

令和 4 年度 厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

Ⅱ. 分担研究報告書

令和4年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究課題名：妊娠期～離乳期の甲状腺機能変動による次世代影響の検討

～妊娠期の甲状腺機能低下時における胎児発生への影響～

研究代表者：中西 剛（岐阜薬科大学 薬学部・教授）

研究分担者：村嶋 亜紀（岩手医科大学 医学部・講師）

研究要旨

近年、ヒトでは妊娠期の甲状腺機能低下が児の脳発達に悪影響を与えることが疫学調査により明らかとなった。このような背景を踏まえ、化学物質の毒性評価を行う各関連ガイドライン試験法においても、甲状腺ホルモン関連指標の検討が追加された。しかしこれら関連指標の変動と化学物質の児動物における毒性学的意義、特に発達神経毒性（DNT）については不明な点が数多く取り残されている。本分担研究では、抗甲状腺薬プロピオチオウラシル（PTU）による甲状腺機能低下の誘導条件の確定と、妊娠期の甲状腺機能低下時における胎児の脳発達以外への影響（器官形成・骨格形成等への影響）について、マウスを用いた出生前発生毒性試験（TG414）により検討した。妊娠母体における血中甲状腺ホルモンの抑制は、ラットを用いた先行研究で甲状腺機能が完全に低下する条件の5～25倍程度の用量で認められた。一方で母体の甲状腺機能を完全に低下させても、児動物の器官形成や骨格形成には影響は認められなかったことから、妊娠期の母体甲状腺機能低下は、胎児の器官形成や骨格形成には影響を与えないことが明らかとなった。また甲状腺機能低下による脳発達への影響を検討するために、シナプス構築の最終段階に神経細胞において発現するSynapsin 1（Syn1）のプロモーター制御下でレポーター分子を発現するトランスジェニックマウス（Syn-Repマウス）を作成し、その基礎データの収集を行った。脳におけるレポーター分子の発現は脳高次機能を担う部位において高く、出生直後にピークを迎え、日齢が進むとともに急激に低下した。以上の結果から、*in vivo*イメージングを用いてSyn-Repマウスのレポーター分子の発現をトレースすることで、神経細胞の分化状態を非侵襲的に把握できる可能性が示された。

A. 研究目的

近年の疫学調査により、ヒトでは妊娠初期における胎児脳の発達が母親から供給される甲状腺ホルモンに依存し、母体の甲状腺刺激ホルモン（TSH）の上昇および／または遊離チロキシン（fT4）の低下とIQ低下との間に明確な相関がみられることが大規模疫学調査から明らかとなっている。また実験動物においても母体の甲状腺機能低下と児の行動発達の相関性に関する報告が散見される。このような背景を踏まえ、妊娠期間中に甲状腺機能低下を引き起こす化学物質のヒトに対するリスクをより厳密に評価するために、OECDガイドラインの実験動物を用いた各関連試験法において甲状腺ホルモン関連指標（TSH／トリヨードチロニン（T3）／チロ

キシン（T4）の血中濃度、甲状腺の重量および病理組織学的評価）の検討が追加された。しかしながら、甲状腺機能低下を誘導する化学物質のリスク管理に資するスキームの確立には繋がっていない。したがって、化学物質曝露により誘導される甲状腺関連指標の変動をリスク評価に活かすためには、母体の甲状腺関連指標の変動と次世代影響、特に脳発達との因果関係を明らかにし、種差をも考慮した学術的基盤を構築する必要がある。

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

発生毒性試験 (TG414) による検討を行った。また脳に対する影響については、シナプス構築の最終段階に神経細胞において発現する Synapsin 1 (Syn1) のプロモーターの下流にルシフェラーゼ (Luc2) と LacZ の融合遺伝子をレポーター遺伝子に有する Syn-Rep マウスを独自に作成し、これを用いた検討を行う。このマウスでは、神経細胞の構築状態 (KE) を *in vivo* イメージングにより非侵襲的にトレースできることが期待され、また同一個体で行動試験 (Adverse Outcome : AO) までを行うことができる利点を有する。すなわち同一個体で時間軸の異なる Key Event (KE) と AO を直接紐付けることが期待される。本分担研究では、甲状腺機能低下によって誘導される DNT 評価を効果的に進めるツールとして期待される Syn-Rep マウスの DNT 評価における有用性について検証することを目的に、レポーター (Luc2 および LacZ) の発現に関する基礎データの収集を行った。

B. 研究方法

1) 出生前発生毒性試験

1-1. 動物

動物実験の実施に関しては、岐阜薬科大学において遺伝子組換え実験および動物実験に関する承認を得て行った。また動物実験における動物保護および倫理指針を遵守し、わが国における「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律」(法律第 68 号・平成 18 年 6 月 1 日施行) また WHO の医学研究顧問委員会の勧告に基づく「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則」に準拠して以後の実験を行った。各臓器の摘出は、イソフルランガス麻酔を用いて安楽死をさせた後に行った。出生前発生毒性試験は ICR マウスを用い、OECD TG414 のプロトコールに準じて実施した。

1-2. PTU の投与

PTU の投与は、完全調整食の AIN-93M (日

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

1-3. 母動物の観察および剖検

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

1-4. 子宮内容物の検査

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

1-5. 胎仔の観察および外表・内臓検査

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

1-6. 骨格検査および骨染色

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

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

1-7. 血清中マーカーの測定

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

1-8. 甲状腺組織学的解析

母動物の甲状腺はパラフィン切片を作成し、組織像を HE 染色で観察した。

1-9. 統計学的解析

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

2) Syn-Rep マウスにおけるレポーター分子の発現解析

2-1. 動物

動物実験の実施に関しては、1-1 に記載の通り実施した。実験には ICR 系の妊娠マウス、ならびに雄性 Syn-Rep マウスと野生型雌性 ICR マウスを交配することで得られた妊娠マウスを用いた。各臓器の摘出は、イソフルランガス麻酔を用いて安楽死をさせた後に行った。

2-2. *in vitro* ルシフェラーゼアッセイ

各臓器のルシフェラーゼアッセイは、Syn-Rep マウスを安楽死させた後に各臓器を摘出し、300 μ L のホモジナイズ緩衝液を加え、ホモジナイズ処理した。4°C、15000 rpm で 10

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

2-3. X-gal 染色

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

2-4. *in vivo* イメージング解析

発達期（4~22 日齢、以後 P4~P22）において経時的に *in vivo* イメージングを行った。*in vivo* イメージングを行う際には、児の成長の不均一性を排除するために OECD ガイドラインに準じて、出生後に得られた児動物を P4 時に 1 匹の母体から合計 8 匹（雌 4 匹・雄 4 匹）となるように間引きを行った。2% イソフルランガスで麻酔後、D-luciferin 溶液（5 mg/mL）を 10 mL/kg 体重で腹腔内に投与した。D-luciferin 投与直後から、25 分後までの頭部の発光量を背中側から 1 分毎に連続測定した。発光量測定には IVIS Lumina II（住商ファーマ）を使用した。各日齢における発光量の変化を表したグラフには、連続測定で得られたデータのうち発光量がピークを示した時点の値を使用した。得られたデータについて Living Image（住商ファーマ）を用いて解析し、頭部の発光強度を Total flux（photon/second）として定量化した。

C. 研究結果

1. 母体甲状腺機能低下時における胎児発生への影響

1-1. PTU 投与による母体甲状腺関連指標への影響

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

1-2. PTU 投与による母体血清中の生化学的パラメーターへの影響

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

1-3. 母動物の体重と摂餌量の評価

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

1-4. PTU 投与による胎仔発生への影響

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

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

2. Syn-Rep マウスにおけるレポーター分子の発現解析

2-1. 成熟期 Syn-Rep マウスの各臓器における Luc2 発現の検討

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

9~10 週齢の各仔マウスの脳、胸腺、肺、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、膵臓、胃、大腸、小腸、脂肪、筋、下垂体、脊髄について Luc2 活性を測定した。また脳については、発現部位における詳細な情報を得るために視床下部、小脳、嗅球、海馬、線条体、大脳皮質前部、大脳皮質後部に分割して検討を行った。さらに雄においては精巣、精巣上体、精嚢を、雌においては子宮、卵巣についても検討を行った。その結果、雌雄ともに、大脳皮質前部、大脳皮質後部で非常に強い活性が認められた (図 4)。また線条体、海馬で大脳皮質の半分程度の活性が認められ、わずかではあるが胃と視床下部でも活性が確認された (図 4)。さらに雄においては精巣で線条体や海馬と同程度の活性が認められた (図 4)。

2-2. 出生直前から離乳期脳の各部位におけるレポーター分子発現の経時変化

出生直前から離乳期にかけてのレポーター分子の発現状況を検討するために、E18.5 および P4、P7、P13、P22 の各脳部位についてルシフェラーゼアッセイを行った。その結

果、雌雄共に P7 の大脳皮質で最も高い Luc2 の発現が認められた (図 5A)。またその経時的な発現変動は、E18.5 から P7 にかけて上昇し、その後急激に発現が低下するパターンを示した (図 5A)。それ以外の部位では、海馬、中脳においてピークで大脳皮質の 1/3~1/5 程度の Luc2 活性が認められ (図 5B, C)、わずかではあるが小脳でも Luc2 活性が認められた。大脳皮質以外の部位においても雌雄間に特段の差は認められず、経時的な発現変動も E18.5~P7 で発現のピークを迎え、その後発現が低下するパターンを示した。

2-3. 脳の各部位における LacZ 発現の経時変化に関する組織学的解析

Syn-Rep マウスのレポーター遺伝子は、Luc2 遺伝子に加え LacZ 遺伝子をタンデムに発現するように設計されている。そこで Syn-Rep マウスの各時期の脳における LacZ の発現状態を検討し、今後の解析における有用性についての検証を行った。E14.5 は胎仔全身、E18.5、P4、P13、P22、9 週齢は脳スライスを作成し、X-gal 染色を行った (図 6)。その結果、E14.5 においては脊髄を中心にわずかに染色が認められる程度であった。一方で E18.5 以降では大脳皮質で強い染色が確認され、海馬周辺でも染色が確認された。染色の強さは P4 でピークとなり、その後経日的に低下した。

2-4. 発達期の脳における *in vivo* イメージングの検討

次に発達期の脳を対象にした *in vivo* イメージングを行った。DNT 陽性化学物質の中にはその影響に雌雄差が存在するものが報告されているため、Syn-Rep マウスを用いた DNT 評価を行う場面を想定して、雌雄別に定常状態での評価を行った。その結果、雌雄ともに P4 を最大値としてその後 P13 にかけて急激に減少し、P13 から P22 にかけては緩やかに減少した (図 7)。また、発達期脳の発光パターンは雌雄差が無いことも明らかとなった。発達期脳におけるこれらの発光の経

時変化のパターンは、先に示した脳の各構成部位における Luc2 活性の経時変化のパターンや脳スライスを用いた X-gal 染色の結果と一致するものであった。

2-5. 発達期の脳における *in vivo* イメージングと体重との相関に関する検討

発達期における児の体重の不均一性は、毒性評価に影響を与える可能性が懸念される。また脳の *in vivo* イメージングにおいても、その結果が児の体重に影響を受ける可能性が考えられる。そこで本項では発達期の体重の差が *in vivo* イメージングの結果に与える影響を検証するために、*in vivo* イメージングの結果と体重との相関性について検討を加えた。P4 から P22 までの各日齢において、横軸には体重を、縦軸には *in vivo* イメージングにより得られた脳部位の発光量を示すグラフを作成し、相関性を表す R^2 値と p 値を雌雄別に算出した。その結果、P22 の雄 ($R^2 = 0.6617, P = 0.0002$) (図 8D) を除いて、雌雄全ての日齢において体重と発光は相関が無いことが明らかとなった (図 8)。以上より、*in vivo* イメージングにおける脳の発光量は、少なくとも出生後早い時期においては体重に依存しないパラメーターであることが確認された。

D. 考察

1. PTU の出生前発生毒性試験

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

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

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

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

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

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

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

2. Syn-Rep マウスにおけるレポーター分子の発現解析

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

その結果、脳で高い Luc2 発現を有することが確認できた。ただ雄においては精巣でも発現が認められた (図 4)。用いるプロモーター領域は我々のものとは少し異なっているが、これまでも Syn1 プロモーター制御下でクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) や Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスが作製されている。これらのマウスにおいても大脳皮質や海馬、視床下部、扁桃体などの脳組織で導入遺伝子の発現が確認されている。また脳以外にも脊髄や精巣での発現が認められるラインも存在していたと報告されている。

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

また脳についてはレポーターの発現時期についても詳細な検討を行った。その結果、Luc2 の発現は出生前から認められ、P4~P7 でピークを迎えた後に、急激に減少することが明らかとなった (図 5)。脳の部位別の検討においては、大脳皮質での発現が非常に高く、海馬、中脳でも高い発現が認められたが、いずれの部位においても離乳期までに発現が衰退するパターンを示した。Syn1 プロモーター制御下で CAT を発現するトランスジェニックマウスにおいても、頭部の CAT 活性を指標にレポーター遺伝子の発現の経時変化について検討されている。各マウスラインによって若干発現のパターンは異なるものの、いずれのマウスラインにおいても胎生期での活性はほとんど認められないが、出生後から少しずつ活性が認められ始め、P15~P20 当たりで発現のピークを迎えている。今回の結果は、概ね過去の報告と一致した発現のパターンとなったと考えられ、Syn-Rep マウスにおけるレポーター分子の発現制御に問題はないと考えられた。

さらに LacZ 遺伝子の有用性を検討するために、胎生期および出生後の脳スライスについて X-gal 染色を行った。その結果、Luc2 活性と同様に大脳皮質周辺に強い染色像が認められるとともに、P4 で最も強い染色が認められ、その後は発現が減衰していく染色パターンを示した (図 6)。自己融解ペプチドを用いて遺伝子を発現させると、理論的には 1 対 1 の割合で連結した分子が発現するとさ

れているが、今回の結果で Luc2 と LacZ の発現が平行であったことから、Syn-Rep マウスは当初の期待通りに遺伝子発現が制御できていると考えられた。

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

一方で本研究課題では *in vivo* イメージング解析の対象が出生後間もない児動物であるため、体重差や個体の大きさによる個体間のデータのバラツキが懸念される。特に毒性試験においては被験物質の投与による非特異的な影響も懸念されるため、個体の大きさや体重に *in vivo* イメージングの結果が左右されてしまうと、被験物質の脳に対する特異的な影響を検出できない可能性が懸念される。しかし今回の検討において、*in vivo* イメージングの結果と児動物の体重には相関が認められなかった(図8)。一般的に脳部位は他の部位と比較して成長しても大きさが変化しないと言われている。また生まれて間もない時期は、体重全体に占める脳の重量比も成獣よりも大きいことから、これがデータのバラツキを少なくしている可能性が考えられた。

生後発達期の神経系におけるシナプス形成は、出生直後に過剰に行われその数はピークを迎える。その後、環境や経験に依存して必要なシナプスは強められて残り、不要なシナプスは除去されることが知られている。この現象を「シナプス刈り込み」と呼び、機能的で無駄の少ない神経回路を作るための基本的過程であると考えられている。最近、ヒ

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

2. 学会発表

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

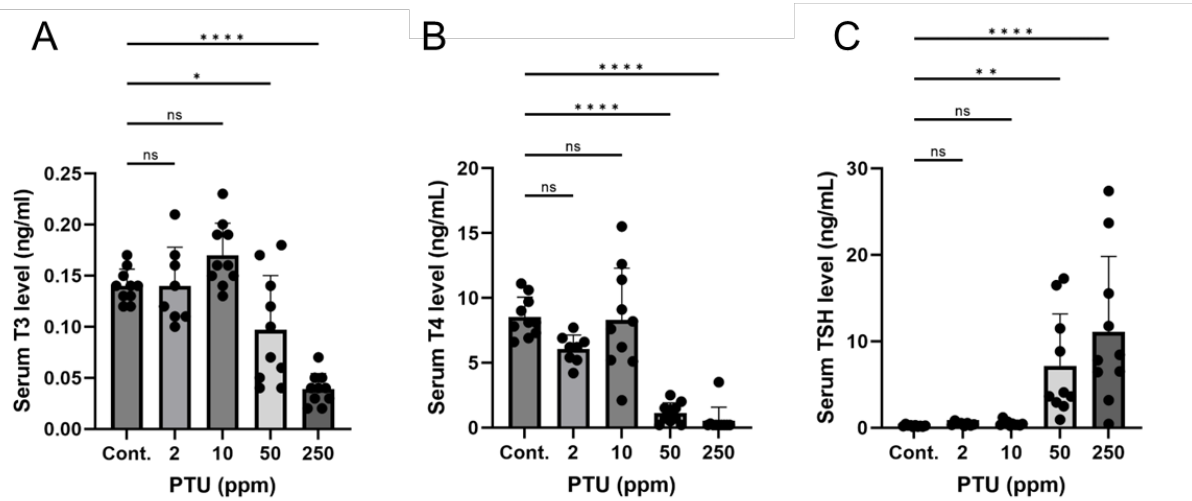


図1 妊娠期に PTU を投与したマウスの GD18 における血清中甲状腺関連ホルモンレベル

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

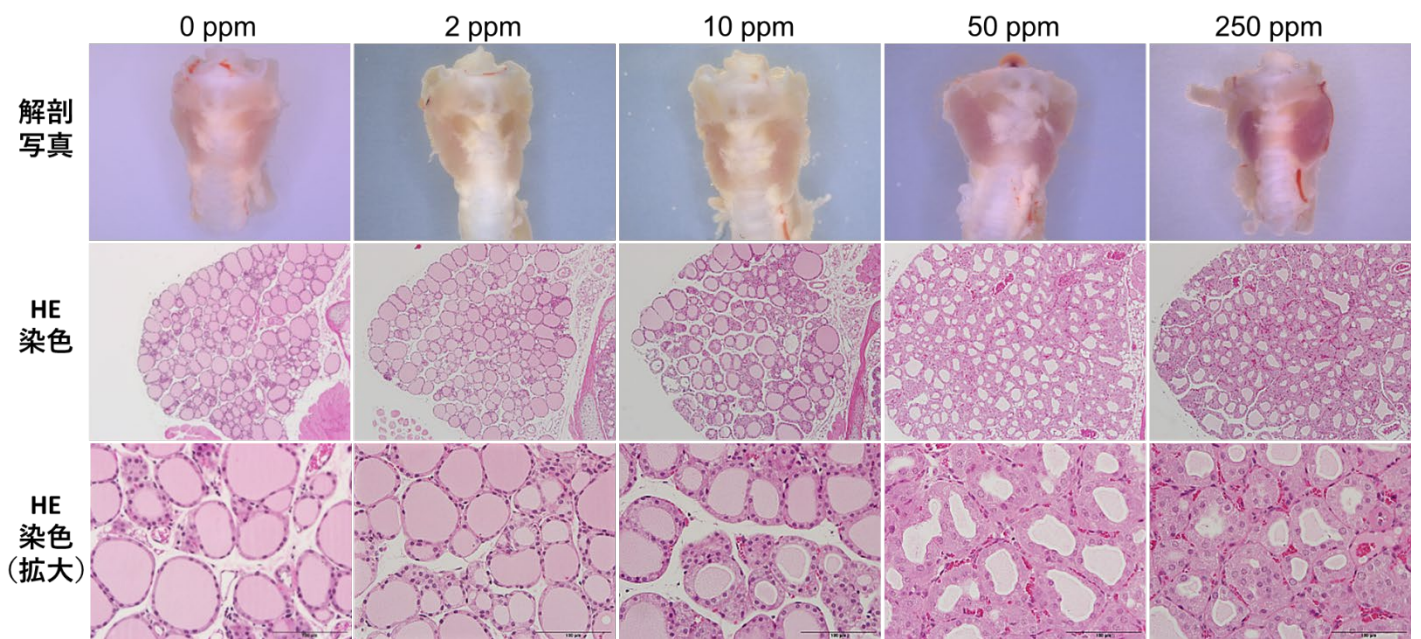


図2 妊娠期に PTU を投与したマウスの GD18 における甲状腺病理組織像

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

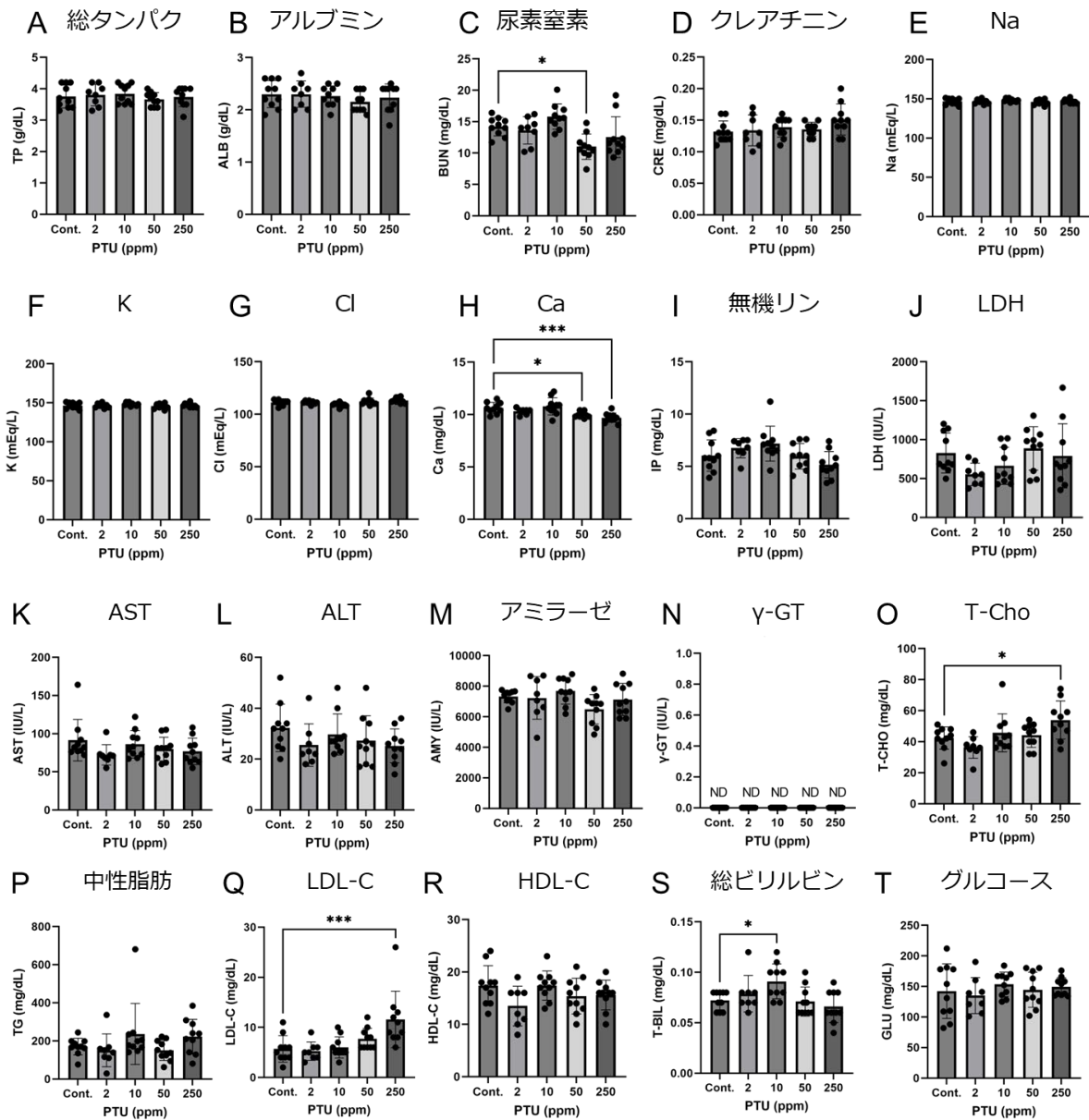


図3 妊娠期に PTU を投与したマウスの GD18 における血清中生化学パラメーターレベル

GD18 に母体より血清を回収し、血清中の総タンパク (A)、アルブミン (B)、尿素窒素 (C)、クレアチニン (D)、Na (E)、K (F)、Cl (G)、Ca (H)、無機リン (I)、乳酸脱水素酵素 (LDH) (J)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) (K)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) (L)、アミラーゼ (M)、 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=8-10). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001 vs. control (Dunnett's test).

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

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

Mean ± SD

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

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

Mean ± SD

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

表3 妊娠期に PTU を投与したマウスの妊娠 18 日目における子宮重量

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

Mean ± SD

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

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

Mean ± SD

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

$P < 0.01$ vs. Steel test

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

胎仔外表検査 所見別

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

Mean ± SD

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

NAD (Nothing Abnormal Detected)

表6 胎生期に PTU を投与したマウスの E18 における内臓検査の結果

胎仔内臓検査 所見別

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

Mean ± SD

表7 胎生期に PTU を投与したマウスの E18 における骨格検査の結果

胎仔骨格検査 変異および異常割合

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

Mean ± SD

表8 胎生期にPTUを投与したマウスのE18における骨格検査の内訳

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

Mean ± SD

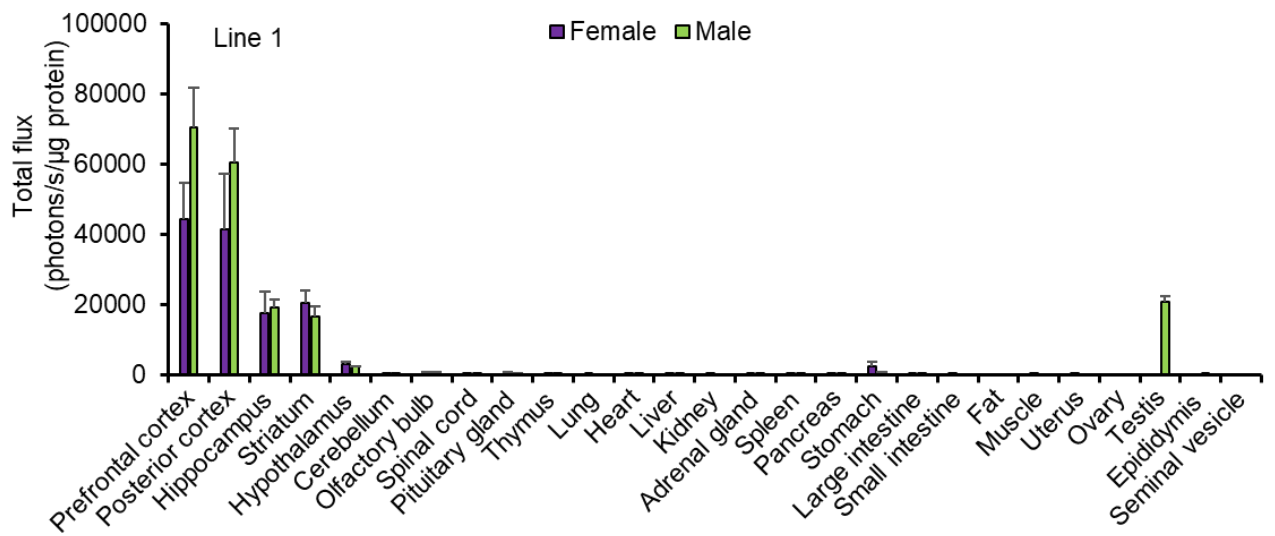


図4 成熟期 Syn-Rep マウス雌の各臓器における Luc2 活性
 Data are expressed as mean \pm S.E.M (n=3)

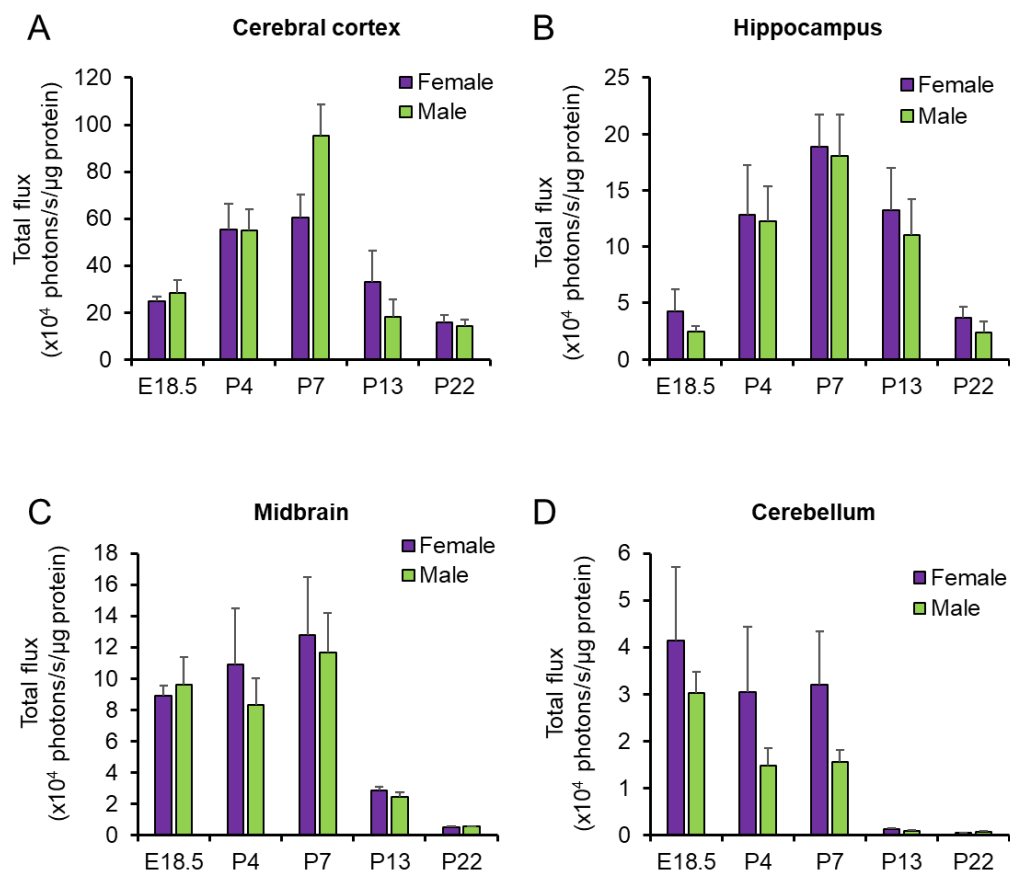


図5 Syn-Rep マウスの出生直前から離乳期の脳における Luc2 活性

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

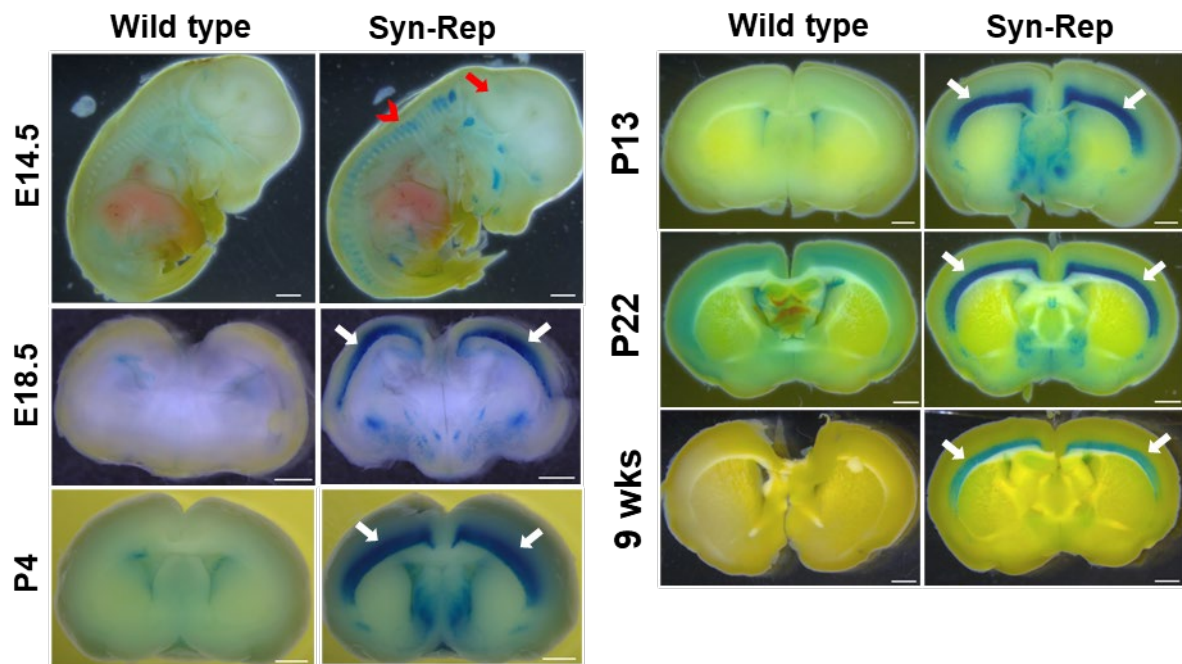


図6 X-gal 染色を用いた Syn-Rep マウスの脳における LacZ 発現の経時変化に関する組織学的解析

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

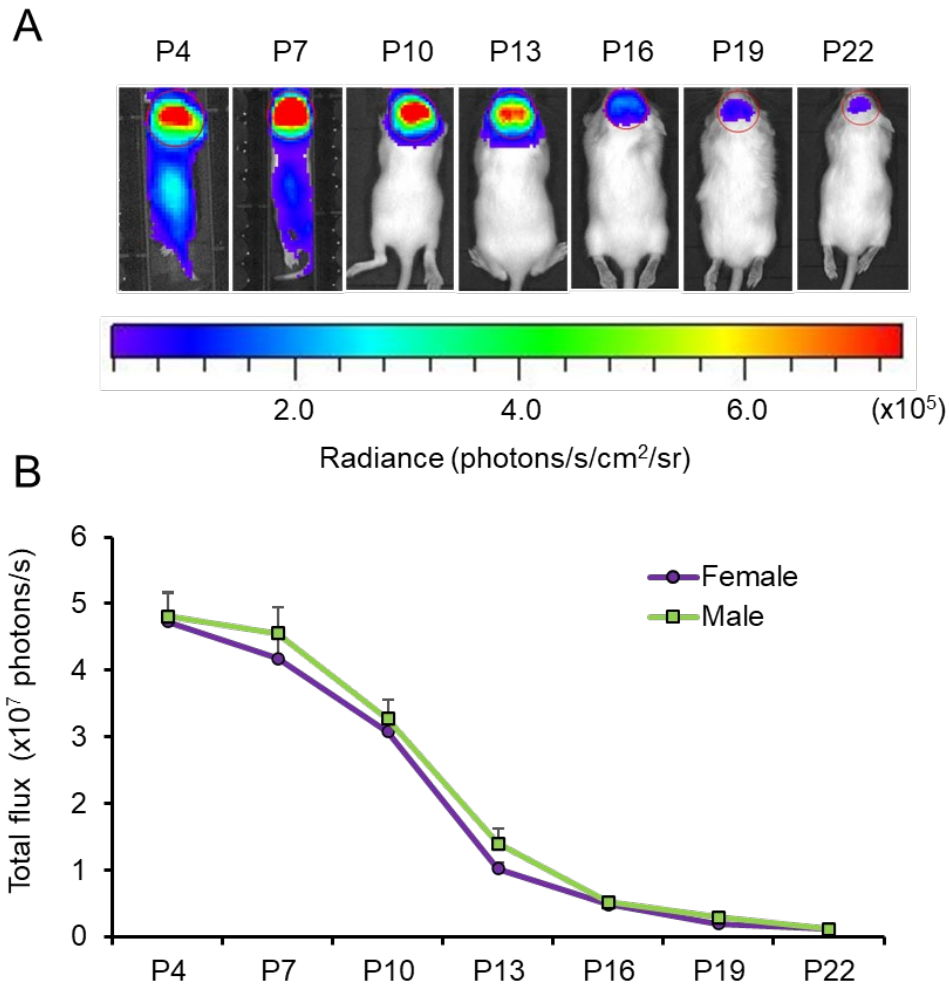


図7 Syn-Rep マウスの発達期の頭部に対する *in vivo* イメージング解析

4 腹の母体から産まれた Syn-Rep マウスに対し、P4 において児の数が 8 匹（雌 4 匹／雄 4 匹）となるように間引きを行い、P4 から P22 における発達期の頭部に対する *in vivo* イメージングを行った。D-luciferin/PBS 溶液を i.p 投与直後から 1 分毎の連続測定を行い、発光量が頭打ちになるまでおよそ 25 分間測定を継続した。(A) 代表的な個体の写真を示している。(B) 得られたデータについて Living Image を用いて解析し、頭部の発光強度を Total flux として定量化した。また、連続測定で得られたデータのうち発光量がピークを示した時点の値を使用し、発達期の各日齢における発光量の変化を表した。Data are expressed as mean \pm S.E.M (n=8 - 15)

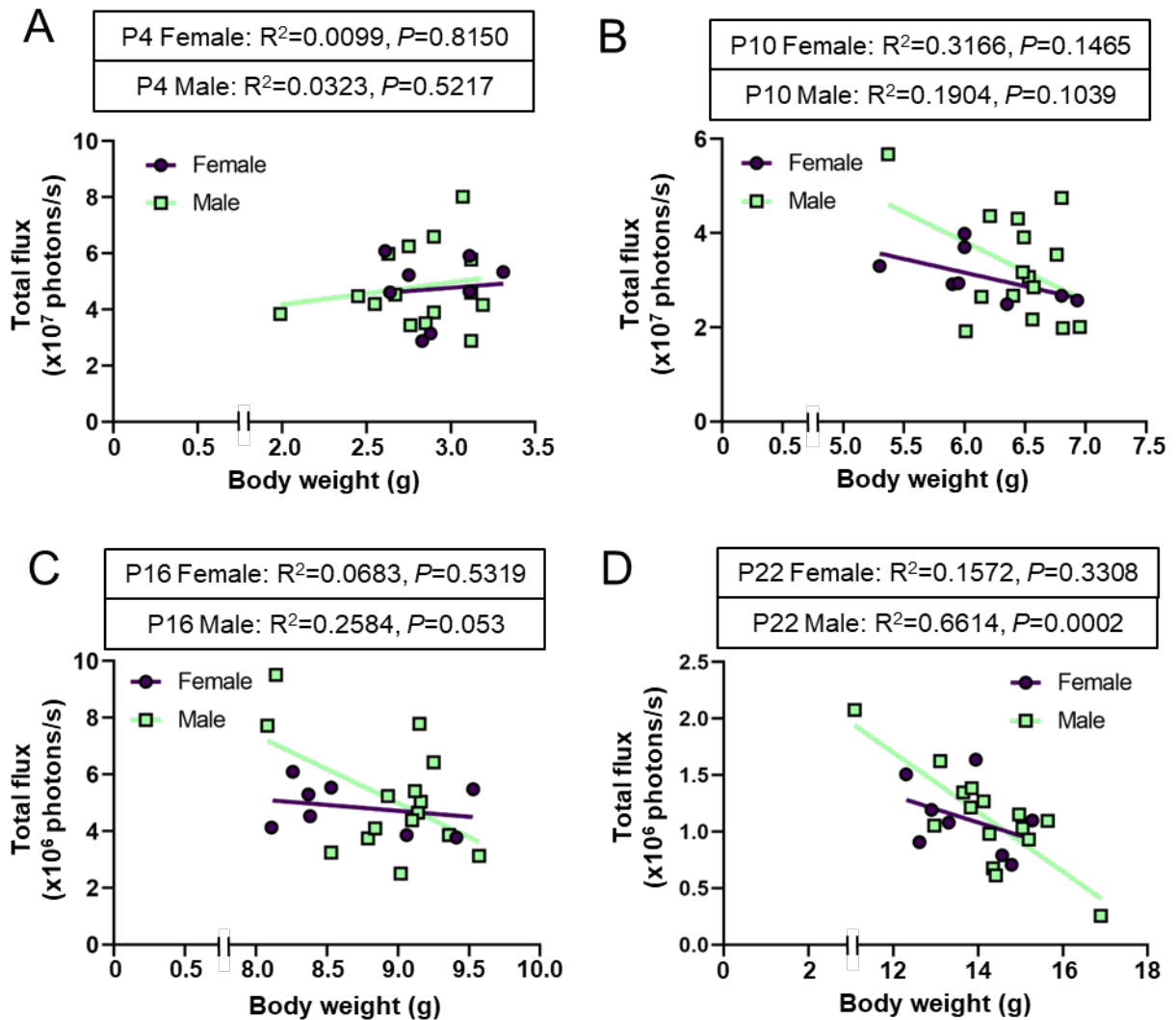


図8 各日齢における頭部の発光と体重の相関性

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