

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)

**I. 総括研究報告書**

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）  
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。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。

今年度は、マウスにおいて抗甲状腺薬プロピルチオウラシル（PTU）を様々な用量で母動物に曝露し、妊娠期から甲状腺機能を低下させた際の甲状腺関連指標の変動と児動物への影響の相関を検討した。特に脳発達への影響については、児動物脳の神経発達状態を非侵襲的にトレースできると期待されるレポータートランスジェニックマウス（Syn-Repマウス）を用いて検討を行った。また前述の *in vivo* 実験で得られた結果を基に、ヒトiPS細胞などを用いて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* 試験法の構築を試みると共に、甲状腺機能低下時における遺伝子発現変動の網羅的解析も試みた。

その結果、今年度は以下のことを明かにした。

1. 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。
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. 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評価におけるNew Approach Methodology（NAM）としての有用性が示された。
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、甲状腺ホルモン受容体（THR） $\alpha$ が神経細胞分化に重要であるとともに、THR $\alpha$ 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。

以上より、甲状腺機能低下による次世代影響は、脳以外では認められなかったことから、妊娠～離乳期の母体甲状腺機能低下における次世代影響は脳が最も鋭敏なエンドポイントである可能性が示された。また 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。

今後は Syn-Rep マウスを用いて、妊娠～離乳期に甲状腺機能を低下させた際の、脳神経系構築への影響の詳細を解明すると共に、各種行動試験との紐付けを行うことで、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）の全容解明を試みる。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同定に繋がりたいと考えている。また *in vivo* 実験で得られた結果を基に、ヒト iPS 細胞などを用いた *in vitro* 試験でも用いることが可能な有効なマーカー分子を見出し、これを用いた *in vitro* 評価法の構築を目指す予定である。

## 分担研究者

諫田泰成	国立医薬品食品衛生研究所・部長
田熊一敬	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	岩手医科大学 医学部・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 (クレチン症) のような極端な症状を誘導するものではなく、甲状腺ホルモン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。

そこで本研究では、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を、DNT 陽性対照物質のリストから選定したバルプロ酸ナトリウム (VPA) を用いて検証することと共に、このマウスを用いて妊娠中に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試みた。また甲状腺機能低下モデルのヒト iPS 細胞の作製を行い、DNT 陽性対照物質をモデル化合物として曝露した際の影響を検証することで、甲状腺機能低下モデル細胞として有用性を検討した。

## **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、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. 抗甲状腺薬の投与**

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 (P63:図 1A)。

### **3. 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 GD12.5 日時に VPA 500 mg/kg を腹腔内に単回投与した。MIA モデルマウス作製には合成二本鎖アナログである Polyinosinic acid-polycytidylic acid (Poly(I:C)) するウイルス感染模倣モデルを用いた。Poly(I:C) の投与は MIA の誘導が報告されている GD12.5 に 20 mg/kg を腹腔内に単回投与した。いずれの実験も、対照群には生理食塩水を投与した。

### **4. 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。PTU 混餌食 (2、10、50 および 250 ppm (w/w)) を GD6 から GD18 まで自由摂取させた。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、ナカライテスク) 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。

## 5. 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的パラメーターの測定はオリエンタル酵母に依頼した。

## 6. 血清中 IL-6 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。

## 7. *in vitro* ルシフェラーゼアッセイ

母動物または Syn-Rep マウス児動物を安楽死させた後に各臓器を摘出した。ホモジナイズ処理後、上清を回収した。黒色の 96 穴プレートに上清を添加し、これに D-luciferin 緩衝液を添加後、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  $\mu\text{g}$  量当たりのルシフェラーゼ活性（photons/second/ $\mu\text{g}$  protein）を算出した。

## 8. 脳の組織学的解析

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、前固定液中で振盪した。PBS で洗浄後、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。

また脳の組織形態学的変化は、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% PFA で組織を固定した。全脳をパラフィン包埋し、厚さ 5  $\mu\text{m}$  の冠状切片を作製した。切片を MAS coating slide glass に貼付し、洗浄および浸漬した後、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

した後、封入し、Nissl 陽性細胞数を測定した。

## 9. *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。

## 10. 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。

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。

## 11. 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。

細胞内の ATP の定量は、ATP determination kit (Thermo Fisher Scientific) によるルシフェラーゼ法に基づいて定量した。

## 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  $\alpha$  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  $\alpha$  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もの参照されたい。)

### 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 投与群においてトリヨードチロニン (T3)、チロキシン (T4) の有意な低下および TSH の有意な上昇が認められた (P26: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 (P27: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 投与による母体へのその他の影響

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 (P29:表 1、P30:表 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 投与群では変化は認められなかった (P30:表 2)。

また血清中の生化学的パラメーターについても評価を行ったところ、50、250 ppm で Ca の低下 (P28:図 3H)、250 ppm で総コレステロール (P28:図 3O) および LDL コレステロール (P28:図 3Q) の上昇が認められた。ま

た、50 ppm で尿素窒素の低下 (P28:図 3C)、10 ppm で総ビリルビンの上昇 (P28:図 3S) が認められた。

### 1-3. 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 (P31:表 4)。また、外表検査 (P32:表 5)・内臓検査 (P33: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 (P33:表 7、P34:表 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 マウスの DNT 評価系としての有用性の検討

### 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 (P35:図 4)。

その結果、成体マウスでは雌雄ともに、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。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、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。

### 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、各日齢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 P4 および P7 の大脳皮質前部、大脳皮質後部で最も高

い Luc2 の発現が認められた (P36:図 5A)。またその経時的な発現変動は、胎齢 18.5 日 (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 (P36: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 (P36: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。

Luc2 と同時に発現するもう一つのレポーター分子である LacZ の発現についても、脳スライスを X-gal 染色することで解析を行ったが、Luc2 の発現パターンと同様の傾向が認められた。

### 2-3. 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。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 (P38:図 7)。また、発達期脳の発光パターンは定常状態では性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。

また毒性試験においては、被験物質が非特異的に児動物の体重抑制を誘導する可能性があり、その結果、脳に直接影響が認められなくとも発光の低下が起こる可能性が懸念される。そこで発達期の体重差が *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の検討を加えた。その結果、P22 の雄 ( $R^2 = 0.6617, P = 0.0002$ ) (P39: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。

#### 2-4. 胎生期 VPA 曝露に対する Syn-Rep マウスのレポーター分子応答性の検証

Syn-Rep マウスを用いて、E12.5 に VPA を投与した雌雄児動物の影響について解析を行った。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。この条件下で発達期の脳を対象にした *in vivo* イメージングを行ったところ、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 (P48:図 2 A, B)。またこの傾向は雌雄ともに確認された。

また 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 (P49:図 3 B, C)。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 (P49:図 3 D)。

#### 2-5. 胎生期 VPA 曝露を受けた児動物の行動薬理学的解析

この投与条件における VPA の児動物への影響について行動薬理学的解析を行った。新奇環境下での自発運動に及ぼす VPA 曝露の影響をオープンフィールド試験により検討した (P50: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、総移動距離および立ち上がり回数が対照群と比べて有意に減少していた。また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 (P52: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 (P52:図 6A)。また、VPA 曝露群では毛づくろい行動 (P52:図 6B) および攻撃行動 (P52:図 6C) は有意ではないものの、

増加傾向が認められた。

### 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 Syn-Rep マウス児動物脳のレポーター分子発現の検証

研究結果 第 2 項で確立した Syn-Rep マウスを用いて、PTU で妊娠期から母体の甲状腺機能低下を誘導した際の児動物脳への影響について検討を行った。第 1 項の研究結果を基に、PTU による甲状腺機能低下誘導の閾値と考えられる 10 ppm と、完全に甲状腺機能を抑制すると考えられる 250 ppm の 2 用量で検討を行った。

その結果、出生後、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 (P65:図 3A)。しかしこの影響に用量依存性は認められなかった。また児動物の脳における *in vivo* イメージング解析では、甲状腺機能低下条件下ではどちらの用量も雌雄共にレポーター分子の発現が高くなった (P65:図 3B, C)。しかしその発現パターンは用量によって異なっており、生後直後~7 日齢までは 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 (P65: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。

#### 3-2. Poly(I:C)を用いた MIA 誘導時における Syn-Rep マウス児動物脳のレポーター分子発現の検証

妊娠期~離乳期における Syn-Rep マウスの甲状腺機能低下は、児動物脳のレポーター分子の発現を上昇させる結果となったが、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 (MoAs) で誘導されることが示唆される。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。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)の影響を Syn-Rep マウスを用いて予試験的に検討した。Poly(I:C) 投与 3 時間後の母体血清 IL-6 レベルを測定したところ、顕著に増加していた (P55: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。この条件下で生まれてきた児動物の脳について *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 (P57:図 11A, B)。なお Poly(I:C)投与による母動物の体重や摂餌量、児動物の体重増加への顕著な影響は認められなかった (P54:図 8、P56:図 10)。

#### 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 $\alpha$ 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 DNT 陽性化学物質曝露の影響

前年度はヒト iPS 細胞にて THR $\alpha$  のノックダウンを行い、甲状腺機能低下モデルの作製を行った。本年度は、THR $\alpha$  ノックダウン iPS 細胞を用いて、DNT 陽性化学物質を曝露し、甲状腺機能低下が化学物質による神経 (外胚葉) 分化抑制に対して与える影響の検証を行った。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 (P71:図 2)。THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、CPF を曝露すると、control の細胞と比べて PAX6 の発現が約 50% 抑制されることを見出した (P71:図 2)。したがって、THR $\alpha$  は CPF による発達神経毒性に関与している可能性が考えられた。また以上より、甲状腺機能低下症のモデルとして

THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞が有用である可能性が示唆された。

##### 4-2. THR $\alpha$ の下流で神経 (外胚葉) 分化に関わる遺伝子の探索 (NGS 解析)

THR $\alpha$  ノックダウンしたヒト iPS 細胞を神経 (外胚葉) 分化させたところ、scramble shRNA を導入した細胞と比べて分化マーカーである PAX6 の発現は約 30%減少した (P71:図 2)。従って、THR $\alpha$  は神経 (外胚葉) 分化に関与すると考えられる。そこで NGS 解析により、THR $\alpha$  の下流で神経 (外胚葉) 分化に関わる遺伝子の探索を試みた。THR $\alpha$  ノックダウン細胞で発現が低下している遺伝子を探索した結果、神経分化に関わる因子 A、B (P72:図 3)、軸索伸展に関わる因子 C (P73:図 4)、D (P74:図 5) などの遺伝子を抽出することができた。

#### 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. マウスにおける PTU 反応性とラットとの種差について

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 T4 のみが 50%程度抑制される軽微な甲状腺機能低下に留まった (P64:図 2)。そこでマウスにおいて甲状腺機能低下を誘導する PTU の用量域を同定するために、同様の投与スケジュールで PTU の用量を変化させて検討を行った。その結果、出産直前のタイミングにおいて、ラットと同様の甲状腺機能低下を誘導するには 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 であることが明らかとなった (P26:図 1)。

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。

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は T4 が低下する個体がいくつか見られる程度の微妙な影響であるが、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 (P27:図 2)。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閾値であると考えられた。

## 2. マウスにおける妊娠期甲状腺機能低下の胎児発生・器官/骨格形成への影響について

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 (P29: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 (P31: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。

### **3. Syn-Rep マウスの DNT 評価における New Approach Methodology (NAM) としての有用性について**

本研究で用いる Syn-Rep マウスでは、レポーター分子である Luc2 および LacZ の脳における発現が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 (P36:図 5、P37:図 6)。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、線条体、視床下部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かなり衰退するパターンを示した (P36:図 5)。Syn1-CAT マウスにおいても同じような発現のパターンであることが報告されていることから、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 Syn-Rep マウスの発達期の脳に対する *in vivo* イメージングでは、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、経時的変化を良好に検出することができた (P38:図 7)。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。

得られた Syn-Rep マウスの基礎データを基に、DNT 評価における Syn-Rep 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 (P48:図 2)。また 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を確認された (P49:図 3)。

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、雄の児動物においては ASD 様の社会性行動異常を誘導した (P50:図 4、P52:図 6)。また本総括研究報告書では触れていないが、雌雄児動物の不安行動の増加、学習記憶能の低下も観察されたことから、レポーター遺伝子の発現変動が行動異常を捉える指標となる可能性が示された。

Syn-Rep マウスのレポーター分子はシナプス構築タンパク質 Syn1 のプロモーターで発現制御されていることから、VPA 曝露による頭部発光の低下はシナプス構築状態の異常を反映していると考えられる。一方でヒトにおいても ASD をはじめとする神経発達症においては、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が知られている。このことから 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可能性が考えられた。しかしその一方で化学物質による 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。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、DNT 陽性対照化学物質についても検討を行っていく予定である。

### **4. 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**

Syn-Rep マウスを用いた検討で、妊娠期か

ら PTU を投与した児動物脳においてレポーター分子の発現が上昇していたことから、甲状腺機能低下によって誘導される DNT ではレポーター分子の発現上昇をもたらす可能性が示された。また本検討では、PTU 10 ppm 投与群でもレポーター分子の発現が上昇することを確認しているが (P65:図 3)、これは本研究の最も特筆すべき成果の一つであると考えている。すなわちこの結果は、母体血清中の甲状腺関連ホルモンに変動が認められない程度の甲状腺機能低下 (PTU 10 ppm) でも児動物脳の発達には何らかの影響を与える可能性を示すとともに、ガイドライン試験で追加された母体血清中の甲状腺関連ホルモンの定量では、甲状腺機能低下時に最も懸念される DNT を捉えることができない可能性を示唆している。今後、レポーター分子の発現変動が行動異常などの AO とどのような関係にあるのかを定量的に検証する必要があるものの、レポーター分子の発現が、甲状腺機能低下時に誘導される DNT を精度良く予測するためのバイオマーカーの候補になる可能性が示された。また甲状腺関連ホルモン変動の閾値付近で誘導される程度の甲状腺機能低下で DNT が誘導されるのであれば、今後は甲状腺関連ホルモンに変わる新たな血清バイオマーカーを探索する必要があると考えられる。

一方で、Syn-Rep マウスレポーター分子は、PTU の用量依存的な発現上昇を示したものの、その経時的な発現プロファイルは 10 ppm 投与群と 250 ppm 投与群では異なっており、レポーター分子の発現のピークが高用量の方が遅れて起こるようなパターンを示した (P65:図 3)。特に生後直後～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くなる逆転現象が起こった。これらの用量では、段階的な甲状腺機能低下が誘導されたにも関わらず、このような逆転現象を引き起こした原因としては、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。また脳神経系の構成細胞には神経細胞の他に、アストロサイト、オリゴグロンドロサイト、ミクログリアがあり、甲状腺ホルモンはこれらの細胞に対しても成熟の段階と脳内の局在に応じて、分化等を促進することが報告されている [*J. Endocrinol.* 189: 189-97 (2006), *J. Neurobiol.* 40: 497-512 (1999), *J. Neurosci.* 21: 2028-38 (2001)]。またこれらの細胞が影響を受ける甲状腺ホルモンの濃度域は、細胞によっても異なる可能性もある。さらに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たり [*PLoS ONE.* 9: e109753 (2014), *Mol. Cell. Endocrinol.* 499:110594 (2020)]、グリア系細胞の活性化が示唆されている [*Int. J. Mol. Sci.* 23:11938 (2022)] ことから、今後は神経細胞以外の脳構成細胞にも注目して、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る。

また我々は、前述の通り DNT 陽性対照物質である VPA を妊娠期に投与した際の Syn-Rep マウス応答性についても解析を行っているが、PTU の結果とは逆に、レポーター分子の発現が有意に低下した (P48:図 2)。これは VPA が発達期の神経細胞数を減少させることから、この結果はそれを反映したものであるが、本研究の結果から、甲状腺機能低下によって誘導される DNT は少なくとも VPA とは異なるメカニズムによって誘導されるものと考えられる。一方で、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ところ、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、PTU 10 ppm 曝露群と類似の発現パターンを示した (P57:図 11)。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。

化学物質によって誘導される DNT には、それに至るまでの多様なメカニズムが存在すると考えられているが、Syn-Rep マウスを用いた DNT 評価はこの多様な影響にも対応して検出できる可能性を示唆している。今後は様々な化合物等についても検討を行うとともに、これらの作用機構の相違・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ている。

## 5 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

今年度は、THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞を用いて、本研究班で選定した DNT 陽性対照物質 CPF の影響を解析した。エンドポイントとして ATP 産生を指標とした解析では iPS 細胞、THR $\alpha$  ノックダウンした iPS 細胞において CPF に対する細胞応答には大きな違いは認められなかった (P70:図 1)。一方、神経分化を指標とした解析では THR $\alpha$  ノックダウンしたヒト iPS 細胞では、CPF による神経分化抑制が認められた (P71:図 2)。このことから、ヒト発達期における神経毒性に THR $\alpha$  が関与していることが示唆される。

THR には  $\alpha$  と  $\beta$  のアイソフォームが存在することが知られている。ノックアウトマウスを用いた研究により、 $\alpha$  は神経発生に関係するが、 $\beta$  はフェノタイプが認められていない [Krieger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2019]。また、分化誘導にともない THR $\alpha$  の発現が選択的に亢進したことから、今回は THR  $\alpha$  を優先的に評価し、神経分化に影響があることを明らかにした。しかしながら、THR $\alpha$  と  $\beta$  の機能的な違いについては明らかになっておらず、甲状腺機能低下による子どもの影響を考慮する上でどちらが重要であるのかを慎重に検討する必要がある。さらに神経分化時に THR $\alpha$  の下流で働く可能性のある遺伝子を探索した結果、神経分化や軸索伸展に関与する遺伝子を同定した (P72~74: 図 3~5)。こうした遺伝子と甲状腺機能低下

の関連についても検討を進め *in vivo* でも機能するのか検証する必要がある。

今後は、金属などの発生毒性や神経毒性が懸念されている他の化学物質に焦点を当てて同様に曝露影響の解析を行い、本モデルの有用性を明らかにする必要がある。

## E. 結論

1. 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。
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. 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 評価における NAM としての有用性が示された。
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、甲状腺ホルモン受容体 (THR)  $\alpha$  が神経細胞分化に重要であるとともに、THR $\alpha$  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。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 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)
  - 7) 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)
  - 8) 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)
  - 9) Yasuhiko Y, Ishigami M, Machino S, Fujii T, Aoki M, Irie F, **Kanda Y**, Yoshida M. Comparison of the lower limit of benchmark dose confidence interval with no-observed-adverse-effect level by applying four different software for tumorigenicity testing of pesticides in Japan, *Regul Toxicol Pharmacol* 133:105201 (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) 諫田泰成：化学物質のインビトロ発達神経毒性評価—甲状腺ホルモンの影響評価の取り組み、第49回日本毒性学会学術年会、札幌、2022年7月
  - 5) 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
  - 6) 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
  - 7) 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
  - 8) 諫田泰成：甲状腺機能を考慮したインビトロ神経毒性試験法の開発、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
  - 9) 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
  - 10) 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
- 11) 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
  - 12) 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
  - 13) 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
  - 14) 諫田泰成、安彦行人：新たなアプローチによる薬理試験の展開、第96回日本薬理学会年会、横浜、2022年12月
  - 15) Kanda Y: Current status and future challenge of developmental neurotoxicity, 3rd Asian Congress for Alternative to Animal Experiment, 済州, 2022年12月
  - 16) Kanda Y: hiPSC-derived neural cells for chemical toxicity evaluation, Inaugural International Scientific Conference of the SAAT- SL, コロンボ, 2023年2月
  - 17) 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

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし