

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

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

分担研究課題名：DNT 陽性対照物質を用いたレポーターマウスの有用性の検証

研究分担者：田熊 一敏（大阪大学 大学院歯学研究科・教授）

研究要旨

近年の大規模疫学調査により、妊娠期における甲状腺機能低下が児のIQ低下を誘導することが明らかとなった。これを踏まえ、OECDガイドライン試験において甲状腺ホルモン関連指標の検討が追加されたが、追加された検討項目に関する毒性学的意義、特に発達神経毒性（DNT）については不明な点が数多く取り残されている。化学物質曝露により誘導される妊娠期の甲状腺機能関連指標の変動をリスク評価に活かすためには、DNT評価を効果的に進めるための新たな技術を導入し、母体の甲状腺機能関連指標の変動と毒性との関係を明確にすることで、学術的基盤を堅固なものにする必要がある。本分担研究では、その候補として期待されるSyn-Repマウスについて、DNT陽性対照物質であるバルプロ酸（VPA）を用い、DNT評価における有用性を検証した。DNTが誘導される条件で妊娠期にVPAを投与したところ、4～13日齢（P4～P13）の雌雄児動物の脳におけるレポーター分子（Luc2）の発現が有意に低下した。また成熟期（8週齢）においても、VPA投与群で大脳皮質におけるLuc2活性の有意な低下と、神経細胞数の有意な減少が確認された。さらにVPA投与群では自閉スペクトラム症（ASD）様の行動異常が認められたことから、Syn-RepマウスはDNT評価を行うための有用なツールとなる可能性が示された。また、Polyinosinic acid-polycytidylic acid (Poly(I:C))を用いた母体免疫活性化（MIA）モデルでは、P4～P7の児動物脳のレポーター分子の発現が有意に上昇しており、抗甲状腺薬であるプロピルチオウラシル（PTU）投与モデルと類似した発現プロファイルを示した。この結果から、妊娠期の甲状腺機能低下とMIAによる児の神経発達影響には、共通したメカニズムが関与する可能性が考えられた。

A. 研究目的

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

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

このような背景のもと我々は、化学物質のDNT評価やその作用メカニズム解明を効率よく行うために、成熟神経細胞のマーカーとして神経細胞分化の最終段階であるシナプ

ス構築ステージにおいて発現する Syn1 に着目し、Syn1 プロモーターの下流にルシフェラーゼ (Luc2) と LacZ の融合遺伝子をレポーター遺伝子に有する Syn-Rep マウスを独自に開発した。このマウスでは、成熟神経細胞のシナプス形成への影響 (Key Event: KE) を *in vivo* イメージングにより非侵襲的にトレースできることが期待され、また同一個体で行動試験 (Adverse Outcome: AO) までを行うことができる利点を有する。すなわち同一個体で時間軸の異なる Key Event (KE) と AO を直接紐付けることが期待される。

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

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

響についても検証した。

B. 研究方法

1. 動物

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

2. 薬物の投与

VPA の投与は自閉スペクトラム症様の症状を呈するとされる条件である胎齢 12.5 日 (E12.5) 時に VPA 500 mg/kg を腹腔内に単回投与した。対照群には生理食塩水を投与した。MIA モデルマウス作製にはウイルス RNA を模倣する合成二本鎖アナログである Polyinosinic acid-polycytidylic acid (Poly(I:C)) 投与モデルを用いた。Poly(I:C)の投与は MIA の誘導が報告されている条件である E12.5 に 20 mg/kg を腹腔内に単回投与した。対照群には生理食塩水を投与した。

出生後、得られた児動物については、児の成長の不均一性を排除するために OECD ガイドラインに準じて、4 日齢 (P4) において 1 匹の母体から合計 8 匹 (雌 4 匹・雄 4 匹) となるように間引きを行った。

3. *in vivo* イメージング解析

出生後から発達期 (P4~P22) において経時的に *in vivo* イメージングを行った。2%イソフルランガスで麻酔後、D-luciferin 溶液 (VPA 投与検討: 5 mg/mL、Poly(I:C)投与検

討：15 mg/mL) を 10 mL/kg 体重で腹腔内に投与した。D-luciferin 投与直後から、40 分後までの頭部の発光量を背中側から 1 分毎に連続測定した。発光量測定には IVIS Lumina II (住商ファーマ) を使用した。各日齢における発光量の変化を表したグラフには、連続測定で得られたデータのうち発光量がピークを示した時点の値を使用した。得られたデータについて Living Image (住商ファーマ) を用いて解析し、頭部の発光強度を Total flux (photon/second) として定量化した。

4. *in vitro* ルシフェラーゼアッセイ

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

5. 組織学的解析

脳の組織形態学的変化は、8 週齢での Nissl 染色法により解析した。被験マウスをリン酸緩衝液の全身灌流により脱血後、4% パラホルムアルデヒドで組織を固定した。全脳をパラフィン包埋し、厚さ 5 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・水和した後、0.1%クレシルバイオレット溶液で 10 分染色した。染色切片を洗浄および脱水・透徹した後、封入した。Nissl 陽性細胞数は、Nuance Fx マルチスペクトルイメージングシステム (PerkinElmer) を用いて取得した画像を用いてマニュアル計測し、1 mm² 当たりの平均値で示した。

6. 行動薬理的解析

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

不安様行動変化は、高架式十字迷路試験により評価した。装置は、それぞれ走路幅 5 cm、長さ 30 cm の白色不透明の直交する 2 本のオープンアームと 2 本のクローズドアームからなり、クローズドアームには高さ 20 cm の不透明の側壁を付け、40 cm の高さに設置した。装置の中央に被験マウスの頭がオープンアームの方向となるように置き、その後 5 分間の行動を観察し、オープンアームおよびクローズドアームにおける滞在時間、および各アームへの進入回数を計測した。なお、各アームでの滞在時間は、四肢全てがアームに入った時点から中央区画に出た時点までとした。

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

学習記憶能の変化は、新奇物体認識試験により評価した。本試験は、馴化、訓練試行および試験試行の 3 つのセッションで構成した。まず、物体を設置せず床敷きのみを敷い

たプレキシガラス製ボックス (30×30×35 cm) に3日間 (10分間/日) 動物を馴化させた後、壁から8 cm離れた位置に2つの物体を置いた装置内で10分間自由に探索させた (訓練試行)。その1または24時間後に、2つの物体のうち、1つを新奇物体と置換した装置内で5分間自由に探索させた (保持試行)。訓練試行および保持試行における動物の行動を観察し、2つの物体に対するそれぞれの探索時間を測定した。訓練試行時においては、総探索時間に対するいずれかの1物体への探索時間の割合 (%) を、保持試行時においては、総探索時間に対する新奇物体への探索時間の割合 (%) を探索嗜好性 (exploratory preference) として示した。

7. 血清中 IL-6 濃度測定

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

8. mRNA 発現量の評価

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

9. 統計学的解析

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

C. 研究結果

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

1-1. 児動物の体重増加への影響

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

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

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

1-3. 児動物脳の組織学的解析

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

1-4. 児動物の行動薬理的解析

VPA 曝露が児動物の新奇環境下での自発運動に及ぼす影響をオープンフィールド試験により検討した (図 4)。VPA 曝露群では、生後8週齢において、経時的な移動距離 (図 4A)、総移動距離 (図 4B) および立ち上がり回数 (図 4C) が対照群と比べて有意に減少していた。次に、不安様行動変化に及ぼす影響を高架式十字迷路試験により検討した (図 5)。VPA 曝露群では、8週齢において、オープンアーム滞在時間の有意な減少 (図 5A)、クローズドアーム滞在時間の有意な増加 (図 5B)、ならびにオープンアーム滞在時間の割合の有意な低下を示した (図に示さず)。さらに、児動物の社会性行動に及ぼす影響を社

会的相互作用試験により検討した (図 6)。VPA 曝露群では、8 週齢において、対照群と比べて初めて遭遇した intruder マウスに対する嗅覚行動時間が有意に減少していた (図 6A)。また、VPA 曝露群では毛づくろい行動 (図 6B) および攻撃行動 (図 6C) は有意ではないものの、増加傾向が認められた。

さらに児動物の学習記憶能に及ぼす影響を新奇物体認識試験より検討した (図 7)。訓練試行において、VPA 曝露群と対照群とも 2 物体に対して 50% の探索嗜好性を示した (図 7 左)。1 時間後の試験試行において、VPA 曝露群と対照群の新奇物体への探索嗜好性に差は認められなかった (図 7 中) が、24 時間後の試験試行においては、対照群に比べて VPA 曝露群では新奇物体への探索嗜好性が有意に低下していた (図 7 右)。

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

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

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

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

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

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

2-3. 児動物脳の神経系マーカー遺伝子発現量への影響

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

D. 考察

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

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

行動試験の結果に関して、E12.5 に VPA 曝露した児動物は、成体期にオープンフィールド試験で自発運動量の低下を、高架式十字迷路試験において、オープンアーム滞在時間の減少および総滞在時間におけるオープンアーム滞在時間割合の低下を示した。高架式十字迷路試験でのオープンアーム滞在時間とその割合の減少は、不安症状の指標とされていることから、不安、恐怖の発現が自発運動量に対して抑制的に作用したことが考えられた。また、社会的相互作用試験においては、E12.5 の VPA 曝露により、intruder 動物に対して示す嗅覚行動時間が減少することを示した。すなわち、社会性行動が低下していることを認めた。さらに、これらの成績より、E12.5 の VPA 曝露が児動物において成体期に ASD 様の情動行動異常を引き起こすことが示された。

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

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

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

Syn-Rep マウスのレポーター遺伝子はシナプス構築タンパク質 *Syn1* の遺伝子プロモーターで制御されていることから、各薬物投与条件下における頭部発光の変化はシナプス構築状態の異常を反映している可能性が考えられる。VPA 投与群におけるレポーター分子の発現量の低下は神経細胞数の減少に起因するシナプス構築の低下を反映し、*Poly(I:C)* や PTU 投与群におけるレポーター分子の発現量の上昇は、ミクログリア活性化を介したシナプス刈込過程の異常を反映している可能性が高いと考えられる。ヒトにおいても ASD をはじめとした神経発達症において発達期のシナプス構築状態が異常な経時変化パターンを示すことから、*Syn-Rep* マウスのレポーター分子の発現パターンの経時的モニタリングは、妊娠期の甲状腺機能低下による脳への影響のみならず、神経発達症の様々な候補遺伝子の影響の検証にも応用可能であると考えられる。一方で、VPA 投与

群と Poly(I:C)および PTU 投与群でレポーター分子の経時的発現プロファイルが異なっていたことから、化学物質による DNT や神経発達症の発症メカニズムは非常に複雑で決して単一の経路で誘導されるものではないことも明らかとなった。今後は Syn-Rep マウスが様々な誘導メカニズムの DNT や神経発達症にも対応可能であるのかを検証して行く必要があると考えられる。このような観点から、次年度以降も、PTU 投与による行動異常への影響や DNT 陽性対照化学物質である鉛やクロルピリホスについても検討を行っていく予定である。

E. 結論

Syn-Rep マウスのレポーター遺伝子の発現をトレースすることで、成熟期の組織形成への影響（時間軸の異なる KE）さらには異常行動（AO）を紐付けできる可能性が示されるとともに、Syn-Rep マウスの DNT 評価における New Approach Methodology (NAM) としての有用性が確認された。また、母体の甲状腺機能低下と MIA による児の神経発達に対する影響には、共通したメカニズムが関与する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

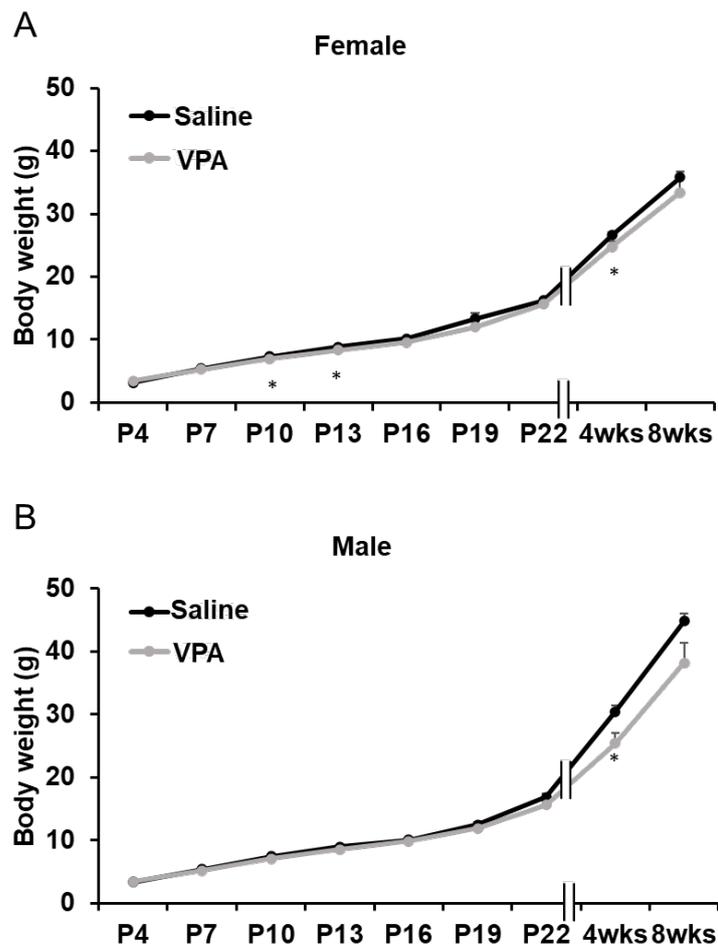


図1 E12.5にVPAを曝露したSyn-Repマウス児の体重変化

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

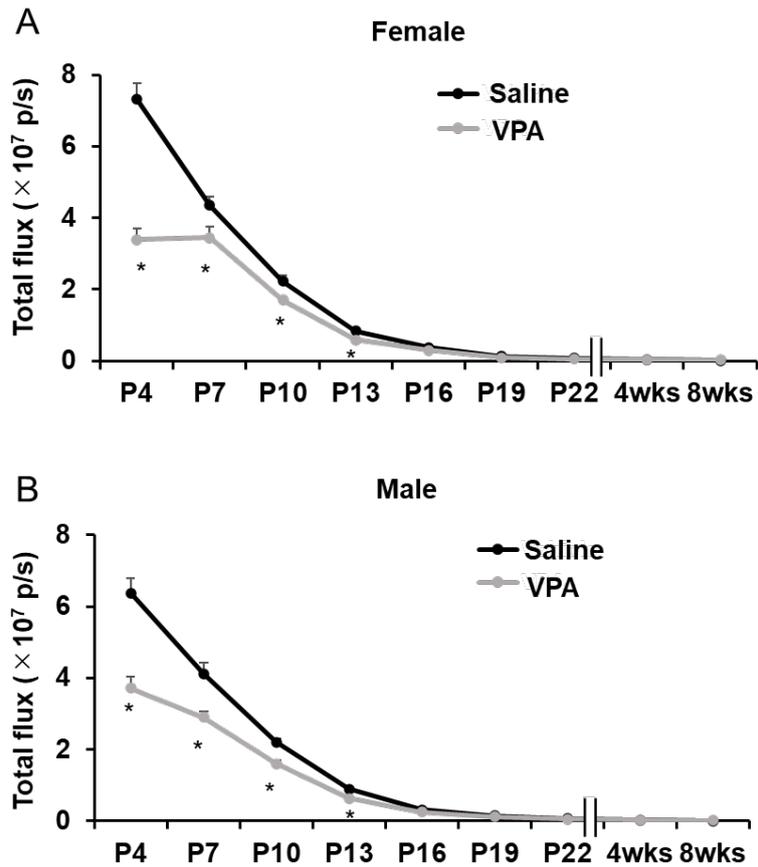


図2 E12.5にVPAを曝露したSyn-Rep児動物頭部の*in vivo*イメージング経時変化

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

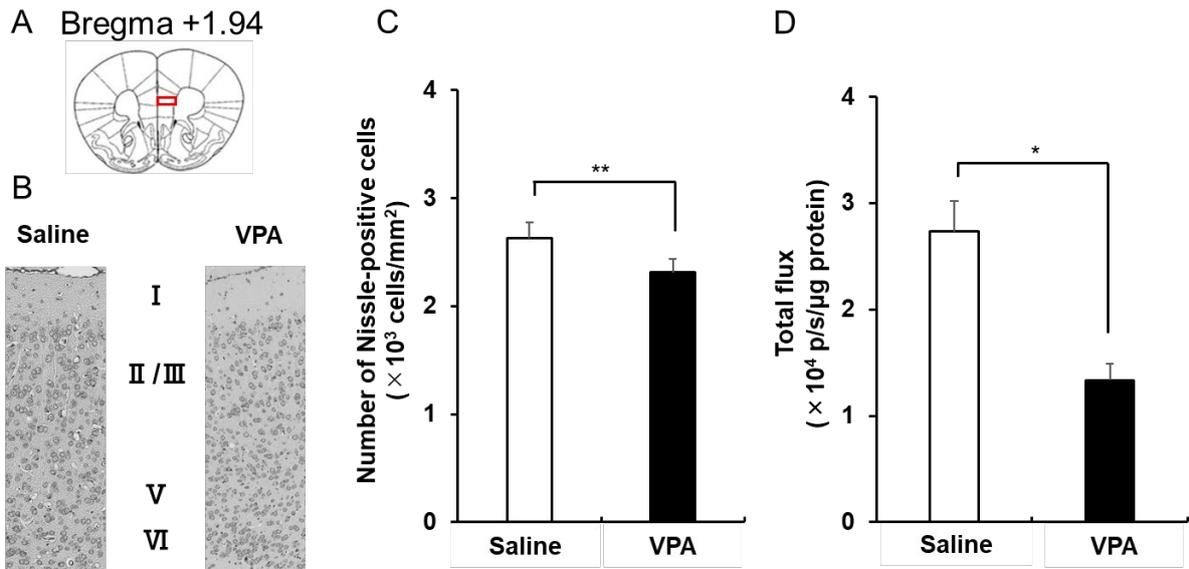


図3 E12.5にVPAを曝露した児動物の大脳皮質におけるNissl陽性細胞数とルシフェラーゼ活性評価

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

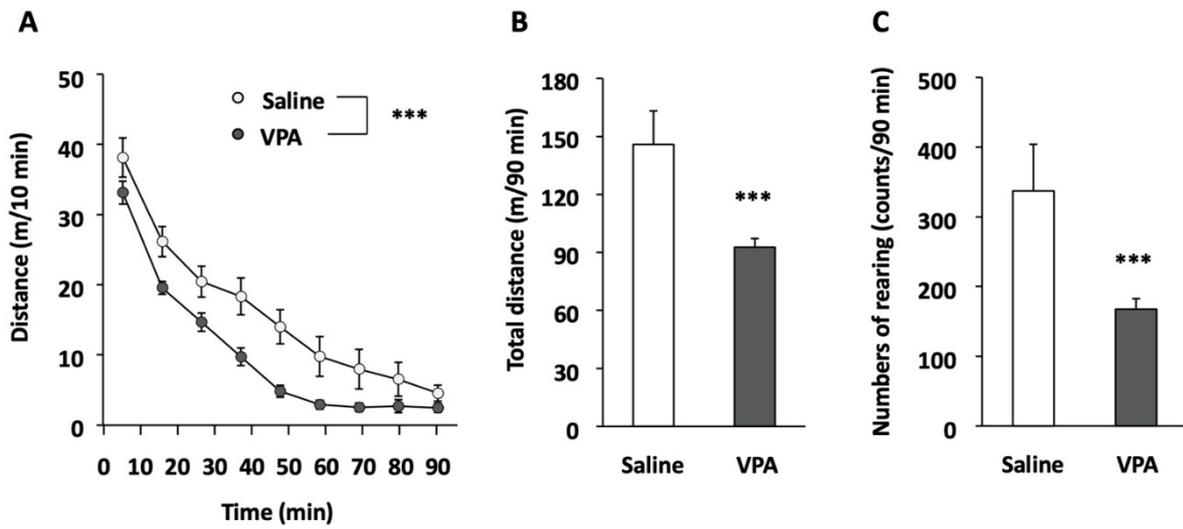


図4 E12.5 に VPA を曝露した児動物の自発行動変化

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

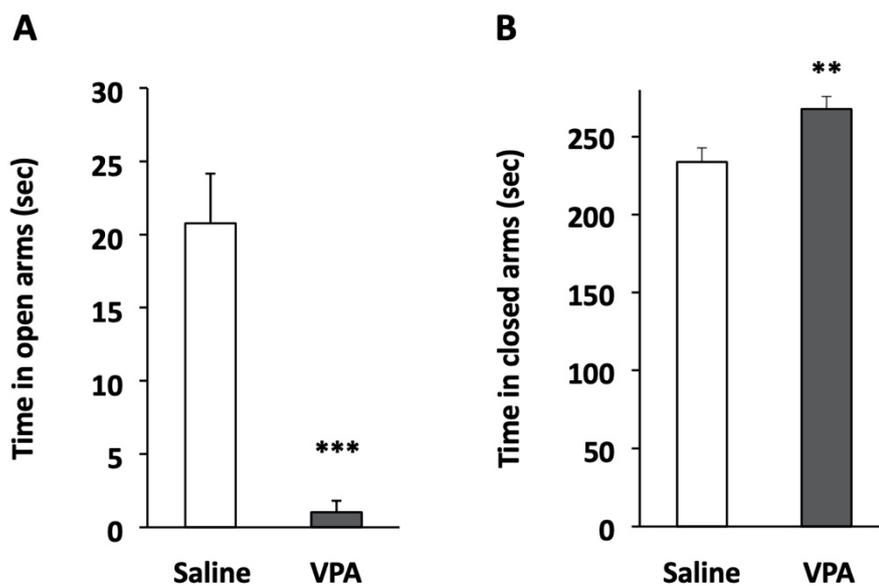


図5 E12.5にVPAを曝露した児動物の不安様行動の変化

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

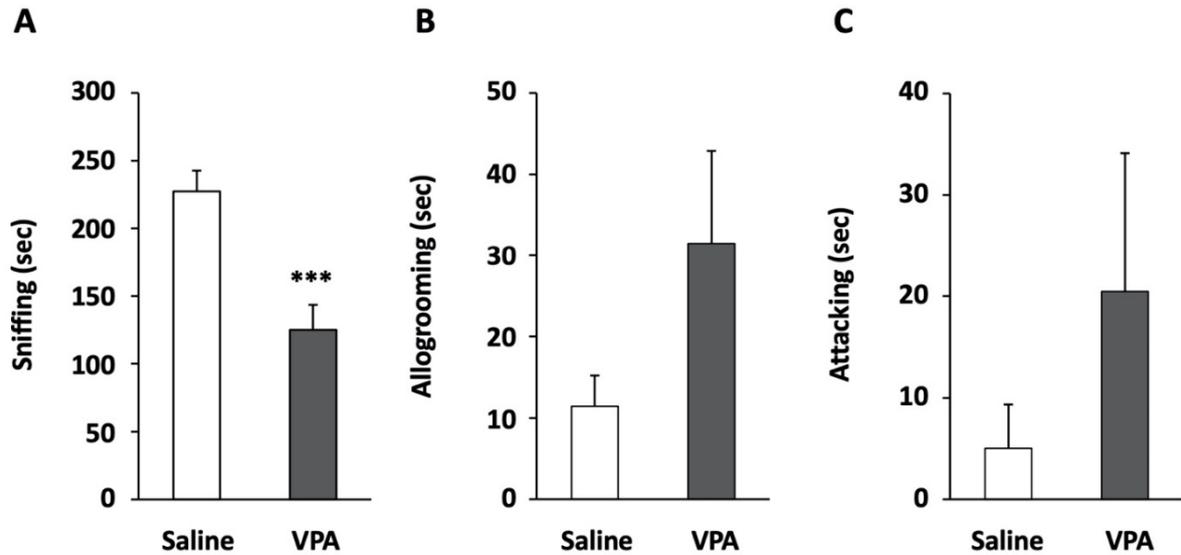


図6 E12.5にVPAを曝露した児動物の社会性行動の変化

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

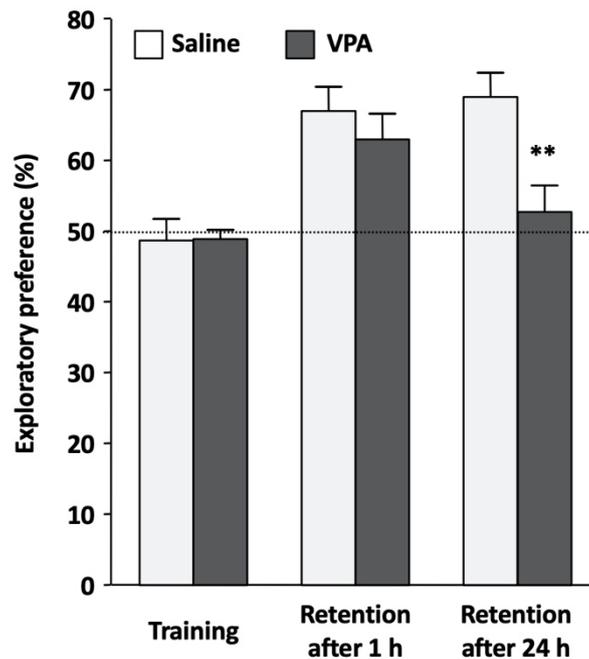


図7 E12.5にVPAを曝露した児動物の学習記憶能の変化

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

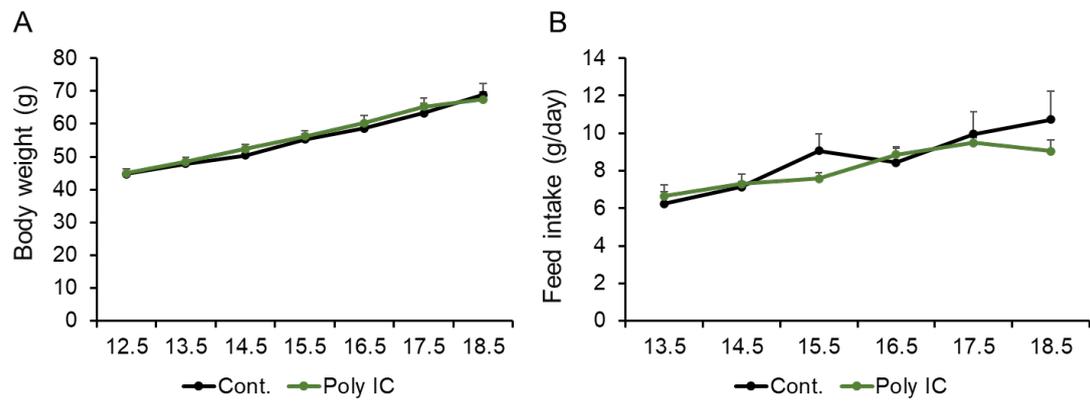


図 8 妊娠 12.5 日目に Poly(I:C)を投与した妊娠マウスの体重および摂餌量の変化
 妊娠 12.5-18.5 日目において妊娠母体の体重 (A) と摂餌量 (B) を測定した。

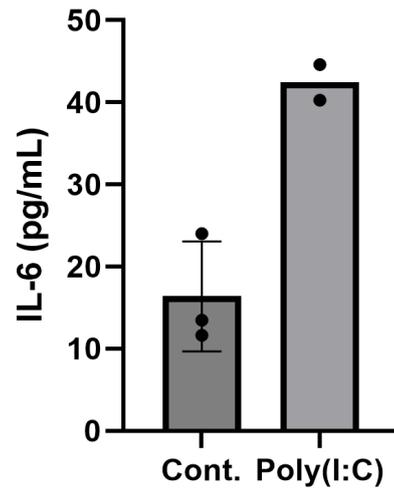


図 9 妊娠 12.5 日目に Poly(I:C)を投与した妊娠マウスの血清中インターロイキン (IL-) 6 レベルの評価

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

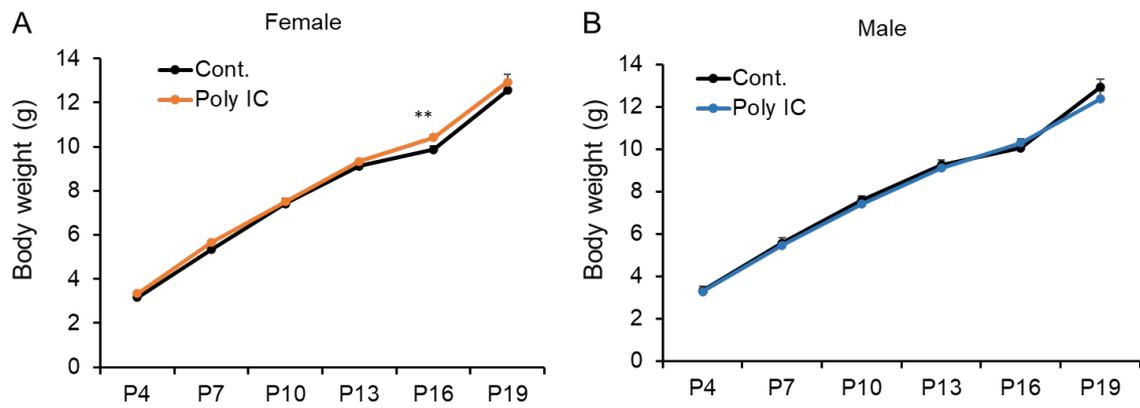


図 10 E12.5 に Poly(I:C)を投与した Syn-Rep マウス児の体重変化

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

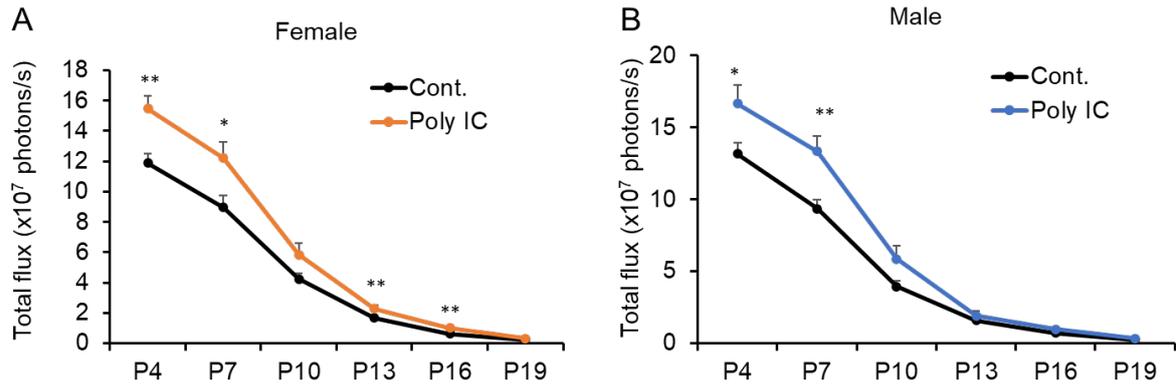


図 11 E12.5 に Poly(I:C)を投与した Syn-Rep マウス頭部の発光経時変化

出生後、P4、P7、P10、P13、P16、P19における児動物（A：雌、B：雄）に対して経時的に *in vivo* イメージングを行った。発光量測定には IVIS Lumina II を使用し、頭部の発光強度を Total flux として定量化した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (unpaired t test)。

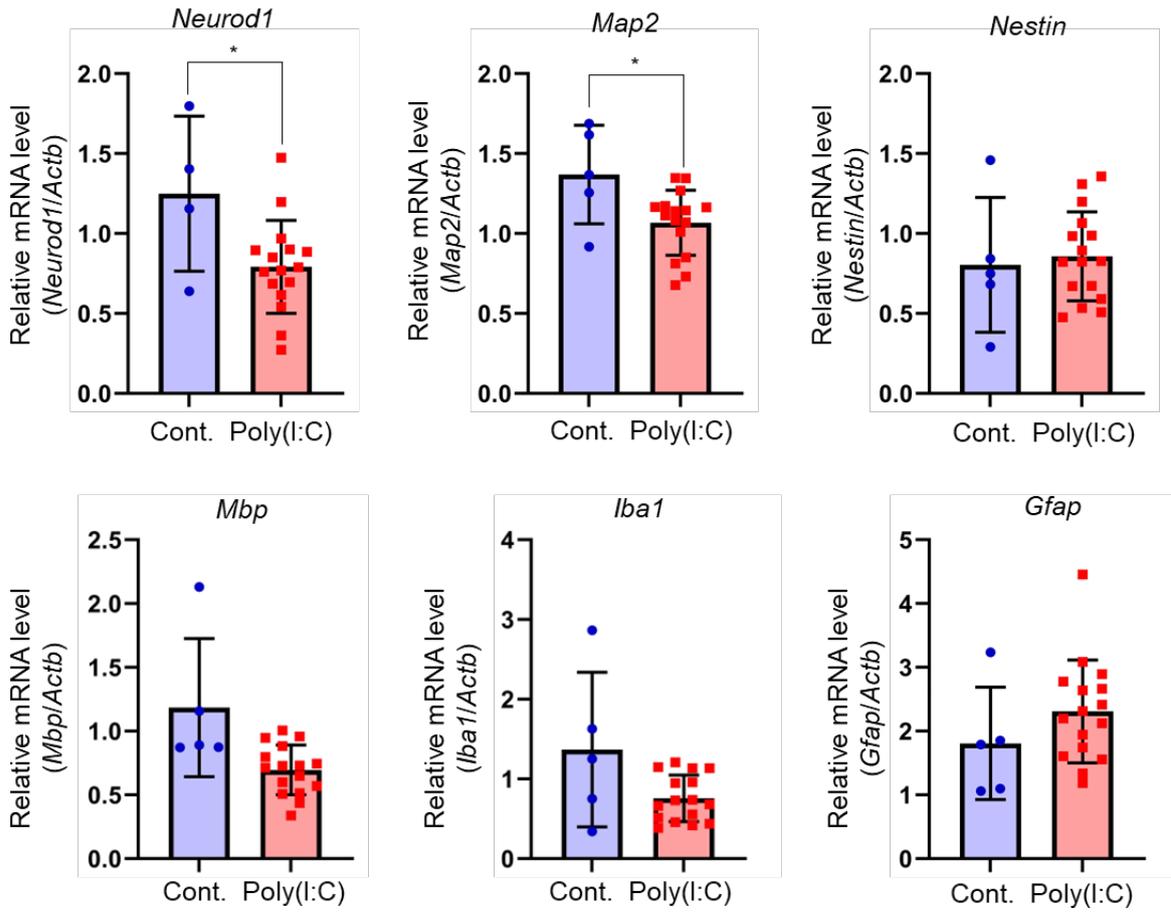


図 12 E12.5 に Poly(I:C)を投与した Syn-Rep マウス児の前頭前皮質における神経系マーカーの mRNA 発現量評価

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