

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5年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中西 剛

令和5年（2024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	17
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～Syn-Rep マウスの有用性評価と甲状腺機能低下を誘導する化学物質の次世代影響評価～	
中西 剛、村嶋亜紀	18
2. DNT 陽性対照化学物質の確立とその作用機構解明～周産期甲状腺機能低下によって誘導される児動物の行動異常の検討～	
田熊一徹	41
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～甲状腺機能低下時における Syn-Rep マウスの応答性評価と児動物脳構成細胞への影響の解析～	
松丸大輔	51
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	78

令和5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5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とから、甲状腺機能低下を誘導する化学物質の次世代影響が懸念されている。しかしガイドライン試験に追加された甲状腺関連指標の変動と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。

これまでに本研究では、児の脳発達状態を非侵襲的にトレースでき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、妊娠期から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行ってきた。昨年度までにSyn-RepマウスのDNT評価におけるNew Approach Methodology（NAM）としての有用性を検証するとともに、抗甲状腺薬プロピルチオウラシル（PTU）を用いた甲状腺機能低下マウスモデルの作成条件を確定した。またSyn-Repマウスは、PTUで誘導された甲状腺機能低下によるDNTを検出できる可能性を見出した。

今年度はPTUの投与量を、甲状腺関連指標に影響が認められ始める閾値用量（10 ppm）と甲状腺刺激ホルモン（TSH）の上昇を伴うトリヨードチロニン（T3）／チロキシシン（T4）の低下が認められる典型的用量（250 ppm）の2用量に設定し、これらの条件で母動物に曝露させた際の児動物の脳発達状態と各種行動への影響をガイドライン試験に準じて検討した。また昨年度に引き続きSyn-RepマウスのDNT評価におけるNAMとしての有用性を検証するために、バルプロ酸（VPA）やPTUとは作用機構が異なるDNT陽性対照物質と考えられる鉛（Pb）曝露時の応答性についても検討した。これに加えて、甲状腺ホルモンシグナルかく乱をすることが懸念されている他の化学物質の次世代影響についても検討を行うために、代替ビスフェノールであるfluorene-9-bisphenol（BHPF）についてマウスを用いた出生前発生毒性試験（TG414）を実施した。さらに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*試験法を構築するために、ヒトiPS細胞を用いて甲状腺機能低下時に誘導される神経分化阻害のマーカー分子の抽出を行った。

その結果、今年度は以下のことを明かにした。

- 1) Syn-Repマウスは、VPAやPTUとは異なった作用機構のDNT陽性対照物質の影響も検出できる可能性が明らかとなり、NAMとしての有用性が示された。
- 2) 妊娠期～離乳期の甲状腺機能低下においては、児動物大脳皮質の神経細胞数に影響は認められなかったが、アストロサイト数の増加が観察された。またSyn-Repマウスはアストロサイトの活性化を伴う脳発達への影響も評価できる可能性が示された。
- 3) 妊娠期～離乳期に甲状腺機能が低下すると、雄性児動物に多動などの情動行動の異常が誘導される可能性が示された。またこの影響は、母動物の甲状腺関連指標に変動が認められる閾値付近のPTU用量においても認められた。
- 4) 妊娠期のBHPF曝露は母体甲状腺機能や児動物の器官形成および骨格形成には影響を与えないことが明らかとなった。
- 5) ヒトiPS細胞を用いた甲状腺機能低下モデルにおいて、化合物の発達神経毒性を評価できるバイオマーカーとしてFactor Xを抽出した。

以上より、Syn-RepマウスおよびヒトiPS細胞を用いた*in vitro*系を組み合わせることで、妊娠期の甲

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。本研究成果は、妊娠母体の甲状腺関連指標の変動と脳神経ネットワークの形成不全との因果関係（Adverse Outcome Pathway：AOP）の解明への貢献が期待される。また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提案や代替試験法の提案にも繋げたいと考えている。

分担研究者

諫田泰成 国立医薬品食品衛生研究所・部長
田熊一敏 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 岐阜薬科大学 薬学部・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（TH）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のような極端な症状を誘導するものではなく、TH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。

これまでに本研究では、Syn-Rep マウスやヒト iPS 細胞等を用いて検討を行い、以下のことを明らかにしてきた。

1. Syn-Rep マウスは、DNT 陽性対照物質である VPA 等による DNT 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 としての有用である可能性を示した。
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. 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。
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るとともに、妊娠期～離乳期の甲状腺機能低下に対して最も敏感に影響を受ける組織は脳である可能性を見出した。
5. ヒト iPS 細胞を用いた神経細胞分化誘導モデルにより、TH 受容体 (THR) α が神経細胞分化に重要であるとともに、THR α 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。

今年度は PTU の投与量を、甲状腺関連指

標に影響が認められ始める閾値用量 (10 ppm) と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) の低下が認められる典型的用量 (250 ppm) の2用量に設定し、これらの条件で母動物に曝露させた際の児動物の脳発達状態と各種行動への影響をガイドライン試験に準じて検討した。また昨年度に引き続き Syn-Rep マウスの DNT 評価における NAM としての有用性を検証するために、VPA や PTU とは作用機構が異なる DNT 陽性対照物質と考えられる鉛 (Pb) 曝露時の応答性についても検討した。これに加えて、TH シグナルかく乱をすることが懸念されている他の化学物質の次世代影響についても検討を行うために、代替ビスフェノールである fluorene-9-bisphenol (BHPF) についてマウスを用いた出生前発生毒性試験 (TG414) を実施した。さらに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* 試験法を構築するために、ヒト iPS 細胞を用いて甲状腺機能低下時に誘導される神経分化阻害のマーカー分子の抽出を行った。

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、交配後陰プラグが確認されたマウスを胎齢 0 日 (E0) とし、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. 抗甲状腺薬および Pb の投与

投与スケジュールは OECD ガイドライン TG426 (発達神経毒性試験) に準じて実施した。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 (P46:図 1)。

鉛の曝露には、酢酸鉛 (PbAc ; 関東化学、純度 > 99.5%) を用いた。200 ppm および 1,000 ppm の用量で飲用水に混ぜ、妊娠 Syn-Rep マウスに GD6 から離乳時 (P21) 自由摂取させた。

3. 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。BHPF (東京化成、純度 > 96.0%) は 5% エタノール / sesame oil 溶液に溶解し、GD5 から GD17 まで、0、3.75 および 37.5 mg/kg-body weight/day の用量で毎日強制経口投与を行った。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、ナカライテック) 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。

4. 血清中マーカーの測定

血清中および脳組織ホモジネートの T4 量の測定は、T4 量を Thyroxin Competitive ELISA Kit (Invitrogen) を用いて、TSH レベルの測定は残留農薬研究所の方法に準拠し、マウス TSH 測定キット (Merck Millipore、#MPTMAG-49K) を用いて実施した。

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。

5. 脳の組織学的解析

脳組織は、4%PFA を用いた灌流固定後に 2 日間浸漬固定した後、70%エタノールに置換し、4°C で保存した。自動パラフィン包埋装置 (CT-Pro 20、Genotsaff) を用いて包埋した。薄切はサンプルをロータリーマイクローム (Leica) にて厚さ 5 μ m に薄切した。HE 染色、Nissl 染色は、ティシュー・テック Prisma (サクラファインテック) を用いて標準的なプロトコールで行った。スライドガラス間の染色ムラを軽減させるために、同日に染色した。免疫組織化学染色は自動免疫染色装置 HISTOSTAINER (ニチレイバイオ) を用いて行った。抗体は抗 Iba1 ヤギポリクローナル抗体 (富士フイルム和光純薬)、GFAP (GA5) マウスモノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた。画像はオールインワン蛍光顕微鏡 (キーエンス) またはマルチスペクトルカメラ Nuance (CRI Inc.) を用いて

撮影し、ImageJ、もしくは組織イメージ解析ソフト inForm ver. 2.4 (PerkinElmer) を用いて計数した。

内側前頭前皮質 (mPFC) における樹状突起スパイン数の測定は、FD Rapid GolgiStain™ Kit (FD NeuroTechnologies) にて染色を行い計測した。

6. *in vivo* イメージング解析

出生後から発達期 (P4~P16) 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。

7. 行動薬理学的解析

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

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

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。

8. 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。3 日後に選別された細胞から RNA を回収して qPCR を行ったところ、scramble control を導入した細胞に比べて約 93% の THR α ノックダウンが認められた。

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 α 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 α 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を参照されたい。)

1. Syn-Rep マウスを用いた発達期の PbAc 曝露による脳発達への影響評価

1-1. 飲水量、母体体重、摂餌量、および児動物体重増加への影響評価

妊娠期および授乳期における飲水量と母体体重に PbAc 曝露による顕著な影響は認められなかった。出生後児動物の体重増加量については、200 ppm 投与群で雌では P4、P7、P10、P13、P16 において、雄では P13、P16 において、対照群と比較して有意な上昇が認められた (P28:図 3A、3B)。一方、1,000 ppm 投与群では雌の P4 において対照群と比較して体重増加量の有意な低下が認められたものの、他の日齢や雄では変化はみられなかった (P28:図 3C、3D)。

1-2. In vivo イメージングを用いた児動物の頭部のレポーター活性評価

児動物の頭部レポーター活性について *in vivo* イメージングにて解析したところ、200 ppm 投与群では対照群と比較して P4 では有意な高値、P10 では有意な低値が認められた (P29:図 4A)。一方、1,000 ppm 投与群では対照群と比較していずれの日齢においてもレポーター活性に有意な差は認められなかった (P29:図 4B)。以上より、200 ppm PbAc の周産期曝露により Syn-Rep マウス頭部のレポーター活性経時変化パターンが変化することが明らかとなった。

1-3. 血清中 TSH レベルへの影響評価

200 ppm 投与群の P21 児動物より血清を採取し、TSH レベルを測定したところ、対照群と比較して TSH レベルに差は認められなかった (P30:図 5)。

1-4. 脳構成細胞への影響評価

P4 の脳組織像をニッスル染色 (神経細胞

を評価) および抗 IBA1 抗体 (ミクログリアを評価) と抗 GFAP 抗体 (アストロサイトを評価) を用いた免疫化学染色により評価したところ、200、1,000 ppm 投与群共にいずれの染色像においても、対照群と比較して大脳皮質における明らかな組織学的異常は認められなかった (P31:図 6)。

海馬歯状回付近においては、200 ppm 投与群では対照群と比較して神経細胞数に明らかな変化は認められなかったものの、ミクログリアおよびアストロサイトの増加が認められた (P32:図 7A)。一方、1,000 ppm 投与群では対照群と比較して海馬歯状回付近において、神経細胞数の減少とミクログリアおよびアストロサイトの増加が認められた (P32:図 7B)。

2. BHPF の出生前発生毒性試験

2-1. BHPF 投与による母体甲状腺関連指標への影響評価

BHPF を投与した母動物の GD18 における血清中 TH レベルについて検討を行ったところ、fT4、T4、T3、TSH レベルは BHPF 曝露による変動はみられなかった (P33:図 8)。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、BHPF 曝露群において甲状腺の組織学的異常は観察されなかった (P34:図 9)。以上の結果より、妊娠期の BHPF 曝露は母体の甲状腺機能に影響を与えない可能性が示唆された。

2-2. BHPF 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評価

BHPF 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、3.75 mg/kg BHPF 投与群で総ビリルビンの上昇 (P35:図 10S) が認められた。また、3.75 および 37.5 mg/kg BHPF 投与群でグルコースの有意な低下が認められた (P36:図 10T)。その他の生化学パラメーターについては、BHPF 投与による変化は認められなかった。

2-3. BHPF 投与による母動物の体重、摂餌量、

子宮重量のへの影響評価

BHPF を投与した母動物について投与期間中に死亡や流産は認められなかった。また、投与期間中の体重変化と摂餌量および GD18 における子宮重量についても、BHPF 投与による顕著な変化は認められなかった (P36:表 1)。

2-4. BHPF 投与による胎仔発生への影響評価

妊娠状況および胎仔への影響について、雌胎仔重量が 3.75 mg/kg BHPF 投与群では対照群と比較して有意な増加が認められたものの (P37:表 2)、着床数、胎仔数、胎盤重量、AGD 等に BHPF 投与による顕著な変化は認められなかった (P37:表 2)。また、外表・内臓検査においても BHPF 投与による異常は確認されなかった (P38:表 3)。さらに、骨格検査においても BHPF 投与による明らかな異常は認められなかった (P39-40:表 4)。以上より、妊娠期の BHPF 曝露は胎児の臓器・骨格形成等にほとんど影響が無いことが示された。

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 曝露時における母動物の解析

摂餌量は3日おきの計測を行った。マウスが給餌器の中に滞在する例があったため、厳密な摂餌量から変動している可能性があり、ケージごとのばらつきがやや大きくなった。10 ppm、250 ppmのいずれの投与群においても、数点の観測点 (10 ppm投与群のP7-10、P16-19、250 ppm投与群のGD15-18、P13-16、P16-19) でPTU投与群の摂餌量が対照群より低値となった (P47:図2A-C)。妊娠期においては妊娠後期の250 ppm投与群において摂餌量が有意に低かったが、出産直後の計測において有意差が見られなかった (P47:図2C)。授乳期においては、児動物が餌を食べ始めるP13以降において10 ppm、250 ppmの双方において有意に摂餌量が低くなった (P47:図2B, D)。母体の体重に関しては、投与群と対照

群の間で数点の計測時において投与群が低値となることが確認された（10 ppmのP10、250 ppmのGD18、P13）（P47:図2E-H）。甲状腺の組織学的解析においては、10 ppm投与群では甲状腺の色調変化が観察された（P49:図4B）。昨年度行った出生前発生毒性試験（TG414）では、GD18.5における母動物の濾胞上皮細胞の肥厚 [前年度報告書参照]は、P21ではわずかに兆候を示すのみであった。また250 ppm投与群においては、甲状腺の肥大、濾胞上皮細胞の肥厚、コロイドの欠失が観察された（P49:図4C', C''）。

3-2. PTU 曝露時における Syn-Rep マウス児動物脳の *in vivo* イメージング解析と甲状腺および脳の組織学的解析

出生後の児動物の体重は10 ppm投与群では、雌雄共に対照群と有意差はなかった（P48:図3A, B）。250 ppm投与群においては、出生直後P4においては対照群と同等だったものの、P7からP21にかけて投与群が有意に低値を示した（P48:図3C, D）。これらの児動物の甲状腺組織像を解析したところ、10 ppm投与群では甲状腺の肥大と濾胞上皮細胞の肥厚が観察された（P49:図4E, E'）。250 ppm投与群では、甲状腺の肥大、濾胞上皮細胞の肥厚、コロイドの欠失が観察された（P49:図4F, F'）。

児動物の脳における *in vivo* イメージング解析では、250 ppm投与群において生後直後P4で対照群よりもレポーター活性が有意な低値を示し、一貫して低下する対照群とは対照的にP7~10にかけて低下の鈍化（対照群と比較して有意な高値）が観察され、P10以降に低下していった（P48:図3G, H）。10 ppm投与群においては、上記の250 ppm投与群の発光変動をマイルドにした変動を示し、P10以降の一点で高値となった（P48:図3E, F）。児動物脳の組織学的解析を行ったところ、Nissl染色像、そしてNissl染色像から計数した大脳皮質の神経細胞数に対照群と投与群間の差は観察されなかった（P50:図5A-D）。同様に、抗IBA1抗体を用いたミクログリア

の染色（P50:図5E-H）、抗GFAP抗体を用いたアストロサイトの染色（P50:図5I-L）を行ったところ、大脳皮質におけるミクログリアが占める細胞割合に投与による変動は見られなかった（P50:図5H）。アストロサイト数に関しては、PTU 10 ppm投与群ではアストロサイト細胞割合がコントロール群と同等であったが、PTU 250 ppm投与群では有意に増加していることが観察された（P50:図5L）。

3-3. PTU 曝露時における雄性児動物の行動変化

10 ppm投与群の雄性児動物では、対照群と比べて、オープンフィールド試験における自発運動量が幼若期（4週齢）より成体期（8週齢）にかけて増加していた（P56-57:図1, 2）。また、本児動物では、幼若期（4週齢）に社会性相互作用試験における匂い嗅ぎ行動が増大していた（P58:図3）。一方、8週齢時に行ったY字型迷路試験では、10 ppm PTU摂餌群で総アーム進入回数の低下が見られたが、自発的交替行動について両群間に差異は認められなかった（P59:図4）。

250 ppm投与群においても、対照群と比べて、オープンフィールド試験における自発運動量が幼若期（4週齢）より成体期（8週齢）にかけて増加していた（P60-61:図5, 6）。自発運動量の日内変動解析においても、250 ppm投与群の自発運動量の増加が明期に生じていることを認めた（P62:図7）。一方、社会性相互作用試験における匂い嗅ぎ行動は幼若期（4週齢）および成体期（8週齢）ともに両群間に差異は認められなかった（P63:図8）。

行動解析後の児動物の脳について、Golgi染色による組織学的解析を行ったところ、250 ppm投与群のmPFC領域で樹状突起スパイン数が増加していることを認めた（P64:図9）。

また血中THレベルについても検討を行ったところ、250 ppm投与群の母動物では、児動物離乳時の血清T4濃度が低下していた（P65:図10A）。児動物については、生後4日

齢の脳では検出限界以下であり、行動解析後（9週齢）の血清 T4 濃度においては 250 ppm 投与群と対照群に差異は認められなかった（P65:図 10B）。

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 α の下流で神経分化に関わる分子の NGS 解析

前年度までにヒト iPS 細胞を用いて THR α のノックダウンを行い、甲状腺機能低下モデルを作製するとともに、DNT 陽性対照物質である農薬のクロルピリホス（CPF）や医薬品のバルプロ酸（VPA）の曝露による神経分化阻害が、THR α のノックダウンにより亢進することを見出した。また THR α ノックダウン細胞を用いて次世代シーケンス解析（NGS 解析）を行った結果、THR α 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のスクリーニングを行った。そこで今年度は NGS 解析により、THR α の下流で神経分化に関わる遺伝子の探索を試みた。THR α ノックダウン細胞で発現が低下する遺伝子をスクリーニングした結果、神経分化に関わる Factor A, B（P70:図 1）、軸索伸展に関わる Factor C（P71:図 2）、D（P72:図 3）、神経分化や薬剤抵抗性に関わる Factor X 遺伝子を同定した（P73:図 4）。

4-2. THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経分化に対する CPF 曝露の影響

THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞に DNT 陽性対照物質である CPF を曝露（10 μ M）し、神経分化能に対する影響を調べた。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞を神経系に分化誘導する際に CPF を曝露したところ、分化マーカー PAX6 の発現はわずかに減少した（P74:図 5）。一方、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に CPF を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて PAX6 発現が約 50%抑制された（P74:図 5）。

そこで、THR α の下流因子について検討し

た。すでにスクリーニングした因子の中から、Factor X の発現について調べた。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞の神経分化時に CPF を曝露しても Factor X の発現はほとんど変化しなかった（P75:図 6）。一方、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に CPF を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて Factor X 発現が約 40%抑制された（P75:図 6）。以上の結果から、Factor X は CPF の神経毒性に関与していることが示唆された。

4-3. THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経分化に対する VPA 曝露の影響

次に、DNT 陽性対照物質である VPA についても同様に神経分化能に対する影響を検討した。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞の神経分化時に VPA を曝露したところ、分化マーカーである PAX6 の発現はわずかに減少した（P76:図 7）。一方、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に VPA を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて PAX6 発現が約 60%抑制された（P76:図 7）。また THR α の下流因子として同定した Factor X の発現についても調べた。その結果、scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞の神経分化時に VPA を曝露しても Factor X の発現はほとんど変化が認められなかった（P77:図 8）。非常に興味深いことに、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に VPA を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて Factor X 発現が約 30%抑制された（P77:図 8）。したがって、Factor X は VPA の神経毒性に関与することが示唆された。

以上の結果より、NGS 解析で同定した Factor X は発達神経毒性の評価マーカーとして有用である可能性が考えられる。

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. Syn-Rep マウスの DNT 評価の NAM としての有用性について

本研究では、DNT 陽性対照物質である PbAc を用いて、Syn-Rep マウスの応答性と脳発達への影響の相関を検証した。今回用いた 1,000 ppm は、一般的に PbAc が明確な DNT を誘導するとされている用量である。また先行研究において、周産期に 1,000 ppm PbAc を投与すると、P21 における児動物の血中 Pb 濃度が平均 41 $\mu\text{g}/\text{dL}$ となることから [Biol. Trace Elem. Res. 199:1414-1424 (2021)], 1/5 の投与量である 200 ppm PbAc 投与では児動物の血中 Pb 濃度が 8 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 程度になると推定される。この濃度はヒトの疫学調査で報告されている血中 Pb 濃度と同程度であるため、本研究では 200 ppm を実質曝露量相当として用いた。

In vivo イメージングの結果より、200 ppm PbAc 投与群では対照群と比較して発達期のレポーター活性の変化が認められたものの、1,000 ppm PbAc 投与群では変化は認められなかった。我々はこれまでに神経細胞数の低下を誘導する DNT 陽性対照物質であるバルプロ酸の投与条件下では Syn-Rep マウス発達期の頭部レポーター活性が低下することを報告しており [Biochem. Pharmacol. 206:115332 (2022)], 母体免疫活性化の誘導物質でありグリア系細胞の活性化を惹起する Polyinosinic acid-polycytidylic acid (Poly(I:C)) 投与条件下では Syn-Rep マウス発達期の頭部レポーター活性が上昇することを明らかにしている [R4 田熊分担研究報告書参照]。本研究における組織学的解析の結果、200 ppm PbAc 投与群ではミクログリアおよびアストロサイトの増加が認められたが、神経細胞数は変化していなかったことから、200 ppm PbAc 投与群における Syn-Rep マウスの頭部レポーター活性の変化はグリア細胞の活性化に起因する可能性が考えられた。一方で 1,000 ppm PbAc 投与群ではミクログリアおよびアストロサイトの増加に加えて、神経細胞数の低下が認められたことから、本条件下では Syn-Rep マウスの頭部レポーター活性を低下させる要因（神経細胞数の低下）と上昇させる要因（グリア細胞の活性化）が複合

的に生じた結果、*in vivo* イメージングによるレポーター活性の変化としては捉えられなかった可能性が考えられる。Syn-Rep マウスは化学物質の DNT を評価する上で有用なツールであるものの、PbAc のような特定の用量域で複合的な影響を示す物質の場合にはその影響を見逃す可能性があることが明らかとなった。このように複合的な作用機構によって誘導されるエンドポイントの検出には、用量反応性を検討する重要性が改めて確認された。

2. BHPF の甲状腺機能への影響と催奇形性について

エストロゲン受容体 α , β 、双方に対して、強力なアンタゴニスト作用を示す化合物として見出された BHPF は、マウスに対して生殖発生毒性を示す可能性が報告されている [Nat. Commun. 8:14585 (2017)]。一方で BHPF は、ゼブラフィッシュの成体に対して TH レベルに影響を与えること [Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 260:109419 (2022)] や、ゼブラフィッシュ幼生への曝露が視床下部一下垂体—甲状腺軸をかく乱し神経系に影響を与えること [Sci. Total Environ. 776:145963 (2021)] が報告されている。哺乳動物においては BHPF が TH シグナルに与える影響については報告されていないが、哺乳動物においても発生段階に曝露すると甲状腺機能に影響を与える結果、次世代影響を誘導する可能性が考えられる。そこで、本研究では BHPF を妊娠マウスに曝露し、マウス甲状腺機能に与える影響について評価するとともに、胎仔の骨格形成や器官形成に与える影響についても検討した。典型的な甲状腺機能低下が生じた場合、PTU 投与モデルで認められるような [R4 中西分担研究報告書参照]、血清中 T3 および T4 の有意な低下、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るが、BHPF 投与群においては各種甲状腺関連ホルモンおよび甲状腺組織像

いずれにおいても変化は認められなかった。また、一部の生化学マーカーにおいては BHPF 投与により変動していたが、甲状腺機能低下症で報告されている変化は BHPF 投与群では認められなかった。BHPF による甲状腺機能への影響の有無がゼブラフィッシュとマウスで異なった原因については不明であるが、BHPF はマウスにおいて代謝不活性化されることや、マウスは魚類よりも BHPF の排出速度が速いことなどが可能性として考えられる。また、我々はこれまでに BHPF がマウスに対して発生毒性を引き起こす可能性を見出している [Nat. Commun. 8:14585 (2017)] が、本研究において改めてガイドラインに準拠したプロトコールで出生前発生毒性試験を実施したところ、妊娠期の BHPF 曝露は着床数や胎児の生存数、胎児の体重に影響を与えず、胎児の臓器や骨格形成等の胎児発生にもほとんど影響が無いことが示された。以上より、BHPF 曝露はマウスに対して甲状腺機能や胎児発生にほとんど影響を与えない可能性が示された。

3.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

10 ppm、250 ppm の PTU 混餌投与系において、血清中甲状腺ホルモン指標の値は、前年度の結果より、児動物は 10 ppm 混餌投与条件においては軽度の妊娠期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典型的な妊娠期甲状腺機能低下状態に曝されたと考えられる。今回解析を行った 10 ppm 投与群の母動物における P21 の甲状腺組織像は、色調変化と濾胞上皮細胞の肥厚の兆候が観察されるのみであり、GD18.5 時の病理組織像 [前年度報告書参照] と比較して影響が軽度であった。この結果は、P13 より児動物の摂餌を考慮して PTU の用量が半分になることにより、一部回復している可能性が考えられた。一方で児動物の甲状腺組織像は、10 ppm 投与群においても明らかな甲状腺機能低下状態の病理組織像を示した。このことから、本混餌系においては、児動物は

胎児期に母体甲状腺機能低下に曝露され、かつ生後において甲状腺機能低下状態であることが示唆された。

昨年度までに我々は、Syn-Rep マウスの有用性を検証するために様々な DNT 誘導物質に対するレポーター分子の発現応答性を検討しており、胎生期の曝露で脳の神経細胞数が減少する VPA 投与モデルでは有意な低値を、母体免疫活性化を誘導するような系では有意な高値を示すことを明らかにしてきた [前年度報告書参照]。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、対照群と比較して生後直後は低値、その後高値となった。10 ppm 投与群の方が 250 ppm 投与群と比較して値の変動がマイルドであったことから用量依存性が確認され、対照群と比較して変動があったことから、神経系の構築に何らかの影響が生じている可能性が示唆された。具体的にどのような因子がレポーター活性に影響しているかはさらなる解析が必要である。

今年度はこのような条件下に曝露した児動物について各種行動試験を行った。その結果、離乳後早期より自発運動と匂い嗅ぎ行動の増加という情動行動異常を惹起することを見いだした。また、自発運動の増加については成育後も継続していることを認めた。先行研究でも、類似の投与条件 (250 ppm PTU を GD15-P25 まで飲水投与した 2-4 ヶ月齢 ICR マウス) において雄の多動といった行動異常が生じることが報告されている [Toxicol Rep. 6: 1031-1039 (2019)] が、本研究結果はこれを指示する結果であったと言える。特筆すべきは、母動物における甲状腺関連指標に影響が認められ始める閾値用量 (10 ppm) において、児動物の行動異常が認められた点である。先述のとおりこの用量群では、児動物の甲状腺組織では明らかな甲状腺機能低下が認められていることから、行動試験の結果を最も反映しているエンドポイントは、児動物の甲状腺組織像である可能性が示唆された。まだ予試験的に行った実験であるため、今後追加の行動試験を行い、用量反応性等に

についても詳細なデータを取得する予定である。

脳の組織学的解析については、大脳皮質組織像の解析から、少なくとも P21 における大脳皮質の神経細胞数には影響していないと考えられた。Syn-Rep マウスの *in vivo* イメージング解析は P16 までであったが投与群で有意に高い値となっており、Syn-Rep マウスを活用することで組織像に現れないレベルの異常を検出することが可能である可能性が示唆された。その一方で、成体期の解析では、行動異常が認められた 250 ppm 投与群の雄性児動物の脳において、mPFC 領域の樹状突起スパイン数が増加していることが確認された。しかし、行動異常とその時点におけるレポーター分子の発現変動との関係は不明瞭であることから、今後行動異常を示す月齢におけるレポーター分子の発現変動のデータを収集するとともに、さらに詳細な組織学的解析が必要であると考えている。

いくつかの報告において、甲状腺機能低下が炎症性サイトカインの発現上昇 [*PLoS ONE*. 9: e109753 (2014)、*Mol Cell Endocrinol*. 499:110594 (2020). など] や、ミクログリアの活性化 [*Int J Mol Sci*. 23: 11938 (2022) など] を誘導しうることが示されている。しかし、本研究の解析の範囲において、ミクログリア数の増加は観察されなかった。炎症性サイトカインに関しても、予備実験において組織内濃度の有意な上昇等は観察されなかった。このことから、おそらく今回検討した程度の周産期甲状腺機能低下状態においては、母胎免疫活性化とは異なった機構でレポーター分子の発現上昇が起こっている可能性が考えられた。

一方、もう一つの脳構成細胞であるアストロサイトに関しては、大脳皮質における陽性細胞割合の増加が観察された。この現象の解釈は、例えば、甲状腺ホルモン前駆体である T4 は血液脳関門を通過後、アストロサイトに取り込まれ、その内部で活性型甲状腺ホルモン T3 になるが、投与マウスでは脳内の甲状腺ホルモンが減少しているため、より多く

の変換を行うことを目的に存在量が増加している可能性が考えられる。また、特定の脳領域のアストロサイトの活性化によって多動につながり得ることも報告されていることから [*Cell*. 177(5): 1280-1292.e20. (2019)]、今後さらに多角的な解析を行う必要があると考えている。

4 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

THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞を用いて NGS 解析を行った結果、THR α の下流で働く神経分化因子として Factor X の同定に成功した。さらに上記の化合物に対する応答性を調べたところ、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞における Factor X の発現は、コントロール細胞より低下する傾向が認められた。Factor X に関しては原著論文にまとめる必要があるため、この報告書では詳細な情報を記載できない。少なくとも PAX6 の下流で作用するシグナル分子であり、ヒト ES 細胞由来神経系細胞において機能を有することが報告されている。しかしながら、Factor X による神経分化機構のメカニズムはいまだ不明であるため、今後、さらに詳細に検討する必要がある。

in vitro と *in vivo* を比較検討する観点から、動物でも同様に Factor X を介する機構が働いているのかは重要である。Factor X のノックアウトマウスの解析結果ではどのようなフェノタイプが報告されているのかなど興味深い。さらに、Syn-Rep マウスの NGS データと照合することにより、詳細な機能が明らかになることが期待される。さらに、化学物質の体内動態などの情報を考慮して、ハザードの特定からリスク評価に展開できるのか検討する必要がある。

今後は、発生毒性や神経毒性が懸念されている他のカテゴリーの化学物質、たとえば金属などを追加して、評価法の適用範囲や chemical space などを明らかにする必要がある。これにより本モデルの有用性を明らかにすることが期待される。

E. 結論

1. Syn-Repマウスは、VPAやPTUとは異なった作用機構のDNT陽性対照物質の影響も検出できる可能性が明らかとなり、NAMとしての有用性が示された。
2. 妊娠期のBHPF曝露は母体甲状腺機能や児動物の器官形成および骨格形成には影響を与えないことが明らかとなった。
3. 妊娠期～離乳期の甲状腺機能低下においては、児動物大脳皮質の神経細胞数に影響は認められなかったが、アストロサイト数の増加が観察された。またSyn-Repマウスはアストロサイトの活性化を伴う脳発達への影響も評価できる可能性が示された。
4. 妊娠期～離乳期に甲状腺機能が低下すると、雄性児動物に多動などの情動行動の異常が誘導される可能性が示された。またこの影響は、母動物の甲状腺関連指標に変動が認められる閾値付近のPTU用量においても認められた。
5. ヒトiPS細胞を用いた甲状腺機能低下モデルにおいて、化合物の発達神経毒性を評価できるバイオマーカーとしてFactor Xを抽出した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomita S, Ishida K, **Matsumaru D**, Hiromori Y, Nagase H, **Nakanishi T (責任著者)**, Excretion and tissue distribution properties of PCB-126 for establishing a bioaccumulation model in mice, *BPB Rep* 7:7-13 (2024).
- 2) 石田 慶士, **松丸 大輔**, **中西 剛**, 化学物質の脳発達への影響を発光で可視化. 光アライアンス 34:15-18 (2023).
- 3) Iwahashi M, Yoshimura T, Harigai W, **Takuma K**, Hashimoto H, Katayama T,

Hayata-Takano A, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice show length abnormalities of the axon initial segment, *J Pharmacol Sci* 153:175–182 (2023)

2. 学会発表

- 1) 糟谷 佐保里 他：妊娠期甲状腺機能低下による甲状腺関連パラメータの変動と胎仔発生への影響評価、第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月
- 2) 小泉 茉奈海 他：周産期甲状腺機能低下モデルを用いた甲状腺ホルモンの産仔脳発達への影響評価、第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月
- 3) 安彦 行人 他：化学構造に基づくクラスタリングと MEA 実験の統合的手法による化学物質発達神経毒性の評価、第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月
- 4) 山田 茂 他：ヒトiPS細胞由来神経細胞における解離性麻酔剤の神経毒性評価、第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月
- 5) 石田 慶士 他：代替ビスフェノール fluorene-9-bisphenol の甲状腺関連指標と胎仔発生への影響評価、第63回日本先天異常学会学術集会、つくば、2023年7月
- 6) 糟谷 佐保里 他：化学物質誘導性の母体甲状腺機能低下による甲状腺関連指標の変動と胎仔発生への影響評価、第63回日本先天異常学会学術集会、つくば、2023年7月
- 7) **諫田 泰成**：ヒトiPS細胞を用いた発達神経毒性ガイドランスと今後の展望、第63回日本先天異常学会学術集会、つくば、2023年7月
- 8) 張替 若菜 他：PACAP KO マウスの多動性と軸索起始部の形態に対するADHD治療薬の影響、第66回日本神経化学学会大会、神戸、2023年7月
- 9) 小泉 茉奈海 他：周産期甲状腺機能低

- 下モデルにおける甲状腺関連パラメータの変動と児動物脳発達との連関評価、フォーラム 2023：衛生薬学・環境トキシコロジー、広島、2023年9月
- 10) 田原 孟 他：抗てんかん薬バルプロ酸の胎生期曝露は中枢性感作に伴う持続的な痛覚過敏とアロディニアを引き起こす、フォーラム 2023 衛生薬学・環境トキシコロジー、広島、2023年9月
 - 11) 辰巳 佳乃子 他：神経分化トレーサーマウスを用いた鉛による発達神経毒性の有害性発現経路に関する検討、メタルバイオサイエンス研究会 2023、岐阜、2023年10月
 - 12) 糟谷 佐保里 他：化学物質誘導性の妊娠期甲状腺機能低下による甲状腺関連指標の変動と胎仔発生毒性の評価、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 2023、名古屋、2023年11月
 - 13) 辰巳 佳乃子 他：神経分化トレーサーマウスを用いた低用量域鉛曝露における発達神経毒性の有害性発現経路に関する検討、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 2023、名古屋、2023年11月
 - 14) 小泉 茉奈海 他：化学物質誘導性の周産期甲状腺機能低下による児の脳発達への影響評価、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 2023、名古屋、2023年11月
 - 15) Takemoto T, et al. : Oxytocin restores abnormal social behavior in a mouse model of 3q29 microdeletion, Neuroscience 2023 (The 52nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience), Washington, D.C., USA, 2023年11月
 - 16) 諫田 泰成：化学物質の発達神経毒性評価と甲状腺影響評価の取り組み、日本動物実験代替法学会、千葉、2023年11月
 - 17) 村田 拳一朗 他：胎生期 PGD2-DP1 シグナル活性化はマウスの自閉症様の精神行動異常を引き起こす、第 50 回日本脳科学会、大阪、2023年12月
 - 18) 竹下 黎 他：内側前頭前皮質における PACAP-PAC1 シグナルの遮断が反復社会的敗北ストレスマウスに与える影響、第 97 回日本薬理学会年会、神戸、2023年12月
 - 19) 金子皓 他：非定型抗精神病薬クロザピンの認知機能障害改善作用における結合組織成長因子の関与、第 97 回日本薬理学会年会、神戸、2023年12月
 - 20) 岩橋 美咲 他：注意欠如・多動症 (ADHD) 様行動を示すマウスにおいてみられた神経軸索起始部の異常は ADHD 治療薬によって行動異常の回復と共に回復する、第 97 回日本薬理学会年会、神戸、2023年12月
 - 21) 吾郷 由希夫 他：バルプロ酸の胎内曝露は中枢性感作と痛覚感受性の増大を引き起こす、第 44 回日本臨床薬理学会学術総会、神戸、2023年12月
 - 22) 安彦 行人 他：ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイシステムによるフルオキセチンの神経毒性評価、第 97 回日本薬理学会年会、神戸、2023年12月
 - 23) 山田 茂 他：ヒト iPS 細胞由来神経細胞による解離性麻酔剤の神経毒性評価、第 97 回日本薬理学会年会、神戸、2023年12月
 - 24) 松丸 大輔 他：甲状腺機能低下モデルにおける甲状腺関連パラメータの変動と次世代影響の連関評価、日本薬学会第 144 年会、横浜、2024年3月
 - 25) 諫田 泰成：甲状腺ホルモンを介した発達神経毒性の評価、日本薬学会第 144 回年会、横浜、2024年3月29日
 - 26) 長平 萌花 他：母体免疫活性化による神経発達影響の評価に資する神経分化トレーサーマウスの有用性、日本薬学会第 144 年会、横浜、2024年3月
 - 27) 田原 孟 他：自閉スペクトラム症モデルマウスの痛覚異常と社会性行動障害

における TRPV1 の役割, 日本薬学会第
144 年会, 横浜, 2024 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

令和 5 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5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
～SynRep マウスの有用性評価と甲状腺機能低下を誘導する化学物質の次世代影響評価～
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（岐阜薬科大学 薬学部・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とから、甲状腺機能低下を誘導する化学物質の次世代影響が懸念されている。しかし甲状腺関連指標の変動と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、この問題の解決に向けて化学物質等の脳発達への影響を効率的に評価できることが期待されるSyn-Repマウス有用性評価を行ってきた。今年度は、バルプロ酸（VPA）や抗甲状腺薬プロピルチオウラシル（PTU）とは異なった作用機構でDNTを誘導すると考えられる酢酸鉛（PbAc）を用いて、PbAc曝露に対するSyn-Repマウス応答性と脳発達との関連について検証した。また血清中TSHレベルに与える影響についても検討を行った。実質曝露量相当である200 ppm PbAcを周産期曝露したSyn-Repマウス児動物について*in vivo*イメージングを行ったところ、頭部レポーター活性は対照群と比較して出生後4日目（P4）で高値、P10で低値を示した。これらの児動物についてP21の血清中TSHレベルを測定したが、変化は認められなかった。この結果からSyn-Repマウスは、VPAやPTUとは異なった作用機構のDNT陽性対照物質の影響も検出できる可能性が明らかとなった。また甲状腺ホルモンシグナルかく乱をすることが懸念されている他の化学物質の次世代影響についても検討を行うために、代替ビスフェノールであるfluorene-9-bisphenol（BHPF）についてマウスを用いた出生前発生毒性試験（TG414）を実施した。既にBHPFは生殖発生毒性を誘導することが報告されているが、我々の検討では妊娠期のBHPF曝露は母体甲状腺機能や児動物の器官形成および骨格形成には影響を与えないことが明らかとなった。

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（TH）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。

このような背景のもと我々は、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）のプロモーター制御下でルシフェラーゼ（Luc2）とLacZの融合遺伝子をレポーター遺伝子として有するSyn-Repマウスを独自に開発した [Biochem.

Pharmacol. 206:115332 (2022)]. 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、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。これまでの検討では、DNT 陽性対照物質の VPA を胎生期の Syn-Rep マウスに曝露すると、神経細胞数の減少を反映したレポーター分子の発現の低下が起こるが、PTU を用いた周産期甲状腺機能低下モデルや Polyinosinic acid-polycytidylic acid (Poly(I:C)) を用いた妊娠母体の免疫活性化 (MIA) モデルでは、アストロサイトの活性化を伴ったレポーター分子の上昇が確認されている。そこで今年度は、Syn-Rep マウスの更なる有用性を検証するために、甲状腺機能への影響が報告されており尚且つ DNT 陽性対照物質でもある酢酸鉛 (PbAc) による脳発達と血清中 TSH レベルへの影響を検討した。

他方、我々はこれまでに、代替ビスフェノールである fluorene-9-bisphenol (BHPF) が市販の飲料用ボトルに溶出し、ヒト血中から検出されること、*in vitro* で強い抗エストロゲン作用を示すことを報告しており、動物実験においても BHPF が発生毒性を引き起こす可能性を見出している [*Nat. Commun.* 8:14585 (2017)]. また BHPF は魚類に対して甲状腺機能をかく乱することが報告されていることから、ヒトにおいても発達期の甲状腺機能がかく乱を介して次世代影響を与える可能性が懸念される。そこで今年度は、妊娠期の BHPF 曝露における母体の甲状腺機能と胎児発生への影響 (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。

B. 研究方法

1. Syn-Rep マウスを用いた発達期の PbAc 曝露による脳発達への影響評価

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。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。

1-2. 薬物の投与

投与スケジュールは OECD テストガイドライン No.426 (発達神経毒性試験) に準じて実施した。PbAc (関東化学、純度 > 99.5%) を 200 ppm および 1,000 ppm の用量で飲用水に混ぜ、妊娠 Syn-Rep マウスに妊娠 6 日目 (GD6) から自由摂取させた。児動物の出生後も飲水投与を継続し、出生後 21 日目 (P21) まで投与した。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、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。

1-3. *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 D-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 (Luc2 由来のレポーター活性)

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P16まで測定した。

1-4. 血清中 TSH レベルの測定

血清中TSHレベルの測定は残留農薬研究所の方法に準拠し、マウスTSH測定キット (Merck Millipore, #MPTMAG-49K) を用いて実施した。血清と抗TSH抗体ビーズを反応し、ビーズを洗浄した。ビーズに検出用抗体を反応させ、洗浄後さらに Streptavidin-Phycoerythrinを反応させた。各試薬を反応させたビーズをFACSFlow (BD Bioscience, #342003) に懸濁後、BD FACSVerse (BD Bioscience) でビーズの蛍光強度を測定した。各動物の血清中TSHレベルは作成した検量線より算出した。

1-5. 脳組織学的解析

P21 の児動物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 (PFA) で組織を固定した。全脳をパラフィン包埋し、厚さ 5 μ 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。Nissl 染色は、0.1%クレシルバイオレット溶液で 10 分染色した。組織免疫化学染色は pH6 のクエン酸バッファーを用いて賦活化処理後、内在性ペルオキダーゼを 3% H₂O₂ 液で不活性化し、非特異的な抗体反応を抑えるために G-Block (GenoStaff) を用いてブロッキングを行った。anti-IBA1 抗体 (ミクログリア特異的マーカー) (富士フイルム和光純薬株式会社、#011-27991) および anti-GFAP 抗体 (アストロサイト特異的マーカー) (Cell Signaling Technology, #3670S) を用いて一次抗体反応を行い、洗浄後ヒストファインシンプルステインマウス MAX-PO(G) (ニチレイ) およびヒストファインマウスステインキット (ニチレイ) を用いて二次抗体反応を行った。DAB を用いて発色反応を行い、マイヤーヘマトキ

シリンを用いて対比染色を行った。染色切片は洗浄および脱水・透徹した後、封入し、オールインワン蛍光顕微鏡 (キーエンス) にて観察した。

1-6. 統計学的解析

データは全て平均値±標準偏差で表し、統計学的処理には解析ソフト GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, USA) を用いた。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。

2. BHPF の出生前発生毒性試験

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。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。交配後陰プラグが確認されたマウスを胎齢 0 日 (E0) とした。

2-2. BHPF の投与

BHPF (東京化成、純度 >96.0%) は 5% エタノール/ sesame oil 溶液に溶解し、GD5 から GD17 まで、0、3.75 および 37.5 mg/kg-body weight/day の用量で毎日強制経口投与を行った。

2-3. 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した。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% PFA で固定しパラフィンブロックを作製した。

2-4. 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、胎子を摘出した。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。

2-5. 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。

2-6. 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℃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。

2-7. 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あすか製薬メディカルに依頼した。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。

2-8. 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。

2-9. 統計学的解析

母動物データ及び胎児データについては 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

1. Syn-Rep マウスを用いた発達期の PbAc 曝露による脳発達への影響評価

1-1. 飲水量、母体体重、摂餌量、および児動物体重増加への影響評価

妊娠期および授乳期における飲水量と母体体重に PbAc 曝露による顕著な影響は認められなかった (図 1、2)。出生後児動物の体重増加量については、200 ppm 投与群で雌では P4、P7、P10、P13、P16 において、雄では P13、P16 において、対照群と比較して有意な上昇が認められた (図 3A、3B)。一方、1,000 ppm 投与群では雌の P4 において対照群と比較して体重増加量の有意な低下が認められたものの、他の日齢や雄では変化はみられなかった (図 3C、3D)。

1-2. In vivo イメージングを用いた児動物の頭部のレポーター活性評価

児動物の頭部レポーター活性について *in vivo* イメージングにて解析したところ、200 ppm 投与群では対照群と比較して P4 では有意な高値、P10 では有意な低値が認められた (図 4A)。一方、1,000 ppm 投与群では対照群と比較していずれの日齢においてもレポーター活性に有意な差は認められなかった (図 4B)。以上より、200 ppm PbAc の周産期曝露により Syn-Rep マウス頭部のレポーター活性経時変化パターンが変化することが明らかとなった。

1-3. 血清中 TSH レベルへの影響評価

200 ppm PbAc 投与群の P21 児動物より血清を採取し、TSH レベルを測定したところ、

対照群と比較して TSH レベルに差は認められなかった (図 5)。

1-4. 脳構成細胞への影響評価

P4 の脳組織像をニッスル染色 (神経細胞を評価) および抗 IBA1 抗体 (ミクログリアを評価) と抗 GFAP 抗体 (アストロサイトを評価) を用いた免疫化学染色により評価したところ、200、1,000 ppm 投与群共にいずれの染色像においても、対照群と比較して大脳皮質における明らかな組織学的異常は認められなかった (図 6)。

海馬歯状回付近においては、200 ppm 投与群では対照群と比較して神経細胞数に明らかな変化は認められなかったものの、ミクログリアおよびアストロサイトの増加が認められた (図 7A)。一方、1,000 ppm 投与群では対照群と比較して海馬歯状回付近において、神経細胞数の減少とミクログリアおよびアストロサイトの増加が認められた (図 7B)。

2. BHPF の出生前発生毒性試験

2-1. BHPF 投与による母体甲状腺関連指標への影響評価

BHPF を投与した母動物の GD18 における血清中 TH レベルについて検討を行ったところ、fT4、T4、T3、TSH レベルは BHPF 曝露による変動はみられなかった (図 8)。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、BHPF 曝露群において甲状腺の組織学的異常は観察されなかった (図 9)。以上の結果より、妊娠期の BHPF 曝露は母体の甲状腺機能に影響を与えない可能性が示唆された。

2-2. BHPF 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評価

BHPF 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、3.75 mg/kg BHPF 投与群で総ビリルビンの上昇 (図 10S) が認められた。また、3.75 および 37.5 mg/kg BHPF 投与群でグルコースの有意な低下が認められた (図 10T)。その

他の生化学パラメーターについては、BHPF 投与による変化は認められなかった。

2-3. BHPF 投与による母動物の体重、摂餌量、子宮重量への影響評価

BHPF を投与した母動物について投与期間中に死亡や流産は認められなかった。また、投与期間中の体重変化と摂餌量および GD18 における子宮重量についても、BHPF 投与による顕著な変化は認められなかった (表 1)。

2-4. BHPF 投与による胎仔発生への影響評価

妊娠状況および胎仔への影響について、雌胎仔重量が 3.75 mg/kg BHPF 投与群では対照群と比較して有意な増加が認められたものの (表 2)、着床数、胎仔数、胎盤重量、AGD 等に BHPF 投与による顕著な変化は認められなかった (表 2)。また、外表・内臓検査においても BHPF 投与による異常は確認されなかった (表 3)。さらに、骨格検査においても BHPF 投与による明らかな異常は認められなかった (表 4)。以上より、妊娠期の BHPF 曝露は胎児の臓器・骨格形成等にほとんど影響が無いことが示された。

D. 考察

1. Syn-Rep マウスを用いた発達期の PbAc 曝露による脳発達への影響評価

本研究では、DNT 陽性対照物質である PbAc を用いて、Syn-Rep マウスの応答性と脳発達への影響の相関を検証した。今回用いた 1,000 ppm は、一般的に PbAc が明確な DNT を誘導するとされている用量である。また先行研究において、周産期に 1,000 ppm PbAc を投与すると、P21 における児動物の血中 Pb 濃度が平均 41 µg/dL となることから [Biol. Trace Elem. Res. 199:1414-1424 (2021)]、1/5 の投与量である 200 ppm PbAc 投与では児動物の血中 Pb 濃度が 8 µg/dL 程度になると推定される。この濃度はヒトの疫学調査で報告されている血中 Pb 濃度と同程度であるため、本研究では 200 ppm を実質曝露量相当として用いた。

In vivo イメージングの結果より、200 ppm PbAc 投与群では対照群と比較して発達期のレポーター活性の変化が認められたものの、1,000 ppm PbAc 投与群では変化は認められなかった。我々はこれまでに神経細胞数の低下を誘導する DNT 陽性対照物質であるバルプロ酸の投与条件下では Syn-Rep マウス発達期の頭部レポーター活性が低下することを報告しており [Biochem. Pharmacol. 206:115332 (2022)]、母体免疫活性化の誘導物質でありグリア系細胞の活性化を惹起する Polyinosinic acid-polycytidylic acid (Poly(I:C)) 投与条件下では Syn-Rep マウス発達期の頭部レポーター活性が上昇することを明らかにしている[R4 田熊分担研究報告書参照]。本研究における組織学的解析の結果、200 ppm PbAc 投与群ではミクログリアおよびアストロサイトの増加が認められたが、神経細胞数は変化していなかったことから、200 ppm PbAc 投与群における Syn-Rep マウスの頭部レポーター活性の変化はグリア細胞の活性化に起因する可能性が考えられた。一方で 1,000 ppm PbAc 投与群ではミクログリアおよびアストロサイトの増加に加えて、神経細胞数の低下が認められたことから、本条件下では Syn-Rep マウスの頭部レポーター活性を低下させる要因（神経細胞数の低下）と上昇させる要因（グリア細胞の活性化）が複合的に生じた結果、*in vivo* イメージングによるレポーター活性の変化としては捉えられなかった可能性が考えられる。Syn-Rep マウスは化学物質の DNT を評価する上で有用なツールであるものの、PbAc のような特定の用量域で複合的な影響を示す物質の場合にはその影響を見逃す可能性があることが明らかとなった。このように複合的な作用機構によって誘導されるエンドポイントの検出には、用量反応性を検討する重要性が改めて確認された。

一方で Pb 曝露が甲状腺機能に与える影響については、セルビア共和国の橋本病患者を対象とした調査において血液中 Pb 濃度が健常者と比較して高いという報告 [Environ.

Res.186:109538 (2020)]や、中国人を対象とした調査において血液中 Pb 濃度が高い女性は血中 TSH レベルが高い傾向にあるという報告がされている [Environ. Pollut.230:320-328 (2017)]。また、0.5 - 1 mg/kg-bw Pb を 28 日間投与した成体ラットにおいて TSH が上昇することが報告されている [Environ. Res. 237:117035 (2023)]。Pb の DNT 誘導メカニズムにおける母体甲状腺機能低下の関与の有無は明確になっておらず今後も詳細な検討が必要であるが、少なくとも本研究においては Syn-Rep マウス頭部のレポーター活性および脳組織像への影響が認められた 200 ppm PbA の周産期曝露は P21 児動物の血中 TSH レベルに影響を与えないことが明らかとなった。

2. BHPF の出生前発生毒性試験

エストロゲン受容体 α 、 β 、双方に対して、強力なアンタゴニスト作用を示す化合物として見出された BHPF は、マウスに対して生殖発生毒性を示す可能性が報告されている [Nat. Commun. 8:14585 (2017)]。一方で BHPF は、ゼブラフィッシュの成体に対して TH レベルに影響を与えること [Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 260:109419 (2022)]や、ゼブラフィッシュ幼生への曝露が視床下部—下垂体—甲状腺軸をかく乱し神経系に影響を与えること [Sci. Total Environ.776:145963 (2021)]が報告されている。哺乳動物においては BHPF が TH シグナルに与える影響については報告されていないが、哺乳動物においても発生段階に曝露すると甲状腺機能に影響を与える結果、次世代影響を誘導する可能性が考えられる。そこで、本研究では BHPF を妊娠マウスに曝露し、マウス甲状腺機能に与える影響について評価するとともに、胎仔の骨格形成や器官形成に与える影響についても検討した。典型的な甲状腺機能低下が生じた場合、PTU 投与モデルで認められるような[R4 中西分担研究報告書参照]、血清中 T3 および T4 の有意な低下、TSH の有意な上昇が認められ、甲状腺の組織像に

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るが、BHPF 投与群においては各種甲状腺関連ホルモンおよび甲状腺組織像いずれにおいても変化は認められなかった。また、一部の生化学マーカーにおいては BHPF 投与により変動していたが、甲状腺機能低下症で報告されている変化は BHPF 投与群では認められなかった。BHPF による甲状腺機能への影響の有無がゼブラフィッシュとマウスで異なった原因については不明であるが、BHPF はマウスにおいて代謝不活性化されることや、マウスは魚類よりも BHPF の排出速度が速いことなどが可能性として考えられる。また、我々はこれまでに BHPF がマウスに対して発生毒性を引き起こす可能性を見出している [Nat. Commun. 8:14585 (2017)] が、本研究において改めてガイドラインに準拠したプロトコールで出生前発生毒性試験を実施したところ、妊娠期の BHPF 曝露は着床数や胎児の生存数、胎児の体重に影響を与えず、胎児の臓器や骨格形成等の胎児発生にもほとんど影響が無いことが示された。以上より、BHPF 曝露はマウスに対して甲状腺機能や胎児発生にほとんど影響を与えない可能性が示された。

E. 結論

- ・実質曝露量相当の周産期 PbAc 曝露による脳発達への影響を Syn-Rep マウスを用いた *in vivo* イメージングで検出できたとともに、同 PbAc 曝露条件下では血清中 TSH レベルに影響を与えない可能性が示唆された。
- ・妊娠期の BHPF 曝露は母体の甲状腺機能および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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomita S, Ishida K, **Matsumaru D**, Hiromori Y, Nagase H, **Nakanishi T (責任著者)**, Excretion and tissue distribution properties of PCB-126 for establishing a bioaccumulation model in mice, *BPB*

Reports 7:7-13 (2024).

- 2) 石田慶士, **松丸大輔**, **中西 剛**, 化学物質の脳発達への影響を発光で可視化. 光アライアンス 34:15-18 (2023).

2. 学会発表

- 1) 糟谷 佐保里 他：妊娠期甲状腺機能低下による甲状腺関連パラメータの変動と胎児発生への影響評価、第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月
- 2) 小泉 茉奈海 他：周産期甲状腺機能低下モデルを用いた甲状腺ホルモンの産仔脳発達への影響評価、第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月
- 3) 石田 慶士 他：代替ビスフェノール fluorene-9-bisphenol の甲状腺関連指標と胎児発生への影響評価、第 63 回日本先天異常学会学術集会、つくば、2023 年 7 月
- 4) 糟谷 佐保里 他：化学物質誘導性の母体甲状腺機能低下による甲状腺関連指標の変動と胎児発生への影響評価、第 63 回日本先天異常学会学術集会、つくば、2023 年 7 月
- 5) 小泉 茉奈海 他：周産期甲状腺機能低下モデルにおける甲状腺関連パラメータの変動と児動物脳発達との連関評価、フォーラム 2023：衛生薬学・環境トキシコロジー、広島、2023 年 9 月
- 6) 辰巳 佳乃子 他：神経分化トレーサーマウスを用いた鉛による発達神経毒性の有害性発現経路に関する検討、メタルバイオサイエンス研究会 2023、岐阜、2023 年 10 月
- 7) 糟谷 佐保里 他：化学物質誘導性の妊娠期甲状腺機能低下による甲状腺関連指標の変動と胎児発生毒性の評価、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 2023、名古屋、2023 年 11 月
- 8) 辰巳 佳乃子 他：神経分化トレーサーマウスを用いた低用量域鉛曝露における発達神経毒性の有害性発現経路に関する検討、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 2023、名古屋、2023 年 11 月
- 9) 小泉 茉奈海 他：化学物質誘導性の周産期甲状腺機能低下による児の脳発達

への影響評価、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 2023、名古屋、2023 年 11 月

- 10) 松丸 大輔 他：甲状腺機能低下モデルにおける甲状腺関連パラメータの変動と次世代影響の連関評価、日本薬学会第 144 年会、横浜、2024 年 3 月
- 11) 長平 萌花 他：母体免疫活性化による

神経発達影響の評価に資する神経分化トレーサーマウスの有用性、日本薬学会第 144 年会、横浜、2024 年 3 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

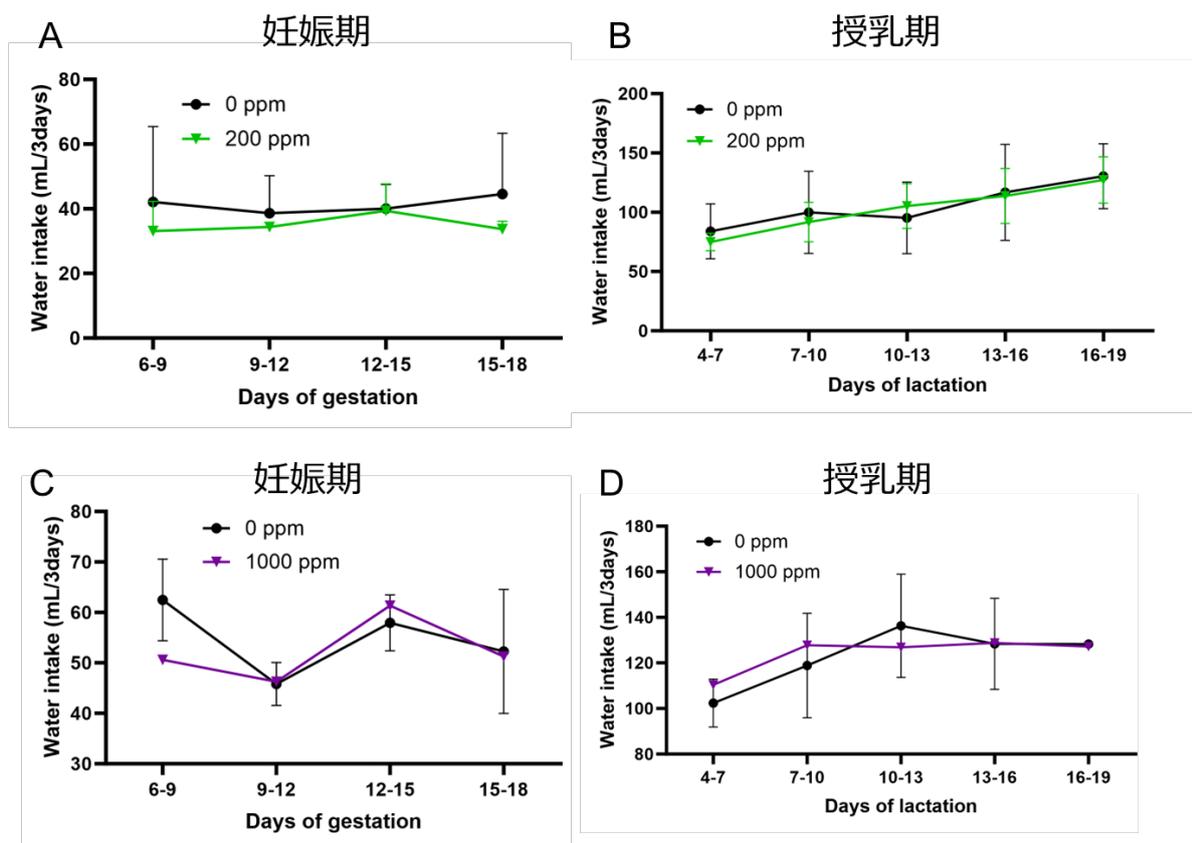


図1 妊娠6日目から出生後21日目までPbAcを投与したマウス母体の飲水量の変化
 妊娠期（A、C）および授乳期（B、D）の飲水量を3日おきに測定した。（A）（B）Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=3). （C）（D）Data are expressed as follows: 0 ppm, mean \pm S.D. (n=3); 1000 ppm, mean (n=2).

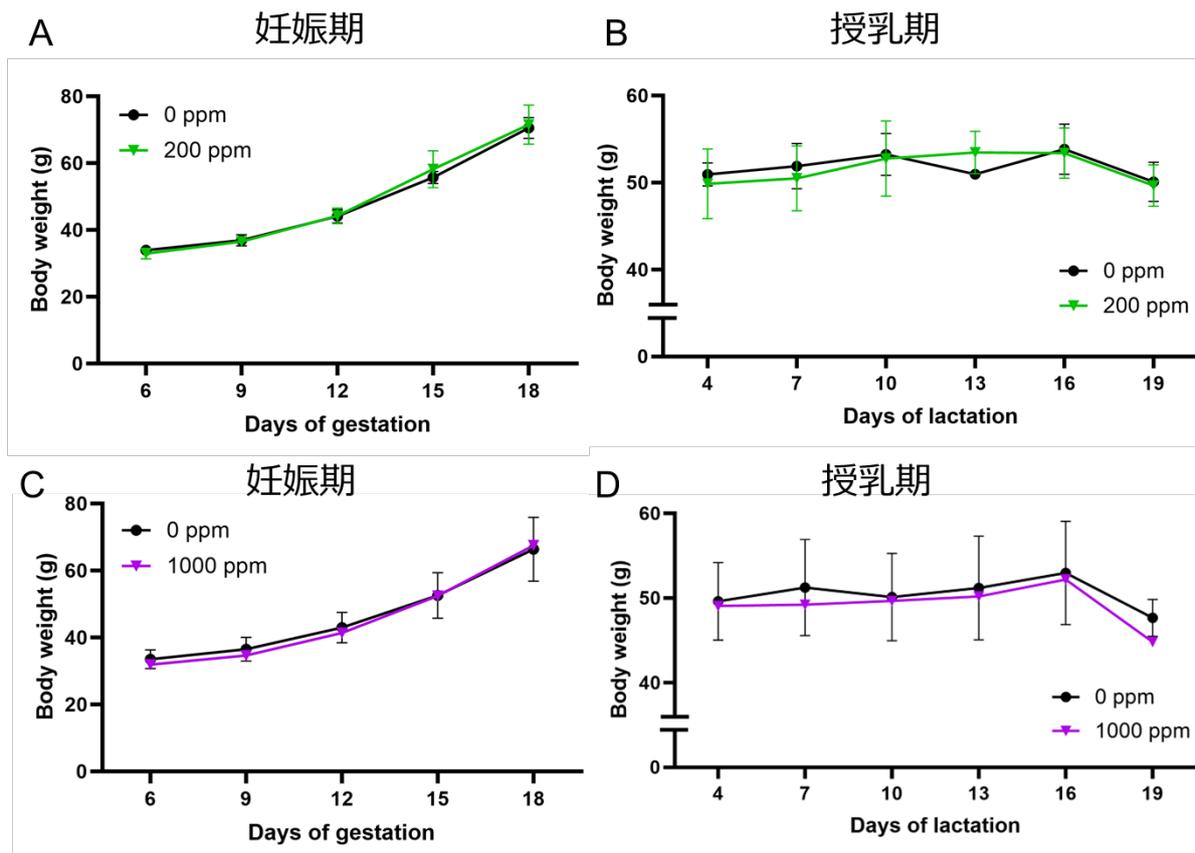


図2 妊娠6日目から出生後21日目までPbAcを投与したマウス母体の体重の変化

妊娠期 (A、C) および授乳期 (B、D) の飲水量を3日おきに測定した。(A) (B) Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=3). (C) (D) Data are expressed as follows: 0 ppm, mean \pm S.D. (n=3); 1000 ppm, mean (n=2).

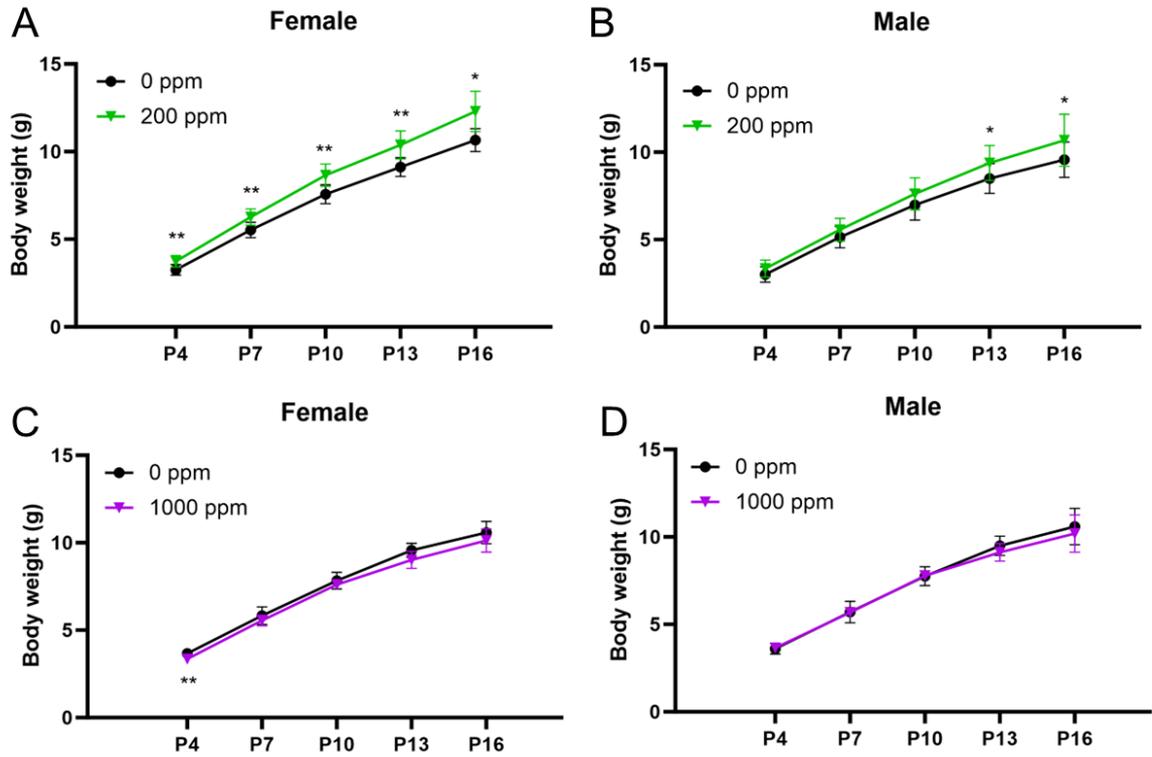


図3 胎齢6日目から出生後21日目までPbAcを投与したSyn-Repマウス児の体重の変化
 出生後、4、7、10、13、16日目における児動物（A、C：雌、B、D：雄）の体重を3日おきに測定した。Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=5-15). * P <0.05, ** P <0.01, vs. control (unpaired t-test).

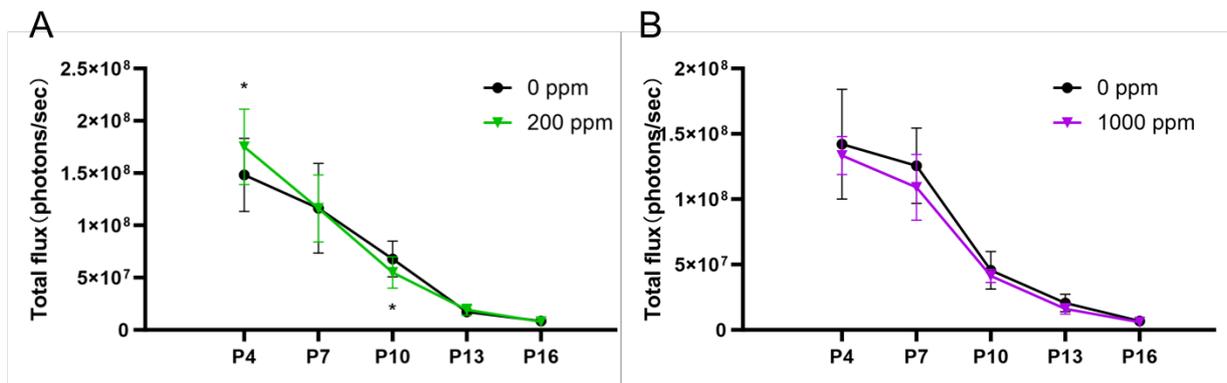


図 4 胎齢 6 日目から出生後 21 日目まで PbAc を投与した Syn-Rep マウス児の頭部発光経時変化

出生後、4、7、10、13、16 日目における児動物 (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。グラフは各個体を n=1 とし雌雄のデータを混合したものをグラフとして表している。Data are expressed as the mean ± S.D. (n=5-15). **P*<0.05, ***P*<0.01,

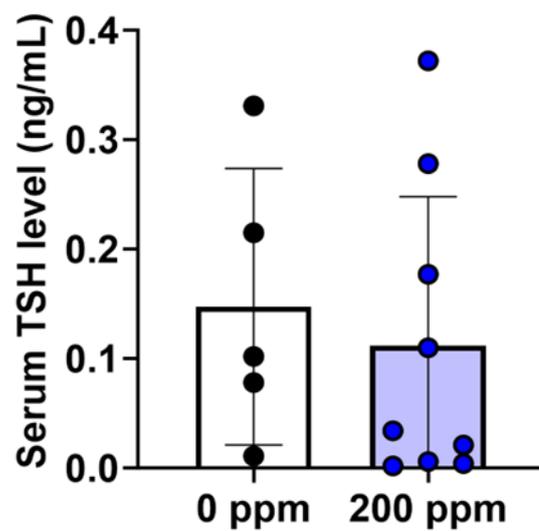


図 5 胎齢 6 日目から出生後 21 日目まで PbAc を投与した Syn-Rep マウス児の血清中 TSH レベル

出生後 21 日目における児動物の血清中 TSH レベルを測定した。グラフは各個体を n=1 とし雌雄のデータを混合したものをグラフとして表している。Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=5-9).

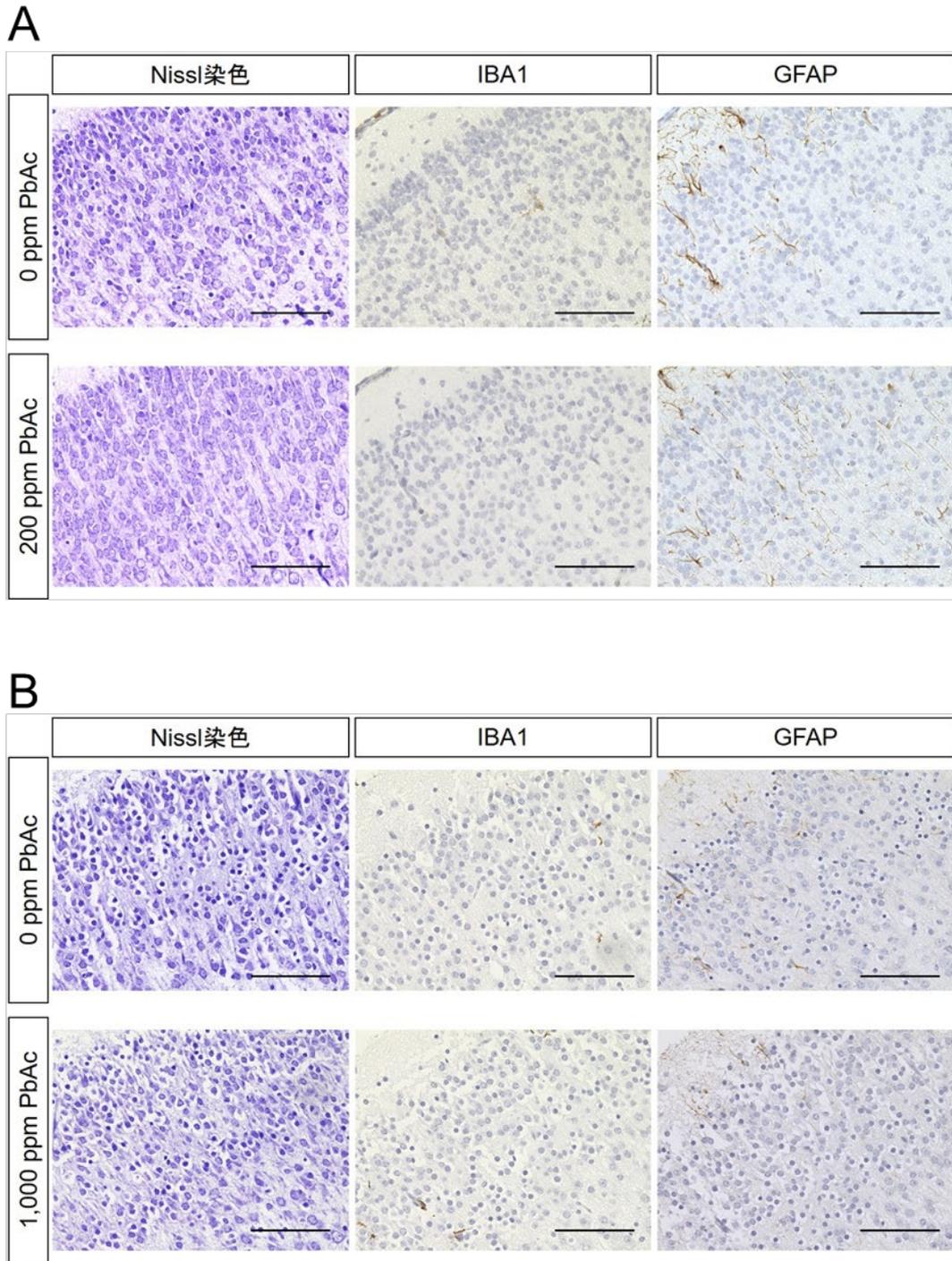
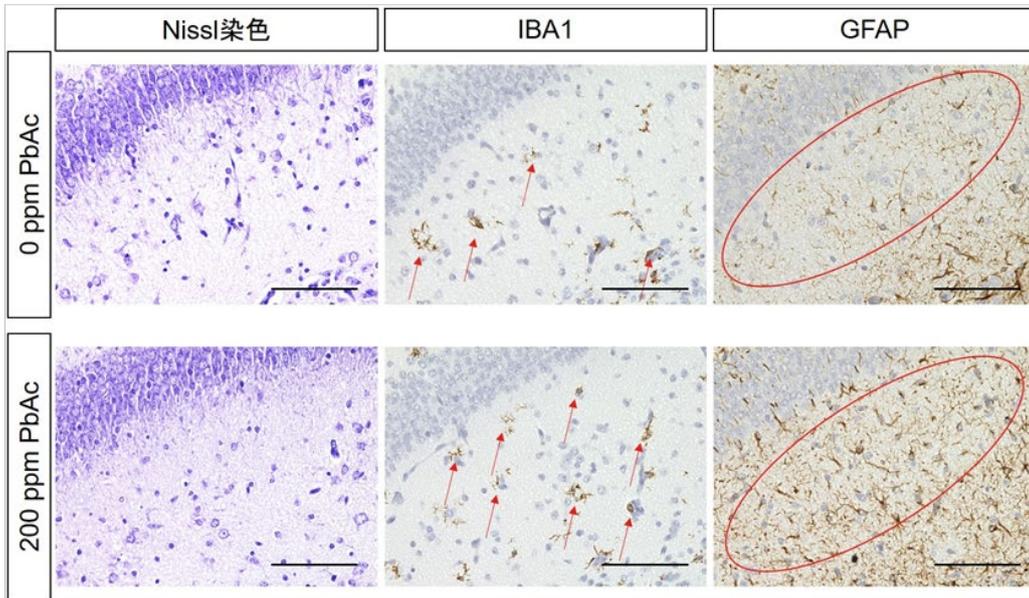


図 6 胎齢 6 日目から出生後 4 日目まで PbAc を投与した Syn-Rep マウス児の 4 日齢における大脳皮質組織学的解析

出生後 4 日目における児動物において全脳を摘出、4%ホルムアルデヒド溶液にて固定後、パラフィン切片を作製した。神経細胞の評価として Nissl 染色、グリア細胞（IBA1：ミクログリアマーカー、GFAP：アストロサイトマーカー）の評価として免疫化学染色を行い、顕微鏡にて大脳皮質の染色画像を観察・取得した。スケールバー：100 μ m。

A



B

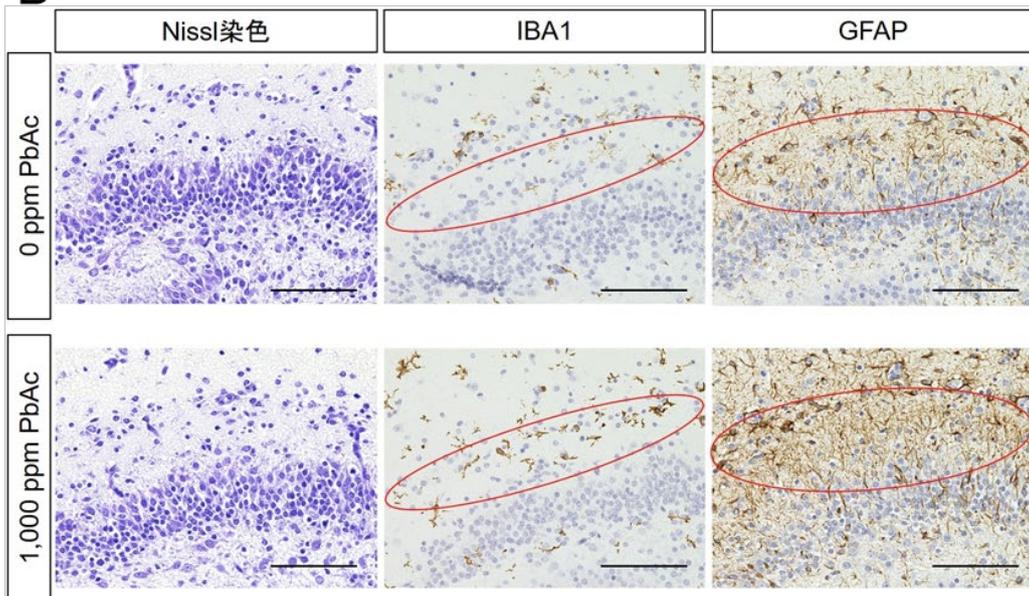


図 7 胎齢 6 日目から出生後 4 日目まで PbAc を投与した Syn-Rep マウス児の 4 日齢における海馬組織学的解析

出生後 4 日目における児動物において全脳を摘出、4%ホルムアルデヒド溶液にて固定後、パラフィン切片を作製した。神経細胞の評価として Nissl 染色、グリア細胞（IBA1：ミクログリアマーカー、GFAP：アストロサイトマーカー）の評価として免疫化学染色を行い、顕微鏡にて海馬歯状回付近の染色画像を観察・取得した。（A）0 ppm と 200 ppm の比較。（B）0 ppm と 1000 ppm の比較。赤矢印および赤丸は IBA1 もしくは GFAP の陽性細胞を示す。スケールバー：100 μ m。

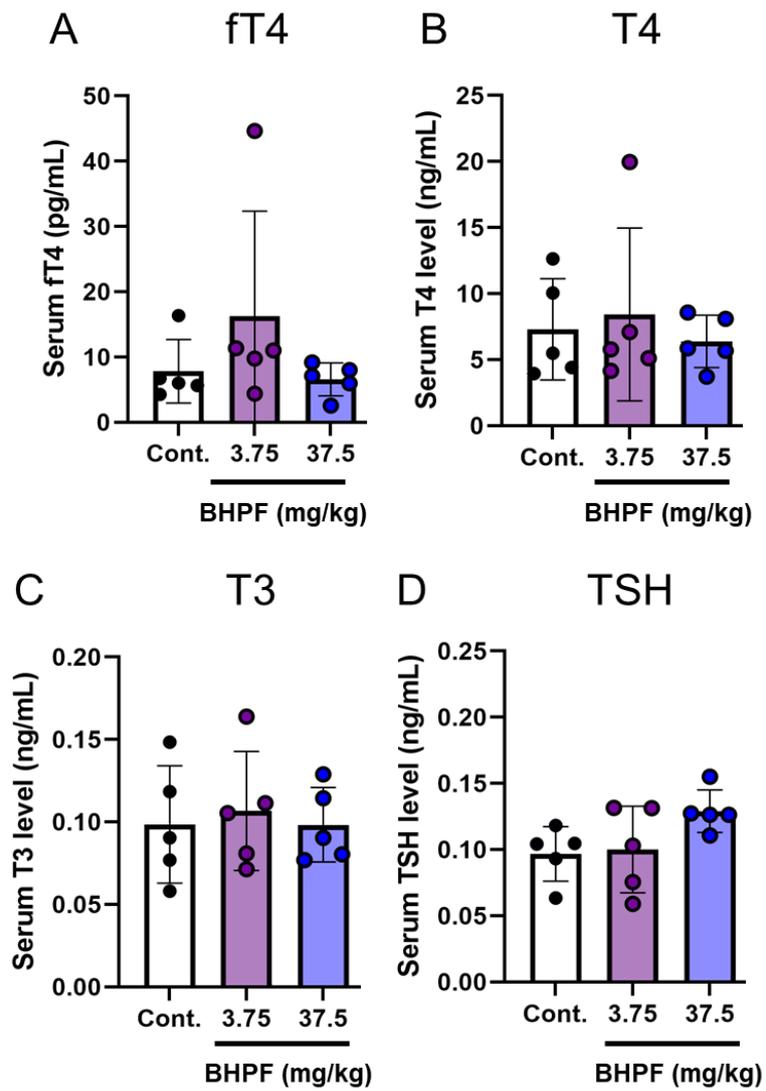


図 8 妊娠期に BHPF を投与したマウスの妊娠 18 日目における血清中甲状腺関連ホルモンレベル
 妊娠 18 日目に母体より血清を回収し、血清中 fT4 (A)、T4 (B)、T3 (C)、TSH (D) レベルを
 測定した。Data are expressed as mean \pm S.D. (n=5).

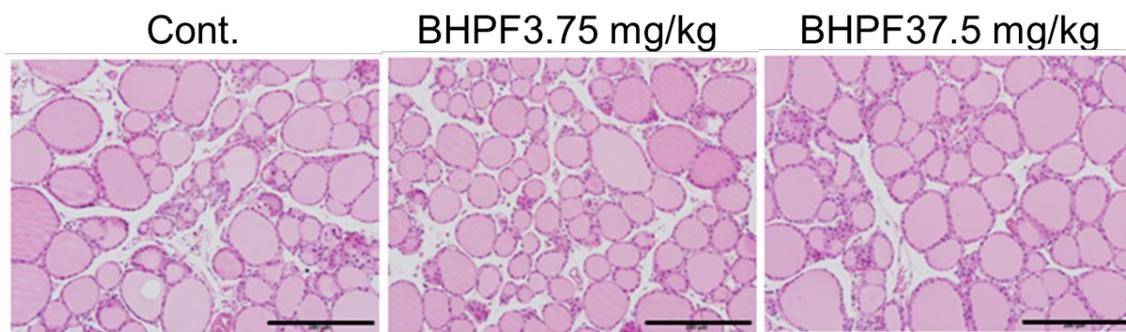


図 9 妊娠期に BHPF を投与したマウスの妊娠 18 日目における甲状腺病理組織像

妊娠 18 日目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。スケールバー：200 μ m。

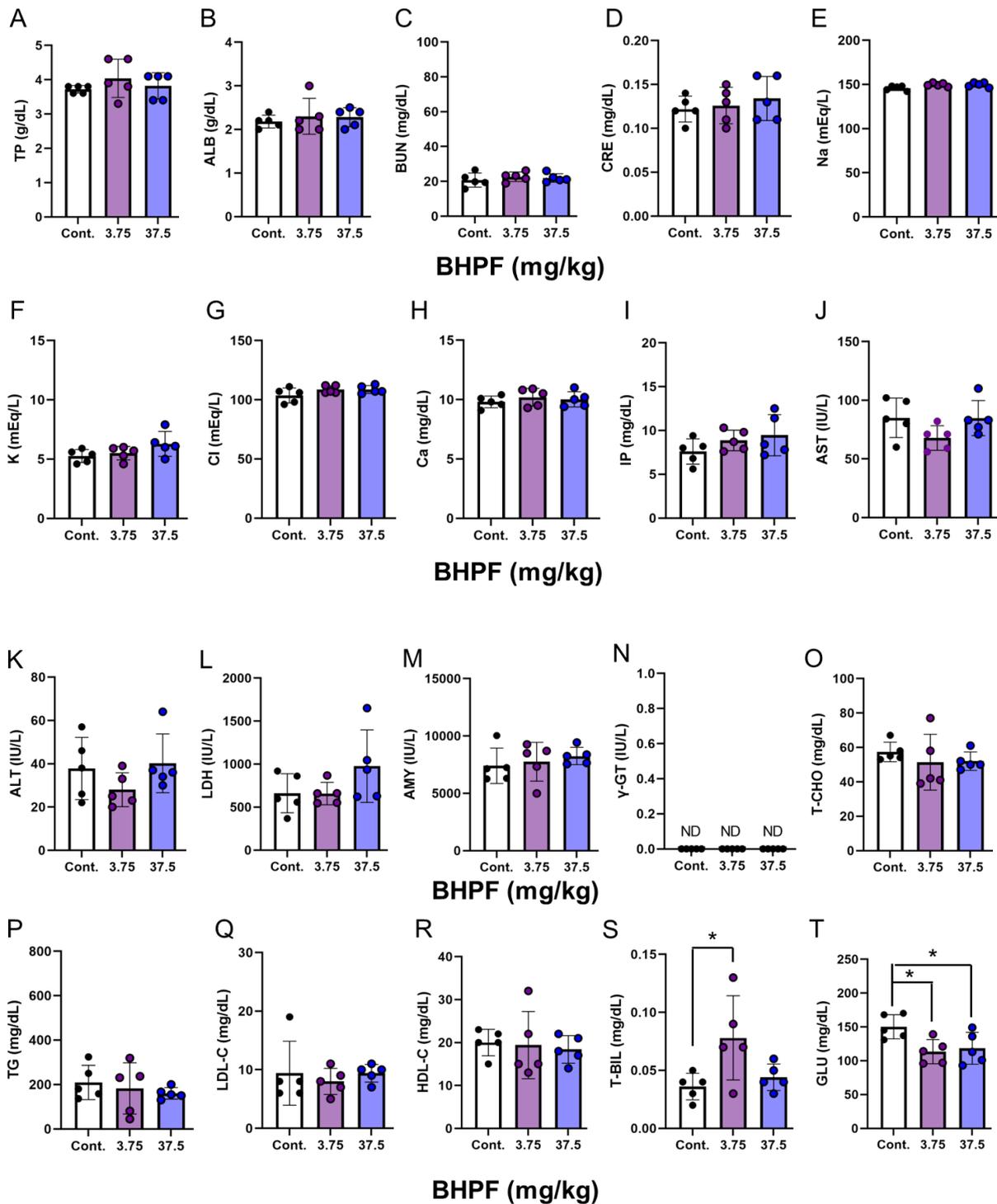


図 10 妊娠期に BHPF を投与したマウスの妊娠 18 日目における血清生化学パラメーターレベル
 妊娠 18 日目に母体より血清を回収し、血清中の総タンパク (A)、アルブミン (B)、尿素窒素 (C)、
 クレアチニン (D)、Na (E)、K (F)、Cl (G)、Ca (H)、無機リン (I)、乳酸脱水素酵素 (LDH)
 (J)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) (K)、アラニンアミノトランスフェラー
 ゼ (ALT) (L)、アミラーゼ (M)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ (γ -GT) (N)、総コレステロ
 ール (T-Cho) (O)、中性脂肪 (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=5). * $P < 0.05$, vs. control (Dunnett's test). ND: Not detected.

表 1 妊娠中に BHPF を投与したマウス母体の各種パラメーター

Parameters	Cont.	BHPF	
		3.75 mg/kg	37.5 mg/kg
Number of litters	10	10	10
Influences on the dams			
Mortality	0	0	0
Abortion	0	0	0
Evaluated litters	10	10	10
Mean body weight (g) GD6	31.98 ± 0.84	33.32 ± 2.13	33.02 ± 1.75
Mean body weight (g) GD18	62.24 ± 2.29	65.66 ± 6.25	64.25 ± 7.64
Mean body weight change (g) from GD5 to GD18	30.26 ± 2.33	32.34 ± 4.62	31.23 ± 6.45
Food consumption (g) from GD5 to GD6	4.71 ± 0.83	5.08 ± 1.03	5.29 ± 0.84
Food consumption (g) from GD17 to GD18	7.37 ± 0.67	8.02 ± 1.45	7.54 ± 1.59
Food consumption (g) from GD5 to GD18	75.74 ± 5.48	82.17 ± 8.69	80.59 ± 9.65
Gravid uterus weight (g)	24.26 ± 2.20	27.13 ± 3.10	26.32 ± 4.64

Data are expressed as the mean ± S.D.

表 2 胎生期に BHPF を投与したマウスの胎齢 18 日目における胎仔の各種パラメーター

Parameters	Cont.	BHPF 3.75 mg/kg	BHPF 37.5 mg/kg
Number of evaluated litters	10	10	10
No. corpora lutea/litter	16.0 ± 3.9	16.0 ± 4.8	17.1 ± 4.4
No. implantation sites/litter	13.6 ± 1.2	13.9 ± 1.3	14.0 ± 2.4
Total live fetuses/litter	12.0 ± 1.6	13.0 ± 1.6	13.0 ± 2.0
Live female fetuses/litter	5.6 ± 2.1	6.1 ± 1.7	7.1 ± 2.0
Live male fetuses/litter	6.4 ± 2.2	6.9 ± 2.4	5.9 ± 2.0
Male/female sex ratio	1.62 ± 1.46	1.29 ± 0.74	0.94 ± 0.51
Total embryonic death/litter	1.60 ± 1.35	0.90 ± 0.99	1.00 ± 0.82
Early resorptions/litter	1.00 ± 1.05	0.70 ± 0.82	0.50 ± 0.53
Late resorptions/litter	0.30 ± 0.48	0.10 ± 0.32	0.20 ± 0.42
Dead fetuses/litter	0.30 ± 0.48	0.10 ± 0.32	0.30 ± 0.48
Female fetal weight (g)	1.512 ± 0.050	1.603 ± 0.100 [#]	1.509 ± 0.097
Male fetal weight (g)	1.570 ± 0.085	1.659 ± 0.094	1.570 ± 0.085
Female placental weight (g)	0.124 ± 0.015	0.121 ± 0.018	0.117 ± 0.013
Male placental weight (g)	0.139 ± 0.018	0.132 ± 0.016	0.125 ± 0.014
Female AGD (mm)	0.997 ± 0.064	1.018 ± 0.036	0.993 ± 0.040
Male AGD (mm)	1.686 ± 0.069	1.741 ± 0.051	1.725 ± 0.059
Female AGD normalized (AGD/3 [√] bw) (mm/g ^{1/3})	0.869 ± 0.055	0.872 ± 0.031	0.867 ± 0.048
Male AGD normalized (AGD/3 [√] bw) (mm/g ^{1/3})	1.453 ± 0.076	1.472 ± 0.040	1.486 ± 0.055

Data are expressed as the mean ± S.D. [#]*P* < 0.05, vs. Cont. by Steel's test. AGD: anogenital distance.

表 3 胎生期に BHPF を投与したマウスの胎齢 18 日目における外表および内臓検査の結果

Parameters	Cont.	BHPF 3.75 mg/kg	BHPF 37.5 mg/kg
Number of evaluated litters	10	10	10
External examination			
Number of evaluated fetuses	120	125	130
Face: cleft palate, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.77)
Forepaw digit: pedunculated supernumerary, no. fetuses (%)	0 (0.00)	3 (2.40)	2 (1.54)
Hindpaw digit: polysyndactyly, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Visceral examination			
Number of evaluated fetuses	54	60	59
Umbilical artery:			
Transposed, no. fetuses (%)	5 (9.26)	12 (20.0)	5 (8.47)
Bilateral, no. fetuses (%)	2 (3.70)	0 (0.00)	1 (1.69)

Data are expressed as number of fetuses or litters. Values in parenthesis are percentage.

表 4 胎生期に BHPF を投与したマウスの胎齢 18 日目における骨格検査の結果

Parameters	Cont.	BHPF	BHPF
		3.75 mg/kg	37.5 mg/kg
Number of evaluated litters	10	10	10
Number of evaluated fetuses	66	70	71
Skeletal variations, no. fetuses (%)	18 (27.3)	23 (32.9)	28 (39.4)
Skeletal malformations, no. fetuses (%)	12 (18.2)	7 (10.0)	14 (19.7)
Sternebra:			
Misaligned, no. fetuses (%)	3 (4.55)	2 (2.86)	7 (9.86)
Xiphoid cartilage branched, no. fetuses (%)	0 (0.00)	8 (11.4)	3 (4.23)
Xiphoid cartilage hole, no. fetuses (%)	8 (12.1)	9 (12.9)	3 (4.23)
Supernumerary rib:			
Cervical short, no. fetuses (%)	3 (4.55)	0 (0.00)	1 (1.41)
Thoracolumbar full, no. fetuses (%)	2 (3.03)	5 (7.14)	10 (14.1)
Thoracolumbar short, no. fetuses (%)	3 (4.55)	3 (4.29)	1 (1.41)
Cartilage interrupted, no. fetuses (%)	1 (1.52)	5 (7.14)	8 (11.3)
Vertebra: sacral arch not fused, no. fetuses (%)	1 (1.52)	1 (1.43)	1 (1.41)
Pelvic girdle: malpositioned caudal unilateral, no. fetuses (%)	1 (1.52)	1 (1.43)	0 (0.00)
Forelimb: forepaw phalanx supernumerary, no. fetuses (%)	0 (0.00)	1 (1.43)	0 (0.00)
Sternebra:			
Fused, no. fetuses (%)	1 (1.52)	0 (0.00)	0 (0.00)
Split, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Branched, no. fetuses (%)	9 (13.6)	5 (7.14)	7 (9.86)
Intersternebral cartilage split, no. fetuses (%)	2 (3.03)	1 (1.43)	2 (2.82)
Xiphoid cartilage split, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.41)
Rib:			
Costal cartilage fused, no. fetuses (%)	1 (1.52)	0 (0.00)	0 (0.00)
Costal cartilage fused to sternum, no. fetuses (%)	1 (1.52)	0 (0.00)	10 (14.1)
Vertebra:			
Cervical arch branched, no. fetuses (%)	4 (6.06)	0 (0.00)	3 (4.23)
Lumbar centrum misshapen, no. fetuses (%)	0 (0.00)	1 (1.43)	2 (2.82)
Sacral vertebra misaligned, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.41)
Skull:			
Nasal incomplete ossification, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Frontal incomplete ossification, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Parietal incomplete ossification, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.41)
Interparietal incomplete ossification, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.41)
Supraoccipital incomplete ossification, no. fetuses (%)	1 (1.52)	0 (0.00)	1 (1.41)
Sternebra:			
Bipartite ossification, no. fetuses (%)	2 (3.03)	1 (1.43)	0 (0.00)
Incomplete ossification, no. fetuses (%)	3 (4.55)	1 (1.43)	2 (2.82)
Asymmetric ossification, no. fetuses (%)	1 (1.52)	0 (0.00)	2 (2.82)
Unilateral ossification, no. fetuses (%)	1 (1.52)	0 (0.00)	0 (0.00)
Unossified, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

Sternum: supernumerary ossification site, no. fetuses (%)	7 (10.6)	0 (0.00)	2 (2.82)
Vertebra:			
Cervical arch, isolated ossification site, no. fetuses (%)	1 (1.52)	1 (1.43)	2 (2.82)
Thoracic arch, increased ossification, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

Data are expressed as number of fetuses or litters. Values in parenthesis are percentage.

令和5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
～甲状腺機能低下時における Syn-Rep マウスの応答性評価と
児動物脳構成細胞への影響の解析～

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誘導し、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、抗甲状腺薬プロピルチオウラシル（PTU）をSyn-Repマウスに投与して行ってきた甲状腺機能低下誘導実験をガイドライン試験に基づいた規模で行った。甲状腺関連指標に影響が認められ始める閾値用量（10 ppm）と、甲状腺刺激ホルモン（TSH）の上昇を伴うトリヨードチロニン（T3）／チロキシシン（T4）の低下が認められる典型的用量（250 ppm）の2用量を設定し、母動物、児動物への影響（摂餌量、体重、甲状腺組織像、Syn-Repレポーター活性、脳組織像・脳構成細胞分布）を比較解析した。どちらの投与群においても母動物の摂餌量、体重変化にはほとんど影響が見られなかった。児動物においては、250 ppm投与群における出生後体重増加の不良が観察された。児動物の甲状腺組織は、甲状腺機能低下の特徴が観察され、Syn-Repレポーター活性は対照群に比較して出生直後は低値で次第に高値となる様子が観察された。組織学的解析の結果、本実験系のマウス群においては脳皮質の神経細胞数に影響は観察されなかったが、アストロサイト数の増加が観察されたことから、Syn-Repマウスを用いた早期における脳影響評価の可能性が示唆された。

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、その際の脳構成細胞への影響の解析とSyn-Repマウスを用いた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妊娠 0.5 日（GD0.5）とした。また、児動物の出生日を生後（授乳）0 日（P0）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 (図1)。児動物の出生後も母動物にPTU混餌食を継続して与えた。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、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。P13~P21の期間は児動物の摂餌も始まるため、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。

実験規模が大きい関係で、10 ppm投与群とその対照群、そして250 ppm投与群とその対照群の実験は同時には行わず、各投与群間で数ヶ月の期間が空いている。

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摂餌量として計算した。

3-2. *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^D-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P16まで測定した。

3-3. 組織学的解析

脳組織は、4%PFAを用いた灌流固定後に2日間浸漬固定した後、70%エタノールに置換し、4°Cで保存した。自動パラフィン包埋装置 (CT-Pro 20、Genotsaff) を用いて包埋した。薄切はサンプルをロータリーミクロトーム (Leica) にて厚さ5 μmに薄切した。HE染色、Nissl染色は、ティシュー・テック Prisma (サクラファインテック) を用いて標準的なプロトコールで行った。スライドガラス間の染色ムラを軽減させるために、同日に染色した。免疫組織化学染色は自動免疫染色装置HISTOSTAINER (ニチレイバイオ) を用いて行った。抗体は抗Iba1ヤギポリクローナル抗体 (富士フイルム和光純薬)、GFAP (GA5) マウスモノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた。画像はマルチスペクトルカメラNuance (CRI Inc.) を用いて撮影し、ImageJ、もしくは組織イメージ解析ソフトinForm ver. 2.4 (PerkinElmer) を用いて計数した。

4. 統計学的解析

統計学的処理は解析ソフト SPSS 15.0J for Windows (SPSS, Inc., USA) を用いた。多重比較検定は Dunnett's multiple comparison test、二群の比較は Student's *t*-test 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

摂餌量は3日おきの計測を行った。マウスが給餌器の中に滞在する例があったため、厳密な摂餌量から変動している可能性があり、ケージごとのばらつきがやや大きくなった。10 ppm、250 ppmのいずれの投与群において

も、数点の観測点（10 ppm投与群のP7-10、P16-19、250 ppm投与群のGD15-18、P13-16、P16-19）でPTU投与群の摂餌量が対照群より低値となった（図2A-C）。妊娠期においては妊娠後期の250 ppm投与群において摂餌量が有意に低かったが、出産直後の計測において有意差が見られなかった（図2C）。授乳期においては、児動物が餌を食べ始めるP13以降において10 ppm、250 ppmの双方において有意に摂餌量が低くなった（図2B, D）。母体の体重に関しては、投与群と対照群の間で数点の計測時において投与群が低値となることが確認された（10 ppmのP10、250 ppmのGD18、P13）（図2E-H）。甲状腺の組織学的解析においては、10 ppm投与群では甲状腺の色調変化が観察された（図4B）。昨年度行った出生前発生毒性試験（TG414）では、GD18.5における母動物の濾胞上皮細胞の肥厚 [前年度報告書参照]は、P21ではわずかに兆候を示すのみであった。また250 ppm投与群においては、甲状腺の肥大、濾胞上皮細胞の肥厚、コロイドの欠失が観察された（図4C', C''）。

2. 児動物の解析

出生後の児動物の体重は10 ppm投与群では、雌雄共に対照群と有意差はなかった（図3A, B）。250 ppm投与群においては、出生直後P4においては対照群と同等だったものの、P7からP21にかけて投与群が有意に低値を示した（図3C, D）。これらの児動物の甲状腺組織像を解析したところ、10 ppm投与群では甲状腺の肥大と濾胞上皮細胞の肥厚が観察された（図4E, E'）。250 ppm投与群では、甲状腺の肥大、濾胞上皮細胞の肥厚、コロイドの欠失が観察された（図4F, F'）。

児動物の脳における*in vivo*イメージング解析では、250 ppm投与群において生後直後P4で対照群よりもレポーター活性が有意な低値を示し、一貫して低下する対照群とは対照的にP7~10にかけて低下の鈍化（対照群と比較して有意な高値）が観察され、P10以降は低下していった（図3G, H）。10 ppm投与群においては、上記の250 ppm投与群の発光変

動をマイルドにした変動を示し、P10以降の一点で高値となった（図3E, F）。

児動物脳の組織学的解析を行ったところ、Nissl染色像、そしてNissl染色像から計数した大脳皮質の神経細胞数に対照群と投与群間の差は観察されなかった（図5A-D）。同様に、抗IBA1抗体を用いたミクログリアの染色（図5E-H）、抗GFAP抗体を用いたアストロサイトの染色（図5I-L）を行ったところ、大脳皮質におけるミクログリアが占める細胞割合に投与による変動は見られなかった（図5H）。アストロサイト数に関しては、PTU 10 ppm投与群ではアストロサイト細胞割合がコントロール群と同等であったが、PTU 250 ppm投与群では有意に増加していることが観察された（図5L）。

D. 考察

本年度の解析においては、10 ppm、250 ppmのPTU投与条件において、母動物の摂餌量が投与群において低値を示すタイミングが存在した。本投与系において、マウスが給餌器に入り込んで正確な摂餌量を計測できない場合があったが、250 ppm投与群の妊娠後期に認められた有意な低下については、その直前の時期や出産後13日まで有意差が認められなかったことから、偶発的に有意差がついたものと考えられた。一方、授乳期のP13以降の摂餌量の有意な低値は、母動物と8匹の児動物の餌の消費の合計である。このため、対照群より体重が低い投与児動物の摂餌量は少なくなることが想定されることから合理的な結果であると考えられた。250 ppm投与群の児動物の体重が低値となった厳密な理由は不明であるが、ウサギ胎児体重の減少が報告されていることから、結果は信頼に足ると考えられた。

本試験の結果では、各投与群とその対照群の母動物の妊娠後期、出産後の体重に差異が存在する。これは、実験規模の大きさの問題で、10 ppm投与群とその対照群、そして250 ppm投与群とその対照群の実験間で数ヶ月の期間が空いていることに起因していること

考えられた。

10 ppm、250 ppm の PTU 混餌投与系において、血清中甲状腺ホルモン指標の値は、前年度の結果より、児動物は 10 ppm 混餌投与条件においては軽度の妊娠期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典型的な妊娠期甲状腺機能低下状態に曝されたと考えられる。今回解析を行った 10 ppm 投与群の母動物における P21 の甲状腺組織像は、色調変化と濾胞上皮細胞の肥厚の兆候が観察されるのみであり、GD18.5 時の病理組織像 [前年度報告書参照]と比較して影響が軽度であった。この結果は、P13 より児動物の摂餌を考慮して PTU の用量が半分になることにより、一部回復している可能性が考えられた。一方で児動物の甲状腺組織像は、10 ppm 投与群においても明らかな甲状腺機能低下状態の病理組織像を示した。このことから、本混餌系においては、児動物は胎児期に母体甲状腺機能低下に曝露され、かつ生後において甲状腺機能低下状態であることが示唆された。マウスが人に比べて未熟な状態で出生することを考慮すると妥当な実験系であると考えられるが、投与期間の調整を行った結果生じる影響もバックグラウンドデータとして取得しておいた方が良いかもしれない。

昨年度までに我々は、Syn-Rep マウスの有用性を検証するために様々な DNT 誘導物質に対するレポーター分子の発現応答性を検討しており、胎生期の曝露で脳の神経細胞数が減少するバルプロ酸投与モデルでは有意な低値を、母体免疫活性化を誘導するような系では有意な高値を示すことを明らかにしてきた[前年度報告書参照]。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、対照群と比較して生後直後は低値、その後高値となった。10 ppm 投与群の方が 250 ppm 投与群に比較して値の変動がマイルドであったことから用量依存性が確認され、対照群に比較して変動があったことから、神経系の構築に何らかの影響が生じている可能性が示唆された。具体的にどのような

因子がレポーター活性に影響しているかはさらなる解析が必要である。大脳皮質組織像の解析から、少なくとも P21 における大脳皮質の神経細胞数には影響していないと考えられたが、類似の投与条件 (250 ppm PTU を GD15-P25 まで飲水投与した 2-4 ヶ月齢 ICR マウス) において雄の多動といった行動異常が生じることが報告されている [Toxicol Rep. 6: 1031–1039 (2019)]。Syn-Rep マウスの *in vivo* イメージング解析は P16 までであったが、投与群で有意に高い値となっており、Syn-Rep マウスを活用することで組織像に現れないレベルの異常を検出することが可能である可能性が示唆された。しかし、行動異常とその時点におけるレポーター分子の発現変動との関係は不明瞭であることから、今後行動異常を示す月齢におけるレポーター分子の発現変動のデータを収集するとともに、さらに詳細な組織学的解析が必要であると考えている。

いくつかの報告において、甲状腺機能低下が炎症性サイトカインの発現上昇 [PLoS ONE. 9: e109753 (2014)、Mol Cell Endocrinol. 499:110594 (2020).など]や、ミクログリアの活性化 [Int J Mol Sci. 23: 11938 (2022)など]を誘導しうることを示されている。しかし、本研究の解析の範囲において、ミクログリア数の増加は観察されなかった。炎症性サイトカインに関しても、予備実験において組織内濃度の有意な上昇等は観察されなかった。このことから、おそらく今回検討した程度の周産期甲状腺機能低下状態においては、母胎免疫活性化とは異なった機構でレポーター分子の発現上昇が起こっている可能性が考えられた。

一方、もう一つの脳構成細胞であるアストロサイトに関しては、大脳皮質における陽性細胞割合の増加が観察された。この現象の解釈は、例えば、甲状腺ホルモン前駆体である T4 は血液脳関門を通過後、アストロサイトに取り込まれ、その内部で活性型甲状腺ホルモン T3 になるが、投与マウスでは脳内の甲状腺ホルモンが減少しているため、より多く

の変換を行うことを目的に存在量が増加している可能性が考えられる。また、特定の脳領域のアストロサイトの活性化によって多動につながり得ることも報告されていることから [Cell. 177(5): 1280-1292.e20. (2019)], 今後さらに多角的な解析を行う必要があると考えられた。

E. 結論

PTU 誘導性の甲状腺機能低下状態に曝露された児動物の解析により、出生後の体重増加の遅延、甲状腺機能低下様の甲状腺組織像に加え、Syn-Rep レポーター活性の対照群とは異なる挙動を観察することができた。また、投与マウスの児動物大脳皮質においては、脳構成細胞のうち、アストロサイト陽性細胞割合の増加が観察された。これらの結果により、Syn-Rep マウスを用いて甲状腺機能低下による次世代影響を評価できることが示唆された。しかし、実際にどのようなメカニズムで甲状腺機能低下によって起こる現象が生じているのかを明らかにする必要があり、今後は発達段階ごとの詳細な現象の解析を行うことで科学的基盤を構築する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomita S, Ishida K, **Matsumaru D**, Hiromori Y, Nagase H, **Nakanishi T (責任著者)**, Excretion and tissue distribution properties of PCB-126 for establishing a bioaccumulation model in mice, *BPB Reports* 7:7-13 (2024)
- 2) 石田 慶士, **松丸 大輔**, 中西 剛, 化学物質の脳発達への影響を発光で可視化. 光アライアンス 34, 15-18 (2023)

2. 学会発表

- 1) 糟谷 佐保里 他：妊娠期甲状腺機能低下による甲状腺関連パラメータの変動と胎仔発生への影響評価, 第 50 回日本毒性学会学術年会, 横浜市, 2023 年 6 月
- 2) 小泉 茉奈海 他：周産期甲状腺機能低

- 3) 下モデルを用いた甲状腺ホルモンの産仔脳発達への影響評価, 第 50 回日本毒性学会学術年会, 横浜市, 2023 年 6 月
- 4) 糟谷 佐保里 他：化学物質誘導性の母体甲状腺機能低下による甲状腺関連指標の変動と胎仔発生への影響評価, 第 63 回日本先天異常学会学術集会, つくば市, 2023 年 7 月
- 5) 小泉 茉奈海 他：周産期甲状腺機能低下モデルにおける甲状腺関連パラメータの変動と児動物脳発達との連関評価, フォーラム 2023：衛生薬学・環境トキシコロジー, 広島市, 2023 年 9 月
- 6) 辰巳 佳乃子 他：神経分化トレーサーマウスを用いた鉛による発達神経毒性の有害性発現経路に関する検討, メタルバイオサイエンス研究会 2023, 岐阜市, 2023 年 10 月
- 7) 糟谷 佐保里 他：化学物質誘導性の妊娠期甲状腺機能低下による甲状腺関連指標の変動と胎仔発生毒性の評価, 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 2023, 名古屋市, 2023 年 11 月
- 8) 辰巳 佳乃子 他：神経分化トレーサーマウスを用いた低用量域鉛曝露における発達神経毒性の有害性発現経路に関する検討, 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 2023, 名古屋市, 2023 年 11 月
- 9) 小泉 茉奈海 他：化学物質誘導性の周産期甲状腺機能低下による児の脳発達への影響評価, 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 2023, 名古屋市, 2023 年 11 月
- 10) **松丸 大輔** 他：甲状腺機能低下モデルにおける甲状腺関連パラメータの変動と次世代影響の連関評価, 日本薬学会第 144 年会, 横浜市, 2024 年 3 月
- 11) 長平 萌花 他：母体免疫活性化による神経発達影響の評価に資する神経分化トレーサーマウスの有用性, 日本薬学会第 144 年会, 横浜市, 2024 年 3 月

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

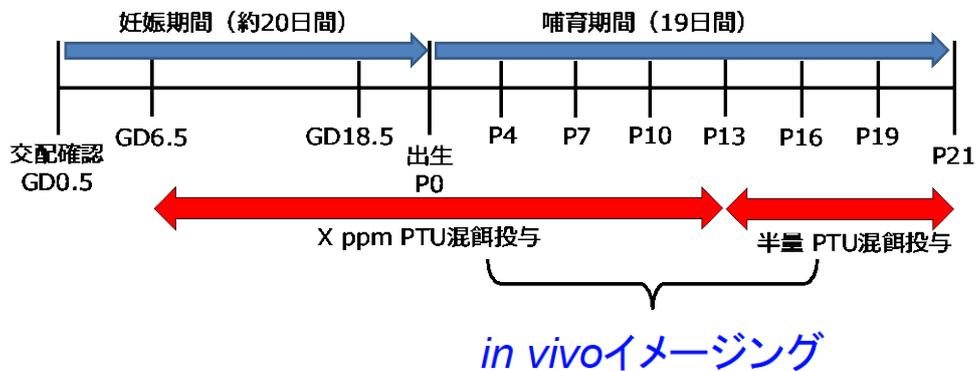
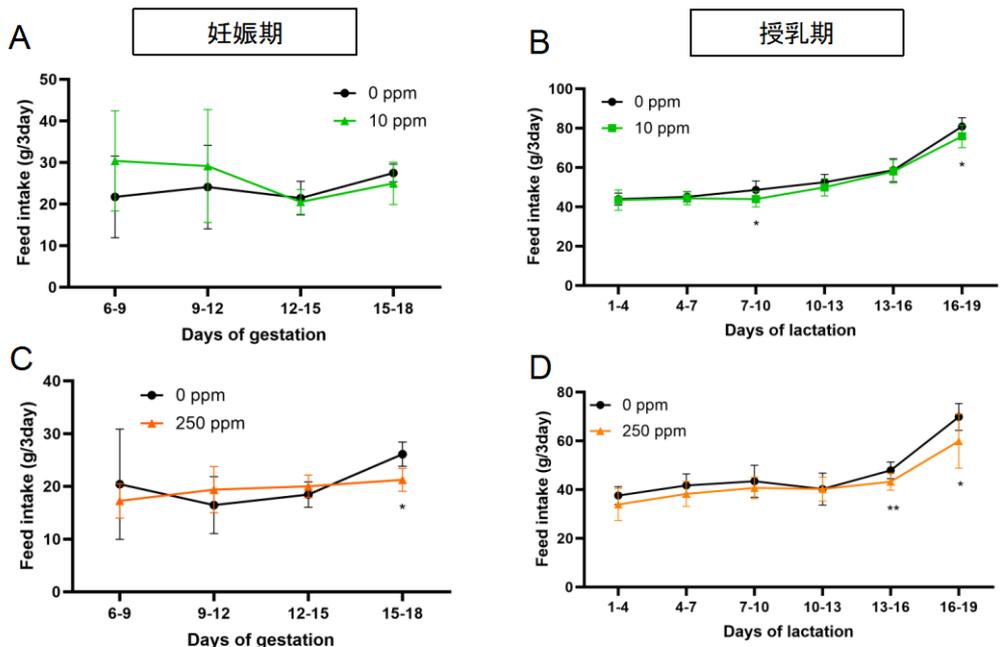


図1 PTU 混餌投与による甲状腺機能低下誘導モデルの作成

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。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および妊娠期の体重を3日ごとに測定した。児動物が P13 になるタイミングより混餌量を半量にした。児動物は3日ごとに *in vivo* イメージングを行った。解析した母動物の数は対照群：n=10、PTU 10 ppm 投与群：n=10、PTU 250 ppm 投与群：n=10 であった。

摂餌量



体重

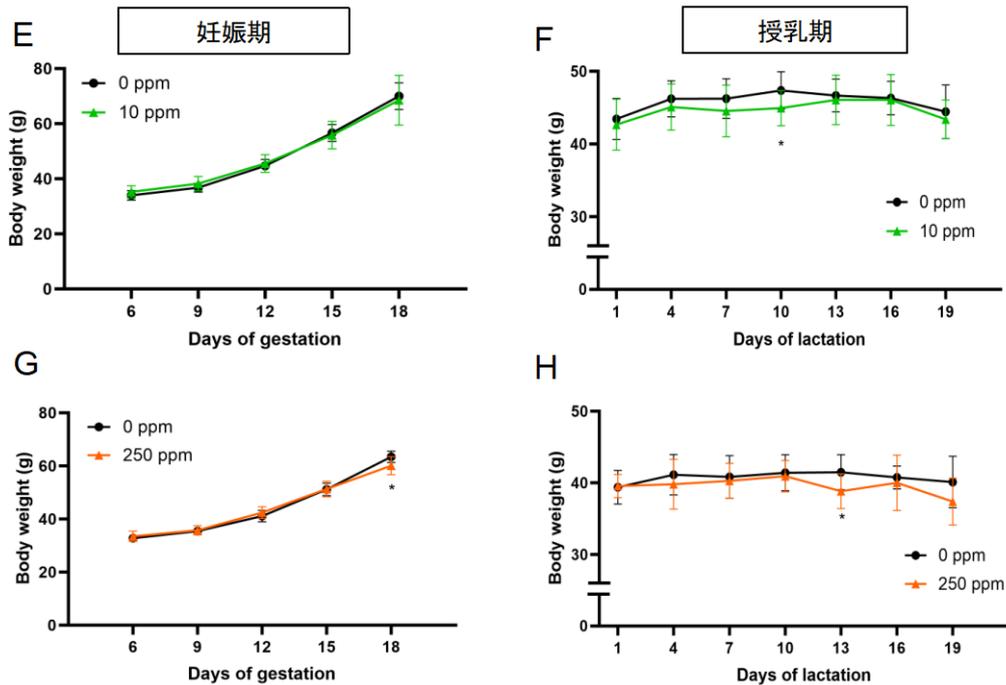
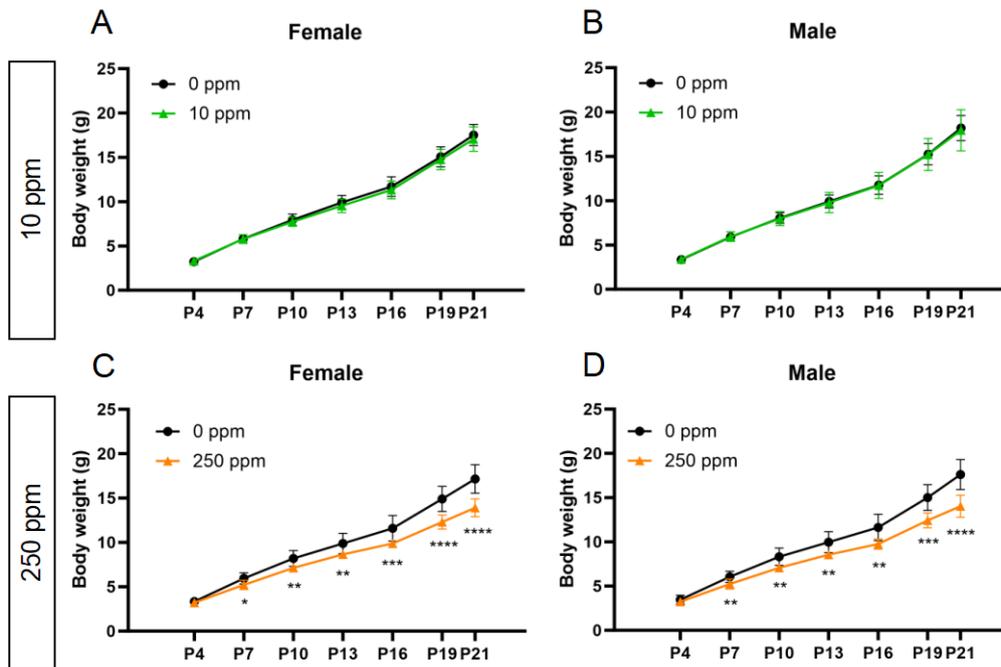


図2 PTU 誘導性甲状腺機能低下誘導モデル母動物の摂餌量・体重

10 ppm PTU 混餌投与母動物の妊娠期 (A)、授乳期 (B) における摂餌量。250 ppm PTU 混餌投与母動物の妊娠期 (C)、授乳期 (D) における摂餌量。10 ppm PTU 混餌投与母動物の妊娠期 (A)、授乳期 (B) における体重。250 ppm PTU 混餌投与母動物の妊娠期 (C)、授乳期 (D) における体重。データは mean ± SD で表し、比較検定は Student's t-test で行った。* $P < 0.05$ 、各群 $n=7-10$ 。

体重



レポーター活性

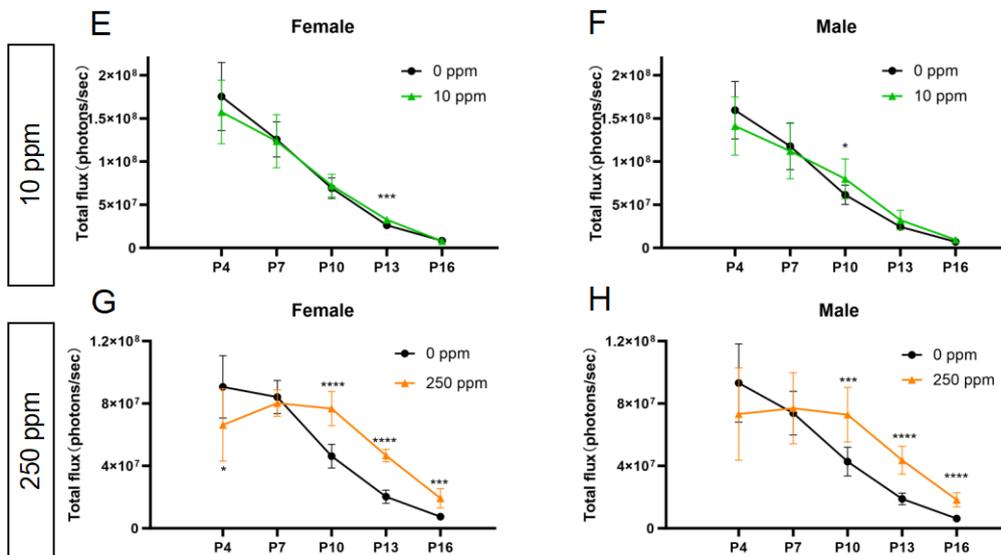


図3 PTU 誘導性甲状腺機能低下誘導モデル児動物の体重・Syn-Rep 活性

10 ppm PTU 混餌投与児動物雌性 (A)、雄性 (B) における体重変化。250 ppm PTU 混餌投与児動物雌性 (C)、雄性 (D) における体重変化。10 ppm PTU 混餌投与児動物雌性 (E)、雄性 (F) における Syn-Rep レポーター活性。250 ppm PTU 混餌投与児動物雌性 (G)、雄性 (H) における Syn-Rep レポーター活性。データは mean ± SD で表し、比較検定は Student's t-test で行った。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.001$ 、各群 $n = 10$ (腹平均)。

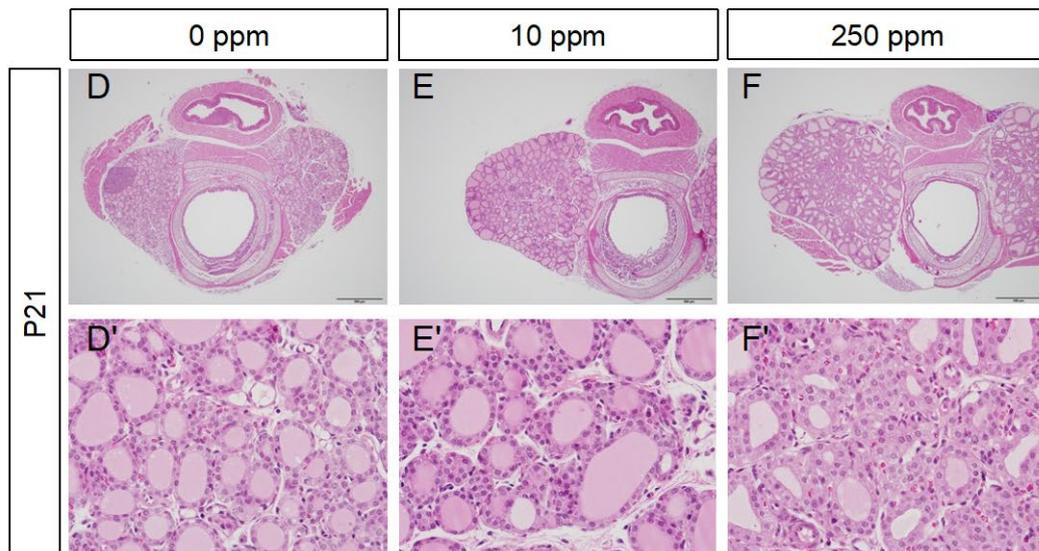
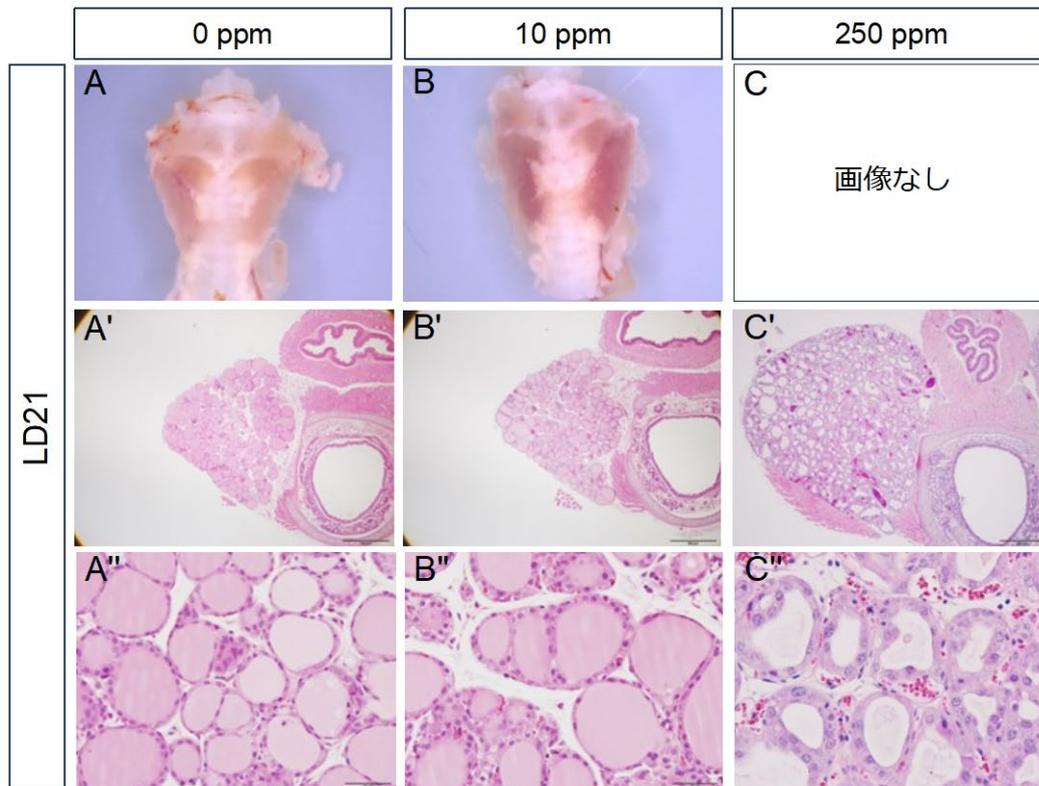


図4 PTU 混餌投与母動物および児動物の甲状腺組織像

対照群、10 ppm、250 ppm のPTU を混餌投与した母動物甲状腺の P21 における外観 (A, B)、HE 染色像 (A'-C', A''-C'')。対照群、10 ppm、250 ppm のPTU を混餌投与した児動物甲状腺の P21 における HE 染色像 (D-F, D'-F')。

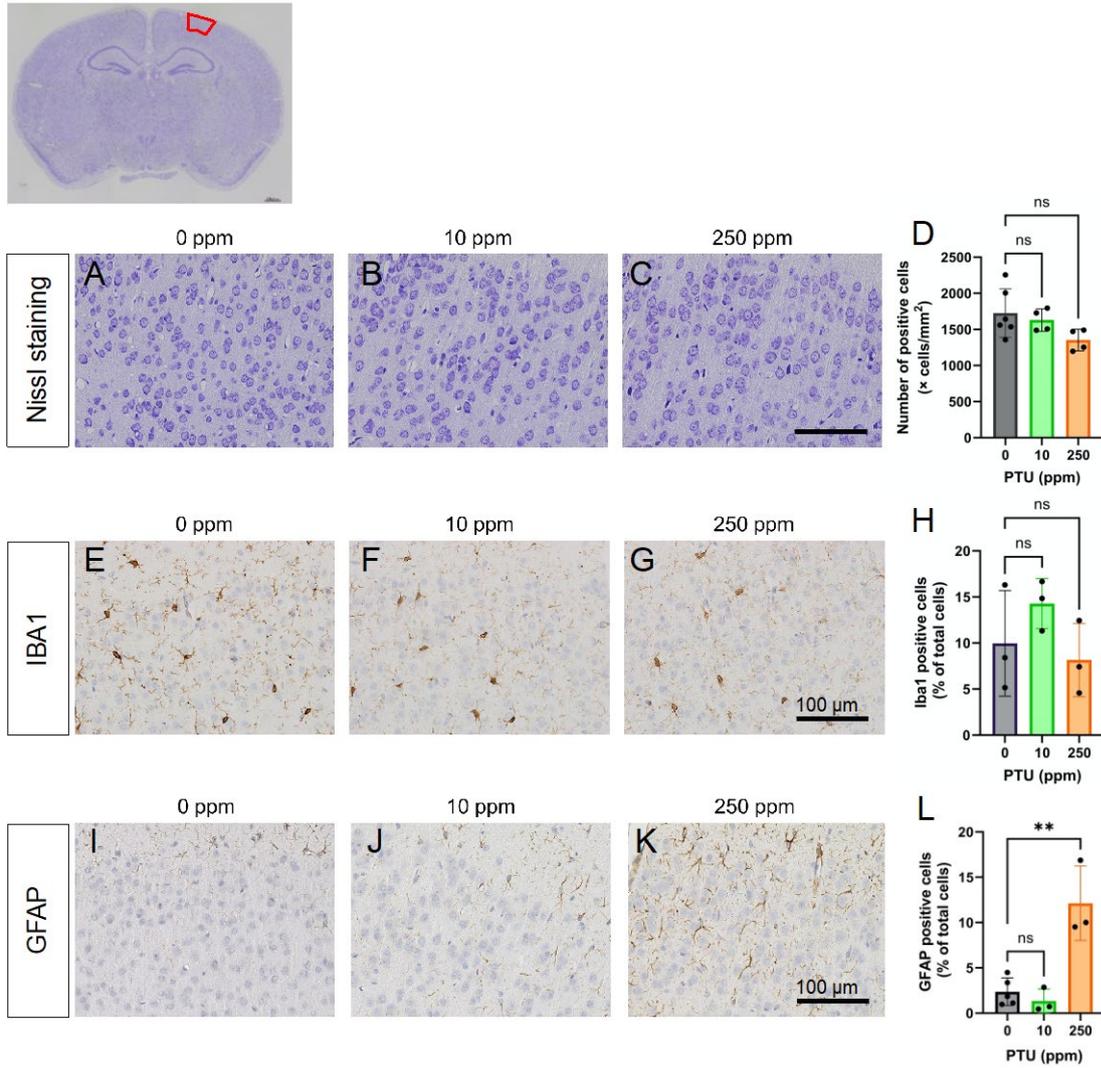


図5 PTU 混餌投与児動物の脳構成細胞の組織学的解析

対照群、10 ppm、250 ppm の PTU を混餌投与した P21 児動物大脳皮質（上図）における Nissl 染色像（A-C）、IBA1 免疫染色像（E-G）、GFAP 免疫染色像（I-K）と陽性細胞計数（D）、陽性細胞割合（H, L）。データは mean ± SD で表し、多重比較検定は Dunnett's multiple comparison test で行った。ns: not significant, ** $P < 0.01$ 。

令和5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 陽性対照化学物質の確立とその作用機構解明
～妊娠期～離乳期甲状腺機能低下によって誘導される児動物の行動異常の検討～
研究分担者：田熊 一徹（大阪大学 大学院歯学研究科・教授）

研究要旨

近年、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とから、甲状腺機能低下を誘導する化学物質の次世代影響が懸念されている。しかし甲状腺関連指標の変動と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多く取り残されている。本分担研究では、妊娠期～離乳期の甲状腺機能低下によって児動物にもたらされる発達神経毒性（DNT）を情動行動異常の発現を指標として評価するとともに、その異常行動発現の病態基盤となりうる神経組織学的な変化の検出を試みた。甲状腺機能低下を惹起する抗甲状腺薬プロピルチオウラシル（PTU）を用いて、OECD ガイドライン試験の DNT 試験（TG426）に準じて児動物の行動解析を行ったところ、PTU を 10 あるいは 250 ppm で摂餌させた群の雄性の児において、4 週齢以降にオープンフィールド試験での自発運動量の増大を認めた。また、10 ppm PTU 摂餌群で 4 週齢時に雄性児動物で新奇動物への匂い嗅ぎ行動の増加を認めた。さらに、250 ppm PTU 摂餌群で 8 週齢時に内側前頭前皮質（mPFC）において樹状突起スパイン数の増加を認めた。すなわち、妊娠期～離乳期の甲状腺機能低下によって児動物の脳で組織解剖学的な変化が生じること、多動と社会性異常という情動行動異常が惹起される可能性を示した。

A. 研究目的

妊娠初期におけるヒト胎児では母体由来の甲状腺ホルモンに依存していることから、妊娠期における母体の甲状腺機能低下は、妊娠中および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。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今なお賛否が分かれているが、児の脳の発達については、大規模疫学調査から妊娠期における甲状腺機能低下と IQ 低下との間に相関が認められている。このような背景のもと、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。しかしながら、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（DNT）との関連についての詳細は不明であり、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多く

取り残されている。なかでも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ことが問題となる。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、この問題をクリアーし、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。

既に先天性甲状腺機能低下症の症例や、甲状腺ホルモン受容体（TR） α 、及び β の欠損マウス等の遺伝子改変動物の表現型から、甲状腺ホルモンシグナルの欠失が様々な次世代影響を与えることはよく知られているが、ここで要求されるのは遺伝子欠損といった極端な状態の影響ではなく、化学物質で現実的に誘導される軽度の甲状腺機能低下状態における影響のデータである。これまで甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤等を用いた甲状腺機能低下モデルにおける検討が報告され

ているが、マウスにおけるモデルについては情報が極めて乏しかった。このような背景から、昨年度までに研究代表者の中西らならびに研究分担者の松丸らは、マウスを用いてPTUによる甲状腺機能低下モデルの作製を試みてきた。その結果、周産期のPTU混餌投与で、母動物に対し用量依存的な甲状腺機能低下状態を誘導できることを見出した。

そこで本分担研究では、母動物の甲状腺関連指標に影響が認められ始めるPTUの閾値用量(10 ppm)と、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)の低下が認められる典型的用量(250 ppm)を用いて、DNTの最終評価である児動物の情動行動変化の評価をおこなった。また情動行動変化をもたらす発現分子基盤を追究する目的で、脳の組織学的解析を行った。

B. 研究方法

1. 動物

実験には妊娠雌性および雄性のICR系マウスを日本エスエルシー(株)より購入して用いた。動物実験の実施に関しては、大阪大学において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

被験物質の投与は、DNT試験(OECD TG426)に準じて行った。PTU(Sigma-Aldrich)は、AIN-93M調整食(Research Diets)に10あるいは250 ppmとなるように混餌し、妊娠6日目から出生後13日目まで自由摂餌により母動物に与えた。児動物が13~21日齢の

間は混餌するPTUを半用量(5あるいは125 ppm)に変更して与えた。

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. 行動薬理学的解析

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

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 × 22 × 20 cm)内で60分馴化させた後、異なるケージで飼育した同性同系統かつ体重が同程度の侵入マウス(intruderマウス)を入れ、被験マウスの侵入マウスに対する行動を観察した。嗅覚行動(face sniff および anogenital sniff)、毛づくろい行動(上体を起こし前肢あるいは鼻を侵入マウスに接触させる行動)、ならびに攻撃行動(biting、pushing

under、sideways posturing および aggressive grooming) を社会性行動の指標として、各行動の総時間を計測した。行動試験はいずれも明期 (8:00~20:00) に行った。

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。

4 血清中および脳組織中の T4 濃度測定

T4 量は、離乳時の母マウスおよび間引きにより余剰とした仔マウスより血清標品および脳組織ホモジネート標品を調製し、Thyroxin Competitive ELISA Kit (Invitrogen) を用いて定量した。

5 組織学的解析

脳の組織形態学的変化は、行動解析後のマウスより脳組織を採取し、FD Rapid GolgiStain™ Kit (FD NeuroTechnologies) を用いて染色し、内側前頭前皮質 (mPFC) における樹状突起スパイン数を計数した。

6. 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 Prism10 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. PTUを10 ppmで摂餌させた母マウス由来の雄性児動物の行動変化

10 ppm PTU摂餌群の雄性児動物では、対照群と比べて、オープンフィールド試験における自発運動量が幼若期 (4週齢) より成体期 (8週齢) にかけて増加していた (図1, 2)。また、本児動物では、幼若期 (4週齢) に社会性相互作用試験における匂い嗅ぎ行動が増大していた (図3)。一方、8週齢時に行った Y 字型迷路試験では、10 ppm PTU摂餌群で総アーム進入回数の低下が見られたが、自発的交替行動について両群間に差異は認められなかった (図4)。

2. PTUを250 ppmで摂餌させた母マウス由来の雄性児動物の行動変化と神経解剖学的変化

250 ppm 投与群においても、対照群と比べて、オープンフィールド試験における自発運動量が幼若期 (4週齢) より成体期 (8週齢) にかけて増加していた (図5, 6)。自発運動量の日内変動解析においても、250 ppm 投与群の自発運動量の増加が明期に生じていることを認めた (図7)。一方、社会性相互作用試験における匂い嗅ぎ行動は幼若期 (4週齢) および成体期 (8週齢) とともに両群間に差異は認められなかった (図8)。

行動解析後の児動物の脳について、Golgi 染色による組織学的解析を行ったところ、250 ppm 投与群の mPFC 領域で樹状突起スパイン数が増加していることを認めた (図9)。

3. PTUを250 ppmで摂餌させた母マウスおよびその雄性児動物のT4量の変化

250 ppm 投与群の母動物では、児動物離乳時の血清 T4 濃度が低下していた (図 10A)。児動物については、生後 4 日齢の脳では検出限界以下であり、行動解析後 (9 週齢) の血清 T4 濃度においては 250 ppm 投与群と対照群に差異は認められなかった (図 10B)。

D. 考察

本分担研究では、妊娠期から離乳期にかけて母マウスに 10 あるいは 250 ppm PTU を含む摂餌をさせることにより、雄性児動物において離乳後早期より自発運動と匂い嗅ぎ行動の増加という情動行動異常を惹起することを見いだした。また、自発運動の増加については成育後も継続していることを認めた。また、250 ppm 投与群において、離乳時に母体血清中の T4 レベルが低下していることを確認し、さらに成体期の雄性児動物において mPFC 領域の樹状突起スパイン数が増加していることを示した。これらの成績を考え合わせると、妊娠期から離乳期の母マウスの甲状腺機能低下は、雄性児動物において脳器質障害をもたらす、異常行動を発現させる可能性が示唆された。

本分担研究では、10 ppm 投与による母体の甲状腺機能への影響は極めて小さいと予測したため、母体血清中の T4 レベルの測定は実施しなかった。しかし今回のデータは、PTU によって誘導される甲状腺機能低下において、母動物の甲状腺関連指標に変動が認められる閾値付近の用量においても、雄性児動物に情動行動異常が生じる可能性を示唆するものである。今後は、母体および児動物の甲状腺関連指標の詳細について検討する必要があると考えている。

また、脳組織学的解析については、250 ppm 投与群において mPFC 領域の樹状突起スパイン数の計数に留まった。多動と社会性行動変化が発現していることより、各用量群友に少なくとも体性感覚野、運動野および海馬領域を対象に加えて詳細な脳組織学的解析を実施する必要がある。さらに、ヒトの発達障害では男児の発現率が高い。したがって、今後はヒトとの相関を検証するためにも、PTU 誘発異常行動発現の性差についても検討を行う必要があると考えている。

E. 結論

妊娠期から授乳期の母体の甲状腺機能低下が、雄性児動物で離乳後早期より成育後ま

で継続する情動行動異常を惹起することを見いだした。この異常行動の発現に神経ネットワークの構成異常という脳器質障害が関与する可能性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwahashi M, Yoshimura T, Harigai W, **Takuma K**, Hashimoto H, Katayama T, Hayata-Takano A, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice show length abnormalities of the axon initial segment, *J Pharmacol Sci* 153:175–182 (2023)

2. 学会発表

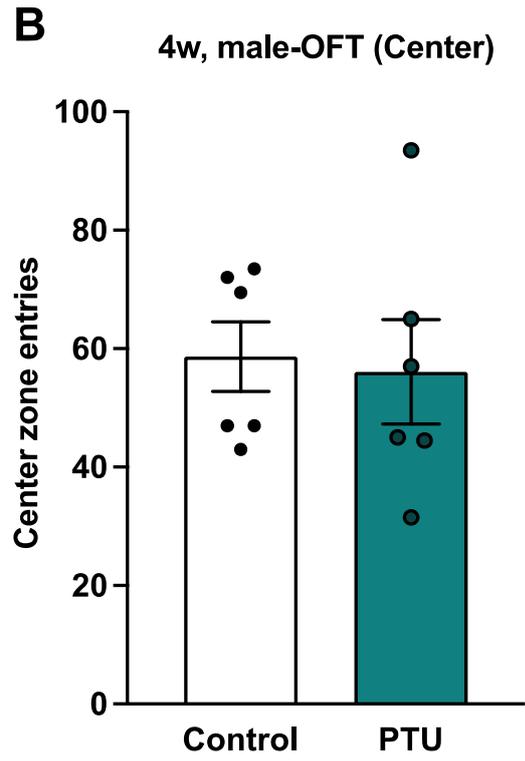
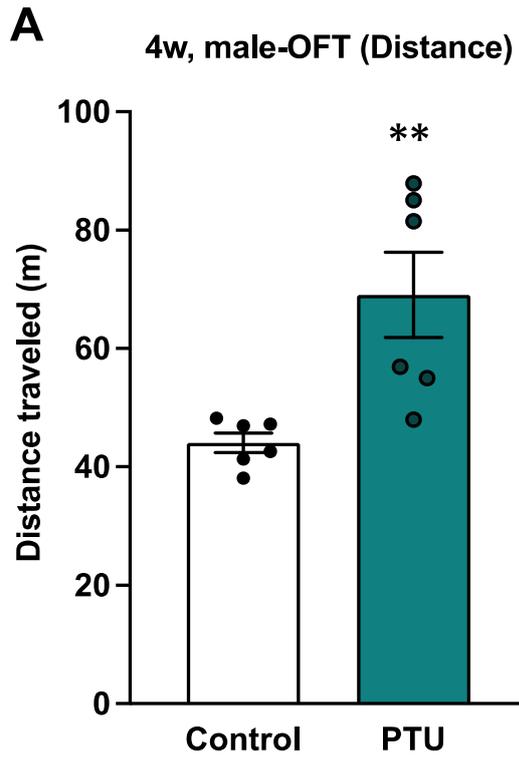
- 1) 田原 孟 他：抗てんかん薬バルプロ酸の胎生期曝露は中枢性感作に伴う持続的な痛覚過敏とアロディニアを引き起こす, フォーラム 2023 衛生薬学・環境トキシコロジー, 広島, 2023 年 9 月
- 2) Takemoto T, et al. : Oxytocin restores abnormal social behavior in a mouse model of 3q29 microdeletion, *Neuroscience 2023* (The 52nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience), Washington, D.C., USA, 2023 年 11 月
- 3) 張替 若菜 他：PACAP KO マウスの多動性と軸索起始部の形態に対する ADHD 治療薬の影響, 第 66 回日本神経化学会大会, 神戸, 2023 年 7 月
- 4) 村田 拳一郎 他：胎生期 PGD2-DP1 シグナル活性化はマウスの自閉症様の精神行動異常を引き起こす, 第 50 回日本脳科学会, 大阪, 2023 年 12 月
- 5) 竹下 黎 他：内側前頭前皮質における PACAP-PAC1 シグナルの遮断が反復社会的敗北ストレスマウスに与える影響, 第 97 回日本薬理学会年会, 神戸, 2023 年 12 月
- 6) 金子皓 他：非定型抗精神病薬クロザピンの認知機能障害改善作用における結合組織成長因子の関与, 第 97 回日本

- 薬理学会年会，神戸，2023年12月
- 7) 岩橋 美咲 他：注意欠如・多動症 (ADHD)様行動を示すマウスにおいてみられた神経軸索起始部の異常はADHD 治療薬によって行動異常の回復と共に回復する，第97回日本薬理学会年会，神戸，2023年12月
- 8) 吾郷 由希夫 他：バルプロ酸の胎内曝露は中枢性感作と痛覚感受性の増大を引き起こす，第44回日本臨床薬理学会

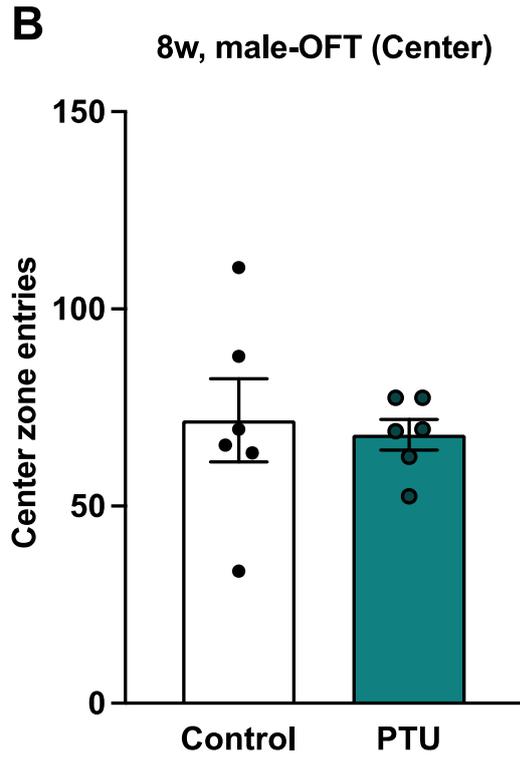
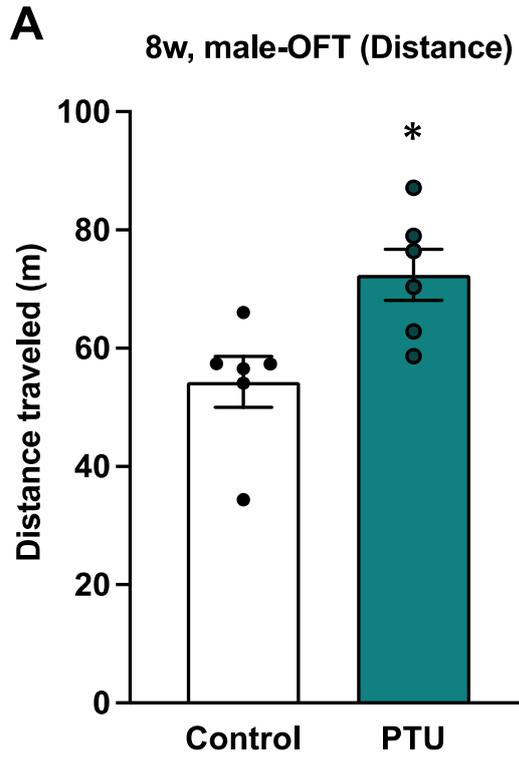
- 学術総会，神戸，2023年12月
- 9) 田原 孟 他：自閉スペクトラム症モデルマウスの痛覚異常と社会性行動障害におけるTRPV1の役割，日本薬学会第144年会，横浜，2024年3月

G. 知的財産権の出願・登録状況

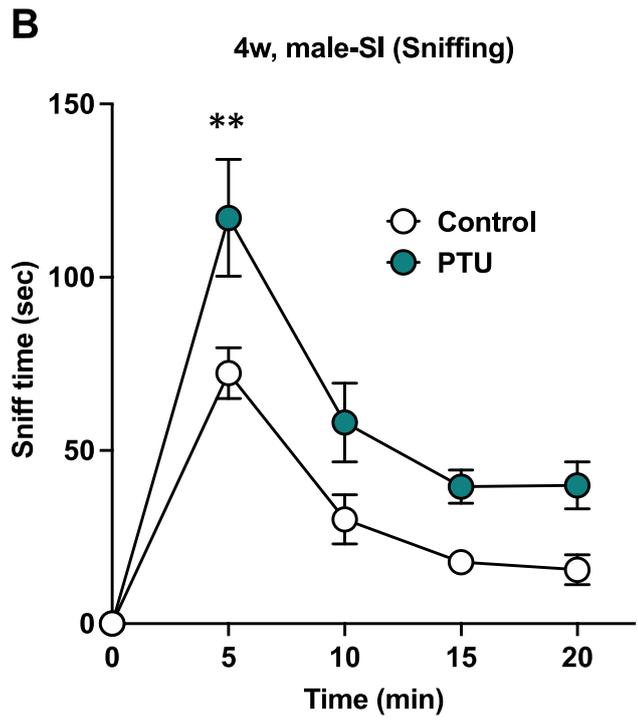
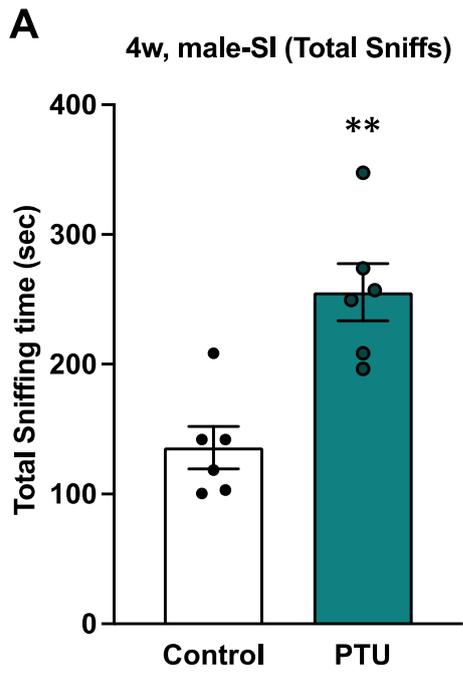
該当なし



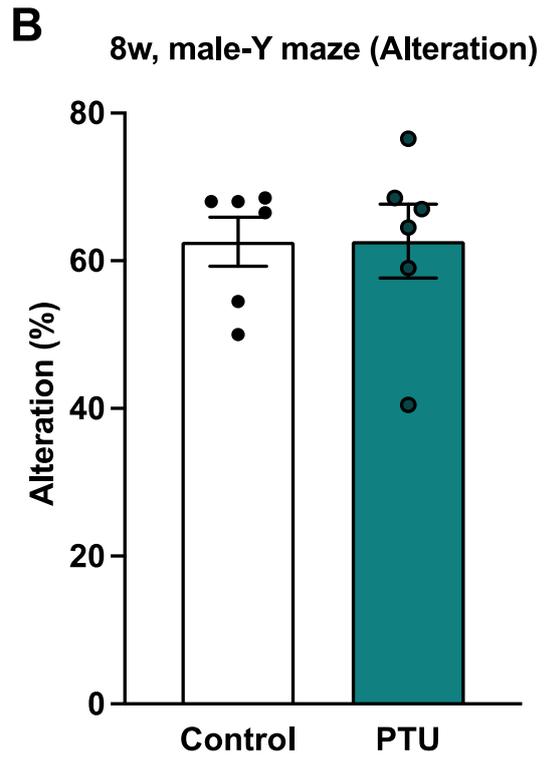
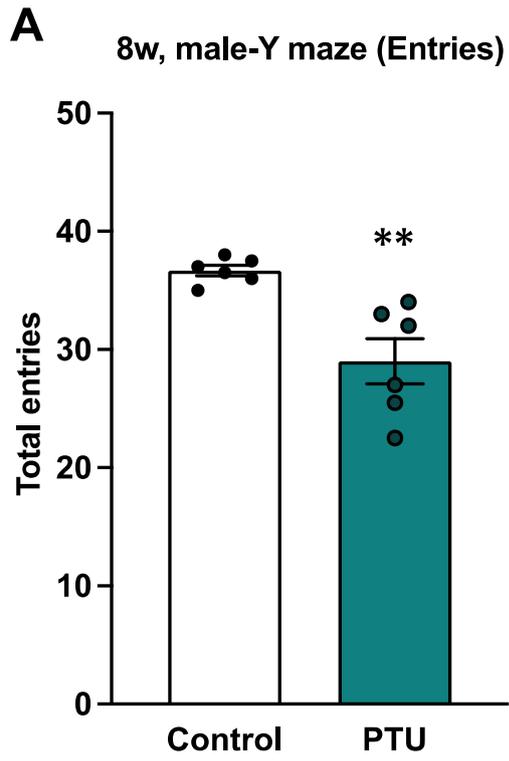
☒ 1



☒ 2

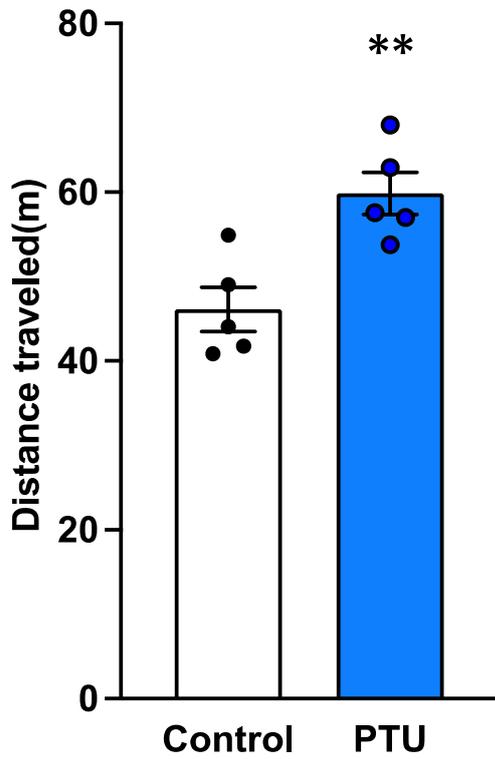


☒ 3

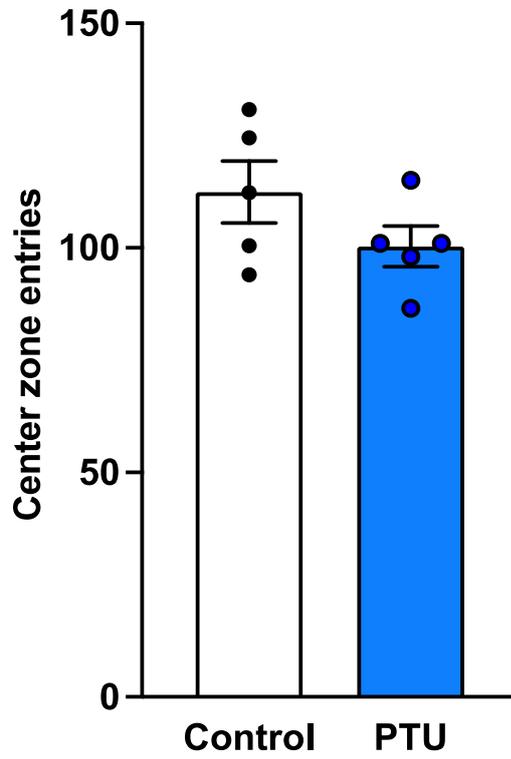


☒ 4

A 4w, male-OFT (Distance)

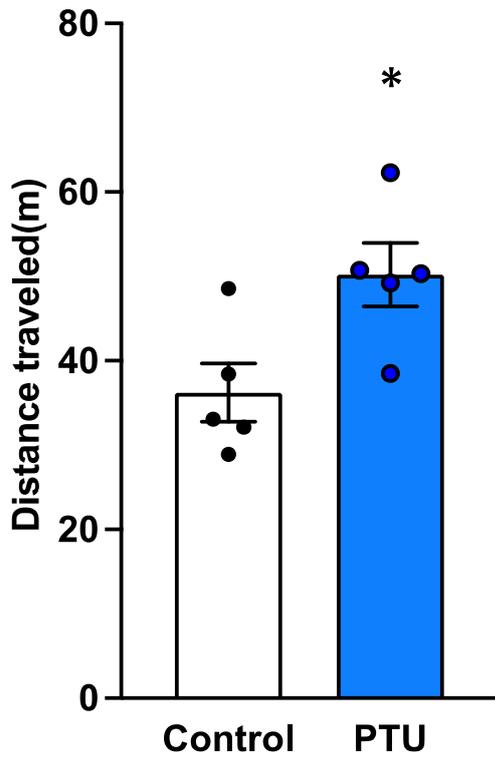


B 4w, male-OFT (Center)



☒ 5

A 8w, male-OFT (Distance)



B 8w, male-OFT (Center)

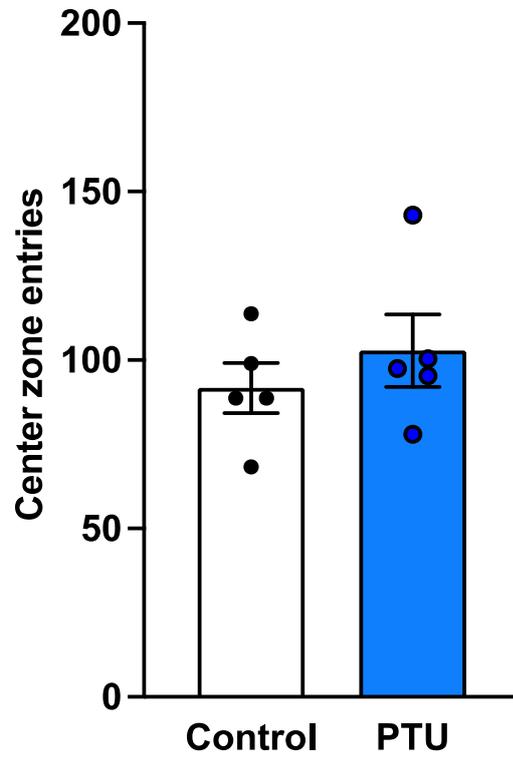
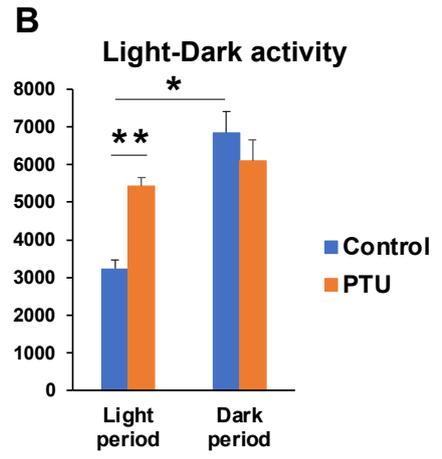
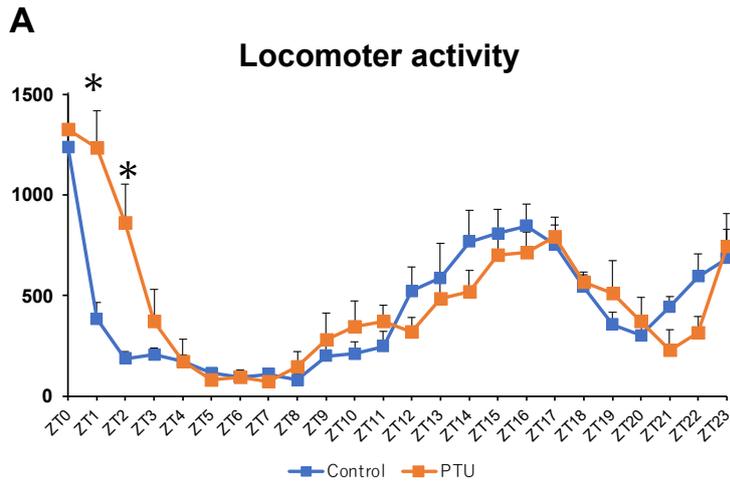
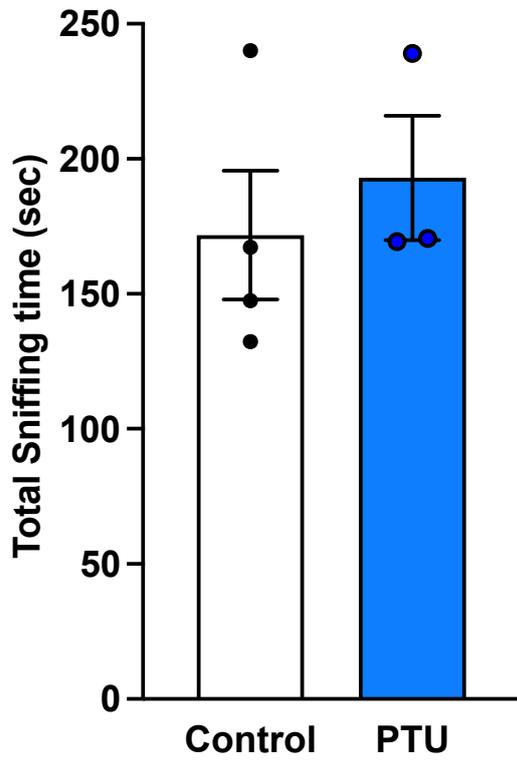


Figure 6

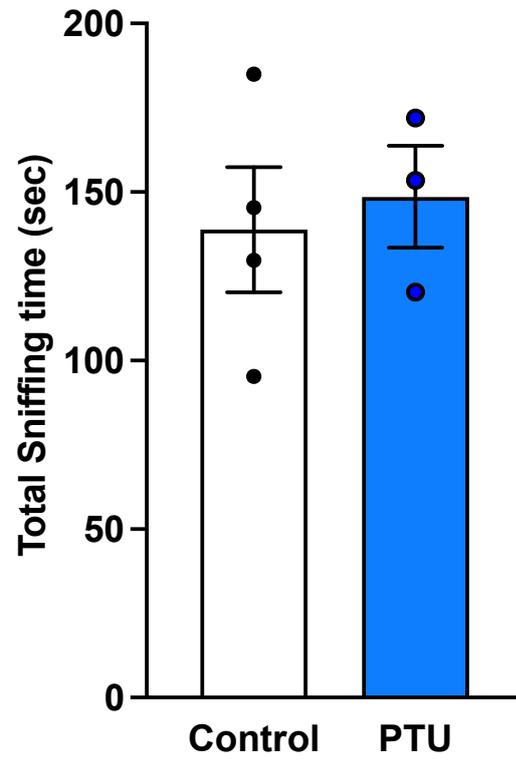


☒ 7

A 4w, male-SI (Total Sniffs)

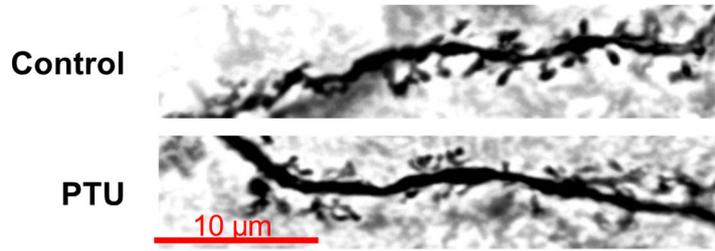


B 8w, male-SI (Total Sniffs)



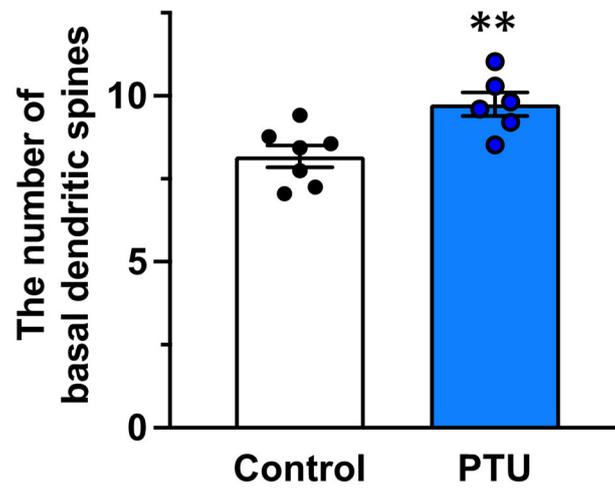
8

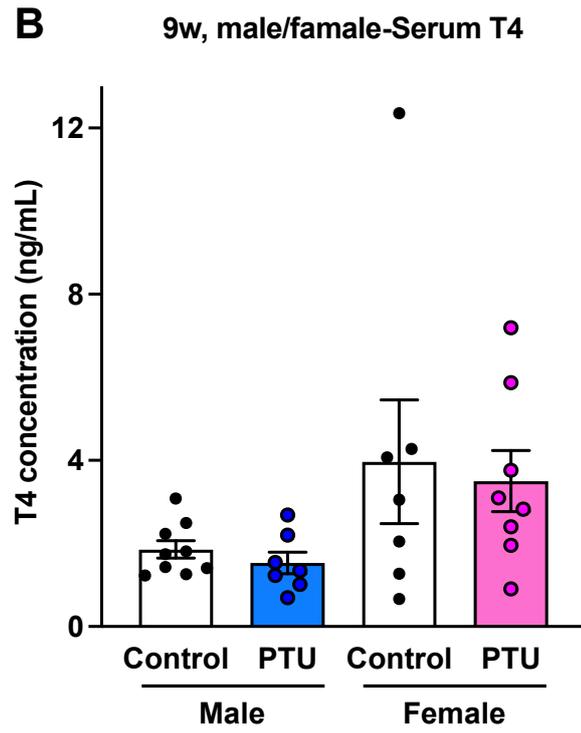
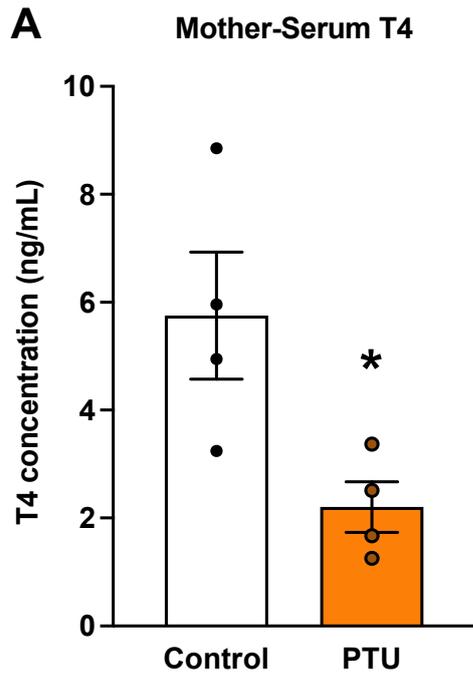
A



B

9w, male-Golgi staining





☒ 10

令和5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、OECDのテスト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。前年度までにヒトiPS細胞を用いて甲状腺ホルモン受容体（THR） α のノックダウンを行い、甲状腺機能低下モデルを作製するとともに、農薬のクロルピリホス（CPF）や医薬品のバルプロ酸（VPA）の曝露による神経分化阻害が、THR α のノックダウンにより亢進することを見出した。またTHR α ノックダウン細胞を用いて次世代シーケンス解析（NGS解析）を行った結果、THR α 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のスクリーニングを行った。今年度は、NGS解析の結果を基に神経分化に関与する遺伝子としてFactor Xの同定に成功した。化学物質を曝露した甲状腺機能低下モデル細胞では、コントロール細胞に比べて神経分化時のFactor X発現がより低下することから、Factor Xはヒト発達期の神経毒性の評価マーカーになる可能性が考えられる。以上の結果より、本モデルを用いて甲状腺機能低下時の化合物曝露の影響を評価できる可能性が示唆された。

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]、OECDテストガイドラインでも発生毒性試験やその他の試験で動物（発生毒性試験においては母動物）の甲状腺ホルモン及び甲状腺刺激ホルモンの定量的評価を追加する等の措置が取られた。

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

最近、3Rs原則の促進の国際的な動向として、New Approach Methodologies（NAMs）によって毒性評価を変革しようとする動き

が盛んである。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、化合物の神経毒性評価に有用であると期待されており、甲状腺機能低下症に認められる化合物の影響評価にも応用できる可能性がある。特に、*in vitro*で甲状腺機能低下の影響を評価できるアッセイ系を開発し、メカニズムベースに機能解析できることが必要である。

このような背景から、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。前年度までにヒトiPS細胞を用いて甲状腺ホルモン受容体THR α のノックダウンを行い、甲状腺機能低下モデルを作製するとともに、DNT陽性対照物質である農薬クロルピリホス（CPF）や医薬品バルプロ酸（VPA）の曝露により、神経分化阻害がTHR α のノックダウンにより亢進することを見出した。またTHR α ノックダウン細胞を用いて次世代シーケンス解析（NGS解析）を行った結果、THR α 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のスクリーニングを行ってきた。今年度は、NGS解析の結果を基に神経分化に関与する遺伝子としてFactor Xの同定の同定を試みるとともに、CPFおよびVPAによる神経分化阻害におけるFactor Xの関与について検証を行った。

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. 神経 (外胚葉) 分化

神経分化は Dual smad 阻害法 [Chambers et al., *Nat. Biotechnol.*, 2009] に従って実施した。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 日間培養することにより、外胚葉へと分化誘導した。

3. 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。

4. 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。3 日後に選別された細胞から RNA を回収して qPCR を行ったところ、scramble control を導入した細胞に比べて約 93% の THR α ノックダウンが認められた。

5. NGS 解析

THR α ノックダウンした細胞 (外胚葉) より RNA 抽出を行い、NGS 解析を行った。scramble control を導入した細胞と比較して、

THR α 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 α の下流で神経分化に関わる分子の NGS 解析

THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞を神経分化したところ、scramble shRNA を導入した細胞と比べて分化マーカー PAX6 の発現が約 30% 減少することを見出した。従って、THR α は神経分化に関与することが示唆された。

次に、NGS 解析により、THR α の下流で神経分化に関わる遺伝子の探索を試みた。THR α ノックダウン細胞で発現が低下する遺伝子をスクリーニングした結果、神経分化に関わる Factor A, B (図 1)、軸索伸展に関わる Factor C (図 2)、D (図 3)、神経分化や薬剤抵抗性に関わる Factor X 遺伝子を同定した (図 4)。

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

THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞に DNT 陽性対照物質である CPF を曝露 (10 μ M) し、神経分化能に対する影響を調べた。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞を神経系に分化誘導する際に CPF を曝露したところ、分化マーカー PAX6 の発現はわずかに減少した (図 5)。一方、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に CPF を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて PAX6 発現が約 50% 抑制された (図 5)。

そこで、THR α の下流因子について検討した。すでにスクリーニングした因子の中から、Factor X の発現について調べた。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞の神経分化時に CPF を曝露しても Factor X の発現はほとんど変化しなかった (図 6)。一方、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に CPF を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて Factor X 発現が約 40% 抑

制された (図 6)。

以上の結果から、Factor X は CPF の神経毒性に関与していることが示唆された。

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

次に、DNT 陽性対照物質である VPA についても同様に神経分化能に対する影響を検討した。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞の神経分化時に VPA を曝露したところ、分化マーカーである PAX6 の発現はわずかに減少した (図 7)。一方、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に VPA を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて PAX6 発現が約 60%抑制された (図 7)。また THR α の下流因子として同定した Factor X の発現についても調べた。その結果、scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞の神経分化時に VPA を曝露しても Factor X の発現はほとんど変化が認められなかった (図 8)。非常に興味深いことに、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に VPA を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて Factor X 発現が約 30%抑制された (図 10)。したがって、Factor X は VPA の神経毒性に関与することが示唆された。

以上の結果より、NGS 解析で同定した Factor X は発達神経毒性の評価マーカーとして有用である可能性が考えられる。

D. 考察

THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞を用いて NGS 解析を行った結果、THR α の下流で働く神経分化因子として Factor X の同定に成功した。さらに上記の化合物に対する応答性を調べたところ、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞における Factor X の発現は、コントロール細胞より低下する傾向が認められた。Factor X に関しては原著論文にまとめる必要があるため、この報告書では詳細な情報を記載できない。少なくとも PAX6 の下流で作用するシグナル分子であり、ヒト ES 細胞由来神経系細胞において機能を有す

ることが報告されている。しかしながら、FactorX による神経分化機構のメカニズムはいまだ不明であるため、今後、さらに詳細に検討する必要がある。

in vitro と *in vivo* を比較検討する観点から、動物でも同様に FactorX を介する機構が働いているのかは重要である。FactorX のノックアウトマウスの解析結果ではどのようなフェノタイプが報告されているのかなど興味深い。さらに、Syn-Rep マウスの NGS データと照合することにより、詳細な機能が明らかになることが期待される。さらに、化学物質の体内動態などの情報を考慮して、ハザードの特定からリスク評価に展開できるのか検討する必要がある。

最近、ヒト iPS 細胞にはプライム型とナイーブ型がありエピゲノム状態などによる株間差も明らかになってきており、神経分化機構や神経分化プロトコルに株間差があることが知られている。本評価手法においても、ヒト iPS 細胞の株間差を最小化できるようなプロトコルやエンドポイントを設定する必要がある。

今後は、発生毒性や神経毒性が懸念されている他のカテゴリーの化学物質、たとえば金属などを追加して、評価法の適用範囲や chemical spaceなどを明らかにする必要がある。これにより本モデルの有用性を明らかにすることが期待される。

E. 結論

甲状腺ホルモン受容体 THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞を用いて、神経分化をエンドポイントとした評価系により、甲状腺機能低下時における化合物の発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

1. 安彦 行人 他：化学構造に基づくク

- ラストリングと MEA 実験の統合的手法による化学物質発達神経毒性の評価、第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月 21 日
2. 山田 茂 他：ヒト iPS 細胞由来神経細胞における解離性麻酔剤の神経毒性評価、第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月 21 日
 3. **諫田 泰成**：ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性ガイドランスと今後の展望、第 63 回日本先天異常学会学術集会シンポジウム、2023 年 7 月 28 日、つくば
 4. **諫田 泰成**：化学物質の発達神経毒性評価と甲状腺影響評価の取り組み、日本動物実験代替法学会、千葉、2023 年 11 月 29 日
 5. 安彦 行人 他：ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイシステムによるフルオキセチンの神経毒性評価、第 97 回日本薬理学会年会、神戸、2023 年 12 月 14 日
 6. 山田 茂 他：ヒト iPS 細胞由来神経細胞による解離性麻酔剤の神経毒性評価、第 97 回日本薬理学会年会、神戸、2023 年 12 月 15 日
 7. **諫田 泰成**：甲状腺ホルモンを介した発達神経毒性の評価、日本薬学会第 144 回年会、横浜、2024 年 3 月 29 日
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
該当なし

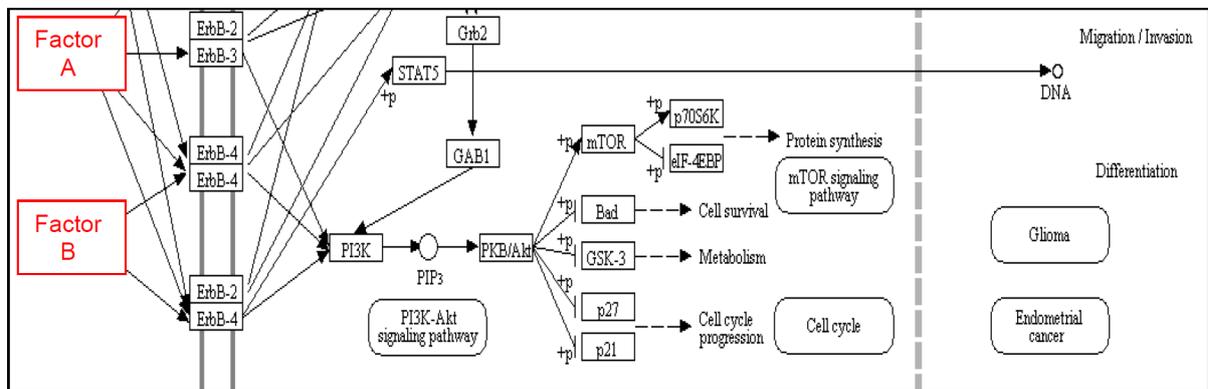


図1 THR α ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS解析）

神経生存維持パスウェイ上にある Factor A, B がスクリーニングされた。

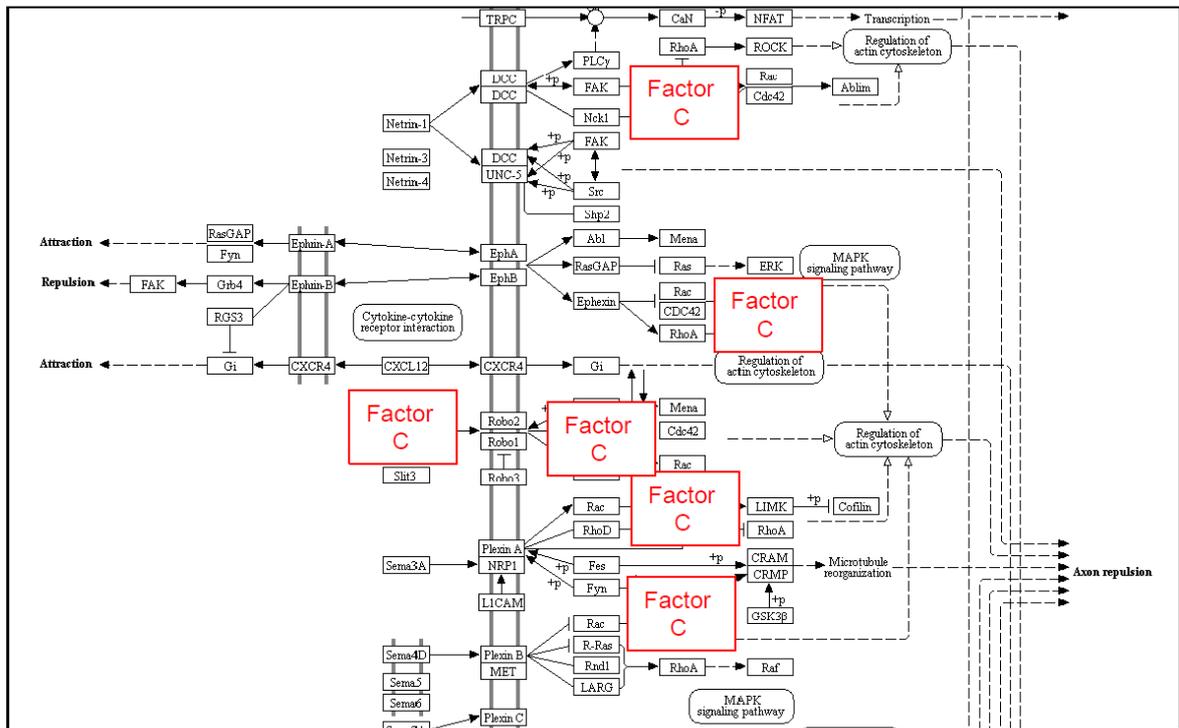


図2 THRαノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS解析）

軸索伸展パスウェイ上にある Factor C がスクリーニングされた。

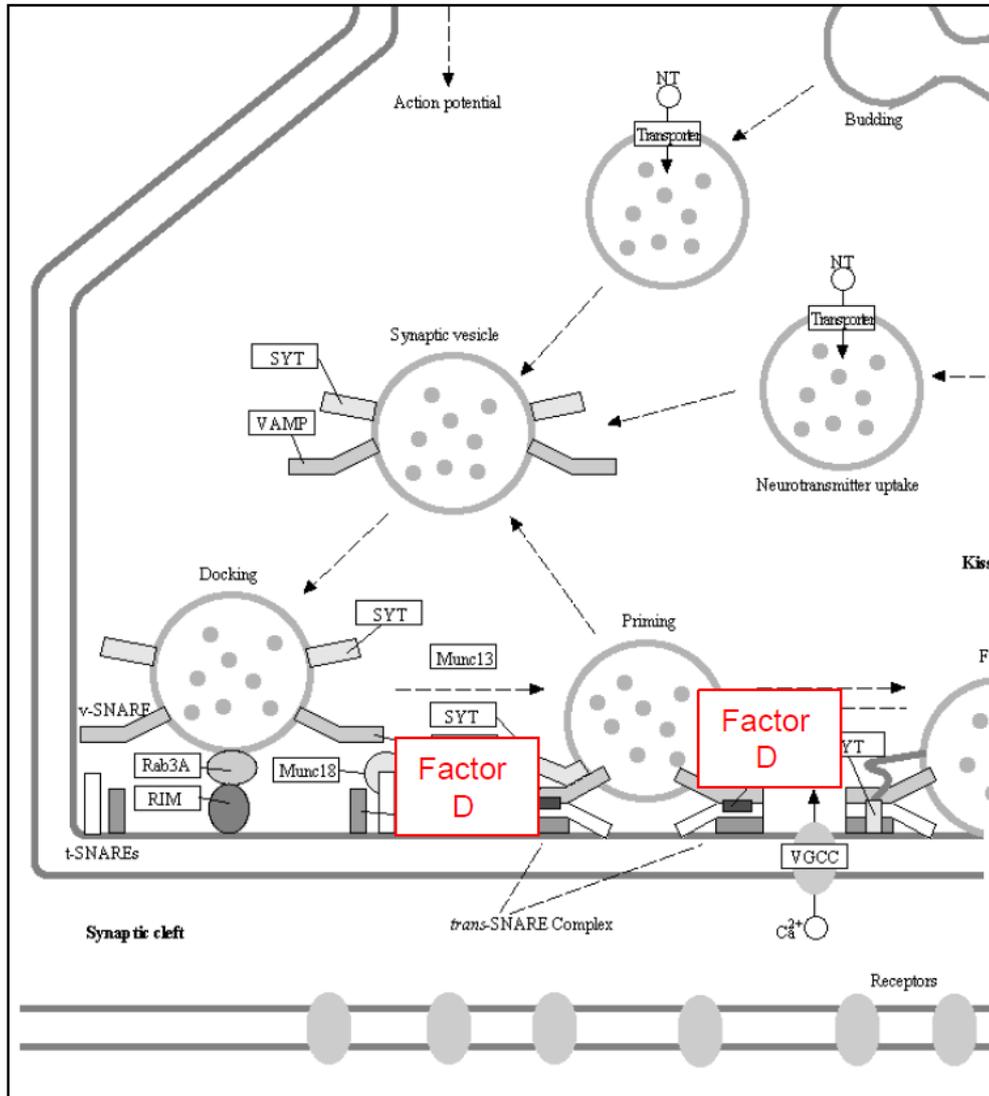


図3 $THR\alpha$ ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS解析）

軸索伸展パスウェイ上にある Factor D がスクリーニングされた。

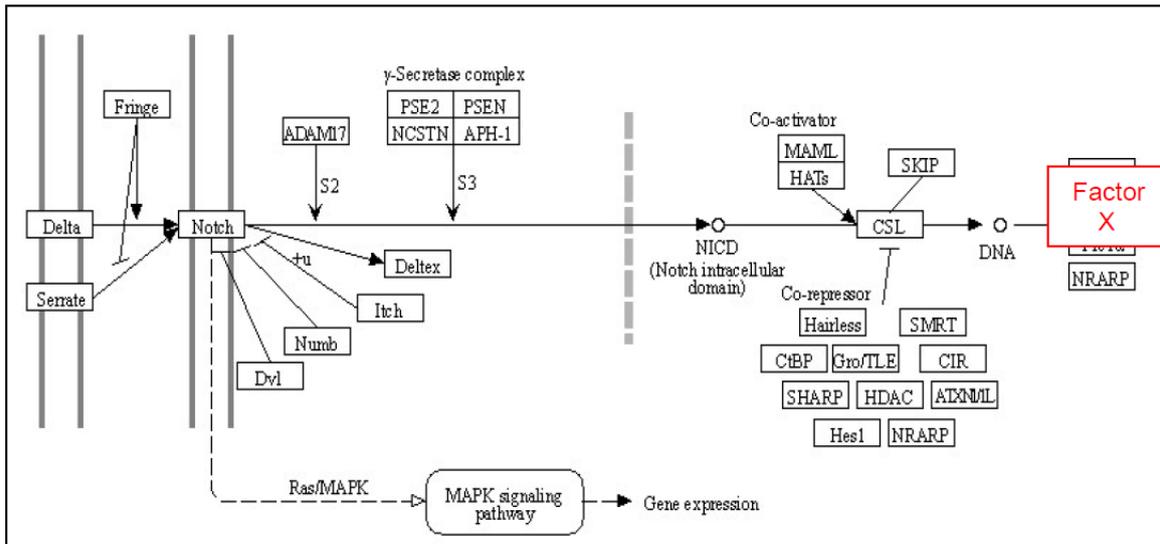


図4 THR α ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS解析）

神経分化パスウェイ上にある Factor X がスクリーニングされた。

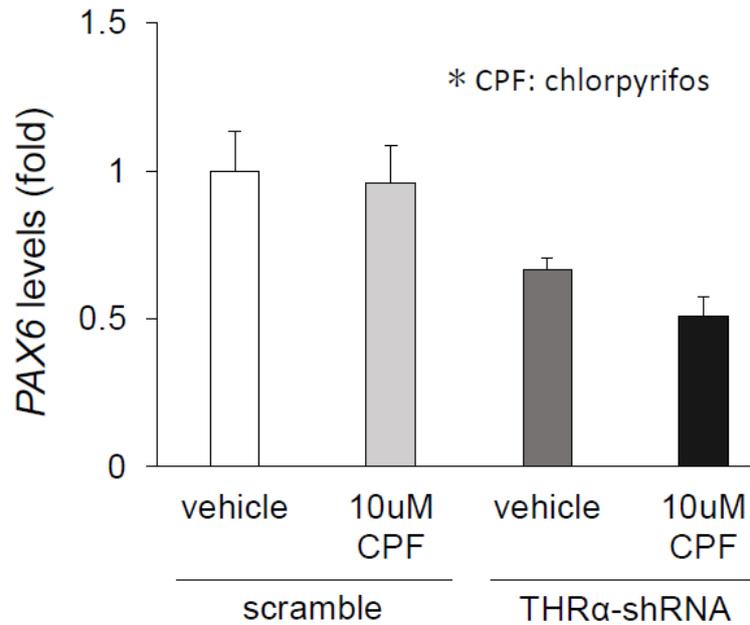


図5 THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経 (外胚葉) 分化に対する CPF 曝露の影響

CPF (10 μ M) を曝露したヒト iPS 細胞に神経分化誘導を行い、4 日目に神経分化マーカー PAX6 の発現を調べた。shRNA により THR α 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。

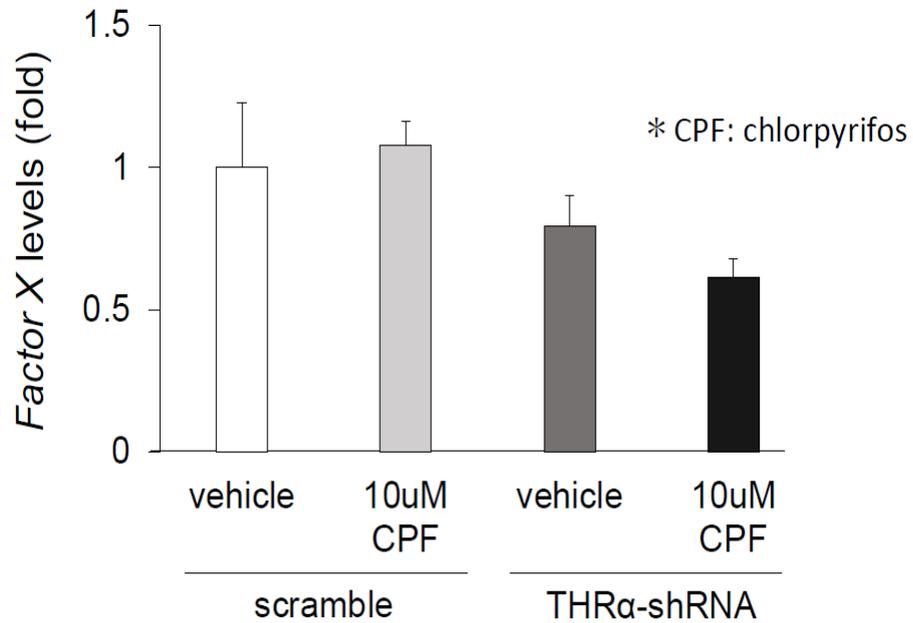


図 6 THRαノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経 (外胚葉) 分化に対する CPF 曝露の影響

CPF (10 μM) を曝露したヒト iPS 細胞に神経分化誘導を行い、4 日目に今回同定した Factor X の発現を調べた。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。

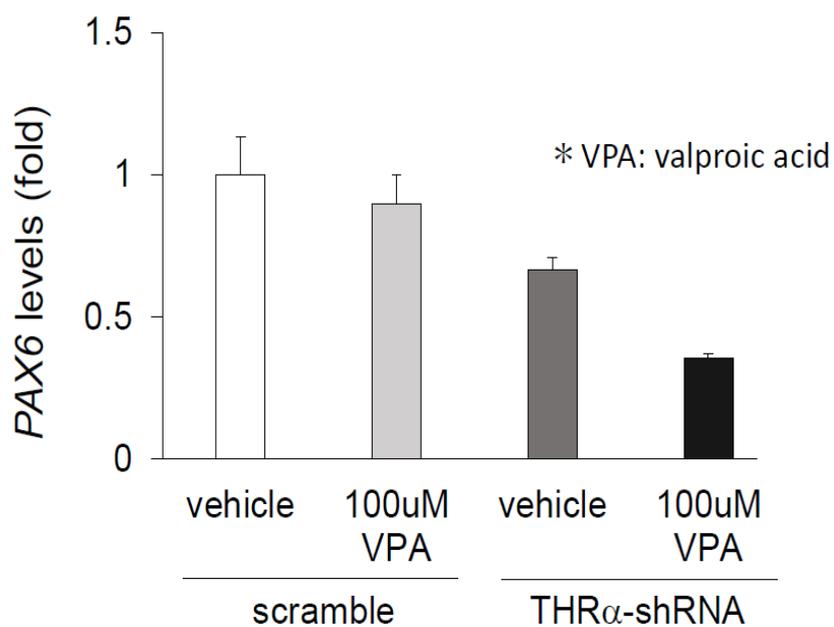


図7 THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経 (外胚葉) 分化に対する VPA 曝露の影響

VPA (100 μ M) を曝露したヒト iPS 細胞に神経分化誘導を行い、4 日目に神経分化マーカー PAX6 の発現を調べた。shRNA により THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するバルプロ酸曝露の影響を示す。ノックダウンコントロールとして scramble shRNA を用いた。

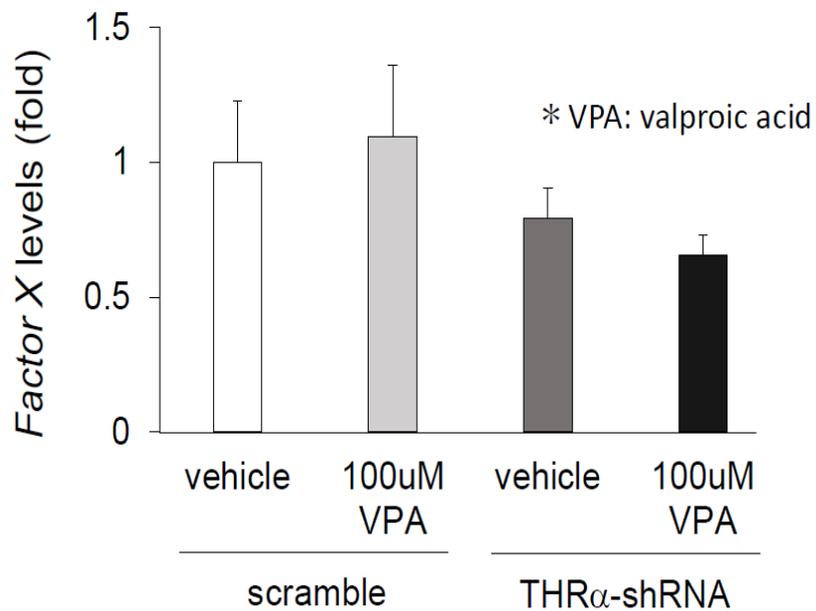


図8 THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経 (外胚葉) 分化に対する VPA 曝露の影響

VPA (100 μ M) を曝露したヒト iPS 細胞に神経分化誘導を行い、4 日目に今回同定した Factor X の発現を調べた。shRNA により THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するバルプロ酸曝露の影響を示す。ノックダウンコントロールとして scramble shRNA を用いた。

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
Shunsuke Tomita, Keisuke Ishida, Daisuke Matsumaru , Youhei Hiromori, Hisamitsu Nagase, Tsuvoishi Nakanishi (責任著者)	Excretion and Tissue Distribution Properties of PCB-126 for Establishing a Bioaccumulation Model in Mice	BPB Reports	7	7-13	2024
石田 慶士, 松丸 大輔 , 中西 剛 (責任著者)	化学物質の脳発達への影響を発光で可視化	光アライアンス	34	15-18	2023
Misaki Iwahashi, Takashi Yoshimura, Wakana Harigai, Kazuhiro Takuma , Hitoshi Hashimoto, Taiichi Katayama, Atsuko Hayata-Takano	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice show length abnormalities of the axon initial segment	Journal of Pharmacological Sciences	153	175-182	2023

令和6年 5月28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5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6年5月1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 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 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 本間 正充

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6年 5月28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5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・准教授

(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。

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5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) 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。