

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
～甲状腺機能低下時における Syn-Rep マウスの応答性評価と
児動物脳構成細胞への影響の解析～
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誘導し、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、抗甲状腺薬プロピルチオウラシル（PTU）をSyn-Repマウスに投与して行ってきた甲状腺機能低下誘導実験をガイドライン試験に基づいた規模で行った。甲状腺関連指標に影響が認められ始める閾値用量（10 ppm）と、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）／チロキシシン（T4）の低下が認められる典型的用量（250 ppm）の2用量を設定し、母動物、児動物への影響（摂餌量、体重、甲状腺組織像、Syn-Repレポーター活性、脳組織像・脳構成細胞分布）を比較解析した。どちらの投与群においても母動物の摂餌量、体重変化にはほとんど影響が見られなかった。児動物においては、250 ppm投与群における出生後体重増加の不良が観察された。児動物の甲状腺組織は、甲状腺機能低下の特徴が観察され、Syn-Repレポーター活性は対照群に比較して出生直後は低値で次第に高値となる様子が観察された。組織学的解析の結果、本実験系のマウス群においては大脳皮質の神経細胞数に影響は観察されなかったが、アストロサイト数の増加が観察されたことから、Syn-Repマウスを用いた早期における脳影響評価の可能性が示唆された。

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、その際の脳構成細胞への影響の解析とSyn-Repマウスを用いた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妊娠0.5日（GD0.5）とした。また、児動物の出生日を生後（授乳）0日（P0）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 (図1)。児動物の出生後も母動物にPTU混餌食を継続して与えた。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。P13~P21の期間は児動物の摂餌も始まるため、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。

実験規模が大きい関係で、10 ppm投与群とその対照群、そして250 ppm投与群とその対照群の実験は同時には行わず、各投与群間で数ヶ月の期間が空いている。

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摂餌量として計算した。

3-2. *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。

3-3. 組織学的解析

脳組織は、4%PFAを用いた灌流固定後に2日間浸漬固定した後、70%エタノールに置換し、4°Cで保存した。自動パラフィン包埋装置 (CT-Pro 20、Genotsaff) を用いて包埋した。薄切はサンプルをロータリーミクロトーム (Leica) にて厚さ5 μmに薄切した。HE染色、Nissl染色は、ティシュー・テック Prisma (サクラファインテック) を用いて標準的なプロトコールで行った。スライドガラス間の染色ムラを軽減させるために、同日に染色した。免疫組織化学染色は自動免疫染色装置HISTOSTAINER (ニチレイバイオ) を用いて行った。抗体は抗Iba1ヤギポリクローナル抗体 (富士フイルム和光純薬)、GFAP (GA5) マウスモノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた。画像はマルチスペクトルカメラNuance (CRI Inc.) を用いて撮影し、ImageJ、もしくは組織イメージング解析ソフトinForm ver. 2.4 (PerkinElmer) を用いて計数した。

4. 統計学的解析

統計学的処理は解析ソフト SPSS 15.0J for Windows (SPSS, Inc., USA) を用いた。多重比較検定は Dunnett's multiple comparison test、二群の比較は Student's *t*-test 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

摂餌量は3日おきの計測を行った。マウスが給餌器の中に滞在する例があったため、厳密な摂餌量から変動している可能性があり、ケージごとのばらつきがやや大きくなった。10 ppm、250 ppmのいずれの投与群において

も、数点の観測点（10 ppm投与群のP7-10、P16-19、250 ppm投与群のGD15-18、P13-16、P16-19）でPTU投与群の摂餌量が対照群より低値となった（図2A-C）。妊娠期においては妊娠後期の250 ppm投与群において摂餌量が有意に低かったが、出産直後の計測において有意差が見られなかった（図2C）。授乳期においては、児動物が餌を食べ始めるP13以降において10 ppm、250 ppmの双方において有意に摂餌量が低くなった（図2B, D）。母体の体重に関しては、投与群と対照群の間で数点の計測時において投与群が低値となることが確認された（10 ppmのP10、250 ppmのGD18、P13）（図2E-H）。甲状腺の組織学的解析においては、10 ppm投与群では甲状腺の色調変化が観察された（図4B）。昨年度行った出生前発生毒性試験（TG414）では、GD18.5における母動物の濾胞上皮細胞の肥厚 [前年度報告書参照]は、P21ではわずかに兆候を示すのみであった。また250 ppm投与群においては、甲状腺の肥大、濾胞上皮細胞の肥厚、コロイドの欠失が観察された（図4C', C''）。

2. 児動物の解析

出生後の児動物の体重は10 ppm投与群では、雌雄共に対照群と有意差はなかった（図3A, B）。250 ppm投与群においては、出生直後P4においては対照群と同等だったものの、P7からP21にかけて投与群が有意に低値を示した（図3C, D）。これらの児動物の甲状腺組織像を解析したところ、10 ppm投与群では甲状腺の肥大と濾胞上皮細胞の肥厚が観察された（図4E, E'）。250 ppm投与群では、甲状腺の肥大、濾胞上皮細胞の肥厚、コロイドの欠失が観察された（図4F, F'）。

児動物の脳における*in vivo*イメージング解析では、250 ppm投与群において生後直後P4で対照群よりもレポーター活性が有意な低値を示し、一貫して低下する対照群とは対照的にP7~10にかけて低下の鈍化（対照群と比較して有意な高値）が観察され、P10以降は低下していった（図3G, H）。10 ppm投与群においては、上記の250 ppm投与群の発光変

動をマイルドにした変動を示し、P10以降の一点で高値となった（図3E, F）。

児動物脳の組織学的解析を行ったところ、Nissl染色像、そしてNissl染色像から計数した大脳皮質の神経細胞数に対照群と投与群間の差は観察されなかった（図5A-D）。同様に、抗IBA1抗体を用いたミクログリアの染色（図5E-H）、抗GFAP抗体を用いたアストロサイトの染色（図5I-L）を行ったところ、大脳皮質におけるミクログリアが占める細胞割合に投与による変動は見られなかった（図5H）。アストロサイト数に関しては、PTU 10 ppm投与群ではアストロサイト細胞割合がコントロール群と同等であったが、PTU 250 ppm投与群では有意に増加していることが観察された（図5L）。

D. 考察

本年度の解析においては、10 ppm、250 ppmのPTU投与条件において、母動物の摂餌量が投与群において低値を示すタイミングが存在した。本投与系において、マウスが給餌器に入り込んで正確な摂餌量を計測できない場合があったが、250 ppm投与群の妊娠後期に認められた有意な低下については、その直前の時期や出産後13日まで有意差が認められなかったことから、偶発的に有意差がついたものと考えられた。一方、授乳期のP13以降の摂餌量の有意な低値は、母動物と8匹の児動物の餌の消費の合計である。このため、対照群より体重が低い投与児動物の摂餌量は少なくなることが想定されることから合理的な結果であると考えられた。250 ppm投与群の児動物の体重が低値となった厳密な理由は不明であるが、ウサギ胎児体重の減少が報告されていることから、結果は信頼に足ると考えられた。

本試験の結果では、各投与群とその対照群の母動物の妊娠後期、出産後の体重に差異が存在する。これは、実験規模の大きさの問題で、10 ppm投与群とその対照群、そして250 ppm投与群とその対照群の実験間で数ヶ月の期間が空いていることに起因していること

考えられた。

10 ppm、250 ppm の PTU 混餌投与系において、血清中甲状腺ホルモン指標の値は、前年度の結果より、児動物は 10 ppm 混餌投与条件においては軽度の妊娠期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典型的な妊娠期甲状腺機能低下状態に曝されたと考えられる。今回解析を行った 10 ppm 投与群の母動物における P21 の甲状腺組織像は、色調変化と濾胞上皮細胞の肥厚の兆候が観察されるのみであり、GD18.5 時の病理組織像 [前年度報告書参照]と比較して影響が軽度であった。この結果は、P13 より児動物の摂餌を考慮して PTU の用量が半分になることにより、一部回復している可能性が考えられた。一方で児動物の甲状腺組織像は、10 ppm 投与群においても明らかな甲状腺機能低下状態の病理組織像を示した。このことから、本混餌系においては、児動物は胎児期に母体甲状腺機能低下に曝露され、かつ生後において甲状腺機能低下状態であることが示唆された。マウスが人に比べて未熟な状態で出生することを考慮すると妥当な実験系であると考えられるが、投与期間の調整を行った結果生じる影響もバックグラウンドデータとして取得しておいた方が良いかもしれない。

昨年度までに我々は、Syn-Rep マウスの有用性を検証するために様々な DNT 誘導物質に対するレポーター分子の発現応答性を検討しており、胎生期の曝露で脳の神経細胞数が減少するバルプロ酸投与モデルでは有意な低値を、母体免疫活性化を誘導するような系では有意な高値を示すことを明らかにしてきた[前年度報告書参照]。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、対照群と比較して生後直後は低値、その後高値となった。10 ppm 投与群の方が 250 ppm 投与群に比較して値の変動がマイルドであったことから用量依存性が確認され、対照群に比較して変動があったことから、神経系の構築に何らかの影響が生じている可能性が示唆された。具体的にどのような

因子がレポーター活性に影響しているかはさらなる解析が必要である。大脳皮質組織像の解析から、少なくとも P21 における大脳皮質の神経細胞数には影響していないと考えられたが、類似の投与条件 (250 ppm PTU を GD15-P25 まで飲水投与した 2-4 ヶ月齢 ICR マウス) において雄の多動といった行動異常が生じることが報告されている [Toxicol Rep. 6: 1031-1039 (2019)]。Syn-Rep マウスの *in vivo* イメージング解析は P16 までであったが、投与群で有意に高い値となっており、Syn-Rep マウスを活用することで組織像に現れないレベルの異常を検出することが可能である可能性が示唆された。しかし、行動異常とその時点におけるレポーター分子の発現変動との関係は不明瞭であることから、今後行動異常を示す月齢におけるレポーター分子の発現変動のデータを収集するとともに、さらに詳細な組織学的解析が必要であると考えている。

いくつかの報告において、甲状腺機能低下が炎症性サイトカインの発現上昇 [PLoS ONE. 9: e109753 (2014)、Mol Cell Endocrinol. 499:110594 (2020).など]や、ミクログリアの活性化 [Int J Mol Sci. 23: 11938 (2022)など]を誘導しうることを示されている。しかし、本研究の解析の範囲において、ミクログリア数の増加は観察されなかった。炎症性サイトカインに関しても、予備実験において組織内濃度の有意な上昇等は観察されなかった。このことから、おそらく今回検討した程度の周産期甲状腺機能低下状態においては、母胎免疫活性化とは異なった機構でレポーター分子の発現上昇が起こっている可能性が考えられた。

一方、もう一つの脳構成細胞であるアストロサイトに関しては、大脳皮質における陽性細胞割合の増加が観察された。この現象の解釈は、例えば、甲状腺ホルモン前駆体である T4 は血液脳関門を通過後、アストロサイトに取り込まれ、その内部で活性型甲状腺ホルモン T3 になるが、投与マウスでは脳内の甲状腺ホルモンが減少しているため、より多く

の変換を行うことを目的に存在量が増加している可能性が考えられる。また、特定の脳領域のアストロサイトの活性化によって多動につながり得ることも報告されていることから [Cell. 177(5): 1280-1292.e20. (2019)], 今後さらに多角的な解析を行う必要があると考えられた。

E. 結論

PTU 誘導性の甲状腺機能低下状態に曝露された児動物の解析により、出生後の体重増加の遅延、甲状腺機能低下様の甲状腺組織像に加え、Syn-Rep レポーター活性の対照群とは異なる挙動を観察することができた。また、投与マウスの児動物大脳皮質においては、脳構成細胞のうち、アストロサイト陽性細胞割合の増加が観察された。これらの結果により、Syn-Rep マウスを用いて甲状腺機能低下による次世代影響を評価できることが示唆された。しかし、実際にどのようなメカニズムで甲状腺機能低下によって起こる現象が生じているのかを明らかにする必要があり、今後は発達段階ごとの詳細な現象の解析を行うことで科学的基盤を構築する必要があると考えられた。

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仔発生への影響評価, 第 50 回日本毒性学会学術年会, 横浜市, 2023 年 6 月
- 2) 小泉 茉奈海 他：周産期甲状腺機能低

- 3) 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, 横浜市, 2023 年 6 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仔発生への影響評価, 第 63 回日本先天異常学会学術集会, つくば市, 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, 広島市, 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, 岐阜市, 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仔発生毒性の評価, 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, 名古屋市, 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, 名古屋市, 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, 名古屋市, 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, 横浜市, 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, 横浜市, 2024 年 3 月

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

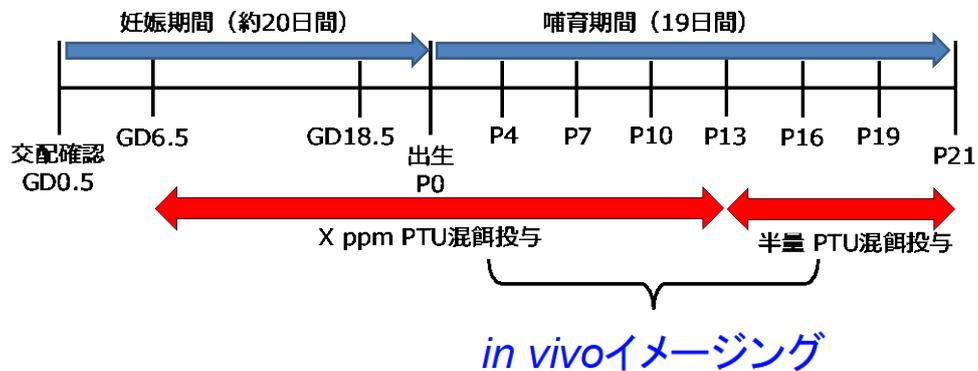
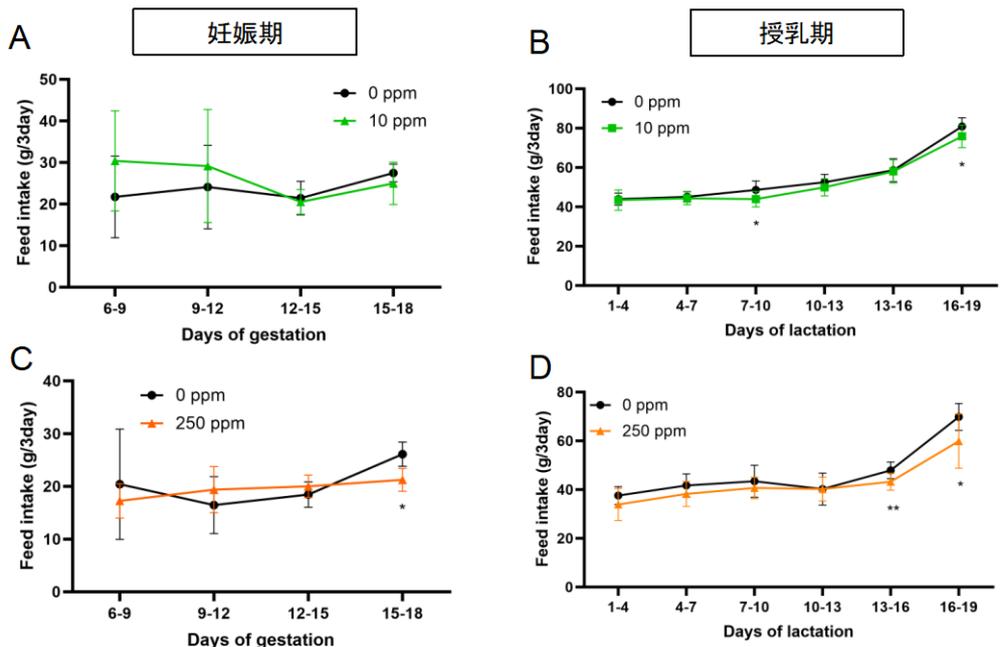


図1 PTU 混餌投与による甲状腺機能低下誘導モデルの作成

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。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および妊娠期の体重を3日ごとに測定した。児動物が P13 になるタイミングより混餌量を半量にした。児動物は3日ごとに *in vivo* イメージングを行った。解析した母動物の数は対照群：n=10、PTU 10 ppm 投与群：n=10、PTU 250 ppm 投与群：n=10 であった。

摂餌量



体重

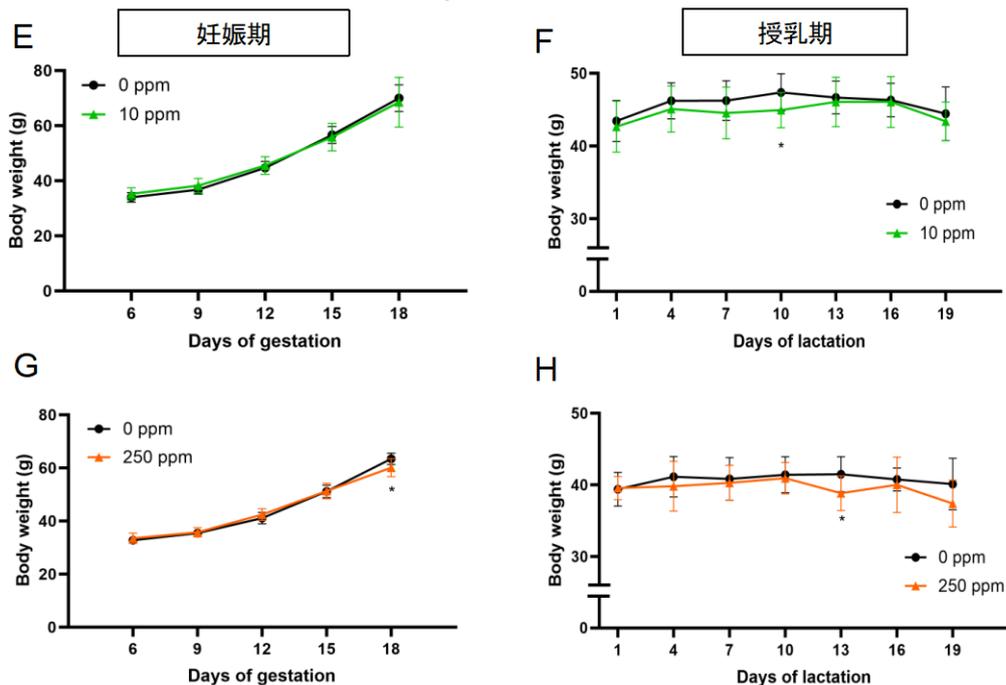
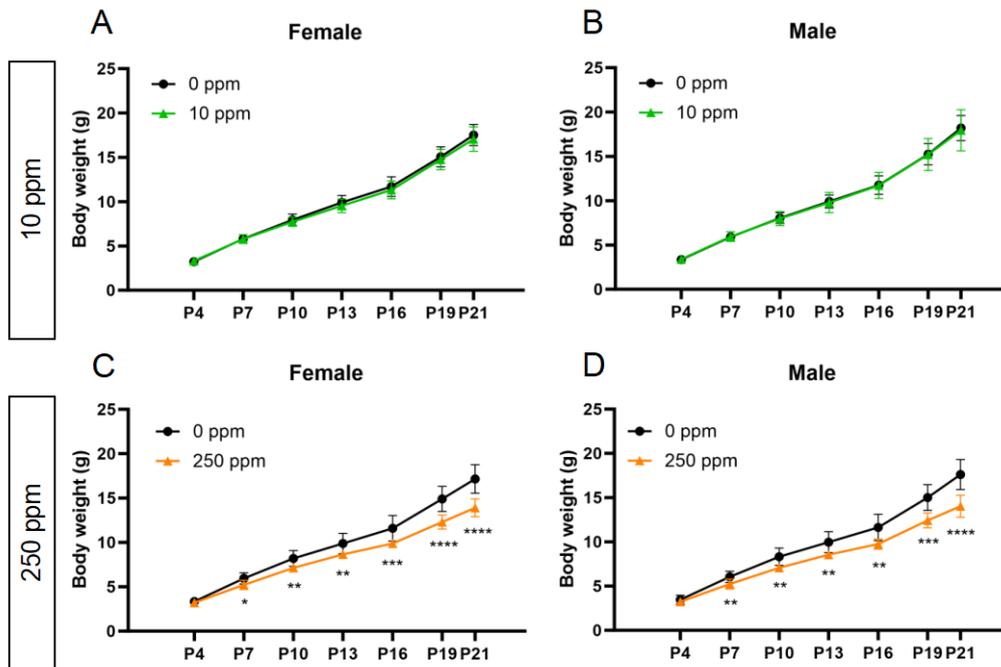


図2 PTU 誘導性甲状腺機能低下誘導モデル母動物の摂餌量・体重

10 ppm PTU 混餌投与母動物の妊娠期 (A)、授乳期 (B) における摂餌量。250 ppm PTU 混餌投与母動物の妊娠期 (C)、授乳期 (D) における摂餌量。10 ppm PTU 混餌投与母動物の妊娠期 (A)、授乳期 (B) における体重。250 ppm PTU 混餌投与母動物の妊娠期 (C)、授乳期 (D) における体重。データは mean ± SD で表し、比較検定は Student's t-test で行った。* $P < 0.05$ 、各群 $n=7-10$ 。

体重



レポーター活性

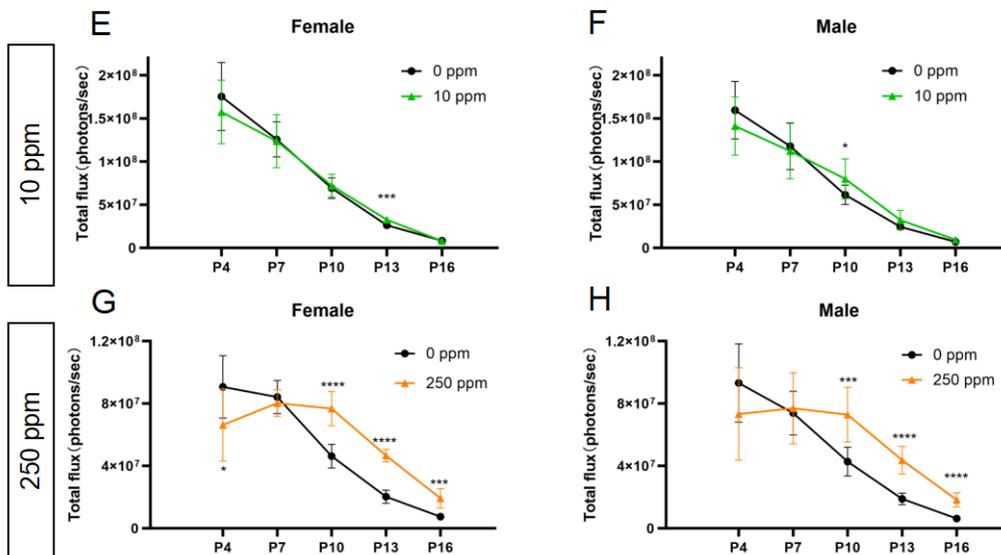


図3 PTU 誘導性甲状腺機能低下誘導モデル児動物の体重・Syn-Rep 活性

10 ppm PTU 混餌投与児動物雌性 (A)、雄性 (B) における体重変化。250 ppm PTU 混餌投与児動物雌性 (C)、雄性 (D) における体重変化。10 ppm PTU 混餌投与児動物雌性 (E)、雄性 (F) における Syn-Rep レポーター活性。250 ppm PTU 混餌投与児動物雌性 (G)、雄性 (H) における Syn-Rep レポーター活性。データは mean \pm SD で表し、比較検定は Student's t-test で行った。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.001、各群 n =10 (腹平均)。

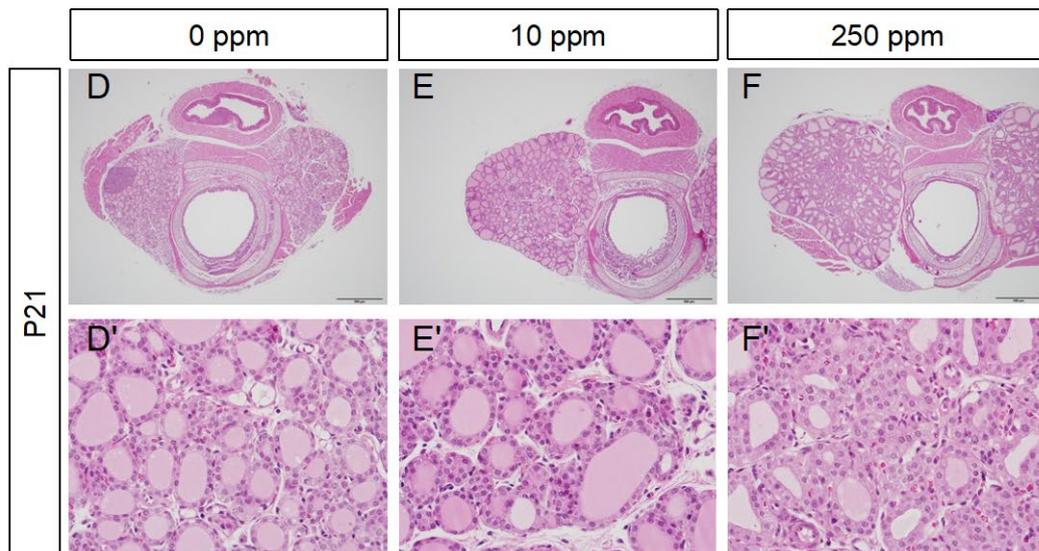
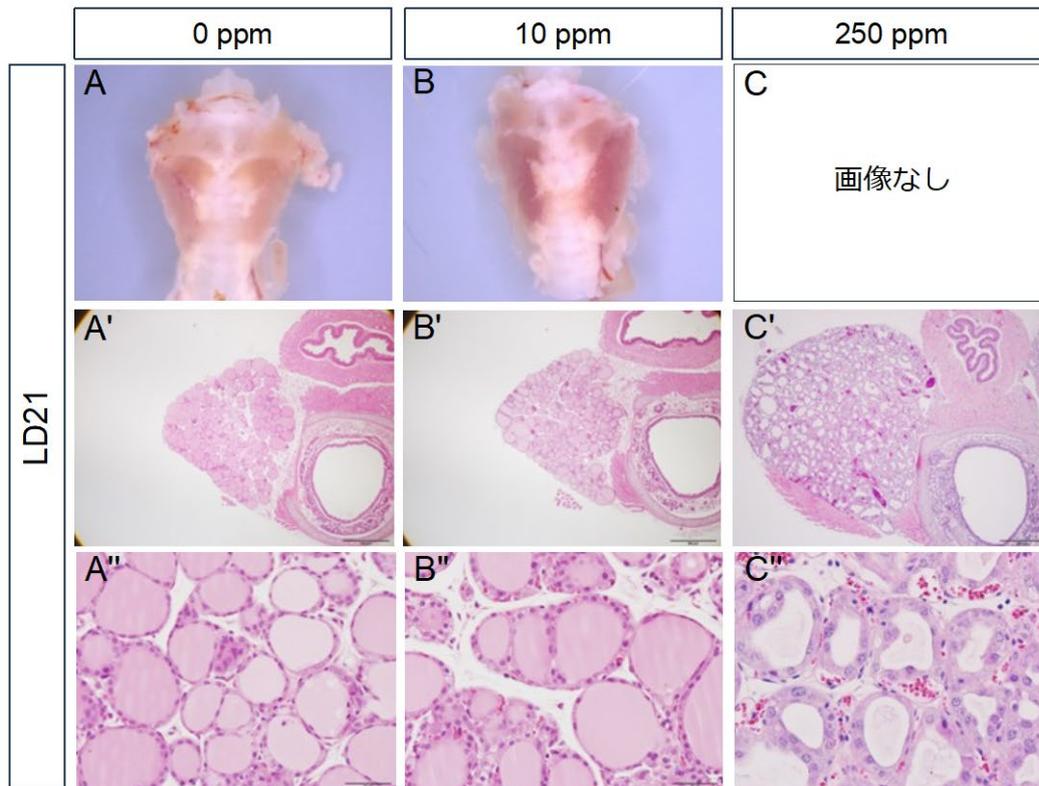


図4 PTU 混餌投与母動物および児動物の甲状腺組織像

対照群、10 ppm、250 ppm のPTU を混餌投与した母動物甲状腺の P21 における外観 (A, B)、HE 染色像 (A'-C', A''-C'')。対照群、10 ppm、250 ppm のPTU を混餌投与した児動物甲状腺の P21 における HE 染色像 (D-F, D'-F')。

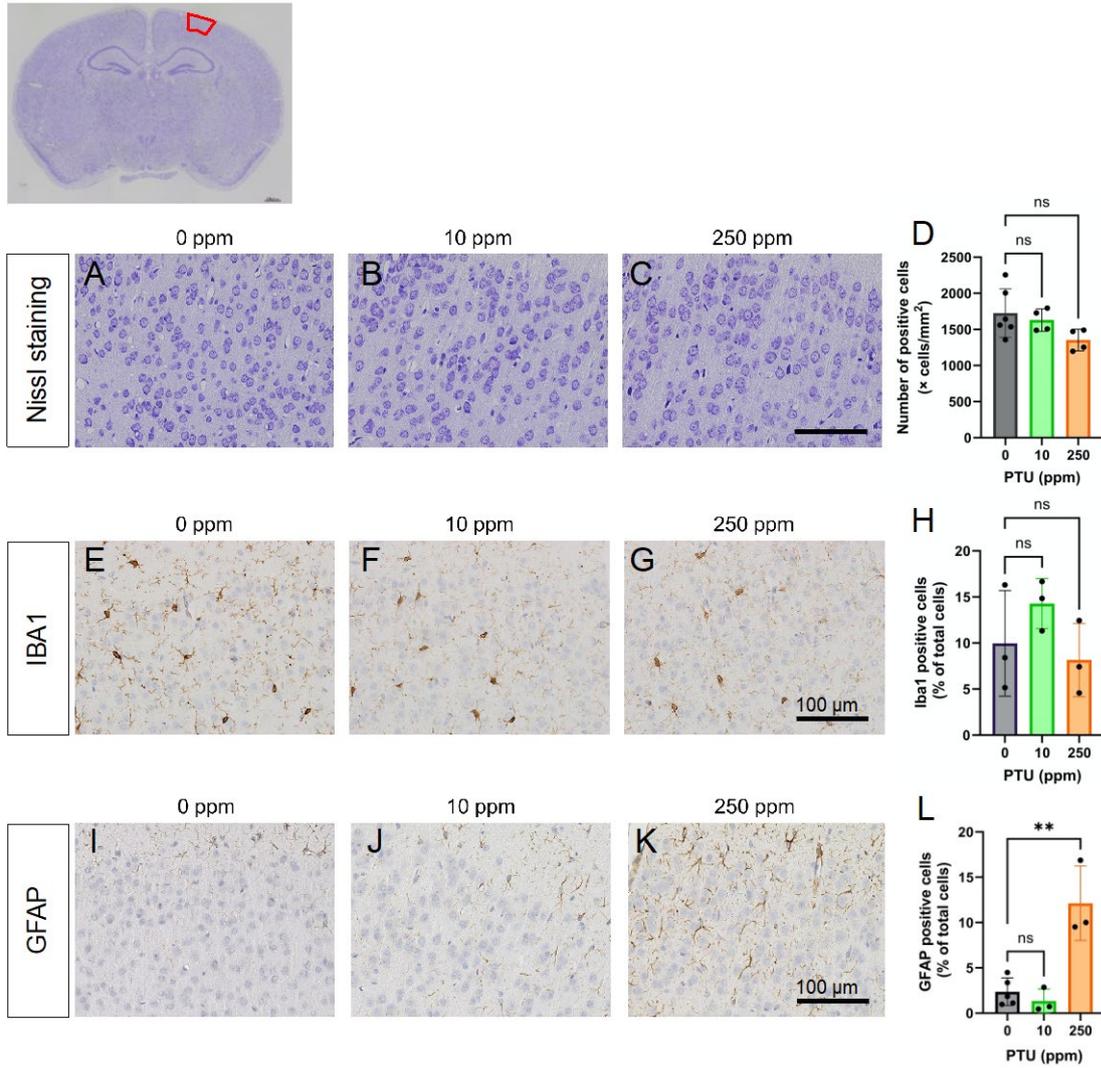


図5 PTU 混餌投与児動物の脳構成細胞の組織学的解析

対照群、10 ppm、250 ppm の PTU を混餌投与した P21 児動物大脳皮質（上図）における Nissl 染色像（A-C）、IBA1 免疫染色像（E-G）、GFAP 免疫染色像（I-K）と陽性細胞計数（D）、陽性細胞割合（H, L）。データは mean ± SD で表し、多重比較検定は Dunnett's multiple comparison test で行った。ns: not significant, ** $P < 0.01$ 。