

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

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

分担研究課題名：妊娠期～離乳期の甲状腺機能変動による次世代影響の検討

～Syn-Rep マウスを用いた児動物脳発達に対する影響の検証～

研究分担者：松丸 大輔（岐阜薬科大学 薬学部・准教授）

## 研究要旨

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

## A. 研究目的

大規模疫学調査によって母体の甲状腺刺激ホルモン（TSH）の上昇を伴うトリヨードチロニン（T3）／チロキシン（T4）の低下と児のIQ低下との間に明確な相関がみられるが、TSHの上昇を伴わないT3／T4の低下との相関は認められないことが報告されている。

本研究の目的を達成するためには、このような甲状腺機能低下状態を再現した条件で児動物への影響を検討する必要がある。近年、抗甲状腺薬であるプロピオチオウラシル（PTU）を妊娠ラットに投与した検討において、TSHの上昇を伴うT3／T4低下を誘導することが報告されている[Regul Toxicol Pharmacol. 137:105283 (2023)]。マウスにおいてもPTU投与により甲状腺機能低下状態を誘導することができたため、その用量依存性と神経影響の評価系の構築のための検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 動物

実験には雄性 Syn-Rep マウスと野生型雌性 ICR マウスを交配することで得られた妊娠マウスを用いた。交配後膈プラグが確認されたマウスを胎齢 0.5 日（E0.5）とした。動物実験の実施に関しては、岐阜薬科大学において遺伝子組換え実験および動物実験に関する承認を得て行った。また動物実験における動物保護および倫理指針を遵守し、わが国における「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律」（法律第68号・平成18年6月1日施行）またWHOの医学研究顧問委員会の勧告に基づく「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則」に準拠して以後の実験を行った。

### 2. 抗甲状腺薬の投与

プロピオチオウラシル（PTU: 6-プロピル-2-チオウラシル、Sigma-Aldrich #P3755）混餌投与は、PTUを完全調整食のAIN-93M（日本クレア）に10 ppm、もしくは250 ppm（w/w）

となるように混餌し、妊娠Syn-RepマウスにE6.5より自由摂取させることで行った。児動物の出生後も母動物にPTU混餌食を継続して与えた。生後13日齢 (P13) ~P21の期間は児動物の摂食も始まるため、混餌食のPTU濃度をそれぞれ半量 (5 ppm, 125 ppm (w/w)) に変更した (図1A)。出生後、得られた児動物については、児の成長の不均一性を排除するためにOECDガイドラインに準じて、P4において1匹の母体から合計8匹 (雌4匹・雄4匹) となるように間引きを行った。

### 3. 発達期動物の解析

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

#### 3-1. 摂餌量の解析

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

#### 3-2. 血清採取および甲状腺関連指標の解析

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

#### 3-3. *in vivo* イメージング解析

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

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

## 4. 統計学的解析

データは全て平均値±標準誤差で表し、統計学的処理には解析ソフト SPSS 15.0J for Windows (SPSS, Inc., USA) を用いた。多重比較検定はDunnnett's test、二群の比較は対応のない *t* 検定を行い、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## C. 研究結果

### 1. 母動物の解析

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

### 2. 児動物の解析

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

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

#### **D. 考察**

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

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

甲状腺機能低下に曝露された児の脳におけるレポーター分子の発現は上昇していた

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

#### **E. 結論**

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

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

## **F. 研究発表**

### **1. 論文発表**

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

### **2. 学会発表**

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

マウスの有用性検証、第49回日本毒性学会学術年会、札幌、2022年6-7月

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

## **G. 知的所有権の取得状況**

該当なし

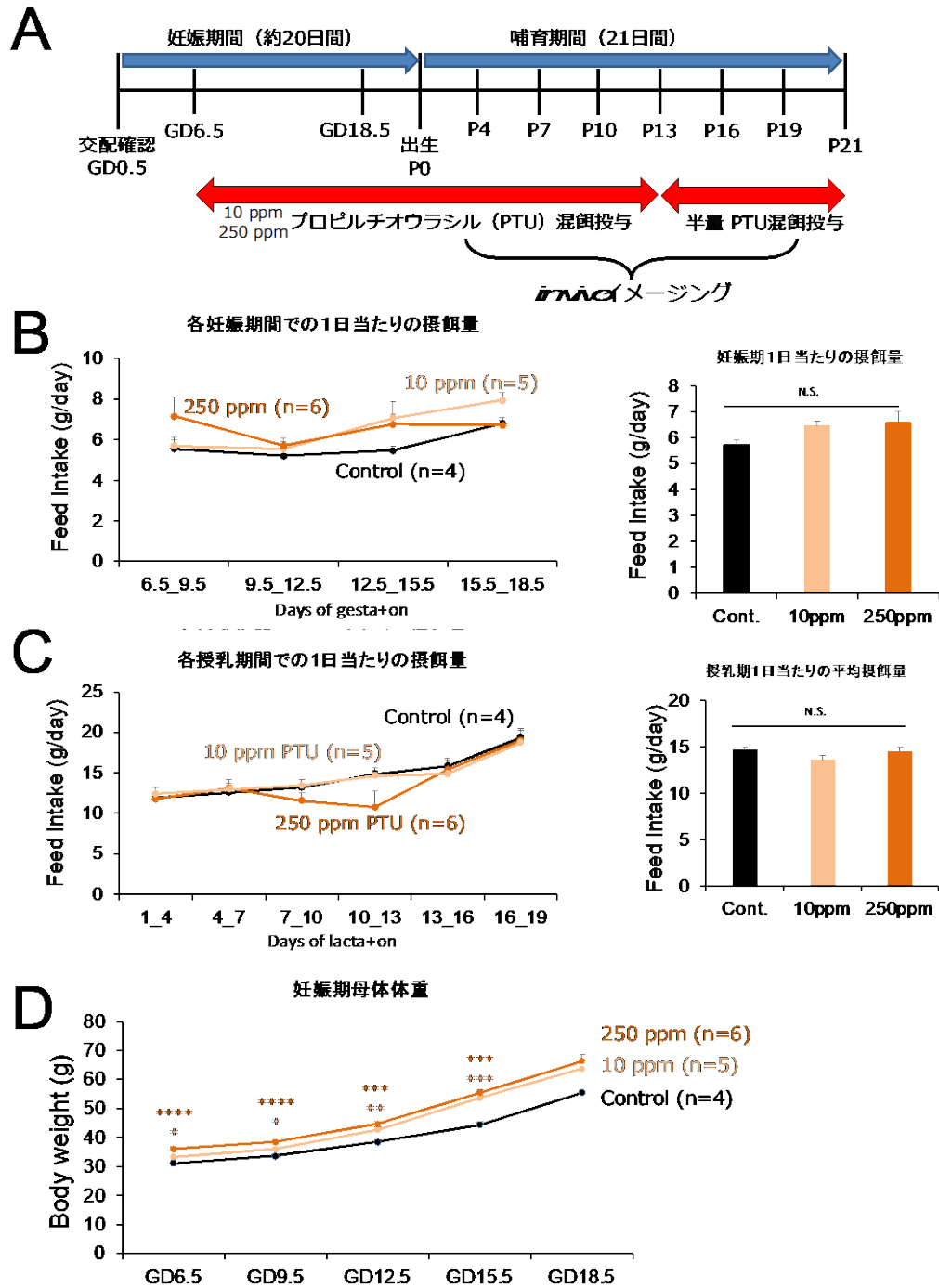
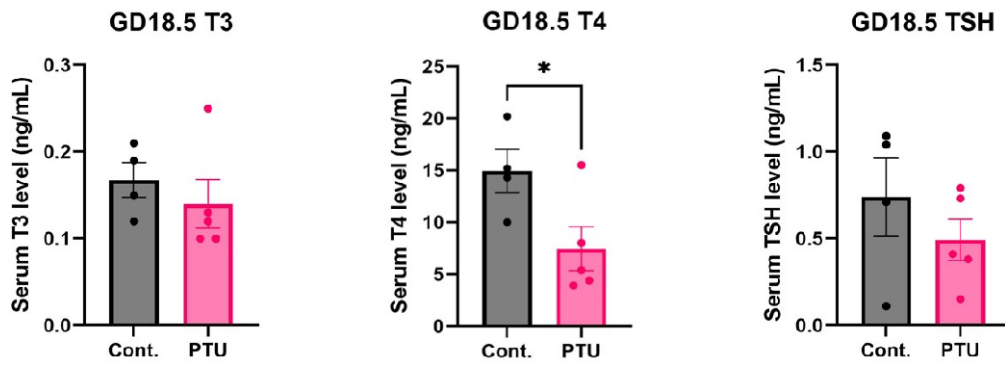


図1 高用量 PTU 混餌投与による甲状腺ホルモン機能低下誘導モデルの作成

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

A



B

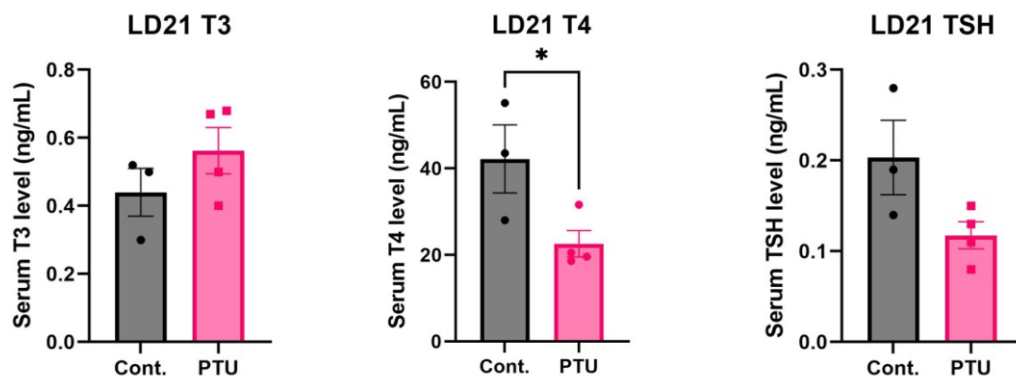


図2 PTU 10 ppm 投与母動物における血清甲状腺関連ホルモン量の解析

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

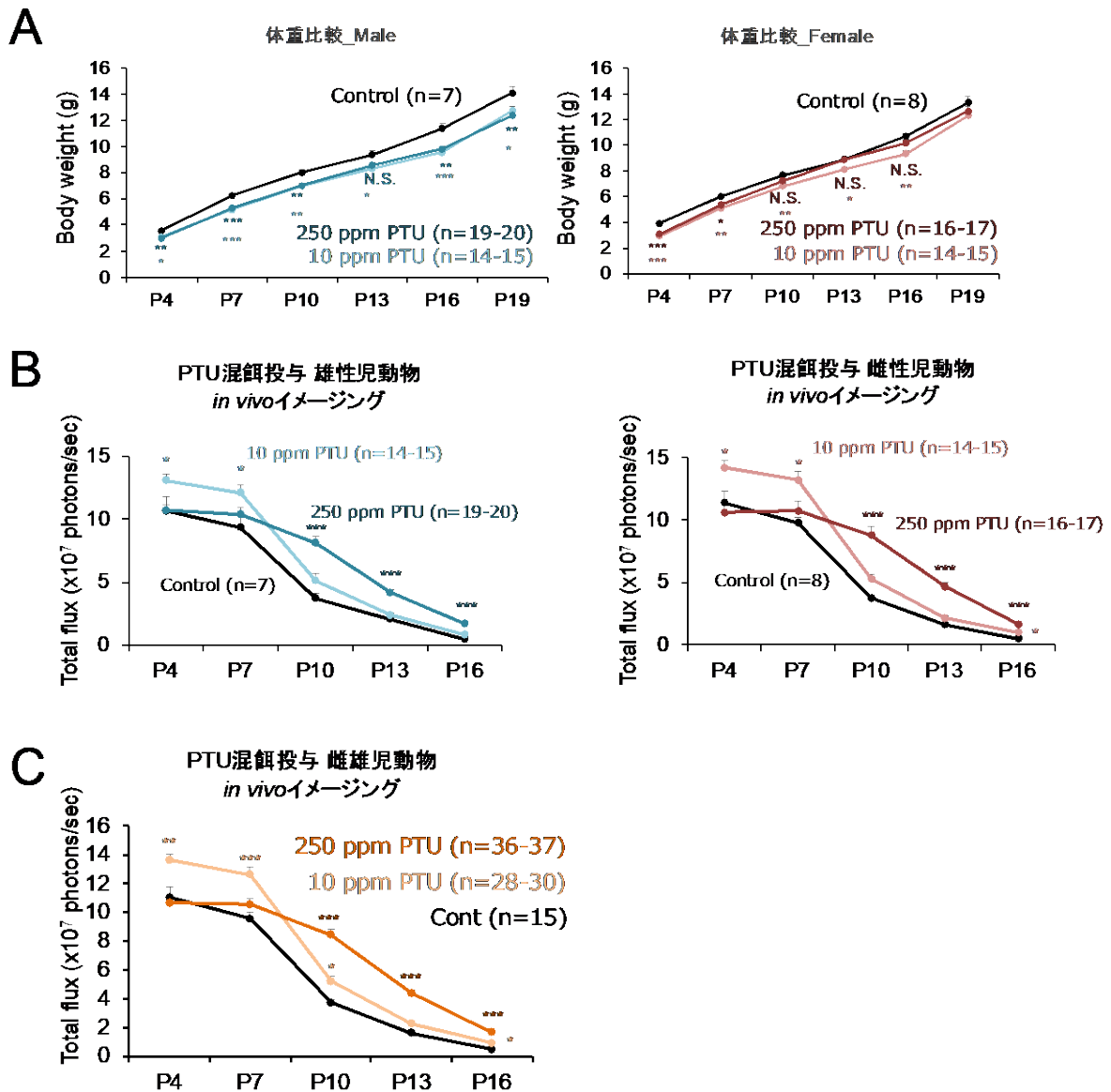


図3 PTU 混餌投与児動物の体重変化及びイメージング解析

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