

令和 7 年度調査研究報告書

ヒトにおける代謝物プロファイル推定試験系の確立

試験番号 : IET 23-1015

令和 8 年 5 月
一般財団法人残留農薬研究所
化学部

室 名 及 び 担 当 者	化学部代謝第 1 研究室 笠神威雄（研究総括），杉岡大介
課 題 名	ヒトにおける代謝物プロファイル推定試験系の確立
目 的	農薬の開発では，候補化合物の動物での <i>in vivo</i> データ（毒性試験及びラット代謝試験）からヒトに対するリスクを評価し，またヒト及び他動物種の組織や酵素系での <i>in vitro</i> 代謝データが補足的にリスク評価に利用されている。ヒト由来の肝ミクロソームや肝細胞など，ヒト試料による <i>in vitro</i> 代謝実験は汎用の手法であるが，ヒトにおける <i>in vivo</i> での代謝物プロファイルを網羅的に予測することは難しく，また <i>in vitro</i> 代謝だけでは排泄経路の特定には至らない。近年，ヒト肝キメラマウス（ヒト肝細胞を有するキメラマウス）が評価動物として注目されており，既存の動物実験や <i>in vitro</i> 代謝実験では得られないデータを取得できる可能性があると考ええる。本研究は，メトキシクロル代謝をモデル反応として，<i>in vitro</i> 代謝及びヒト肝キメラマウスでの <i>in vivo</i> 代謝を比較，検証し，ヒトにおける代謝物プロファイル推定試験系の確立を目指すものである。
調 査 研 究 期 間	令和 5 年 4 月 1 日から令和 8 年 3 月 31 日 3 年計画の 3 年目
前年度までの 調査研究 結果の概要	初年度（令和 5 年度）に実施したメトキシクロル（MXC）の <i>in vitro</i> 代謝試験系における種差・性差に関する調査結果の概要は以下の通りである。すなわち，3 つの試験区（試験区 1: 補酵素無添加，試験区 2: 第 1 相反応の補酵素 NADPH のみを添加，試験区 3: 第 1 及び第 2 相反応の補酵素 NADPH, UDPGA 及び PAPS を添加）で反応させたとき，試験区 2（第 1 相反応）では，各動物種（供試動物種: マウス，ラット，イヌ，ウサギ，ヤギ及びヒト; ヤギ（雌）を除き，いずれも雌雄）において MXC から段階的に酸化 O-脱メチル化された Mono-OH-MXC と Bis-OH-MXC が検出された。その他数種の成分も検出され，O-脱メチル化以外の代謝（酸化と脱塩化水素化）も推察された。これらの生成量は動物種間で差が認められた。生体内代謝に近い試験区 3 では，各動物種から Mono-OH-MXC と Bis-OH-MXC のグルクロン酸抱合体と推定される成分が主要な代謝物として検出された。また，Mono-OH-MXC+O のグルクロン酸抱合体も検出された。さらにヒトでは，Bis-OH-MXC 由来の 2 種の硫酸抱合体と Mono-OH-MXC の硫酸抱合体も推定されたことから，ヒトでは MXC の代謝にグルクロン酸抱合と硫酸抱合の両者が寄与していることが推察され，ヒトでの <i>in vivo</i> における代謝物プロファイルは他の動物種とは定性的，定量的に差異があることが示唆され

	た。 以上の結果を踏まえ、令和 6 年度は通常マウス及びヒト肝キメラマウスによる <i>in vivo</i> 代謝実験（尿及び糞中代謝物プロファイルの比較・検討）を計画した。しかしながら、実験に使用する ^{14}C 標識メトキシクロル (^{14}C]MXC) の放射化学的純度の低下が確認され、精製に時間を要したことから、進捗が計画より遅れることとなった。現在、通常マウスへの投与・採材は終了しているが、代謝物プロファイルの実施にまで至っていない。なお、動物での <i>in vivo</i> 代謝について、当研究室及び他の研究者により以下の知見が得られている。過去に当研究室で実施した通常ラット及び胆管カニュレーションラットでの <i>in vivo</i> 代謝調査結果から、主たる排泄経路は胆汁排泄を経由する糞排泄であることが明らかになっている。マウスにおいてもラットと同様に主たる排泄経路は糞であることが報告されている。ヤギにおいても胆汁排泄を経由する糞排泄が報告されているが、マウスやラットに比べると尿中へ排泄率が高く、大動物では排泄マスバランスの傾向が異なっていることが類推される。これら動物における代謝物プロファイリングでは、脱メチル化体、脱塩素化体、脱塩化水素化体及び複数のグルクロン酸抱合体が検出されているが、初年度（令和 5 年度）に実施したヒト <i>in vitro</i> 代謝で検出された硫酸抱合体についてはこれら動物では報告されておらず、ヒト-動物間での相違が確認された。
本年度の調査研究結果の概要	本年度（令和 7 年度）は、通常マウス（ICR）及びヒト肝キメラマウス（PXB）を用いた <i>in vivo</i> 代謝比較実験を実施した。すなわち、^{14}C]MXC を単回強制経口投与し、尿及び糞中への排泄率、体内残留量並びに尿及び糞中の放射性成分について HPLC による分析を行い、各代謝物成分の定量を実施した。 その結果、ICR マウスにおいては投与放射能の大部分が速やかに排泄され、主要排泄経路は糞であることが確認された。一方、PXB マウスでの主要排泄経路は尿であり、両群間で排泄経路に明確な差異が認められた。尿中及び糞中の代謝物プロファイルについては、ICR マウスと PXB マウスとの間で質的に大きな差異は認められなかった。 以上の結果から、ICR マウスと PXB マウスとの間に認められた排泄経路の差異は、代謝物の生成様式そのものの差異によるものではなく、胆汁排泄を含む排泄機構の差異に起因する可能性が示唆された。なお、各放射性成分の構造同定には未だ至っておらず、今後、質量分析等による未同定成分の構造推定を進める予定である。
今後の試験方針	本年度（令和 7 年度）までに、通常マウス（ICR）及びヒト肝キメラマウス（PXB）にそれぞれ ^{14}C]メトキシクロルを投与し、尿及び糞中への

	排泄率を調査・比較した。さらに、尿及び糞中の放射性成分を HPLC で分離し、各代謝物成分の定量値を得た。一方で、各成分の構造同定には至らなかった。 そこで次年度（令和 8 年度）は、未同定成分の同定・構造推定の推進を目的として、継続事項を含め以下の 2 課題について実験を進める予定である。 (1) ICR マウス及び PXB マウスによる <i>in vivo</i> 代謝実験の継続（尿及び糞中代謝物の同定） (2) <i>In vitro</i> 代謝実験の継続（特に構造推定に至らなかった成分について検討）
成果の公表	(1) 主な誌上発表 なし (2) 主な口頭発表（学会等） なし

[研究体制]

① 研究者名	②分担する研究項目	③現在の専門	④所属及び職名
笠神 威雄	研究総括 メトキシクロルの <i>in vitro</i> 代謝	農薬の動物/作物代謝及び 環境中動態に関する研究	化学部専任室長 代謝担当
杉岡 大介	メトキシクロルの <i>in vivo</i> 代謝	同上	化学部代謝第1研究室 長

令和 7 年度調査研究報告書

農薬等の毒性に関する基礎的研究：
毒性試験に用いる実験動物の遺伝学的基盤の整備
甲状腺影響を適切に評価するための遺伝学的・栄養学的基盤情報の整備

試験番号：IET 12-0031/21-1015/22-1015/22-1018/22-1019/25-1014

令和 8 年 3 月
一般財団法人残留農薬研究所
毒性部

部・室名 及 び 担 当 者 名	毒性部生殖・発生毒性研究室：北條仁(課題 1 研究総括), 高橋研(課題 2 研究総括), 西岡康, 浦川千鶴, 篠田隼, 糟谷佐保里
課 題 名	【課題 1】 毒性試験に用いる実験動物の遺伝学的基盤の整備（ラットの遺伝学的基盤の整備）： アウトブレット動物に保持される突然変異遺伝子の解析 【課題 2】 毒性試験に用いる実験動物の遺伝学的基盤の整備（ウサギの遺伝学的基盤の整備）： ウサギの系統差に着目した背景データの蓄積
目 的	本研究は、毒性実験を実施するに当たって極めて重要であるにも拘らず見落とされることの多い項目として実験動物の遺伝学的な特性に注目して、これらが毒性実験の結果に及ぼす影響を詳細に検討するとともに、得られた成果を毒性実験の精度向上を目的とした基盤情報として整備することにより、毒性学への貢献を目的とするものである。
【課題 1】アウトブレット動物に保持される突然変異遺伝子の解析（IET 12-0031）	
調 査 研 究 期 間	令和 5 年 4 月 1 日から令和 8 年 3 月 31 日 3 年計画の 3 年目
前年度までの結果の概要	ラットの事業に関しては、腎欠損を誘発する <i>ak</i> 変異の解析を進めた。腎欠損が <i>Lrp1</i> 遺伝子に検出した配列の変化に関連し得るものか検証するため、腎臓形成の時期を中心に遺伝子発現に変化がないか調べることにし、まずは腎欠損が出現する時期の特定を試みた。昨年度は三次元的に形態解析が可能なマイクロ CT に着目し、理化学研究所バイオリソースセンターに解析を依頼した。ラットでの解析経験が無かったため、腎臓の形態異常が出現することが分かっている胎齢 15.5 日の胚を用いた条件検討から始めている。本年度は、胎齢 11.5-14.5 日の胚について各遺伝子型を持つ十分な数の雌雄（少なくとも 2 例ずつ）について解析を進める予定であった。
調 査 研 究 方法の概要	分離可能な新規突然変異形質に遭遇した場合には、積極的に表現型の解析と原因遺伝子の同定に取り組んだ。また、前年度に引き続き、以下のテーマについて、可能な限り解析を進めた。 <u>腎欠損ラット AK (候補遺伝子 <i>Lrp1</i>)</u> 本ラットについては、NGS 解析によって候補領域内に <i>Lrp1</i> のインフレー

	ム欠失を検出したものの、これまで本遺伝子が腎臓発生に関与するとの報告がないため、先の解析において候補突然変異を見落とした可能性は依然として残される。そこで、腎欠損が生じる直前の胚を用いて RNAseq 解析を実施し、候補領域内の遺伝子を対象に mRNA の発現を調べ、改めて <i>Lrp1</i> と腎欠損との関連を検証する必要がある。その前段階として腎欠損が生じる時期の特定をするため、妊娠 11-14 日の胚について理化学研究所に依頼してマイクロ CT で形態的解析を試みた。
調査研究 結果の概要 及び考察 試験条件 及び具体的 データ	本年度は課題 3 に注力するため、課題 1 について進捗はなかった。
今後の課題 及び 対応方針	<i>ak</i> 変異については、理化学研究所の協力を仰ぎ、マイクロ CT を利用して腎臓異常の出現時期同定と形態学的解析を試みる。その他、上記 2 変異以外にも新たな突然変異形質が発見された場合には、それらの分離と原因遺伝子の同定にも可能な限り取り組む。
成果の 公表予定	腎欠損ラットについて、データがまとまり次第、日本先天異常学会、日本毒性学会等、関連学会にて発表予定
【課題 2】ウサギの系統差に着目した背景データの蓄積 (IET 21-1015)	
調査研究 期間	令和 6 年 4 月 1 日～令和 9 年 3 月 31 日 3 年計画の 2 年目
前年度までの 結果の概要	これまでの取り組みでは、NZW ウサギの系統特性を把握すべく、生産場で自然交配させた雌ウサギを当研究所へ導入する方法と、導入後に人工授精を行なう方法の 2 種類について、検討を行なってきた。その結果、日本白色種に比べてストレスに対する感受性の高い NZW ウサギは後者の方法が適切であることを明らかにした。また、これらの取り組みによって発生毒性試験 2 試験分の背景対照値を蓄積することができた。昨年度は、ウサギを用いた発生毒性試験において観察される胎児奇形が突然変異遺伝子によって誘発されたものか否かを確認する方法を確立する準備として、雄ウサギから採取した精液の凍結保存技術の検討を行った。NZW 雄ウサギ 3 匹から精液を採取し、トリス-卵黄液による 1 次希釈の後約 3 時間かけて 5℃ まで徐々に温度を低下させた。希釈精液はグリセリン添加トリス-卵黄液による 2 次希釈、30 分間のグリセリン平衡を行った後に 10 分間液体窒素ガス中にさらして凍結させ、液体窒素中に投入した。液体窒素中の凍結

	精液は 30 分もしくは 4 日後に 40 °C の温湯で解凍して直ちに精子活性を位相差顕微鏡下で観察した。その結果, 30 分および 4 日間凍結後のいずれにおいても解凍した希釈精液中のほとんどの精子に運動性が認められたが, 活性は極めて不良であり, 人工授精に用いるには適さないと考えられた。
調 査 研 究 方法の概要	ウサギ凍結精子の解凍後の活性向上を目指して手法の検討を行った。一次希釈, 緩徐冷却, 二次希釈, グリセリン平衡, 凍結の各段階において一部の精液を 40 °C に加温し, 各段階で活性が保たれているかを確認し, 活性低下の起こる段階の原因を検討し, 手法の改善を図った。 また, 当施設で実施されたウサギ発生毒性試験で妊娠率の低迷が 1 試験において発生したため, 現行の人工授精手技の確認のために NZW 雌ウサギと JW 雌ウサギをそれぞれ 10 匹購入して人工授精を行い, 妊娠率を検討した。
調 査 研 究 結果の概要 及 び 考 察 試 験 条 件 及び具体的 デ ー タ	研究所で維持している NZW 雄ウサギから 40 °C の温湯を入れた人工臍を用いて精液を採取し, いずれも精子活性が良好であることを確認してプールした。精液を 37 °C に加温したトリス-卵黄液 (トリスヒドロキシメチルアミノメタン 3.028 g, クエン酸 1.675 g, D-グルコース 1.250 g, ジメチルスルホキシド 15 mL, 50%卵黄液 40 mL を蒸留水に溶解して 100 mL としたもの) で 2 倍に希釈 (①) し, 約 3 時間かけて 5 °C まで温度を低下させたのち (②) に 12%(v/v)グリセリン添加トリス-卵黄液で 2 倍希釈した (③)。2 次希釈を終えた希釈精液は 30 分間グリセリン平衡を行った後 (④) にクライオチューブに分注し, 10 分間液体窒素ガス中にさらして凍結させ, 液体窒素中に投入した。液体窒素中に 1 時間凍結保存した希釈精液を 40 °C の温湯により解凍して直ちに精子活性を位相差顕微鏡下で観察した (⑤)。精子活性の確認は上記の①～⑤の時点で行った。また, 精液希釈液の凍結効率を高めるため, 凍結保存時の容器をクライオチューブから精液凍結用ストローに変更して, 同様の検討を行った。精液の凍結及び解凍の手順は農林水産省ジーンバンク事業「動物遺伝資源保存管理マニュアル」に従った。 トリス-卵黄液で一時希釈した精子 (①) には活発な運動性が確認され, 5 °C の低温下 (②) でも運動性は保たれていた。しかしながら, グリセリン添加トリス-卵黄液を加えると (③) 精子の運動性は低下し, 前進性が観察されなくなった。この様子は, 活性が低下して前進運動が認められない凍結融解後の精子と類似していた。このことから, 前年度の手順において

	失われた精子の前進性と活性は、凍結による精子への生理的なダメージによるものではなく、グリセリン添加が希釈液の密度を増し、精子の前進性が妨げられた結果ではないかと考えた。そこで、同じ手順で凍結した精液を、解凍直後に生理食塩水で2倍希釈して観察すると、希釈前の解凍精液には見られなかった精子の回転運動がみられるようになり、運動性は向上していた。しかしながら依然として活性も前進性も弱く、人工授精には適さないと考えられた。次に、精液の凍結に使用している容器をクライオチューブよりも冷却効率が良いと考えられる精液凍結用ストローに変更して、同じ手順で凍結融解を行ったところ、融解後に生理食塩水で2倍希釈した精液内の精子には前進性が認められ、活性も向上していた。 手技の確認のために購入し、人工授精を行った雌動物はすべて妊娠し、着床数も十分であったことから、手技に内在する大きな問題はないものと考えられ、生産場の雌動物に妊性低下が起こっている懸念もないと考えられた。
今後の課題 及び 対応方針	今回の検討により凍結・解凍後の精子に前進運動が認められ、活性の向上もみられたが、採取直後の精液の活性には及ばなかった。今後は解凍後のさらなる活性向上を目指して手法の検討を行う。また、凍結融解後の精液を用いた人工授精による妊娠ウサギの作出とその受胎成績の検討を行う予定である。
成果の 公表予定	データがまとまり次第、日本先天異常学会、日本毒性学会等、関連学会にて発表予定

部・室名 及び 担当者名	毒性部生殖・発生毒性研究室：西岡康(課題3研究総括)、高橋研、 浦川千鶴、篠田隼、北條仁 毒性部病理研究室：小山彩、藤原千夏、松永あずさ 毒性部短期毒性研究室：小坂忠司、元村淳子 化学部残留第1研究室：近藤圭 化学部残留第2研究室：富山成人、児玉芽吹
課題名	甲状腺影響を適切に評価するための遺伝学的・栄養学的基盤情報の整備
目的	近年、化学物質の甲状腺影響とそれらを介した発達神経毒性 (DNT) の懸念から、欧米諸国を中心として Comparative thyroid assay (CTA) や DNT コホートを含む拡張世代試験 (EOGRT) の実施事例が増えている。しかし、この様な国際的な潮流に反し、我が国における CTA や EOGRT の実施体制

	は殆ど整っていない。可及的速やかな体制整備には、これらの試験種について血中甲状腺ホルモン (TH) 濃度を始めとする背景データや陽性対照データの取得と蓄積が必要とされる。また、これらの取り組みに並行し、試験法の妥当性の検証や新たな技術開発といった評価体制の整備も急務である。例えば、2016 年から 2018 年にかけて、OECD は甲状腺影響を含む内分泌かく乱作用の検出力向上を目的として一連のガイドラインを改定した。結果として、一部の試験では飼料中の植物エストロゲン含量を適正に保つことが求められることとなった。しかし、本改定に従うためには、国内の多くの試験施設が従前より使用する飼料からの切り替えを迫られ、これまでに蓄積した背景データを事実上放棄することを余儀なくされる。また、飼料変更による効果に関しても、エストロゲン作動系に対する影響を除いて甚だ知見に乏しく、その要否については、更なる知見の蓄積をもって判断すべきと考えられる。その他にも、新たな技術開発が求められる領域として、今後は欧米を中心に脑中 TH 濃度のデータがリスク評価に活用されると予測されることから、その測定技術の確立は我が国のリスク評価体制の整備にとっても不可欠である。また、我が国において将来に亘って適切なリスク評価を継続していくためには、検査者の労働負担軽減に繋がる作業効率の改善および診断精度の向上を目指したデジタル技術の活用も求められる。 本課題では、先に述べたような甲状腺影響評価に係る諸問題に対処すべく、①CTA や EOGRT などと求められる条件で血中 TH 濃度を始めとする背景データの取得に努めるとともに、②飼料中の植物エストロゲン含量の違いが甲状腺影響を含む内分泌かく乱作用に関連した指標に及ぼし得る影響について検討することとする。また、これらの検討に加え、③脑中ホルモン濃度測定技術や画像 AI を活用した病理診断支援技術などの甲状腺影響の評価に資する新たな基盤技術の開発にも努める。
【課題 3】拡張一世代試験 (EOGRT) 背景データ採取 (IET 25-1014)、新たな基盤技術の開発 (IET 22-1018/22-1019)、及び飼料中に含まれる植物エストロゲンがラットの甲状腺に及ぼす影響の検討 (IET 22-1015)	
調査研究 期 間	令和 6 年 4 月 1 日～令和 9 年 3 月 31 日 3 年計画の 2 年目
前年度までの 結果の 概要	飼料中の植物エストロゲンが及ぼす影響の検討については、令和 5 年度事業で実施に至らなかった全例のホルモン濃度の測定と統計解析に取り組むと共に、タイコロニーに残存する <i>cack</i> 変異に着目して、変異保有個体の排除が集団の特性を変化させた可能性を検証した。その結果、国内コロニー

	に由来する動物の血中 T4 濃度が三世代に亘ってタイコロニーの動物の値を有意に上回ること、およびこれらの差は <i>cack</i> 変異の排除とは無関係である可能性が高いことを明らかにした。また、令和 6 年度においては、MF 飼料中の植物エストロゲン濃度とヨウ素濃度に大きな変動はないことを確認した。脑中 TH 濃度の測定法確立については、動物供給元で技術的な問題が発生し、試験動物を入手することが出来なかった。改善の見込みがないと判断されたため、動物の入手先の変更を検討することとした。画像 AI を活用した病理診断支援技術の開発については、予備的な検討によって YOLO V8x が YOLO V8l に比してコロイド予測モデル作成において優れていることを明らかにした。また、実際の標本を用いてコロイドを予測させた結果、コロイドサイズの大小が認識精度に大きく影響することなどを見出した。
調査研究方法の概要	当初計画では、2 年目の令和 7 年度より、飼料の違いが甲状腺関連指標に及ぼし得る影響について更なる検討を行なう予定であった。しかし、昨今の欧州当局のリスク評価に係る姿勢を考慮すると、EOGRTS の実施体制の整備を優先すべきと判断されたため、上記検討は飼料中の植物エストロゲン濃度等のモニターを除いて一時中断し、EOGRT の背景データ取得に取り組むこととした。一昨年度より取り上げた新規課題については、当初計画の通り、実用化に向けた開発に積極的に取り組む。以下に、令和 7 年度に実施した試験方法の概要を記す。 1. <u>EOGRT 背景データ採取</u> 1.1. OECD TG443 に可能な限り準拠した条件で EOGRT を実施した。被験物質として抗甲状腺薬である PTU を取り上げ、特に甲状腺影響を介した DNT の検出を試みると共に、当研究所における検査手技の妥当性を検証した。 1.2. 投与方法は混餌投与とし、投与用量は 0, 1, 3 および 6 ppm とした。当研究所で実施した先行研究では、PTU を 0, 1, 3 および 10 ppm の用量で哺育中の母動物に混餌投与した場合、3 および 10 ppm における母動物と児動物に血中 T4 濃度の有意な低下が検出されている。ただし、10 ppm 群の児動物には成長遅延や低体温を含む典型的な甲状腺機能低下症の表現型が認められ、離乳後の投与継続が困難と考えられるため、高用量には 6 ppm を設定する。低用量および中間用量には、先行研究との比較や用量反応関係の把握を意図して、1 および 3 ppm を設定した。基礎飼料には、オリエンタル酵母株式会社製 MF 粉末飼料を用いた。

	1.3. 供試動物として、日本クレア株式会社生産の BrlHan:WIST@Jcl (GALAS) ラットのうち、タイ生育場に由来する雌雄を用いた。本系統のラットは生殖・発生毒性試験で標準的に用いられる動物であることに加え、タイ生育場の動物に関する基礎データを蓄積する必要があると考えられたことから、これらの動物を使用した。 1.4. 1 群当たり雌雄各 12 匹の動物を用意し、P 世代の親動物とした。10 週齢より対照飼料または PTU 混合飼料を与え、投与 4 週の終了後に P 世代の雌雄を交配した。交配後の雄は引き続き飼料の投与を継続し、投与 10 週終了後に剖検して精子検査に供した。雌は投与を継続したまま自然分娩させ、哺育 21 日まで児動物を哺育させた。哺育期間中、児数調整 (哺育 4 日) を行なうほか、児動物の体重測定、AGD 測定、乳頭数検査などを行なった。哺育 21 日に児動物を離乳して、後述する各コホートに割り当てた。残りの離乳児は母動物と共に剖検した。 1.5. P 親動物と F1 児動物ともに剖検時に血液と各種臓器を採取し、血中 TH/TSH 濃度測定と病理組織学的検査を実施した。 1.6. F1 児動物の離乳後、各腹より雌雄各 1 匹を選抜してコホート 1A に割り当てた。コホート 1A の雌雄には親動物と同じ用量の飼料を 10 週間摂取させた。投与期間中に性成熟や発情周期 (初回発情までの日数含む) を調べた。剖検時には雄の精子検査に加え、雌雄の血中 TH/TSH 濃度測定、脾臓リンパ球サブセット解析および病理組織学的検査を行なった。 1.7. 同様に、各腹の雌雄各 1 匹を選抜してコホート 2A に割り当てた。コホート 2A の雌雄にも親動物と同じ用量の飼料を摂取させ、成長期の動物 (生後 23~27 日齢) と若齢成熟動物 (生後 63~75 日齢) を対象に聴覚驚愕検査や FOB および運動量試験などを実施した。これらの神経行動学的検査に加え、雌雄とも性成熟の観察も行なった。コホート 2A の雌雄は生後 75~90 日の間に灌流固定し、神経病理組織学的検査に用いた。 1.8. 各腹の雌雄各 1 匹をさらに選抜してコホート 2B に割り当てた。これらの雌雄は生後 22 日に剖検し、脳重量の測定と神経病理学的検査に用いた (浸漬固定)。 1.9. 上記のうち、令和 7 年度は主としてインライフ試験で得られるデータの取得に努めた。 2. <u>脳中 TH 測定法の確立</u>
--	---

	2.1. 脳中 TH 測定法を確立するため、TH を極力含まないブランク脳試料の採取に取り組む。日本クレア株式会社より thyroglobulin 遺伝子に変異を持つ BrlHan:WIST@Jcl (GALAS) ラットを入手し、ホモ型個体の生産に取り組んだ。 2.2. ホモ型個体はヘテロ同士の交配によって生産し、離乳後の生存率を高めるために生後 28 日齢まで（またはそれ以上）哺育させた。 2.3. 離乳後のホモ型個体に 20 ppm の濃度で PTU を添加した低ヨウ素飼料を 3 週間摂取させ、その後に脳を摘出して保存して分析法バリデーションの実施に備えた。 3. <u>画像 AI を活用した病理診断支援技術の開発</u> 3.1. 昨年度の検討で認識精度が良好であった YOLO V8x を用いた学習モデルを使用した。 3.2. 令和 7 年度は本モデルにコロイドを予測させ、得られた画像のラベルを修正して新たな教師データを作成し、追加学習を行なった。 3.3. 追加学習に当たっては、モデルの汎化性能の向上と正則化効果による過学習抑制効果を狙い、作成した教師データ（画像およびラベル）に対して回転処理等によるデータ拡張 (Data Augmentation) を導入することも検討した。 3.4. さらに、濾胞形成が未熟な妊娠 20 日齢胎児の標本に対して、小型濾胞を認識可能な専用モデルの開発にも可能な限り努めた。 4. <u>飼料中の植物エストロゲンおよびヨウ素濃度のモニター</u> 4.1. 当研究所に導入する MF 飼料について、ロットごとに植物エストロゲン含量とヨウ素含量を調べた。
調査研究結果の概要及び考察試験条件及び具体的データ	<u>拡張一世代試験 (EOGRT) 背景データ採取 (IET 25-1014)</u> 本課題では、EOGRT の利用を強く推進する昨今の欧州の姿勢を鑑み、国内施設における試験実装の可能性を検討すべく、EOGRT の実施ならびに問題点の洗い出しなどを試みた。令和 7 年度は、ガイドラインの推奨に対して半数の動物（12 匹/性/群/世代）を用い、それらに抗甲状腺薬である PTU を 0, 1, 3 および 6 ppm の濃度で投与して、インライフフェーズの試験を実施した。その結果、甲状腺影響として期待される変化として、P 親動物および F1-1A 動物などに甲状腺重量の増加（3 ppm 以上）、F1 哺育児の体重低下（6 ppm）などが用量相関を伴って観察され、試験条件の妥当性が確認された。また、試験規模を半減した条件であるものの、複雑な設計のインライフ試験を大きな問題なく完遂することができた。 <u>新たな基盤技術の開発 (IET 22-1018/22-1019)</u>

	脳中 TH 濃度の測定法確立については、先天性甲状腺機能低下症ラット (Wistar Hannover GALAS) に対して PTU を 20 ppm の濃度で混合したヨウ素欠乏飼料を 3 週間に亘って与え、これらを剖検してブランク試料とする脳を採取した。 画像 AI を活用した病理診断支援技術の開発については、予備的な検討によって YOLO V8x が YOLO V8l に比してコロイド予測モデル作成において優れていることを明らかにした。また、上下反転のデータ拡張を施した画像を再学習させることでモデルの精度が向上することなどを見出した。 <u>飼料中に含まれる植物エストロゲンがラットの甲状腺に及ぼす影響の検討 (IET 22-1015)</u> 新たにモニターを行なった計 12 ロットの MF 飼料における植物エストロゲン濃度は、グルコシドの濃度として 337~709 ppm (平均 546 ppm) と、令和 5~6 年の飼料分析値 (410~642 ppm, 平均 542 ppm) とほぼ同じ値で推移していることが確認された。また、同ロットの飼料におけるヨウ素濃度は <LLOQ~1.1 ppm (LLOQ=0.5 ppm) の範囲で安定的に推移していることが確認された。
今後の課題 及び 対応方針	EOGRTS のインライフ試験を実施することが可能であることを確認したため、引き続き採取データの統計処理と、病理組織学的検査や血中甲状腺ホルモン濃度といった各種検査を進め、これらの陽性対照データの蓄積に努める。脳中ホルモン測定技術の確立に関しては、得られたブランク試料を利用して分析法バリデーションを実施する。画像 AI を活用した病理診断支援技術の開発については、PTU を投与した動物のコロイド予測や、コロイド面積の定量評価を試みることで、より実務に近い病理評価手法の確立を目指す。また、飼料中の植物エストロゲンおよびヨウ素の濃度についても引き続きモニターを継続する。
成果の 公表予定	データがまとまり次第、日本先天異常学会、日本毒性学会等、関連学会にて発表予定

[令和7年度の研究体制]

①研究者名	②分担する研究項目	③現在の専門	④所属および職名
北條 仁	課題1研究総括、課題2、課題3	生殖・発生毒性学および家畜解剖学	毒性部 一般毒性担当部長
高橋 研	課題2研究総括、課題1、課題3	生殖・発生毒性学および実験動物医学	毒性部 副部長
西岡 康	課題3研究総括、課題1、課題2	生殖・発生毒性学および薬理学	生殖・発生毒性研究室 主任研究員
浦川 千鶴	課題1、課題2、課題3	生殖・発生毒性学および栄養学	生殖・発生毒性研究室 主任
篠田 隼	課題1、課題2、課題3	生殖・発生毒性学および理学	生殖・発生毒性研究室 研究員補
糟谷 佐保里	課題2	生殖・発生毒性学および薬学	生殖・発生毒性研究室 研究員補
小山 彩	課題3	毒性病理学	病理研究室 主任
藤原 千夏	課題3	毒性病理学	病理研究室 研究員
松永 あずさ	課題3	毒性病理学	病理研究室 研究員補
小坂 忠司	課題3	免疫毒性学	短期毒性研究室 嘱託
元村 淳子	課題3	免疫毒性学および神経毒性学	短期毒性研究室 室長
近藤 圭	課題3	分析化学および計算機科学	化学部残留第1研究室 主任研究員
富山 成人	課題3	分析化学	化学部 副部長
児玉 芽吹	課題3	分析化学	化学部残留第2研究室 研究員