

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

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

分担研究課題名：妊娠期の甲状腺ホルモン関連指標変動による次世代影響の検討

～抗甲状腺薬を用いた甲状腺機能低下条件の検証～

研究分担者：松丸 大輔（岐阜薬科大学 薬学部・講師）

研究要旨

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

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

1. 動物

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

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

2. 抗甲状腺薬の投与

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

3. *in vivo* イメージング解析

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

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

4. 統計学的解析

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

C. 研究結果

1. MMI 飲水投与系を用いた検討

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

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

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

2. PTU 混餌投与系を用いた検討

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

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

D. 考察

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

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

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

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

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

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

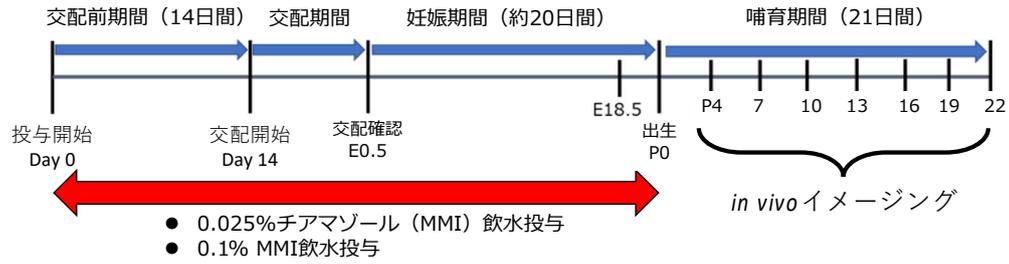
2. 学会発表

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

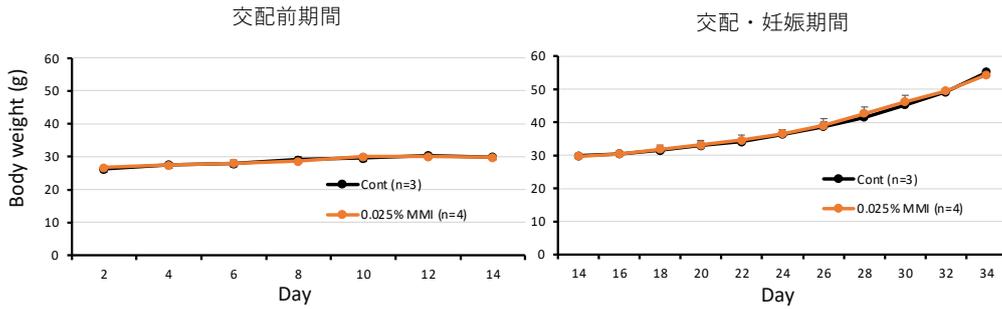
G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

A. チアマゾール (MMI) 飲水投与プロトコール



B. 0.025% MMI投与 母動物の体重変化



C. 0.1% MMI投与 母動物の体重変化

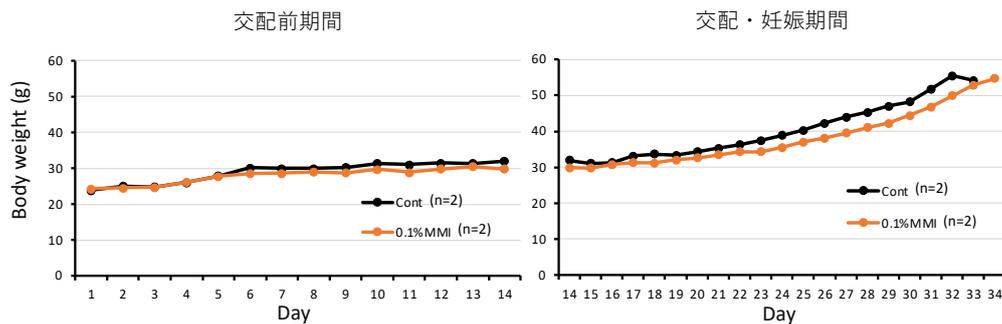
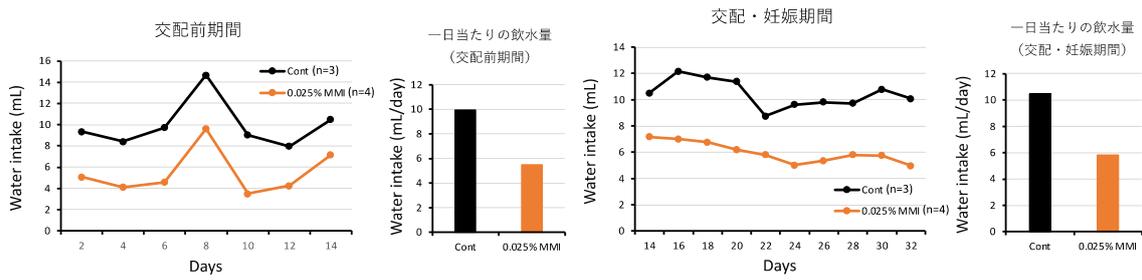


図1 MMI 飲水投与系甲状腺機能低下モデルの投与スケジュールと母動物の体重変化

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

A. 0.025% MMI投与 母動物の飲水量変化



B. 0.1% MMI投与 母動物の飲水量変化

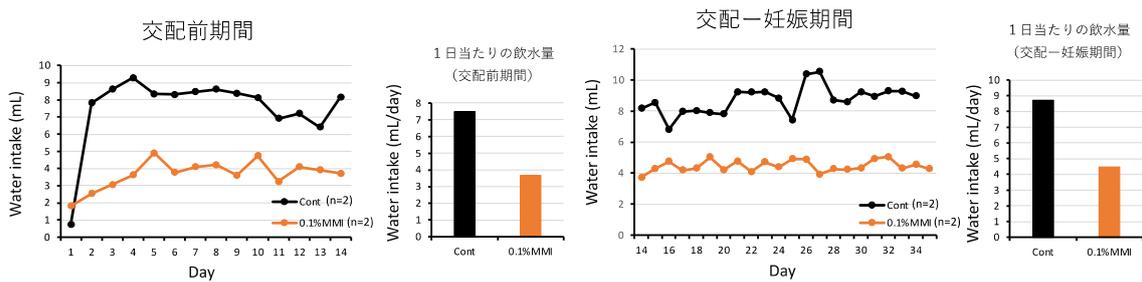
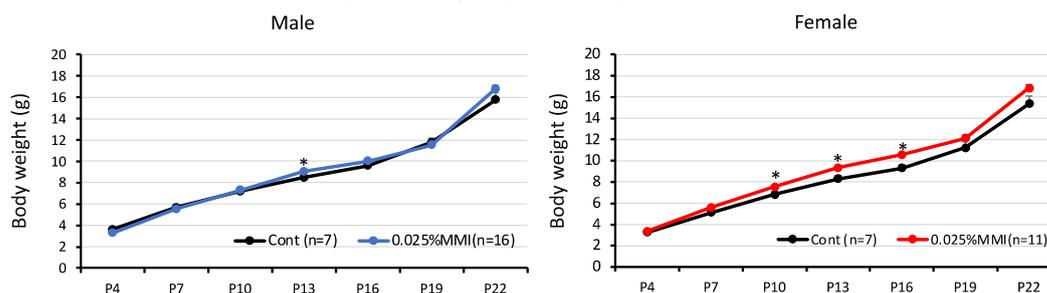


図2 MMI投与母動物における飲水量の変化

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

A. 0.025% MMI投与 児動物 体重変化



B. 0.025% MMI投与 児動物 *in vivo* イメージング

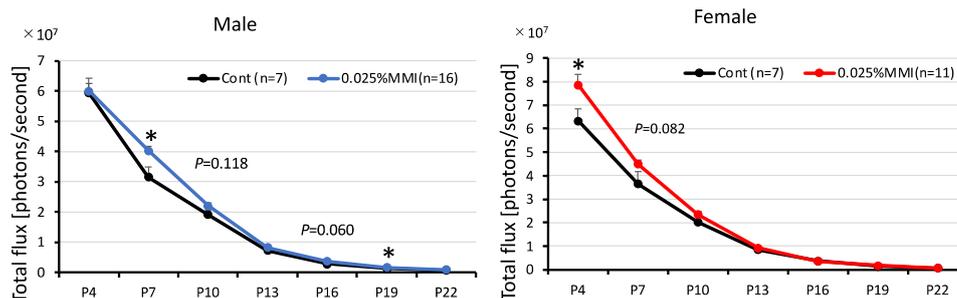
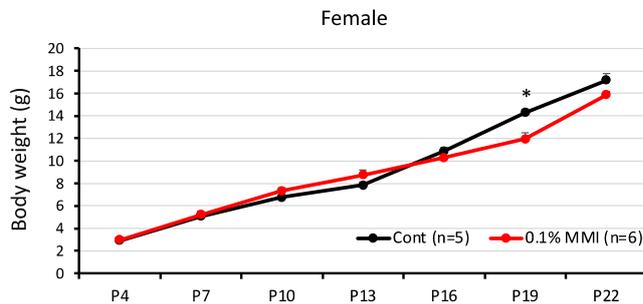


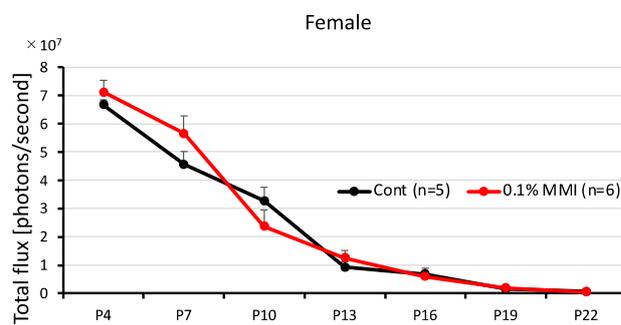
図3 0.025% MMI 飲水投与をした児動物の体重変化及び脳部位の *in vivo* イメージング解析

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

A. 0.1% MMI投与 児動物 体重変化



B. 0.1% MMI投与 児動物 *in vivo* イメージング

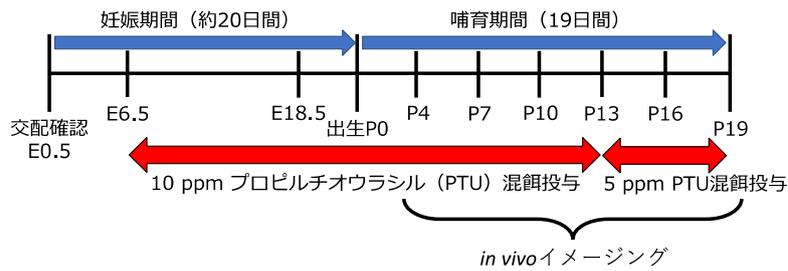


※♂は投与群がn=1であるため、データを示していない

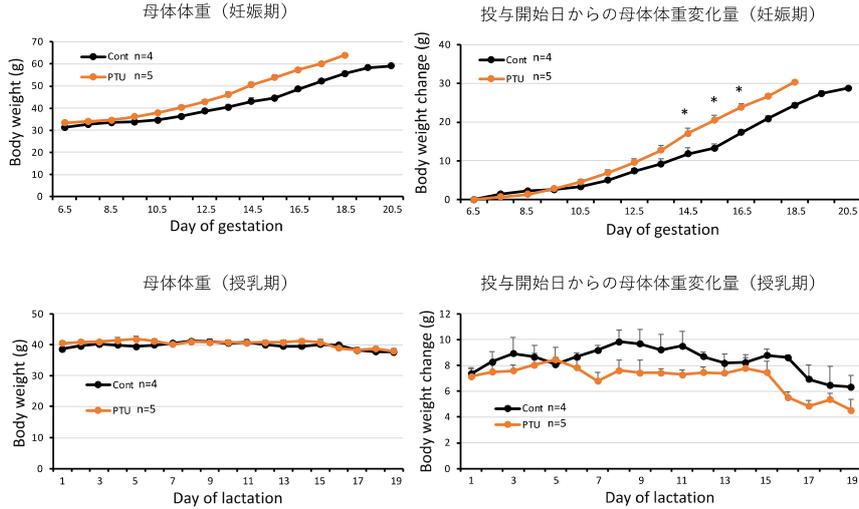
図4 0.01% MMI 飲水投与した雌性児動物の体重変化および脳部位の *in vivo* イメージング解析

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

A. プロピオチオウラシル (PTU) 混餌投与プロトコール



B. PTU混餌投与 母動物の体重変化



C. PTU混餌投与 母動物の摂餌量

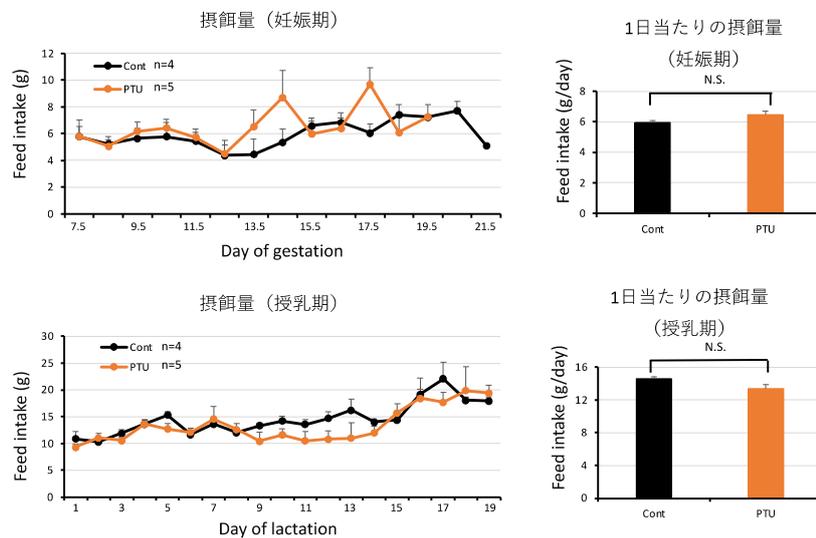
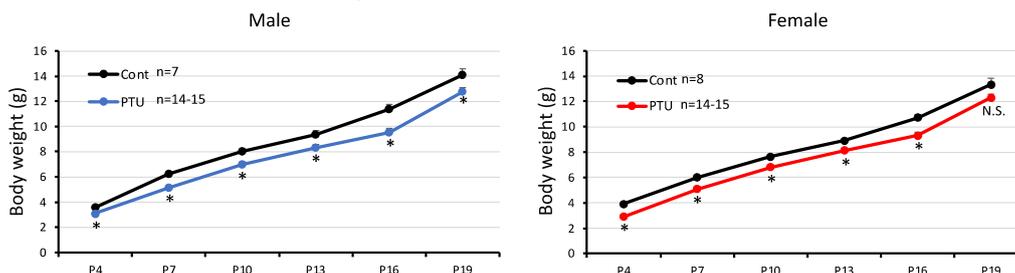


図5 PTU 混餌投与系甲状腺機能低下モデルの投与スケジュールと母動物への影響

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

A. PTU混餌投与 児動物の体重変化



B. PTU混餌投与 児動物 *in vivo* イメージング

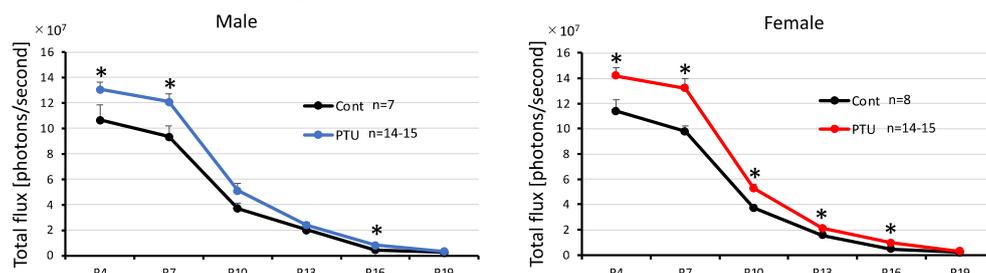


図6 PTU混餌投与した雌性児動物の体重変化および脳部位の *in vivo* イメージング解析

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