

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：DNT 陽性対照化学物質の確立とその作用機構解明
～妊娠期～離乳期甲状腺機能低下によって誘導される児動物の行動異常の検討～
研究分担者：田熊 一徹（大阪大学 大学院歯学研究科・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多く取り残されている。本分担研究では、妊娠期～離乳期の甲状腺機能低下によって児動物にもたらされる発達神経毒性（DNT）を情動行動異常の発現を指標として評価するとともに、その異常行動発現の病態基盤となりうる神経組織学的な変化の検出を試みた。甲状腺機能低下を惹起する抗甲状腺薬プロピルチオウラシル（PTU）を用いて、OECD ガイドライン試験の DNT 試験（TG426）に準じて児動物の行動解析を行ったところ、PTU を 10 あるいは 250 ppm で摂餌させた群の雄性の児において、4 週齢以降にオープンフィールド試験での自発運動量の増大を認めた。また、10 ppm PTU 摂餌群で 4 週齢時に雄性児動物で新奇動物への匂い嗅ぎ行動の増加を認めた。さらに、250 ppm PTU 摂餌群で 8 週齢時に内側前頭前皮質（mPFC）において樹状突起スパイン数の増加を認めた。すなわち、妊娠期～離乳期の甲状腺機能低下によって児動物の脳で組織解剖学的な変化が生じること、多動と社会性異常という情動行動異常が惹起される可能性を示した。

A. 研究目的

妊娠初期におけるヒト胎児では母体由来の甲状腺ホルモンに依存していることから、妊娠期における母体の甲状腺機能低下は、妊娠中および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。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今なお賛否が分かれているが、児の脳の発達については、大規模疫学調査から妊娠期における甲状腺機能低下と IQ 低下との間に相関が認められている。このような背景のもと、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。しかしながら、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（DNT）との関連についての詳細は不明であり、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多く

取り残されている。なかでも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ことが問題となる。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、この問題をクリアーし、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。

既に先天性甲状腺機能低下症の症例や、甲状腺ホルモン受容体（TR） α 、及び β の欠損マウス等の遺伝子改変動物の表現型から、甲状腺ホルモンシグナルの欠失が様々な次世代影響を与えることはよく知られているが、ここで要求されるのは遺伝子欠損といった極端な状態の影響ではなく、化学物質で現実的に誘導される軽度の甲状腺機能低下状態における影響のデータである。これまで甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤等を用いた甲状腺機能低下モデルにおける検討が報告され

ているが、マウスにおけるモデルについては情報が極めて乏しかった。このような背景から、昨年度までに研究代表者の中西らならびに研究分担者の松丸らは、マウスを用いてPTUによる甲状腺機能低下モデルの作製を試みてきた。その結果、周産期のPTU混餌投与で、母動物に対し用量依存的な甲状腺機能低下状態を誘導できることを見出した。

そこで本分担研究では、母動物の甲状腺関連指標に影響が認められ始めるPTUの閾値用量(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)／チロキシン(T4)の低下が認められる典型的用量(250 ppm)を用いて、DNTの最終評価である児動物の情動行動変化の評価をおこなった。また情動行動変化をもたらす発現分子基盤を追究する目的で、脳の組織学的解析を行った。

B. 研究方法

1. 動物

実験には妊娠雌性および雄性のICR系マウスを日本エスエルシー(株)より購入して用いた。動物実験の実施に関しては、大阪大学において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

被験物質の投与は、DNT試験(OECD TG426)に準じて行った。PTU(Sigma-Aldrich)は、AIN-93M調整食(Research Diets)に10あるいは250 ppmとなるように混餌し、妊娠6日目から出生後13日目まで自由摂餌により母動物に与えた。児動物が13~21日齢の

間は混餌するPTUを半用量(5あるいは125 ppm)に変更して与えた。

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. 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。

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 × 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。

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。

4 血清中および脳組織中の T4 濃度測定

T4 量は、離乳時の母マウスおよび間引きにより余剰とした仔マウスより血清標品および脳組織ホモジネート標品を調製し、Thyroxin Competitive ELISA Kit (Invitrogen) を用いて定量した。

5 組織学的解析

脳の組織形態学的変化は、行動解析後のマウスより脳組織を採取し、FD Rapid GolgiStain™ Kit (FD NeuroTechnologies) を用いて染色し、内側前頭前皮質 (mPFC) における樹状突起スパイン数を計数した。

6. 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 Prism10 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. PTUを10 ppmで摂餌させた母マウス由来の雄性児動物の行動変化

10 ppm PTU摂餌群の雄性児動物では、対照群と比べて、オープンフィールド試験における自発運動量が幼若期 (4週齢) より成体期 (8週齢) にかけて増加していた (図1, 2)。また、本児動物では、幼若期 (4週齢) に社会性相互作用試験における匂い嗅ぎ行動が増大していた (図3)。一方、8週齢時に行った Y 字型迷路試験では、10 ppm PTU摂餌群で総アーム進入回数の低下が見られたが、自発的交替行動について両群間に差異は認められなかった (図4)。

2. PTUを250 ppmで摂餌させた母マウス由来の雄性児動物の行動変化と神経解剖学的変化

250 ppm 投与群においても、対照群と比べて、オープンフィールド試験における自発運動量が幼若期 (4週齢) より成体期 (8週齢) にかけて増加していた (図5, 6)。自発運動量の日内変動解析においても、250 ppm 投与群の自発運動量の増加が明期に生じていることを認めた (図7)。一方、社会性相互作用試験における匂い嗅ぎ行動は幼若期 (4週齢) および成体期 (8週齢) とともに両群間に差異は認められなかった (図8)。

行動解析後の児動物の脳について、Golgi 染色による組織学的解析を行ったところ、250 ppm 投与群の mPFC 領域で樹状突起スパイン数が増加していることを認めた (図9)。

3. PTUを250 ppmで摂餌させた母マウスおよびその雄性児動物のT4量の変化

250 ppm 投与群の母動物では、児動物離乳時の血清 T4 濃度が低下していた (図 10A)。児動物については、生後 4 日齢の脳では検出限界以下であり、行動解析後 (9 週齢) の血清 T4 濃度においては 250 ppm 投与群と対照群に差異は認められなかった (図 10B)。

D. 考察

本分担研究では、妊娠期から離乳期にかけて母マウスに 10 あるいは 250 ppm PTU を含む摂餌をさせることにより、雄性児動物において離乳後早期より自発運動と匂い嗅ぎ行動の増加という情動行動異常を惹起することを見いだした。また、自発運動の増加については成育後も継続していることを認めた。また、250 ppm 投与群において、離乳時に母体血清中の T4 レベルが低下していることを確認し、さらに成体期の雄性児動物において mPFC 領域の樹状突起スパイン数が増加していることを示した。これらの成績を考え合わせると、妊娠期から離乳期の母マウスの甲状腺機能低下は、雄性児動物において脳器質障害をもたらす、異常行動を発現させる可能性が示唆された。

本分担研究では、10 ppm 投与による母体の甲状腺機能への影響は極めて小さいと予測したため、母体血清中の T4 レベルの測定は実施しなかった。しかし今回のデータは、PTU によって誘導される甲状腺機能低下において、母動物の甲状腺関連指標に変動が認められる閾値付近の用量においても、雄性児動物に情動行動異常が生じる可能性を示唆するものである。今後は、母体および児動物の甲状腺関連指標の詳細について検討する必要があると考えている。

また、脳組織学的解析については、250 ppm 投与群において mPFC 領域の樹状突起スパイン数の計数に留まった。多動と社会性行動変化が発現していることより、各用量群友に少なくとも体性感覚野、運動野および海馬領域を対象に加えて詳細な脳組織学的解析を実施する必要がある。さらに、ヒトの発達障害では男児の発現率が高い。したがって、今後はヒトとの相関を検証するためにも、PTU 誘発異常行動発現の性差についても検討を行う必要があると考えている。

E. 結論

妊娠期から授乳期の母体の甲状腺機能低下が、雄性児動物で離乳後早期より成育後ま

で継続する情動行動異常を惹起することを見いだした。この異常行動の発現に神経ネットワークの構成異常という脳器質障害が関与する可能性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwahashi M, Yoshimura T, Harigai W, **Takuma K**, Hashimoto H, Katayama T, Hayata-Takano A, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice show length abnormalities of the axon initial segment, *J Pharmacol Sci* 153:175–182 (2023)

2. 学会発表

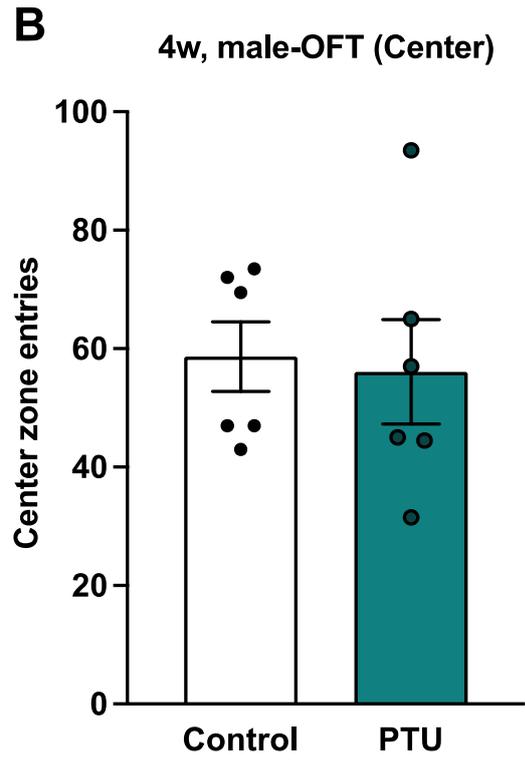
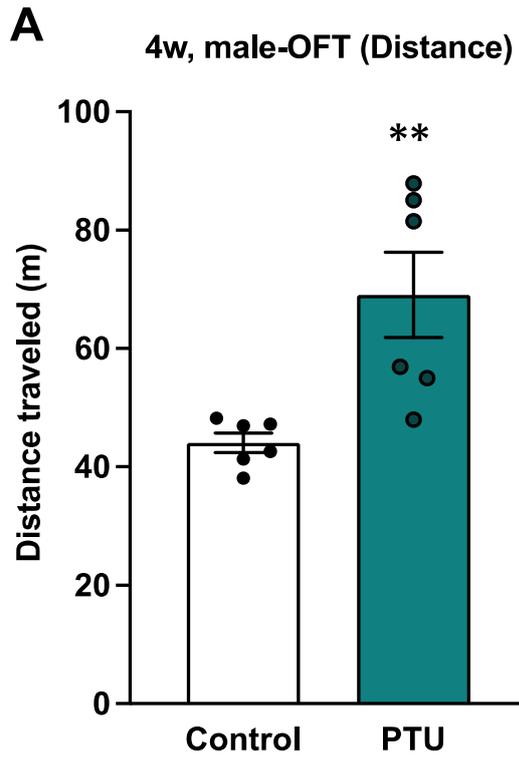
- 1) 田原 孟 他：抗てんかん薬バルプロ酸の胎生期曝露は中枢性感作に伴う持続的な痛覚過敏とアロディニアを引き起こす, フォーラム 2023 衛生薬学・環境トキシコロジー, 広島, 2023 年 9 月
- 2) Takemoto T, et al. : Oxytocin restores abnormal social behavior in a mouse model of 3q29 microdeletion, *Neuroscience 2023* (The 52nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience), Washington, D.C., USA, 2023 年 11 月
- 3) 張替 若菜 他：PACAP KO マウスの多動性と軸索起始部の形態に対する ADHD 治療薬の影響, 第 66 回日本神経化学会大会, 神戸, 2023 年 7 月
- 4) 村田 拳一郎 他：胎生期 PGD2-DP1 シグナル活性化はマウスの自閉症様の精神行動異常を引き起こす, 第 50 回日本脳科学会, 大阪, 2023 年 12 月
- 5) 竹下 黎 他：内側前頭前皮質における PACAP-PAC1 シグナルの遮断が反復社会的敗北ストレスマウスに与える影響, 第 97 回日本薬理学会年会, 神戸, 2023 年 12 月
- 6) 金子皓 他：非定型抗精神病薬クロザピンの認知機能障害改善作用における結合組織成長因子の関与, 第 97 回日本

- 薬理学会年会，神戸，2023年12月
- 7) 岩橋 美咲 他：注意欠如・多動症 (ADHD)様行動を示すマウスにおいてみられた神経軸索起始部の異常はADHD治療薬によって行動異常の回復と共に回復する，第97回日本薬理学会年会，神戸，2023年12月
- 8) 吾郷 由希夫 他：バルプロ酸の胎内曝露は中枢性感作と痛覚感受性の増大を引き起こす，第44回日本臨床薬理学会

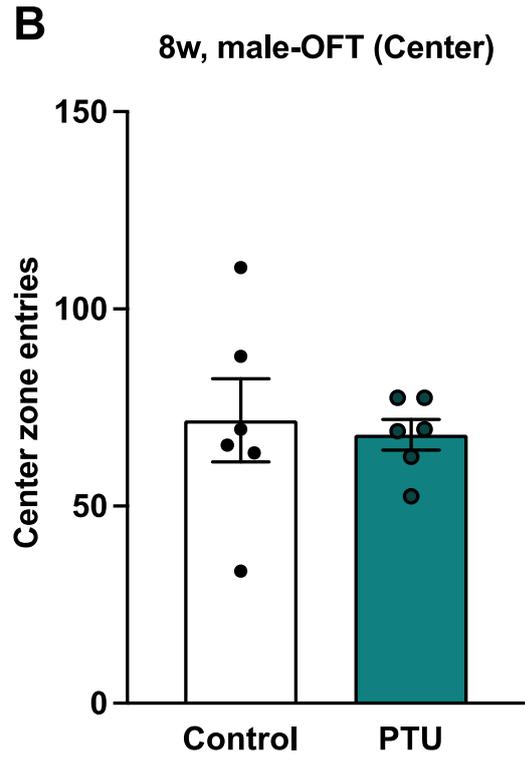
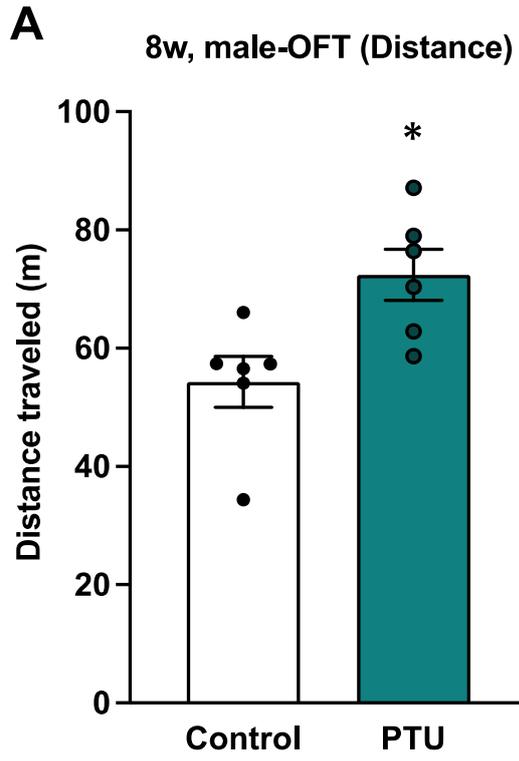
- 学術総会，神戸，2023年12月
- 9) 田原 孟 他：自閉スペクトラム症モデルマウスの痛覚異常と社会性行動障害におけるTRPV1の役割，日本薬学会第144年会，横浜，2024年3月

G. 知的財産権の出願・登録状況

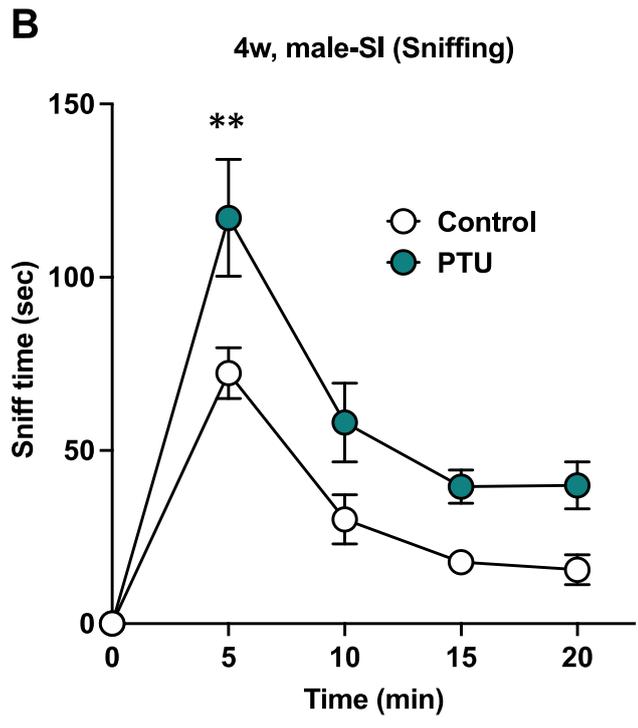
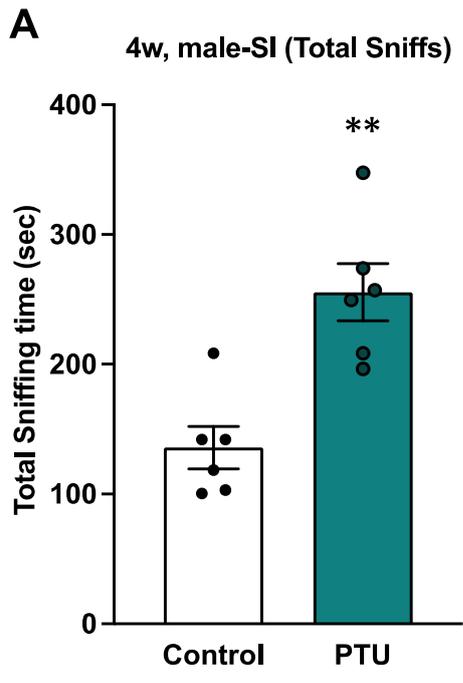
該当なし



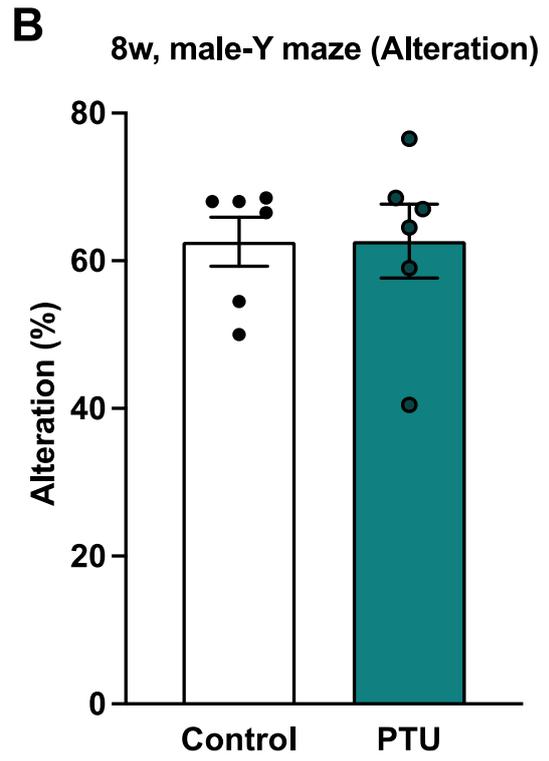
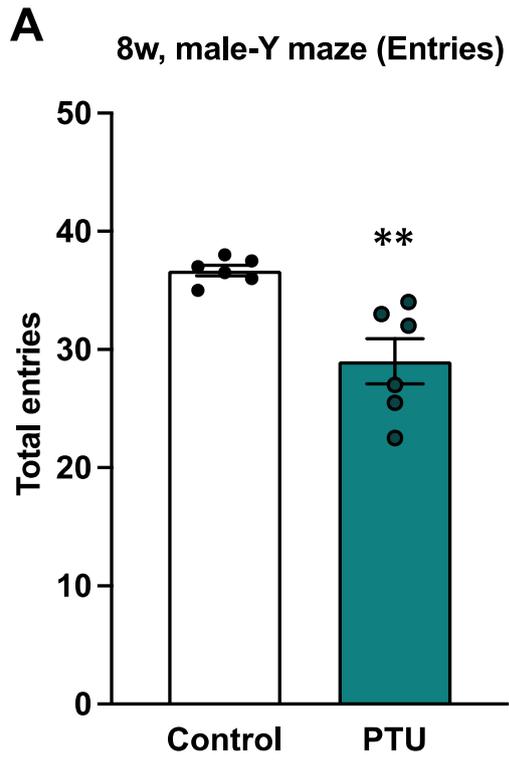
☒ 1



☒ 2

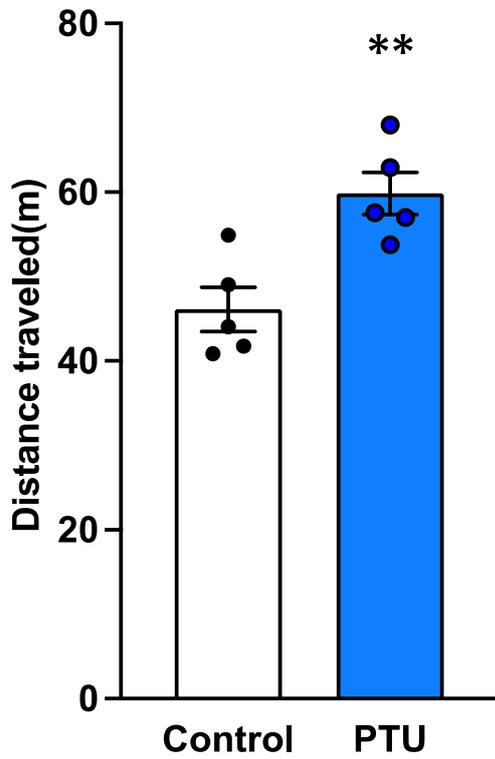


☒ 3

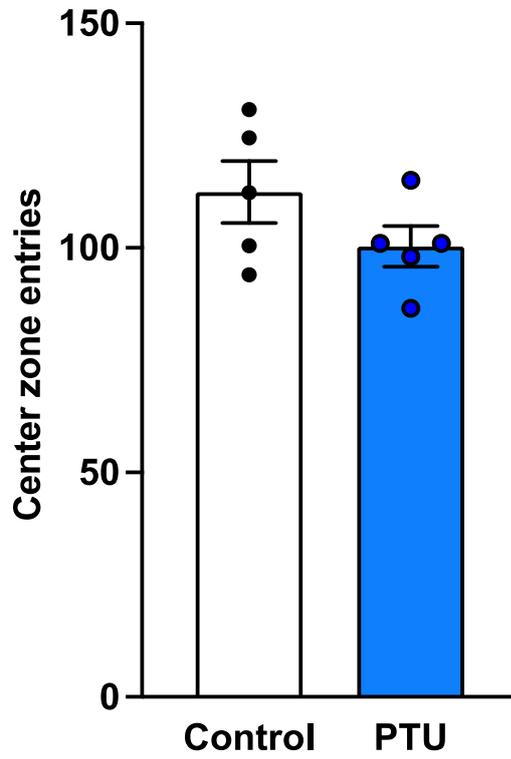


☒ 4

A 4w, male-OFT (Distance)

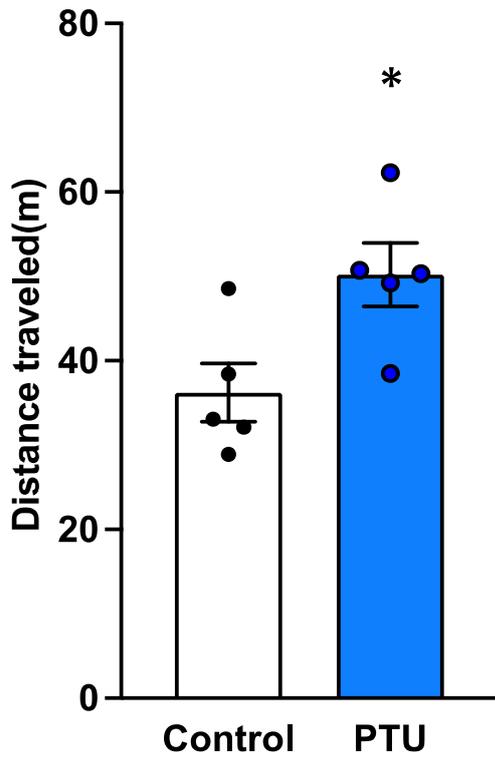


B 4w, male-OFT (Center)



☒ 5

A 8w, male-OFT (Distance)



B 8w, male-OFT (Center)

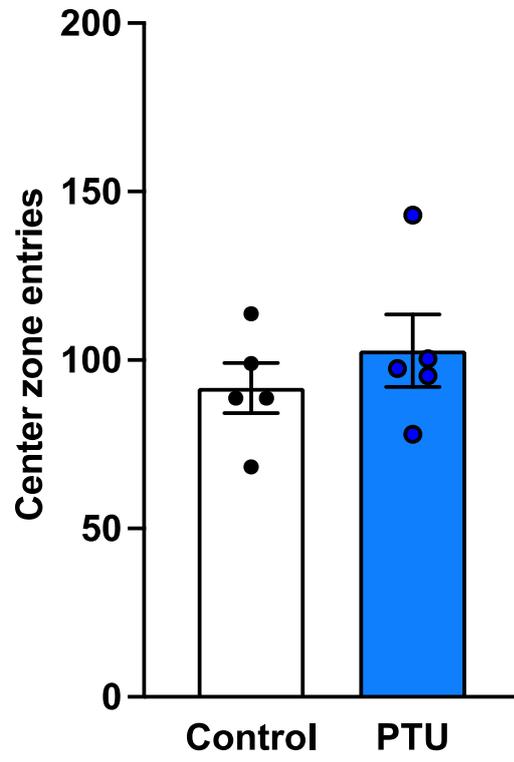
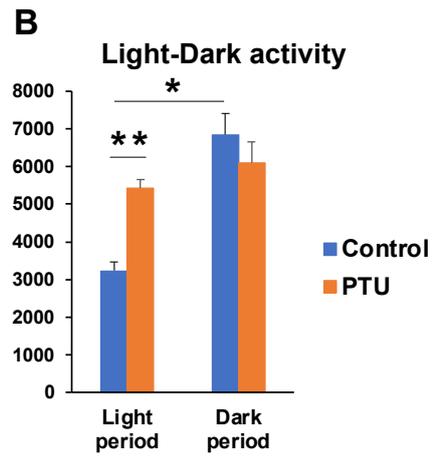
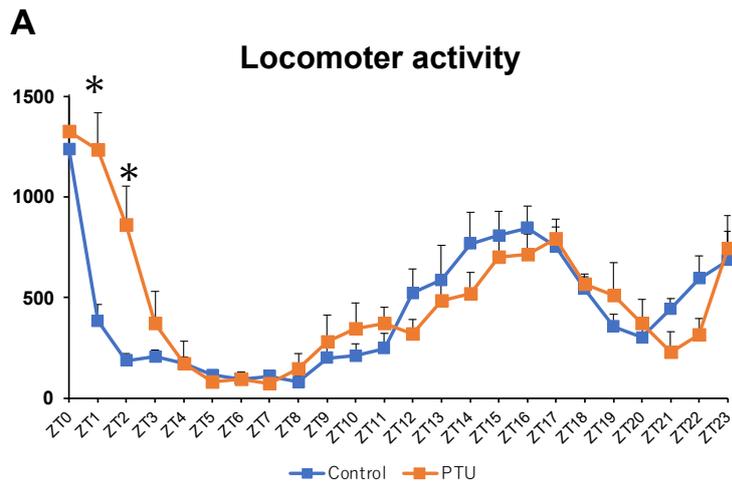
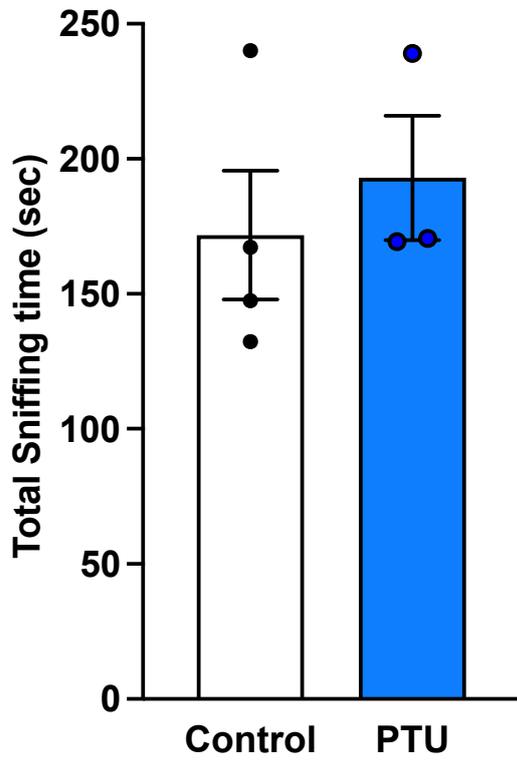


Figure 6

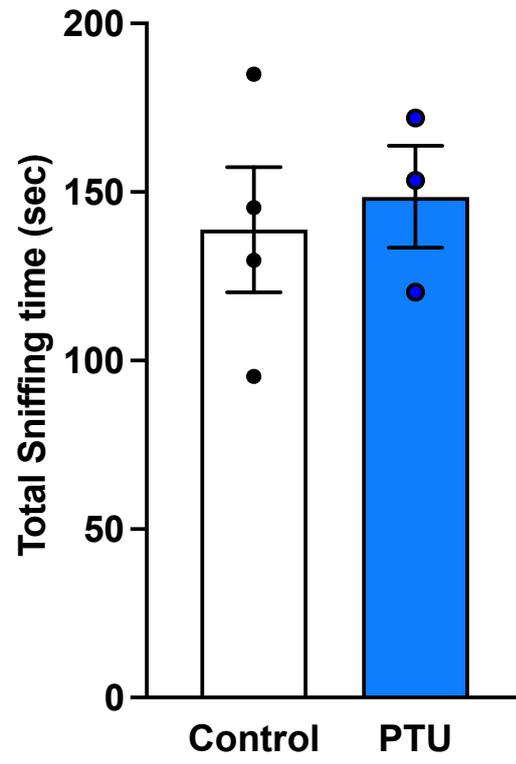


☒ 7

A 4w, male-SI (Total Sniffs)

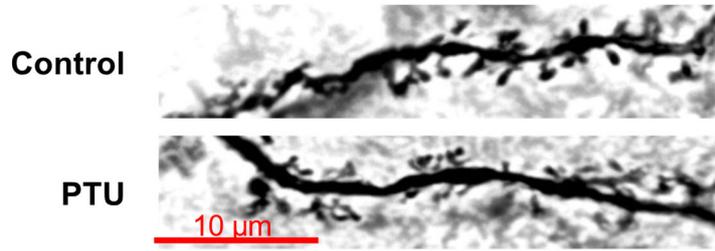


B 8w, male-SI (Total Sniffs)



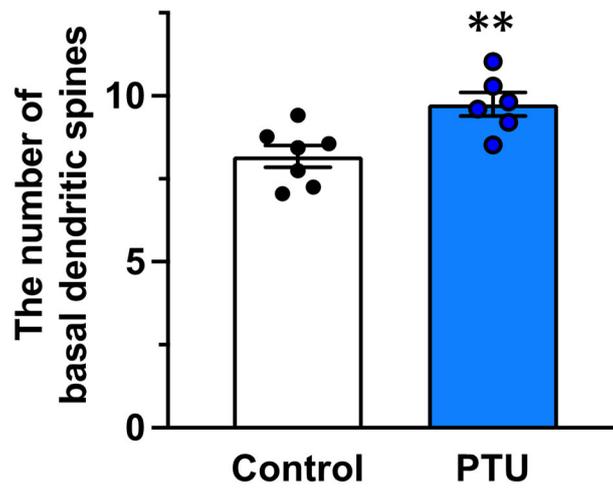
8

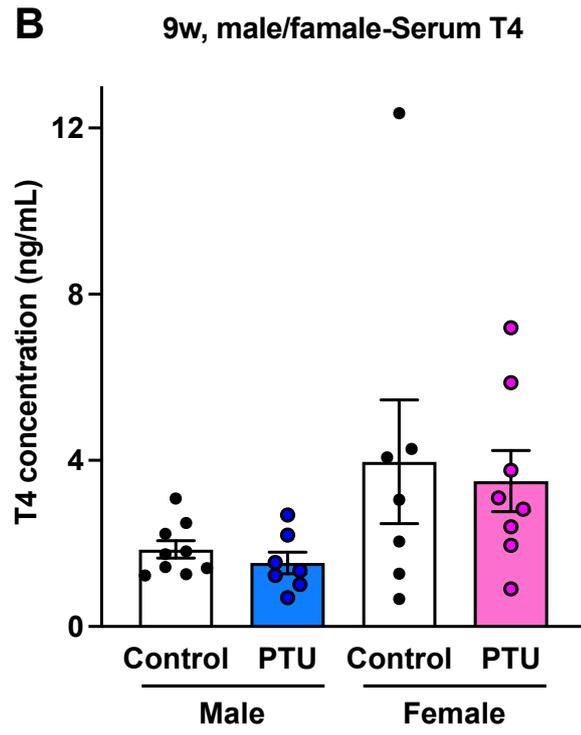
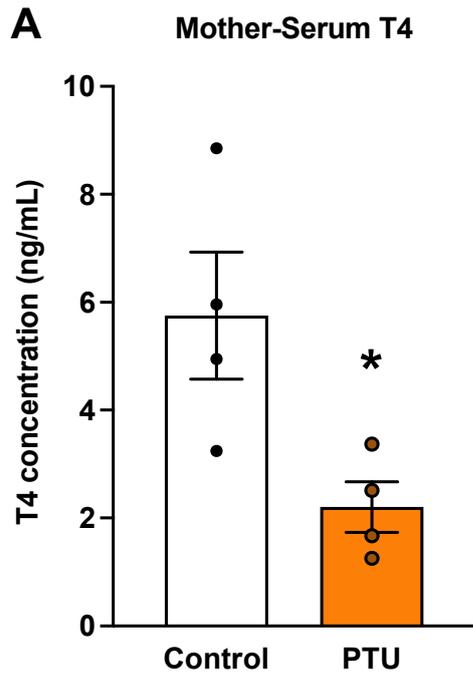
A



B

9w, male-Golgi staining





☒ 10