

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 7 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。

昨年度は、*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研究の文献調査を行った。またTHRαをノックダウンしたiPS細胞のNGS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。

本年度は、発達神経毒性の陽性対照物質として抗てんかん薬バルプロ酸に着目し、臨床情報に関する文献調査を行い、バルプロ酸の投与により血中の甲状腺ホルモン量の減少が報告されていることを明らかにした。またラットに投与した研究についても同様に調査研究を進め、血中の甲状腺ホルモン量の減少が報告されていることを確認した。従って、バルプロ酸の神経毒性と甲状腺ホルモンが相関していることが示唆された。次に、そのメカニズム研究として、昨年度から引き続きNGS解析による解析を行った。THRαを介して神経機能に関わる遺伝子の探索を行った結果、神経分化・成熟に関与する遺伝子、神経細胞の移動や軸索誘導に関与する遺伝子などを明らかにした。

今後、発達神経毒性の陰性対照物質を用いて、本研究で明らかにされたTHRαを介した発達神経毒性のメカニズムを検証する予定である。

### 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やバルプロ酸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。

昨年度は*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。また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

毒性に関連する遺伝子の探索も行った。

本年度は、ヒトにおける発達神経毒性の陽性対照物質である抗てんかん薬バルプロ酸に焦点を当て、臨床情報およびラットに投与した毒性試験に関する文献調査を行った。また、引き続きNGS解析のパスウェイ解析を行い、THR $\alpha$ を介して発達神経毒性に関わる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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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. バルプロ酸投与したヒト及びラットにおける甲状腺ホルモン量への影響**

ヒトにおける既存情報は、OECD TG426 が発出された 2006 年以降の文献に対して行い、Google などでキーワード valproic acid, human, T3, T4, thyroid などの組み合わせ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 2 報を選定した (図 1)。ヒトに投与した影響を調べた文献 (図 1) では、Alhyan (2023)らはヒトに 10~20

mg/kg で 6 ヶ月間経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンの T3 は増加し、T4 は減少することを報告した。T4 は T3 の前駆体であり大半を占める安定供給型の甲状腺ホルモンとして知られている。一方、T3 は活性は高いが不安定でありごく微量にしか存在しない。従って本結果は総じて甲状腺ホルモンの減少を示唆する。Güngör (2024)らはヒトに 10~40 mg/kg で 12 ヶ月間経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモン (T4) が変化しないことを報告した。いずれの論文も Cmax を記載していなかった。

次に、同様のアプローチで、ラットの文献についても 2 報を選定した (図 2)。しかし、TG426 への準拠はいずれも記載されていなかった。El-Bermawy (2015)らはラットに 200 mg/kg で 5 週間胃管投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモン (T3, T4) が減少することを報告した。Mahmoud (2020)らはラットに 200 mg/kg で 8 週間経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモン (T3, T4) が減少することを報告した (いずれも Cmax の記載無し)。

以上の文献調査により、バルプロ酸をヒト及びラットに投与した場合、血清中の甲状腺ホルモン量が減少する報告が多いことが示唆された。

### **2. THR $\alpha$ ノックダウンしたヒト iPS 細胞の 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 $\alpha$ 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 解析を行い、THR $\alpha$ の下流で神経 (外胚葉) 分化に関わる遺伝子の網羅的検討を試みた。

NGS データとパスウェイ解析により THR $\alpha$ ノックダウンで発現が低下する遺伝子を探索した結果、NRG2, NRG4 などの神経の分化や発達に関与する因子が選定された (図 3)。また Slit2, PAK などの神経細胞の移動や軸索誘導に関与する因子も選定された (図 4)。さらに SNAP25, Complexin などのシナプスに局在して神経分化や成熟に関与する因子も選定された (図 5)。

## **D. 考察**

本研究ではまず文献調査を行い、ヒト及びラットへのバルプロ酸投与では、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確認した。こうした文献情報は、発達期におけるバルプロ酸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)。また、双極 I 型障害の 44 歳女性において、バルプロ酸投与後に中枢性甲状腺機能低下症を発症した症例が報告された (Kanamori et al., *Ann. Gen. Psychiatry*, 19:49, 2020)。患者はバルプロ酸の投薬開始後に躁症状は改善した一方、約 1 か月後から強い疲労感を訴えた。血液検査では free T4 および free T3 の低下が認められたが、TSH は正常範囲内であり、中枢性甲状腺機能低下症が疑われた。また、バルプロ酸の中止後には疲労症状および甲状腺ホルモン値はいずれも改善したことから、バルプロ酸誘発性の甲状腺機能低下症と考えられた。以上の先行研究から、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、バルプロ酸は *golden standard* になると考えられる。

甲状腺ホルモン受容体 THR には  $\alpha$  と  $\beta$  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  $\alpha$  は神経発生に関係するが、THR  $\beta$  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、分化誘導に伴い THR  $\alpha$  の発現が選択的に亢進したことから、今回は THR  $\alpha$  を優先的に評価した。しかしながら、THR  $\alpha$  と  $\beta$  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 THR  $\alpha$  ノックダウンしたヒト iPS 細胞の NGS 解析により、神経分化時に THR  $\alpha$  の下流で働く可能性のある因子を探索した結果、神経分化・発達に関与する遺伝子や神経細胞の移動や成熟・軸索誘導に関与する遺伝子などいくつか選定した。NRG2, NRG4 はシナプス形成・可塑性に重要である ErbB 受容体のリガンドとしても知られており、本解析で同定した軸索誘導因子

Slit2, PAK やシナプス成熟因子 SNAP25, Complexin といった因子とクロストークしている可能性も考えられる。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アスピリンなどの発達神経毒性の陰性対照化合物を用いてさらなる検証を行う必要がある。

バルプロ酸の神経毒性メカニズムに関しては、最近、ヒト胎盤を用いた *ex vivo* 胎盤灌流系や胎盤絨毛培養研究において、バルプロ酸は葉酸輸送体や甲状腺ホルモン輸送体などの発現を変化させ、胎盤機能に影響を及ぼす可能性が報告されている (*Birth Defects Res.*, 2025 Apr 11;117(4):e2471.)。これらの知見から、バルプロ酸の発達毒性には、胎児への直接作用に加え、ヒト胎盤における栄養・ホルモン輸送異常が関与する可能性が示唆されている。さらに、動物を用いた研究では、従来から知られる HDAC 阻害を介したエピジェネティック異常に加え、CYP450 関連代謝異常、神経炎症、腸脳相関を介した神経伝達異常が複合的に関与することが報告された (*Food Chem. Toxicol.*, 2026 Feb;208:115882.)。妊娠期 VPA 曝露ラットでは、社会性低下などの ASD 様行動異常や脳組織変化に加え、ステロイド代謝やアラキドン酸代謝の異常も認められており、VPA 誘発神経発達毒性には多層的な分子ネットワーク異常が関与する可能性が示されている。一方で、バルプロ酸が血液脳関門の機能や甲状腺ホルモン輸送に及ぼす影響については依然として不明な点が多く、ヒト iPSC 由来 BBB モデルなどを用いた詳細な検討が必要と考えられる。

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、甲状腺ホルモンの解析を行うこと、中西グループのレポーターマウスの NGS データなどと比較することなどにより、有用なバイオマーカーなどを検討し、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  $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPSC 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評価に有用であるこ

とが考えられる。

## **F. 研究発表**

### **1. 論文発表**

1. Celardo I, Aschner M, Ashton RS, Carstens KE, Cediell-Ulloa A, Cöllen E, Crofton KM, Debad SJ, Dreser N, Fitzpatrick S, Fritsche E, Gutsfeld S, Hardy B, Hartung T, Hessel E, Heusinkveld H, Hogberg HT, Hsieh JH, Kanda Y, Knight GT, Knudsen T, Koch K, Kuchovska E, Mangas I, Marty MS, Melching-Kollmuss S, Müller I, Müller P, Myhre O, Paparella M, Pitzer E, Bal-Price A, Sachana M, Schlüppmann K, Shafer TJ, Schäfer J, Smirnova L, Tal T, Tanaskov Y, Tangianu S, Testa G, Ückert AK, Whelan M, Leist M. Developmental neurotoxicity (DNT): A call for implementation of new approach methodologies for regulatory purposes: Summary of the 5th International Conference on DNT Testing. ALTEX. 2025;42:323-349.
2. OECD (2025), Workshop Proceedings on Critical Innovations in pesticides safety testing and chemical risk assessment for developmental neurotoxicity (DNT), OECD Series on Testing and Assessment,

No 412, OECD Environment, Health and Safety, Paris,

[https://one.oecd.org/official-document/ENV/CBC/MONO\(2025\)10/en](https://one.oecd.org/official-document/ENV/CBC/MONO(2025)10/en)

(2025年9月30日、分担執筆)

### **2. 学会発表**

- 1) Yamada S, Yasuhiko Y, Kanda Y. Involvement of thyroid hormone receptor  $\alpha$  in developmental neurotoxicity. フォーラム 2025 衛生薬学・環境トキシコロジー (2025年9月)
- 2) Kanda Y. Current Status and Challenges of NAMs for Chemical Safety Assessment in Japan. 第7回ラテンアメリカ MAPEF (規制目的の農薬毒性試験における動物実験代替法)ワークショップ (2025年11月)
- 3) 諫田泰成. 甲状腺ホルモンと発達神経毒性. 日本動物実験代替法学会第38回大会 (2025年11月)
- 4) 諫田泰成. 発達神経毒性ガイドンスの現状と課題. 第11回ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会 (2025年11月)
- 5) 山田茂, 諫田泰成. 発達期神経毒性における甲状腺ホルモン受容体  $\alpha$  の役割, 第99回日本薬理学会年会, 仙台 (2026年3月)

## **G. 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし

No.	投与期間 (方法)	用量 (mg/kg 体重 /日)	定量方法	変動	文献
1	6 ヶ月 (経口)	10~20	ELISA	T3: 増加 T4: 減少	Alhyan et al. Cureus. 2023;15:e39712
2	12 ヶ月 (経口)	10~40	ELISA	T4: 変化なし	Güngör et al. Rev Assoc Med Bras. 2024;70:e20241177

**図1** ヒトにバルプロ酸を投与した文献の調査

投与後のヒト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 (Albino)	5 週 (胃管)	200	ELISA	T3: 減少 T4: 減少	El-Bermawy M. The Egyptian J. Histol. 2015;38:10- 20.
2	ラット (Albino)	8 週 (経口)	200	ELISA	T3: 減少 T4: 減少	Mahmoud. Indones. Biomed. J. 2020;12:304-312

**図2** ラットにバルプロ酸を投与した文献の調査

投与後のラット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。

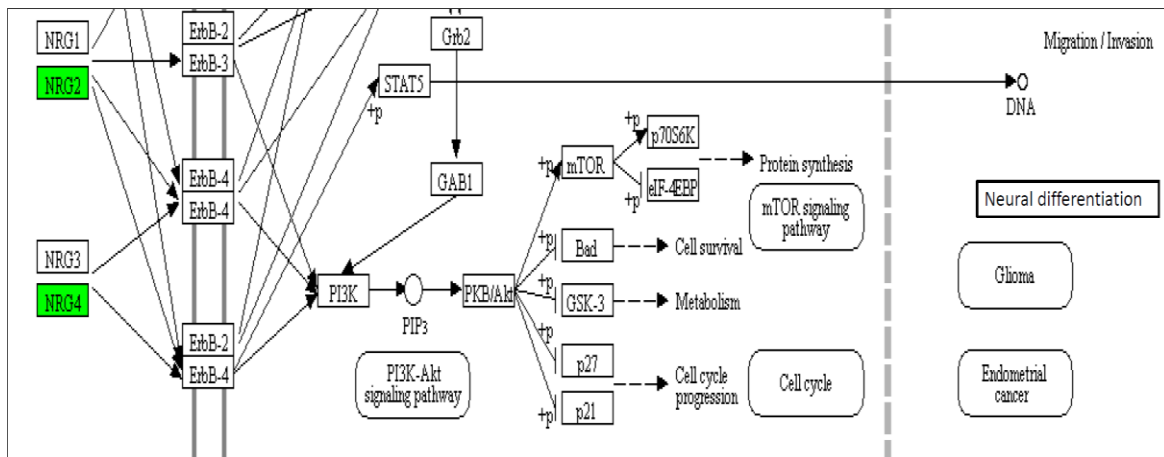


図3 THR $\alpha$ ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS 解析）

神経分化に関与する NRG2, 4 がスクリーニングされた。

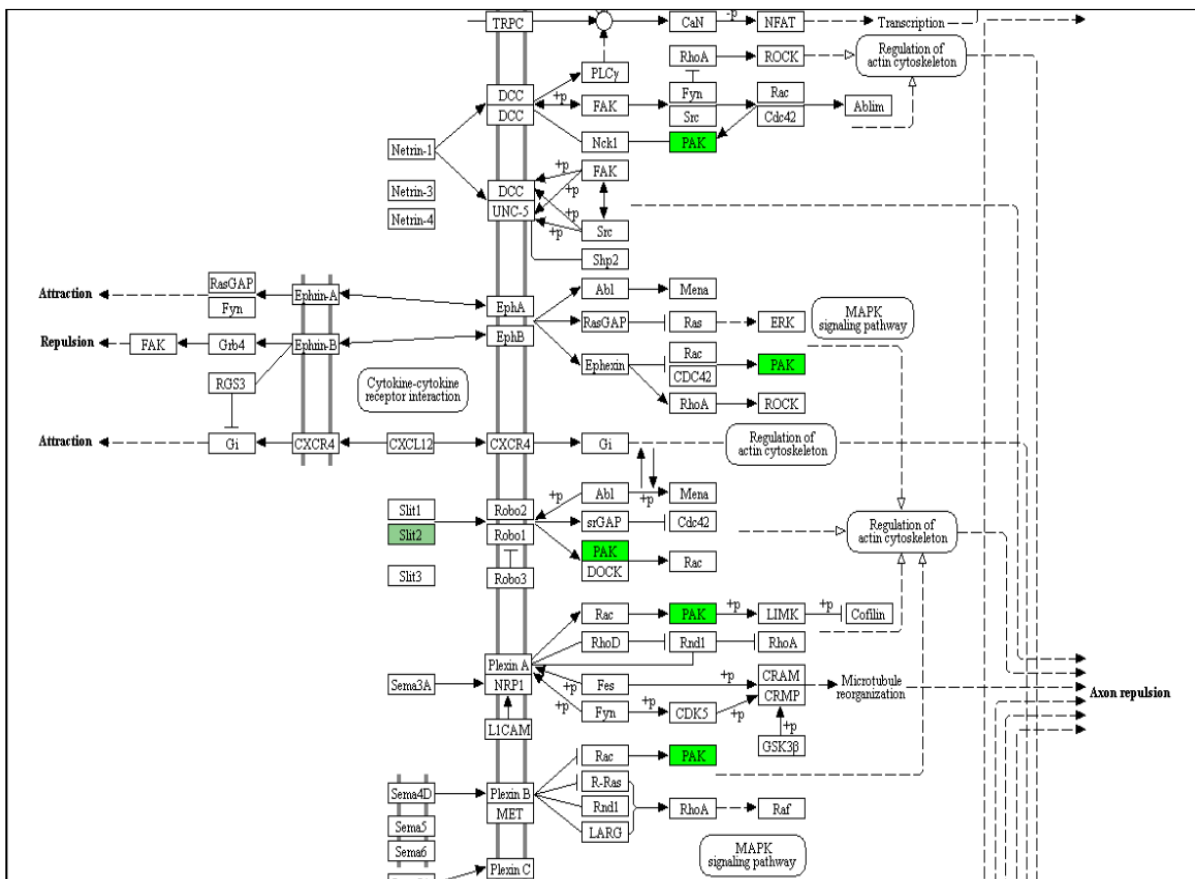


図4 THR $\alpha$ ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS 解析）

神経細胞の移動や軸索誘導に関与する Slit2, PAK がスクリーニングされた。

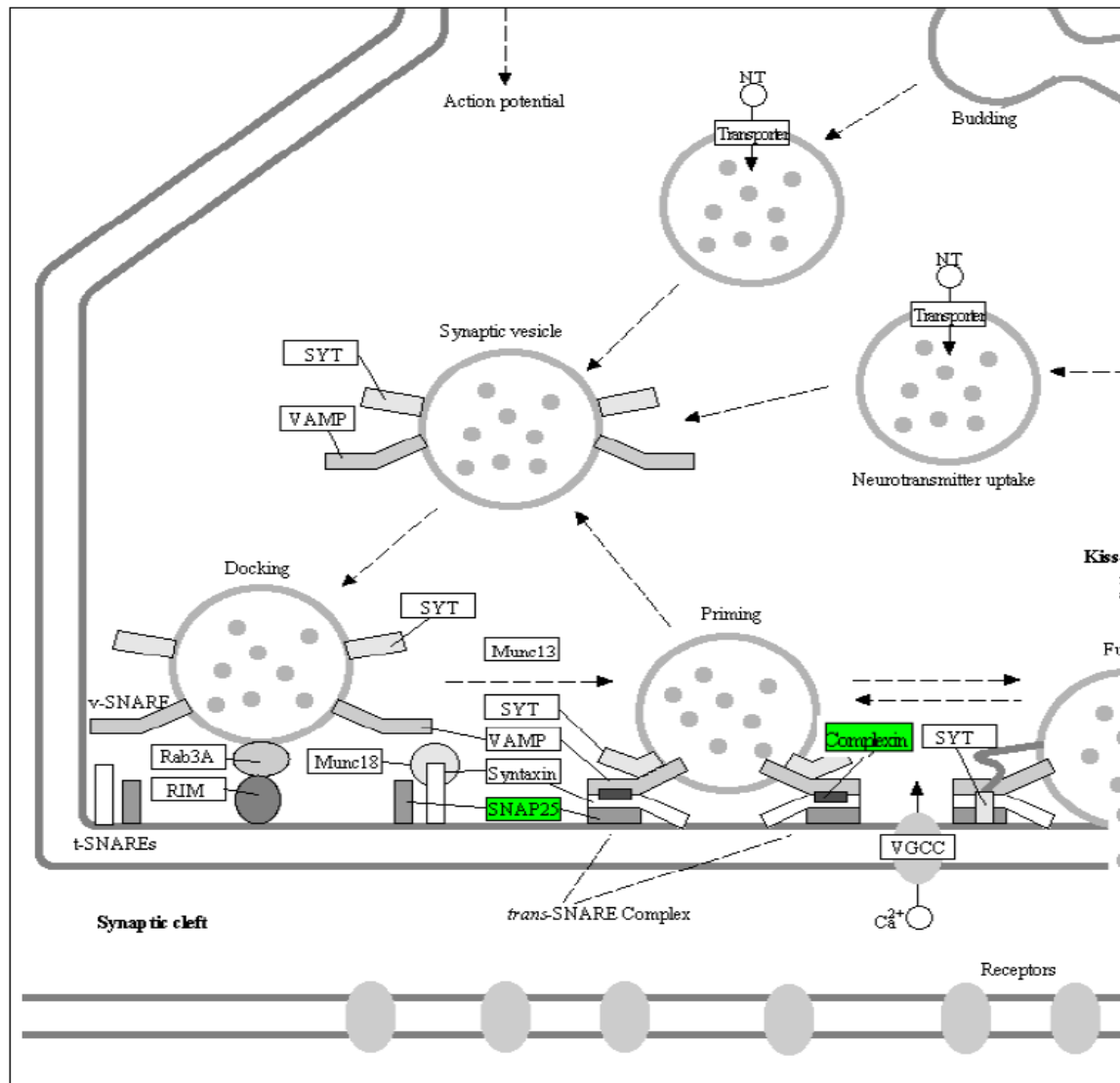


図5 THRαノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS 解析）

神経分化や成熟に関与する SNAP25, Complexin がスクリーニングされた。