

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 甲状腺に対する化学物質の影響を評価する手法の研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター病理部・室長

(氏名・フリガナ) 豊田 武士・トヨダ タケシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 甲状腺に対する化学物質の影響を評価する手法の研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター病理部・部長

(氏名・フリガナ) 小川 久美子 ・ オガワ クミコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 甲状腺に対する化学物質の影響を評価する手法の研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター病理部・室長

(氏名・フリガナ) 石井 雄二・イシイ ユウジ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 甲状腺に対する化学物質の影響を評価する手法の研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター 病理部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 赤根 弘敏・アカネ ヒロトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

甲状腺に対する化学物質の影響を評価する手法の研究

(21KD1003)

令和3年度 研究報告書

研究代表者 豊田武士

令和 4 (2022) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

甲状腺に対する化学物質の影響を評価する手法の研究 豊田武士、小川久美子、石井雄二、赤根弘敏	----- 1
--	---------

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 17
--------------------	----------

甲状腺に対する化学物質の影響を評価する手法の研究

研究代表者 豊田武士 国立医薬品食品衛生研究所病理部 室長

研究要旨

内分泌攪乱物質のヒト健康への影響は広く検討されているが、化学物質による抗甲状腺作用の評価方法については、いまだコンセンサスが得られていない。本研究では、ラット組織を用いた病理組織学的・免疫組織化学的検索による、化学物質の甲状腺影響の *in vivo* 評価法確立を目指す。令和 3 年度は、計 4 種の抗甲状腺物質をラットに 28 日間反復経口投与し、血清ホルモン値と各種検索項目との比較を行った。甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤（PTU・MMI）は、用量依存的な血清 T3・T4 低下および TSH 増加を引き起こした。一方、病理組織学的検査での甲状腺濾胞上皮肥大および免疫組織化学的検索での甲状腺の T4 発現低下は、血清 T3・T4・TSH 値の有意な変動を伴わない、より低い用量から認められた。また、甲状腺重量および下垂体前葉における TSH 陽性面積率の増加が、血清 T4 値の減少と同用量で認められ、これらの指標も抗甲状腺作用の評価に有用と考えられた。さらに、甲状腺・下垂体における網羅的遺伝子発現解析により、新規マーカー候補が多数見出された。以上の結果は、甲状腺の病理組織学的検索および T4 免疫染色が、化学物質の抗甲状腺作用の早期検出において鋭敏な指標となり得ることを示唆する。今後、他の機序による甲状腺機能阻害剤について検討を継続する予定である。

研究分担者

小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所病理部 部長
石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所病理部 室長
赤根弘敏 国立医薬品食品衛生研究所病理部 主任研究官

A. 研究目的

内分泌攪乱物質のヒト健康への影響は以前より広く検討されてきた。甲状腺機能低下を引き起こす化学物質についても、次世代影響を含め、人体に影響を及ぼすことは広く知られている。OECD は、2014 年に甲状腺ホルモンの伝達経路に影響を与える化学物質の検出法に関する Scoping Document を発出し、機序に基づく検索手法案を取りまとめた。また、2018 年の試験法ガイドライン改定では、90 日間反復経口投与毒性試験（TG 408）に内分泌攪乱関連指標の検索が追加され、甲状腺関連ホルモン（トリヨードサイロニン；T3、サイロキシン；T4、甲状腺刺激ホルモン；TSH）および甲状腺重量の測定、ならびに血中総コレステロール・LDL・HDL 値の測定が求められることとなった。2019 年には欧州食品安全機関（EFSA）から甲状腺に影響を及ぼす農薬に関する検討が必要とする報告、2020 年には EU から甲状腺ホルモン攪乱化学物質検索法の必要性に関する論文、米国環境保護庁（EPA）からも残留性有機汚染物質（POPs）としても知られる perfluorohexane sulfonate（PFHxS）の長期曝露影響に関連して甲状腺ホルモン攪乱作用の高感度な検索法が必要であるとする報告がなされている。しかしながら、血清ホルモン値は採取時の条件による変動が大きく、化学物質曝露による甲状腺機能調節の評価方法については、いまだコンセンサスが得られていない。

我々は、厚生労働行政推進調査事業費・化学物質リスク研究事業（H30-化学-指定-003）（平成 30 年～令和 2 年度）において、甲状腺に毒性を示す種々の化学物質を単一用量でラットに 28 日間経口投与し、血清 T3・T4・TSH 濃度および甲状腺 T4・下垂体 TSH 発現を免疫組織化学的に検索した。その結果、血清 T4 値低下および TSH 増加を、組織を用いた免疫組織化学染色によって簡便かつ鋭敏に検出可能であることが明らかになった。内分泌攪乱は、甲状腺ホルモンの異常のみならず、発がん性、発達神経毒性、生殖発生毒性にも関わることから、より詳細な検討が必要と考えられる。

本研究では、国際機関および諸外国等における、甲状腺ホルモン攪乱化学物質の判定に利用可能な評価手法ならびに評価実績の情報収集を実施するとともに、ラット組織を用いた病理組織学的・免疫組織化学的検索による、化学物質の甲状腺影響の *in vivo* 評価法確立を目指す。

B. 研究方法

甲状腺機能に影響を及ぼす種々の化学物質をラットに 28 日間、複数用量で経口投与し、各種内分泌器官の臓器重量および血清ホルモン値を測定する。また、甲状腺・下垂体等について、病理組織学的・免疫組織化学的・分子生物学的検索を実施する。これらの中から、最も鋭敏あるいは毒性学的意義（機序の特定に有用等）を有するパラメータの組み合わせを検索し、化学物質の甲状腺影響の *in vivo* 評価法確立を目指す。また、研究期間を通じて、諸外国・国際機関における甲状腺機能評価に関する情報を収集する。

1. ラットを用いた 28 日間反復経口投与試験（豊田・

赤根)

6週齢のSDラット(各群雌雄5匹;日本チャールス・リバー)に対し、甲状腺ホルモン動態への影響が想定される計4物質を28日間反復経口投与した。

Propylthiouracil (PTU)/Methimazole (MMI)

甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤であるPTUおよびMMIを、それぞれ0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/kgおよび0.3, 1, 3, 10 mg/kgの用量で28日間強制経口投与した。最終投与翌日に採血および解剖し、甲状腺・下垂体・副腎等の重量測定ならびに病理組織学的検索を実施した。また、採取した血清を用いて、T3・T4・TSH・副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)・プロラクチン(PRL)・卵巣刺激ホルモン・黄体ホルモン・エストラジオール・プロゲステロン・テストステロンの測定を実施した。さらに、甲状腺におけるT4、下垂体におけるTSH・ACTH・PRLの免疫組織化学的検索を実施した。TSHについては、下垂体前葉における陽性細胞の面積率を測定した。

Phenobarbital sodium salt (NaPB)/Nicardipine hydrochloride (NCD)

甲状腺ホルモンの代謝促進により抗甲状腺機能を示す物質として、NaPBおよびNCDをそれぞれ10, 30, 100 mg/kgおよび15, 50, 150 mg/kgの用量で、PTU・MMIと同様の方法・検索項目による28日間反復投与試験を実施した。

2. ラット甲状腺および下垂体における網羅的遺伝子発現解析(石井)

甲状腺機能阻害物質投与時のラット甲状腺および下垂体における遺伝子発現変動を検討するため、抗甲状腺物質2種(PTU・MMI)の28日間反復経口投与を実施した。6週齢のSDラット(各群雄7匹;日本チャールス・リバー)に、溶媒(精製水)、1 mg/kg PTU、10 mg/kg MMIを28日間強制経口投与した。投与用量は前述の豊田・赤根らの研究で、抗甲状腺作用の明らかな影響が認められた用量として設定した。各群7例のうち3例は病理組織学的検索用とし、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定後、甲状腺および下垂体重量を測定した。残る4例はRNA抽出用とし、採材した甲状腺・下垂体は直ちに1 mLのIsogen(ニッポン・ジーン社)でホモジナイズし、-80°Cで凍結保存後、total RNAを抽出した。

RNA濃度はNanoDrop ND-1000(Thermo Fisher Scientific社)で測定し、RINの評価はRNA6000 Nano kitおよびAgilent 2100 バイオアナライザ(Agilent社)により測定した。200 ngのtotal RNAからビオチン標識cRNAを合成し、1.65 µgのcRNAにてWhole Rat Genome Microarray Ver3.0 4x44K(G2519F#28282、Agilent社)にハイブリダイズした。アレイのスキューンは、Agilent Microarray Scannerで解析した。階層クラスタリングなどのアレイデータマイニング解析にはGeneSpring GX ver. 14.9を用い、擬陽性率(FDR; False discovery rate)を0.05以下、かつCut off値を発現量比(FC; fold change) >2.0で条件を満たす転写産物をマイクロアレイデータから抽出した。

3. 国際機関および諸外国等における甲状腺機能評価に関する情報収集(小川)

国際学会への直接参加が困難な状況であるため、インターネットを介して欧州毒性学会、米国毒性学会における甲状腺ホルモン関連毒性についてのトピックスを検索した。さらに、JECFA, EFSA, WHO, FDA等からの情報発信およびPubMedをはじめとする検索エンジンを用いて甲状腺ホルモン変動に関する論文等の情報収集を行った。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

C. 研究結果

1. ラットを用いた28日間反復経口投与試験

1-1. 血清ホルモン値(Table 1)

PTU投与群では、雄1 mg/kg以上および雌3 mg/kgでT3の低下、雌雄の1 mg/kg以上でT4の低下、雄0.3 mg/kg以上および雌1 mg/kg以上でTSHの増加が、統計学的有意差をもって認められた(Table 1-1)。雄0.03 mg/kg投与群でみられたT4増加は、用量依存性を欠くことから偶発的な変化と考えられた。

MMI投与群では、雄3 mg/kg以上でT3・T4低下およびTSH増加が、雌10 mg/kgでT4低下およびTSH増加が認められた(Table 1-2)。

NaPB投与群では、雄100 mg/kgでT4の低下が認められた(Table 1-3)。

NCD投与群では、雄150 mg/kgでT4の低下、雌雄150 mg/kgでTSH増加が認められた(Table 1-4)。

PRLおよび測定した他の血清ホルモン値については、いずれも投与に関連する変化は認められなかった。

1-2. 臓器重量(Table 2)

PTU投与群では、雌雄1 mg/kg以上で甲状腺絶対/相対重量の増加、雄1 mg/kg以上で下垂体相対重量の増加、雄1 mg/kg以上および雌3 mg/kgで副腎絶対/相対重量の低下がみられた(Table 2-1)。

MMI投与群では、雄3 mg/kg以上および雌10 mg/kgで甲状腺絶対/相対重量の増加、雄10 mg/kgで下垂体相対重量の増加、雄10 mg/kgで副腎絶対重量の低下、雌10 mg/kgで副腎絶対/相対重量低下が認められた(Table 2-2)。

NaPB投与群では、雌雄100 mg/kgで肝絶対重量の増加、雄30 mg/kg以上および雌100 mg/kgで肝相対重量の増加、雌雄100 mg/kgで甲状腺絶対/相対重量の増加、雌100 mg/kgで副腎絶対/相対重量の増加がみられた(Table 2-3)。

NCD投与群では、雌雄50 mg/kg以上で肝絶対/相対重量の増加、雌150 mg/kgで甲状腺絶対/相対重量の増加が認められた(Table 2-4)。

1-3. 病理組織学的検索(Table 3)

PTU投与群の甲状腺では、甲状腺濾胞上皮細胞の肥大/過形成およびコロイド退縮の発生頻度増加が雌雄0.1

mg/kg 以上で認められ、このうち濾胞上皮細胞肥大は 0.1 mg/kg においても統計学的に有意な増加を示した (Table 3-1)。下垂体前葉では、肥大/空胞化の有意な発生頻度増加が雄 0.3 mg/kg 以上および雌 1 mg/kg 以上で認められた。また、副腎皮質の萎縮が雄 1 mg/kg 以上および雌 3 mg/kg で観察された。

MMI 投与群では、甲状腺濾胞上皮細胞肥大、過形成およびコロイド退縮の発生頻度増加がそれぞれ雌雄 0.3, 1, 3 mg/kg 以上で観察され、このうち濾胞上皮細胞肥大は雄 0.3 mg/kg においても統計学的に有意であった (Table 3-2)。下垂体前葉では、雄 1 mg/kg 以上で肥大/空胞化、雌 10 mg/kg で肥大の有意な発生頻度増加認められた。また、副腎皮質の萎縮が、雄 3 mg/kg 以上で観察された。

1-4. 免疫組織化学的検索：甲状腺 T4

PTU および MMI 投与群の甲状腺における T4 発現を、免疫染色により検索した。対照群では濾胞上皮細胞の細胞質および管腔表面における T4 発現が認められた (Figure 1)。これらの T4 発現レベルは、病理組織学的検索において濾胞上皮細胞の肥大が認められた用量と一致し、PTU 投与群では雌雄 0.1 mg/kg 以上、MMI 投与群では雄 0.3 mg/kg および雌 1 mg/kg 以上で、有意な低下が観察された (Table 3, Figure 1)。

1-5. 免疫組織化学的検索：下垂体 TSH・PRL・ACTH

PTU および MMI 投与群の下垂体前葉における TSH・PRL・ACTH 発現を、免疫染色により検索した。PTU 投与群では雌雄 1 mg/kg 以上で、MMI 投与群では雄 3 mg/kg 以上および雌 10 mg/kg で、TSH 陽性細胞面積率の有意な増加が認められた (Figure 2, 3)。また、TSH 陽性面積率は、血清 TSH レベルと明瞭な相関関係を有することが示された (Figure 4)。

一方、下垂体前葉における PRL および ACTH 発現については、対照群と各投与群との間で明らかな差は認められなかった。

2. ラット甲状腺および下垂体における網羅的遺伝子発現解析

2-1. 体重・摂餌量・臓器重量 (Figure 5)

PTU・MMI 投与群では投与 2 週目から摂餌量の減少がみられ、対照群に比して PTU 投与群では 3 週目から、MMI 投与群では 2 週目から有意な体重増加抑制が認められた (Figure 5)。PTU・MMI 投与群における甲状腺の臓器重量は、絶対/相対重量ともに対照群に比して明らかな高値を示した。

2-2. 病理組織学的検索 (Figure 6)

PTU・MMI 投与群では検索した全例において甲状腺濾胞上皮細胞の肥大/過形成とコロイド退縮が (Figure 6)、下垂体前葉では肥大/空胞化が認められた。

2-3. マイクロアレイ解析 (Table 4, Figure 7)

甲状腺および下垂体のいずれにおいても、対照群と投与群は異なるクラスターとして分類された (Figure 7)。また、下垂体では PTU・MMI 投与群は異なるクラス

ターとして分類された一方、甲状腺では両者は類似した集団として認識された。

甲状腺では、PTU・MMI 投与によって発現増加した遺伝子がそれぞれ 398・444 あり、うち 336 遺伝子が共通していた。また、発現低下した遺伝子が PTU で 772、MMI で 775 あり、うち 676 遺伝子が共通していた。下垂体では、PTU・MMI 投与によって発現増加した遺伝子がそれぞれ 271・293 あり、うち 239 遺伝子が共通していた。発現低下した遺伝子が PTU で 352、MMI で 322 あり、うち 275 遺伝子が共通であった。PTU・MMI 投与群に共通して発現増加を示した遺伝子のうち、変動が大きい上位 100 遺伝子を Table 4 に示す。

3. 国際機関および諸外国等における甲状腺機能評価に関する情報収集

欧州毒性学会では生涯教育コースのセッション “Thyroid hormones, brain development and toxicity testing” として以下の講演があった。

- ・発達期における甲状腺ホルモンの作用と攪乱: 妊娠、脳、ラット対ヒトについて
- ・妊娠中の甲状腺ホルモン低下と神経発達への影響
- ・甲状腺機能の安全性: *in vitro* 試験バッテリー開発
- ・将来への提言: OECD/EPA ガイドライン研究における甲状腺ホルモン測定からの教訓
- ・発達中の脳における有害作用のエンドポイント検索
- ・テストガイドラインの現状: まだ何が足りないか?

これらは、Korevaar (Lancet Diabetes Endocrinol, 4: 35-43, 2016) および Levie (J Clin Endocrinol Metab, 103: 296702979, 2018) による、妊娠初期の母体における甲状腺機能低下が子供の IQ 等の神経発達に影響するとの臨床報告に基づき、EPA 等から提案された化学物質曝露による甲状腺機能攪乱作用の制御が必要との議論 (Gilbert et al., Endocrinology, 161: 1-17, 2020)、EFSA の甲状腺に影響を及ぼす農薬の累積リスク評価の必要性に関する報告 (EFSA J, 17: 5801, 2019) および欧州の ATHENA Project (Assays for the identification of Thyroid Hormone axis-disrupting chemicals: Elaborating Novel Assessment strategies) による甲状腺ホルモン攪乱化学物質検索法の必要性に関する論文 (Kortenkamp et al., Int J Mol Sci, 21: 3123, 2020) に沿った内容と考えられた。

第 61 回米国毒性学会では、甲状腺に関連する毒性影響について、シンポジウムおよび 12 題のポスターが欧州・米国の大学・企業ならびに EPA から発表された。ポスター発表のうち 6 題は *in vivo* 研究 (アフリカツノガエル 1 題、ラット胎内曝露試験 5 題)、5 題は機序に基づく検討 (physiologically based kinetic 2 題、数理モデルおよび AOP を考慮した検討 3 題)、1 題はヒト甲状腺細胞の 3 次元培養に関するものであった。State-of-the-Science on Thyroid Hormone Regulation and Disruption during Neurodevelopment と題するシンポジウムでは、胎児の脳の発達における甲状腺ホルモン変動の影響に関して、AOP のデータギャップおよび齧歯類における肝酵素誘導による二次的影響等も考慮した議論がなされた。1 題はヒトの臨床データから、TSH よ

りも T4 の値が IQ と関連している可能性、および甲状腺ホルモン値の高低に関わらず神経発達への影響がみられるものの、機序については不明としていた。2 題は AOP に関する演題であり、T4 の低下が 5 つの AOP のキーイベントとなっていること、どのような情報が不足しているのか、等について議論された。他の 2 題は、ラットを用いた次世代影響に関する演題であり、NaPB または PFHxS を母動物に投与した場合の母動物および仔動物の酵素・ホルモン変動、遺伝子誘導について発表されていた。特に、NaPB を 75 mg/kg 体重/日までの用量で妊娠期のラットに投与した場合、肝臓における CYP2A1・UGT2b1 誘導はそれぞれ母動物・仔動物で高い一方、T4 のクリアランスを示す T4-gIuc は母動物では増加しながら、仔動物では変動しなかった。また、血清 T4・T3 の低下は母/仔動物ともに観察され、TSH の変動は両者とも伴わなかったことから、仔動物の T4 低下は母動物の T4 低下による二次的変化と考察されており、各方面からの議論があった。本演題では、脳関連パラメータについても検討中とされており、今後の結果が注目される。また EPA から、ラットへの PFHxS または PTU 投与によって脳で発現誘導される遺伝子は、共通するものがないほど異なっているとの発表があった。

論文発表については、欧米企業のグループから、母体の甲状腺ホルモン攪乱による子供の神経発達への影響評価に関する総説 (Marty et al., Critic Rev Toxicol, 51: 328-58, 2021) が報告されている。また、EPA から報告された PFHxS による甲状腺機能攪乱作用 (Ramhøj et al., Sci Rep, 10: 2672, 2020) については、イタリアのグループ (Coperchini et al., Frontier Endocrinol, 11: 1, 2021) も注目している。

さらに、欧州消費者安全科学委員会 (Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS) が 2021 年 10 月の会議の結論として、甲状腺機能への影響に対する懸念等からコウジ酸の化粧品への配合濃度を従来の 1% から 0.04% に引き下げる提言 (https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/scs_s_o_259.pdf) を発表しており、本邦への影響も注視が必要と考えられた。当該案件については、SCCS と企業との議論によって最終案は 0.7% とされたが、特に欧州での甲状腺機能影響に対する感心の高さを反映していると考えられた。

D. 考察

1. ラットを用いた 28 日間反復経口投与試験

OECD ガイドラインおよび化審法に規定される齧歯類を用いた 28 日間反復経口投与試験に準じて、抗甲状腺物質をラットに複数用量で投与し、臓器重量測定および病理組織学的・免疫組織化学的検索を実施し、血清ホルモン値との比較を行った。

令和 3 年度の被験物質として、甲状腺ホルモン合成に必須の酵素である甲状腺ペルオキシダーゼの阻害剤である PTU および MMI を用いた。その結果、両物質とも用量依存的な血清 T3・T4 低下および TSH 増加を引き起こした。甲状腺重量および下垂体前葉の TSH 陽性面積率の有意な増加が、雌雄ともに血清 T4 値の減少と同

用量で認められ、これらの指標は抗甲状腺作用の評価に有用と考えられた。また、下垂体前葉の TSH 陽性面積率は、血清 TSH 値と明瞭な相関を示したことから、血清 TSH レベルの変動は病理組織標本によっても予測可能であることが示唆された。

最も重要な結果として、病理組織学的検査における甲状腺濾胞上皮細胞の肥大および免疫組織化学的検索における甲状腺の T4 発現低下は、血清 T3・T4 (PTU: 1 mg/kg 以上、MMI: 3 mg/kg 以上) および TSH (PTU: 0.3 mg/kg 以上、MMI: 1 mg/kg 以上) 値の有意な変動を伴わない、より低い用量 (PTU: 0.1 mg/kg 以上、MMI: 0.3 mg/kg 以上) から、統計学的有意差をもって認められた。この結果は、甲状腺の病理組織学的検索および T4 免疫染色が、甲状腺機能に影響を及ぼす物質の検出において、より鋭敏な指標である可能性を示唆するものである。

甲状腺ホルモン動態への影響は酵素阻害だけではなく、ヨウ素の取り込み阻害など、他の複数の機序で起こることが知られている。甲状腺組織を用いた検索手法が、他のメカニズムによる甲状腺機能阻害をも検出し得るか検討が必要と考えられる。そこで、本年度の追加被験物質として、肝薬物代謝酵素の発現誘導を介した抗甲状腺機能が知られる NaPB および NCD について、28 日間反復投与試験を同様に実施した。

その結果、両物質の投与群で血清 T4 低下および肝・甲状腺重量の増加、NCD 投与群で血清 TSH 増加が認められた。ラットでは肝薬物代謝酵素 UDPGT の発現亢進によって血清 T4 の排泄が促進され、TSH の分泌亢進と甲状腺刺激が誘導されることが知られており、これに沿う結果と考えられた。今後令和 4 年度にかけて、病理組織学的検索および免疫組織化学的検索を実施し、これらの検索手法の有用性を検討する予定である。

2. ラット甲状腺および下垂体における網羅的遺伝子発現解析

体重・臓器重量測定および病理組織学的検索の結果、前述のラットを用いた PTU・MMI の 28 日間反復経口投与試験と同様の傾向が認められ、甲状腺・下垂体への影響が再現されたことを確認した。同条件下において、両臓器では多数の遺伝子の発現変動が認められ、甲状腺では発現変動した遺伝子の 73.5% が、下垂体では 71.0% が PTU・MMI 投与群で共通していた。これは両物質の甲状腺への作用機序 (ペルオキシダーゼ阻害) が同じであることに起因すると考えられた。これら遺伝子のうち、特に発現増加した遺伝子について精査し、抗甲状腺機能を示唆する新規バイオマーカーとしての探索とともに、メカニズム特定への応用を今後検討していく予定である。

3. 国際機関および諸外国等における甲状腺機能評価に関する情報収集

欧州毒性学会および米国毒性学会においては、引き続き甲状腺ホルモンの神経発達への影響が話題とされ、化学物質の長期曝露による甲状腺発がんに対する懸念のみならず、母体における甲状腺機能低下が短期間であっても子供の神経発達に影響を及ぼす可能性が注目

されていた。EPAからもラットを用いた *in vivo* 研究が発表されており、一部予測と異なる結果が得られていた。特に、仔動物における T4・T3、TSH 等の値を得ることが求められるが、技術的な問題もあるものと推察された。また、過去の試験について、血清の保存がされていない場合でも、パラフィン包埋ブロックとして通常保存される病理組織サンプルを用いた評価が可能であれば、より多くの情報が得られると考えられた。

E. 結論

令和3年度の研究結果から、甲状腺の病理組織学的検索およびT4免疫染色が、甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤による抗甲状腺作用の早期検出において鋭敏な指標となり得ることが示唆された。甲状腺・下垂体を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果から、多数の新規バイオマーカー候補が見出された。今後、肝臓における甲状腺ホルモン代謝促進等、他の機序に基づく甲状腺機能阻害物質についても検討を継続する予定である。国際学会・機関からの情報収集では、甲状腺機能の調節には多くの因子が関与していることから、遺伝子発現変動を含めた機序解明にはさらなる検討が必要とされていた。また、甲状腺機能攪乱を簡便に評価する方法とともに、神経発達毒性に対する影響をも検討可能な方法が求められていた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] [Akane H](#), [Toyoda T](#), Mizuta Y, Cho YM, Ide T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, [Ogawa K](#). Histopathological and immunohistochemical evaluation for detecting changes in blood hormone levels caused by endocrine disruptors in a 28-day repeated-dose study in rats. *J Appl Toxicol*. In press.
- [1] [Toyoda T](#), Matsushita K, [Akane H](#), Morikawa T, [Ogawa K](#). A 13-week subchronic toxicity study of 2-(*I*-menthoxy)ethanol in F344 rats. *J Toxicol Pathol*. 2021; 34: 309-17.
- [2] Yamada T, [Toyoda T](#), Matsushita K, Cho YM, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, [Ogawa K](#). Expression of stem cell markers as useful complementary factors in the early detection of urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for γ -H2AX. *Arch Toxicol*. 2021; 95: 715-26.
- [3] Yamada T, [Toyoda T](#), Ide T, Matsushita K, Morikawa T, [Ogawa K](#). Neuromuscular and vascular hamartoma of the small intestine in an F344 rat. *J Toxicol Pathol*. 2021; 34: 113-7.
- [4] Kobayashi T, [Toyoda T](#), Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, [Ogawa K](#), Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. *o*-Anisidine dimer, 2-methoxy-*N*⁴-(2-methoxyphenyl) benzene-1,4-diamine, in rat urine associated with urinary

- bladder carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*. 2021; 34: 912-9.
- [5] Matsushita K, Takasu T, [Ishii Y](#), [Toyoda T](#), Yamada T, Morikawa T, [Ogawa K](#). *In vivo* mutagenicity and tumor-promoting activity of 1,3-dichloro-2-propanol in the liver and kidneys of *gpt* delta rats. *Arch Toxicol*. 2021; 95: 3117-31.
- [6] Matsushita K, [Toyoda T](#), Yamada T, Morikawa T, [Ogawa K](#). Specific expression of survivin, SOX9, and CD44 in renal tubules in adaptive and maladaptive repair processes after acute kidney injury in rats. *J Appl Toxicol*. 2021; 41: 607-17.
- [7] Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, [Toyoda T](#), Sato F, Kitajima S, [Ogawa K](#), Izutsu K, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Homma M, Okuda H, Goda Y. Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m ciclesonide aerosol by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharm*. 2021; 595: 120241.
- [8] Mitsumoto T, [Ishii Y](#), Namiki M, Nakamura K, Takasu S, [Ogawa K](#). A 90-day subchronic toxicity study of Myrrh in F344 rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2021; 127: 105076.
- [9] Nakamura K, [Ishii Y](#), Takasu S, Nohmi T, Shibutani M, [Ogawa K](#). Chromosome aberrations induced by the non-mutagenic carcinogen acetamide involve in rat hepatocarcinogenesis through micronucleus formation in hepatocytes. *Arch Toxicol*. 2021; 95: 2851-65.
- [10] Nishikawa A, Nagano K, Kojima H, [Ogawa K](#). A comprehensive review of mechanistic insights into formaldehyde-induced nasal cavity carcinogenicity. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2021; 123: 104937.
- [11] Matsushita K, [Ishii Y](#), Kijima A, Takasu S, Kuroda K, Takagi H, Nohmi T, [Ogawa K](#), Umemura T. Background data of 2-year-old male and female F344 *gpt* delta rats. *J Toxicol Pathol*. 2021; 34: 3-31.
- [12] Yasui M, Fukuda T, Ukai A, Maniwa J, Imamura T, Hashizume T, Yamamoto H, Shibuya K, Narumi K, Fujiishi Y, Okada E, Fujishima S, Yamamoto M, Otani N, Nakamura M, Nishimura R, Ueda M, Mishima M, Matsuzaki K, Takeiri A, Tanaka K, Okada Y, Nakagawa M, Hamada S, Kajikawa A, Honda H, Adachi J, Masaki K, [Ogawa K](#), Honma M. Weight of evidence approach using a TK gene mutation assay with human TK6 cells for follow-up of positive results in Ames tests: a collaborative study by MMS/JEMS. *Genes Environ*. 2021; 43: 7.
- [13] Ide T, Cho YM, Oishi Y, [Ogawa K](#). Spontaneous

- adenolipoma of the mammary gland in a male F344 rat. *J Toxicol Pathol.* 2021; 34: 231-4.
- [14] Nakamura K, Ishii Y, Takasu S, Ogawa K. A 90-day subchronic toxicity study of 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2021; 150: 112041.
- [15] Ishii Y, Takasu S, Grúz P, Masumura K, Ogawa K, Nohmi T, Umemura T. The role of DNA polymerase ζ in benzo[*a*]pyrene-induced mutagenesis in the mouse lung. *Mutagenesis.* 2021; 36: 155-64.
- [16] Marques MM, Beland FA, Lachenmeier DW, Phillips DH, Chung FL, Dorman DC, Elmore SE, Hammond SK, Krstev S, Linhart I, Long AS, Mandrioli D, Ogawa K, Pappas JJ, Parra Morte JM, Talaska G, Tang MS, Thakur N, van Tongeren M, Vineis P, Benbrahim-Tallaa L, Chung F, Das S, El Ghissassi F, Grosse Y, Guyton KZ, Korenjak M, Lauby-Secretan B, Liu Y, Mattock H, Middleton D, Miranda-Filho A, Schubauer-Berigan MK, Suonio E, Talukdar FR. Carcinogenicity of acrolein, crotonaldehyde, and arecoline. *Lancet Oncol.* 2021; 22:19-20.
- ## 2. 学会発表
- 1) 豊田武士、小林琢磨、三好規之、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. オルト-トルイジンおよびオルト-アニシジン代謝物の 28 日間反復経口投与によるラット膀胱への影響. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、兵庫県、(2022 年 1 月)
 - 2) 豊田武士、赤根弘敏、小川久美子. γ -H2AX 免疫染色によるラット腎発がん物質早期検出法の開発. 第 80 回日本癌学会学術総会、神奈川県、(2021 年 10 月)
 - 3) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. γ -H2AX 免疫染色を用いた芳香族アミンのラット膀胱に対する傷害性および発がん性短期評価手法. 第 48 回日本毒性学会学術年会、兵庫県、(2021 年 7 月)
 - 4) 石井雄二. 脱離エレクトロスプレーイオン化法 (DESI) による質量分析イメージングを用いた組織切片上における化学物質及び代謝物の局在評価. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、兵庫県、(2022 年 1 月)
 - 5) 石井雄二、中村賢志、瀧本憲史、満元達也、並木萌香、渋谷淳、小川久美子. F344 ラットにおける acetamide 誘発肝腫瘍の全ゲノム解析. 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会、神奈川県、(2021 年 11 月)
 - 6) 石井雄二、中村賢志、並木萌香、高須伸二、小川久美子. 脱離エレクトロスプレーイオン化-質量分析イメージング (DESI-MSI) による腎発がん物質アカネ色素構成成分のラット腎臓における分布解析. 第 48 回日本毒性学会学術年会、兵庫県、(2021 年 7 月)
 - 7) 石井雄二、中村賢志、並木萌香、高須伸二、小川久美子. 質量分析イメージングを用いたラット腎臓におけるアントラキノン系色素成分の分布解析. 日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会、Web 開催、(2021 年 6 月)
 - 8) 赤根弘敏、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子. ラットにおける化学物質誘発抗甲状腺作用検出における病理組織学的及び免疫組織化学的手法と血中ホルモン値との比較. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、兵庫県、(2022 年 1 月)
 - 9) 赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. ラット膀胱発がん物質早期検出における γ -H2AX 免疫染色の特異性. 第 80 回日本癌学会学術総会、神奈川県、(2021 年 10 月)
 - 10) 赤根弘敏、豊田武士、水田保子、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子. 内分泌攪乱物質による血中ホルモン値変動と病理組織学的・免疫組織化学的評価. 第 48 回日本毒性学会学術年会、兵庫県、(2021 年 7 月)
 - 11) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 薬剤性腎障害の慢性化を予測するバイオマーカーとしての CD44 の有用性の検証. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、兵庫県、(2022 年 1 月)
 - 12) 高須伸二、石井雄二、並木萌香、中村賢志、能美健彦、小川久美子. *gpt* delta ラットを用いた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的毒性評価. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、兵庫県、(2022 年 1 月)
 - 13) 瀧本憲史、石井雄二、満元達也、並木萌香、高須伸二、能美健彦、渋谷淳、小川久美子. 細胞質内封入体が示す methyl carbamate の染色体異常と肝発がんへの関与. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、兵庫県、(2022 年 1 月)
 - 14) 満元達也、石井雄二、瀧本憲史、並木萌香、高須伸二、能美健彦、小川久美子. Rubiadin の腎臓における局在と病理組織学的変化が示す部位特異的な遺伝毒性. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、兵庫県、(2022 年 1 月)
 - 15) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. F344 ラットを用いたナノサイズ酸化チタン (IV) の 28 日間反復経口投与毒性試験. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、兵庫県、(2022 年 1 月)
 - 16) 水田保子、曹永晩、赤木純一、井手鉄哉、小川久美子. マウス腹腔内投与におけるポリビニルピロリドンでコートされた銀ナノ球と銀ナノプレートの急性毒性の差異. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、兵庫県、(2022 年 1 月)
 - 17) 相馬明玲、日比大介、高須伸二、石井雄二、梅村隆志. 肝発がん物質フランの葉特異的毒性発現. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、兵庫県、(2022 年 1 月)
 - 18) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 急性腎障害後に発現する CD44 は部分的上皮間葉転換を生じた尿細管において細胞外基質産生を誘導し、慢性腎臓病への移行を促進する. 第 4 回医薬品毒性機序研究会、Web 開催、(2021 年 12 月)
 - 19) 増田寛喜、豊田武士、野村幸世. ラット外科的逆流

- モデルにおけるバレット食道に対する MEK インヒビターの治療効果の検討. 第 32 回日本消化器癌発生学会総会、Web 開催、(2021 年 11 月)
- 20) 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之. 単環芳香族アミンの遺伝毒性に関わる代謝活性化機構. 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会、神奈川県、(2021 年 11 月)
- 21) 並木萌香、石井雄二、中村賢志、瀧本憲史、満元達也、高須伸二、小川久美子. CHL/IU 細胞と RL-34 細胞を用いたラット肝発がん物質 acetamide の *in vitro* 小核試験. 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会、神奈川県、(2021 年 11 月)
- 22) 満元達也、石井雄二、瀧本憲史、並木萌香、高須伸二、能美健彦、小川久美子. 腎発がん物質 rubiadin のグアニン DNA 付加体に対する DNA Polymerase ζ の選択的作用. 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会、神奈川県、(2021 年 11 月)
- 23) 松下幸平、高須伸二、石井雄二、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. *gpt delta* ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法による 1,3-dichloro-2-propanol の発がん機序の解明. 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会、神奈川県、(2021 年 11 月)
- 24) 田中美咲、竹入章、松崎香織、田中健司、小川久美子、安井学、杉山圭一、本間正充、三島雅之. Ames 試験陽性フォローアップとしての TK6 細胞 γ H2AX 評価系の有用性検討；構造異性体および類縁体からの検証. 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会、神奈川県、(2021 年 11 月)
- 25) 孫雨晨、齊藤公亮、牛木淳人、安部光洋、齋藤好信、柏田建、堀益靖、弦間昭彦、巽浩一郎、服部登、津島健司、荒川憲昭、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子、佐藤元信、高松一彦、森和彦、西矢剛淑、泉高司、大野泰雄、齋藤嘉朗、花岡正幸. メタボローム解析を用いた薬剤性間質性肺炎のバイオマーカー探索. 第 65 回日本薬学会関東支部大会、Web 開催、(2021 年 9 月)
- 26) 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之. 単環芳香族アミン化合物の試験管内反応による二量体形成. がん予防学術大会 2021、Web 開催、(2021 年 9 月)
- 27) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. シスプラチン誘発 AKI to CKD モデルラットにおける CD44 の病態生理学的役割. 第 164 回日本獣医学会学術集会、Web 開催、(2021 年 9 月)
- 28) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. シスプラチン誘発急性腎障害から慢性腎臓病への進展における CD44 の発現. 第 48 回日本毒性学会学術年会、兵庫県、(2021 年 7 月)
- 29) 中村賢志、石井雄二、河上強志、田原麻衣子、高須伸二、並木萌香、渋谷淳、小川久美子. Acetamide のラット肝発がん性における系統差に基づいた肝発がん機序に関する検討. 第 48 回日本毒性学会学術年会、兵庫県、(2021 年 7 月)
- 30) 高須伸二、石井雄二、中村賢志、並木萌香、能美健彦、小川久美子. *gpt delta* ラットを用いた 1,3-dichloro-2-propanol の肝発がん機序の検索. 第 48 回日本毒性学会学術年会、兵庫県、(2021 年 7 月)
- 31) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、曾根瑞季、小川久美子. 肝発がん物質検出のためのバイオマーカーとしての EpCAM および CD13 の有用性検討. 第 48 回日本毒性学会学術年会、兵庫県、(2021 年 7 月)
- 32) 森川朋美、豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、小川久美子. ラットを用いたヘム鉄の 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試験. 日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会、Web 開催、(2021 年 6 月)
- 33) 高須伸二、石井雄二、中村賢志、並木萌香、能美健彦、小川久美子. *gpt delta* ラットを用いた 1,3-dichloro-2-propanol の *in vivo* 変異原性の評価. 日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会、Web 開催、(2021 年 6 月)
- 34) 並木萌香、石井雄二、高須伸二、中村賢志、小川久美子. ラットを用いたミルラの 90 日間反復経口投与毒性試験. 日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会、Web 開催、(2021 年 6 月)
- 35) 水田保子、曹永晩、赤木純一、井手鉄哉、小川久美子. モウソウチク乾留物の SD ラットにおける 90 日間反復投与毒性試験. 日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会、Web 開催、(2021 年 6 月)
- 36) 山本栄一、高橋祐次、栗形麻樹子、齋藤洋克、松下幸平、豊田武士、佐藤太、北嶋聡、小川久美子、伊豆津健一、齋藤嘉朗、平林容子、飯村康夫、本間正充、奥田晴宏、合田幸広. 脱離エレクトロスプレーイオン化-飛行時間型質量分析イメージングによるシクレソニドの 1 μ m エアロゾル吸入後のラット肺におけるシクレソニドとその代謝物の空間的局在の可視化. 日本薬学会第 36 年会、徳島県、(2021 年 5 月)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

Table 1-1. Serum hormone levels in SD rats treated with PTU for 28 days

Dose (mg/kg)	0	0.03	0.1	0.3	1	3
No. of animals examined	5	5	5	5	5	5
Male						
T3 (ng/mL)	0.56 ± 0.08	0.52 ± 0.07	0.54 ± 0.08	0.52 ± 0.10	0.33 ± 0.08**	0.26 ± 0.03**
T4 (µg/dL)	3.4 ± 0.4	4.9 ± 1.1*	4.0 ± 0.8	2.4 ± 0.9	1.1 ± 0.3**	1.0 ± 0.4**
TSH (ng/mL)	1.9 ± 1.0	2.1 ± 1.3	4.0 ± 2.6	6.6 ± 2.4*	18.1 ± 4.9**	23.7 ± 1.7**
PRL (ng/mL)	1.7 ± 2.0	2.9 ± 4.9	1.8 ± 2.3	1.8 ± 1.8	1.5 ± 1.4	0.8 ± 0.3
Female						
T3 (ng/mL)	0.55 ± 0.10	0.58 ± 0.11	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.22	0.60 ± 0.22	0.24 ± 0.03*
T4 (µg/dL)	3.2 ± 0.8	3.7 ± 1.4	2.6 ± 0.5	2.3 ± 0.8	1.4 ± 0.4**	1.1 ± 0.6**
TSH (ng/mL)	1.7 ± 1.1	1.6 ± 0.4	2.3 ± 1.2	3.1 ± 0.8	21.1 ± 10.7**	26.8 ± 6.6**
PRL (ng/mL)	3.4 ± 2.9	1.1 ± 1.1	0.5 ± 0.4	1.3 ± 1.3	2.1 ± 0.8	3.1 ± 2.5

Each value represents the mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the control group at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Table 1-2. Serum hormone levels in SD rats treated with MMI for 28 days

Dose (mg/kg)	0	0.3	1	3	10
No. of animals examined	5	5	5	5	5
Male					
T3 (ng/mL)	0.56 ± 0.08	0.68 ± 0.10	0.60 ± 0.10	0.40 ± 0.07*	0.29 ± 0.04**
T4 (µg/dL)	3.4 ± 0.4	3.9 ± 1.0	4.1 ± 0.7	1.7 ± 0.3**	1.1 ± 0.5**
TSH (ng/mL)	1.9 ± 1.0	2.1 ± 0.3	2.8 ± 1.8	14.4 ± 3.5**	23.8 ± 6.2**
PRL (ng/mL)	1.7 ± 2.0	0.7 ± 0.6	0.6 ± 0.4	0.5 ± 0.3	1.1 ± 1.1
Female					
T3 (ng/mL)	0.55 ± 0.10	0.61 ± 0.09	0.63 ± 0.12	0.59 ± 0.08	0.41 ± 0.03
T4 (µg/dL)	3.2 ± 0.8	3.0 ± 0.9	3.3 ± 1.1	2.3 ± 0.7	1.0 ± 0.2**
TSH (ng/mL)	1.7 ± 1.1	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.6	3.1 ± 2.5	17.2 ± 6.1**
PRL (ng/mL)	3.4 ± 2.9	0.6 ± 0.9	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.4	2.8 ± 1.6

Each value represents the mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the control group at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Table 1-3. Serum hormone levels in SD rats treated with NaPB for 28 days

Dose (mg/kg)	0	10	30	100
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
T3 (ng/mL)	0.63 ± 0.11	0.58 ± 0.10	0.57 ± 0.04	0.51 ± 0.08
T4 (µg/dL)	4.4 ± 0.8	4.7 ± 0.6	3.8 ± 0.8	3.0 ± 0.7*
TSH (ng/mL)	1.4 ± 0.7	1.5 ± 0.8	1.5 ± 0.4	2.3 ± 1.3
PRL (ng/mL)	3.9 ± 6.9	3.1 ± 5.1	1.5 ± 1.9	1.1 ± 0.6
Female				
T3 (ng/mL)	0.53 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.56 ± 0.06	0.51 ± 0.03
T4 (µg/dL)	3.1 ± 1.9	2.8 ± 0.8	2.7 ± 0.6	1.8 ± 0.3
TSH (ng/mL)	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.4
PRL (ng/mL)	1.3 ± 1.9	2.1 ± 3.7	1.3 ± 1.2	0.6 ± 0.4

Each value represents the mean ± S.D.

*: Significantly different from the control group at p<0.05.

Table 1-4. Serum hormone levels in SD rats treated with NCD for 28 days

Dose (mg/kg)	0	15	50	150
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
T3 (ng/mL)	0.63 ± 0.11	0.71 ± 0.22	0.64 ± 0.09	0.56 ± 0.03
T4 (µg/dL)	4.4 ± 0.8	3.7 ± 0.5	3.7 ± 0.5	3.1 ± 1.0*
TSH (ng/mL)	1.4 ± 0.7	1.9 ± 0.9	1.7 ± 0.6	4.0 ± 2.2*
PRL (ng/mL)	3.9 ± 6.9	1.9 ± 2.0	1.8 ± 1.9	1.2 ± 0.9
Female				
T3 (ng/mL)	0.53 ± 0.03	0.58 ± 0.09	0.50 ± 0.04	0.54 ± 0.10
T4 (µg/dL)	3.1 ± 1.9	3.8 ± 1.5	4.1 ± 1.2	4.1 ± 0.7
TSH (ng/mL)	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.4	1.5 ± 0.6*
PRL (ng/mL)	1.3 ± 1.9	1.6 ± 1.8	0.7 ± 0.4	0.4 ± 0.2

Each value represents the mean ± S.D.

*: Significantly different from the control group at p<0.05.

Table 2-1. Organ weights in SD rats treated with PTU for 28 days

Dose (mg/kg)	0	0.03	0.1	0.3	1	3
No. of animals examined	5	5	5	5	5	5
Male						
Body weight (g)	355.7 ± 19.4	377.9 ± 16.0	369.7 ± 17.7	358.0 ± 21.9	338.9 ± 38.1	278.1 ± 20.6**
Thyroids (mg)	24.6 ± 3.7	25.0 ± 3.0	20.4 ± 1.3	32.2 ± 2.4	75.4 ± 22.3**	79.9 ± 8.0**
(mg%)	6.9 ± 0.8	6.6 ± 0.7	5.5 ± 0.3	9.0 ± 0.6	21.9 ± 4.4**	28.9 ± 3.9**
Pituitary (mg)	13.1 ± 1.3	13.5 ± 1.6	13.2 ± 0.9	13.4 ± 1.5	15.1 ± 2.1	15.4 ± 2.3
(mg%)	3.7 ± 0.2	3.6 ± 0.4	3.6 ± 0.2	3.7 ± 0.2	4.5 ± 0.4*	5.5 ± 0.7**
Adrenals (mg)	51.5 ± 3.9	53.8 ± 7.0	45.1 ± 3.3	47.7 ± 4.8	36.0 ± 12.2**	31.0 ± 5.4**
(mg%)	14.5 ± 1.3	14.2 ± 1.5	12.2 ± 0.8	13.3 ± 1.3	10.4 ± 2.3**	11.2 ± 2.3*
Female						
Body weight (g)	224.5 ± 17.7	217.2 ± 15.4	229.1 ± 7.6	219.5 ± 12.0	222.1 ± 13.9	188.0 ± 5.9**
Thyroids (mg)	17.6 ± 2.8	17.0 ± 2.5	22.0 ± 4.5	28.8 ± 2.4	66.7 ± 15.4**	67.3 ± 12.3**
(mg%)	7.8 ± 1.1	7.8 ± 1.1	9.6 ± 2.0	13.2 ± 1.6	30.0 ± 6.0**	35.9 ± 6.8**
Pituitary (mg)	17.4 ± 2.1	16.4 ± 1.5	16.1 ± 3.3	16.2 ± 1.3	18.4 ± 3.6	14.6 ± 2.7
(mg%)	7.8 ± 1.0	7.6 ± 1.0	7.0 ± 1.4	7.4 ± 0.6	8.3 ± 1.3	7.8 ± 1.6
Adrenals (mg)	61.6 ± 11.1	53.4 ± 6.7	55.9 ± 7.0	56.4 ± 8.5	54.1 ± 6.4	32.8 ± 3.8**
(mg%)	27.4 ± 3.8	24.7 ± 3.3	24.4 ± 2.8	25.8 ± 4.8	24.3 ± 1.6	17.5 ± 2.1**

Each value represents the mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the control group at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Table 2-2. Organ weights in SD rats treated with MMI for 28 days

Dose (mg/kg)	0	0.3	1	3	10
No. of animals examined	5	5	5	5	5
Male					
Body weight (g)	355.7 ± 19.4	386.2 ± 30.7	371.8 ± 24.4	360.9 ± 16.7	298.8 ± 29.1**
Thyroids (mg)	24.6 ± 3.7	25.2 ± 2.1	28.6 ± 2.0	37.5 ± 5.7**	47.8 ± 7.9**
(mg%)	6.9 ± 0.8	6.5 ± 0.5	7.7 ± 0.6	10.4 ± 1.3**	16.0 ± 1.9**
Pituitary (mg)	13.1 ± 1.3	13.7 ± 2.2	12.9 ± 2.3	13.7 ± 1.7	13.9 ± 1.9
(mg%)	3.7 ± 0.2	3.5 ± 0.5	3.5 ± 0.4	3.8 ± 0.3	4.7 ± 0.8*
Adrenals (mg)	51.5 ± 3.9	55.3 ± 13.8	52.1 ± 7.7	44.5 ± 4.3	33.3 ± 6.5**
(mg%)	14.5 ± 1.3	14.4 ± 3.7	14.0 ± 1.6	12.3 ± 1.0	11.1 ± 1.7
Female					
Body weight (g)	224.5 ± 17.7	224.7 ± 20.1	214.7 ± 14.2	221.7 ± 15.2	223.7 ± 12.5
Thyroids (mg)	17.6 ± 2.8	19.3 ± 2.9	22.5 ± 2.4	24.1 ± 4.1	53.2 ± 12.3**
(mg%)	7.8 ± 1.1	8.6 ± 1.1	10.5 ± 0.9	11.0 ± 2.4	23.8 ± 5.4**
Pituitary (mg)	17.4 ± 2.1	16.6 ± 2.3	17.0 ± 1.8	16.5 ± 2.5	16.8 ± 2.7
(mg%)	7.8 ± 1.0	7.4 ± 0.9	7.9 ± 0.7	7.5 ± 1.2	7.5 ± 1.1
Adrenals (mg)	61.6 ± 11.1	58.8 ± 11.6	58.6 ± 9.6	55.2 ± 5.7	43.4 ± 4.0*
(mg%)	27.4 ± 3.8	26.0 ± 3.1	27.2 ± 3.2	25.0 ± 3.6	19.4 ± 1.8**

Each value represents the mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the control group at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Table 2-3. Organ weights in SD rats treated with NaPB for 28 days

Dose (mg/kg)	0	10	30	100
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
Body weight (g)	354.8 ± 22.3	347.9 ± 19.0	366.2 ± 33.0	353.2 ± 27.4
Liver (g)	9.9 ± 0.8	10.6 ± 0.9	12.4 ± 2.0	14.2 ± 2.0**
(g%)	2.8 ± 0.1	3.1 ± 0.1	3.4 ± 0.3**	4.0 ± 0.3**
Thyroids (mg)	22.7 ± 3.0	27.0 ± 3.6	28.0 ± 6.2	29.6 ± 2.9*
(mg%)	6.4 ± 1.0	7.7 ± 0.8	7.6 ± 1.2	8.4 ± 0.6**
Pituitary (mg)	12.6 ± 0.6	12.9 ± 1.4	13.4 ± 1.3	13.4 ± 1.4
(mg%)	3.6 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.4	3.8 ± 0.1
Adrenals (mg)	44.4 ± 4.7	49.9 ± 10.2	53.7 ± 0.9	56.3 ± 13.0
(mg%)	12.5 ± 1.0	14.3 ± 2.4	14.8 ± 1.2	15.8 ± 2.7
Female				
Body weight (g)	239.2 ± 23.3	233.0 ± 21.1	234.5 ± 22.2	237.3 ± 11.6
Liver (g)	6.7 ± 0.8	6.8 ± 0.9	7.3 ± 0.6	9.4 ± 1.5**
(g%)	2.8 ± 0.2	2.9 ± 0.1	3.1 ± 0.1	4.0 ± 0.5**
Thyroids (mg)	17.5 ± 3.1	18.6 ± 1.5	18.5 ± 2.6	23.3 ± 2.0**
(mg%)	7.3 ± 0.8	8.0 ± 0.7	8.0 ± 1.5	9.8 ± 0.6**
Pituitary (mg)	16.2 ± 1.1	13.9 ± 1.8	15.1 ± 2.7	16.4 ± 1.2
(mg%)	6.8 ± 0.4	6.0 ± 1.0	6.4 ± 0.6	6.9 ± 0.2
Adrenals (mg)	64.6 ± 11.8	69.1 ± 7.7	62.4 ± 8.1	79.5 ± 7.0*
(mg%)	26.9 ± 3.3	29.7 ± 3.4	26.9 ± 4.9	33.6 ± 1.0*

Each value represents the mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the control group at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Table 2-4. Organ weights in SD rats treated with NCD for 28 days

Dose (mg/kg)	0	15	50	150
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
Body weight (g)	354.8 ± 22.3	352.0 ± 16.9	348.3 ± 27.8	332.2 ± 16.6
Liver (g)	9.9 ± 0.8	11.0 ± 0.8	12.5 ± 1.4*	15.8 ± 2.5**
(g%)	2.8 ± 0.1	3.1 ± 0.1	3.6 ± 0.2**	4.7 ± 0.5**
Thyroids (mg)	22.7 ± 3.0	21.9 ± 2.4	25.2 ± 4.2	25.8 ± 4.1
(mg%)	6.4 ± 1.0	6.2 ± 0.7	7.2 ± 1.1	7.8 ± 1.2
Pituitary (mg)	12.6 ± 0.6	14.0 ± 0.9	12.9 ± 1.4	12.2 ± 1.6
(mg%)	3.6 ± 0.2	4.0 ± 0.2	3.7 ± 0.3	3.7 ± 0.4
Adrenals (mg)	44.4 ± 4.7	50.6 ± 9.0	46.4 ± 8.9	42.2 ± 4.3
(mg%)	12.5 ± 1.0	14.4 ± 2.2	13.4 ± 2.5	12.7 ± 1.1
Female				
Body weight (g)	239.2 ± 23.3	224.3 ± 10.5	234.0 ± 13.3	234.4 ± 14.2
Liver (g)	6.7 ± 0.8	6.5 ± 0.3	9.3 ± 1.0**	12.8 ± 1.0**
(g%)	2.8 ± 0.2	2.9 ± 0.1	4.0 ± 0.2**	5.4 ± 0.2**
Thyroids (mg)	17.5 ± 3.1	18.8 ± 1.5	20.3 ± 2.8	22.9 ± 0.4**
(mg%)	7.3 ± 0.8	8.4 ± 0.7	8.7 ± 1.1	9.8 ± 0.7**
Pituitary (mg)	16.2 ± 1.1	16.8 ± 2.6	16.1 ± 1.3	14.8 ± 1.4
(mg%)	6.8 ± 0.4	7.5 ± 1.4	6.9 ± 0.5	6.3 ± 0.4
Adrenals (mg)	64.6 ± 11.8	59.9 ± 4.5	55.5 ± 8.2	63.4 ± 7.4
(mg%)	26.9 ± 3.3	26.7 ± 1.1	23.7 ± 3.7	27.0 ± 2.7

Each value represents the mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the control group at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Table 3-1. Histopathological findings in SD rats treated with PTU for 28 days

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	No. of animals examined					
			0	0.03	0.1	0.3	1	3
			5	5	5	5	5	5
Male	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +, ++)	0	1(1, 0, 0)	5(4, 1, 0)**	5(0, 5, 0)**	5(0, 0, 5)**	5(0, 0, 5)**
		Hyperplasia, follicular cell (±, +, ++)	0	0	3(2, 1, 0)	5(2, 3, 0)**	5(0, 0, 5)**	5(0, 0, 5)**
		Colloid depletion (+)	0	1(1, 0, 0)	3(3, 0, 0)	5(5, 0, 0)**	5(0, 5, 0)**	5(0, 5, 0)**
		Decrease in T4 level (±, +, ++, +++) ^{a)}	0	1(0,1,0,0)	4(3,1,0,0)*	5(1,4,0,0)**	5(0,0,4,1)**	5(0,0,0,5)**
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis (±, +)	0	1(1, 0)	2(2, 0)	5(5, 0)**	5(0, 5)**	5(0, 5)**
		Hypertrophy, pars distalis (±, +)	0	1(1, 0)	2(2, 0)	5(5, 0)**	5(0, 5)**	5(0, 5)**
Adrenal	Atrophy, cortical (±, +, ++)	0	0	0	0	5(0, 1, 4)**	5(0, 1, 4)**	
Female	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +, ++)	0	0	5(5, 0, 0)**	5(0, 5, 0)**	5(0, 1, 4)**	5(0, 0, 5)**
		Hyperplasia, follicular cell (±, +, ++)	0	0	3(3, 0, 0)	5(2, 3, 0)**	5(0, 0, 5)**	5(0, 0, 5)**
		Colloid depletion (+)	0	0	2(2, 0, 0)	4(4, 0, 0)*	5(0, 5, 0)**	5(0, 5, 0)**
		Decrease in T4 level (±, +, ++, +++) ^{a)}	0	0	5(5,0,0,0)**	5(2,2,1,0)**	5(0,3,2,0)**	5(0,0,0,5)**
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis (±, +)	0	0	0	0	3(3, 0)	5(5, 0)**
		Hypertrophy, pars distalis (±, +)	0	0	0	0	5(5, 0)**	5(0, 5)**
Adrenal	Atrophy, cortical (±, +, ++)	0	0	0	0	0	5(2, 2, 1)**	

±, minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

*, **: Significantly different from the control group at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Table 3-2. Histopathological findings in SD rats treated with MMI for 28 days

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	No. of animals examined				
			0	0.3	1	3	10
			5	5	5	5	5
Male	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +, ++)	0	5(5, 0, 0)**	5(1, 4, 0)**	5(0, 2, 3)**	5(0, 1, 4)**
		Hyperplasia, follicular cell (±, +, ++)	0	0	3(2, 1, 0)	5(0, 4, 1)**	5(0, 2, 3)**
		Colloid depletion (+)	0	2(2, 0, 0)	1(1, 0, 0)	5(2, 3, 0)**	5(0, 5, 0)**
		Decrease in T4 level (±, +, ++, +++) ^{a)}	0	4(2,2,0,0)*	5(3,2,0,0)**	5(1,3,1,0)**	5(0,0,5,0)**
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis (±, +)	0	2(2, 0)	5(5, 0)**	5(2, 3)**	5(0, 5)**
		Hypertrophy, pars distalis (±, +)	0	2(2, 0)	5(4, 1)**	5(0, 5)**	5(0, 5)**
Adrenal	Atrophy, cortical (±, +, ++)	0	0	0	4(2, 2, 0)*	5(0, 2, 3)**	
Female	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +, ++)	0	3(3, 0, 0)	5(4, 1, 0)**	5(4, 1, 0)**	5(0, 0, 5)**
		Hyperplasia, follicular cell (±, +, ++)	0	0	3(2, 1, 0)	5(2, 3, 0)**	5(0, 3, 2)**
		Colloid depletion (+)	0	0	0	3(3, 0, 0)	5(0, 5, 0)**
		Decrease in T4 level (±, +, ++, +++) ^{a)}	0	3(3,0,0,0)	5(5,0,0,0)**	5(3,2,0,0)**	5(0,2,3,0)**
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis (±, +)	0	0	0	0	1(1, 0)
		Hypertrophy, pars distalis (±, +)	0	0	0	1(1, 0)	5(4, 1)**
Adrenal	Atrophy, cortical (±, +, ++)	0	0	0	0	1(1, 0, 0)	

±, minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

*, **: Significantly different from the control group at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Table 4-1. Overexpressed genes in the thyroid gland of male SD rats treated with PTU and MMI for 28 days

Probe Name	Gene Symbol	Fold change		Probe Name	Gene Symbol	Fold change	
		PTU vs Control	MMI vs Control			PTU vs Control	MMI vs Control
A_64_P034090	Adm2	57.1	52.5	A_64_P108009	Nrarp	5.0	3.9
A_64_P056674	Ly6l	42.4	56.5	A_42_P464378	Itih3	5.0	8.0
A_64_P120679	Cck	25.7	34.4	A_64_P087380	Efna3	4.9	5.5
A_44_P457203	Banf2	21.3	19.5	A_44_P353739	Kcne3	4.8	3.8
A_64_P082281	Grid1	20.6	2.2	A_44_P166206	Nostrin	4.7	4.7
A_44_P1032771	Fxyd4	17.4	22.7	A_44_P540517	RGD1564664	4.7	4.8
A_44_P505902	Grin2a	16.0	4.1	A_44_P449858	Krt20	4.7	7.7
A_42_P708068	Egr4	15.8	18.8	A_42_P703023	Slc38a3	4.6	4.7
A_64_P148906	Aspg	13.4	15.1	A_44_P333078	Adamtsl2	4.6	5.5
A_64_P052887	LOC501396	12.9	24.0	A_64_P015562	Meiob	4.5	3.7
A_42_P662543	Atp6v0d2	12.0	12.7	A_64_P067000	Prima1	4.5	5.3
A_42_P637189	Apln	11.7	7.0	A_44_P915843	Nectin4	4.4	4.0
A_64_P061760	Scgb1d2	10.3	7.0	A_64_P162112	Galp	4.4	5.3
A_44_P317639	Vash2	9.6	8.6	A_64_P034244	Olr1	4.3	5.1
A_64_P101404	Moxd1	9.2	9.3	A_64_P114759	LOC501223	4.3	7.3
A_42_P811256	Vmn1	9.0	8.1	A_64_P011489	Gdf15	4.3	5.6
A_44_P468468	Lbp	9.0	8.7	A_64_P012813	Mab2113	4.3	7.0
A_44_P835847	C1qtnf3	8.2	8.0	A_64_P017053	Dnah9	4.2	2.1
A_64_P054568	Vash2	7.7	7.6	A_64_P117658	Dync1i1	4.2	5.3
A_44_P138838	Krt76	7.6	7.7	A_64_P005626	Anxa9	4.2	2.8
A_64_P129945	Krt75	7.4	6.2	A_64_P087424	F2r11	4.2	4.5
A_64_P101499	Bmp3	7.3	5.6	A_44_P214900	Pzp	4.1	3.5
A_44_P428739	Shc3	7.1	7.0	A_64_P068847	Ltbp2	4.1	5.7
A_64_P138011	Adra1b	7.0	8.4	A_64_P157504	Ehf	4.1	4.3
A_42_P504653	F10	6.8	8.4	A_44_P370052	Ldhc	4.1	2.5
A_43_P12996	Crym	6.7	5.6	A_42_P709423	Mlph	4.1	4.6
A_44_P578061	Mab2113	6.6	10.0	A_64_P093522	Dtna	4.1	3.7
A_64_P144278	Snph	6.5	8.4	A_64_P055607	Elf5	4.0	3.7
A_64_P149071	Glis1	6.4	5.8	A_44_P577705	Nectin4	4.0	3.3
A_42_P738549	Napsa	6.3	11.6	A_64_P111903	Mmp17	4.0	3.0
A_64_P126030	Slc22a7	6.2	5.8	A_64_P093899	Elf3	4.0	3.3
A_64_P007688	Tlx1	5.9	4.9	A_64_P155103	Vnn3	4.0	3.7
A_64_P155771	Upk3bl1	5.9	3.1	A_43_P11794	Tacr3	4.0	3.3
A_64_P047542	Tmem54	5.8	4.4	A_64_P068363	Dync1i1	3.9	5.0
A_42_P586154	Vwa1	5.7	6.7	A_64_P046552	Sdcbp2	3.9	4.1
A_64_P031806	Upk3bl1	5.7	3.1	A_44_P447373	Ass1	3.8	3.4
A_44_P1026848	Cryba4	5.7	8.1	A_44_P142925	Tprg1	3.8	5.5
A_64_P010028	LOC103692985	5.4	2.6	A_44_P409965	Dnah14	3.8	4.3
A_64_P101056	Padi2	5.4	7.8	A_42_P698240	Ptgr1	3.8	4.1
A_44_P144591	Cthrc1	5.3	5.9	A_44_P264299	Ckb	3.7	4.0
A_64_P080233	Slc5a5	5.2	6.1	A_42_P791677	Areg	3.7	9.2
A_64_P006097	Gjc2	5.2	5.1	A_64_P025548	Tmem26	3.7	2.6
A_44_P154513	Tmem40	5.2	5.6	A_44_P438863	Serpine2	3.7	4.2
A_64_P111898	Mmp17	5.2	3.8	A_64_P005208	Nqo1	3.6	4.1
A_44_P1046787	Sbspon	5.1	8.7	A_64_P040176	Nrip3	3.6	3.2
A_44_P286788	Ncf4	5.1	8.4	A_64_P130025	Dll1	3.6	3.4
A_44_P545193	Hsd11b2	5.1	6.1	A_64_P051636	Pde4c	3.6	4.0
A_42_P559414	Wnt4	5.1	5.1	A_43_P17060	Them5	3.6	2.6
A_43_P11560	Aqp5	5.1	3.3	A_64_P078880	Prm2	3.6	3.3
A_42_P510565	Cdhr4	5.1	4.8	A_42_P684264	Tnik	3.6	3.9

Table 4-2. Overexpressed genes in the pituitary gland of male SD rats treated with PTU and MMI for 28 days

Probe Name	Gene Symbol	Fold change		Probe Name	Gene Symbol	Fold change	
		PTU vs Control	MMI vs Control			PTU vs Control	MMI vs Control
A_43_P22979	Tyrp1	210.8	173.3	A_64_P109854	Fads2b	4.3	3.0
A_42_P771373	Npy	161.6	104.6	A_44_P372958	Tsga13	4.2	4.2
A_64_P137042	Npy	143.6	91.7	A_64_P033765	Zar1	4.1	3.1
A_64_P140025	Tyrp1	134.3	119.2	A_64_P137609	Hs6st2	4.0	3.9
A_64_P103537	Cftr	77.5	53.6	A_64_P044156	Slc7a3	4.0	4.0
A_64_P015527	Dnah14	70.6	43.9	A_42_P497225	Mfge8	4.0	4.7
A_44_P438272	Crisp3	65.5	14.9	A_64_P072938	Sfrp5	3.9	3.7
A_64_P109292	LOC690507	35.9	39.6	A_44_P118874	Trpc5	3.9	3.8
A_64_P127526	LOC690507	33.6	35.8	A_44_P236255	Calb1	3.9	3.3
A_64_P040563	Tchhl1	27.8	16.9	A_64_P041223	Creb3l1	3.8	3.2
A_64_P096924	Vip	27.4	19.6	A_64_P019851	Fads2b	3.8	2.5
A_64_P009996	Tac1	24.7	20.2	A_44_P323754	Serpinb1b	3.8	2.8
A_44_P179986	Hpd	21.6	19.6	A_44_P437896	Bdnf	3.7	3.6
A_64_P009999	Tac1	20.0	16.1	A_64_P064675	Capn8	3.7	2.3
A_64_P048790	Rln3	19.8	15.8	A_44_P224631	Dao	3.7	4.4
A_44_P314969	Slc6a3	16.3	18.0	A_42_P536741	Derl3	3.6	3.2
A_44_P1026848	Cryba4	15.2	11.2	A_64_P024474	Stum	3.6	3.3
A_44_P170382	Slc18a2	11.9	7.5	A_64_P109118	Kcnk10	3.6	2.2
A_42_P809101	Tctex1d1	11.8	12.9	A_44_P257326	Cacna2d3	3.6	3.1
A_64_P078619	Vtn1	11.3	10.4	A_64_P011489	Gdf15	3.6	3.7
A_42_P487686	Agr2	10.8	10.0	A_64_P138145	Trex2	3.5	3.3
A_44_P1001451	Pga5	10.8	20.3	A_44_P548559	Derl3	3.5	3.5
A_64_P103542	Cftr	10.7	7.6	A_44_P337311	Thbs4	3.5	3.4
A_42_P506076	Ptpn5	10.5	8.1	A_64_P089170	Cxadr1l	3.4	3.7
A_44_P409965	Dnah14	9.4	7.1	A_64_P023250	Ascl2	3.3	2.7
A_64_P058087	Rbp4	9.2	7.9	A_64_P019401	Sdf2l1	3.3	3.3
A_64_P144968	Calb2	8.0	7.3	A_44_P347368	Glb1	3.3	3.9
A_64_P043619	Slc38a5	7.9	6.7	A_64_P035843	RGD1561251	3.3	3.1
A_44_P541397	Procr	7.6	9.7	A_64_P035544	Il27ra	3.3	2.8
A_64_P060977	Fam110c	7.4	6.2	A_64_P010852	Lix1	3.3	3.1
A_64_P065185	Magel2	7.3	5.5	A_64_P089541	Lix1	3.2	3.3
A_44_P448431	Cd8a	6.8	6.9	A_44_P492025	Oasl	3.2	2.9
A_64_P072548	Serpini2	6.6	6.1	A_64_P034090	Adm2	3.2	3.0
A_64_P067749	Sst	6.4	4.0	A_42_P665941	Glb1	3.2	3.0
A_43_P13384	Lrit1	6.4	5.0	A_42_P716512	Cmya5	3.2	2.8
A_43_P19034	Magel2	6.2	6.4	A_64_P055679	Il1rapl2	3.1	3.0
A_43_P14933	Ggh	6.1	5.7	A_64_P108200	Kif22	3.1	2.4
A_44_P1032042	Tmem35a	5.8	5.8	A_64_P084163	Myh15	3.1	4.5
A_64_P023381	Col6a5	5.7	6.1	A_44_P414460	Rnd3	3.1	2.4
A_64_P026398	Ntn3	5.6	6.7	A_44_P1013851	Bmp2	3.1	2.7
A_44_P476160	Spag16	5.6	4.7	A_44_P328256	Nlrp12	3.1	3.2
A_44_P398193	Cgref1	5.5	6.7	A_64_P077162	Wdr49	3.1	3.5
A_43_P12451	Slc16a3	5.5	5.1	A_43_P14045	Sema4g	3.0	2.5
A_44_P454227	Npb	5.4	4.5	A_42_P540972	Ras11b	3.0	2.8
A_44_P122386	Hspb3	5.2	4.8	A_44_P440878	Agpat2	3.0	2.6
A_44_P506980	Kcnk13	4.9	2.3	A_44_P117148	Baz1a	3.0	2.4
A_64_P113695	Myo7a	4.7	4.3	A_44_P1024703	Cyb561d2	3.0	3.0
A_64_P141420	Serpinb1a	4.6	3.7	A_64_P006514	Atp5f1d	3.0	2.1
A_64_P038887	Cdca7l	4.4	3.8	A_44_P241448	MGC109340	3.0	2.8
A_64_P023472	Serpinb1a	4.4	3.6	A_64_P090777	LOC680045	2.9	3.0

Figure 1-1. Immunohistochemistry for T4 in the thyroid gland of male SD rats treated with PTU for 28 days

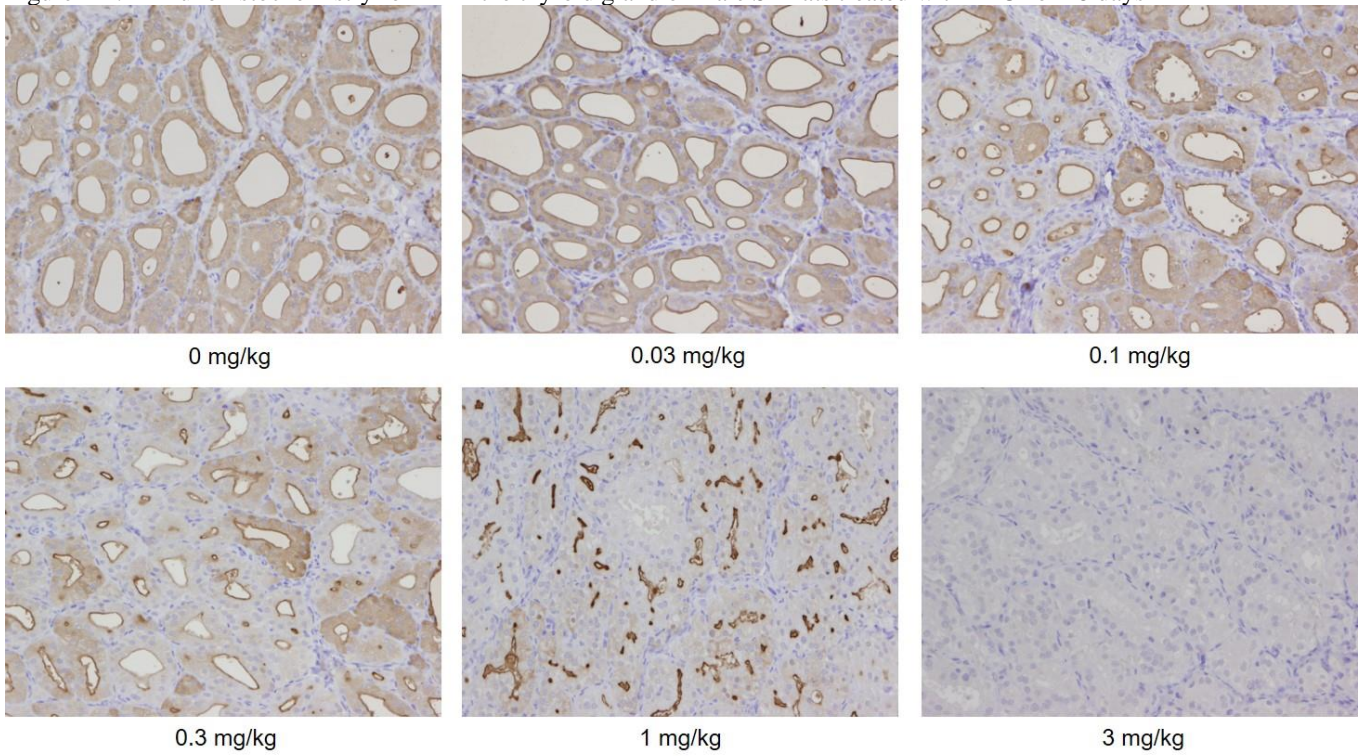


Figure 1-2. Immunohistochemistry for T4 in the thyroid gland of male SD rats treated with MMI for 28 days

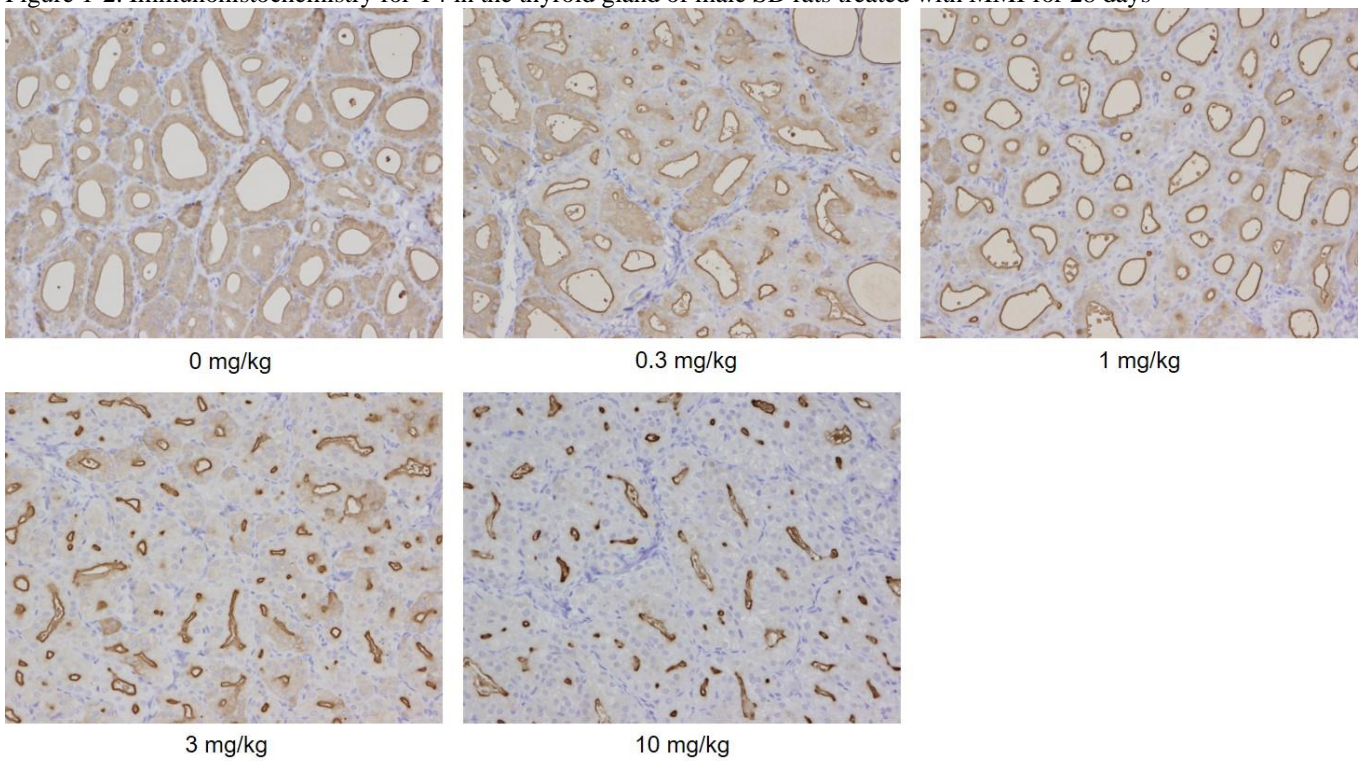


Figure 2-1. Immunohistochemistry for TSH in the pituitary gland of male SD rats treated with PTU for 28 days

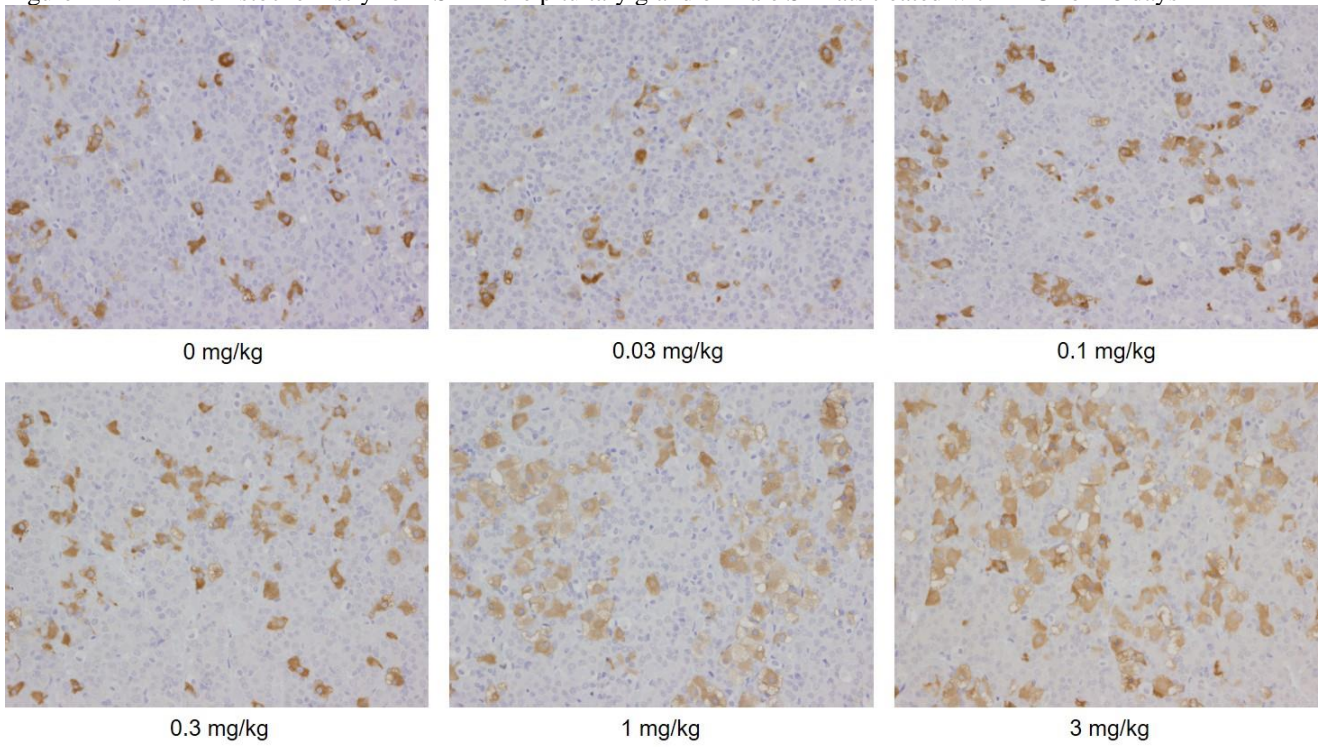


Figure 2-2. Immunohistochemistry for TSH in the pituitary gland of male SD rats treated with MMI for 28 days

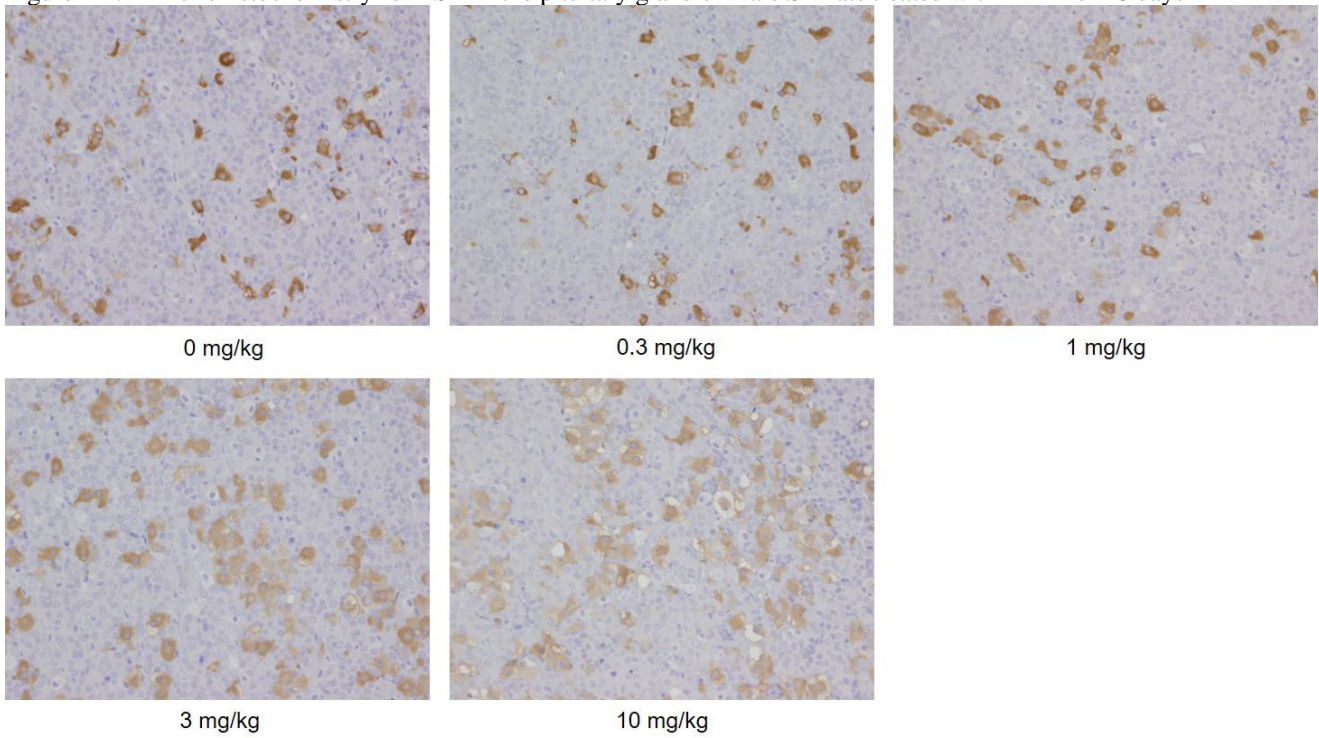


Figure 3. The ratios of TSH-positive area in the pituitary gland of SD rats treated with PTU and MMI for 28 days

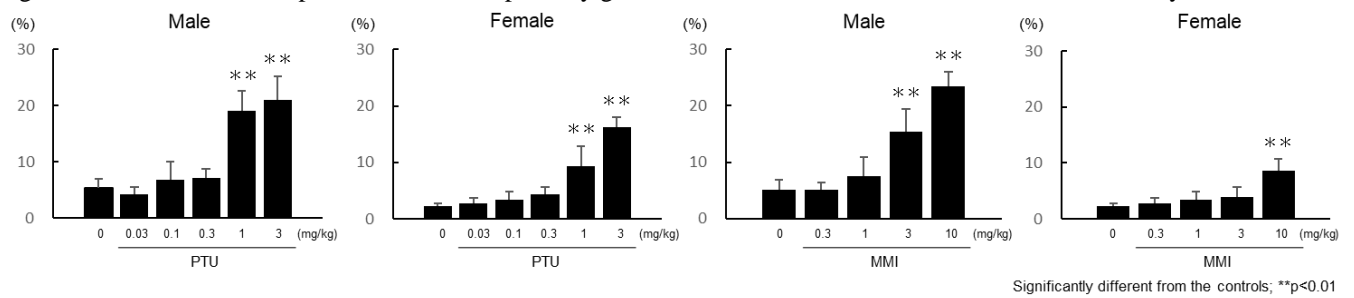


Figure 4. The correlation between the serum TSH level and the ratio of TSH-positive area in the pituitary gland

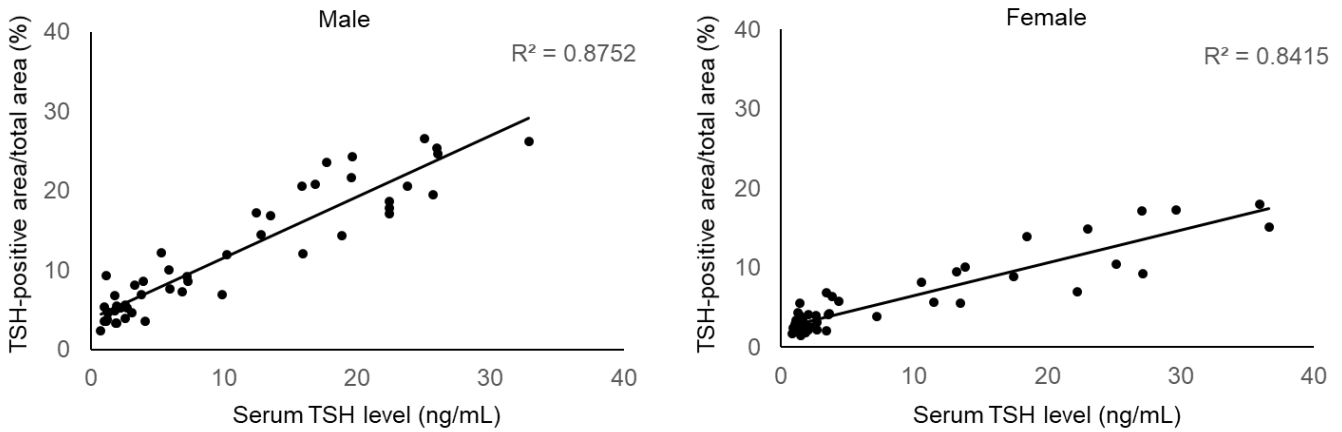


Figure 5. Mean body weight (left) and food consumption (right). *, **: Significantly different from the control group at $P < 0.05$, 0.01 , respectively

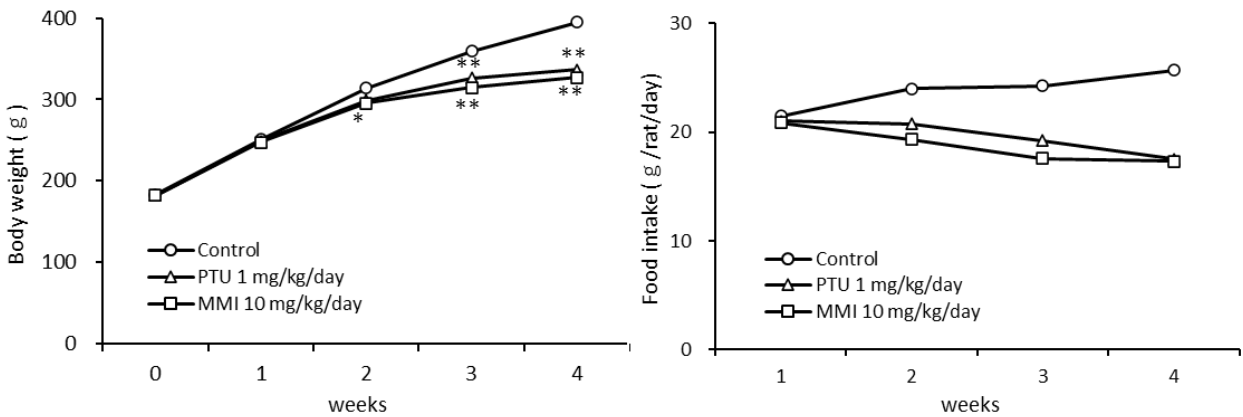


Figure 6. Histopathological findings in the thyroid gland of SD rats treated with PTU and MMI for 28 days

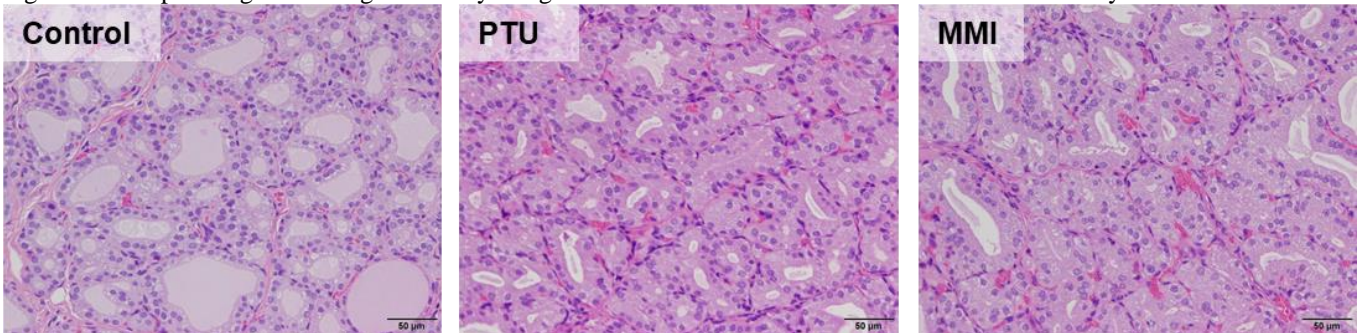
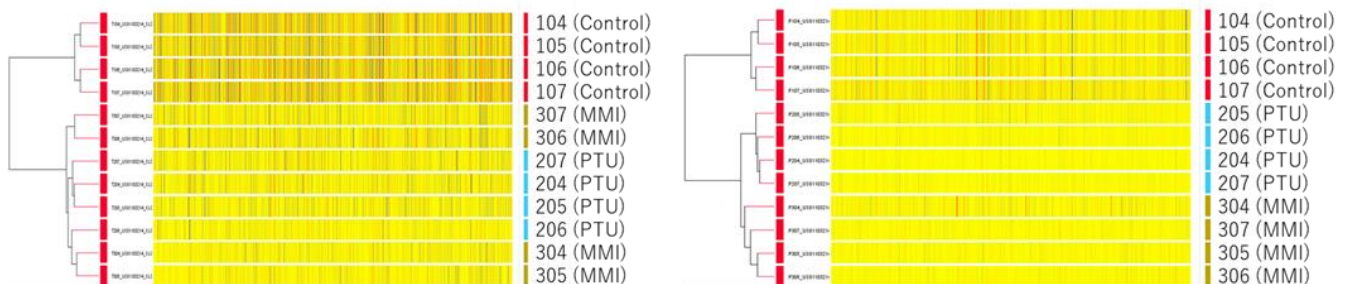


Figure 7. Cluster analysis of microarray data obtained from thyroid (left) and pituitary (right) glands



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Akane H, Toyoda T, Mizuta Y, Cho YM, Ide T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K	Histopathological and immunohistochemical evaluation for detecting changes in blood hormone levels caused by endocrine disruptors in a 28-day repeated-dose study in rats	J Appl Toxicol			in press

令和 4 年 5 月 27 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

(研究代表者)

研究者の住所	〒210-0006 川崎市川崎区砂子 1-2-19-1307
所属機関名	国立医薬品食品衛生研究所
部署・職名	安全性生物試験研究センター病理部・室長
氏名	豊田 武士

交付決定日及び文書番号：令和 3 年 5 月 27 日 衛研発第0527022号

補助事業名：令和3年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

研究課題名（課題番号）：甲状腺に対する化学物質の影響を評価する手法の研究（21KD1003）

研究実施期間：令和3年4月1日から令和4年3月31日まで

（3）年計画の（1）年目

国庫補助金精算所要額：金13,500,000円也（※当該研究課題に係る総額を記載すること）
（うち間接経費 0円）

上記補助事業について、厚生労働科学研究費補助金等取扱規程（平成10年4月9日厚生省告示第130号）第16条第2項の規定に基づき下記のとおり研究成果を報告します。

記

1. 研究概要の説明

(1) 研究者別の概要

所属機関・部署・職名	氏名	分担した研究項目及び研究成果の概要	研究実施期間	配分を受けた研究費	間接経費
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病理部・室長	豊田武士	研究総括、動物実験および病理組織学的・免疫組織化学的解析 甲状腺の病理組織学的・免疫組織化学的検索が、抗甲状腺作用の検出において鋭敏な指標であることを示唆した。	令和3年4月1日～令和4年3月31日	4,500,000円	0円
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病理部・部長	小川久美子	国際機関および諸外国等における甲状腺機能評価に関する情報収集 国際学会・機関において、母体の甲状腺機能低下による子供の神経発達影響が注目されていることを確認した。	令和3年4月1日～令和4年3月31日	2,500,000円	0円
国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験	石井雄二	甲状腺および下垂体の網羅的遺伝子発現解析によるマーカー探索	令和3年4月1日～令和4年3月31日	5,000,000円	0円

研究センター病理部・室長		甲状腺・下垂体を用いた網羅的遺伝子発現解析により、多数の新規バイオマーカー候補を見出した。	日		
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病理部・主任研究官	赤根弘敏	動物実験および病理組織学的・免疫組織化学的検索 甲状腺の病理組織学的・免疫組織化学的検索が、抗甲状腺作用の検出において鋭敏な指標であることを示唆した。	令和3年4月1日 ～令和4年3月31日	1,500,000円	0円

(2) 研究実施日程

研究実施内容	実 施 日 程											
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
動物実験および病理組織学的・免疫組織化学的検索 (豊田武士・赤根弘敏)		←										→
甲状腺および下垂体の網羅的遺伝子発現解析によるマーカー探索 (石井雄二)					←							→
国際機関および諸外国等における甲状腺機能評価に関する情報収集 (小川久美子)	←											→

(注) 研究代表者、研究分担者別に作成すること

(3) 研究成果の説明

研究の目的：内分泌攪乱物質のヒト健康への影響は広く検討されているが、化学物質による抗甲状腺作用の評価方法については、いまだコンセンサスが得られていない。本研究では、国際機関および諸外国等における、甲状腺ホルモン攪乱化学物質の判定に利用可能な評価手法ならびに評価実績の情報収集を実施するとともに、ラット組織を用いた病理組織学的・免疫組織化学的検索による、化学物質の甲状腺影響の *in vivo* 評価法確立を目指す。

研究結果の概要：甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤 (PTU・MMI) は、用量依存的な血清 T3・T4 低下および TSH 増加を引き起こした。一方、病理組織学的検査での甲状腺濾胞上皮肥大および免疫組織化学的検索での甲状腺の T4 発現低下は、血清 T3・T4・TSH 値の有意な変動を伴わない、より低い用量から認められた。また、甲状腺重量および下垂体前葉における TSH 陽性面積率の増加が、血清 T4 値の減少と同用量で認められ、これらの指標も抗甲状腺作用の評価に有用と考えられた。以上の結果は、甲状腺の病理組織学的検索および T4 免疫染色が、化学物質の抗甲状腺作用の早期検出において鋭敏な指標となり得ることを示唆する。

研究の実施経過：令和3年度は、計4種の抗甲状腺物質をラットに28日間反復経口投与し、血清ホルモン値と各種検索項目との比較を行った。また、このうち2物質について、甲状腺・下垂体における網羅的遺伝子発現解析を実施したほか、欧州毒性学会・米国毒性学会における甲状腺ホルモン関連毒性についてのトピックスを検索した。

研究成果の刊行に関する一覧表：別紙参照

研究成果による知的財産権の出願・取得状況：該当なし

研究により得られた成果の今後の活用・提供：本研究は、ラット組織を用いた病理組織学的・免疫組織化学的検索による、化学物質の甲状腺影響の *in vivo* 評価法確立を目指すものである。短期リスク評価手法の開発は、動物実験の3Rに貢献し、試験期間短縮・費用削減につながるとともに、抗甲状腺物質の適切なリスク評価等、厚生労働行政に係る施策への活用が期待される。また、本研究の成果は、日本毒性病理学会や米国毒性学会等の関連学会において発表し、成果の質に応じた国際雑誌に投稿予定である。

2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添 1 のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次 (別添 2 のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 (別添 3 のとおり)
5. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 4 のとおり)
6. 厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告 (別添 5 のとおり)