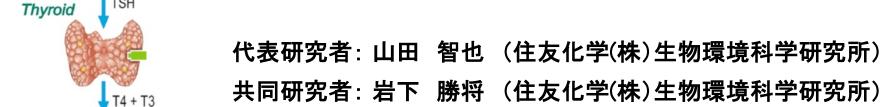








発達神経毒性ポテンシャルのスクリーニングとしての短期*in vivo*甲状腺ホルモン影響評価法の開発



青山 博昭 (一般財団法人・残留農薬研究所)



Blood

Neuron

研究目的

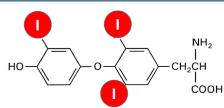
本研究は、下記を目的に実施する:

- 母ラットにおいて甲状腺ホルモン(Thyroid Hormone: TH) の血中濃度の低下作用が示唆される化学物質に関して発達神経毒性(Developmental Neurotoxicity: DNT) 試験の実施の必要性を判断する情報を提供すること。
- 2. 当該情報を比較的簡便に取得できる哺乳動物の試験法を提 案すること。
- 3. 病理変化や遺伝子変化を調べることで、有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway)を把握すべく情報を取得し、より簡便なin vitro 試験の構築に向けて情報を提供すること。

甲状腺ホルモン(T3·T4)の役割

脊椎動物の甲状腺ホルモン

- ▶ 脊椎動物では構造に種差なし
- ▶ 分泌腺の形状、分泌様式がよく保存されている
- ▶ 標的器官はほぼ全身の細胞
- ▶ 生理活性はT3>T4、血中はほとんどT4



Tri-iodothyronine T3

Tetra-iodothyronine or Thyroxine

甲状腺ホルモンの作用

- > 物質代謝の亢進
- > 成長促進・骨格筋の発達促進
- > 交感神経系の活動促進
- > 知能の発達促進

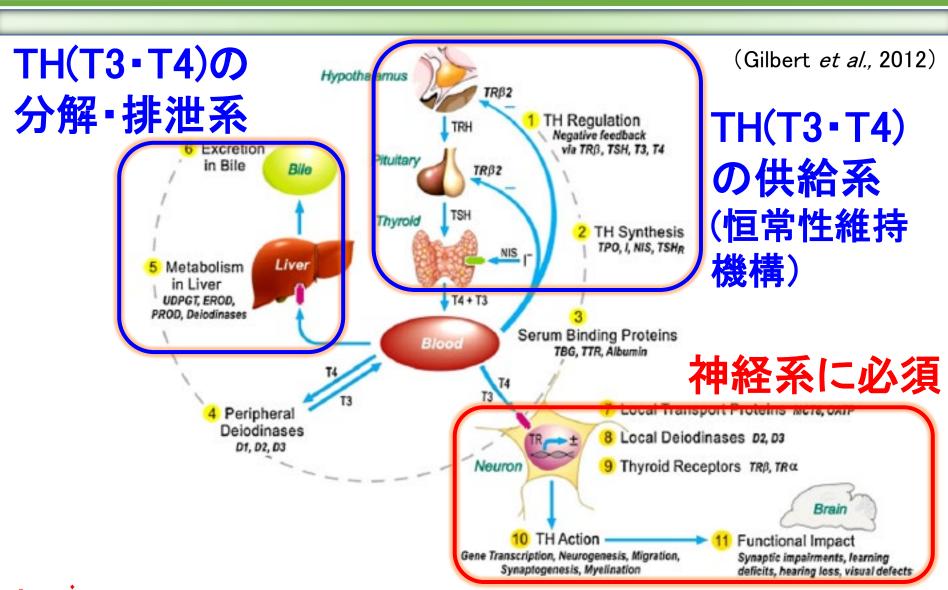
- > 鳥:季節毎の換羽
- ▶ サケ科魚類: 海への降下時
- ▶ ヒラメ・カレイ:変態促進
- > 両生類:幼生→成体の変態促進

生命・成長維持、記憶学習、次世代維持に重要



児の脳の発生・発達期において母親の血中TH濃度の低下により 児の脳の発達障害がヒトや実験動物で報告あり

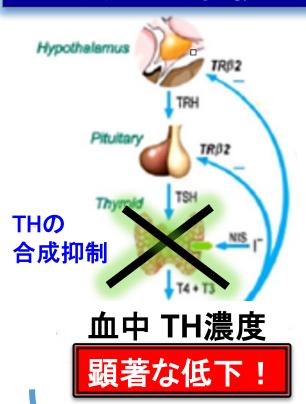
甲状腺ホルモン(TH)の血中濃度の制御系



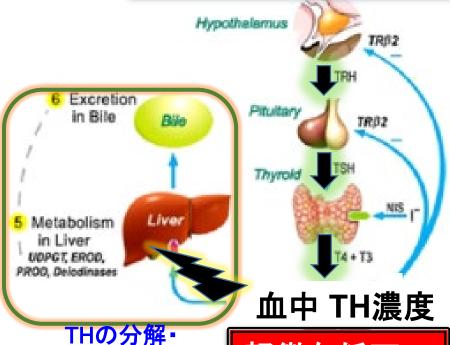
SUMÍTOMO CHEMICAL

化学物質による主な作用点

甲状腺への直接作用



肝臓への間接作用



排泄系増加軽微な低下?

しかし、欧州当局は両者に発達神経毒性試験を要求!

研究によって取得すべき科学知見



児の血中・脳中TH濃度がどの程度変動するか?

◆ SUMÍTOMO CHEMICAL 6/12

研究背景(必要性)

- ●児の脳の発生・発達期において母親の血中TH濃度の低下により児の脳の発達障害がヒトや実験動物で報告
- ●血中TH濃度を低下させる化学物質は発達神経毒性が懸念
- ●実際、肝薬物代謝酵素誘導(間接作用)剤が比較的多い
- ●規制当局は当該化学物質に対して発達神経毒性の有無を評価する ガイドライン試験の実施を要求

多大な資源(時間・動物・費用)が必要: 産業界の負担大

発達神経毒性評価の要否の正確かつ簡便な評価法が必須! 具体的には、Key eventである児の血中・脳中TH変動を 簡便に評価する試験系の構築を目指す!

胎仔・新生仔における甲状腺ホルモン攪乱作用の検査方法

CTA: Comparative Thyroid hormone Assay (US.EPA, 2005) **DG 6** DG₀ **DG 20** PND 4 **PND 21** No treatment Treatment Phase 1: Prenatal cohort: 10 litters/dose Serum T3, T4 & TSH [Dams & fetuses (blood pooled by sex/litter)] 妊娠20日 Whole brain T3 & T4 [Fetuses (one fetus/sex/litter)] Liver enzyme induction [Dams (all) & fetuses (one fetus/sex/litter, 6 litter/dose)] Pathology [Dams (all) & fetuses (one fetus/sex/litter)]: brain (fetus only), liver, thyroid DNA array [Fetuses (one fetus/sex/litter, 3 litters/dose)]: brain Phase 2: Postnatal cohort 1: up to 17 litters/dose Serum T3, T4 & TSH [Two offspring (pooled) /sex/litter)] 生後4日 Whole brain T3 & T4 [One offspring/sex/litter)] Liver enzyme induction [One offspring/sex/litter, 6 litters/dose)] (間引き動物) Pathology (One offspring/sex/litter): brain (offspring only), , liver, thyroid DNA array (One offspring/sex/litter, 3 litter/dose): brain Phase 2: Postnatal cohort 2: up to 17 litters/dose Serum T3, T4 & TSH [Dams (all) & offspring (one offspring/sex/litter)] 離乳時 Whole brain T3 & T4 (One offspring/sex/litter) Liver enzyme induction [Dams (all) & offspring (one offspring/sex/litter, 6 litters/dose)] Pathology [Dams (all) & offspring (one offspring/sex/litter)]: brain (offspring only), liver, thyroid DNA array [Offspring (one offspring/sex/litter, 3 litter/dose)]: brain

Modified CTA: Study Plan

動物試験実施機関: 残留農薬研究所

動物: Crl:CD(SD)ラット(SPF)

被検物質: PB (Phenobarbital sodium salt、酵素誘導剤)

PTU (Propylthiouracil、抗甲状腺薬・・陽性対照

Phase		Group	Treatment period	Number of
				animals
1	Control		GD 6 - 20	10
	PB	1000 ppm	GD 6 - 20	10
	PTU	10 ppm	GD 6 - 20	10
2	Control		GD 6 – LD 21	Up to 17
	PB	1000/500 ppm	GD 6 – LD 21	Up to 17
	PTU	10/5 ppm	GD 6 – LD 21	Up to 17

GD: Gestation Day, LD: Lactation Day

6月初旬から7月中旬にかけて動物実験を実施し、その後、各種測定実施中



Modified CTA:今回の工夫点

投与方法: PBの乳汁移行性があることを示唆する文献 (Moriyama et al.,1999)に基き、投与期間を通して母動物への混餌投与を選択した(乳汁移行性が無い場合、新生児への直接投与が必要)。

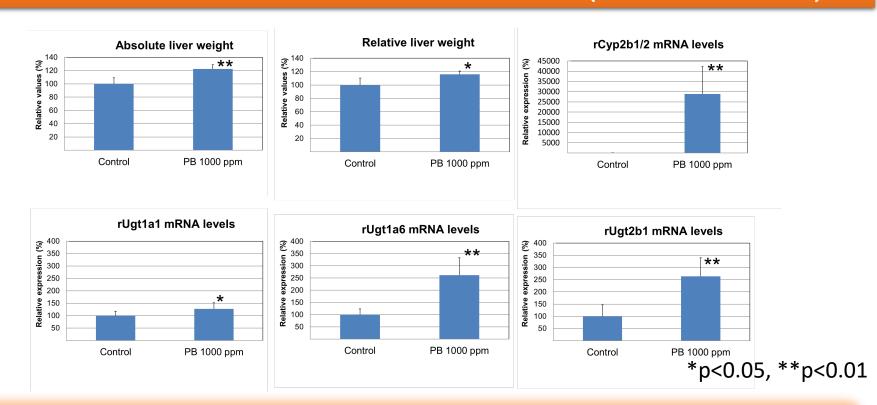
● 投与量:

- ◆ 親動物に明確な肝酵素誘導の惹起を期待し、成獣での充分影響量であるPB 1000 ppm (Yamada et al., 2014)を設定した。
- ◆ PB 1000 ppmを投与した他試験で認められた出生直後の児死亡多発 を考慮し、出生前後の3日間を休薬とした。その結果、死亡回避。
- ◆ 哺育中期以降に母動物の摂餌量が増加することを考慮し、被験物質の過剰摂取回避のため、哺育13-21日においてはPB・PTUともに給餌濃度を半量にした。
- 標本(血液、脳)の採材方法(特に胎児・新生児):予備検討した上で、 現実的に実施可能な採材手順・採材数・保管状態を選定した。

◆ SUMİTOMO CHEMICAL 10/12

母動物における肝臓影響の確認

肝重量・核内受容体CAR依存性の遺伝子発現 (妊娠20日の母動物)



母動物の肝臓:TH抱合酵素の誘導が確認された

TOMO CHEMICAL 今後、予定通り測定・観察を継続する



謝辞

日本化学工業協会が推進するLRIにより本研究の一部を支援いただいたことに関し、深く感謝申し上げます。

また、研究推進にあたり多大なご協力をいただいている残留農薬研究所のスタッフの皆様に厚くお礼申し上げます。

ご清聴ありがとうございました。







