇が認められた。また、50 ppm で尿素窒素の低下 (図 3C)、10 ppm で総ビリルビンの上昇 (図 3S) が認められた。

### 1-3. 母動物の体重と摂餌量の評価

PTU を投与した母動物の体重や子宮重量について、顕著な変化は認められなかった (表 1, 3)。母動物の摂餌量については、GD6 から GD18 までの総摂餌量が PTU 250 ppm 投与群で対照群と比べて有意な減少が認められたが、PTU 2、10、50 ppm 投与群では変化が認められなかった (表 2)。

### 1-4. PTU 投与による胎仔発生への影響

妊娠状況および胎仔への影響について、雄の AGD については、50、250 ppm PTU 投与群で有意な延長が認められたものの、着床数、

胎仔数、胎仔重量、胎盤重量等に PTU 投与による顕著な変化は認められなかった (表 4)。また、外表検査 (表 5)・内臓検査 (表 6) においても PTU 投与による異常は確認されなかった。さらに、骨格検査においても PTU 投与による明らかな異常は認められなかった (表 7, 8)。以上より、母体の甲状腺機能低下は胎児の臓器・骨格形成等にほとんど影響が無いことが示された。

## 2. Syn-Rep マウスにおけるレポーター分子の発現解析

### 2-1. 成熟期 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、まず成熟期各臓器における Luc2 の発現パターンについて解析を行った。

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 4)。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 4)。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 4)。

### 2-2. 出生直前から離乳期脳の各部位におけるレポーター分子発現の経時変化

出生直前から離乳期にかけてのレポーター分子の発現状況を検討するために、E18.5 および P4、P7、P13、P22 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 P7 の大脳皮質で最も高い Luc2 の発現が認められた (図 5A)。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 5A)。それ以外の部位では、海馬、中脳においてピークで大脳皮質の 1/3~1/5 程度の Luc2 活性が認められ (図 5B, C)、わずかではあるが小脳でも Luc2 活性が認められた。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 E18.5~P7 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。

### 2-3. 脳の各部位における 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。E14.5 は胎仔全身、E18.5、P4、P13、P22、9 週齢は脳スライスを作成し、X-gal 染色を行った (図 6)。その結果、E14.5 においては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 以降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。染色の強さは P4 でピークとなり、その後経日的に低下した。

### 2-4. 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 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 7)。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。

### 2-5. 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  $R^2$  値と p 値を雌雄別に算出した。その結果、P22 の雄 ( $R^2 = 0.6617, P = 0.0002$ ) (図 8D) を除いて、雌雄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 8)。以上より、*in vivo* イメージングにおける脳の発光量は、少なくとも出生後早い時期において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

### 1. PTU の出生前発生毒性試験

PTU の投与量と母動物の甲状腺関連指標変動の関係について、250 ppm では血清中の T3 の有意な低下、T4 の完全な抑制、TSH の有意な上昇が認められ、甲状腺の組織像においても甲状腺の色調変化、濾胞細胞の顕著な肥厚、コロイド部分の欠失の明らかな異常が認められた。50 ppm においても T3/T4 の有意な低下、TSH の有意な上昇、甲状腺組織像の明らかな異常が認められた。さらに、血清中生化学マーカーについては 50、250 ppm で Ca の低下、250 ppm で総コレステロールおよび LDL コレステロールの上昇が認められた。これらの生化学マーカーの変動は臨床にお

いても甲状腺機能低下症の患者で認められる変化である。したがって、マウスにおいて 50 ppm 以上の PTU で十分な甲状腺機能低下を誘導できることが明らかとなった。一方、PTU 10 ppm においては血清中の甲状腺関連ホルモンにはほとんど変化は認められなかったが、甲状腺の組織学的検査では全個体で濾胞細胞の肥厚が認められ、甲状腺機能低下が誘導されていることが示唆された。過去の報告で、ラットにおいて甲状腺組織学的検査は、血中甲状腺関連ホルモンよりも鋭敏な甲状腺機能低下を示すバイオマーカーであることが報告されている [Environ. Health Perspect. 112:363-68 (2004)] が、今回の結果はマウスにおいてもそれが再現されたことを示すとともに、10 ppm が PTU による甲状腺機能低下の臨界用量であると考えられた。

甲状腺ホルモンの産生と機能については、生理学的なフィードバック機構によって制御される等、げっ歯類とヒトで類似している点が多い。しかしその一方で、輸送と代謝にはいくつかの重要な種差が存在することが明らかとなっており、化学物質による甲状腺機能低下の種差の原因となっている [Environ. Health Perspect. 112:363-68 (2004)]。例えばラットの方がヒトよりも抗甲状腺薬等に対する感受性が高いと言われているが、これは血中の T4 結合タンパク質の有無に起因すると考えられている。一方マウスについても、ラットと感受性が異なると考えられているものの具体的にどの程度の差があるのかを系統立てて示したデータは存在しない。本研究では、マウスにおける PTU の用量の設定を行うとともに、マウス-ラット間における種差の議論を可能とするために、妊娠 ICR マウスにおける PTU の用量反応性について、先行研究 [Regul Toxicol Pharmacol. 137:105283 (2023)] と同様の投与条件 (Comparative Thyroid hormone Assay に準じた投与スケジュール) で検討を行った。その結果、SD ラットでは強い甲状腺機能低下が誘導される 10 ppm の PTU 混餌投与において、ICR マウスでは甲状腺の組織学的変化のみが検出さ

れる軽微な甲状腺機能低下に留まった (図 1、2)。またマウスにおいて、ラットと同様の甲状腺機能低下を誘導するには PTU が 50~250 ppm 程度の用量が必要であり、PTU に対するマウスの感受性はラットの 1/5~1/25 で程度であることが明らかとなった (図 4)。

これまで毒性試験における甲状腺機能関連指標の変動が化学物質のリスク評価に十分に活用されていない原因の一つに、血中甲状腺関連ホルモンの測定法が統一されていない問題が挙げられる。現在、関連ガイドライン試験において、血中の甲状腺関連ホルモンの測定を行うことになってはいるものの、この問題により各実験動物において毒性指標となる閾値は設定されていない [Crit. Rev. Toxicol. 51:328-58 (2021)]。また散在している甲状腺機能かく乱に関する過去のデータを同列で比較することも困難である [Crit. Rev. Toxicol. 51:328-58 (2021)]。今回我々は、先行研究 [Regul Toxicol Pharmacol. 137:105283 (2023)] と同一の投与条件に加え、残留農薬研究所で血中甲状腺関連ホルモンの測定を行うことで、マウスとラットにおける PTU の感受性の種差について初めて議論をすることを可能にした。基本的に毒性試験はラットで行われるが、遺伝子欠損動物などを用いたメカニズム解明にはマウスが用いられることが多い。今回の我々のデータは、マウスにおける結果をラット実験に落とし込むための重要な情報であり、今後、甲状腺機能低下を誘導する化学物質のリスク管理に少なからず貢献するものと考えている。

PTU 250 ppm の実質的な投与量については、表 2 の摂餌量 (6.25 g/日) からマウスの体重を 40 g として算出した値を、マウスのヒト等価用量 12.3 で補正すると、ヒトの場合およそ 3 mg/kg/日 (体重 50 kg とすると 150 mg/日) に相当する。ヒトへの臨床用量は、プロピルチオウラシルとして、通常妊婦に対しては初期量 150 - 300 mg/日を使用しているため、本研究で妊娠マウスに対して用いた 250 ppm の混餌投与は妊娠女性に対する臨床用量とほぼ同等の用量であると考えられる。

この用量 (250 ppm) においては、妊娠 ICR マウスで強力な甲状腺機能低下が誘導されていたが、母動物の体重変化には特に影響は認められなかった (表 1)。また着床数や胎児の生存数、胎児の体重にも影響は認められなかった (表 4)。本研究結果より、妊娠期における臨床用量の PTU 摂取は、胎児の臓器や骨格形成等の胎児発生にはほとんど影響が無いことが示された。一方、出生後の児動物については PTU 10 ppm 投与群、250 ppm 投与群双方で有意な体重低下が認められている (松丸の「分担研究報告書」を参照)。このことから、甲状腺機能低下の次世代影響は、胎児期よりも出生後の発達への影響の方が大きい可能性が示された。次年度は出生後の児動物の一般毒性についても評価を行う予定である。

## 2. Syn-Rep マウスにおけるレポーター分子の発現解析

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。本研究では、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 4)。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 5)。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、中脳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、Syn-Rep 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、P4 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 6)。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 の発現が平行であったことから、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相関が認められなかった(図8)。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

妊娠期の甲状腺機能低下は、児の脳以外の器官形成や骨格形成には影響を与えないことが明らかとなった。また Syn-Rep マウスは、発達期脳の神経細胞の構築状態を非侵襲的にトレースできたことから、DNT 評価の New Approach Methodology (NAM) としての有用性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ishida K, Furukawa M, Kunitani M, Yamagiwa R, Hiromori Y, **Matsumaru D**, Hu J, Nagase H, **Nakanishi T (責任著者)**, Novel, highly sensitive, *in vivo* screening method detects estrogenic activity at low doses of bisphenol A, *J Hazard Mater* 445: 130461 (2023)
- 2) Ishida K, Tatsumi K, Minamigawa Y, Mori K, **Matsumaru D**, Nagase H, **Kanda Y**, **Takuma K**, **Nakanishi T (責任著者)**, Neuronal differentiation reporter mice as a new methodology for detecting *in vivo* developmental neurotoxicity, *Biochem Pharmacol* 206: 115332 (2022)
- 3) Ishida K, **Matsumaru D**, Shimizu S, Hiromori Y, Hisamitsu Nagase H, **Nakanishi T (責任著者)**, Evaluation of the estrogenic action potential of royal jelly by genomic signaling pathway *in vitro* and *in vivo*, *Biol Pharm Bull* 45: 1510-1517 (2022)

- 4) Acebedo AR, Alcantara MC, **Nakanishi T**, Ogawa T, Yamada G, Suzuki K, Exposure to the organophosphate pesticide fenitrothion directly induced defects in mouse embryonic external genitalia, *Toxicol. Sci* 190: 13-22 (2022)
- 5) Jia Y, Zhang H, Hu W, Wang L, Kang Q, Liu J, **Nakanishi T**, Hiromori Y, Kimura T, Tao S, Hu J, Discovery of contaminants with antagonistic activity against retinoic acid receptor in house dust, *J Hazard Mater* 426:127847 (2022)
- 6) Abe S, **Murashima A** (共同筆頭著者, 共同責任著者), Kimura E, Ema M, Hitomi J, Early development of the pulmonary vascular system: An anatomical and histochemical reinvestigation of the pulmonary venous return development in mice, *Acta Histochem* 124: 151840 (2022)
- 5) 石田 慶士 他：発達神経毒性評価の効率化に向けた *in vivo* 神経細胞分化トレーサー系の構築、第 62 回日本先天異常学会学術集会、金沢/Web, 2022 年 7 月
- 6) 石田 慶士 他：DOHaD 学説からみた甲状腺機能低下：児の神経発達へのリスク評価を目指して、フォーラム 2022：衛生薬学・環境トキシコロジー、熊本、2022 年 8 月
- 7) 山際 頼 他：代替ビスフェノール 9,9-Bis(4-hydroxyphenyl)-fluorene の内分泌かく乱作用に関する検討、フォーラム 2022：衛生薬学・環境トキシコロジー、熊本、2022 年 8 月
- 8) 山際 頼 他：代替ビスフェノール 9,9-Bis(4-hydroxyphenyl)-fluorene の女性ホルモン様作用に関する検討、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2022, 静岡, 2022 年 11 月
- 9) 辰巳 佳乃子 他：化学物質の発達神経毒性評価系としての神経分化トレーサーマウスの有用性検証、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2022, 静岡, 2022 年 11 月
- 10) Ishida K *et al.* : Neuronal differentiation reporter mice as a new methodology for detecting *in vivo* developmental neurotoxicity, *In vivo* イメージングフォーラム 2022, 東京, 2022 年 12 月
- 11) 糟谷佐保里 他：母体甲状腺機能低下によって惹起される胎児発生毒性の評価、日本薬学会第 143 年会、札幌、2023 年 3 月

## 2. 学会発表

- 1) Ishida K *et al.* : Validation of brain neuronal differentiation reporter mice for improved developmental neurotoxicity evaluation, 2022 ICCA-LRI & NITE Workshop, Yokohama/Japan, June 2022
  - 2) 辰巳 佳乃子 他：発達神経毒性評価の効率化に向けた脳神経分化トレーサーマウスの有用性検証、第 49 回日本毒性学会学術年会、札幌、2022 年 6-7 月
  - 3) 森 一馬 他：妊娠期甲状腺機能低下モデルにおける児動物脳のイメージング解析、第 49 回日本毒性学会学術年会、札幌、2022 年 6-7 月
  - 4) 石田 慶士 他：化学物質の発達神経毒性評価の効率化に向けた神経分化トレーサーマウスの有用性検証、第 68 回日本薬学会東海支部総会・大会、名古屋、2022 年 7 月
- G. 知的財産権の出願・登録状況**  
該当なし

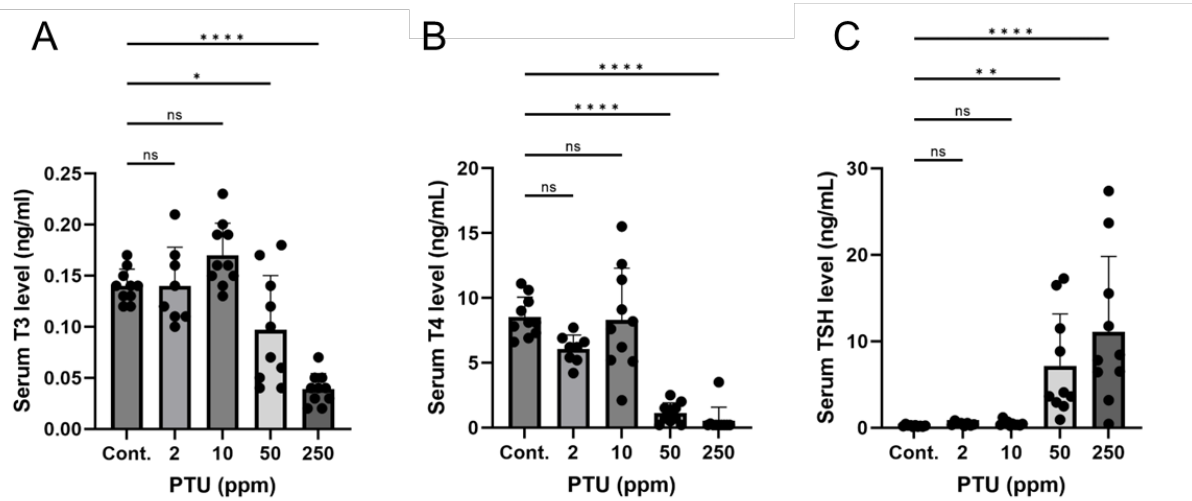


図1 妊娠期に PTU を投与したマウスの GD18 における血清中甲状腺関連ホルモンレベル

GD18 に母体より血清を回収し、血清中 T3 (A)、T4 (B)、TSH (C) レベルを測定した。Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=8-10). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001, \*\*\*\* $P$  < 0.0001 vs. control (Dunnett's test). ns: not significant

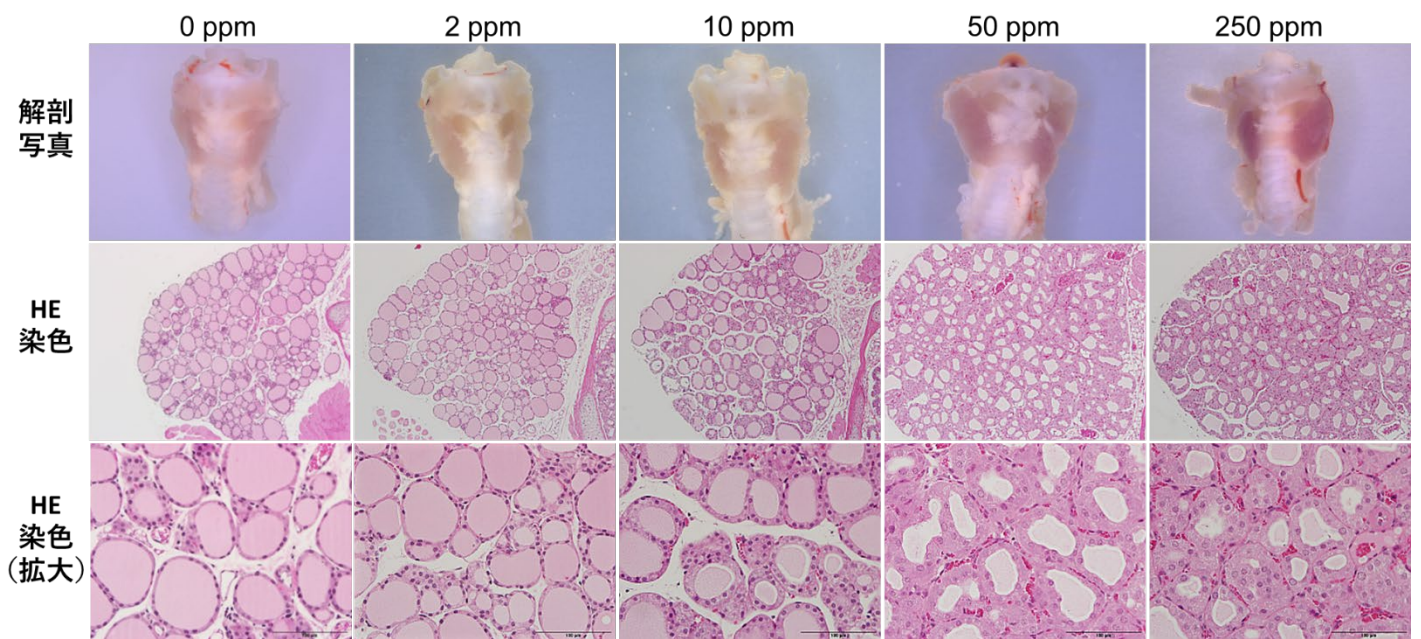


図2 妊娠期に PTU を投与したマウスの GD18 における甲状腺病理組織像

GD18 において母体の甲状腺を取り出し実体顕微鏡下で観察後、パラフィン切片を作製し、HE 染色にて組織像を観察した。



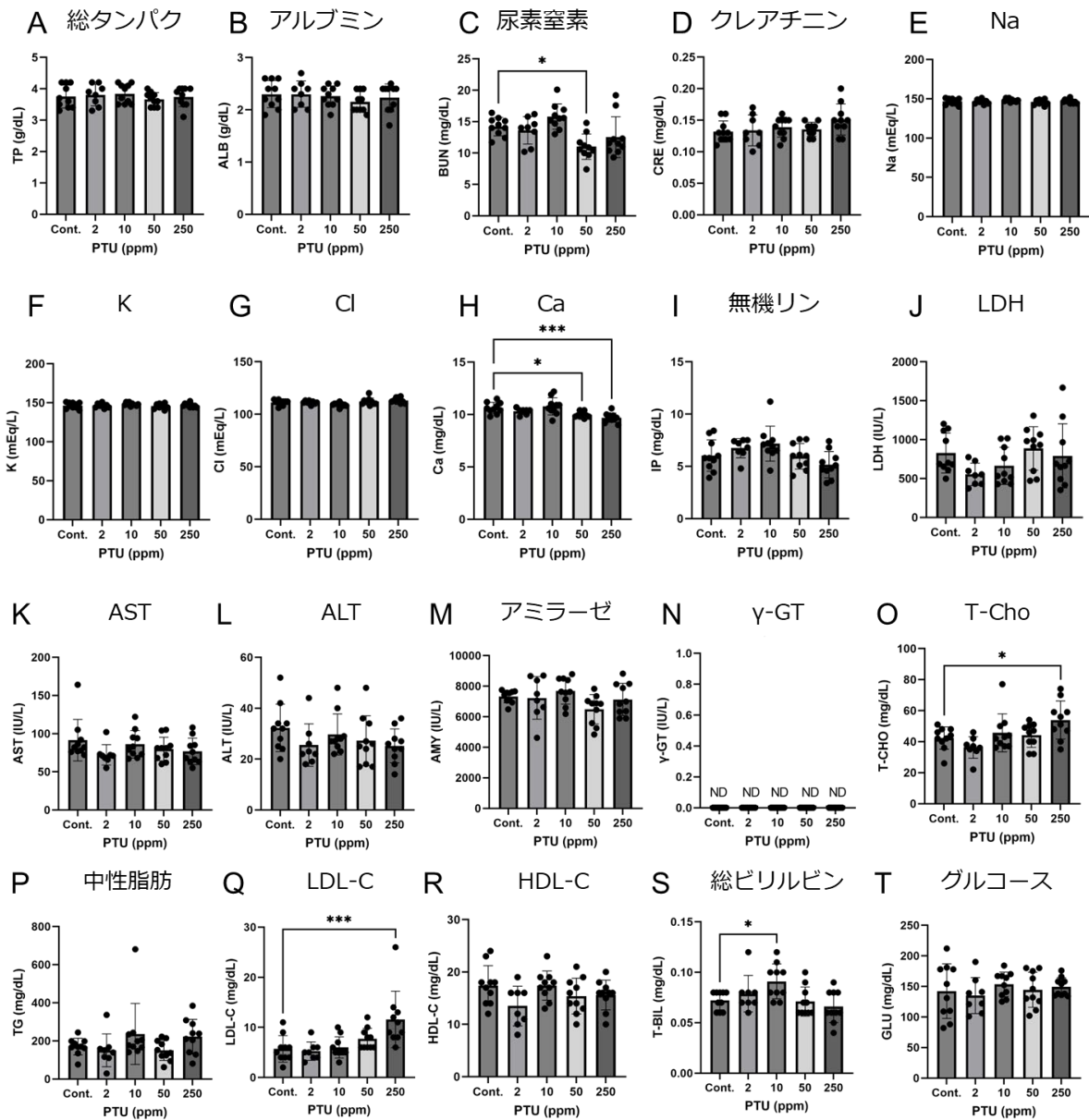


図3 妊娠期に PTU を投与したマウスの GD18 における血清中生化学パラメーターレベル

GD18 に母体より血清を回収し、血清中の総タンパク (A)、アルブミン (B)、尿素窒素 (C)、クレアチニン (D)、Na (E)、K (F)、Cl (G)、Ca (H)、無機リン (I)、乳酸脱水素酵素 (LDH) (J)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) (K)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) (L)、アミラーゼ (M)、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ ( $\gamma$ -GT) (N)、総コレステロール (T-Cho) (O)、中性脂肪 (P)、LDL-コレステロール (LDL-C) (Q)、HDL-コレステロール (HDL-C) (R)、総ビリルビン (S)、およびグルコース (T) レベルを測定した。Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=8-10). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001, \*\*\*\* $P$  < 0.0001 vs. control (Dunnett's test).



表 1 妊娠中に PTU を投与したマウスの妊娠 0 日目から 18 日目までの体重変化

Sex: Female		Unit (g)									
		Dose (ppm)									
		PTU 0		PTU 2		PTU 10		PTU 50		PTU 250	
個体数		10		8		10		10		10	
Days	0	32.190	± 1.869	31.079	± 0.908	30.306	± 1.409	31.368	± 1.366	31.137	± 1.813
	6	35.870	± 1.846	35.064	± 1.527	34.114	± 1.820	35.884	± 1.954	34.615	± 1.752
	9	37.605	± 1.691	36.931	± 1.242	35.998	± 1.722	37.784	± 1.752	36.689	± 2.234
	12	44.389	± 2.100	43.593	± 2.331	42.975	± 2.081	44.611	± 1.824	42.934	± 2.526
	15	54.054	± 2.783	52.508	± 2.850	52.539	± 2.823	54.383	± 2.258	51.767	± 3.064
	18	65.767	± 3.795	63.635	± 3.611	64.375	± 3.870	65.517	± 3.766	62.635	± 3.486
	0 to 18	33.577	± 2.613	32.555	± 3.206	34.069	± 3.518	34.149	± 2.674	31.498	± 2.628

Mean ± SD

表2 妊娠期に PTU を投与したマウスの妊娠 6 日目から 18 日目までの摂餌量変化

Sex: Female		Unit (g)									
		Dose (ppm)									
		PTU 0		PTU 2		PTU 10		PTU 50		PTU 250	
個体数		10		8		10		10		10	
Days	6 to 9	21.79	± 6.56	18.97	± 6.18	25.74	± 8.10	20.13	± 4.22	18.23	± 3.75
	9 to 12	25.27	± 9.63	18.43	± 3.14	29.64	± 11.44	19.47	± 5.18	17.40	± 3.16
	12 to 15	21.16	± 2.93	18.76	± 2.35	22.82	± 2.65	20.73	± 1.90	18.54	± 1.97
	15 to 18	23.43	± 1.80	23.52	± 3.15	23.25	± 2.25	21.86	± 2.76	20.86	± 2.24
	6 to 18	91.65	± 13.97	79.68	± 12.42	101.45	± 18.25	82.19	± 8.70	75.03	± 8.27*

Mean ± SD

\*p<0.05 vs. 0 ppm by Dunnett's test.

表3 妊娠期に PTU を投与したマウスの妊娠 18 日目における子宮重量

Sex: Female		Stage: 18day									
		Dose (ppm)									
		PTU 0		PTU 2		PTU 10		PTU 50		PTU 250	
個体数		10		8		10		10		10	
Uterus (g)		26.002	± 2.894	24.252	± 1.430	25.461	± 2.335	26.823	± 2.373	25.345	± 2.6661

Mean ± SD

表4 妊娠期（胎生期）にPTUを投与したマウスの妊娠（胎齢）18日目における母動物および胎仔の各種パラメーター

	Dose (ppm)				
	PTU	PTU	PTU	PTU	PTU
	0	2	10	50	250
Sex: Female	Stage: 18day				
妊娠解剖個体数	10	8	10	10	10
黄体数	±	±	±	±	
着床数	15.1 ± 1.9	13.5 ± 1.4	14.5 ± 1.4	14.8 ± 1.0	13.9 ± 1.9
着床率 (%)					
生存胎仔数	14.0 ± 2.3	12.8 ± 1.0	13.5 ± 1.6	14.3 ± 1.4	13.3 ± 2.1
♀胎仔数	7.7 ± 2.3	6.5 ± 0.9	6 ± 2.7	7.8 ± 1.5	6.2 ± 1.8
♂胎仔数	6.2 ± 2.2	6.25 ± 1.5	7.2 ± 2.6	6.5 ± 1.6	7.0 ± 1.2
性比 (M/F)	0.90 ± 0.45	1.00 ± 0.36	2.20 ± 3.47	0.92 ± 0.57	1.23 ± 0.41
死亡胚総数	1.10 ± 0.99	0.75 ± 1.04	1.00 ± 0.82	0.50 ± 0.71	0.70 ± 1.06
早期吸収胚数	0.80 ± 0.92	0.50 ± 0.76	0.60 ± 0.84	0.40 ± 0.70	0.50 ± 1.08
後期吸収胚数	0.20 ± 0.42	0.13 ± 0.35	0.10 ± 0.32	0.10 ± 0.32	0.20 ± 0.42
死亡胎仔数	0.10 ± 0.32	0.13 ± 0.35	0.30 ± 0.67	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
死亡胚割合 (%)	7.57 ± 7.50	5.18 ± 6.65	6.93 ± 5.76	3.48 ± 4.98	4.90 ± 7.44
♀胎仔体重	1.490 ± 0.108	1.491 ± 0.097	1.489 ± 0.072	1.519 ± 0.097	1.524 ± 0.107
♂胎仔体重	1.523 ± 0.136	1.550 ± 0.092	1.526 ± 0.098	1.534 ± 0.125	1.580 ± 0.119
♀胎盤重量	0.097 ± 0.012	0.106 ± 0.014	0.098 ± 0.013	0.094 ± 0.008	0.095 ± 0.009
♂胎盤重量	0.103 ± 0.015	0.112 ± 0.013	0.104 ± 0.008	0.100 ± 0.011	0.105 ± 0.012
♀AGD (mm)	0.970 ± 0.060	0.990 ± 0.050	0.966 ± 0.082	0.979 ± 0.044	0.987 ± 0.050
♂AGD (mm)	1.625 ± 0.059	1.684 ± 0.076	1.705 ± 0.105	1.733 ± 0.094*	1.785 ± 0.066**
♀AGD/体重 <sup>1/3</sup> (mm/g <sup>1/3</sup> )	0.851 ± 0.062	0.868 ± 0.047	0.847 ± 0.065	0.853 ± 0.045	0.859 ± 0.037
♂AGD/体重 <sup>1/3</sup> (mm/g <sup>1/3</sup> )	1.416 ± 0.074	1.458 ± 0.055	1.482 ± 0.074	1.506 ± 0.089	1.535 ± 0.025##

Mean ± SD

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. 0 ppm by Dunnett's test.

##  $P < 0.01$  vs. Steel test

表5 胎生期に PTU を投与したマウスの胎齢 18 日目における外表検査の結果

胎仔外表検査 所見別

Sex: Female	Stage: 18day														
	Dose (ppm)														
	PTU 0			PTU 2			PTU 10			PTU 50			PTU 250		
母体数	10			8			10			10			10		
胎仔数	140			102			135			143			133		
NAD	98.57	±	3.01	98.15	±	3.44	95.87	±	7.12	98.56	±	3.04	100.00	±	0.00
	(	138	)	(	100	)	(	130	)	(	141	)	(	133	)
口蓋裂	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.77	±	2.43	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00
	(	0	)	(	0	)	(	1	)	(	0	)	(	0	)
軸後性有茎性過剰指	0.71	±	2.26	0.96	±	2.72	3.36	±	6.11	1.44	±	3.04	0.00	±	0.00
	(	1	)	(	1	)	(	4	)	(	2	)	(	0	)
軸前性多合趾	0.71	±	2.26	0.89	±	2.53	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00
	(	1	)	(	1	)	(	0	)	(	0	)	(	0	)

Mean ± SD

\*, \*\*: Significant difference from control, p<0.05, p<0.01.(Fisher test)

NAD (Nothing Abnormal Detected)

表6 胎生期に PTU を投与したマウスの E18 における内臓検査の結果

胎仔内臓検査 所見別

	Sex: Female		Stage: 18day	
	Dosage (mg/kg)			
	PTU 0		PTU 250	
母体数	10		10	
胎仔数	66		60	
NAD	89.08 ± 16.47 ( 60 )	84.75 ± 20.47 ( 50 )		
臍動脈転換	10.92 ± 16.47 ( 6 )	15.25 ± 20.47 ( 10 )		

Mean ± SD

表7 胎生期に PTU を投与したマウスの E18 における骨格検査の結果

胎仔骨格検査 変異および異常割合

	Sex: Female		Stage: 18day	
	Dose (ppm)			
	PTU 0		PTU 250	
母体数	10		10	
胎仔数	74		72	
NAD	37.20 ± 28.51 ( 28 )	47.54 ± 26.59 ( 34 )		
変異	39.96 ± 19.12 ( 30 )	28.26 ± 22.69 ( 21 )		
異常	16.31 ± 15.59 ( 11 )	11.54 ± 15.05 ( 8 )		
骨化影響	30.02 ± 29.58 ( 22 )	36.51 ± 30.57 ( 27 )		

Mean ± SD

表8 胎生期にPTUを投与したマウスのE18における骨格検査の内訳

	Dose (ppm)			
	PTU		PTU	
	0		250	
母体数	10		10	
胎仔数	74		72	
胸骨文節配列異常	4.50 ± 9.56 ( 4 )	1.25 ± 3.95 ( 1 )		
剣状軟骨分岐	4.75 ± 8.54 ( 4 )	1.43 ± 4.52 ( 1 )		
剣状軟骨孔	11.40 ± 16.07 ( 9 )	8.76 ± 15.45 ( 7 )		
頸部短小過剰肋骨	0.00 ± 0.00 ( 0 )	1.43 ± 4.52 ( 1 )		
胸腰部完全過剰肋骨	5.87 ± 14.28 ( 5 )	4.52 ± 9.94 ( 3 )		
胸腰部短小過剰肋骨	19.38 ± 16.55 ( 13 )	6.95 ± 10.08 ( 5 )		
胸腰部過剰肋軟骨不連続	12.31 ± 11.80 ( 8 )	3.10 ± 6.55 ( 2 )		
腰椎欠損	0.00 ± 0.00 ( 0 )	1.00 ± 3.16 ( 1 )		
後肢帯片側性尾方位異常	0.00 ± 0.00 ( 0 )	1.00 ± 3.16 ( 1 )		
第6胸骨分節分岐	6.68 ± 12.97 ( 4 )	6.01 ± 11.11 ( 4 )		
胸骨分節癒合	0.00 ± 0.00 ( 0 )	1.43 ± 4.52 ( 1 )		
胸骨文節間軟骨分離	2.40 ± 5.25 ( 2 )	0.00 ± 0.00 ( 0 )		
肋軟骨胸骨接続	2.68 ± 5.66 ( 2 )	8.68 ± 15.66 ( 6 )		
第1頸椎弓分岐	0.00 ± 0.00 ( 0 )	1.43 ± 4.52 ( 1 )		
第2頸椎弓分岐	0.00 ± 0.00 ( 0 )	1.43 ± 4.52 ( 1 )		
後肢趾節骨過剰	1.43 ± 4.52 ( 1 )	0.00 ± 0.00 ( 0 )		
上後頭骨不完全骨化	5.71 ± 18.07 ( 4 )	9.14 ± 18.36 ( 7 )		
胸骨文節非対称骨化	7.86 ± 17.32 ( 5 )	6.43 ± 15.95 ( 6 )		
胸骨文節二分骨化	5.35 ± 7.09 ( 4 )	0.00 ± 0.00 ( 0 )		
胸骨文節不完全骨化	13.20 ± 19.89 ( 10 )	17.76 ± 28.01 ( 14 )		
胸骨過剰骨化部位	1.25 ± 3.95 ( 1 )	7.50 ± 16.87 ( 5 )		
第2頸椎弓分離骨化部位	0.00 ± 0.00 ( 0 )	1.43 ± 4.52 ( 1 )		
頸椎体不完全骨化	0.00 ± 0.00 ( 0 )	6.25 ± 15.87 ( 6 )		
頸椎体未骨化	1.00 ± 3.16 ( 1 )	4.68 ± 7.76 ( 4 )		
胸椎弓骨化亢進	1.43 ± 4.52 ( 1 )	0.00 ± 0.00 ( 0 )		

Mean ± SD

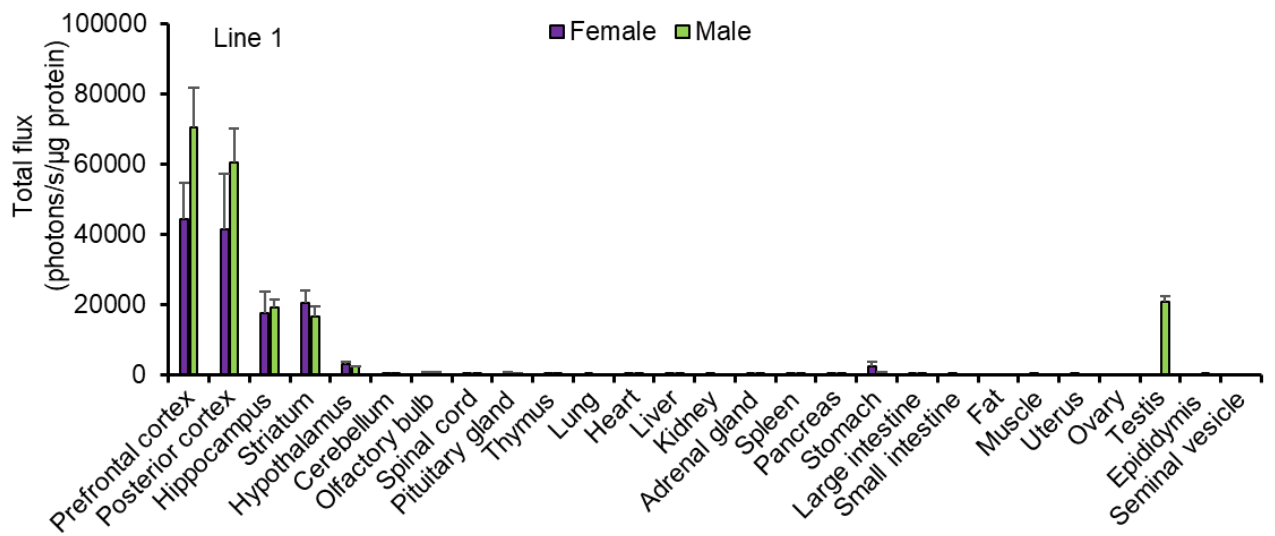
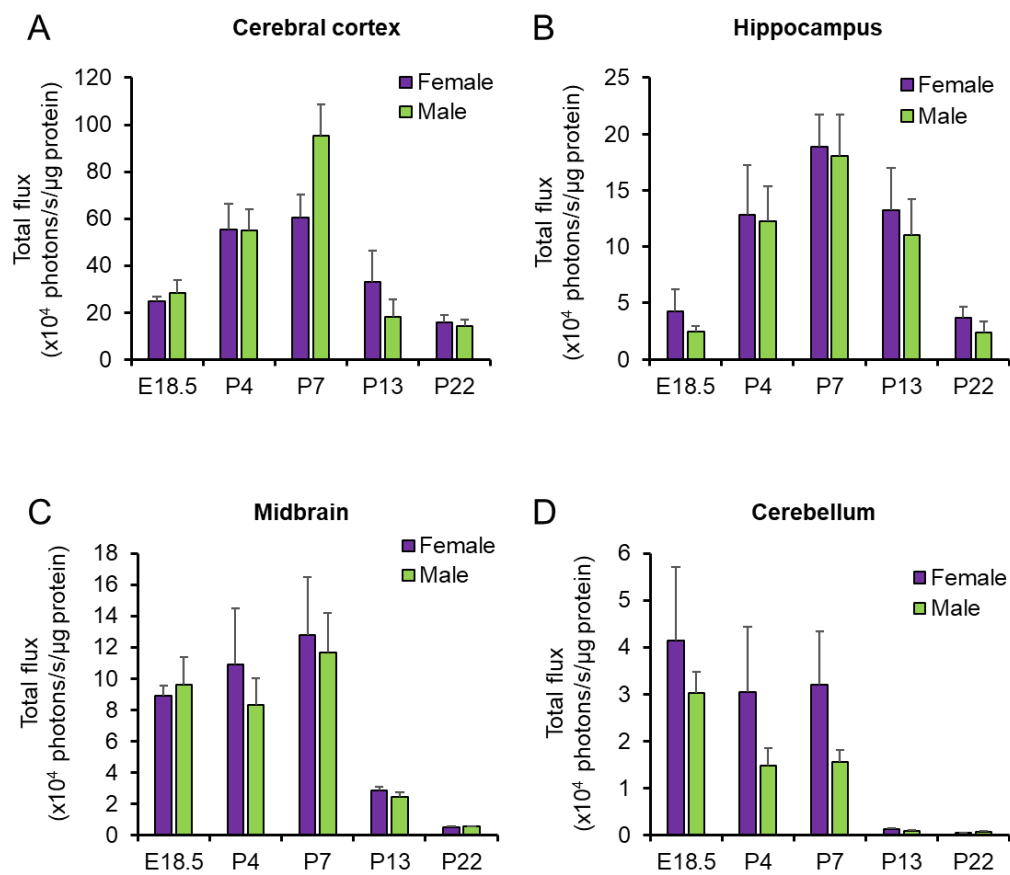


図4 成熟期 Syn-Rep マウス雌の各臓器における Luc2 活性  
 Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=3)



**図5 Syn-Rep マウスの出生直前から離乳期の脳における Luc2 活性**

Syn-Rep マウスの E18.5、P4、P7、P13、P22 における大脳皮質 (A)、海馬 (B)、中脳 (C)、小脳 (D) の Luc2 活性を測定した。Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=4-5)



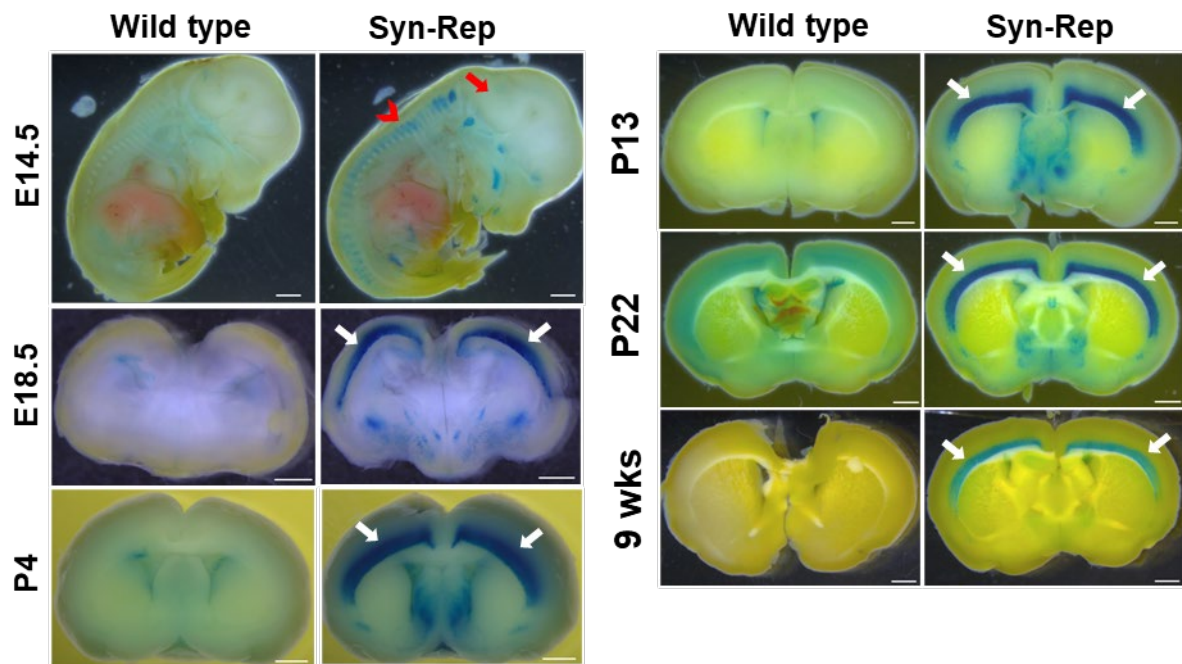
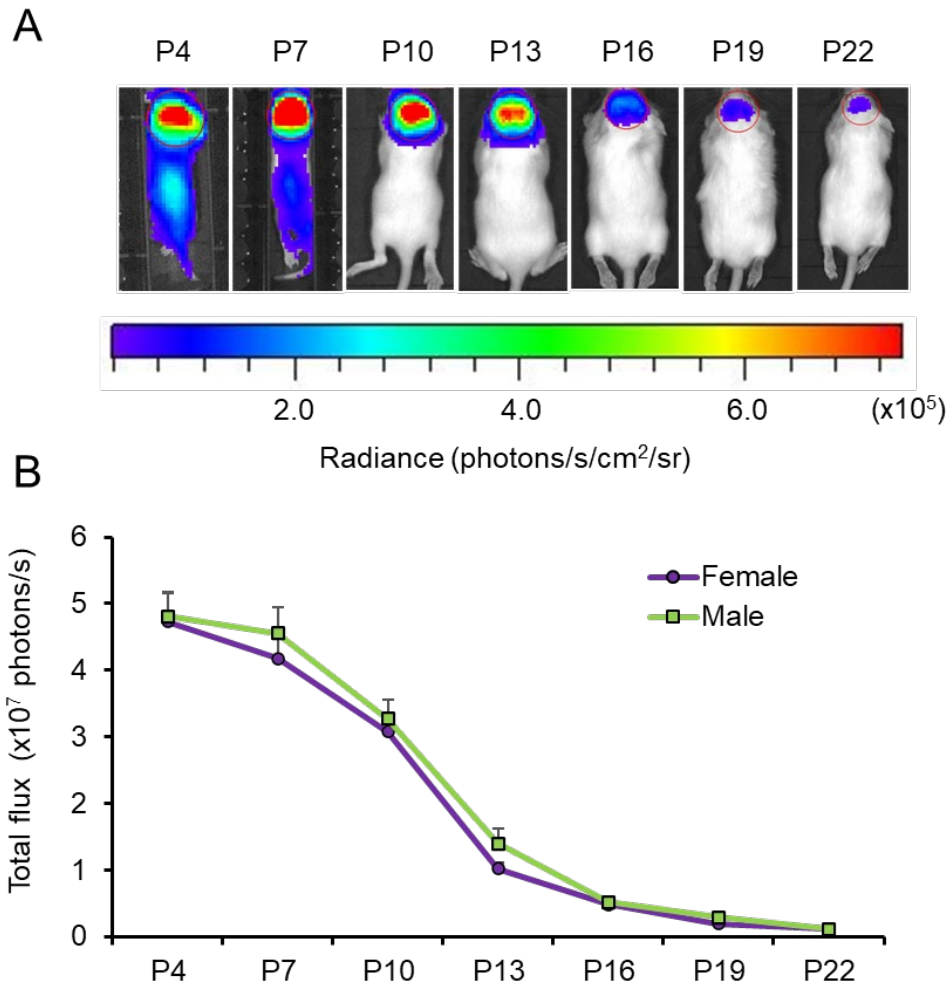


図6 X-gal 染色を用いた Syn-Rep マウスの脳における LacZ 発現の経時変化に関する組織学的解析

Syn-Rep マウス E14.5 の全身および E18.5、P4、P13、P22、9 週齢の脳における  $\beta$ -galactosidase 発現量を X-gal 染色により評価した。赤矢印と白矢印は脳における発現部位を示している。赤矢尻は脊髄における発現部位を示している。



**図7 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 腹の母体から産まれた Syn-Rep マウスに対し、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。(A) 代表的な個体の写真を示している。(B) 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 - 15)

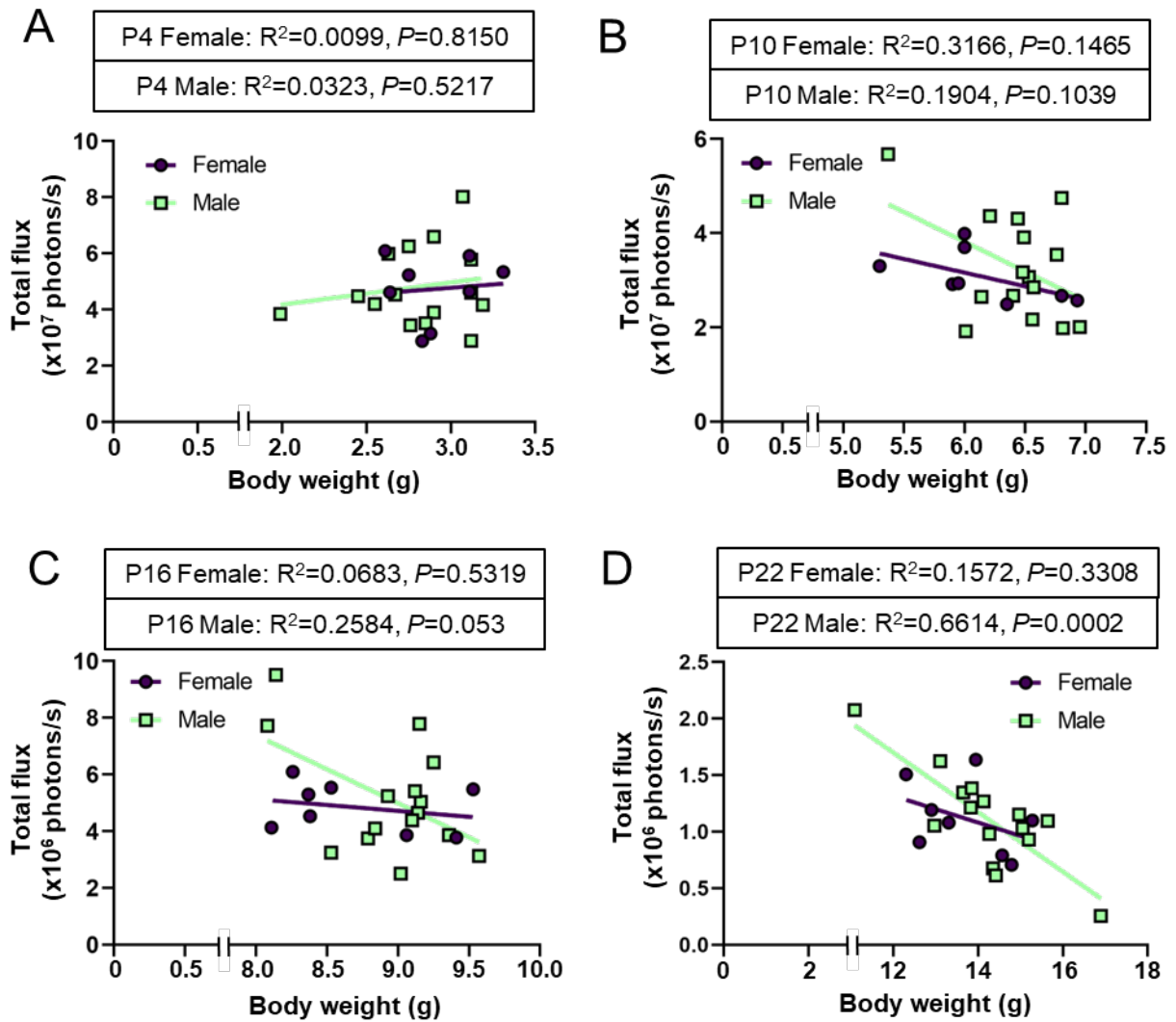


図8 各日齢における頭部の発光と体重の相関性

Syn-Rep マウスに対し、P4 (A)、P10 (B)、P16 (C)、P22 (D) における頭部の発光強度 (Total flux) と体重の相関性に関して、決定係数 ( $R^2$ ) と p 値を GraphPad Prism 9 を用いた線形回帰分析にて算出した。

令和4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

研究分担者：田熊 一敏（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を投与したところ、4～13日齢（P4～P13）の雌雄児動物の脳におけるレポーター分子（Luc2）の発現が有意に低下した。また成熟期（8週齢）においても、VPA投与群で大脳皮質における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VPA投与群では自閉スペクトラム症（ASD）様の行動異常が認められたことから、Syn-RepマウスはDNT評価を行うための有用なツールとなる可能性が示された。また、Polyinosinic acid-polycytidylic acid (Poly(I:C))を用いた母体免疫活性化（MIA）モデルでは、P4～P7の児動物脳のレポーター分子の発現が有意に上昇しており、抗甲状腺薬であるプロピルチオウラシル（PTU）投与モデルと類似した発現プロファイルを示した。この結果から、妊娠期の甲状腺機能低下とMIAによる児の神経発達影響には、共通したメカニズムが関与する可能性が考えられた。

### 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部分を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生かすためには、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した。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) を用いた。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。そこで、VPA を用いて 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。

また、母体の甲状腺機能低下による児の神経発達に対する影響 (松丸の「分担研究報告書」を参照) に、炎症の惹起が関与している可能性が考えられた。妊娠期の感染症等に起因する母体免疫の活性化 (maternal immune activation: MIA) は児の ASD 発症リスクを上昇させることがヒト疫学調査より報告されており、母体の甲状腺機能低下と MIA による児の神経発達に対する影響には、共通したメカニズムが関与する可能性が考えられた。そこで本分担研究では、MIA が Syn-Rep マウスのレポーター遺伝子の発現に与える影

響についても検証した。

## **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. 薬物の投与**

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ある胎齢 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。MIA モデルマウス作製にはウイルス RNA を模倣する合成二本鎖アナログである Polyinosinic acid-polycytidylic acid (Poly(I:C)) 投与モデルを用いた。Poly(I:C)の投与は MIA の誘導が報告されている条件である E12.5 に 20 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**

出生後から発達期 (P4~P22) 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 (VPA 投与検討: 5 mg/mL、Poly(I:C)投与検

討：15 mg/mL) を 10 mL/kg 体重で腹腔内に投与した。D-luciferin 投与直後から、40 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  $\mu$ 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  $\mu$ L/well となるように上清を添加し、これに D-luciferin 緩衝液を 50  $\mu$ 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  $\mu$ g 当たりのルシフェラーゼ活性 (photons/second/ $\mu$ 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  $\mu$ m の冠状切片を作製した。切片を MAS coating slide glass に貼付し、脱パラフィン・水和した後、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・透徹した後、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<sup>2</sup> 当たりの平均値で示した。

#### 6. 行動薬理的解析

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  $\times$  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 (30×30×35 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. 血清中 IL-6 濃度測定

妊娠12日目の母体に20 mg/mLのPoly(I:C)を腹腔内投与し、3時間後に血清を回収した。血清中 IL-6 濃度は IL-6 ELISA Kit, Mouse (Proteintech Group) を用いて測定した。

## 8. mRNA 発現量の評価

Poly(I:C)投与群のP4の児動物において、前頭前皮質を取り出し、TRI REAGENT (コスモバイオ) を用いて mRNA を抽出した。さらに ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて mRNA を cDNA に逆転写した。各種神経系マーカーの mRNA 発現量評価は THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いたリアルタイム PCR にて、LightCycler 96 システム (Roche) を用いて行った。

## 9. 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) 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. VPA を用いた DNT 評価における Syn-Rep マウスの有用性の検証

### 1-1. 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)。

### 1-2. *in vivo* イメージングによる児動物脳のレポーター分子発現への影響

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。

### 1-3. 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)。

### 1-4. 児動物の行動薬理的解析

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 4)。VPA 曝露群では、生後8週齢において、経時的な移動距離 (図 4A)、総移動距離 (図 4B) および立ち上がり回数 (図 4C) 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 5)。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 5A)、クローズドアーム滞在時間の有意な増加 (図 5B)、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 6)。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 6A)。また、VPA 曝露群では毛づくろい行動 (図 6B) および攻撃行動 (図 6C) 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 7)。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 7 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 7 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 7 右)。

## 2. MIA 誘導時の Syn-Rep マウス児動物脳におけるレポーター分子の発現検討

### 2-1. 母体体重、摂餌量、血清中 IL-6 レベルおよび児動物体重増加への影響

妊娠期 Syn-Rep マウスの甲状腺機能低下時に児動物脳のレポーター分子の発現が上昇し、この応答が VPA 曝露時とは真逆であったことから、VPA で誘導される神経細胞死とは異なった毒性発現機構 (MoA) で誘導されることが示唆されている (松丸の「分担研究報告書」を参照)。またヒトの甲状腺機能低下症患者や成体動物で甲状腺機能が低下すると血中の炎症性サイトカインが上昇したり、脳内のミクログリア細胞が活性化される、いわゆる神経炎症が起こる可能性が指摘されている。さらに近年、感染症などによる MIA が、児の脳発達に少なからず影響を与える可能性が懸念されている。そこで、甲状腺機能低下時に児動物脳で誘導されるレポーター分子の発現上昇にも MIA が関与しているのではないかと考え、胎生期に曝露すると MIA による神経発達症様症状を誘導することが知られている Poly(I:C) 投与の影響を予試験的に検討した。Poly(I:C) 投与群において母体の体重量 (図 8A) や摂餌量 (図 8B)

には影響は認められなかった。また、Poly(I:C) 投与 3 時間後の母体血清 IL-6 レベルは顕著に増加していた (図 9) ことから、Poly(I:C) 投与により MIA が誘導されたことが確認された。児動物の体重増加に関して、一部の日齢で有意な増加が認められたものの、出生後から P19 までの期間全体を通して Poly(I:C) 投与による顕著な影響は認められなかった (図 10A, B)。

### 2-2. *in vivo* イメージングによる児動物脳のレポーター分子発現への影響

児動物脳について *in vivo* イメージングにて解析したところ、Poly(I:C) 投与群雌では P4、P7、P13、P16 において、雄では P4、P7 において、脳のレポーター分子の発現が有意に上昇した (図 11A, B)。

### 2-3. 児動物脳の神経系マーカー遺伝子発現量への影響

次に、顕著な発光の上昇が認められた P4 の児動物の前頭前皮質を回収し各種神経系マーカーの mRNA 発現量を評価したところ、神経前駆細胞のマーカーである *Nestin* の発現量に変化は認められなかったものの、未成熟神経細胞のマーカーである *Neurod1* と成熟神経細胞のマーカーである *Map2* の発現量が Poly(I:C) 投与群で有意に低下していた (図 12)。また、ミクログリアのマーカーである *Ibal* とオリゴデンドロサイトのマーカーである *Mbp* の発現量は Poly(I:C) 投与群で低下傾向を示し、アストロサイトのマーカーである *Gfap* の発現量は増加傾向であったが、いずれも統計学的に有意な差では無かった (図 12)。

## 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、レポーター分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。

*Poly(I:C)* 投与し MIA を誘導した群では P4~P7 の児動物脳においてレポーター分子の発現量は上昇しており、VPA 投与群とは異なる発現パターンを示した。一方、母体に PTU を投与し甲状腺機能低下を誘導した児動物脳においてもレポーター分子の発現量は上昇しており（松丸の「分担研究報告書」を参照）、*Poly(I:C)* 投与と PTU 投与群では類似したレポーター分子の発現パターンを示すことが明らかとなった。MIA 誘導性 ASD のメカニズムについては、母体の炎症性サイ

トカイン誘導と、それに伴う胎児脳のミクログリア活性化の関与が報告されている。母体の甲状腺機能低下と MIA による児の神経発達に対する影響には、炎症性サイトカイン誘導や胎児脳のミクログリア活性化等共通したメカニズムが関与する可能性が考えられた。

*Poly(I:C)* 投与群における遺伝子発現量解析において、神経前駆細胞のマーカーである *Nestin* の発現量に変化は認められなかったものの、未成熟神経細胞のマーカーである *Neurod1* と成熟神経細胞のマーカーである *Map2* の発現量が *Poly(I:C)* 投与群で有意に低下していたことから、神経前駆細胞から未成熟神経細胞への分化過程において *Poly(I:C)* による阻害が引き起こされたと考えられる。しかしながら神経系マーカーの遺伝子発現レベルの結果からは、*Poly(I:C)* 投与群におけるレポーター分子の発現上昇が何を反映しているのかについては説明することができなかった。今後は神経細胞をはじめとした単一種類の細胞における発現量を調べる必要がある。

*Syn-Rep* マウスのレポーター遺伝子はシナプス構築タンパク質 *Syn1* の遺伝子プロモーターで制御されていることから、各薬物投与条件下における頭部発光の変化はシナプス構築状態の異常を反映している可能性が考えられる。VPA 投与群におけるレポーター分子の発現量の低下は神経細胞数の減少に起因するシナプス構築の低下を反映し、*Poly(I:C)* や PTU 投与群におけるレポーター分子の発現量の上昇は、ミクログリア活性化を介したシナプス刈込過程の異常を反映している可能性が高いと考えられる。ヒトにおいても ASD をはじめとした神経発達症において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と考えられる。一方で、VPA 投与

群と Poly(I:C)および PTU 投与群でレポーター分子の経時的発現プロファイルが異なっていたことから、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ことも明らかとなった。今後は Syn-Rep 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、PTU 投与による行動異常への影響や 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、Syn-Rep マウスの DNT 評価における New Approach Methodology (NAM) としての有用性が確認された。また、母体の甲状腺機能低下と MIA による児の神経発達に対する影響には、共通したメカニズムが関与する可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ishida K, Tatsumi K, Minamigawa Y, Mori K, **Matsumaru D**, Nagase H, **Kanda Y**, **Takuma K**, **Nakanishi T** (責任著者), Neuronal differentiation reporter mice as a new methodology for detecting *in vivo* developmental neurotoxicity, *Biochem Pharmacol* 206: 115332 (2022)
- 2) Imado E, Sun S, Abawa AR, Tahara T, Kochi T, Huynh TNB, Asano S, Hasebe S,

Nakamura Y, Hisaoka-Nakashima K, Kotake Y, Irifune M, Tsuga K, **Takuma K**, Morioka N, Kiguchi N, Ago Y, Prenatal exposure to valproic acid causes allodynia associated with spinal microglial activation, *Neurochem Int* 160: 105415 (2022)

- 3) Takemoto T, Baba M, Yokoyama K, Kitagawa K, Nagayasu K, Ago Y, Seiriki K, Hayata-Takano A, Kasai A, Mori D, Ozaki N, **Takuma K**, Hashimoto R, Hashimoto H, Oxytocin ameliorates impaired social behavior in a mouse model of 3q29 deletion syndrome, *Mol Brain* 15:26 (2022)

## 2. 学会発表

- 1) Ishida K *et al.* : Validation of brain neuronal differentiation reporter mice for improved developmental neurotoxicity evaluation, 2022 ICCA-LRI & NITE Workshop, Yokohama/Japan, June 2022
- 2) 辰巳 佳乃子 他：発達神経毒性評価の効率化に向けた脳神経分化トレーサーマウスの有用性検証、第 49 回日本毒性学会学術年会、札幌、2022 年 6-7 月
- 3) 森 一馬 他：妊娠期甲状腺機能低下モデルにおける児動物脳のイメージング解析、第 49 回日本毒性学会学術年会、札幌、2022 年 6-7 月
- 4) Kitagawa K *et al.* : Intranasal oxytocin administration suppresses social contact-induced neural activity in a POGZ-Q1038R mutant mouse model of autism spectrum disorder, Neuroscience 2022, San Diego /USA, Nov. 2022

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

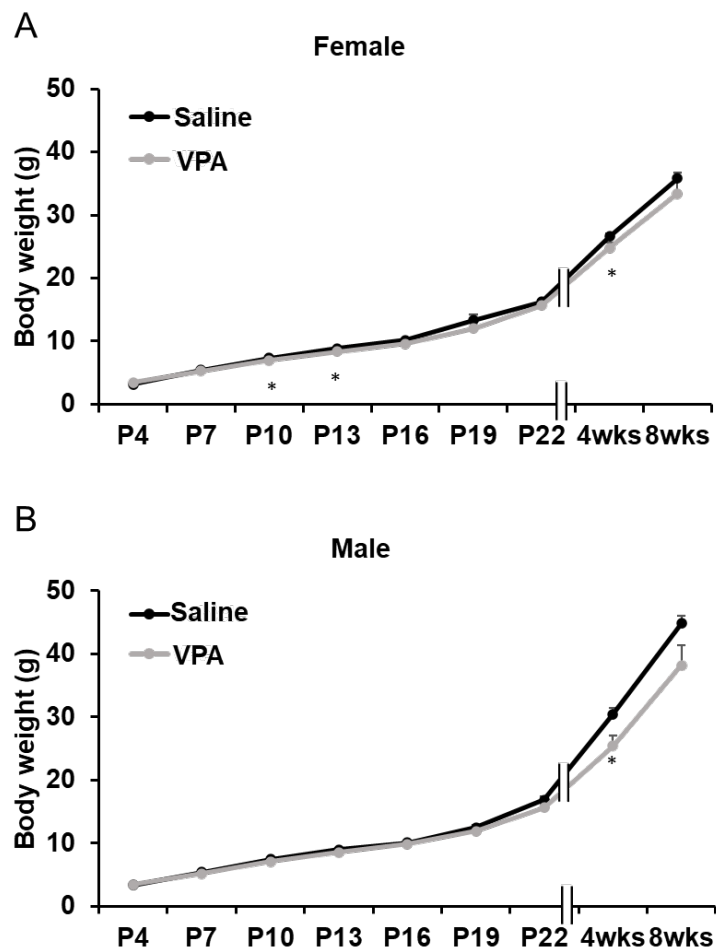


図1 E12.5にVPAを曝露したSyn-Repマウス児の体重変化

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)。

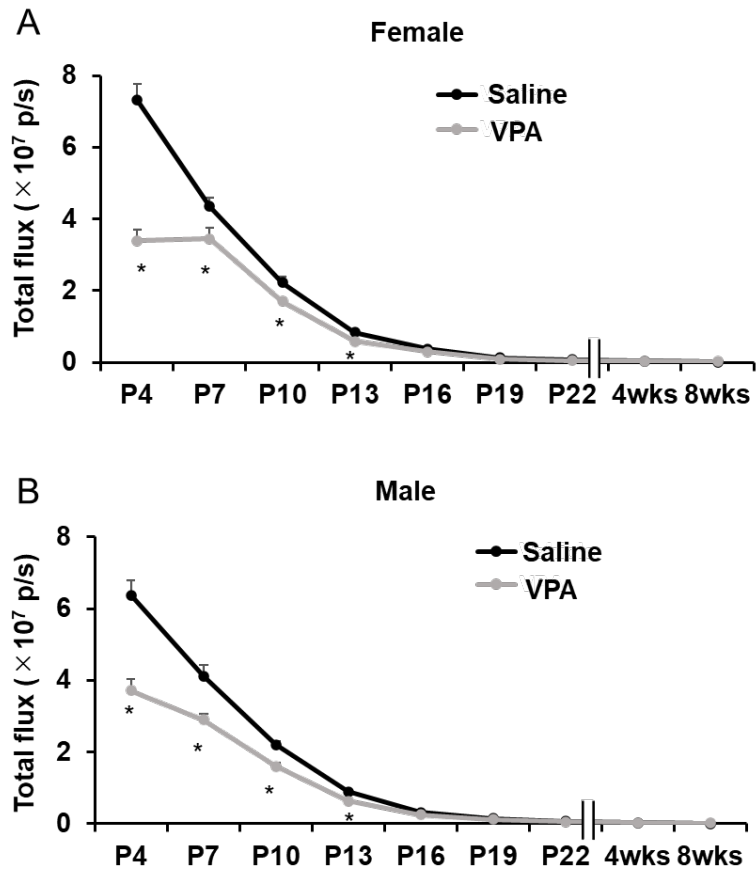
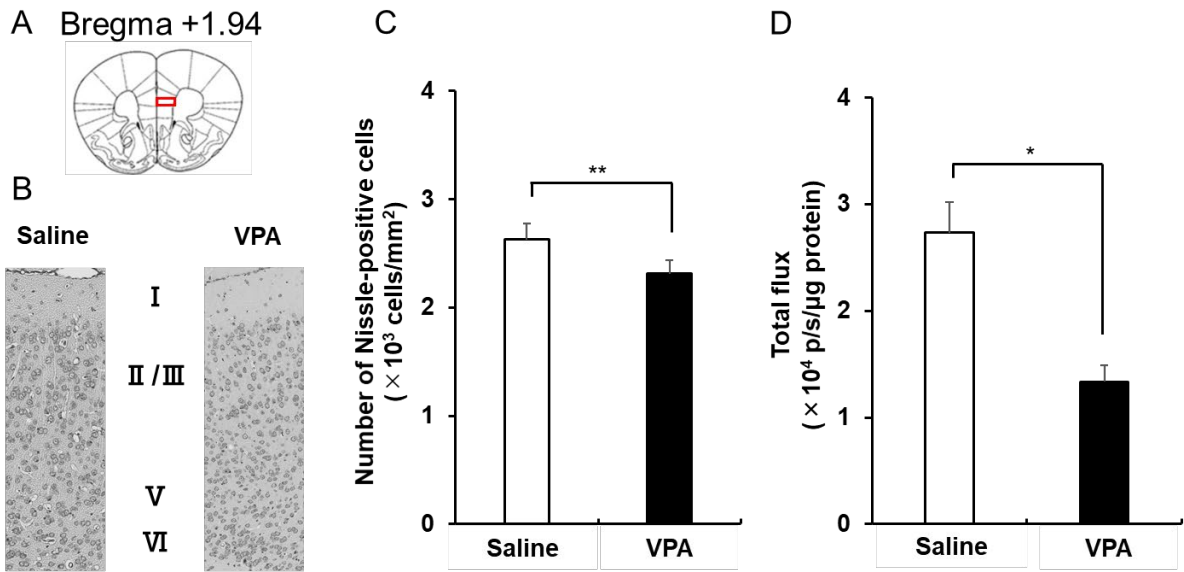


図2 E12.5にVPAを曝露したSyn-Rep児動物頭部の*in vivo*イメージング経時変化

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1mm<sup>2</sup>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 $\mu$ 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)。

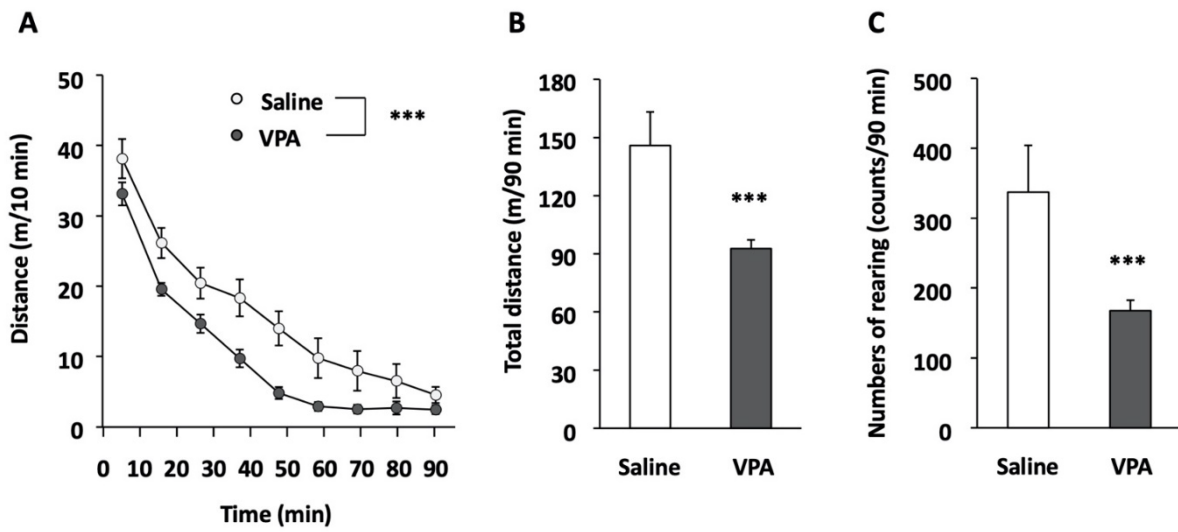
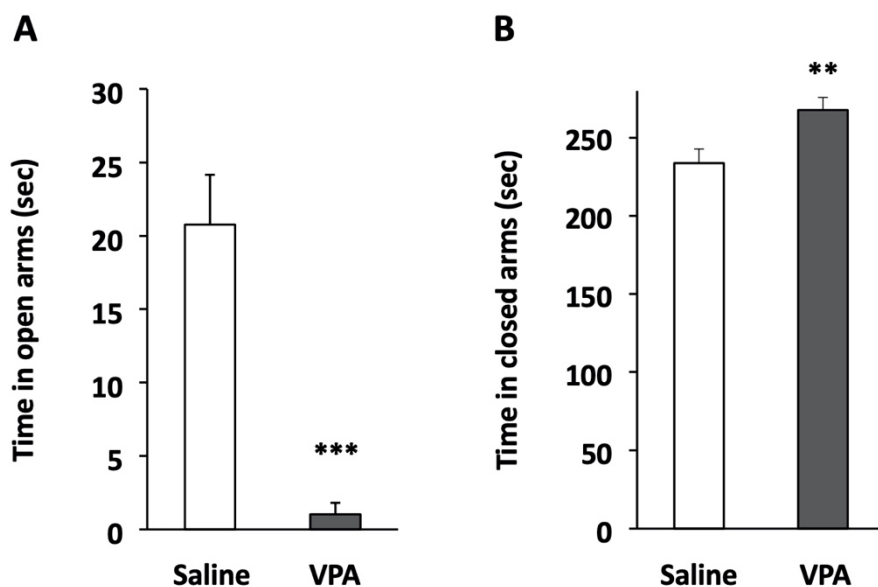


図4 E12.5 に VPA を曝露した児動物の自発行動変化

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5 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)。

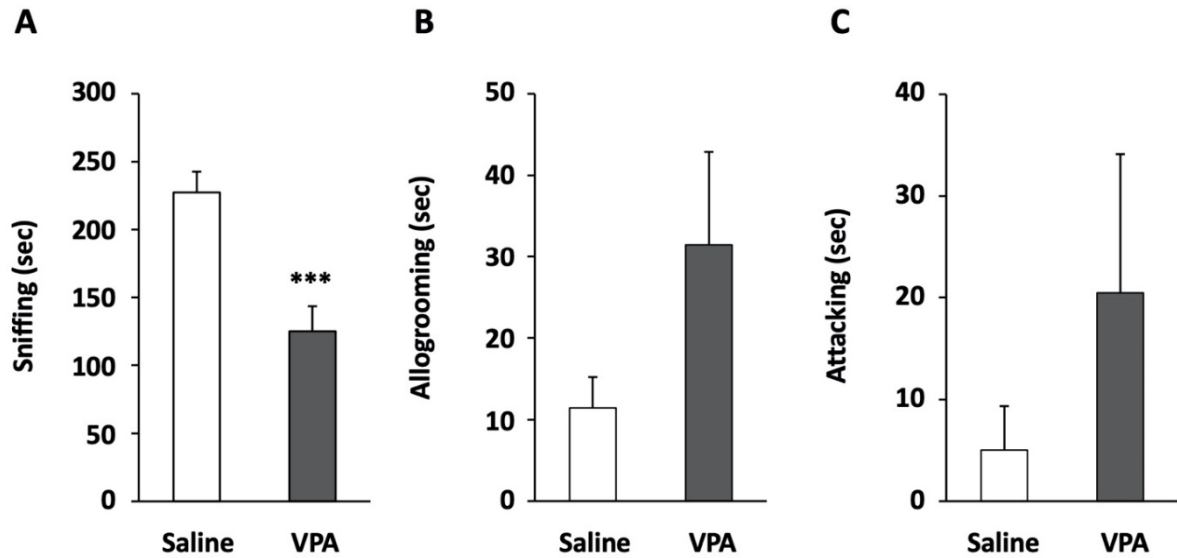


図6 E12.5にVPAを曝露した児動物の社会性行動の変化

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)。



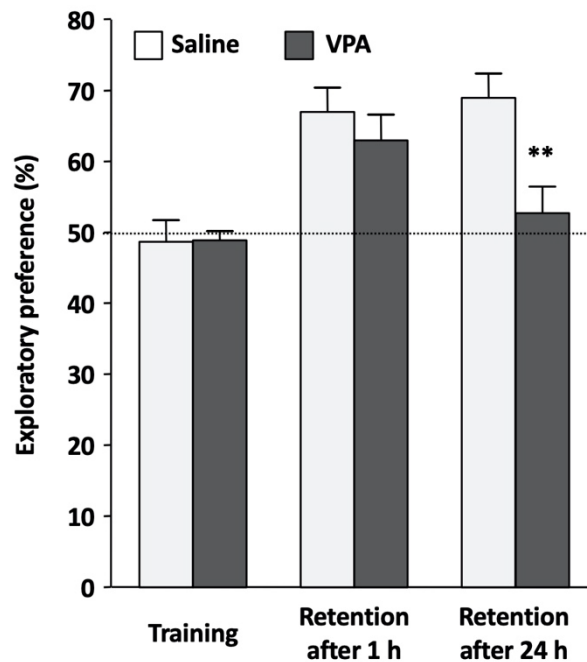


図7 E12.5 に VPA を曝露した児動物の学習記憶能の変化

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)。

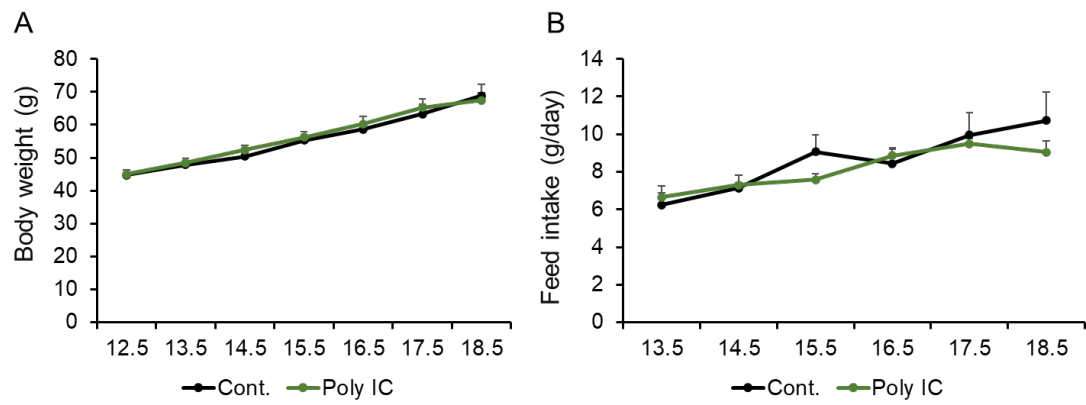


図8 妊娠12.5日目にPoly(I:C)を投与した妊娠マウスの体重および摂餌量の変化  
 妊娠12.5-18.5日目において妊娠母体の体重(A)と摂餌量(B)を測定した。

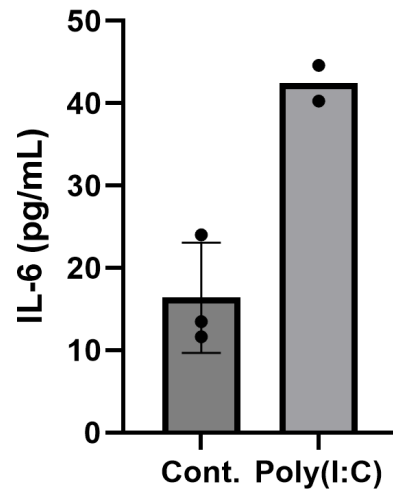
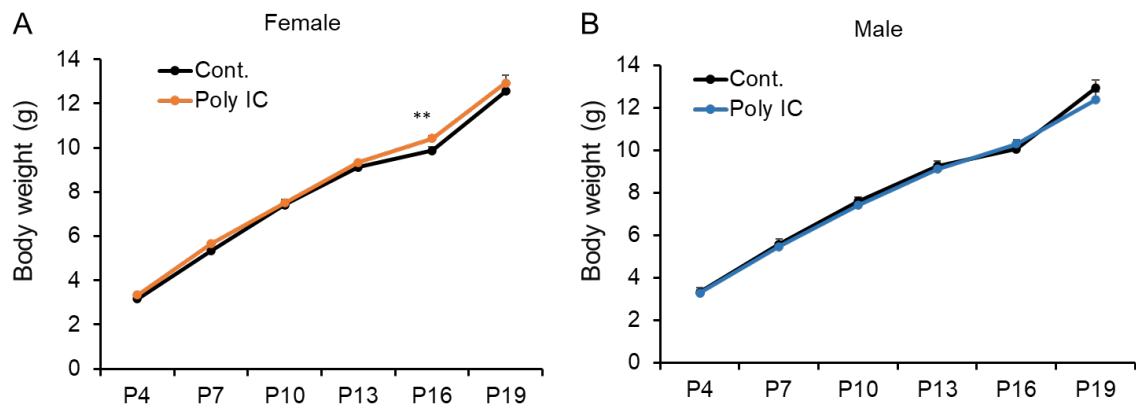


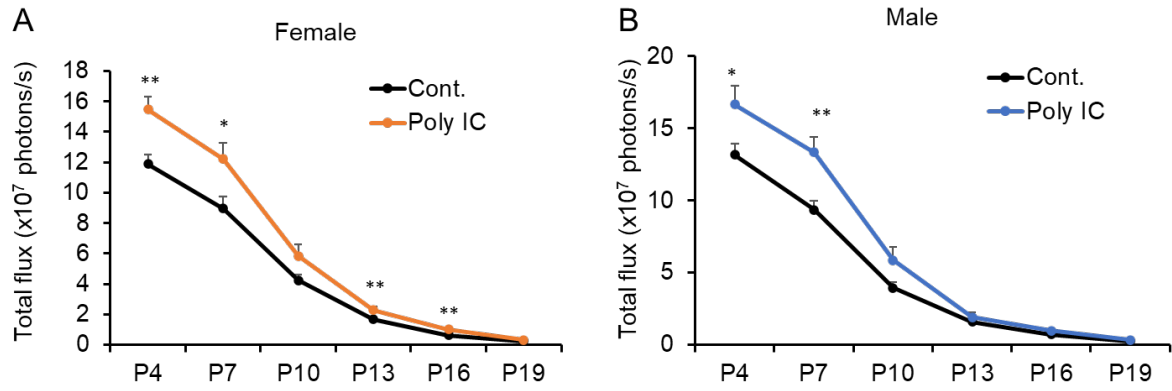
図 9 妊娠 12.5 日目に Poly(I:C)を投与した妊娠マウスの血清中インターロイキン (IL-) 6 レベルの評価

Poly(I:C)投与 3 時間後に母体から血清を回収し、IL-6 レベルについて IL-6 ELISA Kit, Mouse を用いて測定した。



**図 10 E12.5 に Poly(I:C) を投与した Syn-Rep マウス児の体重変化**

出生後、P4、P7、P10、P13、P16、P19 における児動物（A：雌、B：雄）の体重を測定した。 \*\* $P < 0.01$  (unpaired t test)。



**図 11 E12.5 に Poly(I:C)を投与した Syn-Rep マウス頭部の発光経時変化**

出生後、P4、P7、P10、P13、P16、P19における児動物（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。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (unpaired t test)。

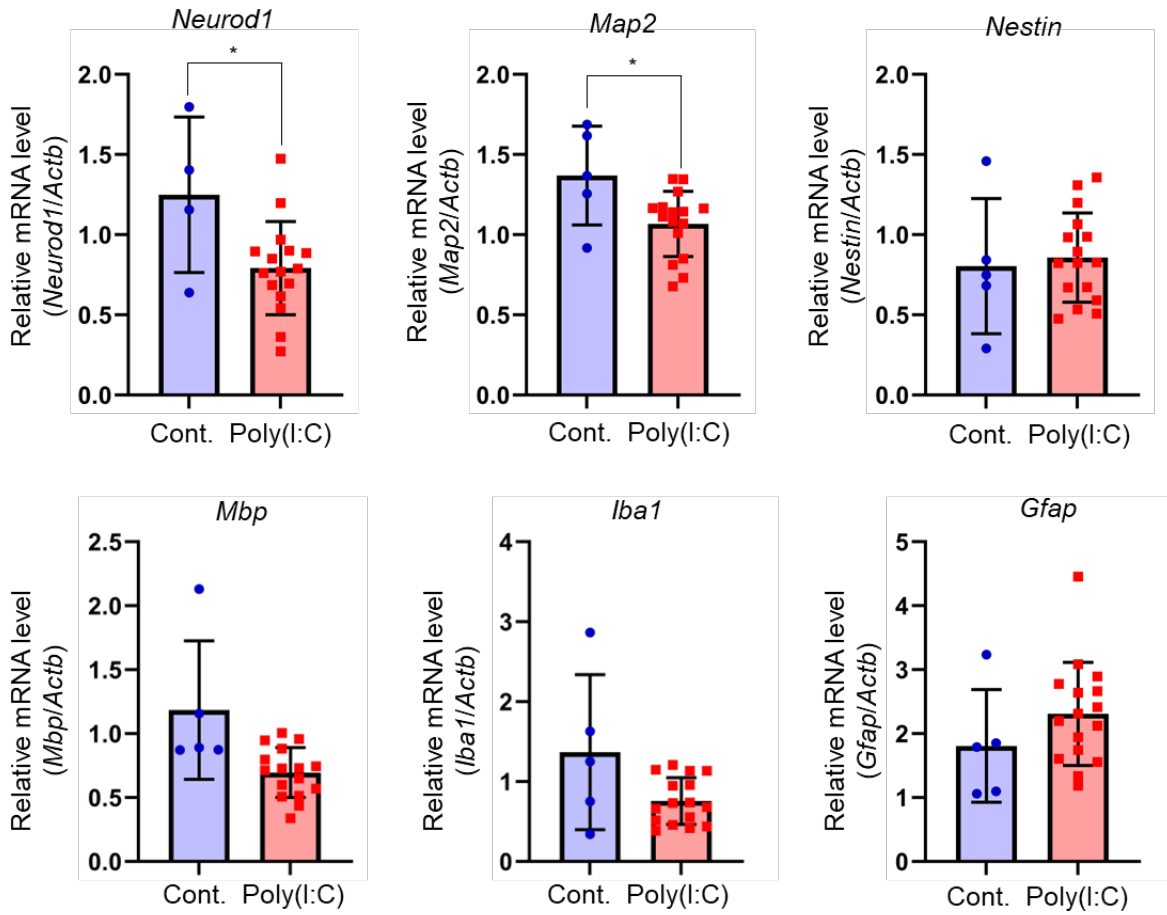


図 12 E12.5 に Poly(I:C)を投与した Syn-Rep マウス児の前頭前皮質における神経系マーカーの mRNA 発現量評価

出生後 P4 における児動物の前頭前皮質を回収し、*Neurod1*、*Map2*、*Nestin*、*Mbp*、*Iba1*、*Gfap* の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により評価した。標的遺伝子の mRNA 発現量は *Actb* mRNA 発現量で補正した。\* $P < 0.05$  (unpaired t test)

令和4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～離乳期の甲状腺機能変動による次世代影響の検討

～Syn-Rep マウスを用いた児動物脳発達に対する影響の検証～

研究分担者：松丸 大輔（岐阜薬科大学 薬学部・准教授）

## 研究要旨

本分担研究は、マウスに抗甲状腺薬を投与して妊娠期～離乳期に甲状腺機能低下を再現し、DNTをはじめとする次世代影響の有無の解析とその評価系構築を目的としている。本年度は、抗甲状腺薬のプロピルチオウラシル（PTU）を用いて、昨年度確立した甲状腺機能低下条件を踏まえ、10 ppm、250 ppm（高用量）の段階的PTU投与条件を設定し、それぞれの条件下におけるレポーター分子の発現への影響を比較解析した。出生後の児動物の脳において経時的に活性を解析したところ、10日齢（P10）以降の児において用量依存的に甲状腺機能低下に曝露されるとレポーター分子の発現が上昇した。しかし、生後直後～P7までは250 ppm曝露群よりも10 ppm曝露群の方がレポーター分子の発現が高く用量反応性が逆転した。この結果から、甲状腺機能低下も例えば細胞種や発達段階ごとにレポーター分子の発現に対して正や負に影響する可能性が示唆された。今後は、甲状腺機能低下がより早い時期の児（胎児期）においてレポーター分子の発現に対してどのような影響を与えるのかを、神経細胞以外の脳構成細胞に対する影響について解析していくことで解明する必要があると考えられた。

## 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。

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。近年、抗甲状腺薬であるプロピオチオウラシル（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ている[Regul Toxicol Pharmacol. 137:105283 (2023)]。マウスにおいてもPTU投与により甲状腺機能低下状態を誘導することができたため、その用量依存性と神経影響の評価系の構築のための検討を行った。

## 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。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

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、もしくは250 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濃度をそれぞれ半量 (5 ppm, 125 ppm (w/w)) に変更した (図1A)。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. 発達期動物の解析

発達期 (P4~P19) にかけて3日ごとに *in vivo* イメージング解析を行った。母動物及び児動物の体重、摂餌量を測定した。

#### 3-1. 摂餌量の解析

摂餌量は3日おきに測定し、個体ごとに1日当たりの摂餌量を計算し、全個体のものを平均した。授乳期は1匹の母動物と8匹の児がケージ内にいる状態であるが、餌の減少量を母動物のみの摂餌量として計算した。

#### 3-2. 血清採取および甲状腺関連指標の解析

PTU 10 ppm 投与群においては、出産直前の妊娠 18.5 日 (GD18.5)、乳離れ直前の授乳 21 日目 (LD21) において母動物より血清を採取し、甲状腺関連指標 (T3、T4、TSH) を測定した。

#### 3-3. *in vivo* イメージング解析

児動物の *in vivo* イメージング解析は、*in vivo* imaging system (IVIS、住商ファーマ) を用いて行った。2%イソフルランガスで麻酔後、150 mg/kg体重の<sup>D</sup>-Luciferin溶液を腹腔内投与した後、マウス背側より1分ごとに撮影・計測し、測定値の減衰が始まる20-30分間にわたって測定した。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

(photons/second) として定量化した。それぞれの測定日における発光値は、1分間測定値の最大値から1秒間測定値を算出し判断した。出生日をP0として、P4から3日ごとにP19まで測定した。

## 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, Inc., USA) を用いた。多重比較検定はDunnnett's test、二群の比較は対応のない *t* 検定を行い、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## C. 研究結果

### 1. 母動物の解析

10 ppm、250 ppmのいずれのPTU混餌投与量においても、妊娠期~授乳期にかけて母動物の摂餌量には影響がなかった (図1B、C)。しかし、PTU投与群においては、母体体重が増加する結果となった (図1D)。妊娠18.5日目は、一部の母動物が出産していたため、統計学的解析には至らなかったが、やはり体重の増加傾向を示した。PTU 10 ppm投与群において妊娠18.5日、および授乳21日齢の血清を採取して甲状腺機能指標 (T3、T4、TSH) を測定したところ、T4のみ有意に低値を示した。一方のTSHは投与群において減少傾向、T3は妊娠期は減少傾向、授乳期においては増加傾向を示した (図2A、B) (血中指標の解析は、別ロットにおいても行っており、PTU 250 ppm投与群の結果を含む全解析は中西、村嶋の頁を参照いただきたい)。

### 2. 児動物の解析

児動物に関しては、発生毒性試験の結果から、出世直前までの体重は250 ppm以下のどの混餌条件でも差がなかった (中西、村嶋の頁を参照)。一方で出生後は、陰性対照群の児動物に比べて、PTU投与条件下の児動物は雌雄共に体重増加の抑制傾向が観察された (図3A)。しかしこの影響に用量依存性は認められなかった。



児動物の脳における*in vivo*イメージング解析では、昨年度の報告と同様、甲状腺機能低下条件下では雌雄共にレポーター分子の発現が上昇した(図3B、C)。生後直後～P7までは10 ppm投与母動物に由来する児動物の方が250 ppm群より高値を示し、P10以降は250 ppm投与の方が高値となった(図3B、C)。すなわち、P10以降はPTU用量依存的なレポーター分子の発現上昇が観察された。

#### **D. 考察**

10 ppm、250 ppm の PTU 投与条件において、母動物の摂餌量に大きな変化は観察されなかった。このことから、昨年度の報告に記載したチアマゾール飲水投与系より PTU 混餌投与系の方が曝露量の制御が行いやすいことが再確認された。また、今回、投与動物の体重は有意に高値となる点が多かったが、これはヒトでも一般的にみられる甲状腺機能低下の症状を反映したものであると考えられた。しかし、投与開始直後の GD6.5 の時点で有意に投与群で体重が高値であったことから、慎重な解釈が必要となると考えられた。

PTU 混餌投与系において、血清中甲状腺ホルモン指標の値から、児動物は 10 ppm 混餌投与条件においては軽度の甲状腺機能低下状態に曝され、250 ppm 投与条件では軽度以上の甲状腺機能低下状態に曝されたと考えられた。このような児動物であっても、胎児期の体重は対照群と差異がないことが中西・村嶋の結果から示されたが、生後、体重が有意に低値を示すことがわかった。一般に、甲状腺機能低下は高プロラクチン血症につながるため、母動物において乳汁分泌不足に至るとは考えにくい。このことからおそらく児動物において何らかの変化が起きていることが推察された。例えば、甲状腺機能低下に曝された児において反射性に甲状腺機能が活性化している可能性や、器質的変化が生じている可能性が考えられた。

甲状腺機能低下に曝露された児の脳におけるレポーター分子の発現は上昇していた

ことから、甲状腺機能低下の影響はレポーター分子の発現上昇をもたらすことが示された。投与群と対照群でレポーター分子の発現を比較すると、P10 以降では 250 ppm 投与群 > 10 ppm 投与群 > 対照群の順となった。しかし、生後直後～P7 周辺の日齢においては、10 ppm 投与群の方がレポーター分子の発現が高かった。段階的な甲状腺機能低下状態に曝露されたにも関わらず Syn-Rep 活性の逆転が観察された。このことから、レポーター分子の発現に影響を与える因子として、甲状腺ホルモン濃度の上昇と正の相関がある要素と負の相関がある要素が存在する可能性、あるいは成長段階によってその影響が変化する可能性など、複数が影響しあっている可能性が考えられた。今後の化学物質安全性評価のためには甲状腺ホルモンに関連し、レポーター分子の発現に影響する各要素の整理が必要であることが考えられた。このためには、現在、生後 4 日目で開始しているレポーター分子の発現の解析を胎児期まで遡って解析し、活性の減衰の性質を明らかにすることも必要と考えられた。そして、例えば甲状腺機能低下によって炎症・炎症性サイトカインの上昇が誘導されることが示唆されていたり[PLoS ONE. 9: e109753 (2014)、Mol Cell Endocrinol. 499:110594 (2020).など]、甲状腺機能低下によるグリア細胞の活性化も示唆されている[Int J Mol Sci. 23: 11938 (2022)など]ことから、神経細胞以外の脳構成細胞であるアストロサイトやミクログリアに注目した解析も行って、甲状腺機能低下による影響を多角的に解析する必要があると考えられた。

#### **E. 結論**

PTU を混餌投与することにより、母動物に軽度以上の甲状腺機能低下状態を誘導することができた。そして、Syn-Rep マウスを用いることで、甲状腺機能低下による次世代影響を評価できることが強く示唆された。しかし、リスク因子を明らかにするためには甲状腺機能低下によって起こる現象の素過程を明らかにする必要があり、今後は、詳細な発

達段階ごとの影響の違い、脳内の各細胞種、あるいは炎症といった生体応答に注目した解析も行う必要があると考えられた。

## **F. 研究発表**

### **1. 論文発表**

- 1) Ishida K, Furukawa M, Kunitani M, Yamagiwa R, Hiromori Y, **Matsumaru D**, Hu J, Nagase H, **Nakanishi T (責任著者)**, Novel, highly sensitive, *in vivo* screening method detects estrogenic activity at low doses of bisphenol A, *J Hazard Mater* 445: 130461 (2023)
- 2) Ishida K, Tatsumi K, Minamigawa Y, Mori K, **Matsumaru D**, Nagase H, **Kanda Y**, **Takuma K**, **Nakanishi T (責任著者)**, Neuronal differentiation reporter mice as a new methodology for detecting *in vivo* developmental neurotoxicity, *Biochem Pharmacol* 206: 115332 (2022)
- 3) Ishida K, **Matsumaru D**, Shimizu S, Hiromori Y, Hisamitsu Nagase H, **Nakanishi T (責任著者)**, Evaluation of the estrogenic action potential of royal jelly by genomic signaling pathway *in vitro* and *in vivo*, *Biol Pharm Bull* 45: 1510-1517 (2022)

### **2. 学会発表**

- 1) Ishida K *et al.* : Validation of brain neuronal differentiation reporter mice for improved developmental neurotoxicity evaluation, 2022 ICCA-LRI & NITE Workshop, Yokohama/Japan, June 2022
- 2) 辰巳 佳乃子 他：発達神経毒性評価の効率化に向けた脳神経分化トレーサー

マウスの有用性検証、第49回日本毒性学会学術年会、札幌、2022年6-7月

- 3) 森 一馬 他：妊娠期甲状腺機能低下モデルにおける児動物脳のイメージング解析、第49回日本毒性学会学術年会、札幌、2022年6-7月
- 4) 石田 慶士 他：化学物質の発達神経毒性評価の効率化に向けた神経分化トレーサーマウスの有用性検証、第68回日本薬学会東海支部総会・大会、名古屋、2022年7月
- 5) 石田 慶士 他：発達神経毒性評価の効率化に向けた *in vivo* 神経細胞分化トレーサー系の構築、第62回日本先天異常学会学術集会、金沢/Web、2022年7月
- 6) 石田 慶士 他：DOHaD学説からみた甲状腺機能低下：児の神経発達へのリスク評価を目指して、フォーラム2022：衛生薬学・環境トキシコロジー、熊本、2022年8月
- 7) 辰巳 佳乃子 他：化学物質の発達神経毒性評価系としての神経分化トレーサーマウスの有用性検証、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2022、静岡、2022年11月
- 8) Ishida K *et al.* : Neuronal differentiation reporter mice as a new methodology for detecting *in vivo* developmental neurotoxicity, *In vivo* イメージングフォーラム2022、東京、2022年12月

## **G. 知的所有権の取得状況**

該当なし

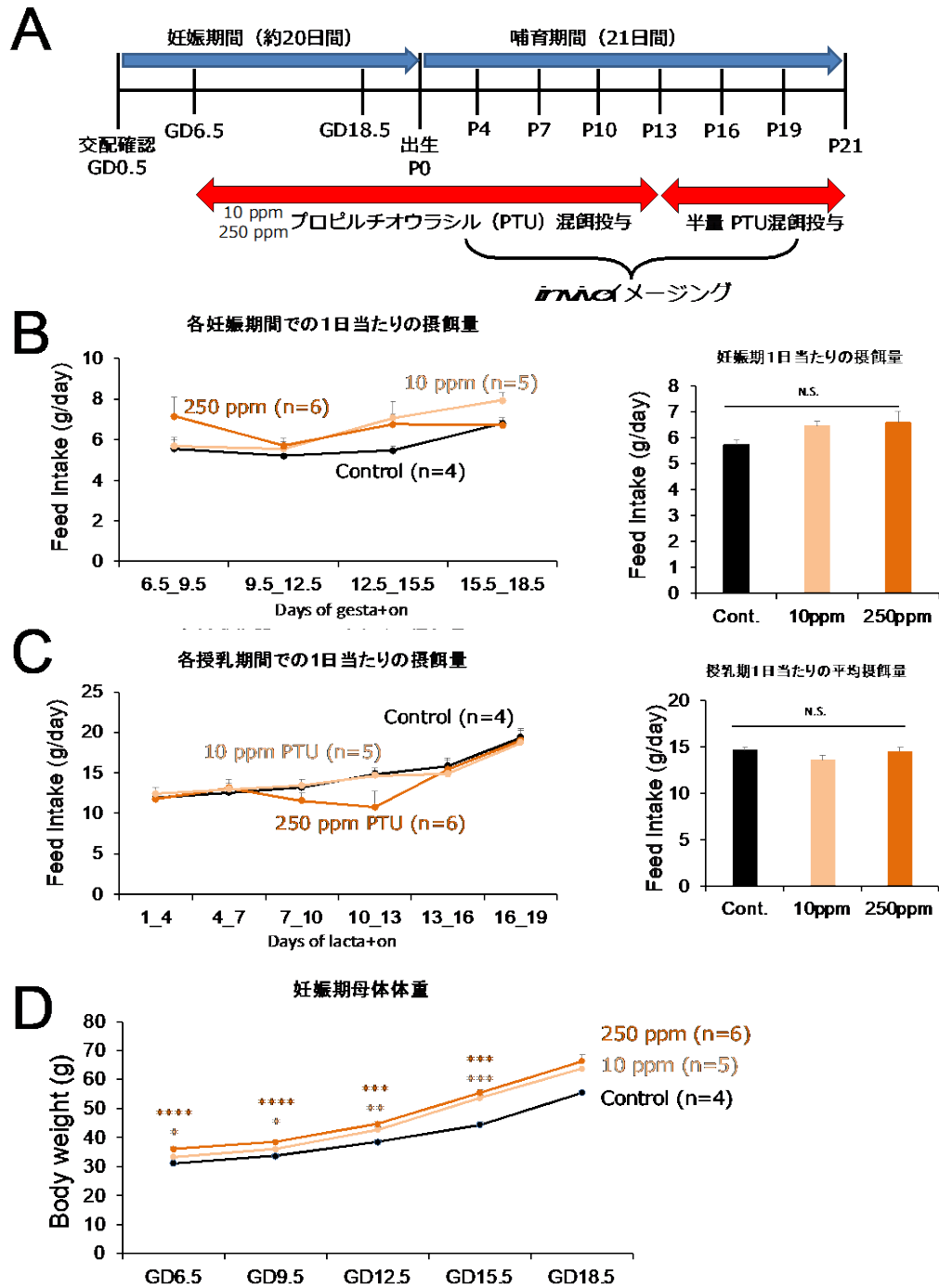
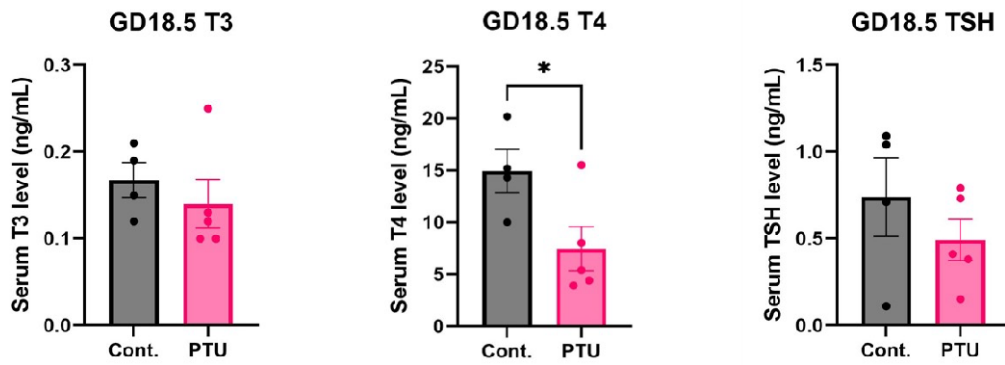


図1 高用量 PTU 混餌投与による甲状腺ホルモン機能低下誘導モデルの作成

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)。GD6.5 より PTU 混餌投与 (対照群、10 ppm、250 ppm) を開始し、児動物出生まで、授乳期の母動物の摂餌量 (B、C) および妊娠期の体重 (D) を3日ごとに測定し1日あたりの値として解析した。妊娠期および授乳期における1日平均を算出比較した (B、C 右側)。解析した母動物の数は対照群：n=4、PTU 10 ppm 投与群：n=5、PTU 250 ppm 投与群：n=6であった。データは mean ± SE で表し、多重比較検定は Dunnett's test で行った。N.S.: not significant、\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 、\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

A



B

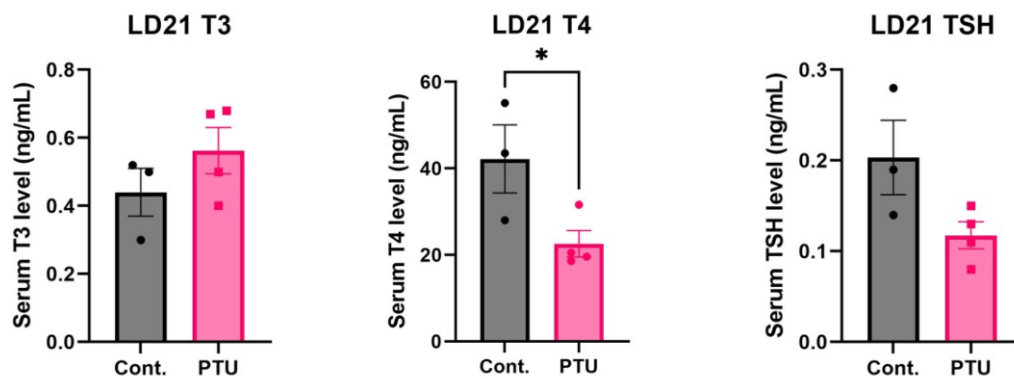


図2 PTU 10 ppm 投与母動物における血清甲状腺関連ホルモン量の解析

GD18.5 および、LD21 において母動物の血清を採取した。(A) GD18.5 における T3、T4、TSH。対照群：n=4、PTU 250 ppm 投与群：n=5。(B) LD21 における T3、T4、TSH。対照群：n=3、PTU 250 ppm 投与群：n=4。データは mean ± SE で表し、検定は対応のない t 検定で行った。\* $P < 0.05$ 。

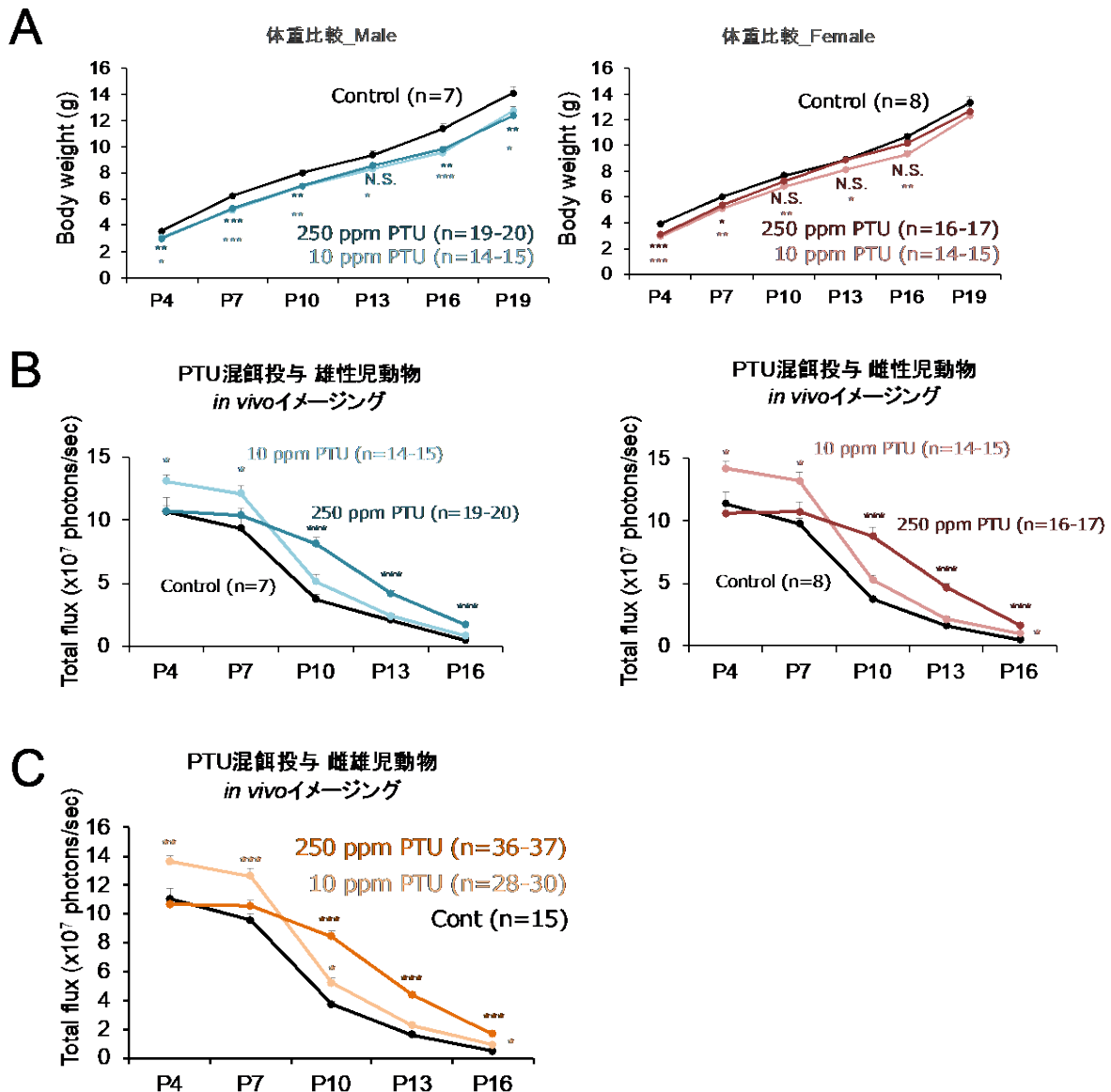


図3 PTU 混餌投与児動物の体重変化及びイメージング解析

対照群、10 ppm、250 ppm の PTU を混餌投与した雌雄それぞれの児動物の出生後 P4、P7、P10、P13、P16、P19 における体重変化測定 (A) 及び経時的 *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頭部の発光強度を Total flux として定量化した。各点を対応のない t 検定で解析した。 $*P < 0.05$ 。解析した児動物の数は対照群：雄性 n=7、雌性 n=8、PTU 10 ppm 投与群：雄性 n=14-15、雌性 n=14-15、PTU 250 ppm 投与群：雄性 n=19-20、雌性 n=16-17 であった。また、イメージング解析は雌雄を混合した状態でも解析し (C)、対照群：n=15、PTU 10 ppm 投与群：n=28-30、PTU 250 ppm 投与群：n=36-37。データは mean  $\pm$  SE で表し、多重比較検定は Dunnett's test で行った。N.S.: not significant、 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 。

令和4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インビトロ評価法の確立を目指している。前年度はヒト iPS 細胞を用いて甲状腺ホルモン受容体  $THR\alpha$  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。本年度は、 $THR\alpha$  ノックダウン細胞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る農薬クロルピリホス曝露により神経分化阻害が認められることを見出した。さらに  $THR\alpha$  ノックダウン細胞を用いて次世代シーケンス解析を行った結果、 $THR\alpha$  シグナルの下流で機能し、神経（外胚葉）分化に関与する遺伝子をスクリーニングすることに成功した。以上より、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、*in vivo* のデータと比較検討することにより、本モデルの有用性をさらに明らかにする予定である。

### 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。しかし発達神経毒性（DNT）の有無を判定するガイドライン試験（TG426 など）を実施するには、多大な資源と労力（コスト）が掛かることから、甲状腺関連指標の変動を化学物質のリスク管理に活用するためのスキームの確立には至っていない。またこの問題を解決するために、米国環境保護庁（EPA）が2005年にガイドダンスとして提唱した Comparative Thyroid Assay（CTA）がDNTスクリーニング試験として有望視されているが、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。

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、甲状腺機能低下を反映するヒト iPS 細胞の作製を行った。未分化のヒト iPS 細胞には  $THR\alpha$  と  $THR\beta$  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  $THR\alpha$  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  $THR\alpha$  に焦点を当てて、ノックダウン株を作製した。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として選定した農薬クロルピリホス（CPF）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。

### **6. NGS 解析**

THR $\alpha$  ノックダウンした細胞 (外胚葉) より RNA 抽出を行い、Novogene 社に委託した。scramble control に対して THR $\alpha$  ノックダウンした細胞 (外胚葉) で発現が低下している遺伝子の探索を行った。

## **C. 研究結果**

### **1. THR $\alpha$ ノックダウンしたヒト iPS 細胞の ATP 産生に対する CPF 曝露の影響**

THR $\alpha$  をノックダウンした iPS 細胞に CPF (10 $\mu$ M) を曝露し、ATP 産生能に対する影響を調べた。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞へ CPF を曝露しても ATP 産生に影響は無かった (図 1)。また THR $\alpha$  ノックダウンした iPS 細胞に CPF 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 1)。

### **2. THR $\alpha$ ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経 (外胚葉) 分化に対するクロルピリホス (CPF) 曝露の影響**

THR $\alpha$  ノックダウンしたヒト iPS 細胞に CPF (10 $\mu$ M) を曝露し、神経 (外胚葉) 分化能に対する影響を調べた。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞の神経分化時に CPF 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 2)。THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、CPF を曝露すると、control の細胞と比べて PAX6 の発現が約 50%抑制されることを見出した (図 2)。したがって、THR $\alpha$  は CPF による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 $\alpha$  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。

### **3. THR $\alpha$ の下流で神経 (外胚葉) 分化に関わる遺伝子の探索 (NGS 解析)**

THR $\alpha$  ノックダウンしたヒト iPS 細胞を神経 (外胚葉) 分化させたところ、scramble shRNA を導入した細胞と比べて分化マーカーである PAX6 の発現は約 30%減少した (図 2)。従って、THR $\alpha$  は神経 (外胚葉) 分化に関与すると考えられる。そこで NGS 解析により、THR $\alpha$  の下流で神経 (外胚葉) 分化に関わる遺伝子の探索を試みた。THR $\alpha$  ノックダウン細胞で発現が低下している遺伝子を探索した結果、神経分化に関わる因子 A, B (図 3)、軸索伸展に関わる因子 C (図 4)、D (図 5) などの遺伝子を抽出することができた。

## 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、本研究班で選定した発達神経毒性が懸念される農薬 CPF 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 CPF 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、CPF による神経分化抑制が認められた。このことから、ヒト発達期における神経毒性に THR $\alpha$  が関与していることが示唆される。

THR には  $\alpha$  と  $\beta$  のアイソフォームが存在することが知られている。ノックアウトマウスを用いた研究により、 $\alpha$  は神経発生に関係するが、 $\beta$  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、神経分化に影響があることを明らかにした。しかしながら、THR $\alpha$  と  $\beta$  の機能的な違いについては明らかになっておらず、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重要であるのかを慎重に検討する必要がある。さらに神経分化時に THR $\alpha$  の下流で働く可能性のある遺伝子を探索した結果、神経分化や軸索伸展に関与する遺伝子を同定した。こうした遺伝子と甲状腺機能低下の関連についても検討を進め *in vivo* でも機能するのか検証する必要がある。

今後は、金属などの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する必要がある。

## 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

1. Ishida K, Tatsumi K, Minamigawa Y, Mori K, Matsumaru D, Nagase H, **Kanda Y**, Takuma K, Nakanishi T. Neuronal differentiation reporter mice as a new methodology for detecting in vivo developmental neurotoxicity, *Biochem Pharmacol* 206: 115332 (2022)
2. Yasuhiko Y, Ishigami M, Machino S, Fujii T, Aoki M, Irie F, **Kanda Y**, Yoshida M. Comparison of the lower limit of benchmark dose confidence interval with no-observed-adverse-effect level by applying four different software for tumorigenicity testing of pesticides in Japan, *Regul Toxicol Pharmacol* 133:105201 (2022).

3.

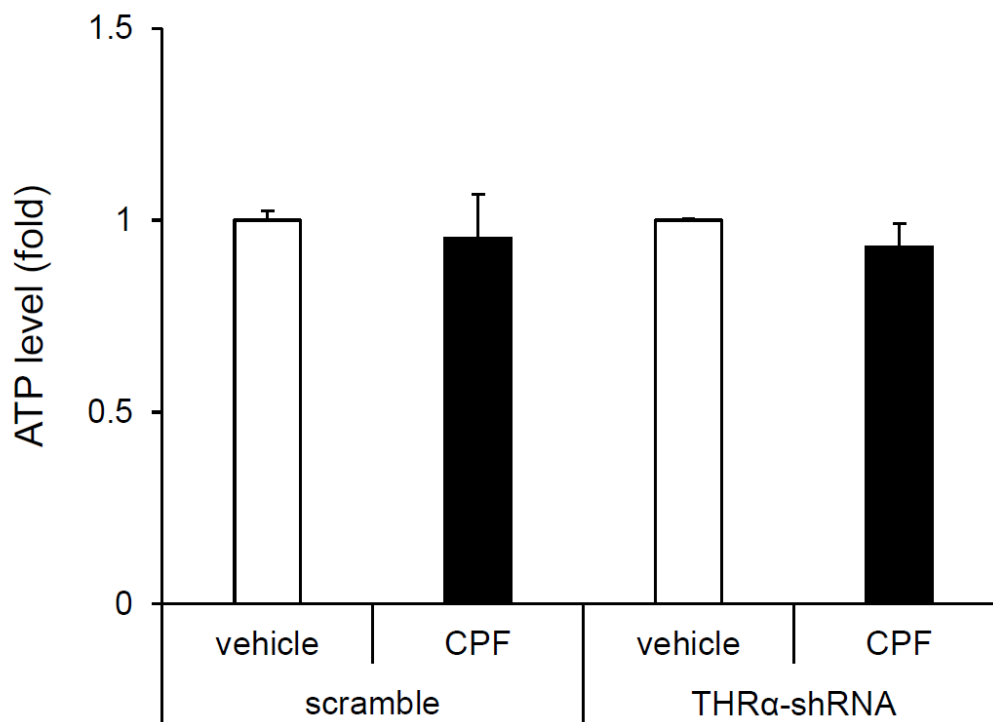
### 2. 学会発表

1. **諫田泰成**：化学物質のインビトロ発達神経毒性評価—甲状腺ホルモンの影響評価の取り組み、第 49 回日本毒理学学会学術年会、札幌、2022 年 7 月
2. **諫田泰成**：甲状腺機能を考慮したインビトロ神経毒性試験法の開発、フォーラム 2022 衛生薬学・環境トキシコロジー、熊本、2022 年 8 月
3. **諫田泰成**、安彦行人：新たなアプローチによる薬理試験の展開、第 96 回日本薬理学会年会、横浜、2022 年 12 月
4. **Kanda Y**: Current status and future challenge of developmental neurotoxicity, 3rd Asian Congress for Alternative to Animal Experiment, 濟州, 2022 年 12 月
5. **Kanda Y**: hiPSC-derived neural cells for chemical toxicity evaluation, Inaugural International Scientific Conference of the SAAT- SL, コロンボ, 2023 年 2 月 1 日
6. 糟谷佐保里、目加田京子、石田慶士、松丸大輔、村嶋亜紀、**諫田泰成**、中西剛：母体甲状腺機能低下によって惹起される胎児発生毒性の評価、日本薬学会第 143 年会、札幌、2023 年 3 月



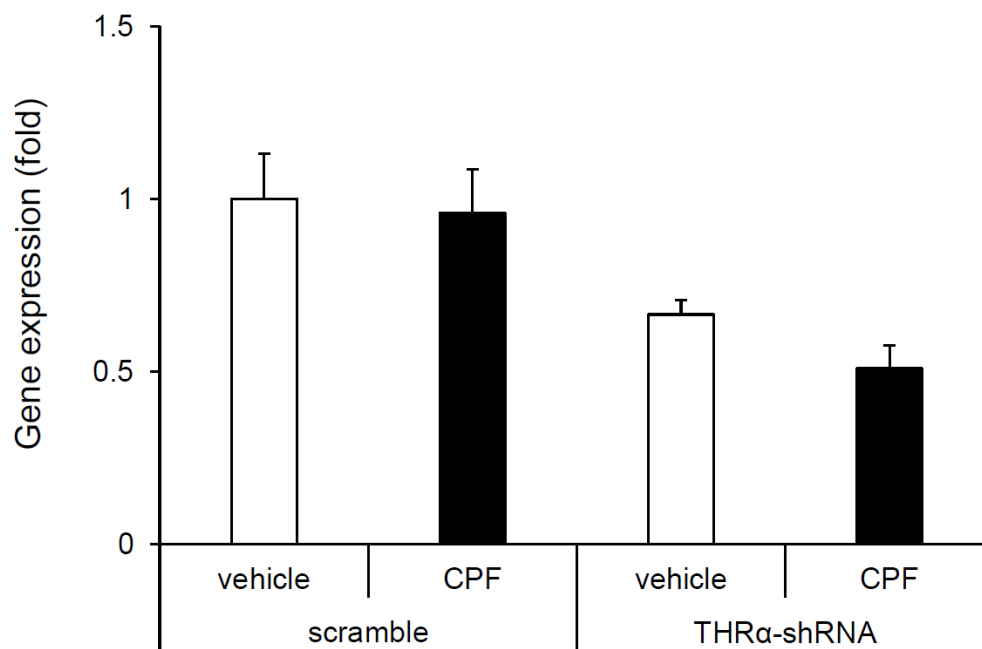
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況



**図1** THRαノックダウンしたヒト iPS 細胞の ATP 産生に対する CPF の影響

ヒト iPS 細胞に CPF (10 μM) を曝露して 24 時間後に細胞内 ATP 量を調べた。  
shRNA により THRα をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するクロルピリホス曝露の影響を示す。ノックダウンコントロールとして scramble shRNA を用いた。



**図 2** THR $\alpha$  ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経 (外胚葉) 分化に対する CPF 曝露の影響

CPF (10  $\mu$ 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。shRNA により THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するクロルピリホス曝露の影響を示す。ノックダウンコントロールとして scramble shRNA を用いた。

KEGG pathway: neural differentiation

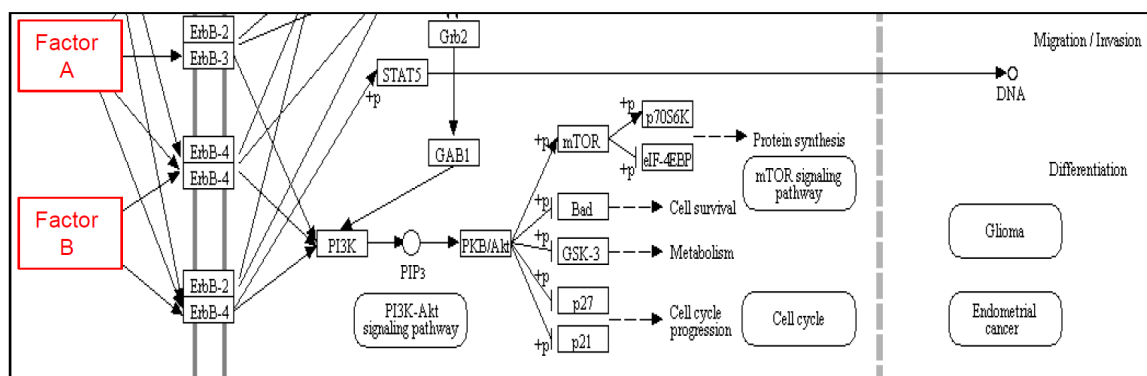


図3 THRa ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子

神経分化パスウェイ解析により、Factor A, B を同定した。

KEGG pathway: axonal growth

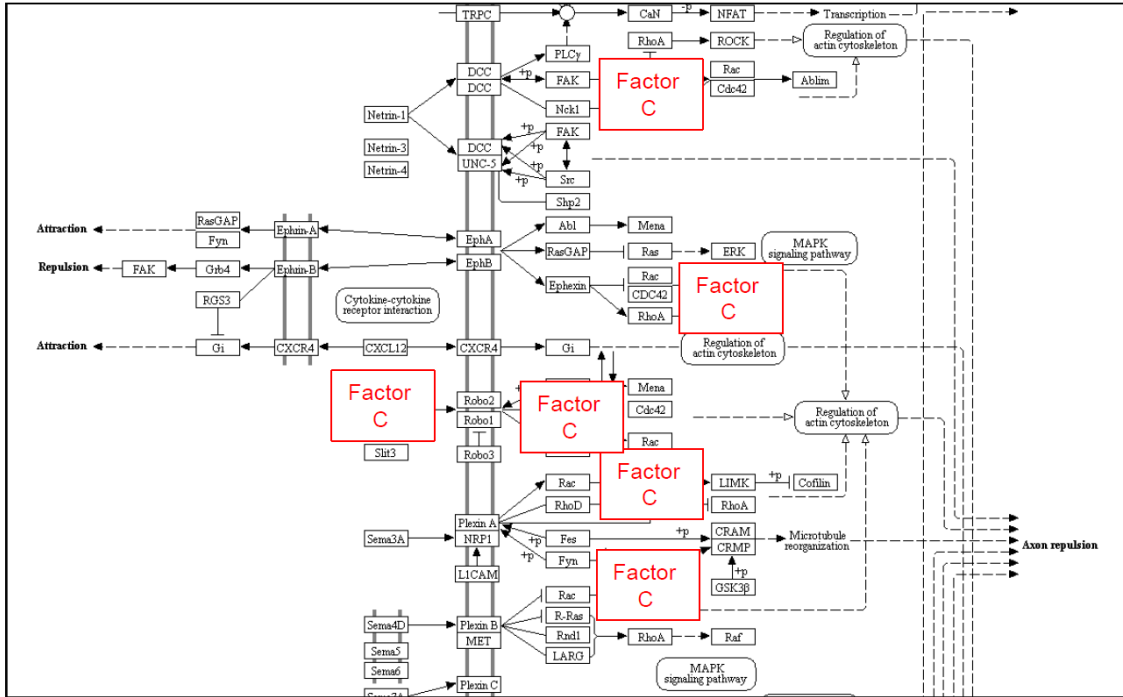


図4  $THR\alpha$  ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子

軸索伸展のパスウェイ解析により、Factor C を同定した。

KEGG pathway: axonal growth

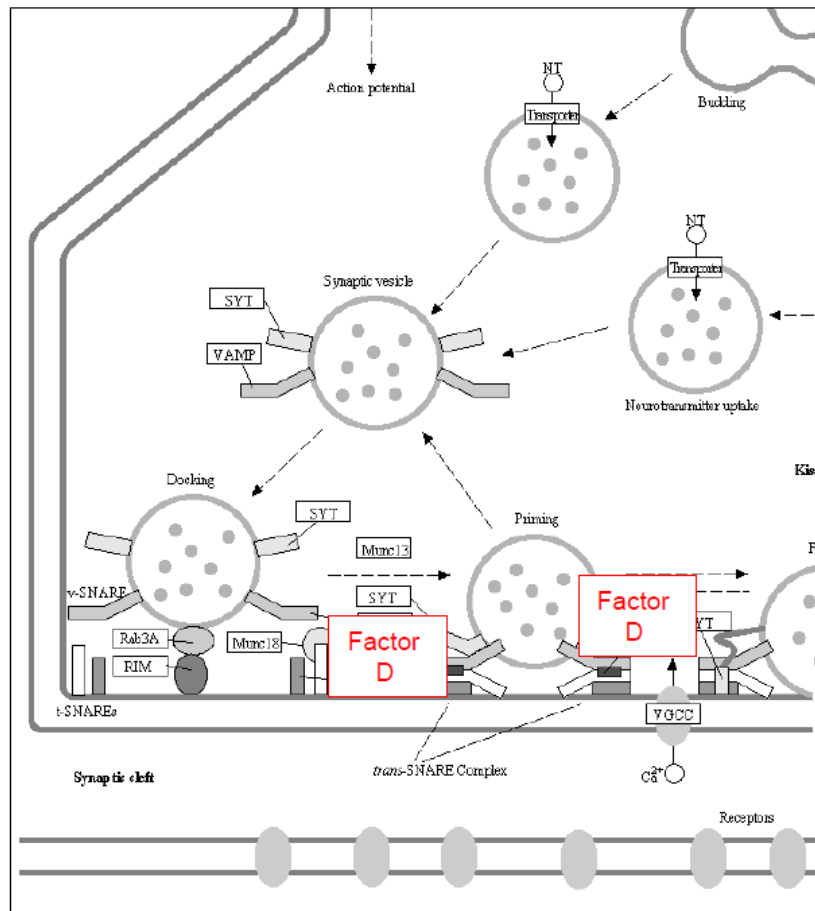


図5 *THRa* ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子

軸索伸展のパスウェイ解析により、Factor D を同定した。

## 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
Keishi Ishida, Motoshi Furukawa, Masataka Kunitani, Rai Yamagiwa, Youhei Hiromori, <b><u>Daisuke Matsumaru</u></b> , Jianying Hu, Hisamitsu Nagase, <b><u>Tsuyoshi Nakanishi</u></b> (責任著者)	Novel, highly sensitive, <i>in vivo</i> screening method detects estrogenic activity at low doses of bisphenol A	Journal of Hazardous Materials	445	130461	2023
Keishi Ishida, Kanoko Tatsumi, Yoshiki Minamigawa, Kazuma Mori, <b><u>Daisuke Matsumaru</u></b> , Hisamitsu Nagase, <b><u>Yasunari Kanda</u></b> , <b><u>Kazuhiro Takuma</u></b> , <b><u>Tsuyoshi Nakanishi</u></b> (責任著者)	Neuronal differentiation reporter mice as a new methodology for detecting <i>in vivo</i> developmental neurotoxicity	Biochemical Pharmacology	206	115332	2022
Keishi Ishida, <b><u>Daisuke Matsumaru</u></b> , Shinya Shimizu, Youhei Hiromori, Hisamitsu Nagase, <b><u>Tsuyoshi Nakanishi</u></b> (責任著者)	Evaluation of the estrogenic action potential of royal jelly by genomic signaling pathway <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	Biological and Pharmaceutical Bulletin	P45	1510-1517	2022
Alvin R Acebedo, Mellissa C Alcantara, <b><u>Tsuyoshi Nakanishi</u></b> , Takehiko Ogawa, Gen Yamada, Kentaro Suzuki	Exposure to the organophosphate pesticide Fenitrothion directly induced defects in mouse embryonic external genitalia	Toxicological Sciences	190	13-22	2022
Yingting Jia, Hong Zhang, Wenxin Hu, Lei Wang, Qiyue Kang, Jiaying Liu, <b><u>Tsuyoshi Nakanishi</u></b> , Youhei Hiromori, Tomoki Kimura, Shu Tao, Jianying Hu	Discovery of contaminants with antagonistic activity against retinoic acid receptor in house dust	Journal of Hazardous Materials	426	127847	2022

Shizuka Abe, <b>Aki Murashima</b> (共同筆頭著者, 共同責任著者), Eiji Kimura, Masatsugu Ema, Jiro Hitomi	Early development of the pulmonary vascular system: An anatomical and histological reinvestigation of the pulmonary venous return development in mice	Acta Histochem	124	151840	2022
Eiji Imado, Samnang Sun, Abrar Rizal Abubawa, Takeru Tahara, Takahiro Kochi, Tran Ngoc Bao Huynh, Satoshi Asano, Shigeru Hasebe, Yuki Nakamura, Kazue Hisaoka-Nakashima, Yachihiro Kotake, Masahiro Irifune, Kazuhiko Tsuga, <b>Kazuhiro Takuma</b> , Norimitsu Morioka, Norikazu Kiguchi, Yukio Ago	Prenatal exposure to valproic acid causes allodynia associated with spinal microglial activation	Neurochemistry International	160	105415	2022
Tomoya Takemoto, Masayuki Baba, Kazumasa Yokoyama, Kohei Kitagawa, Kazuki Nagayasu, Yukio Ago, Kaoru Seiriki, Atsuko Hayata-Takanoto, Atsushi Kasai, Daizuke Mori, Norio Ozaki, <b>Kazuhiro Takuma</b> , Ryota Hashimoto, Hitoshi Hashimoto, Takanobu Nakazawa	Molecular brain (micro report) oxytocin ameliorates impaired social behavior in a mouse model of 3q29 deletion syndrome	Molecular Brain	15	26	2022
Yukuto Yasuhiko, Mikiya Ishigami, Satoshi Machino, Tatsuya Fujii, Masanori Aoki, Fumi Irie, <b>Yasunari Kanda</b> , Midori Yoshida	Comparison of the lower limit of benchmark dose confidence interval with no-observed-adverse-effect level by applying four different software for tumorigenicity testing of pesticides in Japan	Regulatory Toxicology and Pharmacology	133	105201	2022



令和4年 5月29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4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 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 西村 理行

次の職員の令和4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4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・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。

令和5年3月30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4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 厚生労働科学研究費補助金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(21KD1004)

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。

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4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) 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。