

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：甲状腺ホルモン関連指標の変動を考慮したヒト細胞試験法の構築

研究分担者 諫田泰成（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部 部長）

研究要旨

大規模な疫学調査によって妊婦の甲状腺ホルモン低下と出生児の知能低下との間に明らかな相関性が認められたことに関して懸念が高まっており、様々な化合物の毒性を評価するOECDの試験法ガイドラインでも発生毒性試験やその他の試験で動物（発生毒性試験においては母動物）の甲状腺ホルモン及び甲状腺刺激ホルモンの定量的評価を追加する等の措置が取られた。

本分担研究では、ヒトiPS細胞に着目して甲状腺機能影響を評価可能なインビトロ評価法の確立を目指している。前年度はヒトiPS細胞を用いて作製した甲状腺機能低下モデルを用いて次世代シーケンス（NGS）解析を行い、甲状腺ホルモン受容体THRαシグナルの下流にあり、神経（外胚葉）分化に関与する遺伝子を明らかにした。

本年度は、まず*in vivo*の神経毒性と甲状腺機能との相関を明らかにするために、発達神経毒性の陽性対照物質である農薬クロルピリホスをげっ歯類に投与した実験に関する文献調査を行った。その結果、クロルピリホスをげっ歯類に曝露（妊娠期を含む）した結果、血中の甲状腺ホルモン量が低下する報告が多いことが分かった。従って、クロルピリホスの神経毒性に甲状腺ホルモンが関与している可能性が示唆された。

次に、昨年度から引き続きNGS解析によるメカニズム解析を行い、THRαを介して神経機能に関わる遺伝子の探索を行った。その結果、神経分化に関与する転写因子、薬剤排出トランスポーター、神経ペプチド・ホルモン受容体などのカテゴリーに分類される遺伝子を明らかにした。

今後、中西グループのレポーターマウスのNGSデータなどと比較することにより、有用な指標を探索する予定である。

A. 研究目的

欧米諸国では、大規模な疫学調査によって妊婦の甲状腺ホルモン低下と出生児の知能低下との間に明らかな相関性が認められたことに関して懸念が高まっており（Gilbert et al., *Neurotoxicology*, 2012）、様々な化合物の毒性を評価するOECDの試験法ガイドラインでも発生毒性試験やその他の試験で動物（発生毒性試験においては母動物）の甲状腺ホルモン及び甲状腺刺激ホルモンの定量的評価を追加する等の措置が取られた。

また甲状腺に対する何らかの影響が観察された化合物について、発達神経毒性（DNT）試験実施の必要性を判断するために、Comparative Thyroid Assay（CTA）という新たな*in vivo*試験法が提案され、試験実施のtriggerやこれらの試験で得られるデータの解釈について、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。

こうした背景のもと、*in vitro*で甲状腺機能低下の影響を評価できるアッセイ系があれば、メカニズムベースに機能解析が進むことが期待される。OECDの専門家会議では、中枢神経系のモデルの安定供給に問題が

生じたため、バリデーション試験を pending している。

我々はこれまでに発生過程を*in vitro*で模倣できるヒトiPS細胞を用いて甲状腺ホルモン受容体THRαのノックダウンを行い、甲状腺機能低下のモデル細胞を作製した。また中西グループのレポーターマウスの*in vivo*データの結果から発達神経毒性に焦点をあてて、THRαが農薬クロルピリホスなどの発達神経毒性に関与すること、THRαの下流因子の探索などを行った。

本年度は、まず*in vitro*の実験で得た結果を動物実験データと比較するために、OECD TG426が発出後の文献を調査し、クロルピリホスを投与したげっ歯類の甲状腺ホルモン量に関する論文の収集を行った。

次に、THRαをノックダウンしたヒトiPS細胞を用いて次世代シーケンス（NGS）解析のパスウェイ解析を行い、THRαの下流で発達神経毒性に関連する生物学的なカテゴリーを調べて、遺伝子の探索を行った。

B. 研究方法

1. 細胞

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。

2. 外胚葉分化

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。

3. shRNA によるノックダウン

shRNA 導入はレンチウイルス (SIGMA) を用いた。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い、分化実験などに使用した。

4. NGS 解析

THR α ノックダウンした細胞 (外胚葉) より RNA 抽出を行い、Novogene 社に委託して NGS データを取得した。また、scramble control に対して THR α ノックダウンした細胞 (外胚葉) で発現が低下する遺伝子の探索を行った。

C. 研究結果

1. クロルピリホスを投与したげっ歯類における甲状腺ホルモン量への影響

既存情報は、OECD TG426 が発出された 2006 年以降の文献に対して行い、Pubmed でキーワード rat, mouse, chlorpyrifos, thyroid によりヒットした文献から、甲状腺ホルモンの定量を行った計 13 報を選定した (図 1, 2)。なお選出した 13 報に、TG426 への準拠が記載された文献は存在しなかった。

胎生期から生後にかけて投与した文献 (図 1) では、Jeong (2006) らはラットに 1, 10, 100 mg/kg で経口投与し、蛍光免疫法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。De Angelis (2009) らはマウスに 1, 3 mg/kg で皮下投与し、放射免疫測定法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。Peluso (2023) らはマウスに 0.1, 1, 10 mg/kg で経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。Colella (2023) らはマウスに 1, 10 mg/kg で経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。また Nittoli (2021) らはマウスに 0.1, 1, 10 mg/kg で経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。胎生期にのみ投与したケースでは、Haviland (2010) らがマウスに 1, 5 mg/kg で 4 日間経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンが増加することを報告した。

成体に投与したケース (図 2) では、Mosbah (2016) ら

がラットに 20 mg/kg で 4 週間経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。Chebab (2017) らはラットに 6.75 mg/kg で 30 日間経口投与し、化学発光法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。Farkhondeh (2025) らはラットに 30 mg/kg で 15 日間投与後、血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。Porreca (2016) らはマウスに 0.1, 1, 10 mg/kg で 7 日間経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。

一方、Otênio (2022) らはラットに 0.01, 0.1, 1, 10 mg/kg で 5 日間経口投与し、血清中の甲状腺ホルモンが増加することを報告した。Cobilinschi (2021) らもラットに 100 mg/kg で 4 時間経口胃管投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンが増加することを報告した。また Levin (2014) らはラットに 1 mg/kg で 4 日間経口投与し、ID-LC/MS/MS 法にて血清中の甲状腺ホルモン量を測定した結果、変化が認められなかった。

以上の文献調査により、クロルピリホスを胎生期から生後にかけて長期投与した場合、血清中の甲状腺ホルモン量が減少することが示唆された。一方、短期間の投与では血清中の甲状腺ホルモン量が増加あるいは変化しないことを報告する文献も存在した。

2. THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の NGS 解析

THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞を神経 (外胚葉) 分化誘導したところ、negative control の scramble shRNA を導入した細胞と比べて神経分化マーカーである PAX6 の発現が減少することを見出していることから、THR α は神経 (外胚葉) 分化に関与すると考えられる。

そこで本年度は、NGS 解析により、THR α 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。NGS データとパスウェイ解析により THR α ノックダウンで発現が低下する遺伝子を探索した結果、Factor A, B などの薬剤排出トランスポーターが選定され (図 3)、THR α ノックダウン細胞の薬剤応答性への関与が考えられる。また Factor C~F などの神経ペプチド・ホルモン受容体も選定され、THR α ノックダウンによる神経内分泌機能に対する負の影響が想定される (図 4)。さらに神経分化に関わる転写因子として、以前報告した HES5 以外に Factor G~O などを選定した (図 5)。

D. 考察

本研究ではまず文献調査を行い、胎生期から生後のげっ歯類への長期クロルピリホス投与では、血清中の甲状腺ホルモン量が減少する報告が多いことを見出した。一方、胎生期あるいは数日間以内の短期曝露では

血清中の甲状腺ホルモン量が変化しないか増加する報告も存在することから、曝露の実験デザインの重要性が示唆された。

こうした文献情報は、発達期におけるクロルピリホス長期曝露が甲状腺ホルモンの低下をもたらすことを示唆し、欧米の大規模疫学調査によって妊婦の甲状腺ホルモン低下と出生児の知能低下との間に明らかな相関性が認められる報告をサポートするものである (Gilbert et al., *Neurotoxicology*, 2012)。一方、クロルピリホスの短期曝露では ROS 産生・酸化ストレス誘発による炎症応答が生じることが知られており (Weis et al., *Chemosphere*, 2021)、甲状腺ホルモン増加が報告されたケースでは一過性の応答が引き起こされた可能性が考えられる。以上の文献調査により、甲状腺ホルモンは発達期の神経毒性に関与する可能性が高いことが示唆され、他の化学物質に関しても情報を収集して検証をする必要がある。

甲状腺ホルモン受容体 THR には α と β の 2 種類のアイソフォームが存在する。ノックアウトマウスを用いた研究により、THR α は神経発生に関係するが、THR β 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、分化誘導に伴い THR α の発現が選択的に亢進したことから、今回は THR α を優先的に評価した。しかしながら、THR α と β の生理的な機能については明らかにされておらず、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より重要であるのかは慎重に検討する必要がある。さらに神経分化時に THR α の下流で働く可能性のある因子を探索した結果、薬剤排出トランスポーター、神経ペプチド・ホルモン受容体、転写因子などに属する遺伝子をいくつか選定した。これまでの研究により THR α ノックダウン細胞は薬剤感受性が少し高いことから薬剤排出トランスポーター発現との関連については興味深い。また転写因子については、既に THR α の下流で作用する因子を報告済みであるが、他の選定因子と相関する可能性も考えられる。神経ペプチド・ホルモン受容体については甲状腺ホルモンシグナルとのクロストークという点で興味深い。以上の観点をもとに、選定した因子と甲状腺機能低下の関連についてさらに検討を進める必要がある。

今後は、神経毒性が懸念されている他の化学物質を用いて曝露影響の解析を行うこと、中西グループのレポーターマウスの NGS データなどと NGS データを比較することなどにより、本評価系の有用性を明らかに

する予定である。

E. 結論

甲状腺ホルモン受容体 α をノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経分化を指標にして、甲状腺機能低下時における化学物質の発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。本モデルは甲状腺機能低下時の化学物質影響に有用であることが考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 諫田泰成、川岸裕幸、安彦行人. ヒト iPS 細胞由来分化細胞を用いた *in vitro* 薬理評価系の開発と標準化. 第 96 回日本組織培養学会大会 (2024 年 6 月)
2. 諫田泰成. ヒト細胞を活用した代替法の国際動向. 第 10 回細胞凝集研究会 (2024 年 7 月)
3. 諫田泰成、西田基宏、魏范研. 副作用メカニズムに基づく個人差予測. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月)
4. 安彦行人、諫田泰成. ヒト iPS 細胞由来神経細胞によるピレスロイド系農薬の神経毒性評価. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月)
5. S. Yoshida, T. K. S. Tiong, Y. Nomura, Y. Kanda. Glyphosate exposure in utero induced social behavior alteration and neuronal cell death, which could be rescued with postnatal butyrate administration. EuroTox 2024 (2024 年 9 月)
6. T. Nakanishi, K. Ishida, K. Tatsumi, D. Matsumaru, H. Nagase, Y. Kanda, K. Takuma. Utilizing neuronal differentiation reporter mice for *in vivo* detection of developmental neurotoxicity. EuroTox 2024 (2024 年 9 月)
7. 諫田泰成. NAMs による食品安全性評価の現状と今後の展望. 日本動物実験代替法学会 (2024 年 12 月)
8. 山田茂、安彦行人、中西剛、諫田泰成. 発達期の神経毒性における甲状腺ホルモン受容体の解析. 第 98 回日本薬理学会年会 (2025 年 3 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

No.	動物種 (系統)	世代	投与期間 (方法)	用量 (mg/kg 体重/日)	定量方法	変動	文献
1	ラット (SD)	F0	交配前 2 週 ～出産後 6 週 (強制経口)	1, 10, 100	蛍光免疫 測定法	雌：変化なし、 雄：減少 (100mg/kg 体重/日)	Jeong et al. Toxicology. 2006;220:189- 202
		F1	P21 から 13 週 (強制経口)	1, 10, 100	蛍光免疫 測定法	雌：減少 (100mg/kg 体重/日)、 雄：減少(全用量)	
2	マウス (CD1)	F0	E15～E18 (強制経口)	3, 6	放射標識 免疫測定 法	減少(6mg/kg 体重/日)	De Angelis et al. Toxicol Sci. 2009;108:311- 319
		F1	P11～P14 (皮下)	1, 3	放射標識 免疫測定 法	雌：変化なし、 雄：減少 (3mg/kg 体重/日)	
3	マウス (SW)	F1	GD17～GD20 (母動物皮下)	1, 5	ELISA 法	増加 (雌 5mg/kg 体重/日)	Haviland et al. Reprod Toxicol. 2010;29(1):74-79
4	マウス (CD1)	F0	GD0～離乳 (強制経口)	0.1, 1, 10	—	—	Nittoli et al. Cells. 2021;10(9):2187
		F1	離乳～ 生後 180 日 (強制経口)	0.1, 1, 10	ELISA 法	減少 (10mg/kg 体重/日)	
5	マウス (CD1)	F0	E0.5～離乳 (強制経口)	1, 10	—	—	Colella et al. Int J Mol Sci. 2023;24(3):3054
		F1	離乳～P21 (強制経口)	1, 10	ELISA 法	減少 (10mg/kg 体重/日)	
6	マウス (CD1)	F0	GD0～離乳 (強制経口)	0.1, 1, 10	—	—	Peluso et al. Int J Mol Sci. 2023;24:9582
		F1	離乳～生涯 (強制経口)	0.1, 1, 10	ELISA 法	変化なし	
		F2	離乳～生涯 (強制経口)	0.1, 1, 10	ELISA 法	減少 (雄 1, 10mg/kg 体重/日)	

E: embryonic day GD: gestational day P: postnatal day

図 1 げっ歯類の胎生期から生後にかけてクロルピリホスを投与した文献の調査

投与後のげっ歯類の血清中の甲状腺ホルモン量は減少する傾向が見られた。

No.	動物種 (系統)	投与期間 (方法)	用量 (mg/kg 体重/日)	定量方法	変動	文献
1	ラット (SD)	4 日 (強制経口)	1	LC/MS/MS	変化なし	Levin et al. Neurotoxicol Teratol. 2014;41:35-42
2	ラット (Wister)	4 週 (強制経口)	20	ELISA 法	減少	Mosbah et al. Toxicol Ind Health. 2016;32(7):1266-77
3	マウス (CD1)	7 日 (強制経口)	0.1, 1, 10	ELISA 法	減少 (1, 10mg/kg 体重/日)	Porreca et al. Sci Rep. 2016;6:38131
4	ラット (Wister)	30 日 (強制経口)	6.75	化学発光免疫測定法	減少	Chebhab et al. Biomed Pharmacother. 2017;96:1310-1316
5	ラット (Wister)	4 時間 (経口胃管)	100	ELISA 法	増加	Cobilinschi et al. Acta Endocrinol (Buchar). 2021;17(2):177-185
6	ラット (Wister)	5 日 (強制経口)	0.01, 0.1, 1, 10	電気化学発光法	増加 (全用量)	Otenio et al. Drug Chem Toxicol. 2022;45(1):387-392
7	ラット (Wister)	15 日 (強制経口)	30	ELISA 法	減少	Farkhondeh et al. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.2025

図2 げっ歯類の成体にクロルピリホスを投与した文献の調査

投与後のげっ歯類の血清中の甲状腺ホルモン量は減少・増加・変化なしのケースがあった。

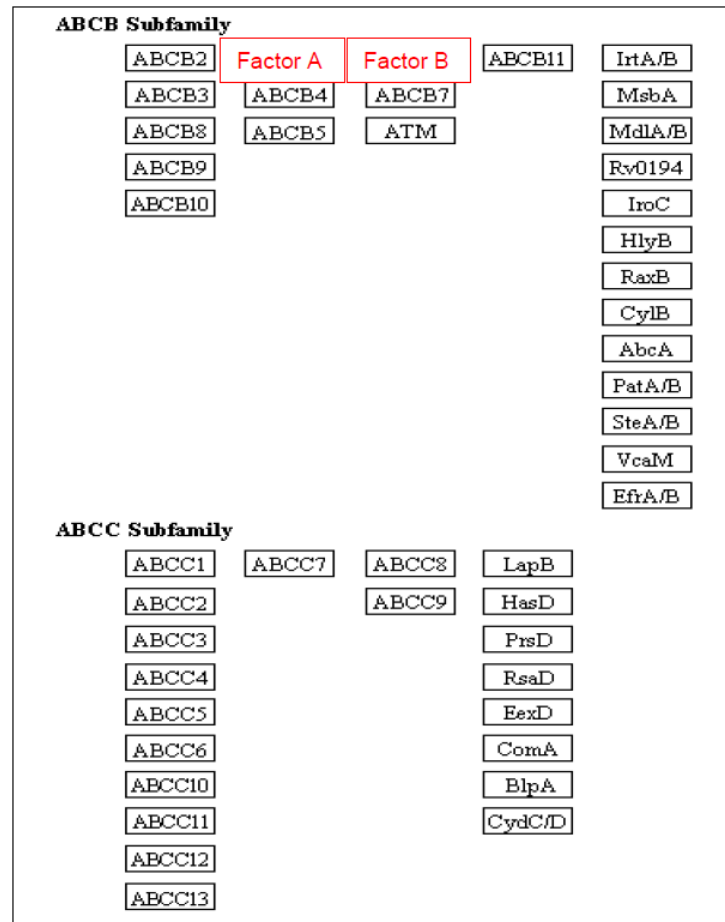


図3 THR α ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS 解析）

薬剤排出トランスポーターFactor A, B を選定した。

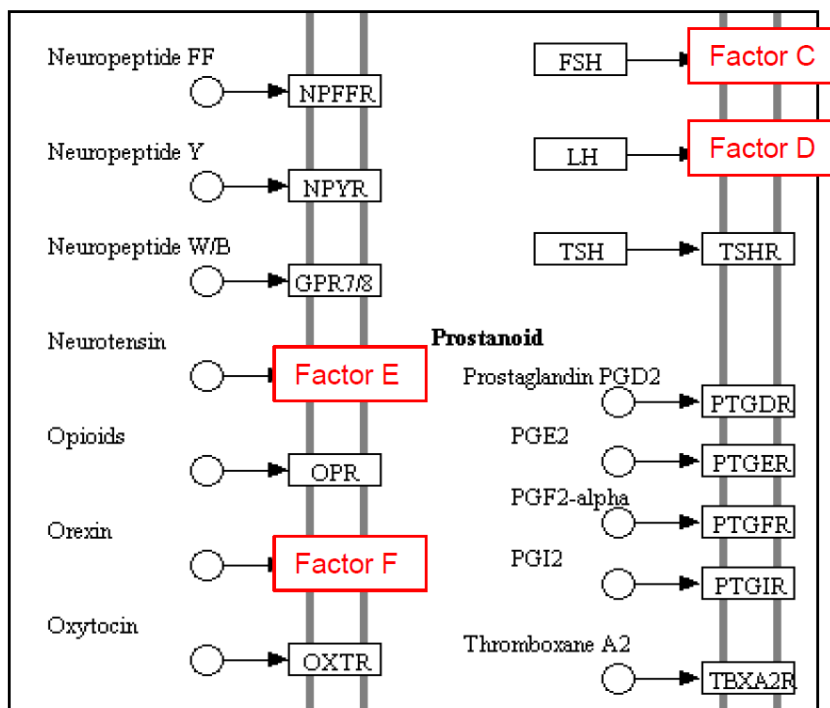


図4 THR α ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS 解析）

神経ペプチド・ホルモン受容体 Factor C~F を選定した。

Transcription factors		
HSF4	GTF2IP14	AC092810.1
SIM2	CICP14	AC090616.1
BATF3	TCEA1P4	Factor O
GFI1	TCEAL6	SCX
TAL1	SPDEF	AP001893.2
EYA4	TFAP2B	RIPPLY2
Factor G	Factor K	ASXL3
Factor H	Factor L	BATF2
Factor I	AC027644.1	
NOC2LP1	YY2	
Factor J	Factor M	
TCEA3	Factor N	

図5 THR α 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）

転写因子である Factor G~O を選定した。