

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)

I. 総括研究報告書

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）
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。しかしガイドライン試験に追加された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。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。

これまでに本研究では、児の脳発達状態を非侵襲的にトレースでき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、妊娠期から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行ってきた。昨年度までにSyn-RepマウスのDNT評価におけるNew Approach Methodology（NAM）としての有用性を検証するとともに、抗甲状腺薬プロピルチオウラシル（PTU）を用いた甲状腺機能低下マウスモデルの作成条件を確定した。またSyn-Repマウスは、PTUで誘導された甲状腺機能低下によるDNTを検出できる可能性を見出した。

今年度はPTUの投与量を、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用量に設定し、これらの条件で母動物に曝露させた際の児動物の脳発達状態と各種行動への影響をガイドライン試験に準じて検討した。また昨年度に引き続きSyn-RepマウスのDNT評価におけるNAMとしての有用性を検証するために、バルプロ酸（VPA）やPTUとは作用機構が異なるDNT陽性対照物質と考えられる鉛（Pb）曝露時の応答性についても検討した。これに加えて、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。さらに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*試験法を構築するために、ヒトiPS細胞を用いて甲状腺機能低下時に誘導される神経分化阻害のマーカー分子の抽出を行った。

その結果、今年度は以下のことを明かにした。

- 1) 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り、NAMとしての有用性が示された。
- 2) 妊娠期～離乳期の甲状腺機能低下においては、児動物大脳皮質の神経細胞数に影響は認められなかったが、アストロサイト数の増加が観察された。またSyn-Repマウスはアストロサイトの活性化を伴う脳発達への影響も評価できる可能性が示された。
- 3) 妊娠期～離乳期に甲状腺機能が低下すると、雄性児動物に多動などの情動行動の異常が誘導される可能性が示された。またこの影響は、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PTU用量においても認められた。
- 4) 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。
- 5) ヒトiPS細胞を用いた甲状腺機能低下モデルにおいて、化合物の発達神経毒性を評価できるバイオマーカーとしてFactor Xを抽出した。

以上より、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

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。本研究成果は、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）の解明への貢献が期待される。また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提案や代替試験法の提案にも繋げたいと考えている。

分担研究者

諫田泰成 国立医薬品食品衛生研究所・部長
田熊一敏 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 岐阜薬科大学 薬学部・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（TH）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のような極端な症状を誘導するものではなく、TH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。

これまでに本研究では、Syn-Rep マウスやヒト iPS 細胞等を用いて検討を行い、以下のことを明らかにしてきた。

1. Syn-Rep マウスは、DNT 陽性対照物質である VPA 等による DNT 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 としての有用である可能性を示した。
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. 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。
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るとともに、妊娠期～離乳期の甲状腺機能低下に対して最も敏感に影響を受ける組織は脳である可能性を見出した。
5. ヒト iPS 細胞を用いた神経細胞分化誘導モデルにより、TH 受容体 (THR) α が神経細胞分化に重要であるとともに、THR α 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。

今年度は PTU の投与量を、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) /チロキシン (T4) の低下が認められる典型的用量 (250 ppm) の2用量に設定し、これらの条件で母動物に曝露させた際の児動物の脳発達状態と各種行動への影響をガイドライン試験に準じて検討した。また昨年度に引き続き Syn-Rep マウスの DNT 評価における NAM としての有用性を検証するために、VPA や PTU とは作用機構が異なる DNT 陽性対照物質と考えられる鉛 (Pb) 曝露時の応答性についても検討した。これに加えて、TH 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。さらに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* 試験法を構築するために、ヒト iPS 細胞を用いて甲状腺機能低下時に誘導される神経分化阻害のマーカー分子の抽出を行った。

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、交配後陰プラグが確認されたマウスを胎齢 0 日 (E0) とし、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. 抗甲状腺薬および Pb の投与

投与スケジュールは OECD ガイドライン TG426 (発達神経毒性試験) に準じて実施した。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 (P46:図 1)。

鉛の曝露には、酢酸鉛 (PbAc; 関東化学、純度 > 99.5%) を用いた。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 GD6 から離乳時 (P21) 自由摂取させた。

3. 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。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。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、ナカライテック) 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。

4. 血清中マーカーの測定

血清中および脳組織ホモジネートの T4 量の測定は、T4 量を Thyroxin Competitive ELISA Kit (Invitrogen) を用いて、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。

5. 脳の組織学的解析

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マイクローム (Leica) にて厚さ 5 μ m 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。画像はオールインワン蛍光顕微鏡 (キーエンス) また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解析ソフト inForm ver. 2.4 (PerkinElmer) を用いて計数した。

内側前頭前皮質 (mPFC) における樹状突起スパイン数の測定は、FD Rapid GolgiStain™ Kit (FD NeuroTechnologies) にて染色を行い計測した。

6. *in vivo* イメージング解析

出生後から発達期 (P4~P16) 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。

7. 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。

8. 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。3 日後に選別された細胞から RNA を回収して qPCR を行ったところ、scramble control を導入した細胞に比べて約 93% の THR α ノックダウンが認められた。

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 α 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 α 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を参照されたい。)

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。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 (P28: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 (P28: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 (P29: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 (P29: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 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 (P30: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 (P31: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 (P32: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 (P32: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 (P33: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 (P34: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 (P35: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 (P36: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、

子宮重量のへの影響評価

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 (P36: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 (P37: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 (P37: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 (P38: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 (P39-40: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。

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 (P47: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 (P47: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 (P47: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）（P47: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（P49: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（P49:図4C', C''）。

3-2. PTU 曝露時における Syn-Rep マウス児動物脳の *in vivo* イメージング解析と甲状腺および脳の組織学的解析

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（P48: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（P48: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（P49: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（P49: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以降に低下していった（P48: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（P48: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（P50:図5A-D）。同様に、抗IBA1抗体を用いたミクログリア

の染色（P50:図5E-H）、抗GFAP抗体を用いたアストロサイトの染色（P50: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（P50: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（P50:図5L）。

3-3. PTU 曝露時における雄性児動物の行動変化

10 ppm投与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（P56-57: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（P58: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（P59:図4）。

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（P60-61: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（P62: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）ともに両群間に差異は認められなかった（P63: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（P64:図9）。

また血中THレベルについても検討を行ったところ、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（P65: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（P65:図 10B）。

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 α の下流で神経分化に関わる分子の NGS 解析

前年度までにヒト iPS 細胞を用いて THR α のノックダウンを行い、甲状腺機能低下モデルを作製するとともに、DNT 陽性対照物質である農薬のクロルピリホス（CPF）や医薬品のバルプロ酸（VPA）の曝露による神経分化阻害が、THR α のノックダウンにより亢進することを見出した。また THR α ノックダウン細胞を用いて次世代シーケンス解析（NGS 解析）を行った結果、THR α シグナルの下流で機能し、神経（外胚葉）分化に関与する遺伝子のスクリーニングを行った。そこで今年度は NGS 解析により、THR α の下流で神経分化に関わる遺伝子の探索を試みた。THR α ノックダウン細胞で発現が低下する遺伝子をスクリーニングした結果、神経分化に関わる Factor A, B（P70:図 1）、軸索伸展に関わる Factor C（P71:図 2）、D（P72:図 3）、神経分化や薬剤抵抗性に関わる Factor X 遺伝子を同定した（P73:図 4）。

4-2. THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経分化に対する CPF 曝露の影響

THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞に DNT 陽性対照物質である CPF を曝露（10 μ M）し、神経分化能に対する影響を調べた。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞を神経系に分化誘導する際に CPF を曝露したところ、分化マーカー PAX6 の発現はわずかに減少した（P74:図 5）。一方、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に CPF を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて PAX6 発現が約 50%抑制された（P74:図 5）。

そこで、THR α の下流因子について検討し

た。すでにスクリーニングした因子の中から、Factor X の発現について調べた。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞の神経分化時に CPF を曝露しても Factor X の発現はほとんど変化しなかった（P75:図 6）。一方、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に CPF を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて Factor X 発現が約 40%抑制された（P75:図 6）。以上の結果から、Factor X は CPF の神経毒性に関与していることが示唆された。

4-3. THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経分化に対する VPA 曝露の影響

次に、DNT 陽性対照物質である VPA についても同様に神経分化能に対する影響を検討した。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞の神経分化時に VPA 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（P76:図 7）。一方、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に VPA を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて PAX6 発現が約 60%抑制された（P76:図 7）。また THR α の下流因子として同定した Factor X の発現についても調べた。その結果、scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞の神経分化時に VPA を曝露しても Factor X の発現はほとんど変化が認められなかった（P77:図 8）。非常に興味深いことに、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に VPA を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて Factor X 発現が約 30%抑制された（P77:図 8）。したがって、Factor X は VPA の神経毒性に関与することが示唆された。

以上の結果より、NGS 解析で同定した Factor X は発達神経毒性の評価マーカーとして有用である可能性が考えられる。

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. Syn-Rep マウスの DNT 評価の NAM としての有用性について

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 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 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。

2. BHPF の甲状腺機能への影響と催奇形性について

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一下垂体—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。

3.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

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。

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 VPA 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 投与群と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、対照群と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。

今年度はこのような条件下に曝露した児動物について各種行動試験を行った。その結果、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。先行研究でも、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)] が、本研究結果はこれを指示する結果であったと言える。特筆すべきは、母動物における甲状腺関連指標に影響が認められ始める閾値用量 (10 ppm) において、児動物の行動異常が認められた点である。先述のとおりこの用量群では、児動物の甲状腺組織では明らかな甲状腺機能低下が認められていることから、行動試験の結果を最も反映しているエンドポイントは、児動物の甲状腺組織像である可能性が示唆された。まだ予試験的に行った実験であるため、今後追加の行動試験を行い、用量反応性等に

についても詳細なデータを取得する予定である。

脳の組織学的解析については、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。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。その一方で、成体期の解析では、行動異常が認められた 250 ppm 投与群の雄性児動物の脳において、mPFC 領域の樹状突起スパイン数が増加していることが確認された。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] を誘導しうることが示されている。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ている。

4 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

THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞を用いて NGS 解析を行った結果、THR α の下流で働く神経分化因子として Factor X の同定に成功した。さらに上記の化合物に対する応答性を調べたところ、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞における Factor X の発現は、コントロール細胞より低下する傾向が認められた。Factor X に関しては原著論文にまとめる必要があるため、この報告書では詳細な情報を記載できない。少なくとも PAX6 の下流で作用するシグナル分子であり、ヒト ES 細胞由来神経系細胞において機能を有することが報告されている。しかしながら、Factor X による神経分化機構のメカニズムはいまだ不明であるため、今後、さらに詳細に検討する必要がある。

in vitro と *in vivo* を比較検討する観点から、動物でも同様に Factor X を介する機構が働いているのかは重要である。Factor X のノックアウトマウスの解析結果ではどのようなフェノタイプが報告されているのかなど興味深い。さらに、Syn-Rep マウスの NGS データと照合することにより、詳細な機能が明らかになることが期待される。さらに、化学物質の体内動態などの情報を考慮して、ハザードの特定からリスク評価に展開できるのか検討する必要がある。

今後は、発生毒性や神経毒性が懸念されている他のカテゴリーの化学物質、たとえば金属などを追加して、評価法の適用範囲や chemical space などを明らかにする必要がある。これにより本モデルの有用性を明らかにすることが期待される。

E. 結論

1. 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り、NAMとしての有用性が示された。
2. 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。
3. 妊娠期～離乳期の甲状腺機能低下においては、児動物大脳皮質の神経細胞数に影響は認められなかったが、アストロサイト数の増加が観察された。またSyn-Repマウスはアストロサイトの活性化を伴う脳発達への影響も評価できる可能性が示された。
4. 妊娠期～離乳期に甲状腺機能が低下すると、雄性児動物に多動などの情動行動の異常が誘導される可能性が示された。またこの影響は、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PTU用量においても認められた。
5. ヒトiPS細胞を用いた甲状腺機能低下モデルにおいて、化合物の発達神経毒性を評価できるバイオマーカーとしてFactor Xを抽出した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 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 Rep* 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).
- 3) 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) 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、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) 安彦 行人 他：化学構造に基づくクラスタリングと MEA 実験の統合的手法による化学物質発達神経毒性の評価、第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月
- 4) 山田 茂 他：ヒトiPS細胞由来神経細胞における解離性麻酔剤の神経毒性評価、第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月
- 5) 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、2023年7月
- 6) 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、2023年7月
- 7) **諫田 泰成**：ヒトiPS細胞を用いた発達神経毒性ガイドランスと今後の展望、第63回日本先天異常学会学術集会、つくば、2023年7月
- 8) 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回日本神経化学学会大会、神戸、2023年7月
- 9) 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
- 10) 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
 - 11) 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
 - 12) 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、2023年11月
 - 13) 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
 - 14) 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
 - 15) 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
 - 16) 諫田 泰成：化学物質の発達神経毒性評価と甲状腺影響評価の取り組み、日本動物実験代替法学会、千葉、2023年11月
 - 17) 村田 拳一朗 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
 - 18) 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
 - 19) 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
 - 20) 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
 - 21) 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
 - 22) 安彦 行人 他：ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイシステムによるフルオキセチンの神経毒性評価、第 97 回日本薬理学会年会、神戸、2023年12月
 - 23) 山田 茂 他：ヒト iPS 細胞由来神経細胞による解離性麻酔剤の神経毒性評価、第 97 回日本薬理学会年会、神戸、2023年12月
 - 24) 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
 - 25) 諫田 泰成：甲状腺ホルモンを介した発達神経毒性の評価、日本薬学会第 144 回年会、横浜、2024年3月29日
 - 26) 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
 - 27) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし