

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総合研究報告書

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。本研究では、独自に作製した神経細胞の分化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）とヒトiPS細胞を用いてこの問題の解決を図る。

本研究では以下の検討を実施した。

- 1) 甲状腺機能低下によって誘導されるDNTの評価を効果的に進めるために、Syn-Repマウスの各種DNT陽性化学物質に対する応答性を解析し、DNT研究における有用性を検証した。
- 2) 本研究では、抗甲状腺薬を用いてマウス甲状腺機能低下モデル作成するが、その情報が極めて乏しいことから投与量の最適化を行った。
- 3) 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。
- 4) 他の動物種で甲状腺機能をかく乱することが報告されている代替ビスフェノールであるfluorene-9-bisphenol (BHPF) について、甲状腺機能への影響を含めた次世代影響の検討を行った。
- 5) ヒトiPS細胞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とバイオマーカーの抽出を試みた。

その結果、本研究では以下のことを明かにした。

- 1) Syn-Repマウスは、発達期脳の神経細胞の構築状態やDNT陽性対象化学物質の影響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) としての有用である可能性が示された。
- 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も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、妊娠期に母体の甲状腺機能が抑制されても、胚の着床や児の骨格・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) 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極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) 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。
- 6) ヒトiPS細胞を用いた神経細胞分化誘導モデルにおいて、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 $\alpha$ の下流で発現するFactor Xが発達神経毒性を評価できるバイオマーカーとなる可能性を見出した。

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、妊娠期～

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。

また本研究成果は、Syn-Rep マウスの DNT 研究・評価における活用、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、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貢献すると考えている。またヒト iPS 細胞を用いた *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* 評価法の構築への貢献も期待される。

### 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 年にガイドラ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 陽性对照物質のリストから選定し、これらを用いて検証することと共に、このマウスを用いて妊娠期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 陽性对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

### 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 (図 25)。

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. 薬物の投与

バルプロ酸 (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、またはあすか製薬メディカルに依頼した。

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。

#### **6. *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。

#### **7. 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、脳組織を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℃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  $\mu\text{m}$  に薄切した。HE染色、Nissl染色は、ティッシュ・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。

#### **8. *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。

## 9. 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。

## 10. 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。

## **11. 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。

## **12. 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。

## **13. 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**

### **1. Syn-Rep マウスの DNT 評価系としての有用性の検討**

#### **1-1. 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 (図 1)。

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。

#### **1-2. 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 (図 2A)。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 (図 2A)。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 (図 2B、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 (図 3)。

#### **1-3. 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 (図 4)。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 ( $R^2 = 0.6617$ ,  $P = 0.0002$ ) (図 5) 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。

#### 1-4. 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

DNT 陽性対照物質である VPA を用いて、Syn-Rep マウスのレポーター分子の応答性を検証した。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ところ、体重増加に関して、一部の日齢で有意差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(図 6)。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(図 7)。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(図 8 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(図 8 D)。

#### 1-5. 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(図 9~12)。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(図 9)。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(図 11)。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(図 11A)。また、VPA 曝露群では毛づくろい行動(図 11B)および攻撃行動(図 11C)は有意ではないものの、増加傾向が認められた。

#### 1-6. 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

次に胎生期に曝露すると、母体免疫活性化(MIA)によって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(図 13~16)。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(図 14)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(図 16)。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(図 13、図 15)。

#### 1-7. 妊娠期~離乳期の PbAc 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

さらに DNT 陽性対照物質である PbAc を用いて、Syn-Rep マウスのレポーター分子の応答性を検証した。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 17、18)。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 19A、19B)。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 19C、19D)。

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 20A)。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 20B)。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。

#### 1-8. 妊娠期～離乳期の PbAc 曝露時における児動物脳の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腦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 21)。

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 22A)。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 22)。

## 2. 母体甲状腺機能低下時における次世代影響の検証

### 2-1. PTU 投与による母体甲状腺関連指標への影響

本研究では、PTU を用いてマウス甲状腺機能低下モデル作成するが、マウスにおいて抗甲状腺薬の投与量と甲状腺機能低下との相関に関する情報が極めて乏しいことから、まずは投与量の最適化を行った。2～250 ppm の用量で PTU を混餌投与した母動物の 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。その結果、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 (図 23)。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 (図 24)。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。

### 2-2. 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 (表 1、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 (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 (図 25H)、250 ppm で総コレステロール (図 25O) および LDL コレステロール (図 25Q) の上昇が認められた。また、50 ppm で尿素窒素の低下 (図 25C)、10 ppm で総ビリルビンの上昇 (図 25S) が認められた。



### 2-3. 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(表4)。また、外表検査(表5)・内臓検査(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(表7、表8)。以上より、母体の甲状腺機能低下は胎児の臓器・骨格形成等には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

研究結果 第1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。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、典型的な甲状腺機能状態と考えられる 250 ppm の2用量で検討を行った。

まず母動物への影響を検証した。摂餌量を3日おきの計測したところ。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26A-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26C)。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26B、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26E-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28B)。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28C'、C")。

次に児動物への影響を検証した。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27A、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27C、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28E、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28F、F')。

#### 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

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27G、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27E、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29A-D)。同様に、抗IBA1抗体を用いたミクログリアの染

色 (図29E-H)、抗GFAP抗体を用いたアストロサイトの染色 (図29I-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29H)。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29L)。

### 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 (図 30, 31)。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 32)。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 33)。

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 34, 35)。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 36)。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 37)。

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 38)。

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 (図 39A)。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 39B)。

## 4. BHPF の次世代影響に関する検討

### 4-1. BHPF 投与による母体甲状腺関連指標への影響評価

ゼブラフィッシュなどで甲状腺機能をかき乱が報告されている代替ビスフェノール BHPF について、甲状腺機能への影響を含めた次世代影響の検討を行った。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 40)。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 41)。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。

### 4-2. 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 42S) 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 42T)。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。

### 4-3. 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 (表 9)。

### 4-4. 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 10)、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 10)。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 11)。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 12)。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。

## 5. 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

### 5-1. shRNA を用いたヒト iPS 細胞における THR $\alpha$ のノックダウン

ヒト未分化 iPS 細胞には THR $\alpha$  と THR $\beta$  の 2 種類のアイソフォームが発現している。qPCR により、THR $\alpha$  のほうが発現量が高いと考えられた(図 43)。またヒト iPS 細胞を神経系に分化誘導したところ、分化誘導にともない THR $\alpha$  のみ発現亢進が観察された(図 1)。そこで、化学物質の応答性に対する THR $\beta$  の影響を検討するために、ノックダウン細胞を作製した。レンチウイルスを用いてヒト iPS 細胞に THR $\alpha$  shRNA を導入した後、感染細胞をピューロマイシンで選択し、さらに 3 日後に RNA を回収して qPCR を行った。その結果、scramble control を導入した細胞に比べて約 93% の THR $\alpha$  ノックダウンが認められた(図 44)。

### 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(図 50, 53)。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 (図 45)、軸索伸展に関わる Factor C (図 46)、D (図 47)、神経分化や薬剤抵抗性に関わる Factor X 遺伝子を同定した(図 48)。

### 4-3. THR $\alpha$ ノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するクロルピリホス(CPF)曝露の影響

THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対する DNT 陽性対照物質 CPF の影響を検討した。CPF (10  $\mu$ M) を曝露し、ATP 産生能に対する影響を調べたところ、scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞に CPF を曝露しても ATP 産生に影響はほとんど認められなかった(図 49)。また THR $\alpha$  ノックダウンしたヒト iPS 細胞に CPF 曝露しても、scramble control を導入した細胞と比べて ATP 産生に変化はなかった(図 49)。

次に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(図 50)。一方、THR $\alpha$  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(図 50)。そこで、THR $\alpha$  の下流因子について検討した。既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(図 51)。一方、THR $\alpha$  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(図 51)。

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。

### 4-4. THR $\alpha$ ノックダウンしたヒト iPS 細胞に対する VPA 曝露の影響

THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対する DNT 陽性対照物質 VPA の影響を検討した。VPA (100  $\mu$ M) を曝露し、ATP 産生

能に対する影響を調べたところ、ATP 産生に影響は認められなかった (図 10)。また  $\text{THR}\alpha$  ノックダウンした iPS 細胞に VPA 曝露しても、scramble control を導入した細胞と比べて、特に ATP 産生に変化は観察されなかった (図 52)。

次に、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 (図 53)。一方、 $\text{THR}\alpha$  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 (図 11)。また  $\text{THR}\alpha$  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 (図 54)。非常に興味深いことに、 $\text{THR}\alpha$  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 (図 54)。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

### 1. Syn-Rep マウスの DNT 評価における 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 (図 2, 3)。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 (図 2)。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、経時的变化を良好に検出することができた (P38:図 4)。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 (図 7)。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 (図 8)。

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 (図 9, 11)。これに加え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。

## **2. 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）で予備検討を行った。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（データは示さず）。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 であることが明かとなった（図 23）。

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。

### 3. 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 の摂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 (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 (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。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。

### 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

10 ppm、250 ppm の PTU 摂餌投与系において、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 摂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、本摂餌系においては、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。

Syn-Rep マウスの有用性の検証において、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。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。

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。

## 5. 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  $\alpha$ 、 $\beta$ 、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、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。

## 6 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 $\alpha$  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。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。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。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. Syn-Repマウスは、発達期脳の神経細胞の構築状態やDNT陽性対象化学物質の影響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が示された。
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も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、妊娠期に母体の甲状腺機能が抑制されても、胚の着床や児の骨格・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. 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極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. 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。
6. ヒトiPS細胞を用いた神経細胞分化誘導モデルにおいて、THR $\alpha$ が神経細胞分化に重要であるとともに、THR $\alpha$ の下流で発現するFactor X が発達神経毒性を評価できるバイオマーカーとなる可能性を見出した。

## 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 中西 剛: 内分泌かく乱に起因する生殖発生毒性評価の問題点とその将来展望(総説), *ファルマシア* 58:44 (2022)
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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

## 2. 学会発表

- 1) 今戸 瑛二 他: 胎生期バルプロ酸投与マウスは熱刺激およびカプサイシン誘発痛の増大と機械的アロディニアを示す、第 139 回日本薬理学会近畿部会、Web 開催、2021 年 6 月
- 2) 石田 慶士 他: 新規発達神経毒性評価系開発に向けた神経分化トレーサーマウスの解析、第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸/Web、2021 年 7 月
- 3) 諫田 泰成: インビトロ発達神経毒性評価法の現状と今後の課題、第 61 回日本先天異常学会学術集会シンポジウム、Web 開催、2021 年 8 月
- 4) 南川 祥輝 他: 神経分化トレーサーマウスを用いた新規発達神経毒性評価系の有用性検証、フォーラム 2021: 衛生薬学・環境トキシコロジー、船橋/Web、2021 年 9 月
- 5) 諫田 泰成 他: ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性評価法の現状と今後の展望、日本薬学会第 142 年会シンポジウム、Web 開催、2022 年 3 月
- 6) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
  - 18) 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
  - 19) 諫田 泰成 他 : 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
  - 20) Kanda Y: Current status and future challenge of developmental neurotoxicity, 3rd Asian Congress for Alternative to Animal Experiment, 済州, 2022 年 12 月
  - 21) 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
  - 22) 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
  - 23) 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
  - 24) 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
  - 25) 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
  - 26) 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
  - 27) 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
  - 28) 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
  - 29) 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
  - 30) 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
  - 31) 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関連評価、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
  - 32) 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
  - 33) 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
  - 34) 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

- 35) 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
- 36) 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
- 37) 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
- 38) **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
- 39) 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
- 40) 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
- 41) 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
- 42) 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
- 43) 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
- 44) 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
- 45) 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
- 46) **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
- 47) **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
- 48) 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
- 49) 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

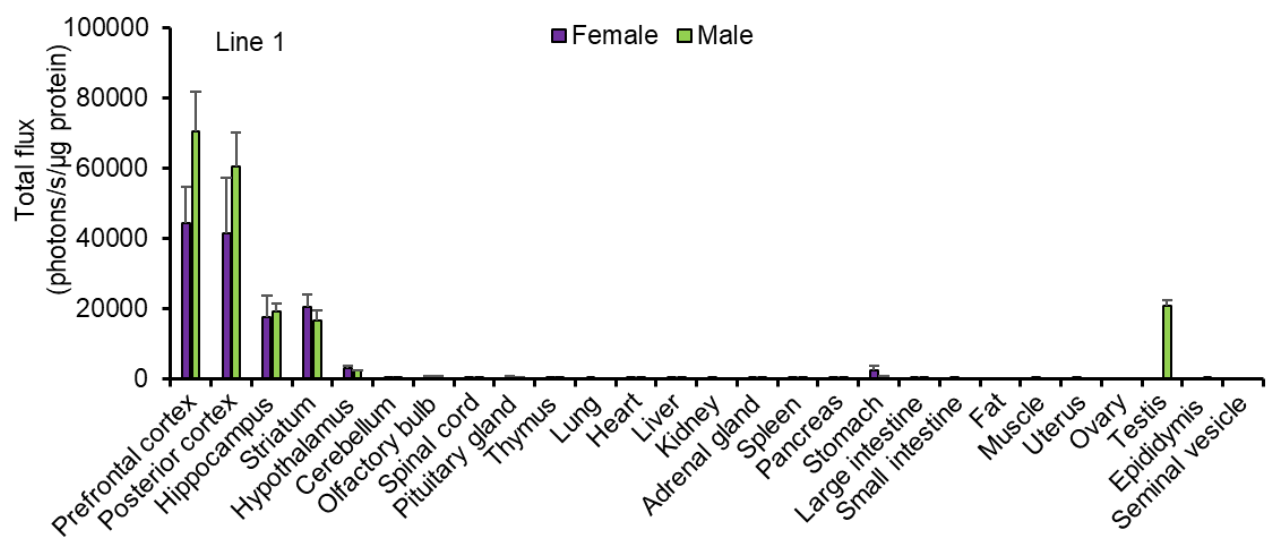
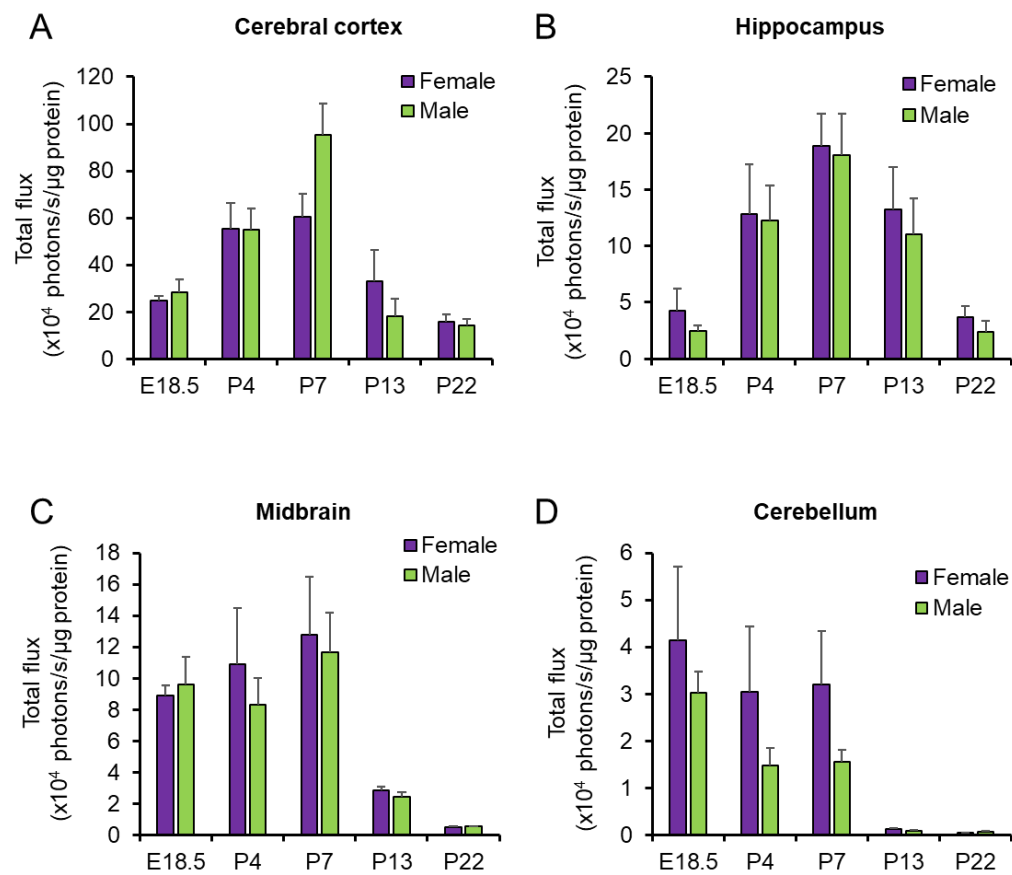


図1 成熟期 Syn-Rep マウス雌の各臓器における Luc2 活性

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=3)



**図2 Syn-Rep マウスの出生直前から離乳期の脳における Luc2 活性**

Syn-Rep マウスの E18.5、P4、P7、P13、P22 における大脳皮質 (A)、海馬 (B)、中脳 (C)、小脳 (D) の Luc2 活性を測定した。Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=4-5)

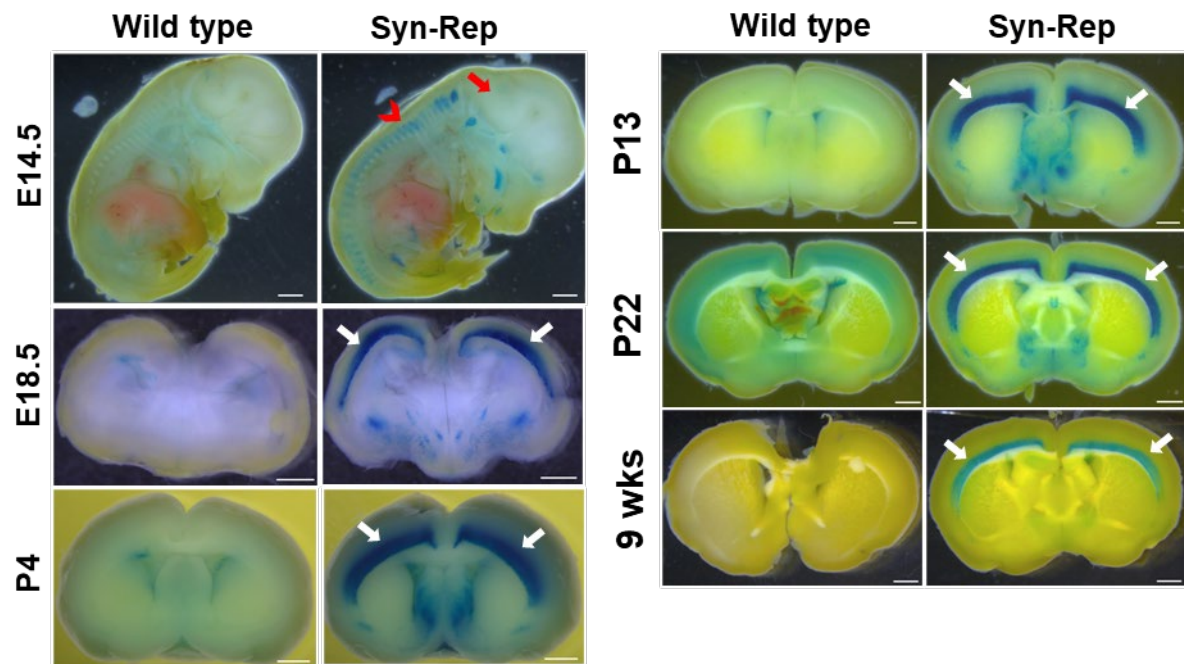
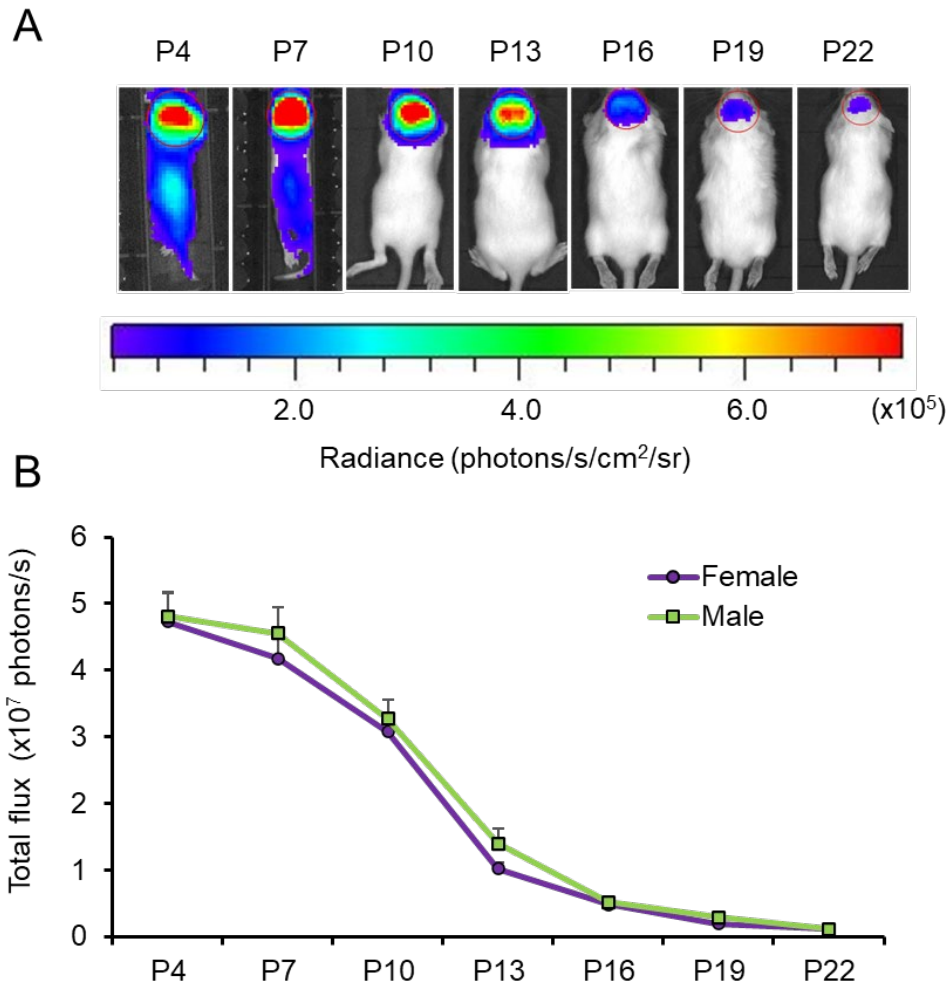


図3 X-gal 染色を用いた Syn-Rep マウスの脳における LacZ 発現の経時変化に関する組織学的解析

Syn-Rep マウス E14.5 の全身および E18.5、P4、P13、P22、9 週齢の脳における  $\beta$ -galactosidase 発現量を X-gal 染色により評価した。赤矢印と白矢印は脳における発現部位を示している。赤矢尻は脊髄における発現部位を示している。



**図 4 Syn-Rep マウスの発達期の頭部に対する *in vivo* イメージング解析**

4 腹の母体から産まれた Syn-Rep マウスに対し、P4 において児の数が 8 匹（雌 4 匹／雄 4 匹）となるように間引きを行い、P4 から P22 における発達期の頭部に対する *in vivo* イメージングを行った。D-luciferin/PBS 溶液を i.p 投与直後から 1 分毎の連続測定を行い、発光量が頭打ちになるまでおよそ 25 分間測定を継続した。（A）代表的な個体の写真を示している。（B）得られたデータについて Living Image を用いて解析し、頭部の発光強度を Total flux として定量化した。また、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、発達期の各日齢における発光量の変化を表した。Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=8 - 15)



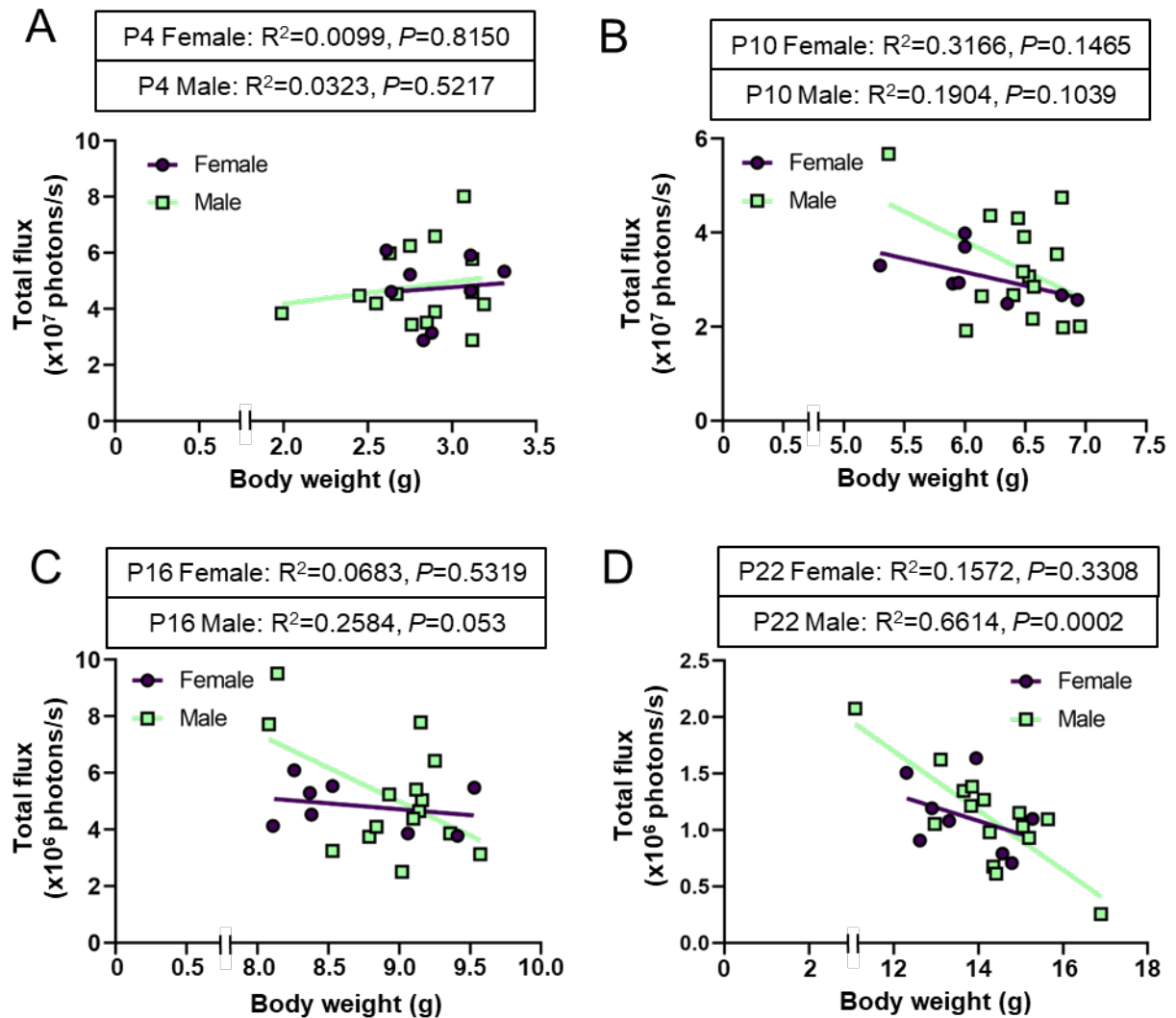
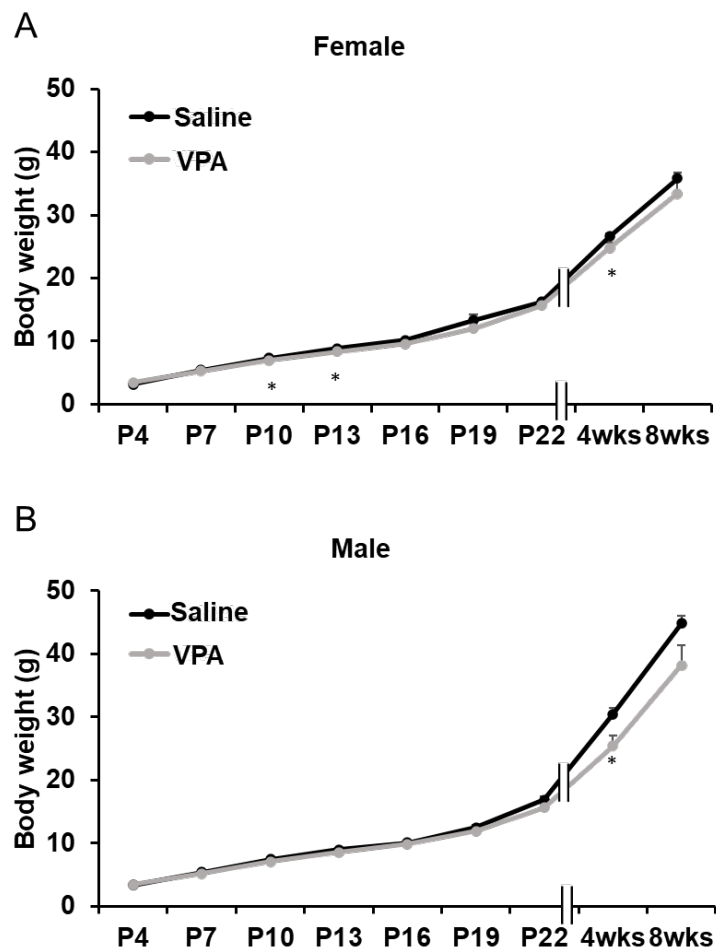


図 5 各日齢における頭部の発光と体重の相関性

Syn-Rep マウスに対し、P4 (A)、P10 (B)、P16 (C)、P22 (D) における頭部の発光強度 (Total flux) と体重の相関性に関して、決定係数 ( $R^2$ ) と p 値を GraphPad Prism 9 を用いた線形回帰分析にて算出した。



**図 6 E12.5 に VPA を曝露した Syn-Rep マウス児の体重変化**

P4、P7、P10、P13、P16、P19、P22 および 4、8 週齢における児マウス（A：雌、B：雄）の体重を測定した。\* $P < 0.05$  (unpaired t test)。

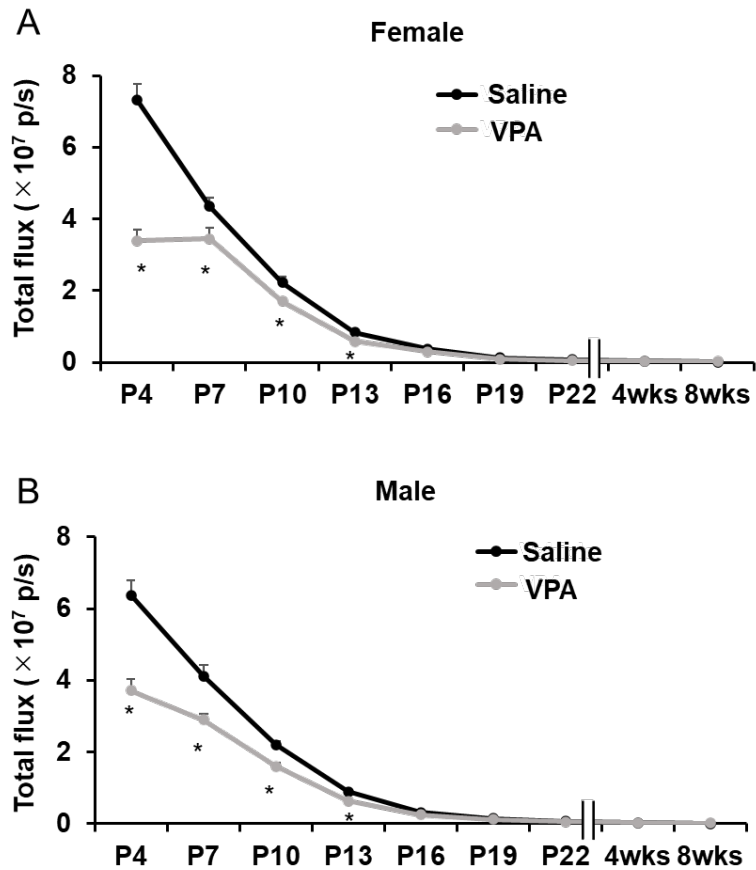
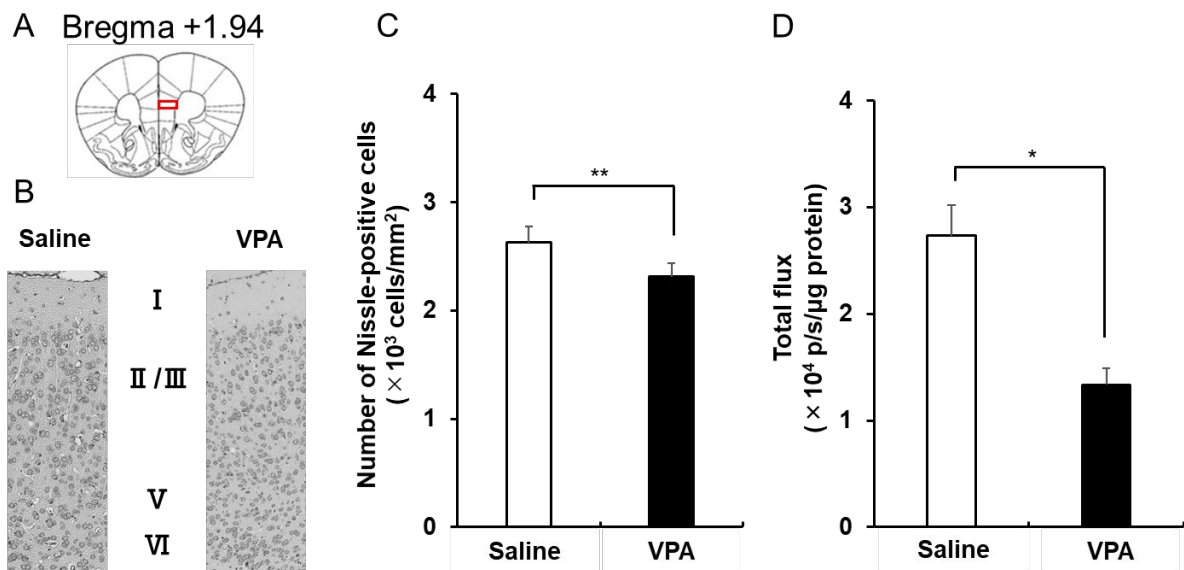


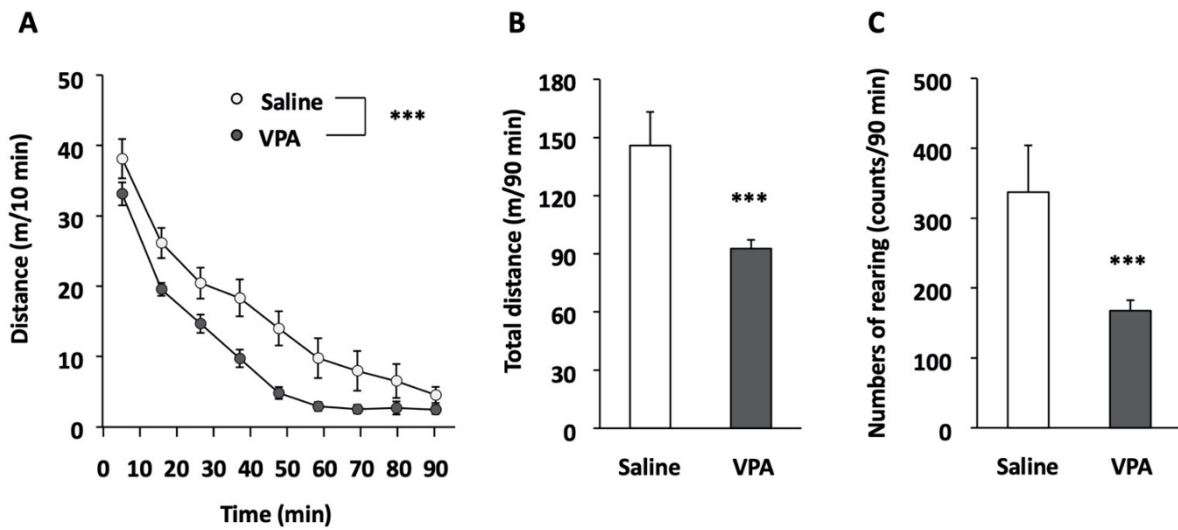
図7 E12.5にVPAを曝露したSyn-Rep児動物頭部の*in vivo*イメージング経時変化

P4、P7、P10、P13、P16、P19、P22 および4、8週齢の児マウス（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。\* $P < 0.05$  (unpaired t test)。



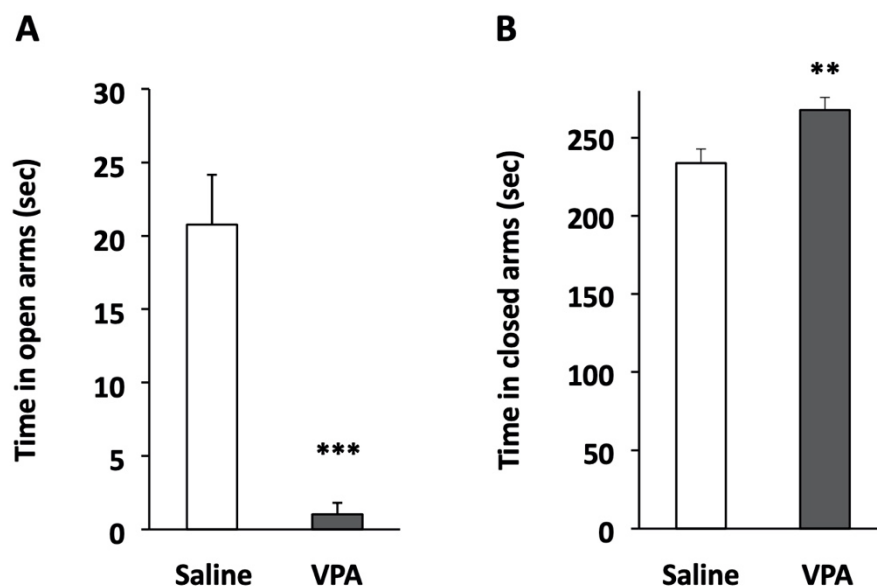
**図8 E12.5 に VPA を曝露した児動物の大脳皮質における Nissl 陽性細胞数とルシフェラーゼ活性評価**

(A-C) 8 週齢の雌の児動物において、4%パラホルムアルデヒドの全身灌流により組織を固定後、全脳を摘出してパラフィン切片を作製した。切片を 0.1%クレシルバイオレット溶液で染色し、洗浄および脱水した後封入した。前頭前皮質を含む超薄切片中の Nissl 陽性細胞像を蛍光顕微鏡システムを用いて取得し、マニュアル計測にて 1 mm<sup>2</sup> 当たりの Nissl 陽性細胞数を算出した。A：冠状切片の模式図。B：雌性の児動物の切片より得られた典型的な Nissl 染色像。I～VI の数字は大脳皮質の層を示す。C：単位面積当たりの Nissl 陽性細胞数。(D) 8 週齢の雌の Syn-Rep 児動物において脳を摘出し、前頭前皮質におけるルシフェラーゼ活性を IVIS Lumina II 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  $\mu$ g 量当たりのルシフェラーゼ活性を算出した。\* $P < 0.05$  (unpaired t test)。



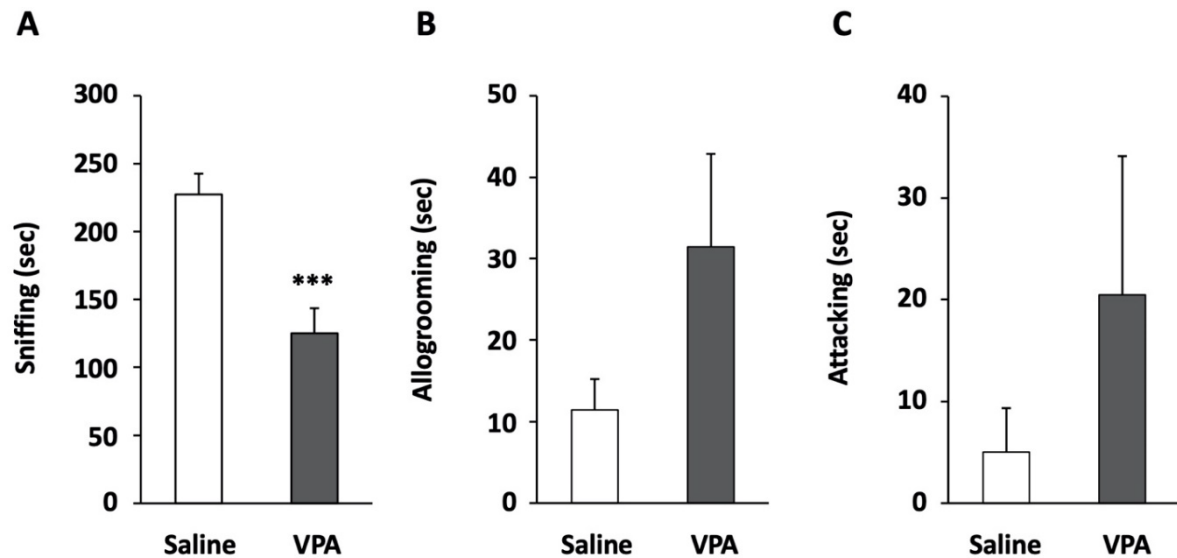
**図 9 E12.5 に VPA を曝露した児動物の自発行動変化**

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。8 週齢の雄性の児動物をオープンフィールド装置に入れ、この新奇環境における移動距離 (A, B)、および立ち上がり回数 (C) を Acti-Track System を用いて 90 分間測定した。生理食塩投与 (対照) 群と比較して、\*\*\* $P < 0.001$  (A: repeated measures ANOVA; B, C: unpaired t test)。



**図 10 E12.5 に VPA を曝露した児動物の不安様行動の変化**

不安様行動変化は高架式十字迷路試験により評価した。8 週齢の雄性の児動物を高架式十字迷路装置の中央に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 (A) およびクローズドアームにおける滞在時間 (B) 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。生理食塩投与 (対照) 群と比較して、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$  (A, B: unpaired t test)。



**図 11 E12.5 に VPA を曝露した児動物の社会性行動の変化**

社会性行動変化は社会性相互作用試験により評価した。8 週齢の雄性の児動物（被験マウス）を新たな透明ポリカーボネート製ケージ内で 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（A）、毛づくろい行動（B）および攻撃行動（C）を社会性行動の指標として、各行動の総時間を計測した。生理食塩投与（対照）群と比較して、\*\*\* $P < 0.001$  (A: unpaired t test)。

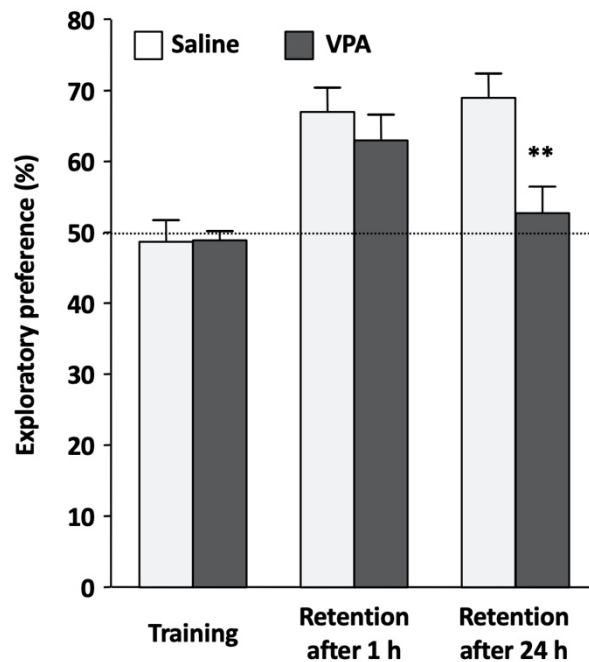
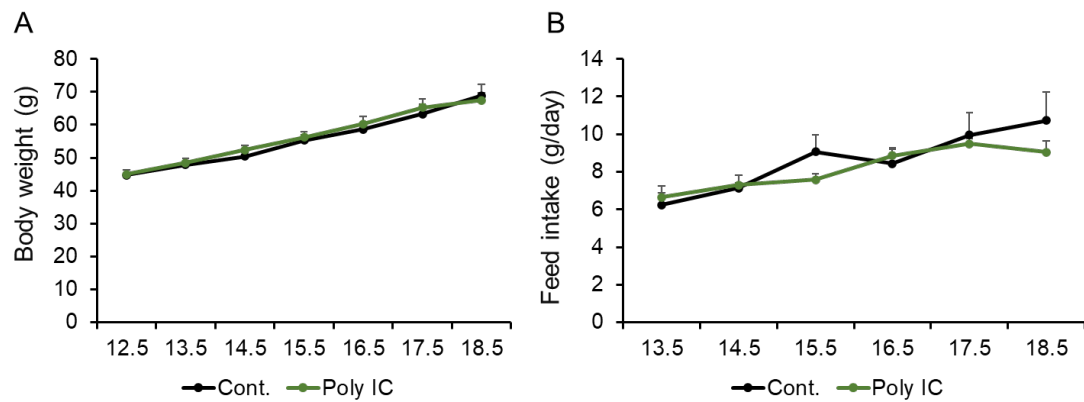


図 12 E12.5 に VPA を曝露した児動物の学習記憶能の変化

8 週齢の雄性の児動物を、まず、物体を設置せず床敷きのみを敷いたプレキシグガラス製ボックスに 3 日間（10 分間/日）馴化させた後、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。生理食塩投与（対照）群と比較して、\*\* $P < 0.01$  (unpaired t test)。





**図 13** 妊娠 12.5 日目に Poly(I:C)を投与した妊娠マウスの体重および摂餌量の変化  
妊娠 12.5-18.5 日目において妊娠母体の体重 (A) と摂餌量 (B) を測定した。

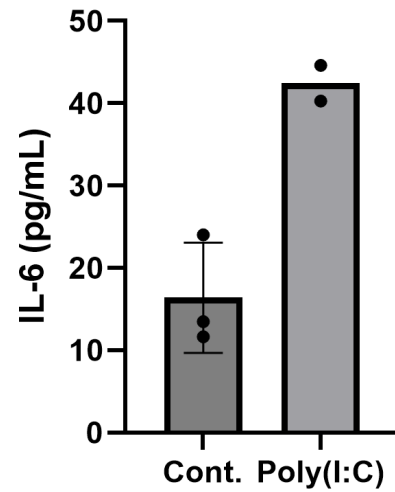
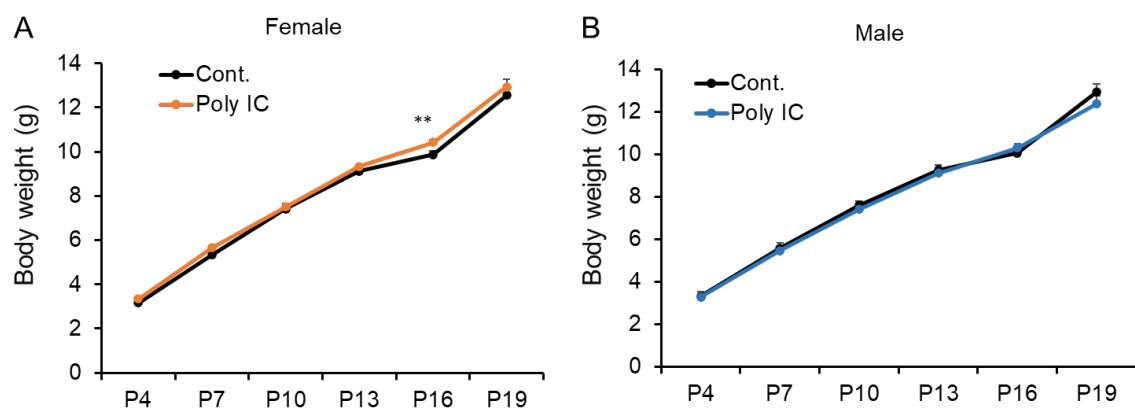


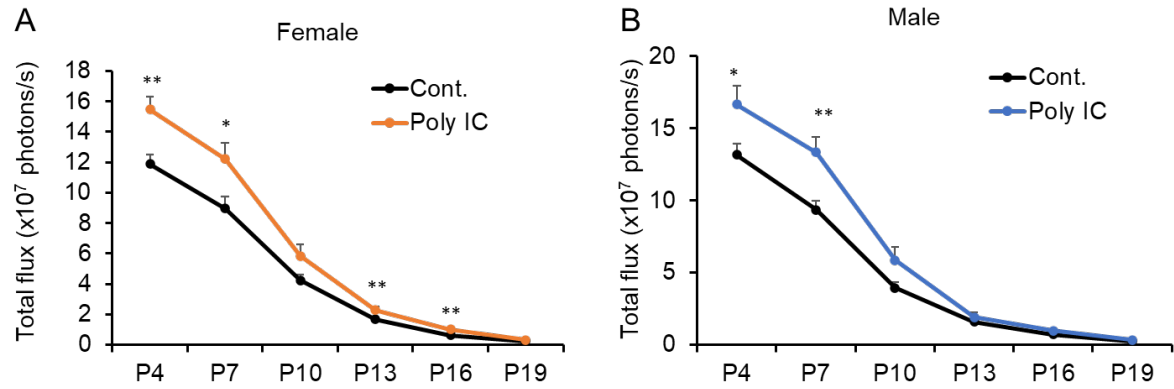
図 14 妊娠 12.5 日目に Poly(I:C)を投与した妊娠マウスの血清中インターロイキン (IL-) 6 レベルの評価

Poly(I:C)投与 3 時間後に母体から血清を回収し、IL-6 レベルについて IL-6 ELISA Kit, Mouse を用いて測定した。



**図 15 E12.5 に Poly(I:C)を投与した Syn-Rep マウス児の体重変化**

出生後、P4、P7、P10、P13、P16、P19 における児動物（A：雌、B：雄）の体重を測定した。 \*\* $P < 0.01$  (unpaired t test)。



**図 16 E12.5 に Poly(I:C) を投与した Syn-Rep マウス頭部の発光経時変化**

出生後、P4、P7、P10、P13、P16、P19 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。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (unpaired t test)。

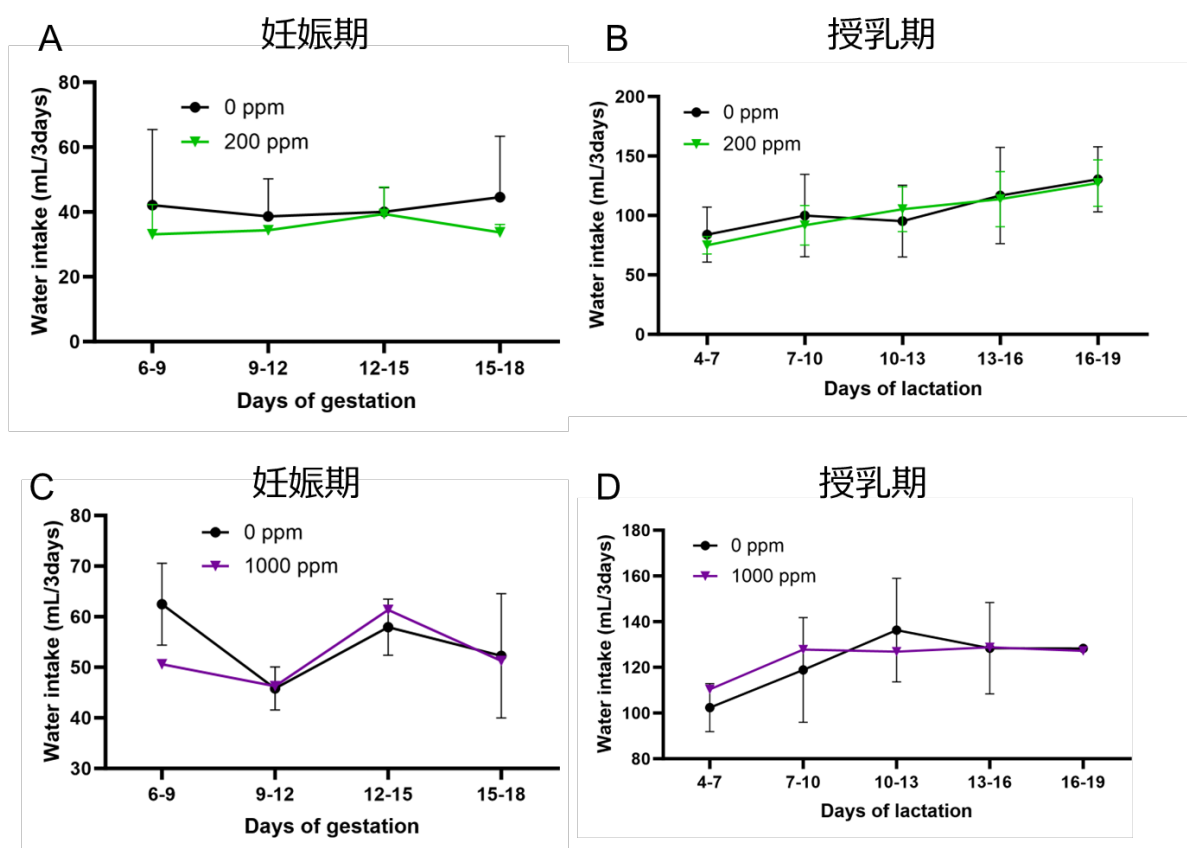


図 17 妊娠 6 日目から出生後 21 日目まで PbAc を投与したマウス母体の飲水量の変化

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).

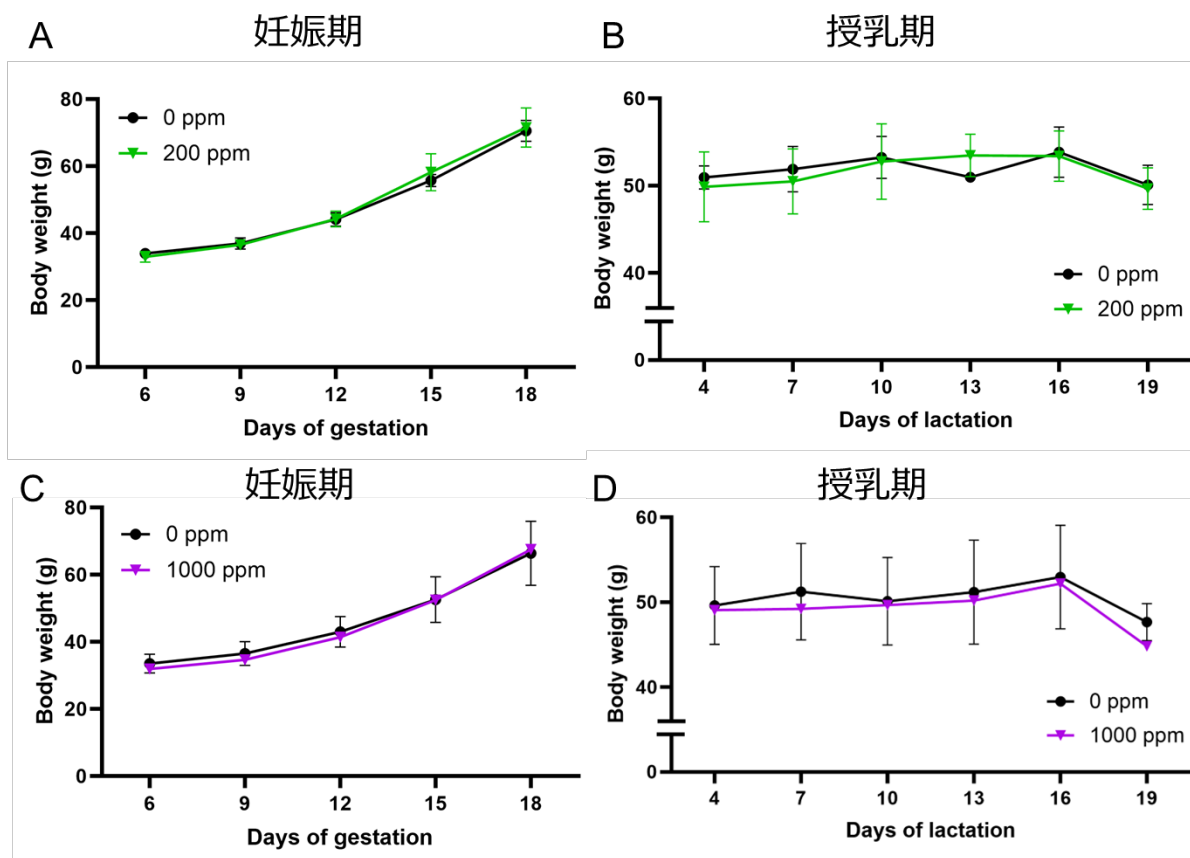


図 18 妊娠 6 日目から出生後 21 日目まで PbAc を投与したマウス母体の体重の変化

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).

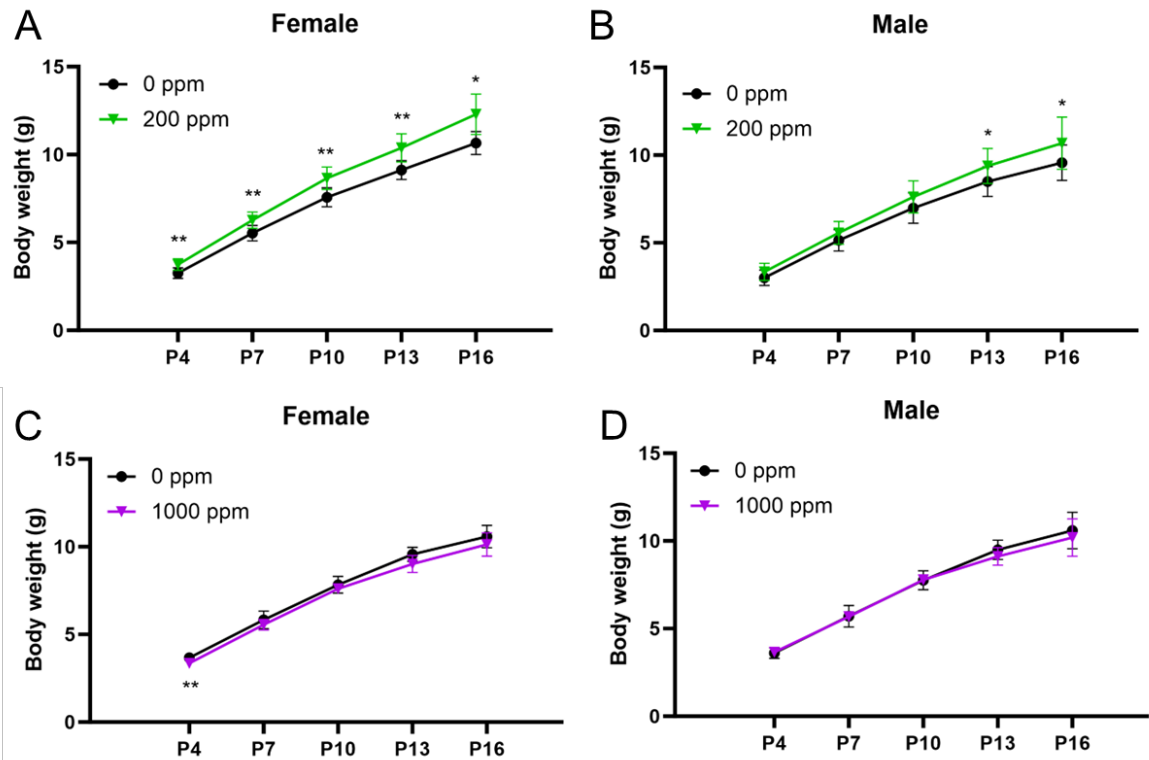
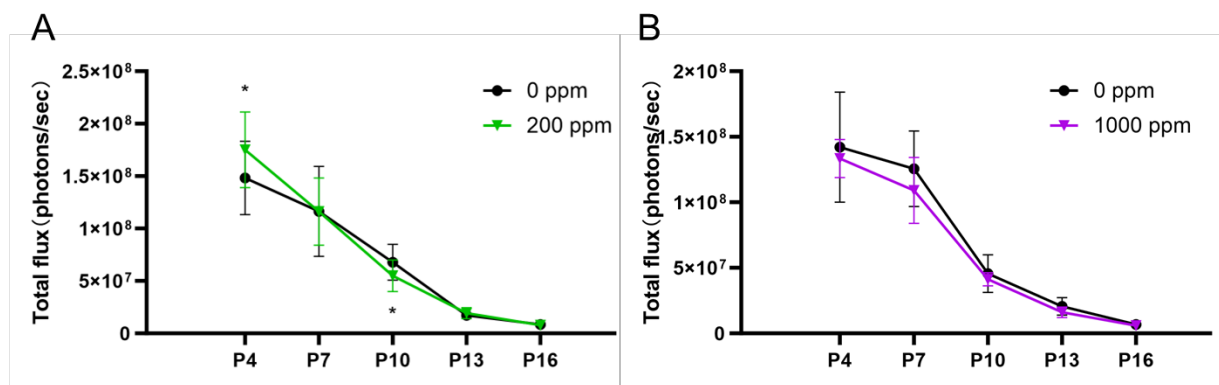


図 19 胎齢 6 日目から出生後 21 日目まで PbAc を投与した Syn-Rep マウス児の体重の変化

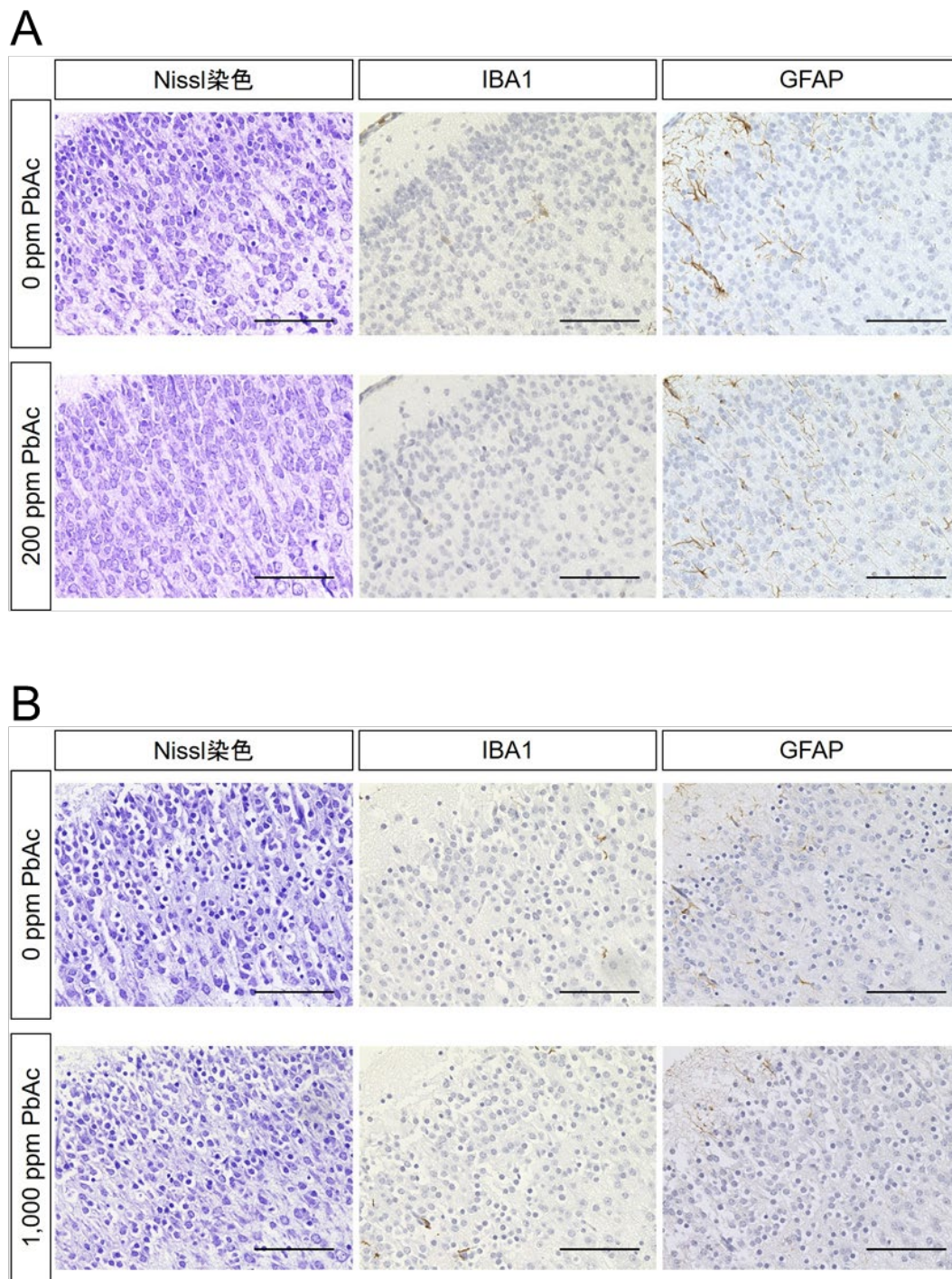
出生後、4、7、10、13、16 日目における児動物（A、C：雌、B、D：雄）の体重を 3 日おきに測定した。Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n=5-15). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, vs. control (unpaired t-test).



**図 20 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 ± S.D. (n=5-15). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,

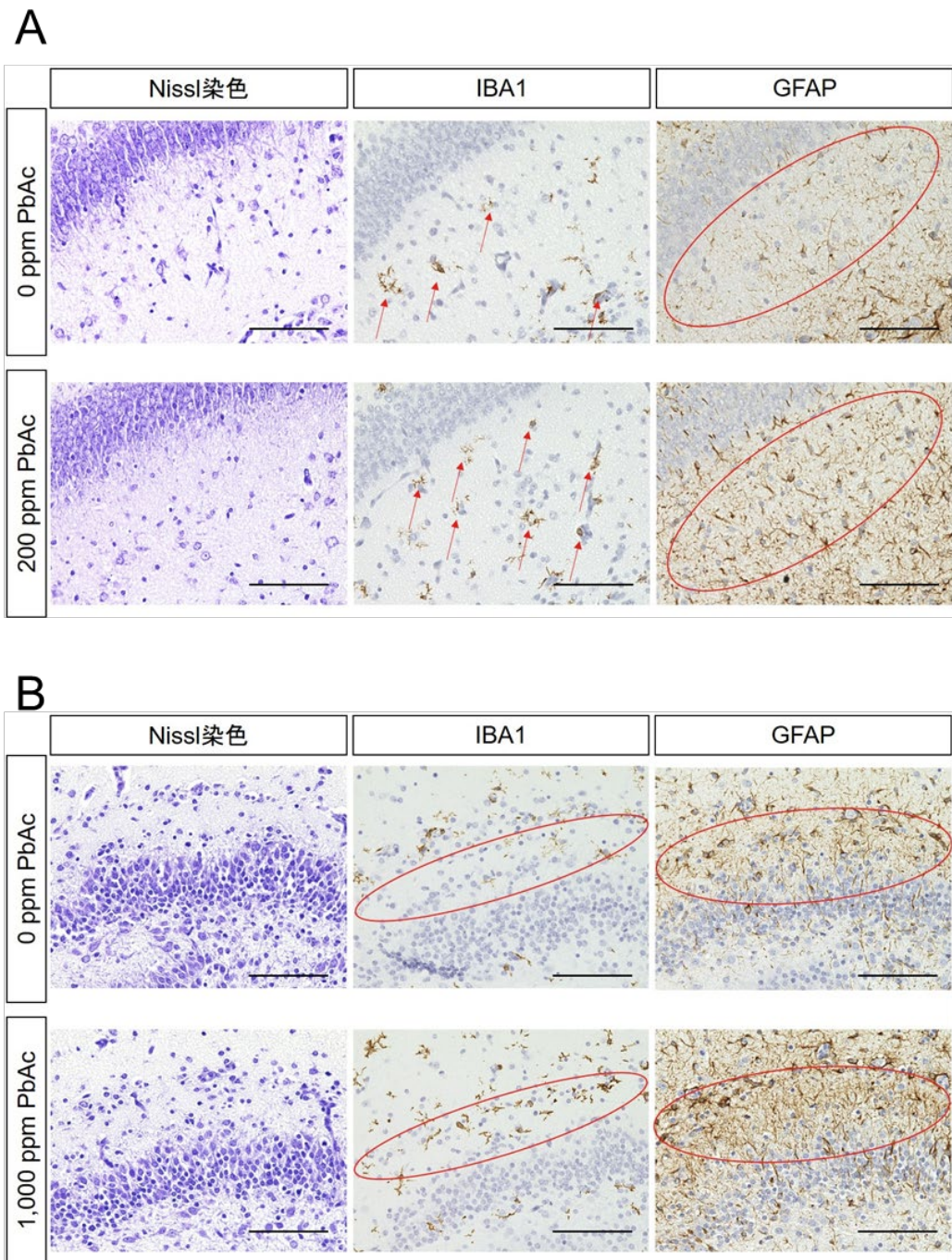




**図 21 胎齢 6 日目から出生後 4 日目まで PbAc を投与した Syn-Rep マウス児の 4 日齢における大脳皮質組織学的解析**

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  $\mu$ m。





**図 22 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  $\mu$ m。

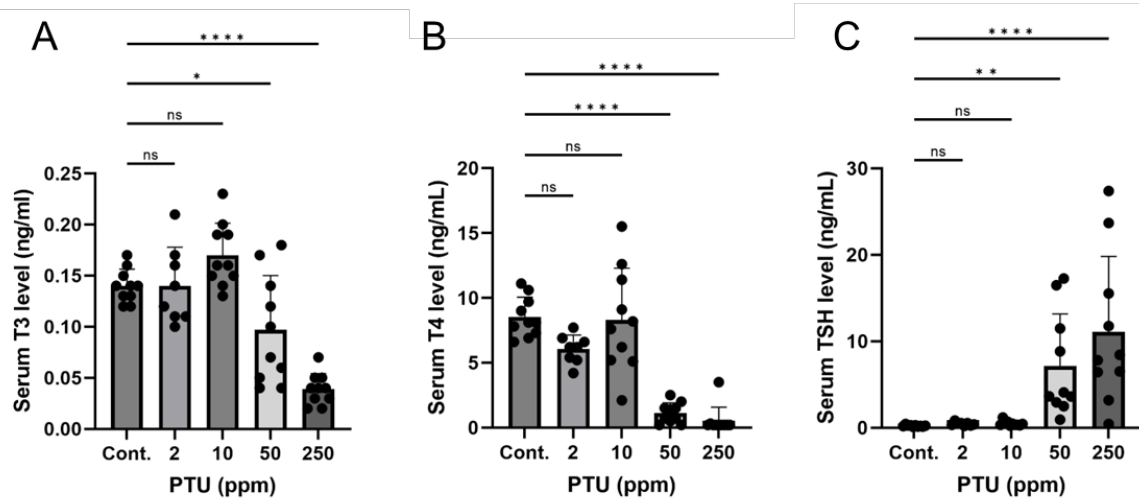
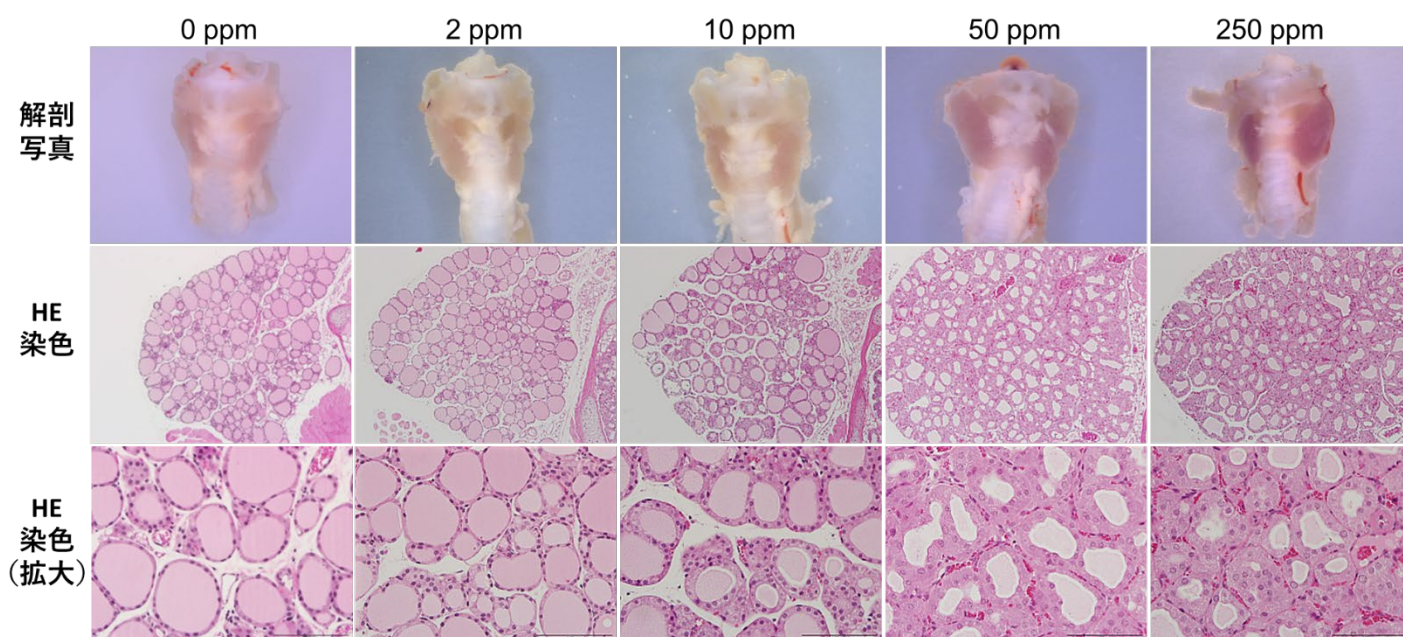


図 23 妊娠期に PTU を投与したマウスの GD18 における血清中甲状腺関連ホルモンレベル

GD18 に母体より血清を回収し、血清中 T3 (A)、T4 (B)、TSH (C) レベルを測定した。Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=8-10). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001, \*\*\*\* $P$  < 0.0001 vs. control (Dunnett's test). ns: not significant



**図 24 妊娠期に PTU を投与したマウスの GD18 における甲状腺病理組織像**

GD18 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。



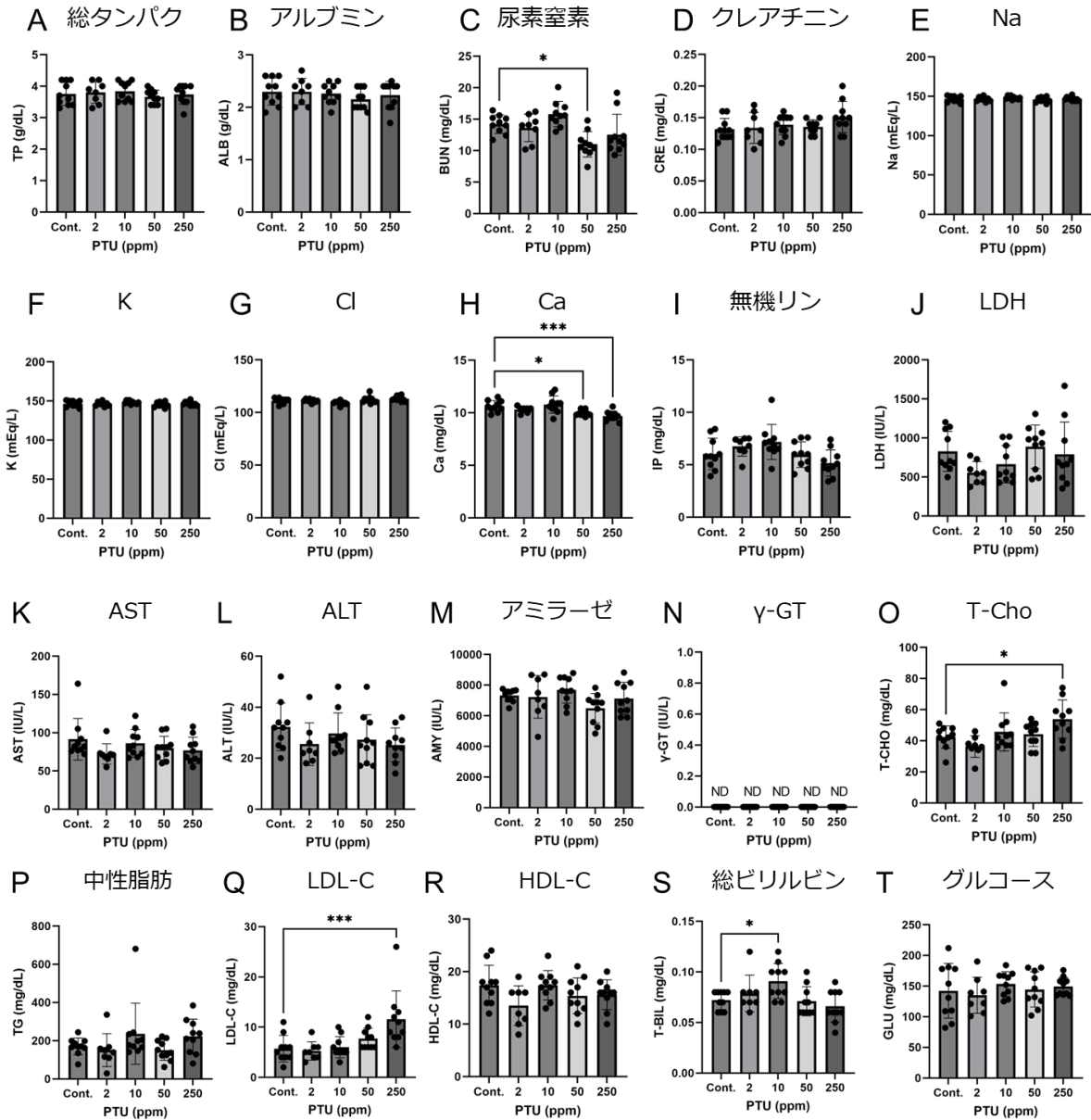


図 25 妊娠期に PTU を投与したマウスの GD18 における血清中生化学パラメーターレベル

GD18 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)、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ ( $\gamma$ -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=8-10). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001, \*\*\*\* $P$  < 0.0001 vs. control (Dunnett's test).

表 1 妊娠期に PTU を投与したマウスの妊娠 0 日目から 18 日目までの体重変化

Sex: Female														Unit (g)
		Dose (ppm)												
		PTU			PTU			PTU			PTU			
		0			2			10			50			PTU
														250
個体数		10			8			10			10			10
Days		0	32.190	± 1.869	31.079	± 0.908	30.306	± 1.409	31.368	± 1.366	31.137	± 1.813		
	6	35.870	± 1.846	35.064	± 1.527	34.114	± 1.820	35.884	± 1.954	34.615	± 1.752			
	9	37.605	± 1.691	36.931	± 1.242	35.998	± 1.722	37.784	± 1.752	36.689	± 2.234			
	12	44.389	± 2.100	43.593	± 2.331	42.975	± 2.081	44.611	± 1.824	42.934	± 2.526			
	15	54.054	± 2.783	52.508	± 2.850	52.539	± 2.823	54.383	± 2.258	51.767	± 3.064			
	18	65.767	± 3.795	63.635	± 3.611	64.375	± 3.870	65.517	± 3.766	62.635	± 3.486			
	0 to 18	33.577	± 2.613	32.555	± 3.206	34.069	± 3.518	34.149	± 2.674	31.498	± 2.628			
Mean ± SD														

**表 2 妊娠期に PTU を投与したマウスの妊娠 6 日目から 18 日目までの摂餌量変化**

Sex: Female		Unit (g)											
		Dose (ppm)											
		PTU 0			PTU 2			PTU 10			PTU 50		
個体数		10			8			10			10		
Days	6 to 9	21.79	±	6.56	18.97	±	6.18	25.74	±	8.10	20.13	±	4.22
	9 to 12	25.27	±	9.63	18.43	±	3.14	29.64	±	11.44	19.47	±	5.18
	12 to 15	21.16	±	2.93	18.76	±	2.35	22.82	±	2.65	20.73	±	1.90
	15 to 18	23.43	±	1.80	23.52	±	3.15	23.25	±	2.25	21.86	±	2.76
	6 to 18	91.65	±	13.97	79.68	±	12.42	101.45	±	18.25	82.19	±	8.70
		18.23	±	3.75	17.40	±	3.16	18.54	±	1.97	20.86	±	2.24
		75.03	±	8.27*									

Mean ± SD

\*p<0.05 vs. 0 ppm by Dunnett's test.

**表 3 妊娠期に PTU を投与したマウスの妊娠 18 日目における子宮重量**

Sex: Female		Stage: 18day											
		Dose (ppm)											
		PTU 0			PTU 2			PTU 10			PTU 50		
個体数		10			8			10			10		
Uterus (g)		26.002	±	2.894	24.252	±	1.430	25.461	±	2.335	26.823	±	2.373
		25.345	±	2.6661									

Mean ± SD

**表 4 妊娠期（胎生期）に PTU を投与したマウスの妊娠（胎齢）18 日目における母動物および胎仔の各種パラメーター**

Sex: Female	Stage: 18day														
	Dose (ppm)														
	PTU			PTU			PTU			PTU					
	0			2			10			50			250		
妊娠解剖個体数	10			8			10			10			10		
黄体数	±			±			±			±					
着床数	15.1	±	1.9	13.5	±	1.4	14.5	±	1.4	14.8	±	1.0	13.9	±	1.9
着床率 (%)															
生存胎仔数	14.0	±	2.3	12.8	±	1.0	13.5	±	1.6	14.3	±	1.4	13.3	±	2.1
♀胎仔数	7.7	±	2.3	6.5	±	0.9	6	±	2.7	7.8	±	1.5	6.2	±	1.8
♂胎仔数	6.2	±	2.2	6.25	±	1.5	7.2	±	2.6	6.5	±	1.6	7.0	±	1.2
性比 (M/F)	0.90	±	0.45	1.00	±	0.36	2.20	±	3.47	0.92	±	0.57	1.23	±	0.41
死亡胚総数	1.10	±	0.99	0.75	±	1.04	1.00	±	0.82	0.50	±	0.71	0.70	±	1.06
早期吸収胚数	0.80	±	0.92	0.50	±	0.76	0.60	±	0.84	0.40	±	0.70	0.50	±	1.08
後期吸収胚数	0.20	±	0.42	0.13	±	0.35	0.10	±	0.32	0.10	±	0.32	0.20	±	0.42
死亡胎仔数	0.10	±	0.32	0.13	±	0.35	0.30	±	0.67	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00
死亡胚割合 (%)	7.57	±	7.50	5.18	±	6.65	6.93	±	5.76	3.48	±	4.98	4.90	±	7.44
♀胎仔体重	1.490	±	0.108	1.491	±	0.097	1.489	±	0.072	1.519	±	0.097	1.524	±	0.107
♂胎仔体重	1.523	±	0.136	1.550	±	0.092	1.526	±	0.098	1.534	±	0.125	1.580	±	0.119
♀胎盤重量	0.097	±	0.012	0.106	±	0.014	0.098	±	0.013	0.094	±	0.008	0.095	±	0.009
♂胎盤重量	0.103	±	0.015	0.112	±	0.013	0.104	±	0.008	0.100	±	0.011	0.105	±	0.012
♀AGD (mm)	0.970	±	0.060	0.990	±	0.050	0.966	±	0.082	0.979	±	0.044	0.987	±	0.050
♂AGD (mm)	1.625	±	0.059	1.684	±	0.076	1.705	±	0.105	1.733	±	0.094*	1.785	±	0.066**
♀AGD/体重 <sup>1/3</sup> (mm/g <sup>1/3</sup> )	0.851	±	0.062	0.868	±	0.047	0.847	±	0.065	0.853	±	0.045	0.859	±	0.037
♂AGD/体重 <sup>1/3</sup> (mm/g <sup>1/3</sup> )	1.416	±	0.074	1.458	±	0.055	1.482	±	0.074	1.506	±	0.089	1.535	±	0.025##

Mean ± SD

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. 0 ppm by Dunnett's test.

##  $P < 0.01$  vs. Steel test



表 5 胎生期に PTU を投与したマウスの胎齡 18 日目における外表検査の結果

胎仔外表検査 所見別															
Sex: Female	Stage: 18day														
	Dose (ppm)														
	PTU 0			PTU 2			PTU 10			PTU 50			PTU 250		
母体数	10			8			10			10			10		
胎仔数	140			102			135			143			133		
NAD	98.57 (	± 138	3.01 )	98.15 (	± 100	3.44 )	95.87 (	± 130	7.12 )	98.56 (	± 141	3.04 )	100.00 (	± 133	0.00 )
口蓋裂	0.00 (	± 0	0.00 )	0.00 (	± 0	0.00 )	0.77 (	± 1	2.43 )	0.00 (	± 0	0.00 )	0.00 (	± 0	0.00 )
軸後性有茎性過剰指	0.71 (	± 1	2.26 )	0.96 (	± 1	2.72 )	3.36 (	± 4	6.11 )	1.44 (	± 2	3.04 )	0.00 (	± 0	0.00 )
軸前性多合趾	0.71 (	± 1	2.26 )	0.89 (	± 1	2.53 )	0.00 (	± 0	0.00 )	0.00 (	± 0	0.00 )	0.00 (	± 0	0.00 )

Mean ± SD

\*, \*\*: Significant difference from control, p<0.05, p<0.01.(Fisher test)

NAD (Nothing Abnormal Detected)

表 6 胎生期に PTU を投与したマウスの E18 における内臓検査の結果

胎仔内臓検査 所見別						
Sex: Female				Stage: 18day		
	Dosage (mg/kg)					
	PTU			PTU		
	0			250		
母体数	10			10		
胎仔数	66			60		
NAD	89.08	± 16.47		84.75	± 20.47	
	( 60 )			( 50 )		
臍動脈転換	10.92	± 16.47		15.25	± 20.47	
	( 6 )			( 10 )		
Mean ± SD						

表 7 胎生期に PTU を投与したマウスの E18 における骨格検査の結果

胎仔骨格検査 変異および異常割合						
Sex: Female			Stage: 18day			
	Dose (ppm)					
	PTU			PTU		
	0			250		
母体数	10			10		
胎仔数	74			72		
NAD	37.20	±	28.51	47.54	±	26.59
	(	28	)	(	34	)
変異	39.96	±	19.12	28.26	±	22.69
	(	30	)	(	21	)
異常	16.31	±	15.59	11.54	±	15.05
	(	11	)	(	8	)
骨化影響	30.02	±	29.58	36.51	±	30.57
	(	22	)	(	27	)
Mean ± SD						

表 8 胎生期に PTU を投与したマウスの E18 における骨格検査の内訳

	Dose (ppm)			
	PTU		PTU	
	0		250	
母体数	10		10	
胎仔数	74		72	
胸骨文節配列異常	4.50 ± 9.56	( 4 )	1.25 ± 3.95	( 1 )
剣状軟骨分岐	4.75 ± 8.54	( 4 )	1.43 ± 4.52	( 1 )
剣状軟骨孔	11.40 ± 16.07	( 9 )	8.76 ± 15.45	( 7 )
頸部短小過剰肋骨	0.00 ± 0.00	( 0 )	1.43 ± 4.52	( 1 )
胸腰部完全過剰肋骨	5.87 ± 14.28	( 5 )	4.52 ± 9.94	( 3 )
胸腰部短小過剰肋骨	19.38 ± 16.55	( 13 )	6.95 ± 10.08	( 5 )
胸腰部過剰肋軟骨不連続	12.31 ± 11.80	( 8 )	3.10 ± 6.55	( 2 )
腰椎欠損	0.00 ± 0.00	( 0 )	1.00 ± 3.16	( 1 )
後肢帯片側性尾方位置異常	0.00 ± 0.00	( 0 )	1.00 ± 3.16	( 1 )
第6胸骨分節分岐	6.68 ± 12.97	( 4 )	6.01 ± 11.11	( 4 )
胸骨分節癒合	0.00 ± 0.00	( 0 )	1.43 ± 4.52	( 1 )
胸骨文節間軟骨分離	2.40 ± 5.25	( 2 )	0.00 ± 0.00	( 0 )
肋軟骨胸骨接続	2.68 ± 5.66	( 2 )	8.68 ± 15.66	( 6 )
第1頸椎弓分岐	0.00 ± 0.00	( 0 )	1.43 ± 4.52	( 1 )
第2頸椎弓分岐	0.00 ± 0.00	( 0 )	1.43 ± 4.52	( 1 )
後肢趾節骨過剰	1.43 ± 4.52	( 1 )	0.00 ± 0.00	( 0 )
上後頭骨不完全骨化	5.71 ± 18.07	( 4 )	9.14 ± 18.36	( 7 )
胸骨文節非対称骨化	7.86 ± 17.32	( 5 )	6.43 ± 15.95	( 6 )
胸骨文節二分骨化	5.35 ± 7.09	( 4 )	0.00 ± 0.00	( 0 )
胸骨文節不完全骨化	13.20 ± 19.89	( 10 )	17.76 ± 28.01	( 14 )
胸骨過剰骨化部位	1.25 ± 3.95	( 1 )	7.50 ± 16.87	( 5 )
第2頸椎弓分離骨化部位	0.00 ± 0.00	( 0 )	1.43 ± 4.52	( 1 )
頸椎体不完全骨化	0.00 ± 0.00	( 0 )	6.25 ± 15.87	( 6 )
頸椎体未骨化	1.00 ± 3.16	( 1 )	4.68 ± 7.76	( 4 )
胸椎弓骨化亢進	1.43 ± 4.52	( 1 )	0.00 ± 0.00	( 0 )

Mean ± SD

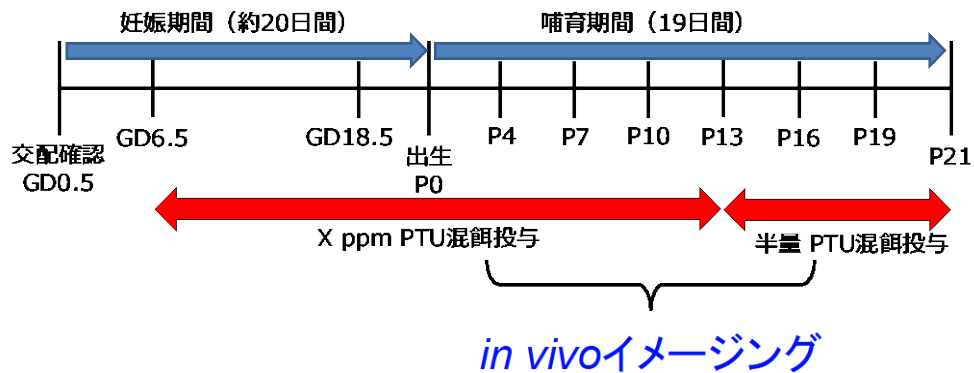
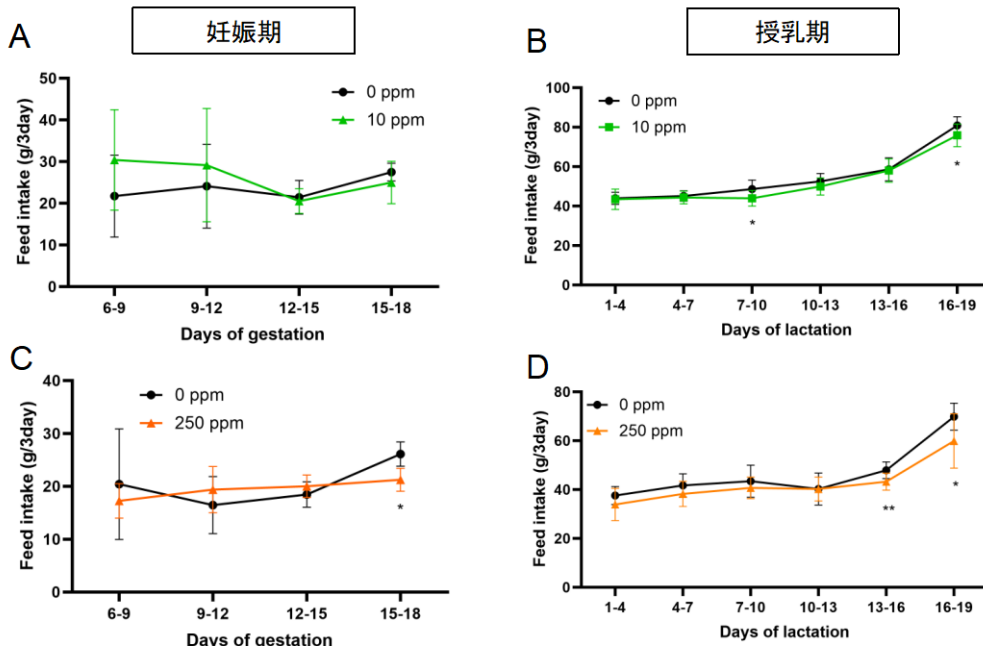


図 25 PTU 混餌投与による甲状腺機能低下誘導モデルの作成

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

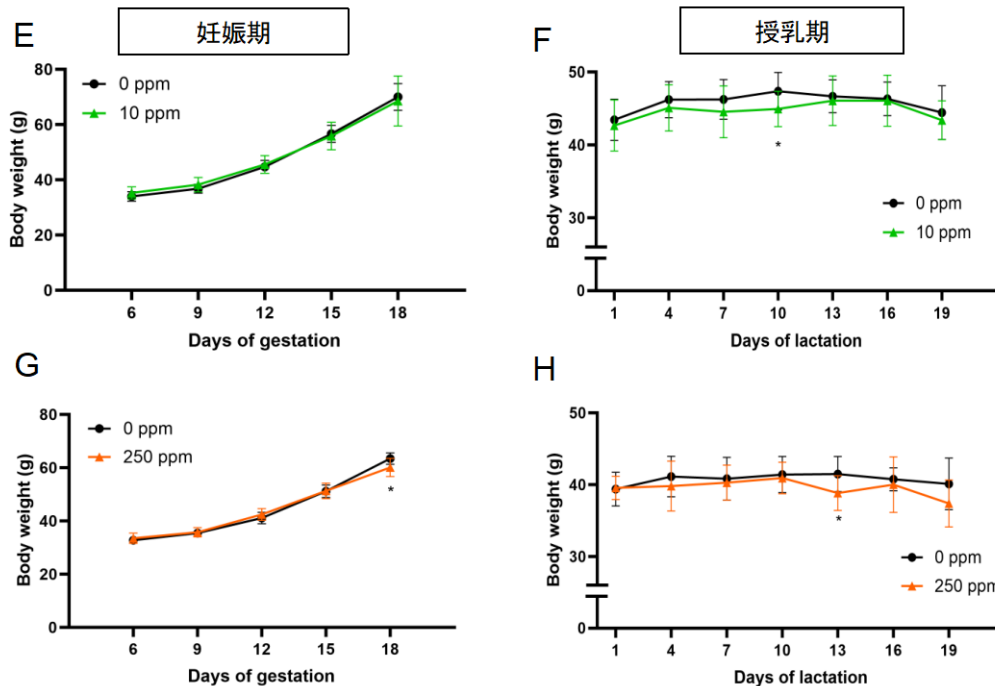
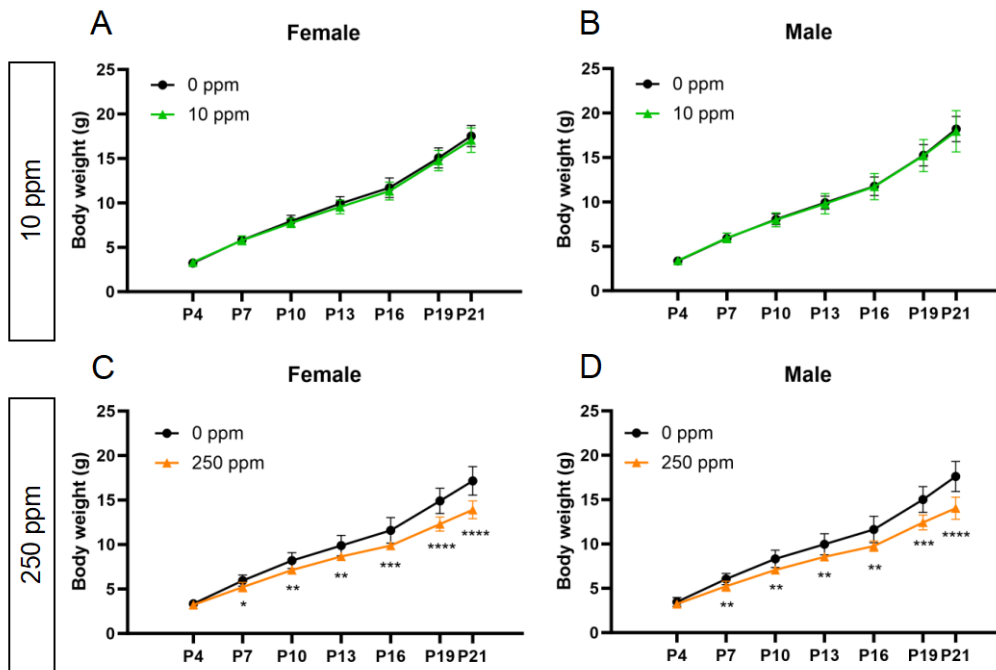


図 26 PTU 誘導性甲状腺機能低下誘導モデル母動物の摂餌量・体重

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  $\pm$  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

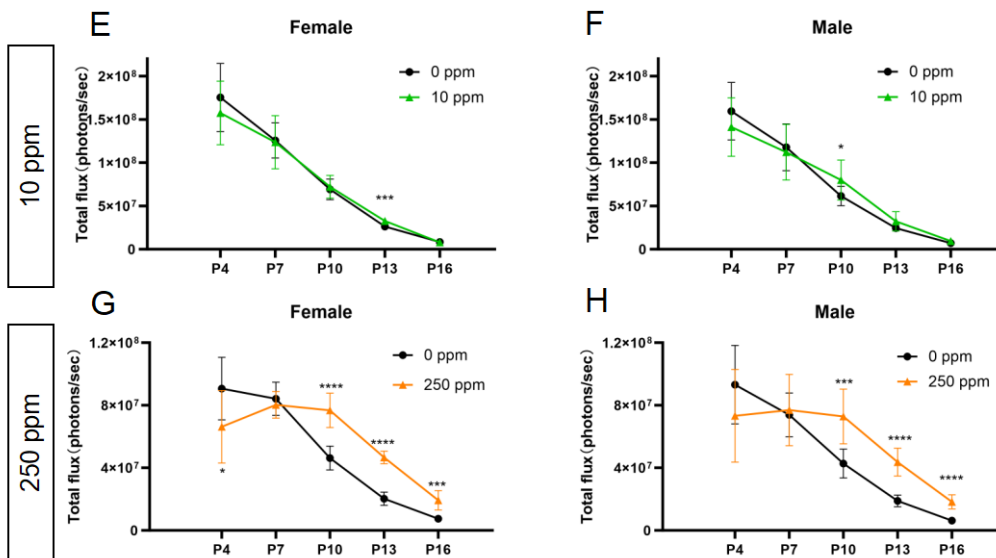


図 27 PTU 誘導性甲状腺機能低下誘導モデル児動物の体重・Syn-Rep 活性

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)。

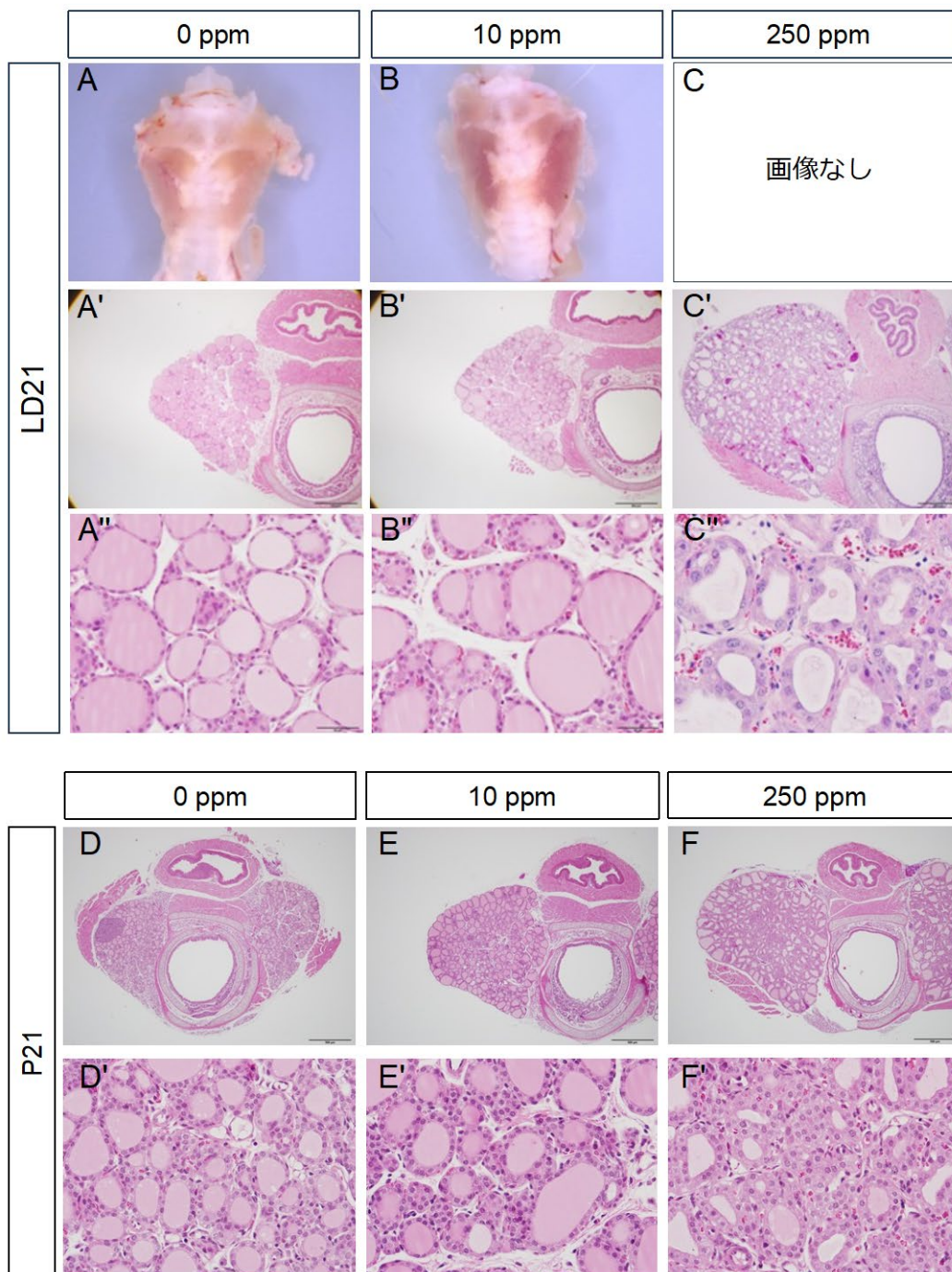
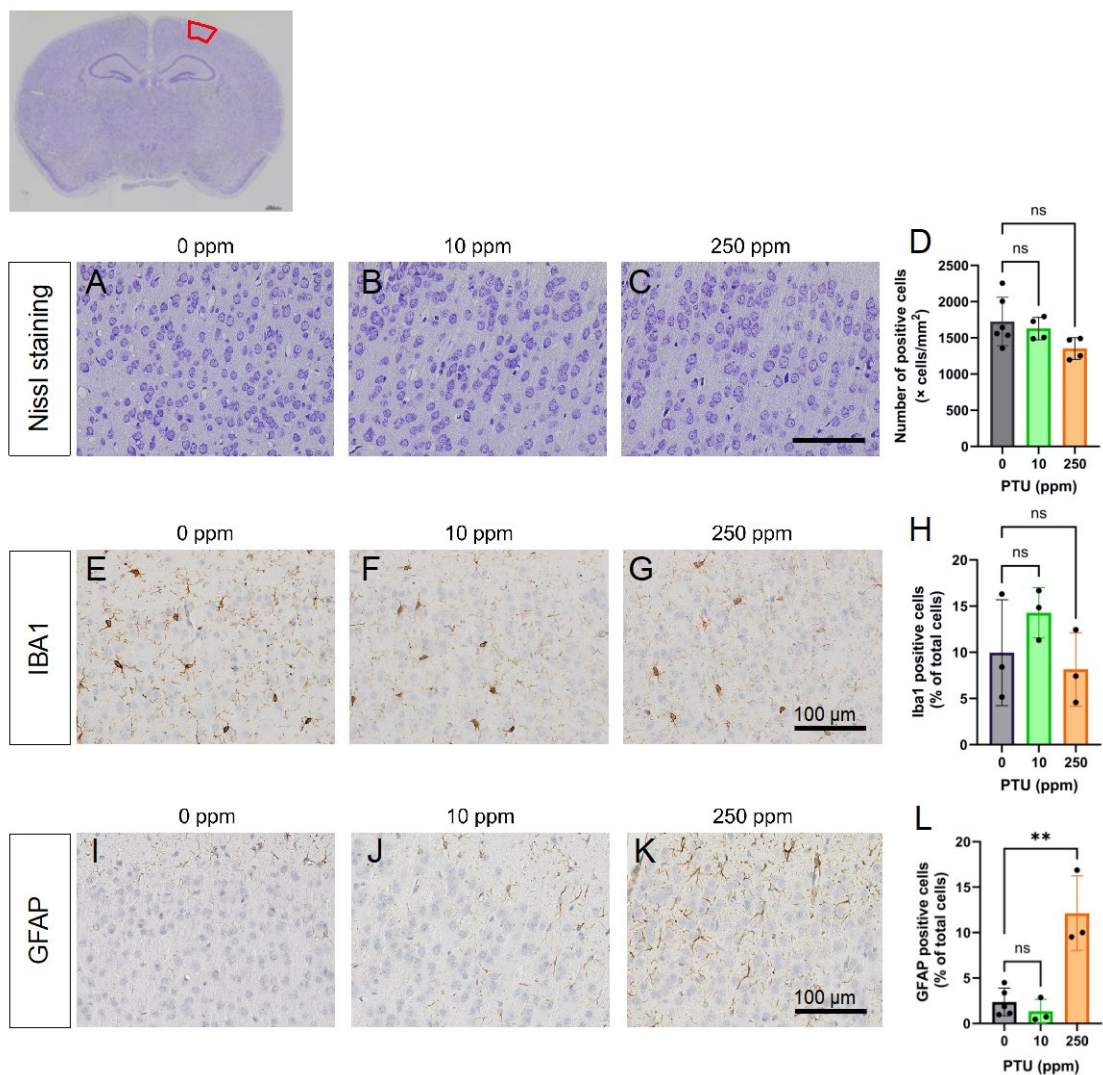


図 28 PTU 混餌投与母動物および児動物の甲状腺組織像

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')。





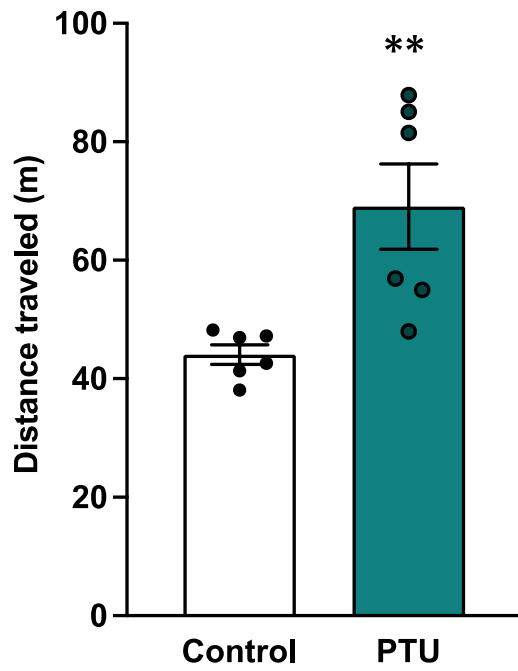
**図 29 PTU 混餌投与児動物の脳構成細胞の組織学的解析**

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, \*\* $P < 0.01$ 。

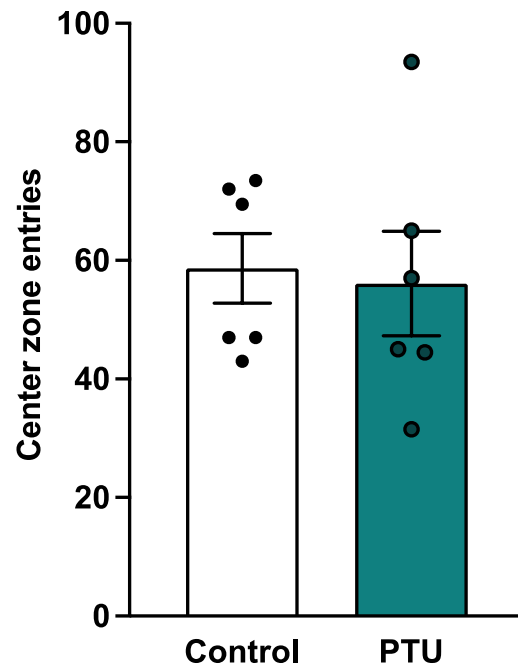


**A**

4w, male-OFT (Distance)

**B**

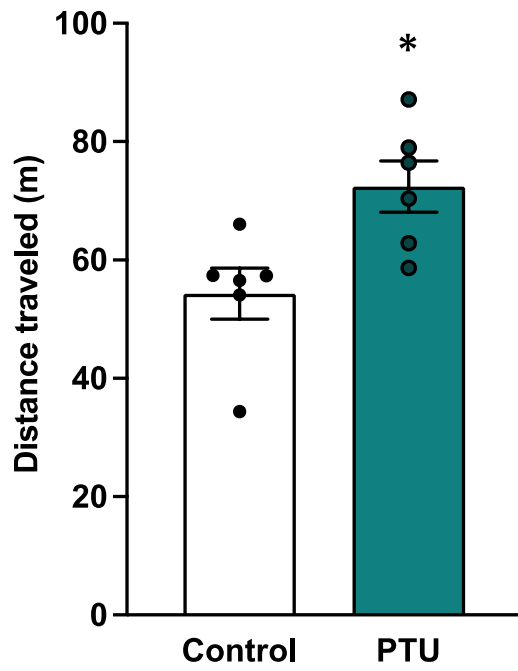
4w, male-OFT (Center)



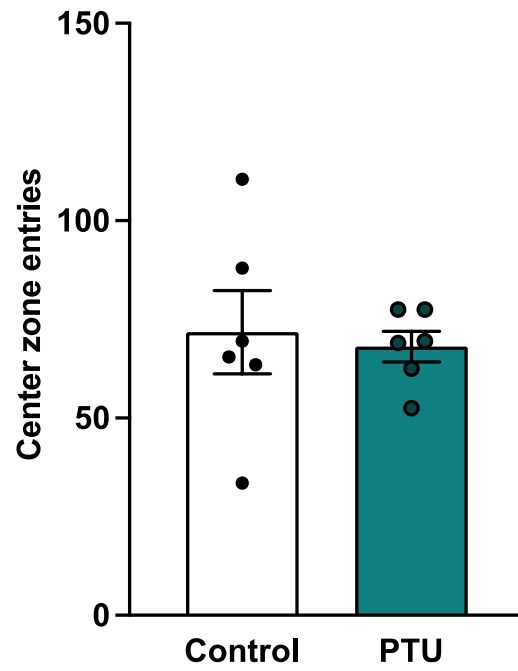
30

**A**

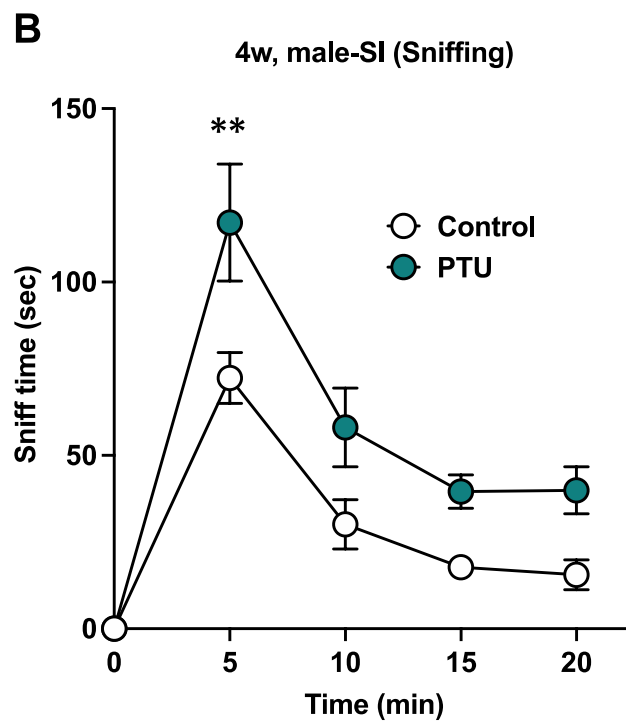
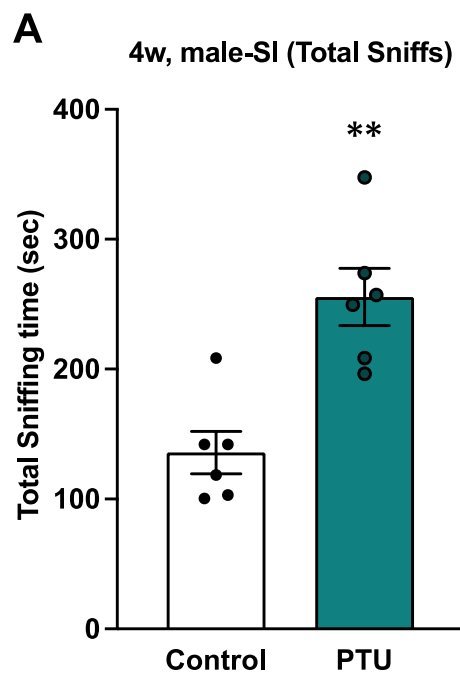
8w, male-OFT (Distance)

**B**

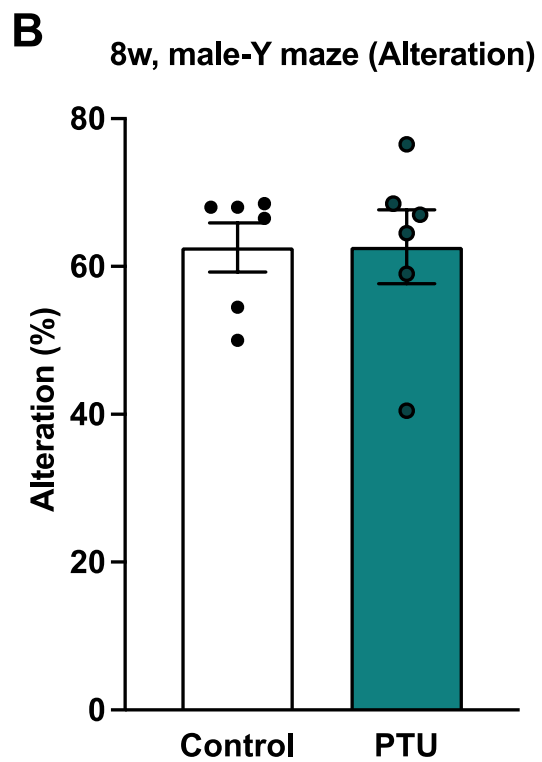
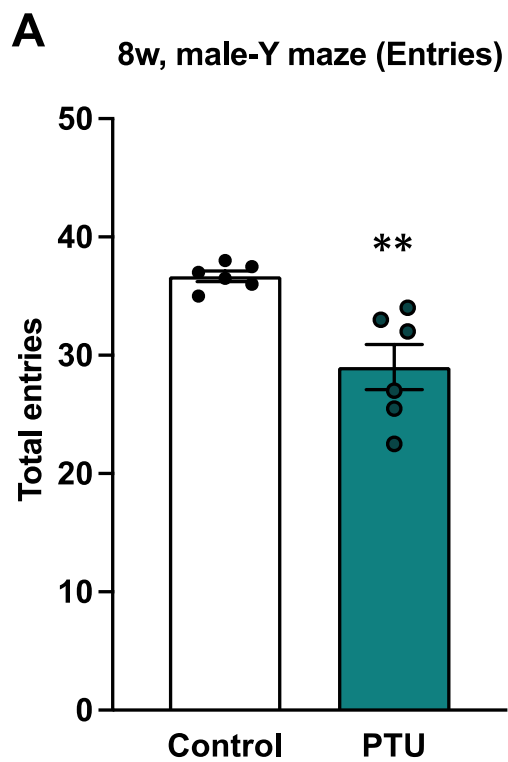
8w, male-OFT (Center)



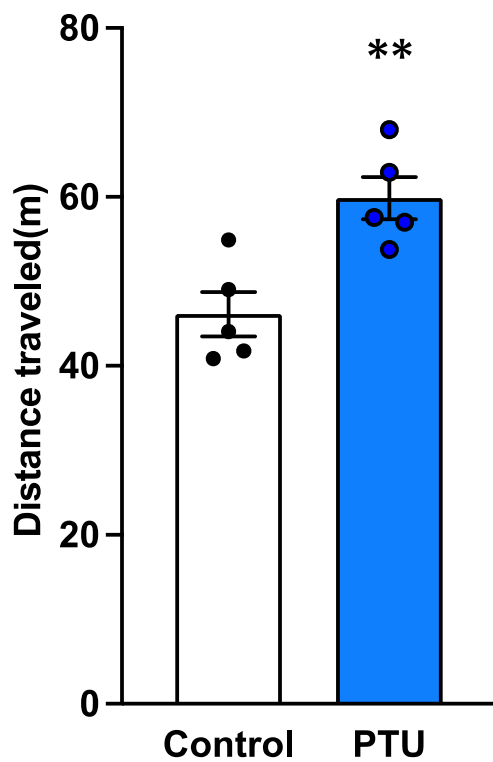
31



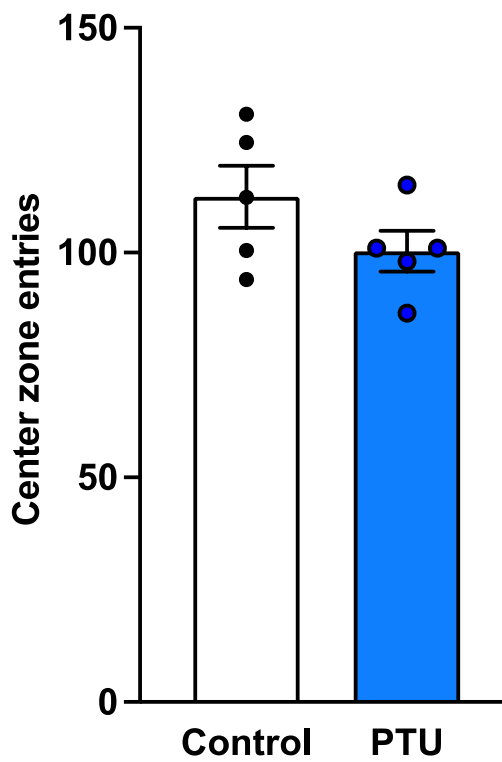
32



**A** 4w, male-OFT (Distance)

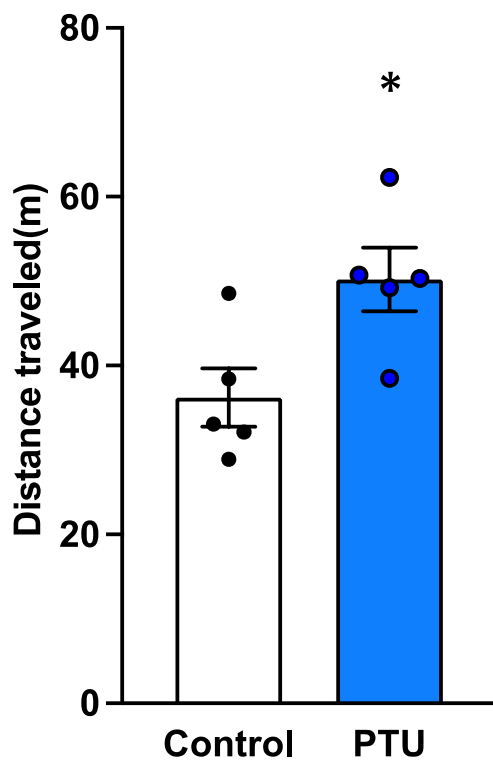


**B** 4w, male-OFT (Center)

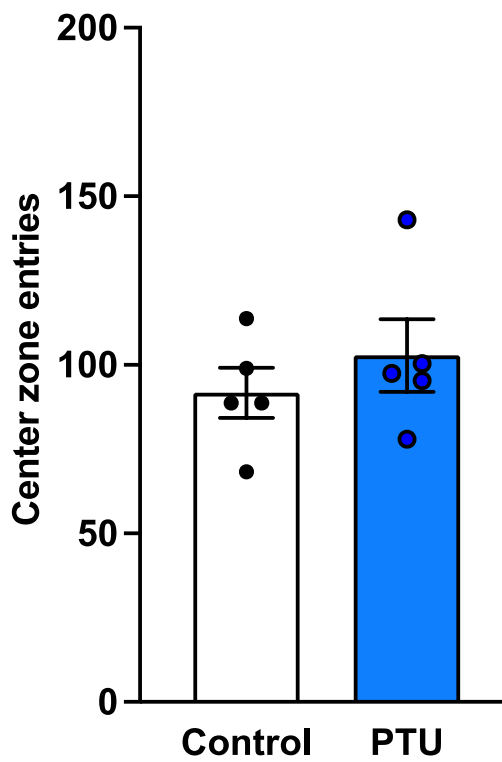


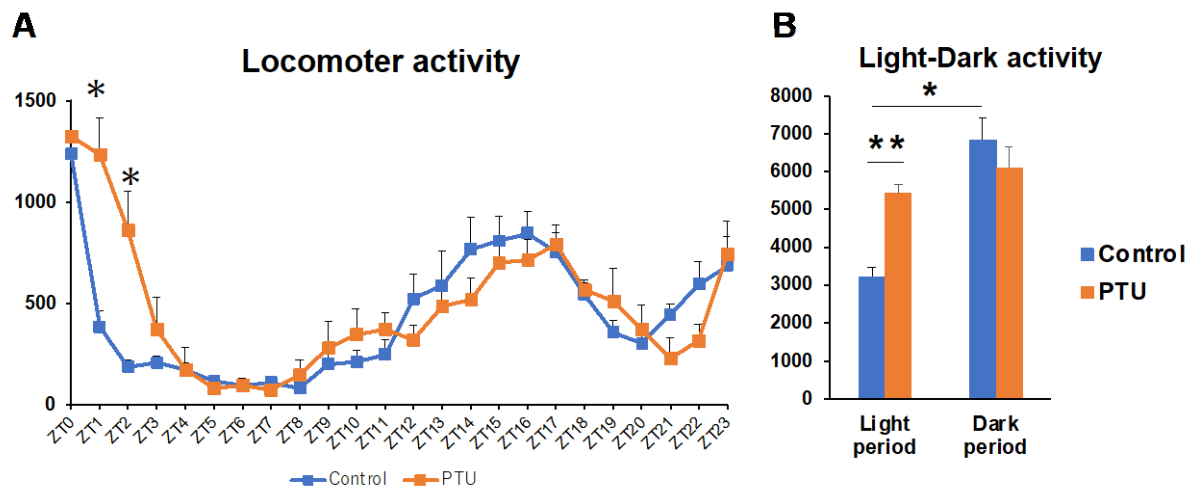
☒ 34

**A** 8w, male-OFT (Distance)



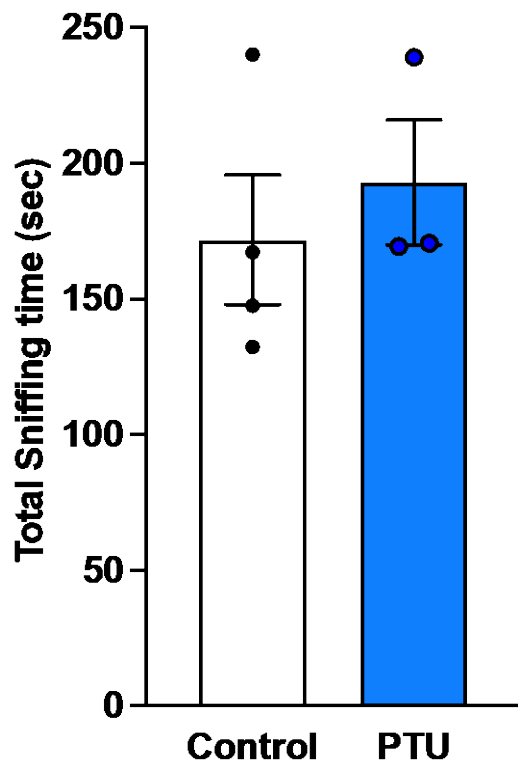
**B** 8w, male-OFT (Center)



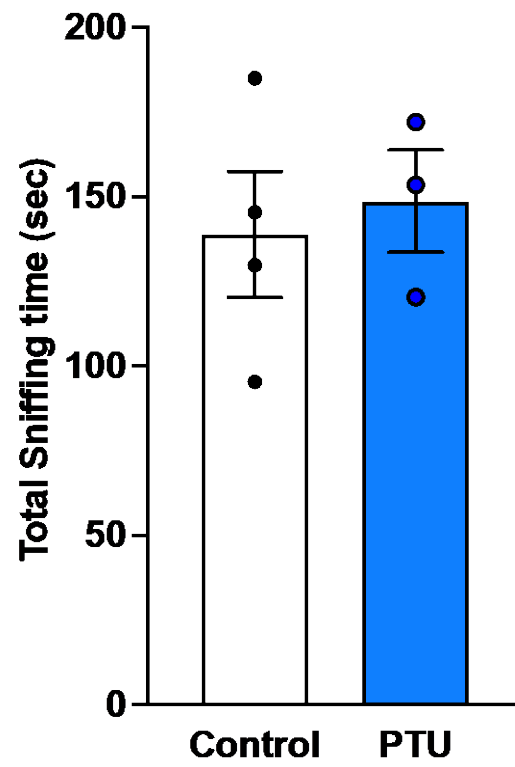


36

**A** 4w, male-SI (Total Sniffs)

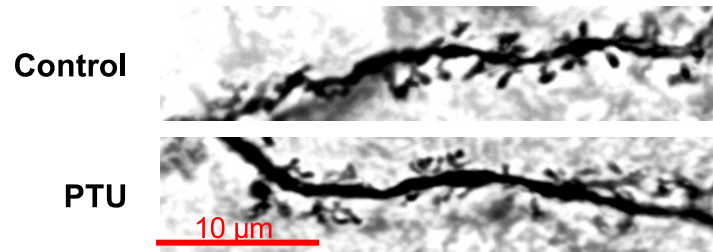


**B** 8w, male-SI (Total Sniffs)



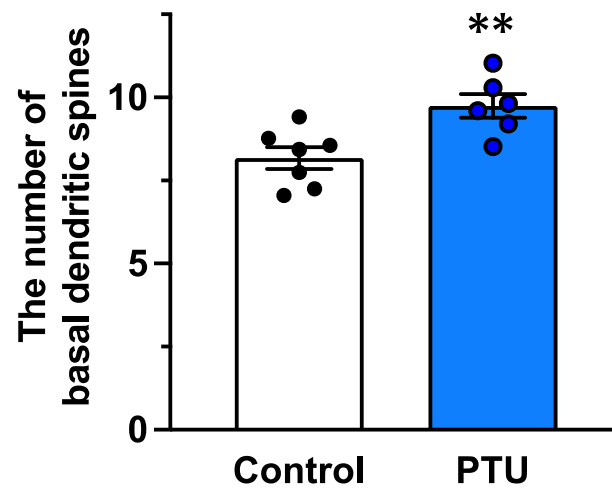


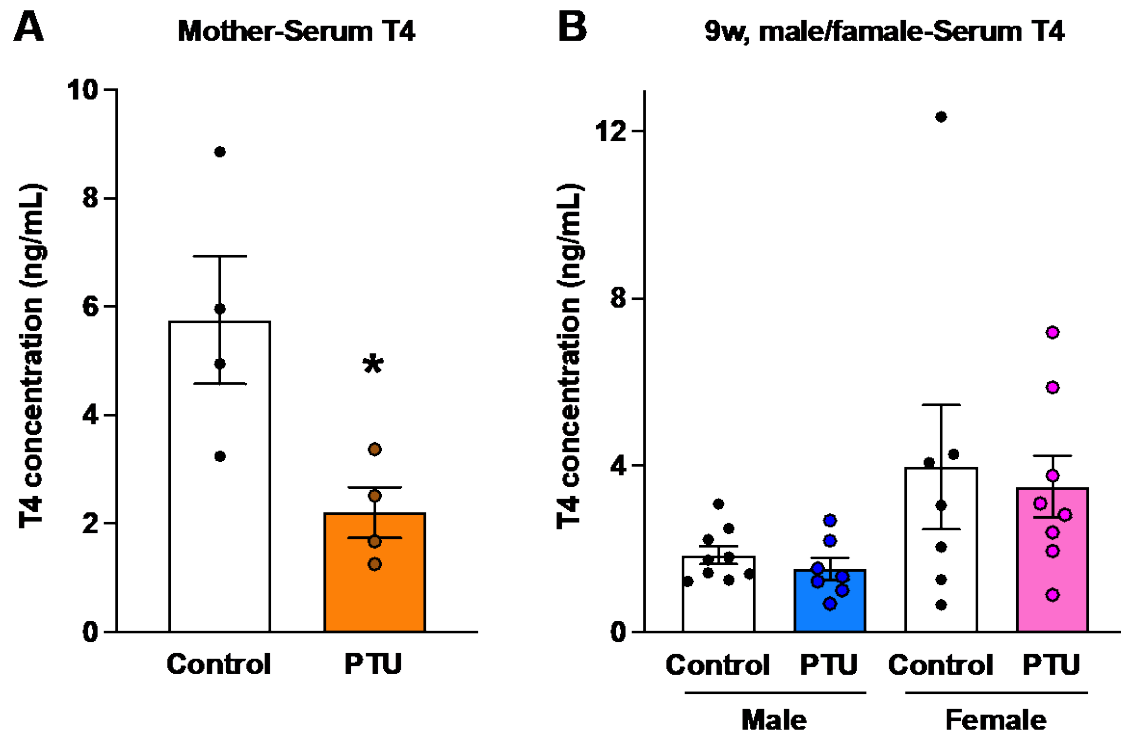
**A**



**B**

9w, male-Golgi staining





☒ 39

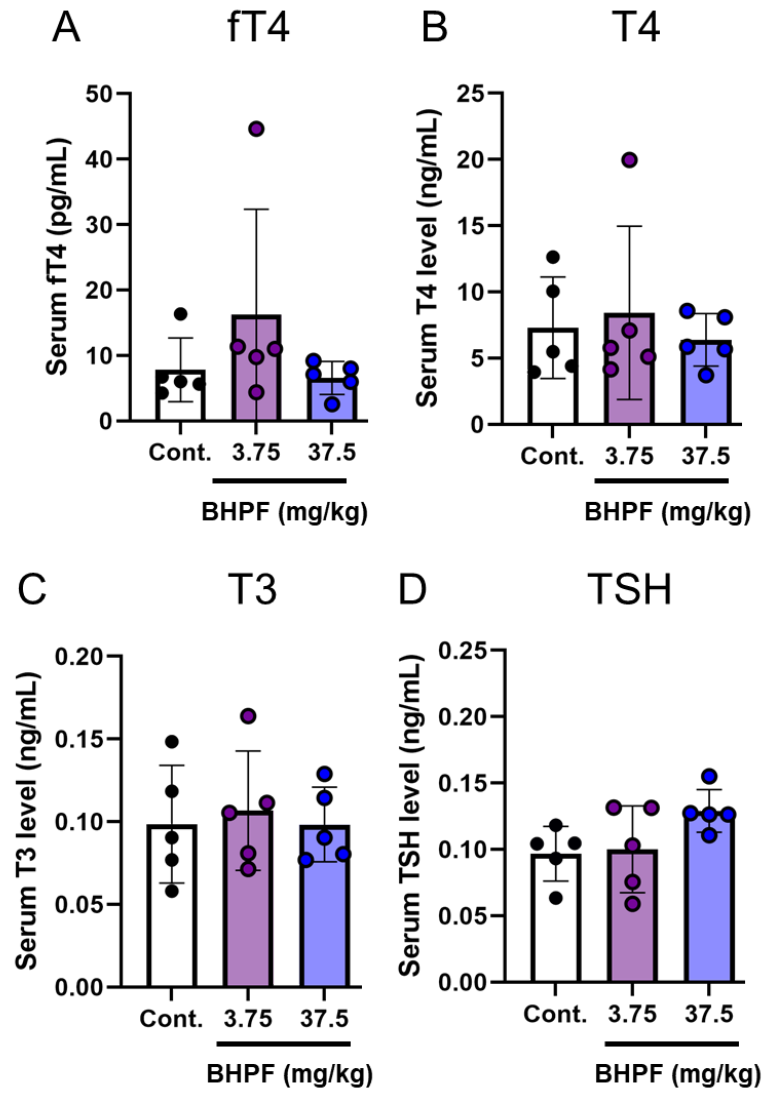
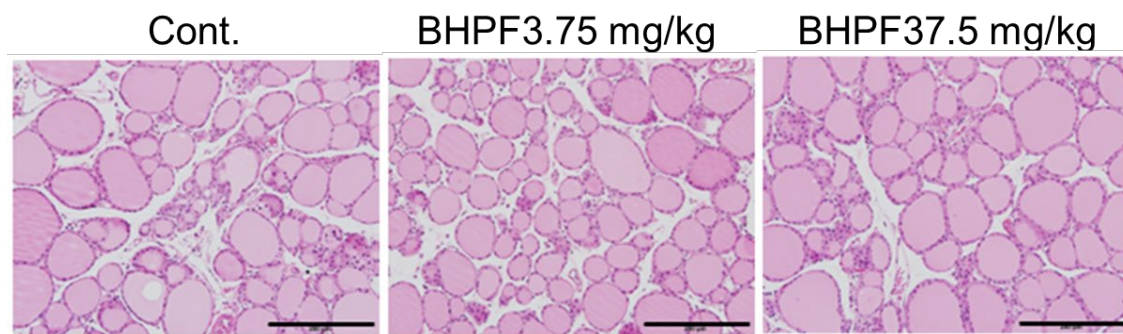
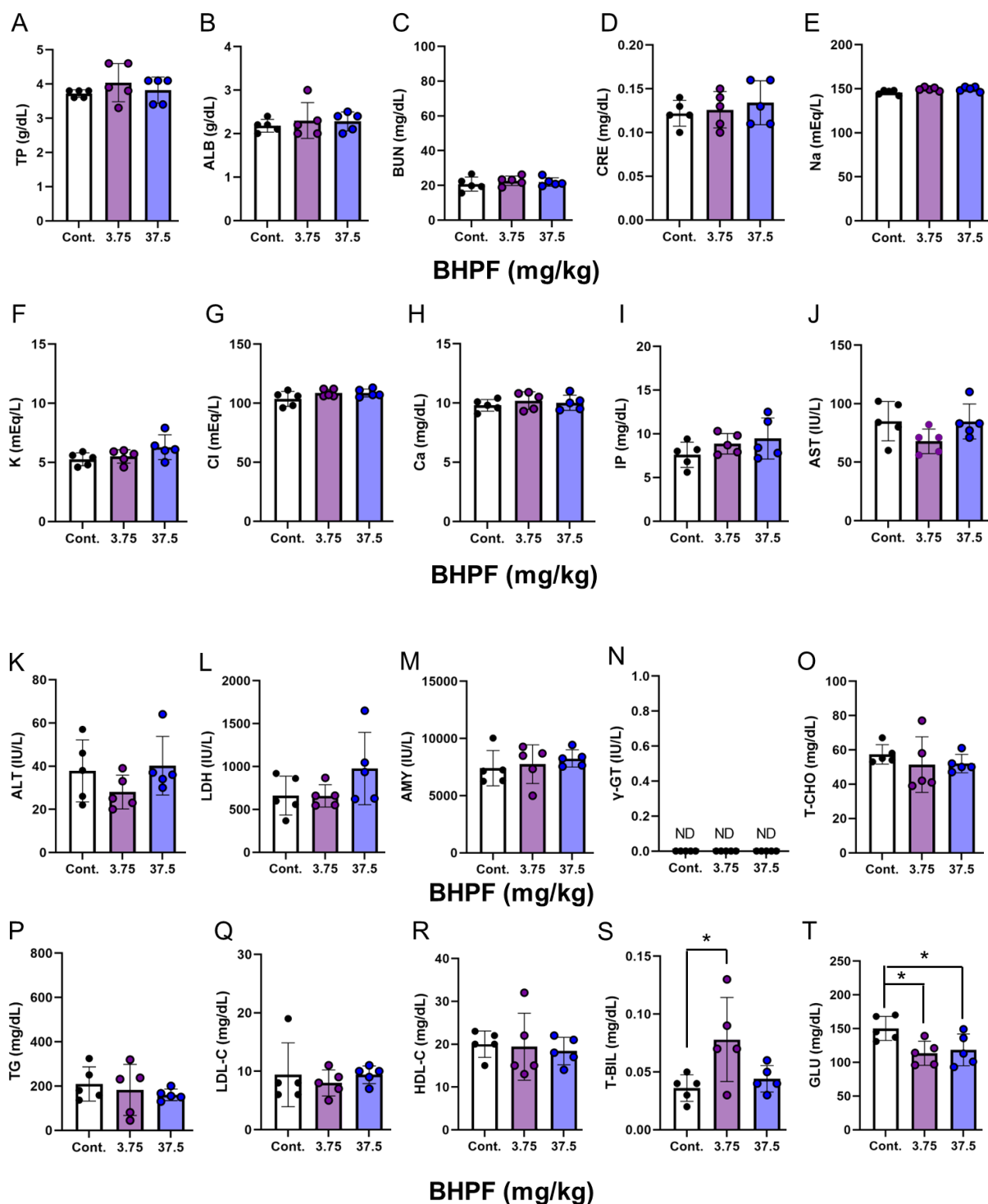


図 40 妊娠期に BHPF を投与したマウスの妊娠 18 日目における血清中甲状腺関連ホルモンレベル  
 妊娠 18 日目に母体より血清を回収し、血清中 fT4 (A)、T4 (B)、T3 (C)、TSH (D) レベルを  
 測定した。Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=5).



**図 41 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  $\mu$ m。



**図 42** 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 ± S.D. (n=5). \*P < 0.05, vs. control (Dunnett's test). ND: Not detected.

表 9 妊娠期に 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	BHPF 37.5 mg/kg
Number of litters	10	10	10
<b>Influences on the dams</b>			
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 10 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 <sup>#</sup>	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 <sup>√</sup> bw) (mm/g <sup>1/3</sup> )	0.869 ± 0.055	0.872 ± 0.031	0.867 ± 0.048
Male AGD normalized (AGD/3 <sup>√</sup> bw) (mm/g <sup>1/3</sup> )	1.453 ± 0.076	1.472 ± 0.040	1.486 ± 0.055

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

表 11 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
<b>External examination</b>			
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)
<b>Visceral examination</b>			
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.

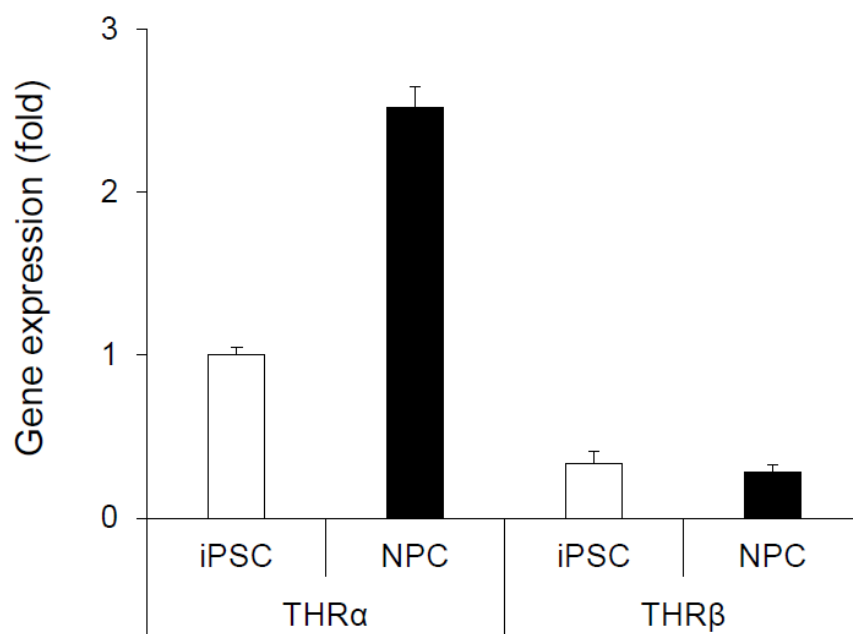


表 12 胎生期に BHPF を投与したマウスの胎齢 18 日目における骨格検査の結果

Parameters	Cont.	BHPF 3.75 mg/kg	BHPF 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)

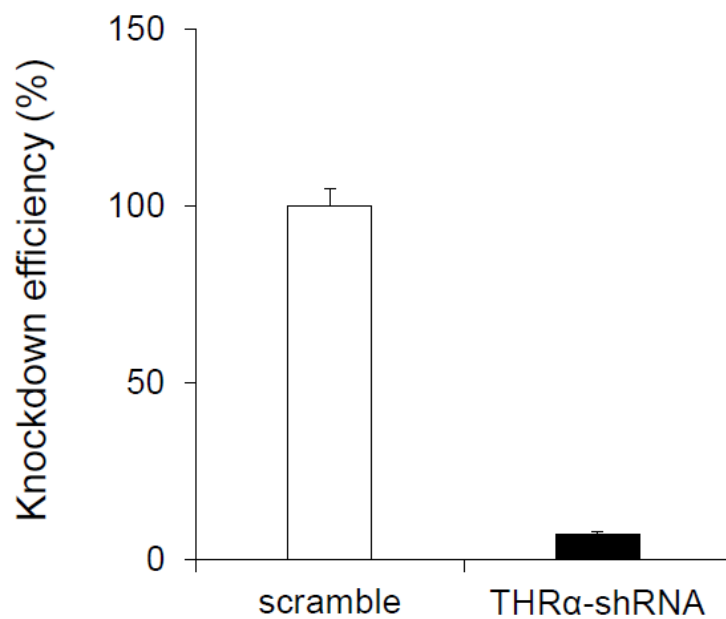
Sternum: supernumerary ossification site, no. fetuses (%)	7 (10.6)	0 (0.00)	2 (2.82)
Vertebra:			
Cervical arch, isolated ossification site, no. fetuses (%)	1 (1.52)	1 (1.43)	2 (2.82)
Thoracic arch, increased ossification, no. fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

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



**図 43 ヒト iPS 細胞の神経分化前後の THR 発現**

ヒト iPS 細胞の神経分化前後における THR $\alpha$ , THR $\beta$  の発現を qPCR で調べた。



**図 44** ヒト iPS 細胞の THRα ノックダウン

ヒト iPS 細胞に THRα に対するレンチウイルス shRNA を導入後した後、THRα のノックダウン効率を qPCR で調べた。

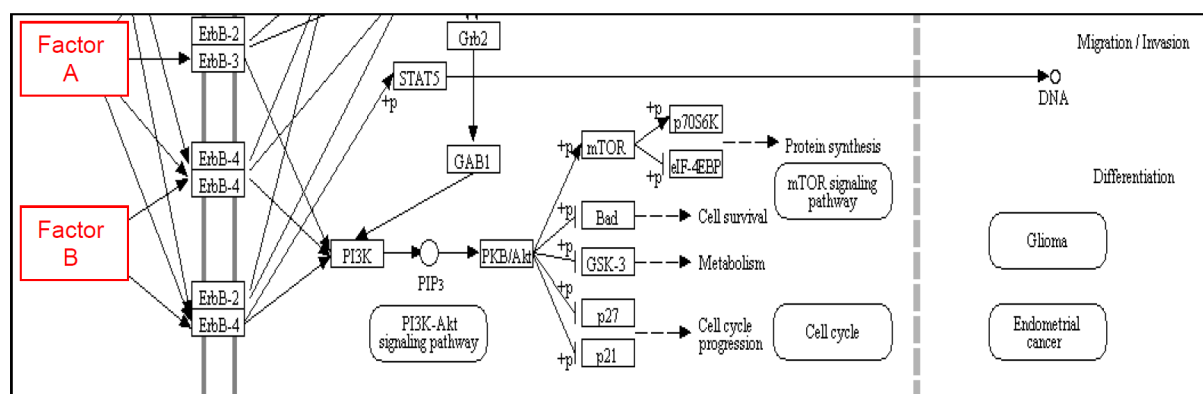


図 45  $THR\alpha$ ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS 解析）

神経生存維持パスウェイ上にある Factor A, B がスクリーニングされた。

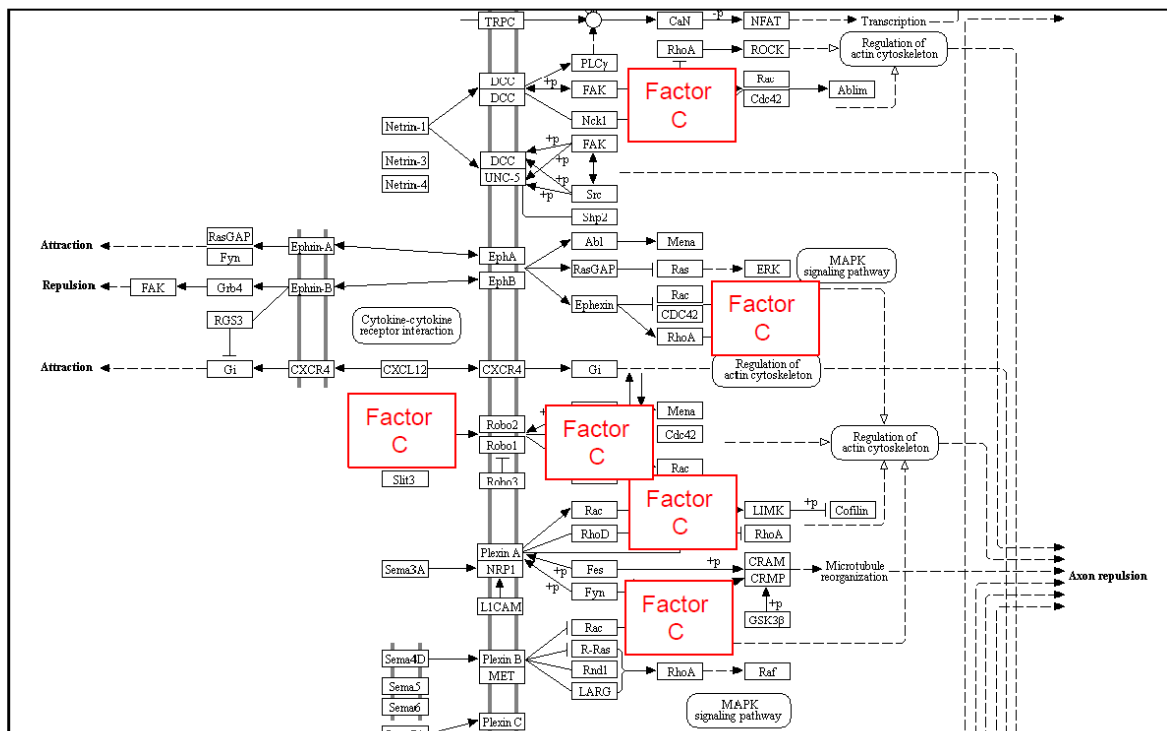


図 46  $THR\alpha$ ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS 解析）

軸索伸展パスウェイ上にある Factor C がスクリーニングされた。

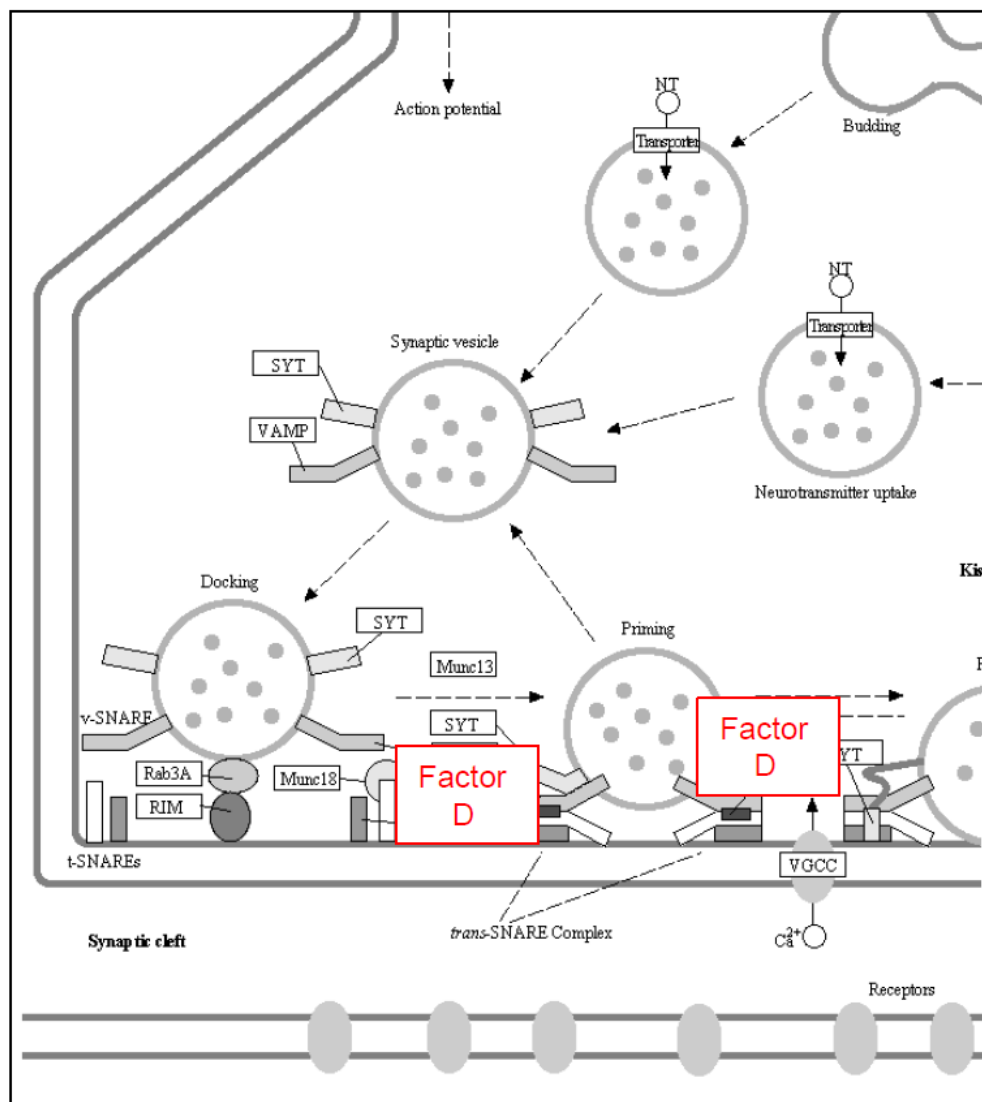


図 47  $THR\alpha$ ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS 解析）

軸索伸展パスウェイ上にある Factor D がスクリーニングされた。

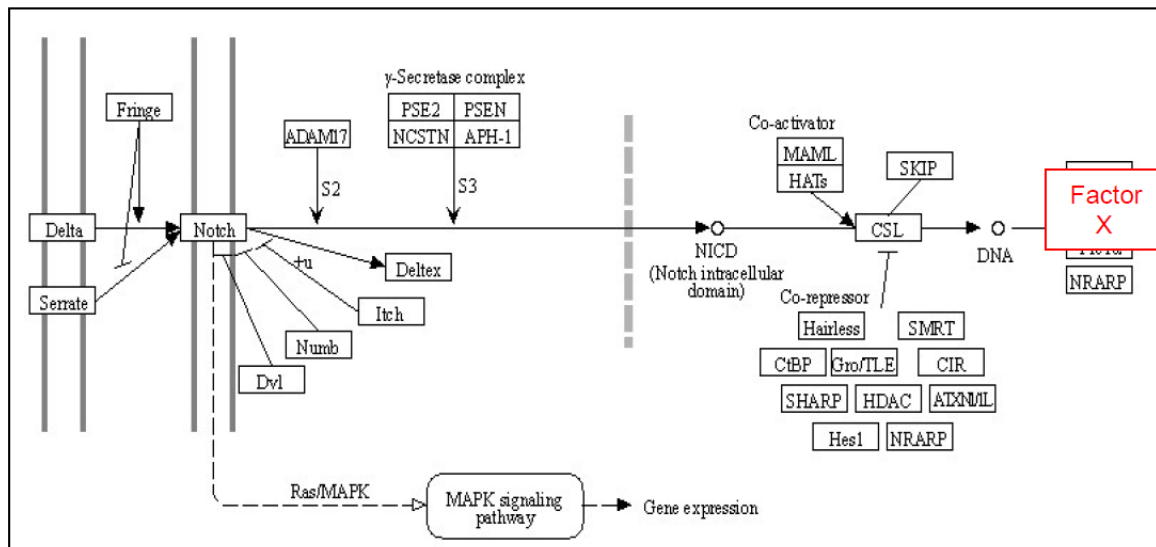
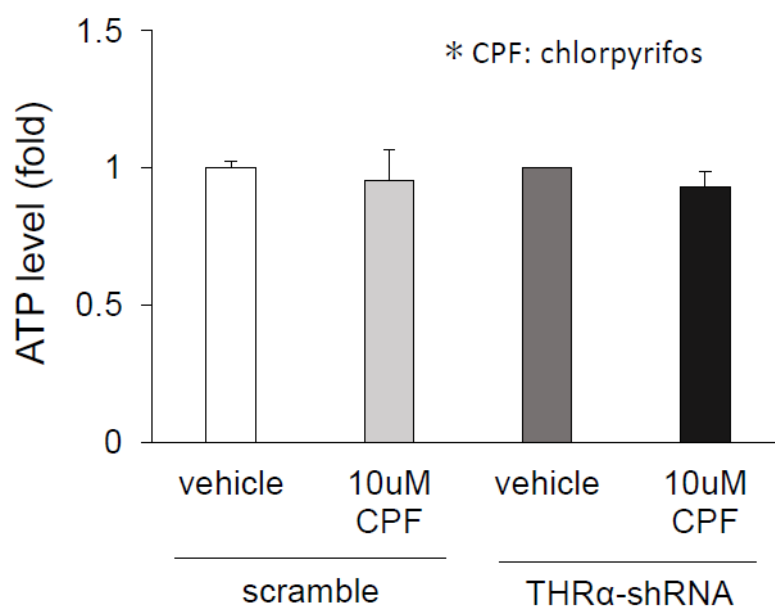


図 48  $THR\alpha$ ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS 解析）

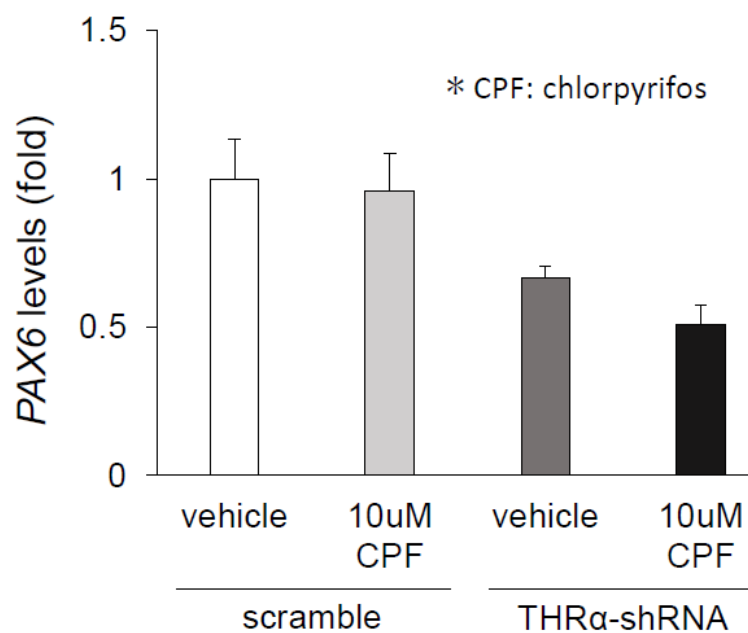
神経分化パスウェイ上にある Factor X がスクリーニングされた。





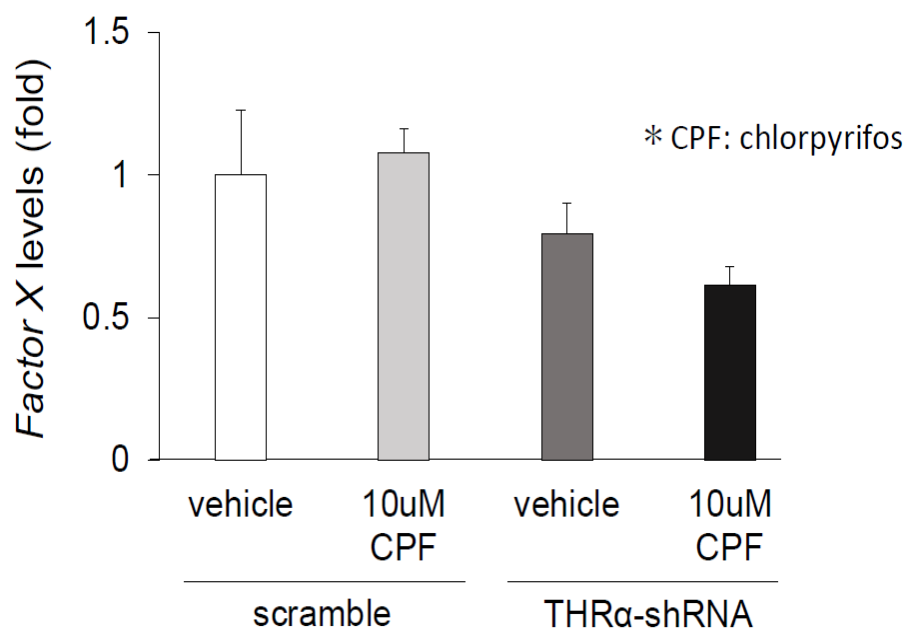
**図 49** **THRα**ノックダウンしたヒト iPS 細胞の ATP 産生に対するクロルピリホスの影響

ヒト iPS 細胞にクロルピリホス (10  $\mu$ M) を曝露して 24 時間後に細胞内 ATP 量を調べた。shRNA により THRα をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するクロルピリホス曝露の影響を示す。ノックダウンコントロールとして scramble shRNA を用いた。



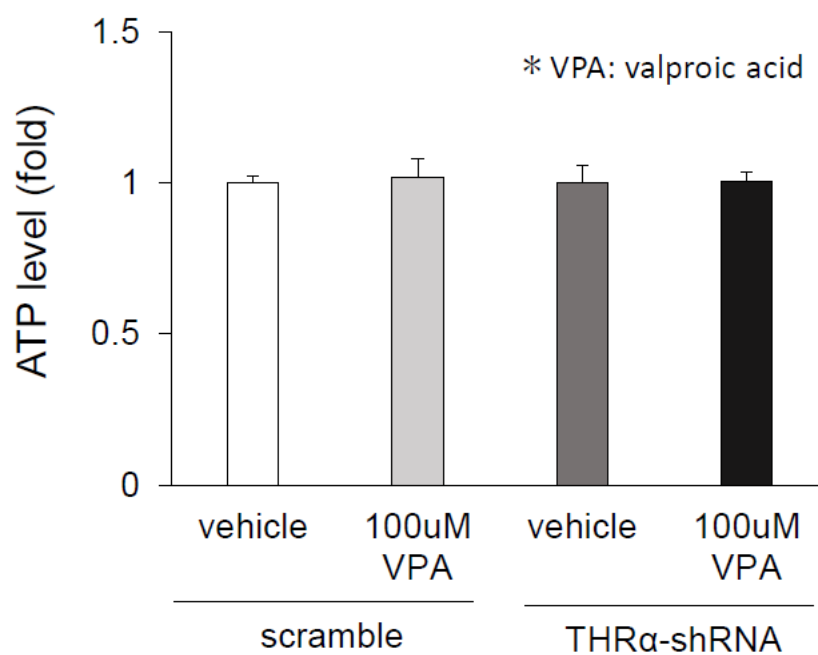
**図 50** THRαノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経 (外胚葉) 分化に対するクロルピリホス曝露の影響

クロルピリホス (10  $\mu$ M) を曝露したヒト iPS 細胞に神経分化誘導を行い、4 日目に神経分化マーカー PAX6 の発現を調べた。shRNA により THRα をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するクロルピリホス曝露の影響を示す。ノックダウンコントロールとして scramble shRNA を用いた。



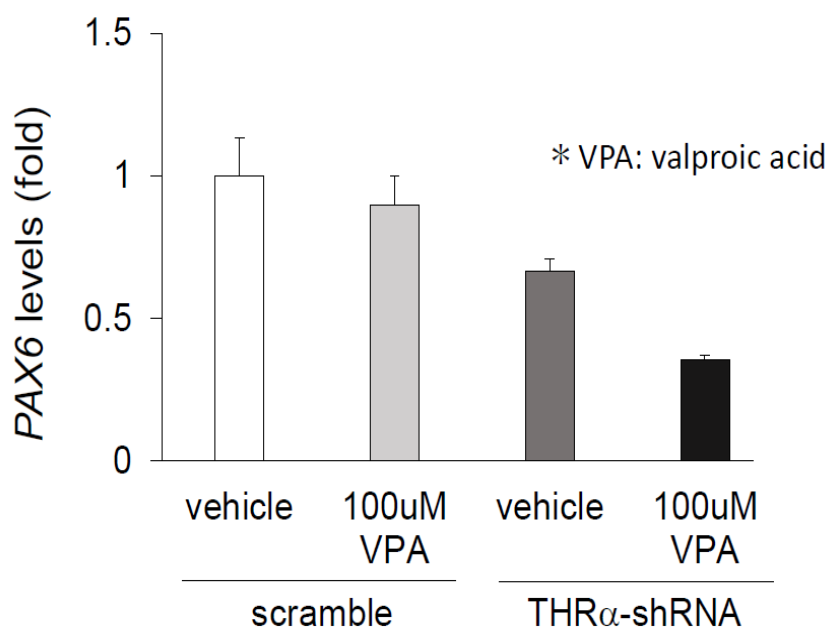
**図 51** THRαノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経 (外胚葉) 分化に対するクロルピリホス曝露の影響

クロルピリホス (10  $\mu$ M) を曝露したヒト iPS 細胞に神経分化誘導を行い、4 日目に今回同定した Factor X の発現を調べた。shRNA により THRαをノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するクロルピリホス曝露の影響を示す。ノックダウンコントロールとして scramble shRNA を用いた。



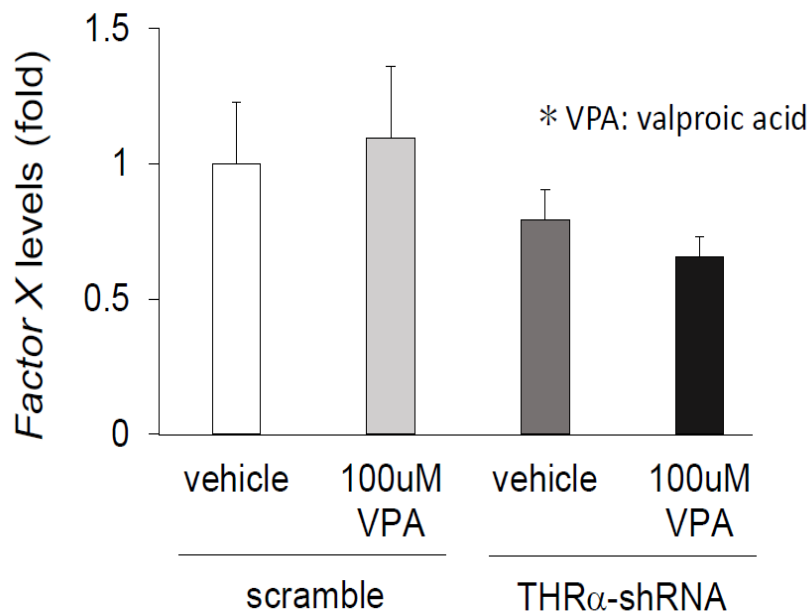
**図 52** **THRαノックダウンしたヒト iPS 細胞の ATP 産生に対するバルプロ酸の影響**

ヒト iPS 細胞にバルプロ酸（100 μM）を曝露して 24 時間後に細胞内 ATP 量を調べた。shRNA により THRαをノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するバルプロ酸曝露の影響を示す。ノックダウンコントロールとして scramble shRNA を用いた。



**図 53** THR $\alpha$ ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経（外胚葉）分化に対するバルプロ酸曝露の影響

バルプロ酸（100  $\mu$ M）を曝露したヒト iPS 細胞に神経分化誘導を行い、4 日目に神経分化マーカー PAX6 の発現を調べた。shRNA により THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するバルプロ酸曝露の影響を示す。ノックダウンコントロールとして scramble shRNA を用いた。



**図 54** THR $\alpha$ ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経（外胚葉）分化に対するバルプロ酸曝露の影響

バルプロ酸（100  $\mu$ M）を曝露したヒト iPS 細胞に神経分化誘導を行い、4 日目に今回同定した Factor X の発現を調べた。shRNA により THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するバルプロ酸曝露の影響を示す。ノックダウンコントロールとして scramble shRNA を用いた。