

2015 年度研究助成 研究成果報告書（HP掲載用）

研究課題名：周産期のヨウ素過剰摂取が脳高次機能へおよぼす影響の解明

群馬大学医学系研究科 応用生理学分野 天野出月

【研究要旨】（研究要旨を 200～300 文字程度でご記入ください。）

ヨウ素は必須微量元素のひとつで、甲状腺ホルモンの構成物質である。ヨウ素欠乏は甲状腺機能低下症を引き起こすため、古くから国際的な問題となってきた。一方、我が国はヨウ素を多量に摂取する環境におかれてきた。しかしヨウ素過剰の影響は不明な点が多いことから、マウスモデルを用いて脳機能への評価を行った。その結果、ヨウ素過剰摂取により、雌マウスで学習獲得能の上昇を認めたが、雄マウスでは社会的新奇探索性の低下を示し、海馬機能を中心として様々な影響を及ぼすことが明らかとなった。以上のことから日々の食事を通じて過不足のない適切な量のヨウ素摂取が重要であることが分かった。

【研究目的】

ヨウ素は甲状腺ホルモンの構成物質で、生体にとって必須な微量元素である。ヨウ素摂取不足は甲状腺機能低下症を来し、特に周産期では身体発育の遅れや神経発達異常を呈する（Zimmermann, *Endocr Rev*, 2009）。このことから、WHO を中心にヨウ素欠乏を防ぐ国際的な取り組みが積極的になされてきた。一方、ヨウ素は海藻類、特にコンブに多く含まれており、海洋国である我が国はヨウ素を過剰に摂取する数少ない国の一つであることが知られている。『日本人の食事摂取基準 2015（厚生労働省）』によれば、日本におけるヨウ素摂取は成人で 1-3mg/day であり、米国人の 138-353 μ g/day と比べ 10 倍程度と高値である。他国と異なりヨウ素過剰摂取しているため、甲状腺機能に少なからず影響がある可能性が示唆されている。

ヨウ素の過剰摂取は様々な表現系を呈することが知られているが、生理学的閾値を超える過剰なヨウ素摂取に対して、生体の耐容性は高いと考えられている。しかし、甲状腺疾患の既往がある者、高齢者、胎児および新生児、または他の危険因子を有する場合は、ヨウ素過剰摂取で甲状腺機能障害発症の危険性があるという報告もある。ヨウ素過剰摂取により、潜在性または顕性の甲状腺機能低下症または甲状腺機能亢進症が引き起こされる可能性があることが知られている。しかし、周産期のヨウ素過剰摂取による甲状腺機能異常が脳機能発達にどのように影響するのかは十分に研究されていない。そこで本研究では慢性ヨウ素過剰モデルマウスを作成し、甲状腺機能の変化および、タッチパネル式学習装置などを用いた認知・学習機能などの神経行動学的評価、及び分子生物学的手法を用いてそのメカニズムを明らかにすることとした。

【研究方法】

今回行ったすべての実験は群馬大学動物実験施設運営委員会の定めるガイドラインに沿って、動物実験における 3R の原則（代替法の利用、使用動物数の削減、実験方法の洗練や実験動物の苦痛軽減）を加味した倫理上問題のない実験計画を作成し、同委員会の承認を得たうえで行った。マウスは C57BL/6 を用い、群馬大学生物資源センターにて飼育を行った。室温 24℃、12 時間明暗サイクル（明期；6:00 から 18:00）の室内にて飼育し、水および餌は自由に摂取させた。

厚生労働省によると日本の成人の推奨ヨウ素量は 130ug/day、実際の摂取量が 1-3mg/day と報告されている。またバセドウ病におけるヨウ化カリウム(KI)療法では 5-100mg/day を投与されていることから、今回は通常のヨウ素摂取量に対して、x20 倍量、x200 倍量の投与を行う 2 群を実験群とした。使用した餌(CE-2, 日本クレア)にはヨウ素が 0.17mg/100g 含有されており 6ug/day 摂取していると考え、実験群には飲料水を通じて KIO₃(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)を 37.4mg/l (x20 群), 374mg/l (x200 群) の量でマウスへ投与した。対照群(control 群)には正常飲料水を使用した。また投与群へは全実験期間を通じて投与し続けた。

日本エスエルシー株式会社より成獣の C57BL/6 雌マウスを購入し、4 週間以上 KIO₃ 溶液または水を投与したのちに交配を行った。産後 21 日に仔を離乳させ、各群の仔マウスを 10 週齢まで飼育した後、行動実験を行った。新奇物体認識試験 (Object Recognition Test; ORT) および位置認識試験 (Object Location Test; OLT)、タッチパネル認識学習装置を用いた視覚弁別試験、三部屋式社会性行動試験 (3ch social interaction test) を行った。行動実験終了後に海馬の total RNA を抽出し、逆転写後 real-time PCR 法によって mRNA の発現レベルを解析した。血液・尿も採取し甲状腺ホルモンの測定、尿中ヨウ素量の測定を行った。

【研究結果】

1) ヨウ素過剰の成長発育および甲状腺機能への影響

実験期間中の仔マウスの体重推移は雌雄ともに群間の差は認めなかった。また、本モデルがヨウ素過剰モデルであることを確認するために、尿中ヨウ素濃度を ICP-質量分析法を用いて測定した。離乳時の母マウス、成獣仔マウスのサンプルを用いて測定を行った結果、control 群に対して x20 群で約 33 倍、x200 群で約 493 倍の濃度であった。このことから本モデルで想定した濃度のヨウ素摂取を行えていることを確認した。甲状腺ホルモンの測定は液体クロマトグラフィー質量分析法を用いて現在測定中であるため、甲状腺ホルモンレベルにてついて本報告書で論じることはできない。しかしヨウ素過剰である x20 群、x200 群における甲状腺では control 群に比べて腫大傾向を示し、甲状腺濾胞細胞の菲薄化を認めることから甲状腺機能低下が起きていることが示唆された。

2) ヨウ素過剰による認知学習機能への影響 (新奇物体認識試験、位置認識試験)

認知機能評価を行うため、10-11 週齢で ORT/OLT を行った。新奇物体もしくは、新奇位置への探索時間の割合を示す識別率では、ORT、OLT とも各群で差は認められなかつ

た。

3) ヨウ素過剰による認知学習機能への影響（視覚弁別試験）

視覚弁別試験はタッチパネル式オペラント学習装置を用いて行った。雄では control 群および x20 群、x200 群は試験第 1 日目ではいずれの群でも chance level であったが、2 日目以降は学習獲得にともない正反応率の上昇を認め、第 5 日目で 80% に達した。一方、雌では control 群が第 7 日目で正反応率が 80% に達したのに対して、x20、x200 群では第 4 日目で 80% に達し、学習獲得の上昇を認めた。

4) ヨウ素過剰による社会的行動への影響

社会的行動への評価をするために三部屋式社会性行動試験を行った。この試験では装置馴化、社会性を評価する試行(Session1)、社会的新規探索性を評価する試行(Session2) の 3 試行で構成される。雌雄ともにいずれの群でも Session1 では新奇個体（ストレンジャーマウス 1）への探索時間の有意な上昇を認め、社会性行動への異常は認めなかった。また Session2 ではストレンジャーマウス 2 への探索時間の有意な上昇を雌のいずれの群でも認めた一方で、雄の x200 群のみストレンジャーマウス 1、2 の各々の探索時間に有意差は認めなかった。このことから雄の x200 群では社会的新奇探索性に異常を来している可能性が示唆された。

5) ヨウ素過剰による海馬における mRNA の発現レベルへの影響

脳領域の中で、海馬は甲状腺ホルモンに対する感受性の高い部位であることが知られている。また、海馬が重要な役割を果たすとされる OLT では異常を認めなかった一方で、視覚弁別試験の結果からは海馬への影響が示唆されたため real-time PCR 法を用いて海馬における mRNA の発現レベルへの影響を調べた。甲状腺ホルモン関連遺伝子である *Nrgn*, *Ntf3*, *Bdnf*, *Mbp*, *Thrb* では各群および性別における差は認めなかったが、*Hr*, *Klf9* は性別でのみ有意差を認め、*Thra* ではヨウ素投与により発現レベルの上昇傾向を認めた。また *Nr1d1*, *Itpr1* では各群および性別による有意差を認めたが、これらの結果は一致した傾向は示さなかった。次に学習記憶に重要な影響を果たすことが知られているシナプス関連遺伝子群の解析を行った。N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)型グルタミン酸受容体サブユニットである *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*, α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メソオキサゾール-4-プロピオン酸(AMPA)型グルタミン酸受容体サブユニットである *Gria1*, *Gria2*、プレシナプス関連遺伝子である *Syn1*(Synapsin1)、*Syp*(Synaptophysin)、ポストシナプス関連遺伝子である *Dlg4*(PSD95)に変化は認めなかった。シナプス後膜肥厚の主な構成物であり、海馬の長期増強や空間学習に重要な役割を果たすとされる *Camk2a*(CAMK2 α)では x200 群で mRNA 発現量の有意な上昇を認めた。

【考察】

我が国におけるヨウ素過剰による影響の報告の一つとして海岸性甲状腺腫(coastal goiter)がある。樋口によると、北海道の海岸地方の一部では 6.9% に甲状腺腫を認め（対

照群である札幌地方では 1.3%)、病理学的にはコロイド濾胞腺腫であり、甲状腺機能は正常であったと報告している(樋口, 日本内分泌学会雑誌, 1964)。本実験でもこの報告と同様にヨウ素過剰群では甲状腺はコロイド濾胞腺腫様の変化を認めた。甲状腺機能は現在測定中のためここで過去の報告と比較することはできないが、樋口が海岸性甲状腺腫の罹患者で甲状腺機能の正常を報告している一方で Teng らはヨウ素過剰摂取者では甲状腺機能低下症を来すことを報告している (Teng ら, *N Engl J Med*, 2006)。また動物モデルではラットを用いた実験では、Zhang らは通常よりも 3 倍量のヨウ素を投与した母ラットでは TT4 および FT4 の上昇傾向を認め、一方で仔ラットでは新生仔期に軽度の TSH の上昇を認めたのみでその他は正常であったことを報告している (Zhang ら, *BMC Neuroscience*, 2012)。Xia らはマウスでは 8 倍量以上のヨウ素投与により TSH の上昇、TT3 の減少、TT4 の増加を示すことが報告されている (Xia ら, *Biol Trace Elem Res*, 2013)。ヨウ素欠乏モデルとは異なり、ヨウ素過剰モデルでは生物種やヨウ素の投与量及び投与期間、血液採取時期によって甲状腺ホルモン値は変動することが予想され、個々の実験で甲状腺ホルモン値の確認が必要であると考えられる。

ヨウ素過剰の認知学習記憶試験への影響は ORT、OLT また視覚弁別課題を用いて評価を行った。ORT および OLT はげっ歯類が新奇性を好むという特性を利用したものであり、ORT は嗅周皮質が重要な役割を果たす非空間記憶の試験、OLT は海馬が重要な役割を果たす空間記憶の試験である (Ennaceur ら, *Behav Brain Res*, 1997) (Dodart ら, *Neuroreport*, 1997)。我々は以前に甲状腺機能低下モデルマウスにおいて、ORT/OLT でそれぞれ異なる結果を得たことから、甲状腺ホルモンが脳領域によって影響が異なることを明らかにした (Amano ら, *J Physiol Sci.*, 2016)。このことから本研究でも脳領域によって異なる行動実験の結果を得ることが予想されたが、各研究手法および各群で有意差は認められなかった。またオペラント課題を用いた学習獲得の検討(視覚弁別課題)も行った。今回はヒトの認知機能評価に使用されるのと同様なタッチスクリーンをオペラント箱で使用して実験を行ったが、この実験手法は海馬機能を反映するとされる

(Clelland ら, *Science*, 2009)。OLT の結果と同様に雄では学習獲得能に差を認めなかったが、雌ではヨウ素過剰群で学習獲得能の上昇を認めた。このことからヨウ素摂取により性差はあるが、おそらく甲状腺機能の変化を通じて海馬機能発達の促進作用がある可能性が示唆された。一方で社会行動学的な影響を評価するために行った三部屋式社会性行動試験では社会性に変化は認めなかったが、雄の x200 群で社会的新奇探索性の低下を認めた。社会性記憶は腹側海馬の CA1 領域がその責任領域の一つであることが報告されており (Okuyama ら, *Science*, 2016)、OLT、視覚弁別課題の結果とは異なる海馬への影響を示す結果が得られた。甲状腺ホルモンの脳発達期における影響には臨界期があるとされ、その時期は脳領域毎にも異なる。今回行った行動実験はそれぞれ海馬機能を反映するものであるが、海馬内でもさらに責任領域が異なることが本研究の結果につながっていることが示唆される。さらに別の手法を用いた行動実験を組み合わせることに

より、詳細な解析が行えると考えられる。

行動実験からは海馬への影響が示唆されたため、成体仔マウスの海馬の mRNA 発現レベルの解析を real-time PCR 法を用いて行った。甲状腺ホルモンにより発現量の変化が起こることが知られている遺伝子 (*Nrgn*, *Hr*, *Ntf3*, *Nr1d1*, *Klf9*, *Mbp*, *Bdnf*, *Itpr1*, *Thra*, *Thrb*) の発現レベルに同一の傾向は認めなかった。これらの遺伝子に対する甲状腺ホルモンの影響が脳領域や日齢により異なることが理由の一つであると考えられるが

(Sawano ら, *Int. J. Devl Neuroscience*, 2013)、実験群で甲状腺ホルモンに大きな変化がないであろうことも要因と考えられる。一方で神経回路を構成し、情報の伝達・処理に関わるシナプスに関連する遺伝子の発現量は NMDA 受容体、AMPA 受容体、シナプス前後膜関連遺伝子の発現量に有意な変化は認めなかった。しかし、神経伝達物質合成酵素やシナプス小胞結合蛋白、イオンチャネル、神経伝達物質受容体などをリン酸化することによって、学習・記憶などに重要な役割を果たすことが知られている CAMK2 α (*Camk2a*) (Yamagata ら, *JNeurosci*, 2009) ではヨウ素過剰群で発現の上昇傾向を認め、行動実験で見られた学習獲得能の上昇を支持する結果であった。今後はリン酸化レベルの変化をみることによりメカニズムの一端を明らかにできると考えられる。

我が国は世界的にみてヨウ素摂取量の多い国であるが、このような視点から記憶学習などの脳機能への影響を評価した疫学データは報告されていない。Zava らが日本人のヨウ素摂取量を文献調査した論文の中で、米国に比べて日本人が長寿であることなどがヨウ素摂取量の違いに起因している可能性に言及しているように (Zava ら, *Thyroid Research*, 2011)、ヨウ素摂取は少なからず健康への良い影響はあると考えられる。一方でヨウ素過剰により一過性の甲状腺機能低下症や可逆的な甲状腺腫を来すことも事実である。本研究ではヨウ素の過剰摂取により雌マウス(x20 群, x200 群)で学習獲得能の上昇を認めたが、雄マウス(x200 群)では社会的新奇探索性の異常を示唆する結果を得た。いずれも海馬を中心とする機能であるが、表現型としては相反する結果であった。他国に比べて我が国の伝統的食生活はヨウ素を多くとる傾向にあるが、厚生労働省が示した 1-3mg/day (成人) の摂取量であれば問題ないことが示唆された。ただし健康目的でのサプリメントとしてのヨウ素摂取や、特に周産期におけるヨウ素摂取量の大きな変動は避けるべきであり適切な量の摂取を心がける必要があると考えられる。

【結論】

必須微量元素であるヨウ素は、甲状腺ホルモンの構成物質で、体内ヨウ素の 70-80% が甲状腺に存在するとされる。ヨウ素の欠乏は甲状腺機能低下症の原因となる一方、我が国のようなヨウ素を多量に摂取する環境は世界的にも少なく、影響には不明な点が多い。そこで本研究ではマウスモデルを用いて脳機能への評価を行った。その結果、ヨウ素過剰群では雌マウスで学習獲得能の上昇を認めたが、雄マウスでは社会的新奇探索性の低下を示し、海馬機能を中心として様々な影響を及ぼすことが明らかとなった。我が国の摂取量は他国

に比して多いが、摂取基準内であれば問題はなく、過剰摂取は控え、適切な量を摂取することが肝要である。