

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
**化学物質による抗甲状腺作用および周産期の甲状腺機能低下に伴う
 次世代影響の評価に関する総合研究（24KD2003）**

令和 6 年度分担研究報告書

分担研究課題：周産期の甲状腺機能変動による次世代影響の検討

研究分担者：中西 剛（岐阜薬科大学 薬学部 教授）
 研究分担者：松丸大輔（岐阜薬科大学 薬学部 准教授）
 研究分担者：石田慶士（岐阜薬科大学 薬学部 助教）
 研究分担者：田熊一徹（大阪大学 大学院歯学研究科 教授）
 研究分担者：早田敦子（大阪大学 大学院歯学研究科 准教授）

研究要旨

近年、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。先天性甲状腺機能低下症の表現型からも、妊娠期～周産期の甲状腺機能低下が児に多様な影響を及ぼすことは既に明らかである。しかし、化学物質曝露により誘導される甲状腺機能低下は一般に軽度であると考えられる。必ずしも典型的な甲状腺機能低下状態における表現型と一致しない可能性がある。このため化学物質リスク評価においては、典型的な甲状腺機能低下状態における表現型よりも、軽度な甲状腺機能低下によって誘導される最も鋭敏な児のエンドポイントを明らかにすることが極めて重要である。この問題を解決するために我々は、これまでに甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）阻害剤であるプロピルチオウラシル（PTU）を用いたマウス甲状腺機能低下モデルを構築してきた。今年度の本分担研究では、このマウス甲状腺機能低下モデルを用いて、様々な程度の甲状腺機能低下を誘導した際の出生後の影響について詳細な検討を行い、甲状腺機能低下の程度と児動物の表現型との相関を検証するとともに、最も鋭敏な児のエンドポイントの探索を行った。

その結果、母動物の典型的な甲状腺機能低下状態（PTU 250 ppm 投与群）においては、児動物も典型的な甲状腺機能低下状態を示した。一方で、閾値付近（PTU 10 ppm 投与群）では児動物も同程度の甲状腺機能低下状態であったことから、母動物の甲状腺関連指標は児動物の甲状腺機能状態を反映していることが示された。児動物への影響については、典型的な甲状腺機能低下状態であっても、脳以外への影響はほとんど認められなかった。一方で脳については、閾値付近の甲状腺機能低下状態から、既に児動物に多動などの行動異常が観察された。また Syn-Rep マウスを用いた *in vivo* イメージング解析においても、用量依存的なレポーター分子の発現変動が確認された。しかしながら、発達神経毒性（DNT）ガイドライン試験の要求項目である脳重量の測定や組織学的解析では、閾値付近の甲状腺機能低下状態における影響は検出できなかった。このことから、甲状腺機能低下時における最も鋭敏な児のエンドポイントは行動異常であることが明らかとなるとともに、Syn-Rep マウスを用いた *in vivo* イメージング解析がそれを検出するための New Approach Methodology（NAM）として有用である可能性が改めて示された。

他方、DNT 陽性対照候補物質であるクロロピリフォス（CPF）の周産期曝露では、コリンエステラーゼ（ChE）活性の有意な低下状態であっても、甲状腺関連指標には影響が認められなかったことから、甲状腺機能低下による DNT の陽性対照物質にはならない可能性が示された。

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、2016～2018 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、甲状腺関連指標に影響が認められた化学物質すべてについて発達神経毒性（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）が掛かるという問題もあり、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。現在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状況である。

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典型的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軽度の影響である。したがってこの問題を根本的に解決するためには、まず妊娠期～周産期の甲状腺機能低下の影響を受ける最も鋭敏な児のエンドポイントを明らかにする必要がある。この点については、2019年に米国 The Health and Environmental Sciences Institute (HESI) が開催した Thyroid Hormone Assessment Workshop においても同様の指摘がなされている。また甲状腺機能低下の影響は、種差が大きいことも考慮しなければならない。

このような背景のもと、我々は厚生労働科学研究費補助金・化学物質リスク研究事業（令和3～5年度）において、以下の検討を行い、成果を挙げてきた。

- 1) 甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO) 阻害剤である 6-プロピル-2-チオウラシル (PTU) の混餌投与系を用いたマウス甲状腺機能低下モデルを構築し、閾値用量である 10 ppm から甲状腺機能低下の症状を示し始め、250 ppm では典型的な甲状腺機能低下が認められることを明らかにした。またマウスにおいて典型的な甲状腺機能低下を誘導する PTU の用量はラットの 25 倍程度であり、マウスの方が化学物質による甲状腺機能低下に対して抵抗性が高いことも明らかにした。
- 2) PTU を用いた出生前発生毒性試験 (TG414) を行ったところ、マウスにおいては妊娠中に典型的な甲状腺機能低下を誘導しても、胚の着床や胎児の骨格・臓器形成等には特に影響がないことが確認された。
- 3) 神経細胞分化マーカーである Synapsin 1 (Syn) をレポーター遺伝子としたトランスジェニックマウス (Syn-Rep マウス) を作製し、神経細胞の分化成熟状態を *in vivo* イメージングにより非侵襲的に観察できる New Approach Methodologies (NAMs) として有用であることを見出した。
- 4) Syn-Rep マウスを用いて、妊娠期～周産期の甲状腺機能低下時における児の影響を検討したところ、PTU 10 ppm 投与群において脳のレポーター分子の発現変動が確認されるとともに、行動異常を示す可能性が示唆されたことから、マウスにおいては甲状腺機能低下閾値用量付近において、既に脳発達に影響を与える可能性が示された。

本研究では先行研究をさらに発展させ、妊娠期～周産期の甲状腺機能低下時における次世代影響の更なる詳細を明らかにし、既存ガイドライン試験に適用可能な DNT 試験実施の trigger となるエンドポイント/バイオマーカーの提案を行うなど、リスク評価のスキーム構築への貢献を目指す。また次世代影響に関する *in vitro* 試験法構築に資する Adverse Outcome Pathway (AOP) の解明を試みる。今年度は、先行研究で未実施であった甲状腺機能低下の閾値用量 (PTU 10 ppm) および典型的な症状を示す用量 (250 ppm) 投与群の離乳児における児の詳細な影響評価と、中間用量 (50 ppm) における次世代影響評価全般を行った。

B. 研究方法

1. 動物

ICR 系マウスは日本エスエルシーより入手した。実験には雄性 Syn-Rep マウス (ICR マウスとの交配で系統維持したもの) 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。剖検時、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。

2. 被験物質の投与

投与プロトコールは OECD テストガイドライン No.426 (発達神経毒性試験) に準じて実施した。PTU (Sigma-Aldrich #P3755) およびクロルピリフォス (CPF: 富士フイルム和光純薬、純度: 99.0%) の投与は、完全調整飼料の AIN-93M に混餌し、妊娠 Syn-Rep マウスに妊娠 6.5 日 (GD6.5) より自由摂取させることで行った。PTU は 10 ppm、50 ppm、250 ppm (w/w) で、CPF は 10 ppm および 50 ppm (w/w) の用量で投与した。出生後も母動物に混餌飼料を出産後 21 日目 (LD21) まで継続して与えたが、PTU 曝露においては、生後 13 日齢 (P13) ～P21 の期間は児動物の摂食も始まるため、混餌飼料の PTU 濃度をそれぞれ半量 (5 ppm、25 ppm、125 ppm (w/w)) に変更した。出生後、得られた児動物については、児の成長の不均一性を排除するために OECD ガイドラインに準じて、P4 において 1 匹の母体から合計 8 匹 (雌 4 匹・雄 4 匹) となるように間引きを行った。

3. 母動物の観察および剖検

投与期間中は 3 日おきに摂餌量と体重を測定した。LD21 に母体をイソフルラン深麻酔下で開腹し、後大静脈より全採血を行った。血液は凝固促進剤・血清分離剤入りの採血管に移し転倒混和した。30 分静置し凝固させた後、3000g 10 分の条件で遠心分離し血清を -80℃ で保存した。放血致死後に速やかに各臓器を摘出し、重量を測定した。

4. 児動物の剖検

P21 で児動物をイソフルラン深麻酔下で開腹し、後大静脈より全採血を行った。半数は灌流固定を行い、各臓器をパラフィン包埋した。半数は放血致死後に速やかに各臓器を摘出し、重量を測定した。

5. 血清中マーカーの測定

血清中の甲状腺ホルモン (総トリヨードチロニン (T3)、総チロキシン (T4)) レベルの測定はあすか製薬メディカルに依頼した。また血清中の各種生化学マーカーの測定はオリエンタル酵母に依頼した。TSH の測定は、残留農薬研究所で確立された MILLIPLEX MAP Mouse Pituitary Magnetic Bead Panel - Endocrine Multiplex Assay TSH 用 (EMD Millipore) を用いた免疫ビーズ法に準じて行った [Minami et al., *Regul Toxicol Pharmacol*, 137: 105283 (2023)]。各血清サンプルを抗 TSH 抗体ビーズと反応させ、ビーズを洗浄した。ビーズに検出用抗体を反応させ、洗浄後さらに Streptavidin-Phycoerythrin を反応させた。各試薬を反応させたビーズを FACSFlow (BD Bioscience, #342003) に懸濁後、BD FACSVerse (BD Bioscience) でビーズの蛍光強度を測定した。各動物の

血清 TSH レベルは作成した検量線より算出した。

6. 組織学的解析

甲状腺、肝臓、腎臓、脾臓、肺、胸腺はパラフィン切片を作成し、組織像を HE 染色で観察した。

脳の免疫組織化学的解析は、anti-NeuN 抗体（成熟神経細胞特異的マーカー）、anti-IBA1 抗体（ミクログリア特異的マーカー）、anti-GFAP 抗体（アストロサイト特異的マーカー）、anti-MBP 抗体（オリゴデンドロサイト特異的マーカー）を用いた免疫組織化学染色により観察した。脳のゴルジ染色は、FD Rapid GolgiStain Kit™(FD Neuro Technologies)を用いて行った。ビブラトームを用いて作製した冠状切片（厚さ 100 μm）を gelatin-coated microscope slide に張り付け風乾し、キットのプロトコールに従って染色した。取得画像の内側前頭前皮質 (mPFC) 第 5 層における錐体神経細胞の樹状突起スパイン数を ImageJ にて計数した。

7. *In vivo* イメージング解析

児動物の *in vivo* イメージング解析は、*in vivo* imaging system (IVIS、住商ファーマ) を用いて行った。2% イソフルランガスで麻酔後、150 mg/kg 体重の D-Luciferin 溶液を腹腔内投与した後、マウス背側より 1 分ごとに撮影・計測し、測定値の減衰が始まる 20-30 分間にわたって測定した。得られたデータについて Living Image (住商ファーマ) を用いて解析し、頭部の発光強度 (Luc2 由来のレポーター活性) を Total flux (photons/second) として定量化した。

8. 児動物の行動解析

行動解析としては 4 および 8 週齢時にオープンフィールド試験および社会性相互作用試験を実施した。オープンフィールド試験では、被験マウスが新奇環境下で探索行動を行う性質を利用して自発運動量を測定した。塩ビ製のボックス (30 cm×30 cm×30 cm) を中央部が照度 40 lx となる光度下に設置し、被験マウスをその中央部に置き、その後 20 分間の自由行動をビデオカメラにて記録した。記録動画より ANY-maze video-tracking software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) を用いて、マウスの総移動距離を計測した。社会性相互作用試験では、被験マウスが初めて遭遇した新奇侵入マウスへの接触時間を指標として社会性を評価した。まず被験マウスをホームケージから行動観察を行う新たなケージに移して 1 時間馴化させ、そのケージ内に被験マウスよりも 1 週齢若い同性の侵入マウスを入れ、その後 20 分間の相互的な自由行動をビデオカメラにて記録した。記録動画より侵入マウスに対する被験マウスの匂い嗅ぎ時間を目視で計測した。さらに、8 週齢時には、断崖回避試験と、Y 字型迷路試験を加えた。断崖回避試験では、高所でのマウスの回避行動を指標として、衝動性や不注意性を評価した。照度 50 lx となる光度下に、上端に直径 8 cm の円形ステージを付けた高さ 50 cm のポールを設置し、被験マウスをその中央部に置き、その後 15 分間の自由行動をビデオカメラにて記録した。マウスのステージからの落下の有無を記録し、落下割合を算出した。

Y 字型迷路試験では、長さ 30 cm の 3 つのアームを Y 字型に配置した迷路装置における被験マウスの各アームへの侵入行動より空間作業記憶を評価した。被験マウスを装置の中央部に置き、その後 5 分間の自由行動をビデオカメラにて記録した。記録動画よりマウスが侵入したアームを順に記録し、アームに侵入した回数 (total entry) および連続して異なる 3 本のアームに侵入した組み合わせの数 (alternation) を求め、交替行動率を次式 “Percent alternation=number of spontaneous alternations/(Total entry-2)×100” より算出した。

9. 統計学的解析

データは全て平均値±標準偏差で表し、統計学的処理には解析ソフト GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, USA) を用いた。多重比較検定は Dunnett's test、二群の比較は対応のない *t* 検定を行い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に関しては、岐阜薬科大学において遺伝子組換え実験および動物実験に関する承認を得て行った。また動物実験における動物保護および倫理指針を遵守し、わが国における「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律」(法律第 68 号・平成 18 年 6 月 1 日施行) また WHO の医学研究顧問委員会の勧告に基づく「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則」に準拠して以後の実験を行った。

C. 研究結果

1. 母動物の摂餌量、体重および臓器重量への影響

これまでに我々は、PTU を用いたマウス周産期甲状腺機能低下モデルにおける出生後の影響については、甲状腺機能低下を誘導する閾値用量の 10 ppm と典型的な甲状腺機能低下を誘導する 250 ppm の 2 用量しか行っていないかった。そこで今年度は、出生後における各エンドポイントの用量反応性をより明確にするために中間用量である 50 ppm 曝露群を設定して検討を行った。その結果、妊娠期の母動物の摂餌量に影響は認められなかったが、授乳期の総摂餌量に有意な低下が認められた。また体重についても、LD1 - LD13 においては有意な低下が認められた。一方、LD16 - LD19 においては体重の回復が認められた。各主要臓器の重量については、肝臓と肺で有意な増加が認められたが、用量反応性は認められなかった。

2. 母動物および児動物における血清甲状腺関連ホルモンへの影響

PTU 曝露時における出生後 (LD21 および P21) の血清中甲状腺ホルモン (total T3 および T4) レベルならびに生化学マーカーについては未測定であったため、今年度に測定を行った。その結果、250 ppm 投与群の母動物では出生前の結果 (厚生労働科学研究費補助金 [21KD1004] の総合研究報告書を参照) を反映して、T3 と T4 の有意な低下と TSH の有意な上昇が認められた

(Figure 1)。一方で、10 ppm 投与群の母動物では、出生前においては T3、T4、TSH の有意な変動は認められなかった(厚生労働科学研究費補助金 [21KD1004]の総合研究報告書を参照)が、LD21 では T4 で有意な低下が認められた(Figure 1)。また児動物についても、250 ppm 投与群では雌雄共に T3 と T4 の有意な低下と TSH の有意な上昇が認められたが、10 ppm 投与群においては雌雄共に T4 のみ有意な低下が認められ、T3 については、わずかではあるが雄で有意な上昇が認められた(Figure 2)。

3. 母動物および児動物における血清生化学マーカーへの影響

母動物の生化学マーカーについては、10 ppm 投与群では特に影響は認められなかった。250 ppm 投与群では、尿素窒素、カリウム、無機リンの有意な低下、乳酸脱水素酵素(LDH)、総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロールの有意な上昇が認められた。一方、児動物についても、10 ppm 投与群では特に影響は認められなかったが、250 ppm 投与群では、雌雄共に、尿素窒素、無機リン、アミラーゼの有意な低下と総タンパク、アルブミン、中性脂肪、総ビリルビンの有意な増加が認められた。また雄のみで、Na、AST、ALT の有意な低下が、雌のみで Ca の有意な上昇が認められた。しかし総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロールなどの脂質代謝関連マーカーには影響が認められなかった。

4. 児動物の体重および臓器への影響

出生後の児動物の体重は 50 ppm 投与群では、雌雄共に対照群と有意な差はみられなかった。また LD21 における児動物の絶対臓器重量を評価したところ、対照群と比較して PTU 投与により有意に変動している臓器がいくつか存在するものの、いずれも用量反応性は認められなかった。一方、相対臓器重量を評価したところ、雄において脳の相対重量の有意な増加が認められた。肝臓、腎臓、胸腺、肺、脾臓については、組織学的解析を行ったが、対照群と比較して明らかな異常は認められなかった。

5. 児動物の脳への影響

児動物の脳における影響を検討するために、頭部の *in vivo* イメージング解析を行った。50 ppm 投与群においては、P7-16 で雌雄共に対照群と比較してレポーター活性は高い傾向を示し、雌では P16 で、雄では P10、P13、P16 で有意な差が認められた(Figure 3)。50 ppm 投与群のレポーター活性の経時変化は、10 ppm 投与群と 250 ppm 投与群(21KD1004: 総合研究報告書)の間型のパターンを示し、PTU の用量依存的な脳のレポーター活性への影響が認められた。

また P21 における児動物脳の免疫組織学的解析を行ったところ、P21 における大脳皮質一時運動野(M1)領域の II/III 層において、成熟神経細胞、ミクログリア、およびオリゴデンドロサイトの数に PTU 投与による影響は認められなかった。一方、当該領域におけるアストロサイトの数は 10、50 ppm 投与群では変化はみられな

かったものの、250 ppm 投与群では対照群と比較して有意な増加が認められた(Figure 4)。

8 週齢時における 10 ppm 投与群の児動物脳についてゴルジ染色による解析を行ったところ、雄の mPFC 領域第 5 層の錐体神経細胞において基底樹状突起スパインの 10 μ m あたりの密度が有意に増加していることを認めた。また近年、神経発達症などの精神行動異常への関与が示唆されている神経炎症に着目し、mPFC と感覚情報処理を担う脳領域である第一次体性感覚野(S1BF)における、ミクログリアとアストロサイトの状態を各細胞種特異的のマーカーを用いて免疫組織学的解析により検討した。その結果、10 ppm PTU 投与群の雄児動物の S1BF において、ミクログリアマーカーである Iba1 陽性細胞数の増加傾向が認められた。一方、GFAP 陽性細胞数については変化が認められなかった。

6. 児動物の行動への影響

これまでの検討で 250 ppm 投与群の児動物においてオープンフィールド試験における自発運動量の増加が認められるなど多動の症状を示すことを確認していたが、10 ppm 投与群については予備的に行った検討であったため、今期は 10 ppm 投与群における行動異常の再現性の確認を行った。その結果、生後 4 および 8 週齢時ともに、10 ppm 投与群の雄児動物においてオープンフィールド試験での総移動距離が有意に増加した(Figure 5)。社会性行動に及ぼす影響についても、4 週齢時における匂い嗅ぎ時間が有意に増加していることを認めた(Figure 6)。さらに 8 週齢時に行った断崖回避試験では、10 ppm 投与群の雄児動物において落下割合が増加する傾向が認められた。一方、Y 字型迷路試験においては、総アーム進入および自発的交替行動ともに特段の変化は認められなかった。雌の児動物において、10 ppm 投与群では生後 4 週齢時の匂い嗅ぎ時間、8 週齢時のオープンフィールド試験での総移動距離について、雄と同様の傾向が認められた。

7. 周産期の CPF 曝露による児動物への影響評価

検討は、周産期曝露により児動物の行動異常が誘導されることが報告されている 10、50 ppm の 2 用量で行った。実験期間中の母動物および児動物の体重と摂餌量に CPF 投与による影響は認められなかった。

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、雄では 10 ppm 投与群では P10 で、50 ppm 投与群では P13 で対照群と比較して有意な低下が認められた(Figure 7)。雌では頭部レポーター活性における CPF 投与による影響は認められなかった。

児動物脳の免疫組織学的解析を行ったところ、成熟神経細胞、ミクログリア、およびアストロサイトの数に特段の影響は認められなかった。

CPF 投与による甲状腺組織像への影響を評価したところ、LD21 の母動物および P21 の児動物において対照群と比較して CPF 投与群で明らかな組織学的異常は認められなかった。

CPF を投与した児動物の P21 における血清中生化学マーカーを測定したところ、雌雄共にいずれの用量に

においても対照群と比較して ChE 活性の有意な低下が認められた (Figure 8)。

D. 考察

1. 母動物と児動物の甲状腺関連指標の変動と行動異常について

我々はこれまでに検討を行ってきた PTU を用いたマウス甲状腺機能低下モデルにおいて、GD18.5 の母動物の解析から、50 ppm 以上が典型的な甲状腺機能低下を誘導する条件であり、10 ppm は甲状腺機能低下の閾値用量である可能性を示してきた (21KD1004: 総合研究報告書)。今回の検討において P21 の雌雄児動物と LD21 の母動物の T3 と T4 レベルを測定したところ、PTU 10 ppm 投与により母動物と児動物共に T4 の低下は認められたが、T3 の低下および TSH の変動は認められなかった。T3 については、児動物の雄で逆に有意な上昇が確認されたが、PTU の閾値用量で散見される現象で、ネガティブフィードバック機構による影響と考えられた。これらの結果から、改めて 10 ppm は甲状腺機能低下を誘導する閾値用量であることが確認された。また母動物の甲状腺関連指標は、児動物の甲状腺機能低下状態を反映したものである可能性も示された。

一方で、10 ppm 投与群の 4 週齢および 8 週齢児動物では、自発運動の増大 (多動) や匂い嗅ぎ行動の増加という情動行動の異常が確認された。また成育後も多動の持続性や、衝動性や不注意の増大傾向を認めた。甲状腺ホルモン不応症の患者では、注意欠陥多動障害 (ADHD) などの症状がしばしば認められる事が報告されている [N Engl J Med, 328:997-1001 (1993)他] が、今回確認された児動物の行動異常はヒトにおける影響と類似したものであると言える。一方で、これまでも実験動物を用いて甲状腺機能低下時における行動異常が検証されているが、極端な甲状腺機能低下状態における検討であったり、甲状腺機能低下の程度と行動異常との相関が確認されていなかったりと、その情報が極めて断片的であった。今回の結果は、閾値レベルの甲状腺機能低下状態 (10 ppm) であっても、児動物の脳発達に対して有害影響を与える可能性があることを明示しており、甲状腺機能低下を誘導する化学物質のリスク管理に極めて重要な情報になると考えている。

他方で、8 週齢時の 10 ppm 投与群においては、P21 で検出された甲状腺組織学的異常 (21KD1004: 総合研究報告書) や血中 T4 レベルの低下は認められなかった。250 ppm 投与群においても甲状腺で濾胞上皮細胞の肥厚がわずかに観察される程度であり、P21 で認められた典型的な甲状腺機能低下の症状 (コロイドの消失等) は観察されなかった。これは P21 以降に PTU 混餌食から通常食に切り替えたためであり、PTU 投与による甲状腺機能低下は可逆的であることが示唆された。しかしその一方で、10 ppm 投与群の 8 週齢においても、行動異常が持続していることから、周産期の甲状腺機能低下は児動物の脳発達に不可逆的な影響を与えていると考えられた。

2. Syn-Rep マウスレポーター分子のバイオマーカーと

しての有用性について

我々はこれまでに、PTU 10 ppm および 250 ppm 投与群における Syn-Rep マウス児動物の脳におけるレポーター活性は、対照群と比較して生後直後は低値、その後高値となり、発育遅延が起こっているようなプロファイルを示した。またその影響は、10 ppm 投与群の方が 250 ppm 投与群と比較してマイルドであることを明らかにしている (21KD1004: 総合研究報告書)。今年度は用量依存性を確認するために、新たにその中間用量である 50 ppm 投与群のレポーター活性の変動を評価した。その結果、10 ppm および 250 ppm 投与群と類似したプロファイルを示し、影響の程度もそれらの中間であることが明らかとなった。このことから、レポーター活性変動は PTU の用量依存性であり、レポーター活性が脳発達への影響の程度を反映するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。10 ppm と 250 ppm 投与群の児動物では多動の行動異常が検出されることから、レポーター活性の変化は行動異常を反映したバイオマーカーとしても有用である可能性が示唆された。行動試験は定性的な評価であるため脳の影響の程度を評価することは困難であるのに対し、Syn-Rep マウスのレポーター活性は脳発達への影響の定量的な評価が可能であることから、今後は脳の組織学的解析や各種バイオマーカーとの相関を検討することで、定量評価系としての有用性も示していきたいと考えている。

3. 児動物脳の組織学的解析について

P21 児動物においては、250 ppm 投与群において脳の相対重量の増加が認められたが、これは 250 ppm 投与群においては有意な体重増加の抑制が認められていることから、低体重に起因したものであると考えられた。しかし 50 ppm 投与群の雄では、体重の増加の抑制がないにも関わらず脳の相対重量の有意な増加が認められたことから、PTU 投与による脳の相対重量増加は必ずしも体重減少のみでは説明できない可能性が考えられた。

脳の構成細胞のうちアストロサイトは血中の T4 を取り込み細胞内で活性型の T3 に変換した後に神経細胞に供給する役割を担っている [Mol Cell Endocrinol, 458:22-28 (2017)]。250 ppm 投与群の P21 児動物では大脳皮質 M1 領域のアストロサイトの数が増加していたが、これ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 T4 から T3 へ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た。しかし甲状腺機能低下による行動異常が確認されている 10 ppm 投与群の P21 児動物では、アストロサイトの数に影響は認められなかった。現状では PTU 投与マウスの多動の原因をアストロサイトの増加で説明することはできないが、用量依存性などを考慮した組織学的解析を進めることでアストロサイトに対する影響についても結論を導き出したいと考えている。

一方で、8 週齢の児動物脳においては、10 ppm 投与群でミクログリアの増加傾向が認められ、mPFC 第 5 層の錐体細胞の樹状突起スパイン密度についても増加がみられた。mPFC で示唆されているシナプス形成異常と精神疾患との関連を考え合わせると、mPFC での神経形

態学的変化が 10 ppm 投与群における ADHD 様の情動行動変化をもたらしたものと推察される。また多動と社会性行動変化が発現していることより、今後は mPFC と S1BF に加えて、少なくとも運動野および海馬領域を対象に加えて詳細な脳組織学的解析を実施する必要があると考えている。また、ヒトの発達障害では男児の発現率が高いことが知られている。今後は、PTU 誘発異常行動発現の性差についても詳細な検討を行う予定である。

4. 母体甲状腺機能低下による児動物の脳以外への影響について

我々はこれまでに、妊娠期における PTU 投与は、典型的な甲状腺機能低下を示す 250 ppm 投与群であっても胎児の臓器や骨格形成等にほとんど影響を与えないことを明らかにしている (21KD1004: 総合研究報告書)。今年度は、出生後 (P21) の児動物の器官形成への影響についても解析を行った。その結果、児動物の脳と甲状腺以外の臓器に関しては、重量、病理組織学的解析の結果、PTU の用量依存的な影響は認められなかった。P21 児動物の生化学マーカーに関しても 250 ppm 投与群でいくつかの項目で変化が認められるものの、特定の臓器への影響を判断できる結果は得られなかった。以上の結果を総合的に判断し、周産期の PTU 投与は児動物の甲状腺や脳以外の臓器に対してはほとんど影響を与えない可能性が示唆された。

その一方で、母動物においてはヒトの甲状腺機能低下時の症状でも影響が確認されている LDH、T-CHO、LDL-C、HDL の上昇などの脂質代謝関連マーカーへ影響が、250 ppm 投与群で認められた。この結果は、母動物の脂質代謝マーカーに明確な異常が認められる場合には、甲状腺機能低下による児動物の DNT が起こっている可能性を示唆するものである。2018 年の改正農薬取締法に基づいて 2021 年度から我が国で登録されているすべての農薬を対象に、15 年ごとに安全性などを再評価する制度が開始されているが、これまで甲状腺関連指標評価されていない農薬で脂質代謝関連マーカーに明確な影響が認められる農薬については、甲状腺関連指標の評価はもちろんのこと、さらに甲状腺機能低下が認められた場合には DNT の評価を行うべきかもしれない。この点も含めて血液生化学マーカーについては、今後 50 ppm 投与群の血液検体を解析し、用量依存性を確認することで明確な結論を導き出せるものと期待される。

5. 周産期の CPF 曝露による影響評価

本研究では、DNT 陽性対照候補物質である CPF 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 50 ppm は、5 mg/kg/day に相当する用量であるが、これは一般的に CPF が DNT を誘導するとされている用量である。また、血清中 ChE は CPF 投与群で有意な低下が認められたことから、殺虫剤としての作用点である ChE 阻害作用を、マウスに対して誘導する条件であることも確認された。一方で甲状腺関連指標に対する影響として甲状腺の病理組織学的解析を行ったが、特に影響は認められなかった。CPF

の甲状腺機能への影響については、DNT にフォーカスした研究ではないものの、マウスやラットに対して甲状腺機能に影響を与える可能性が報告されている [*Toxicology*, 220:189-202 (2006), *Toxicol Sci*, 108:311-319 (2009)]。これら先行研究では、CPF 投与経路が皮下注射だったり、投与期間が長期間であるなど投与プロトコルが異なる上に、T3、T4 の測定方法もラジオイムノアッセイなどの古典的な手法で測定を行っていることから、これらの違いが我々との結果の違いに繋がっている可能性が考えられた。

脳に対する影響の検討については、CPF 投与群の雌の児動物では脳の *In vivo* イメージングで特に影響は認められなかったが、雄では発達期の一部の時点においてレポーター活性に有意な低下が認められた。しかし、各種脳構成細胞マーカーを用いた免疫組織学的解析においては、CPF 投与による明確な影響は認められなかった。食品安全委員会の評価書においても本研究結果と同様に、5 mg/kg/day の投与条件において児動物脳の神経病理組織学的検査で異常は認められなかったと結論付けられており、CPF による DNT を組織学的解析により捉えることは難しい可能性が考えられる。

以上の結果から、CPF による DNT を Syn-Rep マウスで検出できる可能性は示唆されるものの、その影響は甲状腺機能低下に起因するものではなく、CPF は甲状腺機能低下に起因する DNT の陽性対照物質としては適さない可能性が示唆された。

E. 結論

マウス周産期甲状腺機能低下モデルを用いた母動物・児動物への影響評価により、閾値レベルの甲状腺機能低下状態においても行動異常を誘導し、児動物の脳発達に影響を及ぼす可能性が示された。このことから、甲状腺機能低下を誘導する化学物質のリスク管理では特に DNT の評価に注意が必要であることが示された。一方、周産期の甲状腺機能低下は、児動物の甲状腺や脳以外の臓器に対してはほとんど影響を与えない可能性が示唆された。また、Syn-Rep マウスのレポーター分子が、甲状腺機能低下による DNT を検出するための有用なバイオマーカーとなる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Hagiwara H, Hayata-Takano A, Miyakawa T, et al., Large-scale animal model study uncovers altered brain pH and lactate levels as a transdiagnostic endophenotype of neuropsychiatric disorders involving cognitive impairment, *elife*. 2024; 12: RP89376.
- [2] Ohnami S, Naito M, Kawase H, Higuchi M, Hasebe S, Takasu K, Kanemaru R, Azuma Y, Yokoyama R, Kochi T, Imado E, Tahara T, Kotake Y, Asano S, Oishi N, Takuma K, Hashimoto H, Ogawa K, Nakamura A, Yamakawa H, Ago Y, Brain region-specific neural activation by low-dose opioid promotes social behavior, *JCI Insight*. 2024; 9: e182060.

2. 学会発表

- 1) Mima S, Hayata-Takano A, Tomita S, Iwahashi M, Ishida K, Matsumaru D, Nakanishi T, Takuma K. Maternal

- hypothyroidism during the fetal and neonatal periods causes behavioral abnormalities in mouse offspring. 第 98 回日本薬理学会年会 (2025 年 3 月)
- 2) 石田慶土、松丸大輔、中西剛. 周産期甲状腺機能低下による甲状腺関連指標の変動と次世代影響の連関評価、第 8 回先天異常学会勉強会 (2024 年 11 月)
 - 3) 長平萌花、石田慶土、田中雅己、松丸大輔、中西剛. 母体免疫活性化に起因する神経発達影響評価に資する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 2024 (2024 年 10 月)
 - 4) 田中雅己、石田慶土、松丸大輔、中西剛. 神経分化レポーターマウスを用いたクロルピリフォスの発達神経毒性評価. 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 2024 (2024 年 10 月)
 - 5) 中西剛. 毒性学研究における *in vivo* イメージングの応用. *In vivo* イメージングフォーラム 2024 (2024 年 10 月)
 - 6) Nakanishi T, Ishida K, Tatsumi K, Matsumaru D, Nagase H, Kanda Y, Takuma K. Utilizing neuronal differentiation reporter mice for *in vivo* detection of developmental neurotoxicity. EUROTOX 2024 (2024 年 9 月)
 - 7) 石田慶土、目加田京子、松丸大輔、中西剛. 妊娠期 fluorene-9-bisphenol 曝露による母体甲状腺関連パラメータと胎仔発生への影響評価. フォーラム 2024 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (2024 年 9 月)
 - 8) 田中雅己、石田慶土、松丸大輔、中西剛. 神経分化レポーターマウスを用いた周産期クロルピリフォス曝露による脳発達への影響評価. フォーラム 2024 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (2024 年 9 月)
 - 9) 長平萌花、石田慶土、田中雅己、松丸大輔、中西剛. 母体免疫活性化による神経発達影響評価における神経分化トレーサーマウスの有用性検証. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月)
 - 10) 田中雅己、石田慶土、松丸大輔、中西剛. 神経分化レポーターマウスを用いたクロルピリフォスの発達神経毒性に関する検討. 第 64 回日本先天異常学会学術集会 (2024 年 7 月)
 - 11) Murata K, Hayata-Takano A, Kikuchi T, Iwahashi M, Mohri I, Tachibana M, Takuma K, Katayama T, Taniike M, Hashimoto H. Prenatal PGD2-DP1 signaling activation exhibits behavioral abnormalities associated with autism-like mental/behavioral disorders in mice. Neuro 2024 (2024 年 7 月)
 - 12) Ono A, Koan D, Asano S, Miyaoka T, Chen L, Nakagawa S, Hayata-Takano A, Nakazawa T, Harada A, Hashimoto H, Waschek J, Tanimoto K, Ago Y. Overexpression of vasoactive intestinal peptide receptor 2 in neurons causes abnormal dendritic morphology in the prefrontal cortex and cognitive impairment. CINP 2024 (2024 年 5 月)
 - 13) Iwahashi M, Yoshimura T, Harigai W, Takuma K, Hashimoto H, Katayama T, Hayata-Takano A. Treatment for attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) drug normalizes AIS length abnormality along with hyperactivity in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. CINP 2024 (2024 年 5 月)
 - 14) Iwahashi M, Yoshimura T, Harigai W, Takuma K, Hashimoto H, Katayama T, Hayata-Takano A. Involvement of axon initial segment (AIS) abnormality in attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD)-like behaviors of mice. Oral Neuroscience 2023 (2024 年 4 月)
- G.知的所有権の取得状況**
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

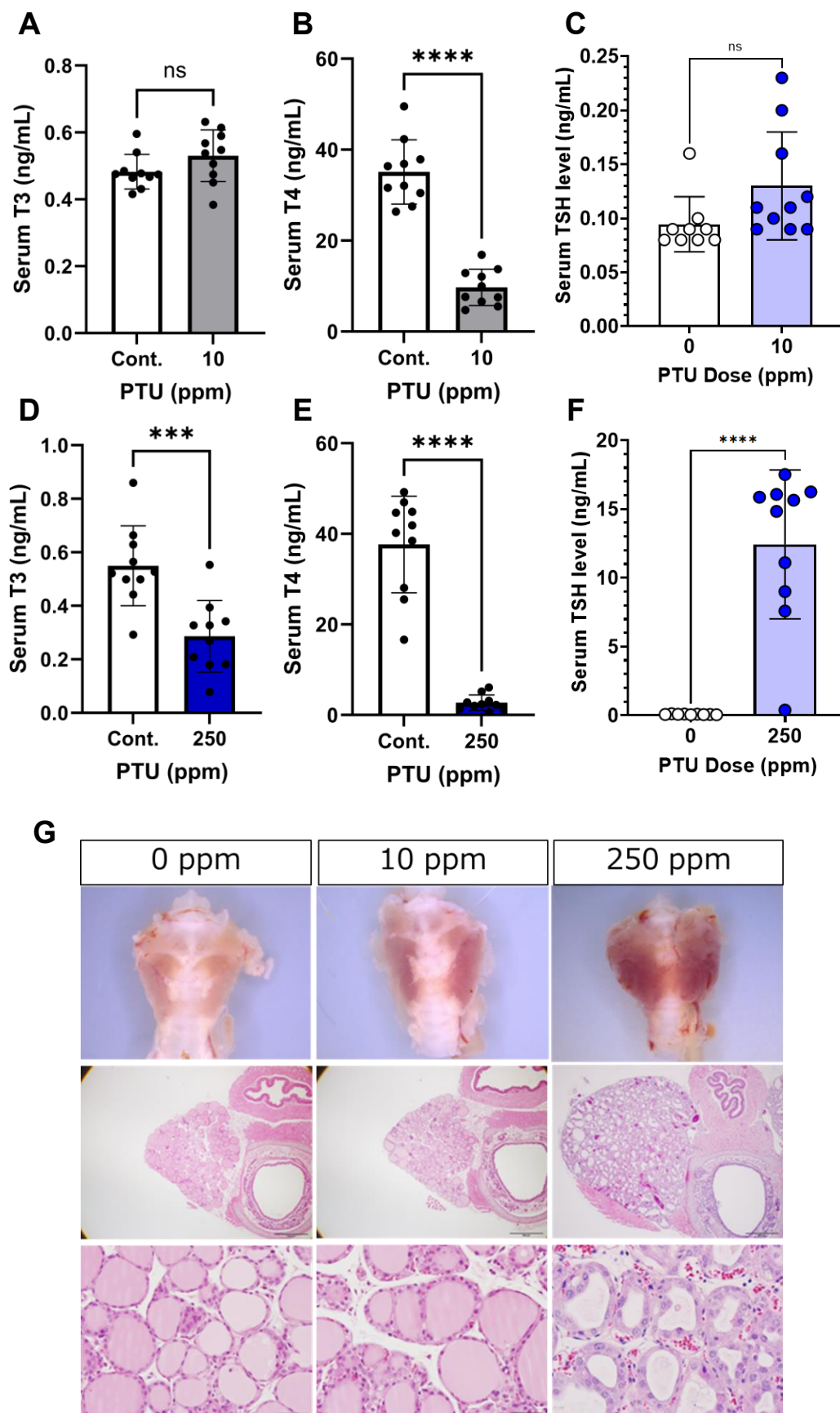


Figure 1. Effects of perinatal exposure to PTU on serum T3 (A, D), T4 (B, E) and TSH (C, F) levels and histology (G) in the thyroid of dams. * and ****: significantly different from the controls at $P < 0.001$ and 0.0001 , respectively. ns: not significant.**

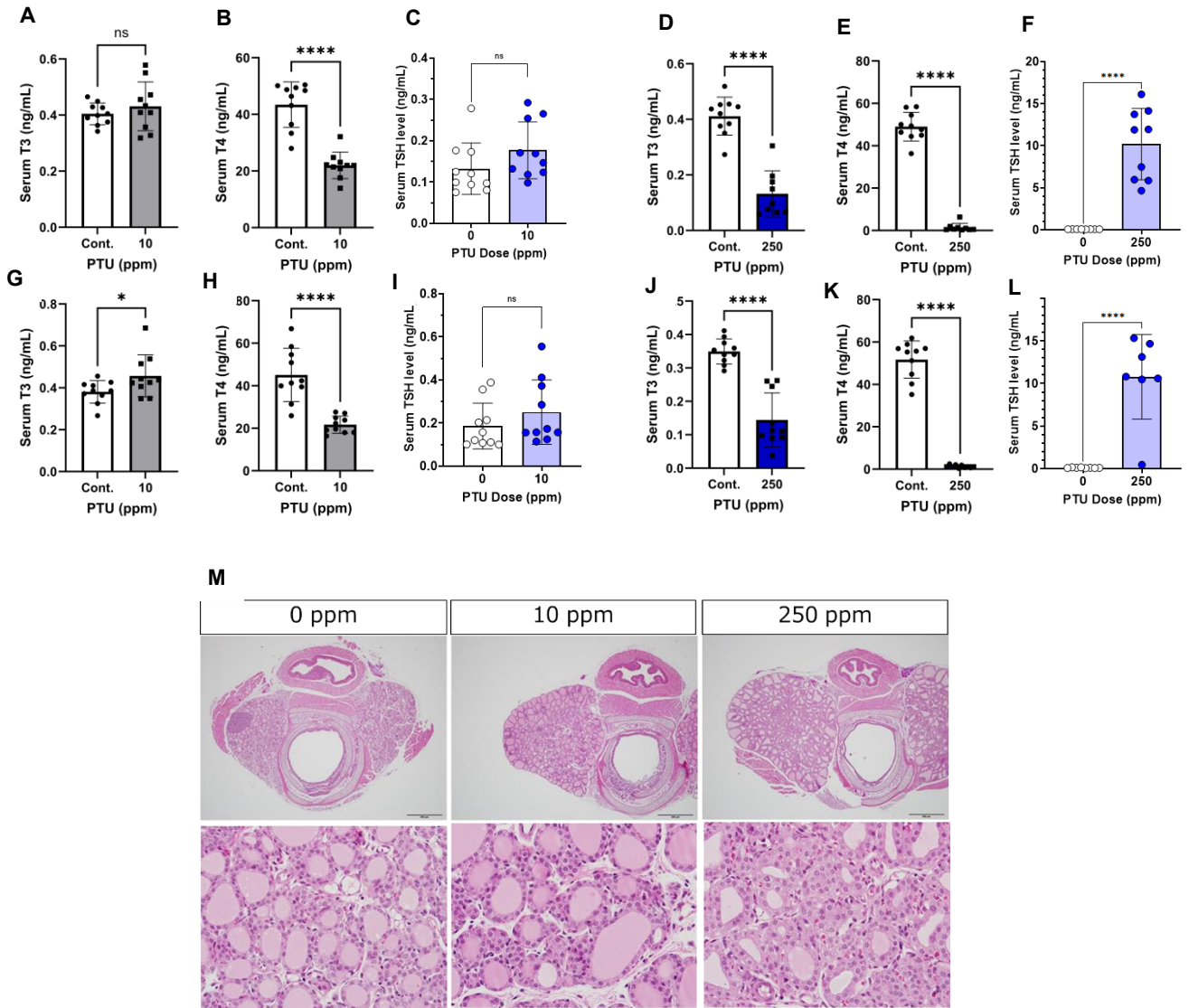


Figure 2. Effects of perinatal exposure to PTU on serum T3 (A, D, G, J), T4 (B, E, H, K) and TSH (C, E, I, L) levels and histology (M) in the thyroid of female (A-F) and male (G-L) pups. * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.0001 , respectively. ns: not significant.**

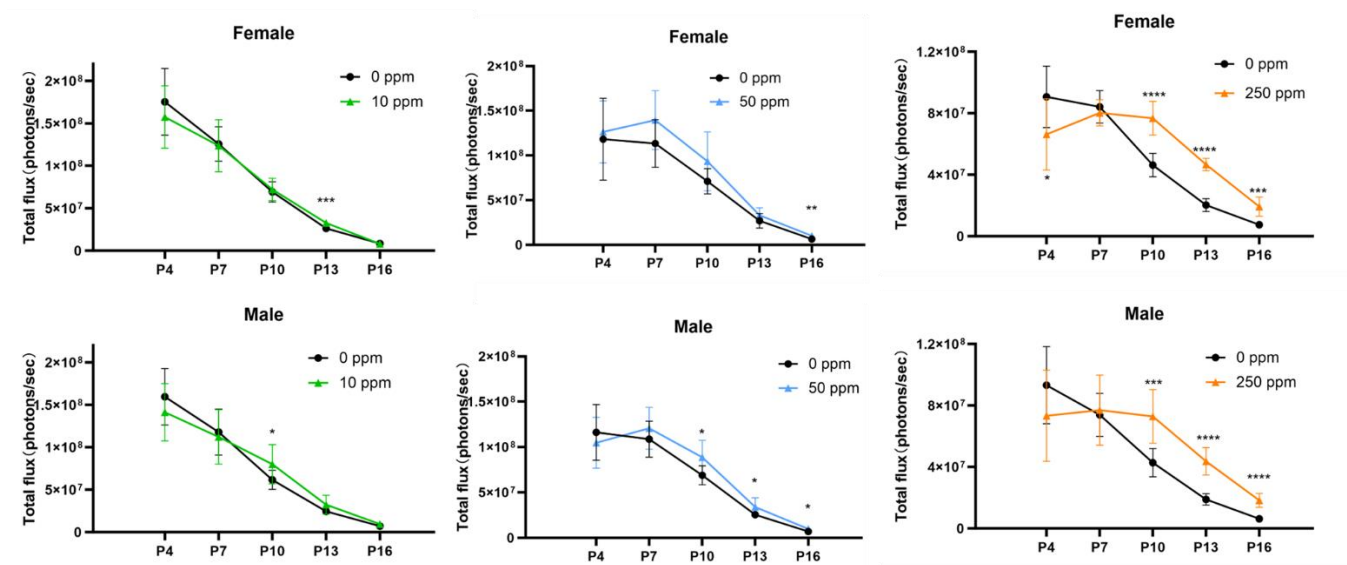


Figure 3. Effects of perinatal exposure to PTU on *in vivo* luminescence of the head area of Syn-Rep pups. *, **, *** and ****: significantly different from the controls at $P < 0.05$, 0.01, 0.001 and 0.0001, respectively.

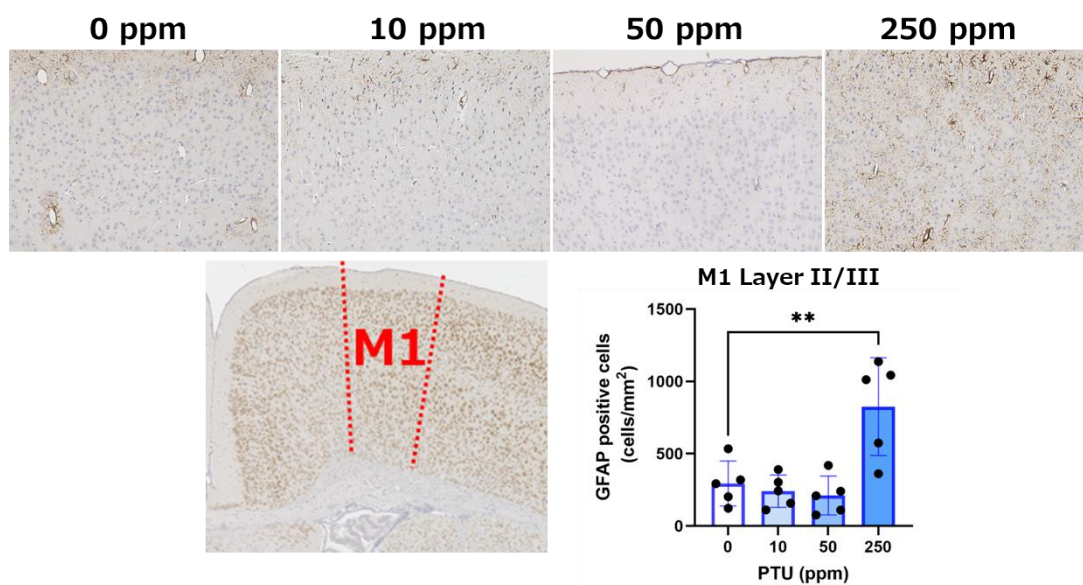


Figure 4. Immunohistochemistry for GFAP in the brain of PTU-treated pups. **: significantly different from the controls at $P < 0.01$.

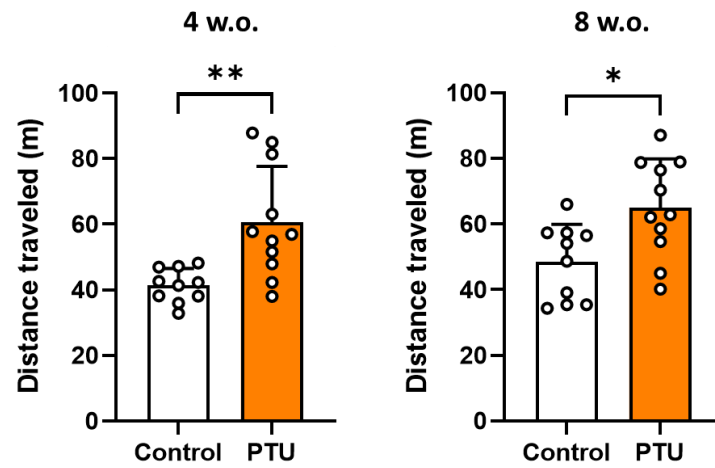


Figure 5. Effects of perinatal exposure to PTU on distance traveled in pups. * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

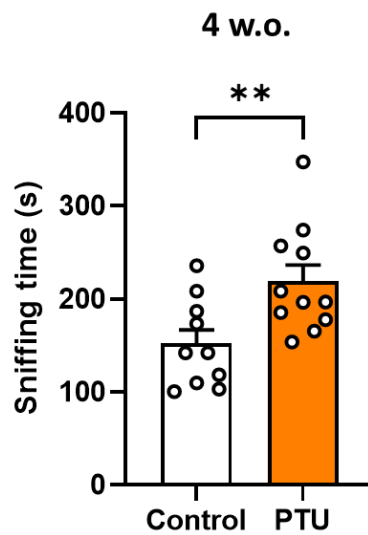


Figure 6. Effects of perinatal exposure to PTU on sniffing time in pups. **: significantly different from the controls at $P < 0.01$.

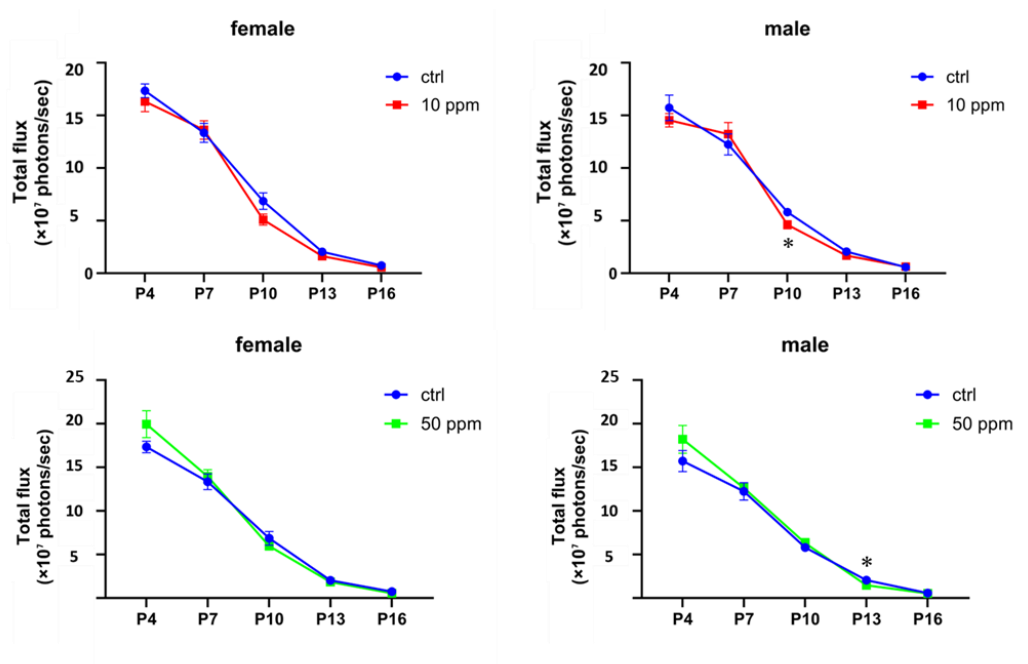


Figure 7. Effects of perinatal exposure to chlorpyrifos on *in vivo* luminescence of the head area of Syn-Rep pups.
*: significantly different from the controls at $P < 0.05$.

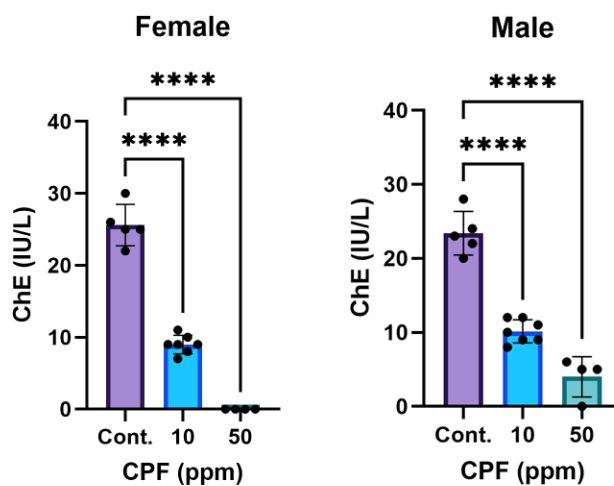


Figure 8. Effects of perinatal exposure to chlorpyrifos on serum cholinesterase (ChE) levels in pups. ****: significantly different from the controls at $P < 0.0001$.