

令和 5 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5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
～SynRep マウスの有用性評価と甲状腺機能低下を誘導する化学物質の次世代影響評価～
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（岐阜薬科大学 薬学部・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とから、甲状腺機能低下を誘導する化学物質の次世代影響が懸念されている。しかし甲状腺関連指標の変動と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、この問題の解決に向けて化学物質等の脳発達への影響を効率的に評価できることが期待されるSyn-Repマウス有用性評価を行ってきた。今年度は、バルプロ酸（VPA）や抗甲状腺薬プロピルチオウラシル（PTU）とは異なった作用機構でDNTを誘導すると考えられる酢酸鉛（PbAc）を用いて、PbAc曝露に対するSyn-Repマウス応答性と脳発達との関連について検証した。また血清中TSHレベルに与える影響についても検討を行った。実質曝露量相当である200 ppm PbAcを周産期曝露したSyn-Repマウス児動物について*in vivo*イメージングを行ったところ、頭部レポーター活性は対照群と比較して出生後4日目（P4）で高値、P10で低値を示した。これらの児動物についてP21の血清中TSHレベルを測定したが、変化は認められなかった。この結果からSyn-Repマウスは、VPAやPTUとは異なった作用機構のDNT陽性対照物質の影響も検出できる可能性が明らかとなった。また甲状腺ホルモンシグナルかく乱をすることが懸念されている他の化学物質の次世代影響についても検討を行うために、代替ビスフェノールであるfluorene-9-bisphenol（BHPF）についてマウスを用いた出生前発生毒性試験（TG414）を実施した。既にBHPFは生殖発生毒性を誘導することが報告されているが、我々の検討では妊娠期のBHPF曝露は母体甲状腺機能や児動物の器官形成および骨格形成には影響を与えないことが明らかとなった。

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（TH）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。

このような背景のもと我々は、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）のプロモーター制御下でルシフェラーゼ（Luc2）とLacZの融合遺伝子をレポーター遺伝子として有するSyn-Repマウスを独自に開発した [Biochem.

Pharmacol. 206:115332 (2022)]. 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、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。これまでの検討では、DNT 陽性対照物質の VPA を胎生期の Syn-Rep マウスに曝露すると、神経細胞数の減少を反映したレポーター分子の発現の低下が起こるが、PTU を用いた周産期甲状腺機能低下モデルや Polyinosinic acid-polycytidylic acid (Poly(I:C)) を用いた妊娠母体の免疫活性化 (MIA) モデルでは、アストロサイトの活性化を伴ったレポーター分子の上昇が確認されている。そこで今年度は、Syn-Rep マウスの更なる有用性を検証するために、甲状腺機能への影響が報告されており尚且つ DNT 陽性対照物質でもある酢酸鉛 (PbAc) による脳発達と血清中 TSH レベルへの影響を検討した。

他方、我々はこれまでに、代替ビスフェノールである fluorene-9-bisphenol (BHPF) が市販の飲料用ボトルに溶出し、ヒト血中から検出されること、*in vitro* で強い抗エストロゲン作用を示すことを報告しており、動物実験においても BHPF が発生毒性を引き起こす可能性を見出している [*Nat. Commun.* 8:14585 (2017)]. また BHPF は魚類に対して甲状腺機能をかく乱することが報告されていることから、ヒトにおいても発達期の甲状腺機能がかく乱を介して次世代影響を与える可能性が懸念される。そこで今年度は、妊娠期の BHPF 曝露における母体の甲状腺機能と胎児発生への影響 (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。

B. 研究方法

1. Syn-Rep マウスを用いた発達期の PbAc 曝露による脳発達への影響評価

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。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。

1-2. 薬物の投与

投与スケジュールは OECD テストガイドライン No.426 (発達神経毒性試験) に準じて実施した。PbAc (関東化学、純度 > 99.5%) を 200 ppm および 1,000 ppm の用量で飲用水に混ぜ、妊娠 Syn-Rep マウスに妊娠 6 日目 (GD6) から自由摂取させた。児動物の出生後も飲水投与を継続し、出生後 21 日目 (P21) まで投与した。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、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。

1-3. *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 D-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 (Luc2 由来のレポーター活性)

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P16まで測定した。

1-4. 血清中 TSH レベルの測定

血清中TSHレベルの測定は残留農薬研究所の方法に準拠し、マウスTSH測定キット (Merck Millipore, #MPTMAG-49K) を用いて実施した。血清と抗TSH抗体ビーズを反応し、ビーズを洗浄した。ビーズに検出用抗体を反応させ、洗浄後さらに Streptavidin-Phycoerythrinを反応させた。各試薬を反応させたビーズをFACSFlow (BD Bioscience, #342003) に懸濁後、BD FACSVerse (BD Bioscience) でビーズの蛍光強度を測定した。各動物の血清中TSHレベルは作成した検量線より算出した。

1-5. 脳組織学的解析

P21 の児動物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 (PFA) 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。Nissl 染色は、0.1%クレシルバイオレット溶液で 10 分染色した。組織免疫化学染色は pH6 のクエン酸バッファーを用いて賦活化処理後、内在性ペルオキダーゼを 3% H₂O₂ 液で不活性化し、非特異的な抗体反応を抑えるために G-Block (GenoStaff) を用いてブロッキングを行った。anti-IBA1 抗体 (ミクログリア特異的マーカー) (富士フイルム和光純薬株式会社, #011-27991) および anti-GFAP 抗体 (アストロサイト特異的マーカー) (Cell Signaling Technology, #3670S) を用いて一次抗体反応を行い、洗浄後ヒストファインシンプルステインマウス MAX-PO(G) (ニチレイ) およびヒストファインマウスステインキット (ニチレイ) を用いて二次抗体反応を行った。DAB を用いて発色反応を行い、マイヤーヘマトキ

シリンを用いて対比染色を行った。染色切片は洗浄および脱水・透徹した後、封入し、オールインワン蛍光顕微鏡 (キーエンス) にて観察した。

1-6. 統計学的解析

データは全て平均値±標準偏差で表し、統計学的処理には解析ソフト GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, USA) を用いた。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。

2. BHPF の出生前発生毒性試験

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。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。交配後陰プラグが確認されたマウスを胎齢 0 日 (E0) とした。

2-2. BHPF の投与

BHPF (東京化成、純度 >96.0%) は 5% エタノール/sesame oil 溶液に溶解し、GD5 から GD17 まで、0、3.75 および 37.5 mg/kg-body weight/day の用量で毎日強制経口投与を行った。

2-3. 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した。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% PFA で固定しパラフィンブロックを作製した。

2-4. 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、胎子を摘出した。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。

2-5. 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。

2-6. 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℃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。

2-7. 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あすか製薬メディカルに依頼した。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。

2-8. 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。

2-9. 統計学的解析

母動物データ及び胎児データについては 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

1. Syn-Rep マウスを用いた発達期の PbAc 曝露による脳発達への影響評価

1-1. 飲水量、母体体重、摂餌量、および児動物体重増加への影響評価

妊娠期および授乳期における飲水量と母体体重に PbAc 曝露による顕著な影響は認められなかった (図 1、2)。出生後児動物の体重増加量については、200 ppm 投与群で雌では P4、P7、P10、P13、P16 において、雄では P13、P16 において、対照群と比較して有意な上昇が認められた (図 3A、3B)。一方、1,000 ppm 投与群では雌の P4 において対照群と比較して体重増加量の有意な低下が認められたものの、他の日齢や雄では変化はみられなかった (図 3C、3D)。

1-2. In vivo イメージングを用いた児動物の頭部のレポーター活性評価

児動物の頭部レポーター活性について *in vivo* イメージングにて解析したところ、200 ppm 投与群では対照群と比較して P4 では有意な高値、P10 では有意な低値が認められた (図 4A)。一方、1,000 ppm 投与群では対照群と比較していずれの日齢においてもレポーター活性に有意な差は認められなかった (図 4B)。以上より、200 ppm PbAc の周産期曝露により Syn-Rep マウス頭部のレポーター活性経時変化パターンが変化することが明らかとなった。

1-3. 血清中 TSH レベルへの影響評価

200 ppm PbAc 投与群の P21 児動物より血清を採取し、TSH レベルを測定したところ、

対照群と比較して TSH レベルに差は認められなかった (図 5)。

1-4. 脳構成細胞への影響評価

P4 の脳組織像をニッスル染色 (神経細胞を評価) および抗 IBA1 抗体 (ミクログリアを評価) と抗 GFAP 抗体 (アストロサイトを評価) を用いた免疫化学染色により評価したところ、200、1,000 ppm 投与群共にいずれの染色像においても、対照群と比較して大脳皮質における明らかな組織学的異常は認められなかった (図 6)。

海馬歯状回付近においては、200 ppm 投与群では対照群と比較して神経細胞数に明らかな変化は認められなかったものの、ミクログリアおよびアストロサイトの増加が認められた (図 7A)。一方、1,000 ppm 投与群では対照群と比較して海馬歯状回付近において、神経細胞数の減少とミクログリアおよびアストロサイトの増加が認められた (図 7B)。

2. BHPF の出生前発生毒性試験

2-1. BHPF 投与による母体甲状腺関連指標への影響評価

BHPF を投与した母動物の GD18 における血清中 TH レベルについて検討を行ったところ、fT4、T4、T3、TSH レベルは BHPF 曝露による変動はみられなかった (図 8)。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、BHPF 曝露群において甲状腺の組織学的異常は観察されなかった (図 9)。以上の結果より、妊娠期の BHPF 曝露は母体の甲状腺機能に影響を与えない可能性が示唆された。

2-2. BHPF 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評価

BHPF 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、3.75 mg/kg BHPF 投与群で総ビリルビンの上昇 (図 10S) が認められた。また、3.75 および 37.5 mg/kg BHPF 投与群でグルコースの有意な低下が認められた (図 10T)。その

他の生化学パラメーターについては、BHPF 投与による変化は認められなかった。

2-3. BHPF 投与による母動物の体重、摂餌量、子宮重量への影響評価

BHPF を投与した母動物について投与期間中に死亡や流産は認められなかった。また、投与期間中の体重変化と摂餌量および GD18 における子宮重量についても、BHPF 投与による顕著な変化は認められなかった (表 1)。

2-4. BHPF 投与による胎仔発生への影響評価

妊娠状況および胎仔への影響について、雌胎仔重量が 3.75 mg/kg BHPF 投与群では対照群と比較して有意な増加が認められたものの (表 2)、着床数、胎仔数、胎盤重量、AGD 等に BHPF 投与による顕著な変化は認められなかった (表 2)。また、外表・内臓検査においても BHPF 投与による異常は確認されなかった (表 3)。さらに、骨格検査においても BHPF 投与による明らかな異常は認められなかった (表 4)。以上より、妊娠期の BHPF 曝露は胎児の臓器・骨格形成等にほとんど影響が無いことが示された。

D. 考察

1. Syn-Rep マウスを用いた発達期の PbAc 曝露による脳発達への影響評価

本研究では、DNT 陽性対照物質である PbAc を用いて、Syn-Rep マウスの応答性と脳発達への影響の相関を検証した。今回用いた 1,000 ppm は、一般的に PbAc が明確な DNT を誘導するとされている用量である。また先行研究において、周産期に 1,000 ppm PbAc を投与すると、P21 における児動物の血中 Pb 濃度が平均 41 µg/dL となることから [Biol. Trace Elem. Res. 199:1414-1424 (2021)]、1/5 の投与量である 200 ppm PbAc 投与では児動物の血中 Pb 濃度が 8 µg/dL 程度になると推定される。この濃度はヒトの疫学調査で報告されている血中 Pb 濃度と同程度であるため、本研究では 200 ppm を実質曝露量相当として用いた。

In vivo イメージングの結果より、200 ppm PbAc 投与群では対照群と比較して発達期のレポーター活性の変化が認められたものの、1,000 ppm PbAc 投与群では変化は認められなかった。我々はこれまでに神経細胞数の低下を誘導する DNT 陽性対照物質であるバルプロ酸の投与条件下では Syn-Rep マウス発達期の頭部レポーター活性が低下することを報告しており [Biochem. Pharmacol. 206:115332 (2022)]、母体免疫活性化の誘導物質でありグリア系細胞の活性化を惹起する Polyinosinic acid-polycytidylic acid (Poly(I:C)) 投与条件下では Syn-Rep マウス発達期の頭部レポーター活性が上昇することを明らかにしている[R4 田熊分担研究報告書参照]。本研究における組織学的解析の結果、200 ppm PbAc 投与群ではミクログリアおよびアストロサイトの増加が認められたが、神経細胞数は変化していなかったことから、200 ppm PbAc 投与群における Syn-Rep マウスの頭部レポーター活性の変化はグリア細胞の活性化に起因する可能性が考えられた。一方で 1,000 ppm PbAc 投与群ではミクログリアおよびアストロサイトの増加に加えて、神経細胞数の低下が認められたことから、本条件下では Syn-Rep マウスの頭部レポーター活性を低下させる要因（神経細胞数の低下）と上昇させる要因（グリア細胞の活性化）が複合的に生じた結果、*in vivo* イメージングによるレポーター活性の変化としては捉えられなかった可能性が考えられる。Syn-Rep マウスは化学物質の DNT を評価する上で有用なツールであるものの、PbAc のような特定の用量域で複合的な影響を示す物質の場合にはその影響を見逃す可能性があることが明らかとなった。このように複合的な作用機構によって誘導されるエンドポイントの検出には、用量反応性を検討する重要性が改めて確認された。

一方で Pb 曝露が甲状腺機能に与える影響については、セルビア共和国の橋本病患者を対象とした調査において血液中 Pb 濃度が健常者と比較して高いという報告 [Environ.

Res.186:109538 (2020)]や、中国人を対象とした調査において血液中 Pb 濃度が高い女性は血中 TSH レベルが高い傾向にあるという報告がされている [Environ. Pollut.230:320-328 (2017)]。また、0.5 - 1 mg/kg-bw Pb を 28 日間投与した成体ラットにおいて TSH が上昇することが報告されている [Environ. Res. 237:117035 (2023)]。Pb の DNT 誘導メカニズムにおける母体甲状腺機能低下の関与の有無は明確になっておらず今後も詳細な検討が必要であるが、少なくとも本研究においては Syn-Rep マウス頭部のレポーター活性および脳組織像への影響が認められた 200 ppm PbA の周産期曝露は P21 児動物の血中 TSH レベルに影響を与えないことが明らかとなった。

2. BHPF の出生前発生毒性試験

エストロゲン受容体 α 、 β 、双方に対して、強力なアンタゴニスト作用を示す化合物として見出された BHPF は、マウスに対して生殖発生毒性を示す可能性が報告されている [Nat. Commun. 8:14585 (2017)]。一方で BHPF は、ゼブラフィッシュの成体に対して TH レベルに影響を与えること [Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 260:109419 (2022)]や、ゼブラフィッシュ幼生への曝露が視床下部—下垂体—甲状腺軸をかく乱し神経系に影響を与えること [Sci. Total Environ.776:145963 (2021)]が報告されている。哺乳動物においては BHPF が TH シグナルに与える影響については報告されていないが、哺乳動物においても発生段階に曝露すると甲状腺機能に影響を与える結果、次世代影響を誘導する可能性が考えられる。そこで、本研究では BHPF を妊娠マウスに曝露し、マウス甲状腺機能に与える影響について評価するとともに、胎仔の骨格形成や器官形成に与える影響についても検討した。典型的な甲状腺機能低下が生じた場合、PTU 投与モデルで認められるような[R4 中西分担研究報告書参照]、血清中 T3 および T4 の有意な低下、TSH の有意な上昇が認められ、甲状腺の組織像に

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るが、BHPF 投与群においては各種甲状腺関連ホルモンおよび甲状腺組織像いずれにおいても変化は認められなかった。また、一部の生化学マーカーにおいては BHPF 投与により変動していたが、甲状腺機能低下症で報告されている変化は BHPF 投与群では認められなかった。BHPF による甲状腺機能への影響の有無がゼブラフィッシュとマウスで異なった原因については不明であるが、BHPF はマウスにおいて代謝不活性化されることや、マウスは魚類よりも BHPF の排出速度が速いことなどが可能性として考えられる。また、我々はこれまでに BHPF がマウスに対して発生毒性を引き起こす可能性を見出している [Nat. Commun. 8:14585 (2017)] が、本研究において改めてガイドラインに準拠したプロトコールで出生前発生毒性試験を実施したところ、妊娠期の BHPF 曝露は着床数や胎児の生存数、胎児の体重に影響を与えず、胎児の臓器や骨格形成等の胎児発生にもほとんど影響が無いことが示された。以上より、BHPF 曝露はマウスに対して甲状腺機能や胎児発生にほとんど影響を与えない可能性が示された。

E. 結論

- ・実質曝露量相当の周産期 PbAc 曝露による脳発達への影響を Syn-Rep マウスを用いた *in vivo* イメージングで検出できたとともに、同 PbAc 曝露条件下では血清中 TSH レベルに影響を与えない可能性が示唆された。
- ・妊娠期の BHPF 曝露は母体の甲状腺機能および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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomita S, Ishida K, **Matsumaru D**, Hiromori Y, Nagase H, **Nakanishi T (責任著者)**, Excretion and tissue distribution properties of PCB-126 for establishing a bioaccumulation model in mice, *BPB*

Reports 7:7-13 (2024).

- 2) 石田慶士, **松丸大輔**, **中西 剛**, 化学物質の脳発達への影響を発光で可視化. *光アライアンス* 34:15-18 (2023).

2. 学会発表

- 1) 糟谷 佐保里 他：妊娠期甲状腺機能低下による甲状腺関連パラメータの変動と胎児発生への影響評価、第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月
- 2) 小泉 茉奈海 他：周産期甲状腺機能低下モデルを用いた甲状腺ホルモンの産仔脳発達への影響評価、第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月
- 3) 石田 慶士 他：代替ビスフェノール fluorene-9-bisphenol の甲状腺関連指標と胎児発生への影響評価、第 63 回日本先天異常学会学術集会、つくば、2023 年 7 月
- 4) 糟谷 佐保里 他：化学物質誘導性の母体甲状腺機能低下による甲状腺関連指標の変動と胎児発生への影響評価、第 63 回日本先天異常学会学術集会、つくば、2023 年 7 月
- 5) 小泉 茉奈海 他：周産期甲状腺機能低下モデルにおける甲状腺関連パラメータの変動と児動物脳発達との連関評価、フォーラム 2023：衛生薬学・環境トキシコロジー、広島、2023 年 9 月
- 6) 辰巳 佳乃子 他：神経分化トレーサーマウスを用いた鉛による発達神経毒性の有害性発現経路に関する検討、メタルバイオサイエンス研究会 2023、岐阜、2023 年 10 月
- 7) 糟谷 佐保里 他：化学物質誘導性の妊娠期甲状腺機能低下による甲状腺関連指標の変動と胎児発生毒性の評価、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 2023、名古屋、2023 年 11 月
- 8) 辰巳 佳乃子 他：神経分化トレーサーマウスを用いた低用量域鉛曝露における発達神経毒性の有害性発現経路に関する検討、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 2023、名古屋、2023 年 11 月
- 9) 小泉 茉奈海 他：化学物質誘導性の周産期甲状腺機能低下による児の脳発達

への影響評価、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 2023、名古屋、2023 年 11 月

- 10) 松丸 大輔 他：甲状腺機能低下モデルにおける甲状腺関連パラメータの変動と次世代影響の連関評価、日本薬学会第 144 年会、横浜、2024 年 3 月
- 11) 長平 萌花 他：母体免疫活性化による

神経発達影響の評価に資する神経分化トレーサーマウスの有用性、日本薬学会第 144 年会、横浜、2024 年 3 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

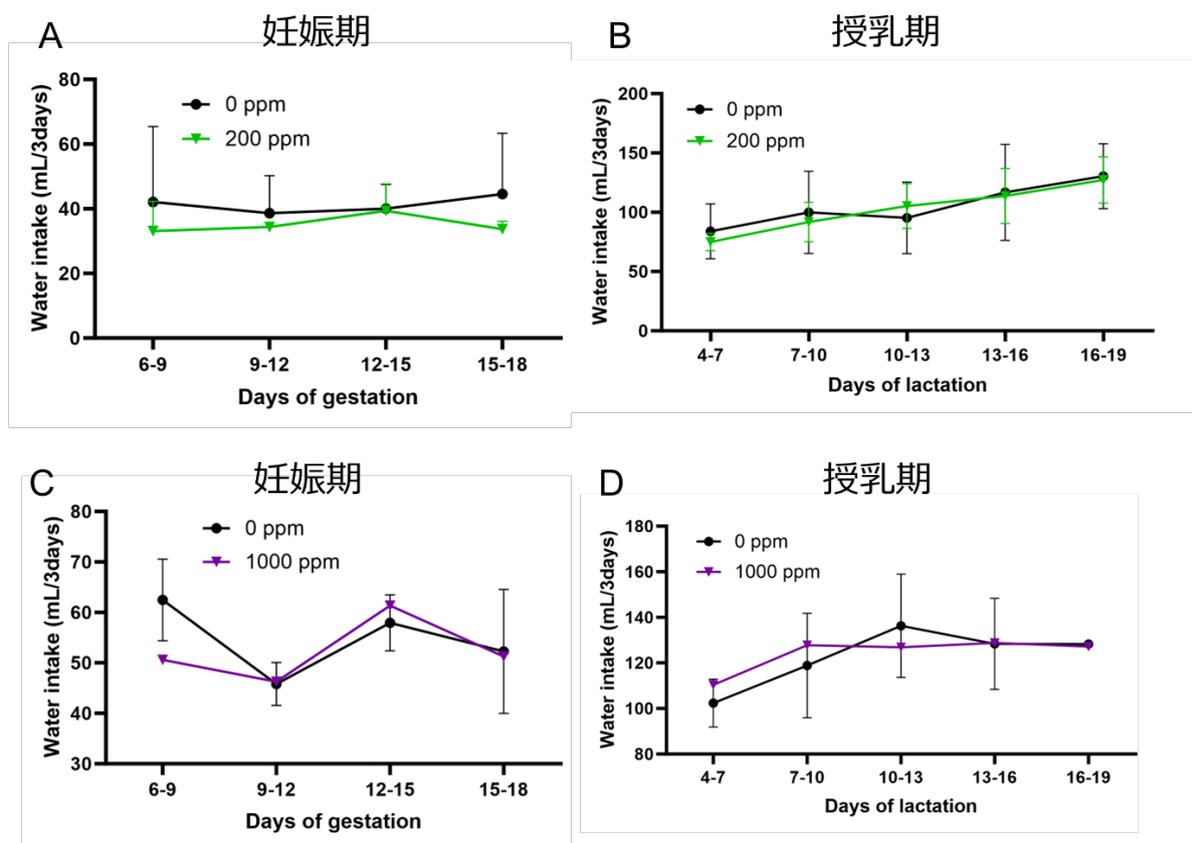


図1 妊娠6日目から出生後21日目までPbAcを投与したマウス母体の飲水量の変化
 妊娠期（A、C）および授乳期（B、D）の飲水量を3日おきに測定した。（A）（B）Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=3). （C）（D）Data are expressed as follows: 0 ppm, mean \pm S.D. (n=3); 1000 ppm, mean (n=2).

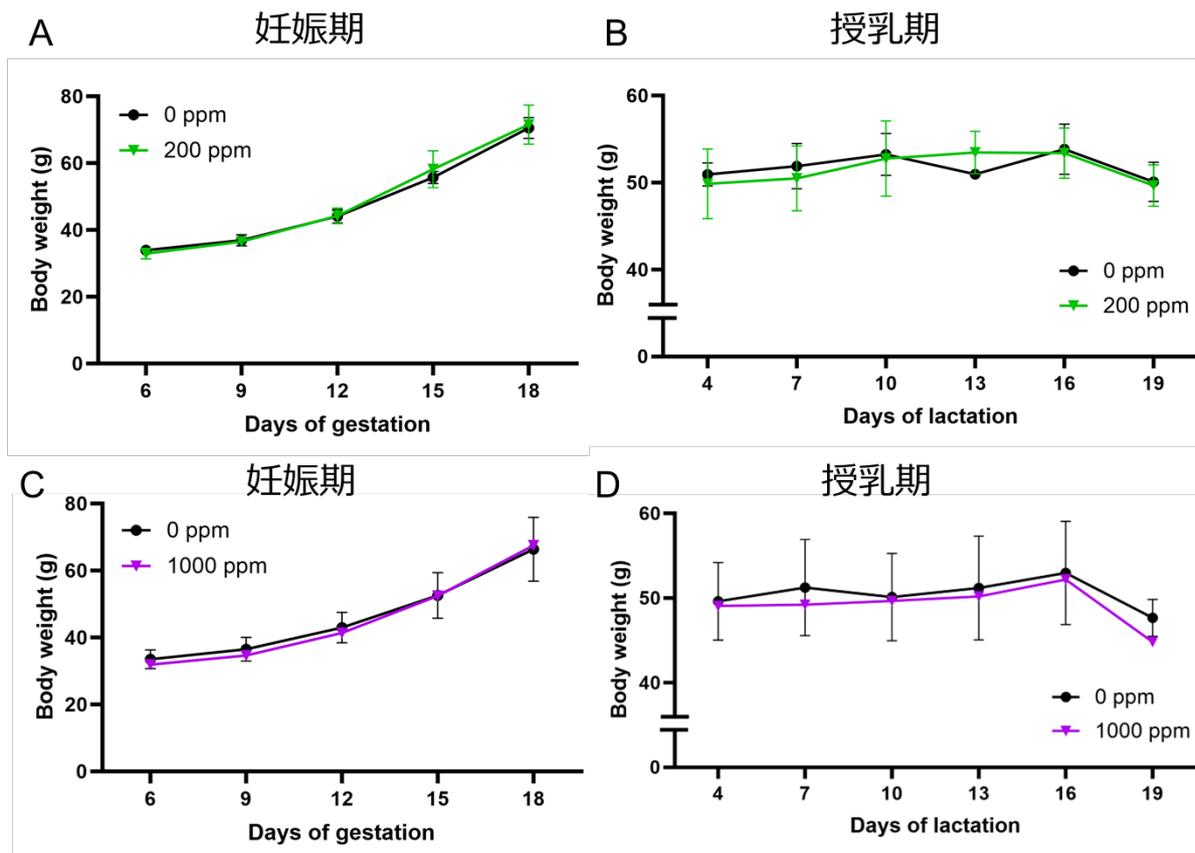


図2 妊娠6日目から出生後21日目までPbAcを投与したマウス母体の体重の変化

妊娠期 (A、C) および授乳期 (B、D) の飲水量を3日おきに測定した。(A) (B) Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=3). (C) (D) Data are expressed as follows: 0 ppm, mean \pm S.D. (n=3); 1000 ppm, mean (n=2).

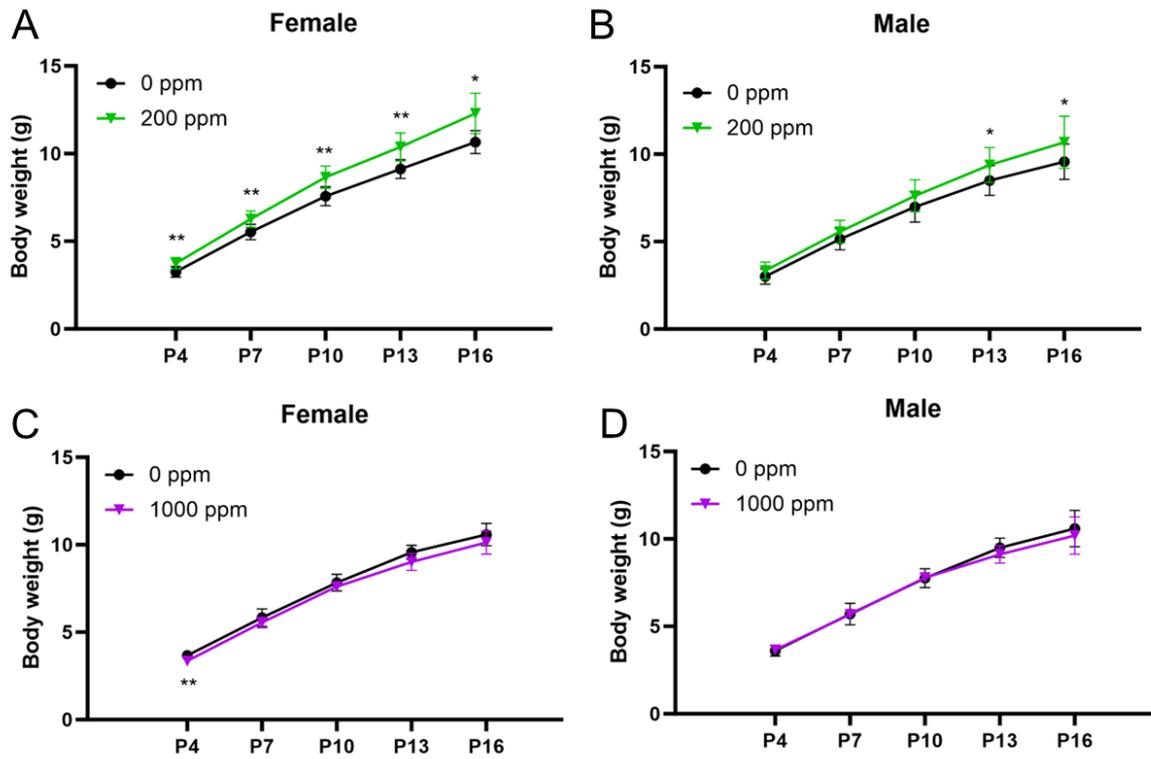


図3 胎齢6日目から出生後21日目までPbAcを投与したSyn-Repマウス児の体重の変化
 出生後、4、7、10、13、16日目における児動物（A、C：雌、B、D：雄）の体重を3日おきに測定した。Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=5-15). * P <0.05, ** P <0.01, vs. control (unpaired t-test).

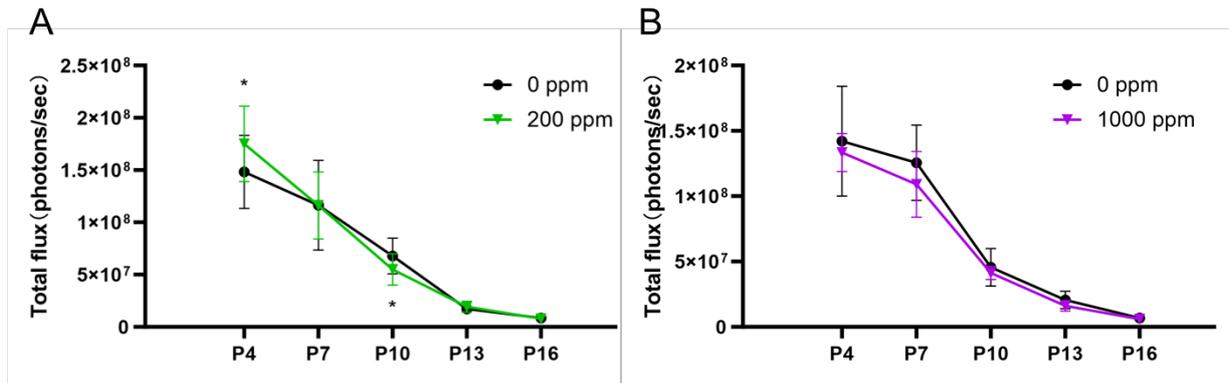


図 4 胎齢 6 日目から出生後 21 日目まで PbAc を投与した Syn-Rep マウス児の頭部発光経時変化

出生後、4、7、10、13、16 日目における児動物 (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。グラフは各個体を $n=1$ とし雌雄のデータを混合したものをグラフとして表している。Data are expressed as the mean \pm S.D. ($n=5-15$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$,

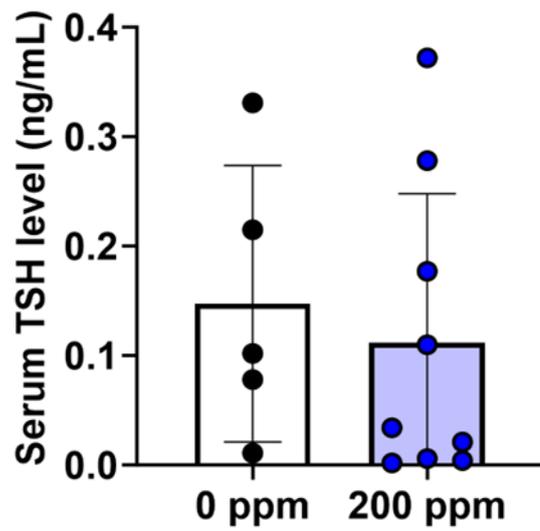


図 5 胎齢 6 日目から出生後 21 日目まで PbAc を投与した Syn-Rep マウス児の血清中 TSH レベル

出生後 21 日目における児動物の血清中 TSH レベルを測定した。グラフは各個体を n=1 とし雌雄のデータを混合したものをグラフとして表している。Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=5-9).

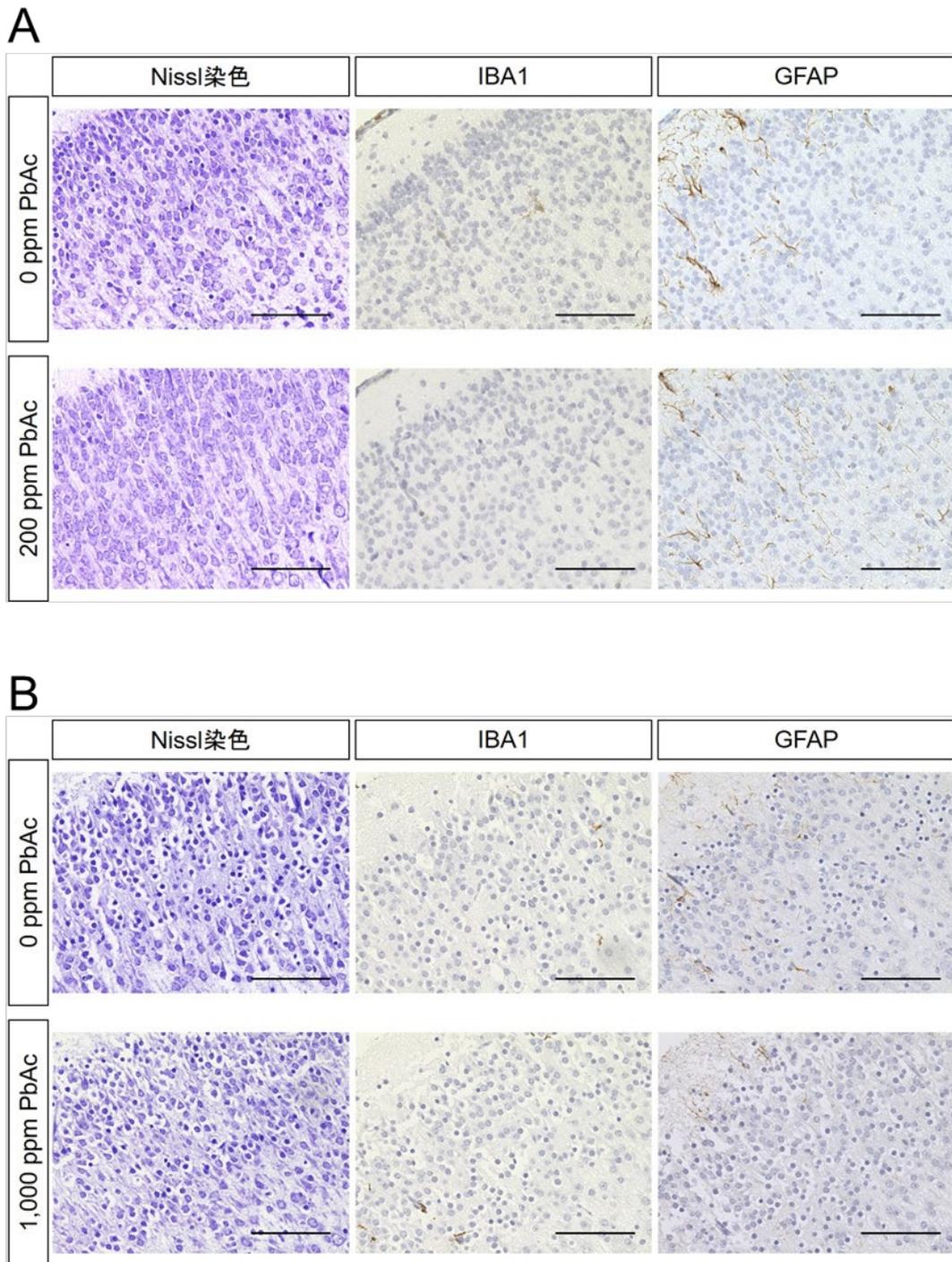


図 6 胎齢 6 日目から出生後 4 日目まで PbAc を投与した Syn-Rep マウス児の 4 日齢における大脳皮質組織学的解析

出生後 4 日目における児動物において全脳を摘出、4%ホルムアルデヒド溶液にて固定後、パラフィン切片を作製した。神経細胞の評価として Nissl 染色、グリア細胞（IBA1：ミクログリアマーカー、GFAP：アストロサイトマーカー）の評価として免疫化学染色を行い、顕微鏡にて大脳皮質の染色画像を観察・取得した。スケールバー：100 μ m。

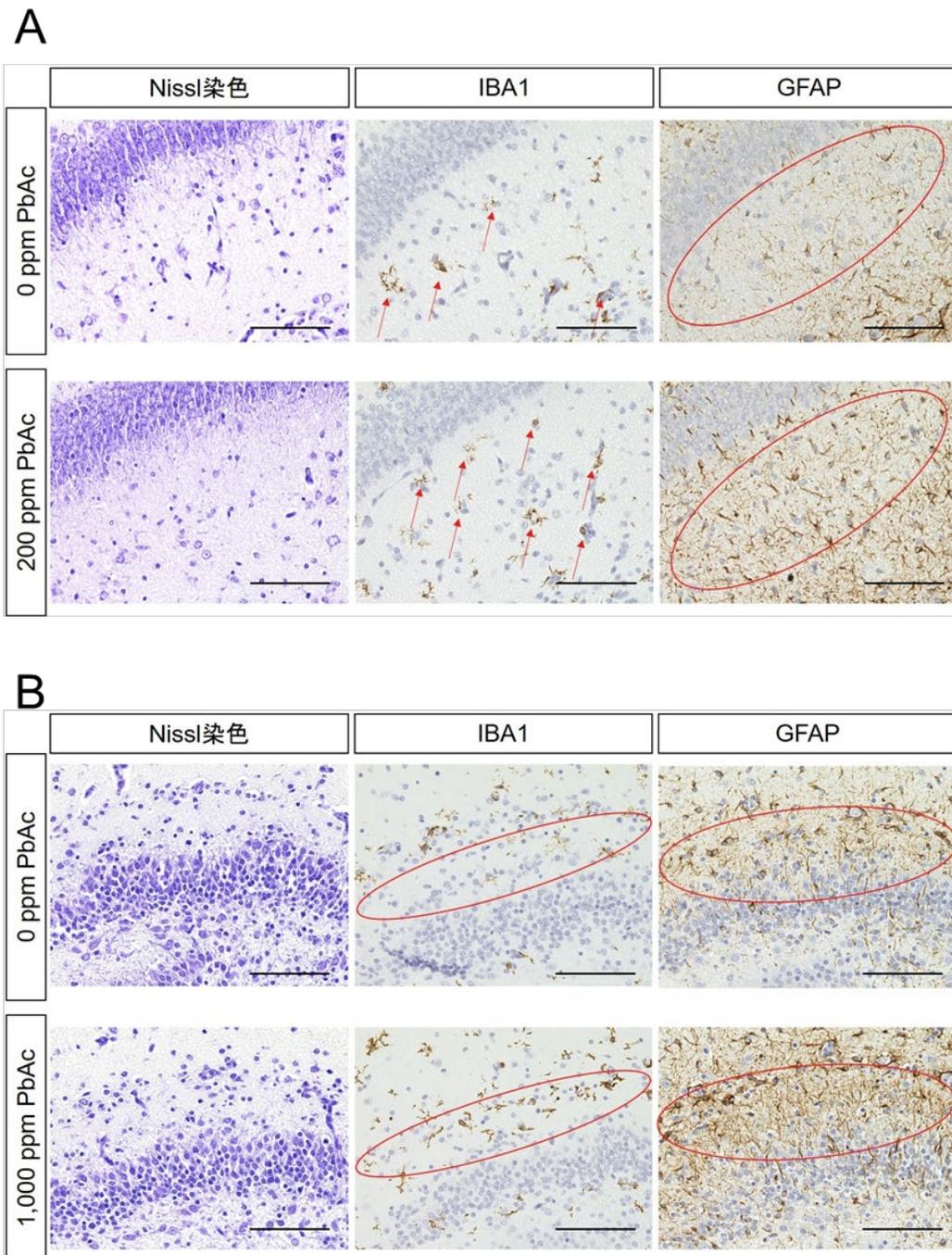


図 7 胎齢 6 日目から出生後 4 日目まで PbAc を投与した Syn-Rep マウス児の 4 日齢における海馬組織学的解析

出生後 4 日目における児動物において全脳を摘出、4%ホルムアルデヒド溶液にて固定後、パラフィン切片を作製した。神経細胞の評価として Nissl 染色、グリア細胞（IBA1：ミクログリアマーカー、GFAP：アストロサイトマーカー）の評価として免疫化学染色を行い、顕微鏡にて海馬歯状回付近の染色画像を観察・取得した。（A）0 ppm と 200 ppm の比較。（B）0 ppm と 1000 ppm の比較。赤矢印および赤丸は IBA1 もしくは GFAP の陽性細胞を示す。スケールバー：100 μ m。

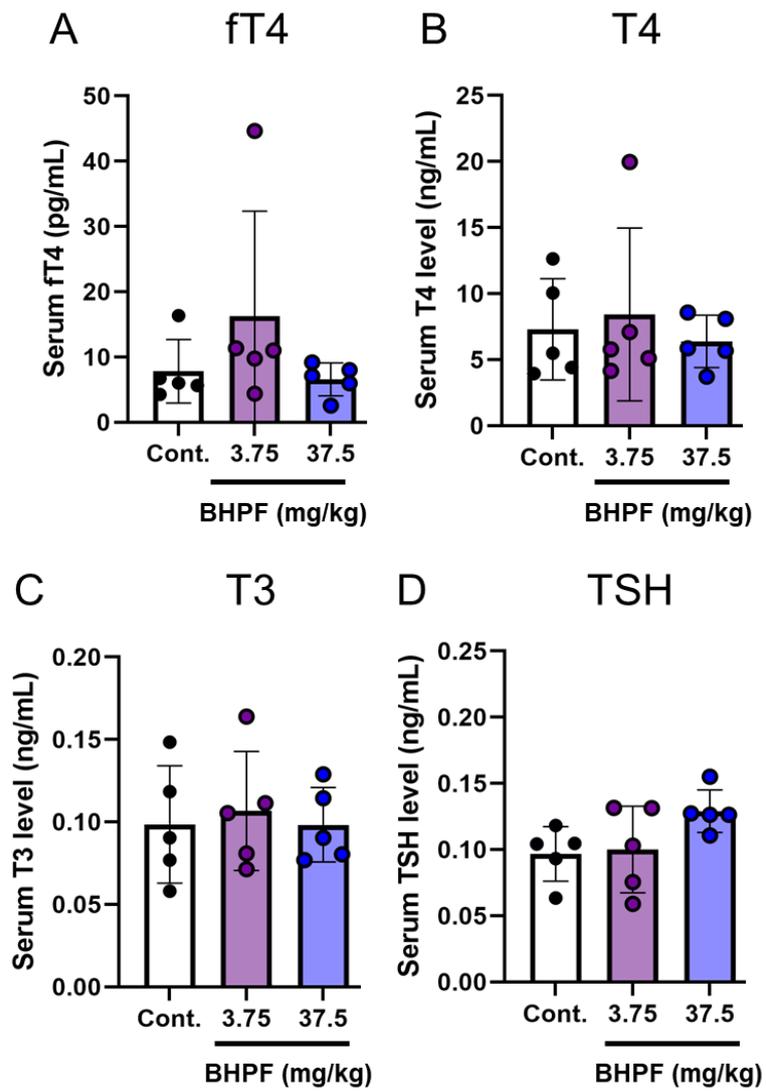


図 8 妊娠期に BHPF を投与したマウスの妊娠 18 日目における血清中甲状腺関連ホルモンレベル
 妊娠 18 日目に母体より血清を回収し、血清中 fT4 (A)、T4 (B)、T3 (C)、TSH (D) レベルを
 測定した。Data are expressed as mean \pm S.D. (n=5).

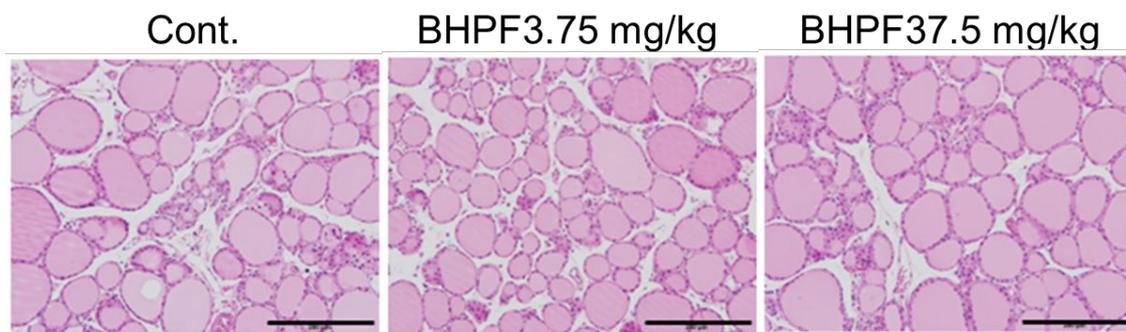


図9 妊娠期に BHPF を投与したマウスの妊娠 18 日目における甲状腺病理組織像

妊娠 18 日目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。スケールバー：200 μ m。

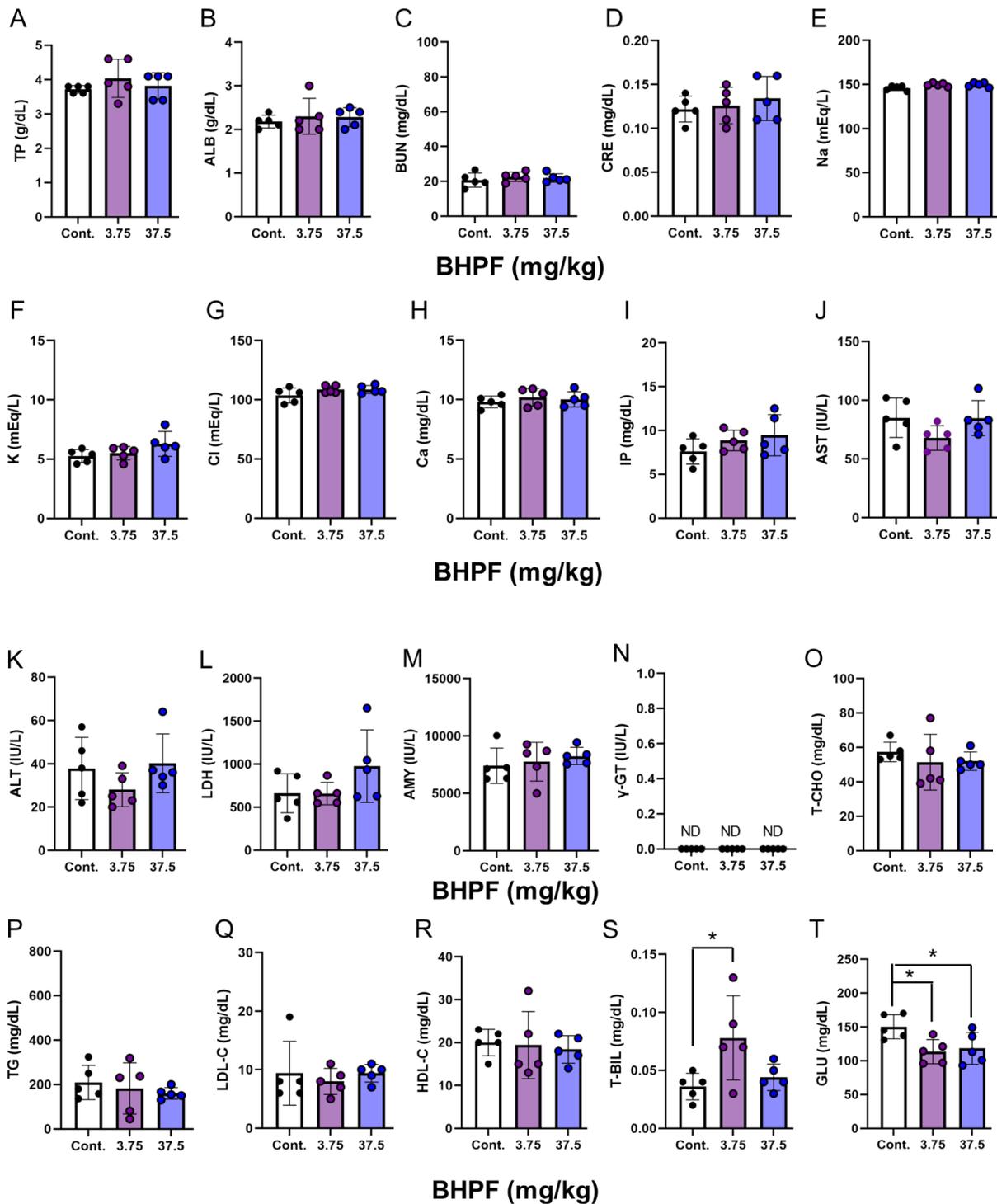


図 10 妊娠期に BHPF を投与したマウスの妊娠 18 日目における血清中生化学パラメーターレベル
 妊娠 18 日目に母体より血清を回収し、血清中の総タンパク (A)、アルブミン (B)、尿素窒素 (C)、
 クレアチニン (D)、Na (E)、K (F)、Cl (G)、Ca (H)、無機リン (I)、乳酸脱水素酵素 (LDH)
 (J)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) (K)、アラニンアミノトランスフェラー
 ゼ (ALT) (L)、アミラーゼ (M)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ (γ -GT) (N)、総コレステロ
 ール (T-Cho) (O)、中性脂肪 (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=5). * $P < 0.05$, vs. control (Dunnett's test). ND: Not detected.

表 1 妊娠中に BHPF を投与したマウス母体の各種パラメーター

Parameters	Cont.	BHPF	
		3.75 mg/kg	37.5 mg/kg
Number of litters	10	10	10
Influences on the dams			
Mortality	0	0	0
Abortion	0	0	0
Evaluated litters	10	10	10
Mean body weight (g) GD6	31.98 ± 0.84	33.32 ± 2.13	33.02 ± 1.75
Mean body weight (g) GD18	62.24 ± 2.29	65.66 ± 6.25	64.25 ± 7.64
Mean body weight change (g) from GD5 to GD18	30.26 ± 2.33	32.34 ± 4.62	31.23 ± 6.45
Food consumption (g) from GD5 to GD6	4.71 ± 0.83	5.08 ± 1.03	5.29 ± 0.84
Food consumption (g) from GD17 to GD18	7.37 ± 0.67	8.02 ± 1.45	7.54 ± 1.59
Food consumption (g) from GD5 to GD18	75.74 ± 5.48	82.17 ± 8.69	80.59 ± 9.65
Gravid uterus weight (g)	24.26 ± 2.20	27.13 ± 3.10	26.32 ± 4.64

Data are expressed as the mean ± S.D.

表 2 胎生期に BHPF を投与したマウスの胎齢 18 日目における胎仔の各種パラメーター

Parameters	Cont.	BHPF 3.75 mg/kg	BHPF 37.5 mg/kg
Number of evaluated litters	10	10	10
No. corpora lutea/litter	16.0 ± 3.9	16.0 ± 4.8	17.1 ± 4.4
No. implantation sites/litter	13.6 ± 1.2	13.9 ± 1.3	14.0 ± 2.4
Total live fetuses/litter	12.0 ± 1.6	13.0 ± 1.6	13.0 ± 2.0
Live female fetuses/litter	5.6 ± 2.1	6.1 ± 1.7	7.1 ± 2.0
Live male fetuses/litter	6.4 ± 2.2	6.9 ± 2.4	5.9 ± 2.0
Male/female sex ratio	1.62 ± 1.46	1.29 ± 0.74	0.94 ± 0.51
Total embryonic death/litter	1.60 ± 1.35	0.90 ± 0.99	1.00 ± 0.82
Early resorptions/litter	1.00 ± 1.05	0.70 ± 0.82	0.50 ± 0.53
Late resorptions/litter	0.30 ± 0.48	0.10 ± 0.32	0.20 ± 0.42
Dead fetuses/litter	0.30 ± 0.48	0.10 ± 0.32	0.30 ± 0.48
Female fetal weight (g)	1.512 ± 0.050	1.603 ± 0.100 [#]	1.509 ± 0.097
Male fetal weight (g)	1.570 ± 0.085	1.659 ± 0.094	1.570 ± 0.085
Female placental weight (g)	0.124 ± 0.015	0.121 ± 0.018	0.117 ± 0.013
Male placental weight (g)	0.139 ± 0.018	0.132 ± 0.016	0.125 ± 0.014
Female AGD (mm)	0.997 ± 0.064	1.018 ± 0.036	0.993 ± 0.040
Male AGD (mm)	1.686 ± 0.069	1.741 ± 0.051	1.725 ± 0.059
Female AGD normalized (AGD/3 [√] bw) (mm/g ^{1/3})	0.869 ± 0.055	0.872 ± 0.031	0.867 ± 0.048
Male AGD normalized (AGD/3 [√] bw) (mm/g ^{1/3})	1.453 ± 0.076	1.472 ± 0.040	1.486 ± 0.055

Data are expressed as the mean ± S.D. [#]*P* < 0.05, vs. Cont. by Steel's test. AGD: anogenital distance.

表 3 胎生期に BHPF を投与したマウスの胎齢 18 日目における外表および内臓検査の結果

Parameters	Cont.	BHPF 3.75 mg/kg	BHPF 37.5 mg/kg
Number of evaluated litters	10	10	10
External examination			
Number of evaluated fetuses	120	125	130
Face: cleft palate, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.77)
Forepaw digit: pedunculated supernumerary, no. fetuses (%)	0 (0.00)	3 (2.40)	2 (1.54)
Hindpaw digit: polysyndactyly, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Visceral examination			
Number of evaluated fetuses	54	60	59
Umbilical artery:			
Transposed, no. fetuses (%)	5 (9.26)	12 (20.0)	5 (8.47)
Bilateral, no. fetuses (%)	2 (3.70)	0 (0.00)	1 (1.69)

Data are expressed as number of fetuses or litters. Values in parenthesis are percentage.

表 4 胎生期に BHPF を投与したマウスの胎齢 18 日目における骨格検査の結果

Parameters	Cont.	BHPF	BHPF
		3.75 mg/kg	37.5 mg/kg
Number of evaluated litters	10	10	10
Number of evaluated fetuses	66	70	71
Skeletal variations, no. fetuses (%)	18 (27.3)	23 (32.9)	28 (39.4)
Skeletal malformations, no. fetuses (%)	12 (18.2)	7 (10.0)	14 (19.7)
Sternebra:			
Misaligned, no. fetuses (%)	3 (4.55)	2 (2.86)	7 (9.86)
Xiphoid cartilage branched, no. fetuses (%)	0 (0.00)	8 (11.4)	3 (4.23)
Xiphoid cartilage hole, no. fetuses (%)	8 (12.1)	9 (12.9)	3 (4.23)
Supernumerary rib:			
Cervical short, no. fetuses (%)	3 (4.55)	0 (0.00)	1 (1.41)
Thoracolumbar full, no. fetuses (%)	2 (3.03)	5 (7.14)	10 (14.1)
Thoracolumbar short, no. fetuses (%)	3 (4.55)	3 (4.29)	1 (1.41)
Cartilage interrupted, no. fetuses (%)	1 (1.52)	5 (7.14)	8 (11.3)
Vertebra: sacral arch not fused, no. fetuses (%)	1 (1.52)	1 (1.43)	1 (1.41)
Pelvic girdle: malpositioned caudal unilateral, no. fetuses (%)	1 (1.52)	1 (1.43)	0 (0.00)
Forelimb: forepaw phalanx supernumerary, no. fetuses (%)	0 (0.00)	1 (1.43)	0 (0.00)
Sternebra:			
Fused, no. fetuses (%)	1 (1.52)	0 (0.00)	0 (0.00)
Split, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Branched, no. fetuses (%)	9 (13.6)	5 (7.14)	7 (9.86)
Intersternebral cartilage split, no. fetuses (%)	2 (3.03)	1 (1.43)	2 (2.82)
Xiphoid cartilage split, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.41)
Rib:			
Costal cartilage fused, no. fetuses (%)	1 (1.52)	0 (0.00)	0 (0.00)
Costal cartilage fused to sternum, no. fetuses (%)	1 (1.52)	0 (0.00)	10 (14.1)
Vertebra:			
Cervical arch branched, no. fetuses (%)	4 (6.06)	0 (0.00)	3 (4.23)
Lumbar centrum misshapen, no. fetuses (%)	0 (0.00)	1 (1.43)	2 (2.82)
Sacral vertebra misaligned, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.41)
Skull:			
Nasal incomplete ossification, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Frontal incomplete ossification, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Parietal incomplete ossification, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.41)
Interparietal incomplete ossification, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.41)
Supraoccipital incomplete ossification, no. fetuses (%)	1 (1.52)	0 (0.00)	1 (1.41)
Sternebra:			
Bipartite ossification, no. fetuses (%)	2 (3.03)	1 (1.43)	0 (0.00)
Incomplete ossification, no. fetuses (%)	3 (4.55)	1 (1.43)	2 (2.82)
Asymmetric ossification, no. fetuses (%)	1 (1.52)	0 (0.00)	2 (2.82)
Unilateral ossification, no. fetuses (%)	1 (1.52)	0 (0.00)	0 (0.00)
Unossified, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

Sternum: supernumerary ossification site, no. fetuses (%)	7 (10.6)	0 (0.00)	2 (2.82)
Vertebra:			
Cervical arch, isolated ossification site, no. fetuses (%)	1 (1.52)	1 (1.43)	2 (2.82)
Thoracic arch, increased ossification, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

Data are expressed as number of fetuses or litters. Values in parenthesis are percentage.