

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4年度 研究報告書

研究代表者 豊田武士

令和 5 (2023) 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	----- 26
--------------------	----------

## 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

本研究では、化学物質の甲状腺影響を効率的に検出可能な *in vivo* 評価法確立を目的とする。令和 4 年度までに、計 10 種の抗甲状腺物質をラットに 28 日間経口投与し、血清ホルモン値の変化と病理組織学的・免疫組織化学的解析手法との比較を行った。その結果、抗甲状腺物質の検出において、病理組織学的検索による甲状腺濾胞上皮細胞の肥大が、血中ホルモン値測定よりも鋭敏な指標となり得ることが示された。また、甲状腺重量、下垂体前葉の TSH および甲状腺の T4・Ki67 免疫染色も、血中ホルモン値と概ね同等の感度を示し、抗甲状腺作用の評価に有用と考えられた。これまでの甲状腺・下垂体を用いての網羅的遺伝子発現解析の結果から、免疫組織化学的解析に利用可能な新規バイオマーカーとして、ナトリウム/ヨウ素共輸送体（NIS）を見出した。国際的な動向調査として OECD および ICCVAM/EPA が主導する専門家会議に参画し、*in vitro* 評価系の実用化には課題が多く残されており、既存の試験に組み込みが可能な *in vivo* 評価手法の開発が引き続き重要であることが確認された。今後、種々の機序に基づく抗甲状腺物質を用いた病理組織学的解析および網羅的遺伝子発現解析を継続し、早期検出において最も鋭敏または機序の特定に有用なパラメータの特定を目指す。

## 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  
赤根敏弘 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は、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（経済協力開発機構）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 年の改定では、90 日間反復経口投与毒性試験の試験法ガイドラインに内分泌攪乱関連指標が追加され、甲状腺重量の測定に加え、甲状腺関連ホルモンとして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 EFSA（欧州食品安全機関）から、甲状腺に影響を及ぼす農業に関する検討が必要とする報告が、2020 年には EU から甲状腺ホルモン攪乱物質検索法の必要性に関する論文、EPA（米国環境保護庁）からも 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、抗甲状腺物質の効果的な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のが現状である。

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、ホルモン攪乱等、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 濃度および甲状腺における T4・下垂体における TSH 発現を免疫組織化学的に検索した。その結果、T4 低下および TSH 増加を、病理組織標本を用いた免疫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内分泌攪乱物質の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

様々な機序による抗甲状腺物質をラットに 28 日間、複数用量で反復経口投与し、血液中の甲状腺関連ホルモン値を測定する。甲状腺・下垂体・肝臓等について、臓器重量測定および病理組織学的・免疫組織化学的・分子生物学的解析を実施する。これらの中から、最も鋭敏あるいは機序の特定に有用な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、国際機関等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（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン）（5 匹/群）に対し、以下の①～⑥の機序に基づ

く計 10 種の抗甲状腺物質を 28 日間反復経口投与した。

- ① 甲状腺ペルオキシダーゼ阻害: Propylthiouracil (PTU) および Methimazole (MMI)
- ② 肝臓における甲状腺ホルモン代謝促進: Phenobarbital sodium salt (NaPB) および Nicardipine hydrochloride (NCD)
- ③ ヨウ素取込み阻害: Ammonium perchlorate (APC) および Potassium thiocyanate (PTC)
- ④ 脱ヨウ素酵素阻害: Iopanoic acid (IOP) および Erythrosine
- ⑤ TSH 産生阻害: Bexarotene (BEX)
- ⑥ TSH 受容体拮抗: VA-K-14

①・②の投与実験は令和 3 年度に実施済みであり、本年度は追加の免疫組織化学的解析を実施した。雌雄のラットを用いた①～③の検討において、甲状腺影響の感受性は概ね雄>雌であることが確認されたため、④～⑥については雄のみを対象に実験を行った。各物質の投与用量は以下の通りである (APC, PTC, Erythrosine 以外は強制経口投与)。

- ① PTU: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg  
MMI: 0.3, 1, 3, 10 mg/kg
- ② NaPB: 10, 30, 100 mg/kg  
NCD: 15, 50, 150 mg/kg
- ③ APC: 1, 10, 100 ppm (飲水)  
PTC: 10, 100, 1000 ppm (飲水)
- ④ IOP: 30, 100, 300 mg/kg  
Erythrosine: 0.06, 0.25, 1, 4% (混餌)
- ⑤ BEX: 1, 3, 10 mg/kg
- ⑥ VA-K-14: 1, 3, 10 mg/kg

各実験において、最終投与翌日に採血および解剖を実施し、甲状腺・下垂体・肝臓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、血清中の甲状腺関連ホルモン (T3・T4・TSH) の測定を行った。さらに、甲状腺における T4・Ki67 (細胞増殖マーカー)・ナトリウム/ヨウ素共輸送体 (sodium-iodide symporter; NIS)、下垂体前葉における TSH、肝臓における甲状腺ホルモン代謝に関するグルクロン酸転移酵素 (UGT1A1/1A6/1A7) の免疫組織化学的検索を実施した。Ki67 については甲状腺濾胞上皮における陽性細胞率、NIS・TSH・UGT1A6 についてはそれぞれ甲状腺・下垂体前葉・肝臓における陽性面積率を測定した。

## 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索するため、抗甲状腺物質 2 種 (NaPB・NCD) 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; ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン) に、溶媒 (精製水)、100 mg/kg NaPB、150 mg/kg NCD 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、採材した甲状腺および下垂体は直ちに 1 mL の ISOGEN (ニッポンジーン社) でホモジナイズした後、-80°C で凍結保存した。

凍結組織から total RNA を抽出後、RNA 濃度を NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific 社) で測定し、RIN の評価を 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。アレイのスキャンは、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)

2022 年 4 月に OECD のテストガイドラインプログラム各国調整官作業部会 (Working Group of National Co-ordinators of the TGs programme; WNT) にて新たに承認された活動の 1 つである「Thyroid Disruption Method Expert Group」に、小川・豊田がメンバーとして参画し、OECD における甲状腺機能障害評価法の開発に関する動向を調査した。

また、米国動物実験代替法検証省庁間連絡委員会 (ICCVAM) の要請に応じて、甲状腺機能評価法のバリデーションに関する専門家作業部会にも小川がメンバーとして参加し、EPA が提案している評価法について、情報収集および評価に協力している。

さらに、欧州毒性学会および米国毒性学会における甲状腺ホルモン関連毒性に関する研究発表の動向を調査した。

### (倫理面への配慮)

動物実験の実施にあたっては、使用する動物数は最小限にとどめ、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験委員会の承認を経て、同所が定める実験動物取扱い規定に基づき、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

④Erythrosine および⑥VA-K-14 の投与実験を終了し、血清ホルモン値測定、病理組織学的・免疫組織化学的検索を令和 5 年度にかけて順次実施する予定である。①～⑤の計 8 物質についてこれまでに得られた結果を以下に示す。

#### 1-1. 血清中の甲状腺関連ホルモン値

血清 T3・T4・TSH 値の測定結果を Table 1 に示す。

##### ① 甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤

PTU 投与群では以下の変動が統計学的有意差をもつ

て認められた (Table 1-1) : T3 低下 ; 雄 1 mg/kg 以上および雌 3 mg/kg、T4 低下 ; 雌雄 1 mg/kg 以上、TSH 増加 ; 雄 0.3 mg/kg 以上および雌 1 mg/kg 以上。

MMI 投与群 (Table 1-2) : T3・T4 低下および TSH 増加 ; 雄 3 mg/kg 以上、T4 低下・TSH 増加 ; 雌 10 mg/kg。

雄 0.03 mg/kg PTU 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。

#### ② 肝臓における甲状腺ホルモン代謝促進剤

NaPB 投与群 (Table 1-3) : T4 低下 ; 雄 100 mg/kg。

NCD 投与群 (Table 1-4) : T4 低下 ; 雄 150 mg/kg、TSH 増加 ; 雌雄 150 mg/kg。

#### ③ ヨウ素取込み阻害剤

APC 投与群 (Table 1-5) : TSH 増加 ; 雄 100 ppm。

雌 1 ppm 群でみられた TSH 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。

PTC 投与群 (Table 1-6) : 雌雄とも血清 T3・T4・TSH 値の有意な変動は認められなかった。

#### ④ 脱ヨウ素酵素阻害剤

IOP 投与群 (Table 1-7) : T3 増加 ; 雄 300 mg/kg、T4・TSH 増加 ; 雄 30 mg/kg 以上。

#### ⑤ TSH 産生阻害剤

BEX 投与群 (Table 1-8) : T3 低下 ; 雄 3 mg/kg 以上、T4 低下 ; 雄 1 mg/kg 以上。

### 1-2. 臓器重量

解剖時体重および臓器重量 (甲状腺・下垂体・副腎・肝臓) の測定結果を Table 2 に示す。

#### ① 甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤

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、雄 3 mg/kg で肝絶対/相対重量の低下、雌 3 mg/kg で肝絶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および副腎絶対重量の低下、雌 10 mg/kg で副腎絶対/相対重量の低下が認められた (Table 2-2)。

#### ② 肝臓における甲状腺ホルモン代謝促進剤

NaPB 投与群では、雌雄 100 mg/kg で甲状腺絶対/相対重量および肝絶対重量の増加、雄 30 mg/kg 以上および雌 100 mg/kg で肝相対重量の増加、雌 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 150 mg/kg で甲状腺絶対/相対重量の増加、雌雄 50 mg/kg 以上で肝絶対/相対重量の増加が認められた (Table 2-4)。

#### ③ ヨウ素取込み阻害剤

APC 投与群では、雌雄 100 ppm で甲状腺絶対/相対重量の増加がみられた (Table 2-5)。

PTC 投与群では、雄 1000 ppm で甲状腺絶対/相対重量の増加が認められた (Table 2-6)。雄 100 ppm で肝相対重量の増加がみられたが、用量依存性を欠くことから偶発的な変化と考えられた。

#### ④ 脱ヨウ素酵素阻害剤

IOP 投与群では、雄 100 mg/kg 以上で甲状腺相対重量、雄 300 mg/kg で甲状腺絶対重量、下垂体相対重量

および肝相対重量の増加がみられた (Table 2-7)。

#### ⑤ TSH 産生阻害剤

BEX 投与群では、雄 10 mg/kg で肝絶対/相対重量の増加が認められた (Table 2-8)。

### 1-3. 病理組織学的検索

各投与群の甲状腺・下垂体・副腎・肝臓における病理組織学的所見を Table 3 に示す。

#### ① 甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤

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が雌雄 0.3 mg/kg 以上、濾胞上皮細胞過形成およびコロイド退縮が雌雄 1 mg/kg 以上で認められ、雄の濾胞上皮細胞肥大は 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が認められた。また、副腎皮質の萎縮が雄 3 mg/kg 以上で、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が雄 10 mg/kg で有意な発生頻度増加を示した。

#### ② 肝臓における甲状腺ホルモン代謝促進剤

NaPB 投与群では、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が雌雄 10 mg/kg 以上で認められ、雄 10 mg/kg 以上、雌 30 mg/kg 以上で統計学的に有意な発生頻度増加を示した (Table 3-3)。甲状腺濾胞上皮細胞肥大が雌雄 30 mg/kg 以上、濾胞上皮細胞過形成およびコロイド退縮が雄 30 mg/kg 以上で観察された。下垂体前葉では、100 mg/kg の雄 2 例で肥大/空胞化が認められた。

NCD 投与群では、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が雌雄 50 mg/kg 以上で認められ、雄 50 mg/kg 以上、雌 100 mg/kg で統計学的に有意な発生頻度増加を示した (Table 3-4)。また、小葉周辺性の肝細胞空胞化が観察され、雄 150 mg/kg、雌 15 mg/kg 以上で統計学的に有意であった。甲状腺濾胞上皮細胞肥大が雌雄 15 mg/kg 以上で観察され、雌雄 50 mg/kg 以上で統計学的に有意であった。また、濾胞上皮細胞過形成およびコロイド退縮が雄 50 mg/kg 以上で観察された。下垂体前葉では、150 mg/kg の雄 2 例で肥大/空胞化が認められた。

#### ③ ヨウ素取込み阻害剤

APC 投与群では、甲状腺濾胞上皮細胞の肥大/過形成およびコロイド退縮が雌雄 10 ppm 以上で観察され、雄の濾胞上皮細胞肥大は 10 ppm においても統計学的に有意な増加を示した (Table 3-5)。下垂体前葉では、肥大/空胞化が雄 10 ppm 以上で散見された。

PTC 投与群では、甲状腺濾胞上皮細胞の肥大が雄 10 ppm 以上および雌 100 ppm 以上で、下垂体前葉の肥大/空胞化が雄 10 ppm 以上で散見されたが、統計学的有意差はみられなかった (Table 3-6)。

#### ④ 脱ヨウ素酵素阻害剤

IOP 投与群では、甲状腺濾胞上皮細胞の肥大/過形成

の発生頻度が雄 30 mg/kg 以上で有意に増加した。下垂体前葉では、肥大/空胞化の有意な発生頻度増加がそれぞれ 100 mg/kg 以上および 300 mg/kg で認められた (Table 3-7)。

#### ⑤ TSH 産生阻害剤

BEX 投与群の甲状腺では、コロイド退縮が雄 3 mg/kg 以上の各 1 例に認められたが、統計学的有意差はみられなかった。下垂体では、全群で病理組織学的変化は認められなかった (Table 3-8)。

### 1-4. 免疫組織化学的解析 (甲状腺 T4)

これまでに①～③の計 6 物質 (PTU・MMI・NaPB・NCD・APC・PTC) について、甲状腺における T4 発現を免疫染色により検索した (Figure 1, Table 3)。

#### ① 甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤

対照群では、濾胞上皮細胞の細胞質および濾胞内腔表面に T4 発現が認められた。T4 発現レベルの低下が、病理組織学的検索において濾胞上皮細胞肥大が認められた用量と一致して、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 以上および雌 1 mg/kg 以上で認められた (Table 3-1/2)。

#### ② 肝臓における甲状腺ホルモン代謝促進剤

NaPB および NCD 投与群のいずれにおいても、T4 発現の明らかな低下は認められなかった (Table 3-3/4)。

#### ③ ヨウ素取込み阻害剤

APC 投与群において、T4 発現レベルの低下が雌雄 10 ppm 以上で散見されたが、その発生頻度に統計学的有意差はみられなかった (Table 3-5)。PTC 投与群では、T4 発現の明らかな低下は認められなかった (Table 3-6)。

### 1-5. 免疫組織化学的解析 (下垂体 TSH)

これまでに①～⑤の計 8 物質 (PTU・MMI・NaPB・NCD・APC・PTC・IOP・BEX) について、下垂体前葉における TSH 発現を免疫染色により検索した (Figure 2)。

#### ① 甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤

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 陽性面積率の有意な増加が認められた。

#### ② 肝臓における甲状腺ホルモン代謝促進剤

NaPB 投与群では、TSH 陽性面積率について対照群と各投与群との間で統計学的に有意な変化は認められなかった。NCD 投与群では雌雄 150 mg/kg で、TSH 陽性面積率の有意な増加がみられた。

#### ③ ヨウ素取込み阻害剤

APC 投与群では雄 100 ppm、PTC 投与群では雄 1000 ppm で、TSH 陽性面積率が有意に増加した。

#### ④ 脱ヨウ素酵素阻害剤

IOP 投与群では雄 100 mg/kg 以上で、TSH 陽性面積率の有意な増加が認められた。

#### ⑤ TSH 産生阻害剤

BEX 投与群では雄 1 mg/kg 以上で、TSH 陽性面積率の有意な低下が認められた。

### 1-6. 免疫組織化学的解析 (甲状腺 Ki67)

これまでに①～③の計 6 物質 (PTU・MMI・NaPB・NCD・APC・PTC) について、甲状腺における Ki67 発現を免疫

染色により検索した (Figure 3)。

#### ① 甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤

PTU 投与群では雌雄 0.3 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、Ki67 陽性率の有意な増加が認められた。

#### ② 肝臓における甲状腺ホルモン代謝促進剤

NaPB 投与群では雄 100 mg/kg で、NCD 投与群では雄 50 mg/kg 以上で、Ki67 陽性率が有意に増加した。

#### ③ ヨウ素取込み阻害剤

APC 投与群の雄 100 ppm で、Ki67 陽性率の有意な増加がみられた。PTC 投与群では、対照群と各投与群との間で有意な差は認められなかった。

### 1-7. 免疫組織化学的解析 (肝臓 UGT)

①～②の計 4 物質 (PTU・MMI・NaPB・NCD) について、肝臓における UGT 発現を免疫染色により検索した (Figure 4)。

#### ① 甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤

PTU 投与群では雄 3 mg/kg、MMI 投与群では雄 10 mg/kg で、UGT1A6 陽性面積率の有意な増加が認められた。

#### ② 肝臓における甲状腺ホルモン代謝促進剤

UGT1A1/1A6/1A7 はいずれも、対照群では小葉中心部の肝細胞に発現が認められた。UGT1A6 は病理組織学的検索で認められた肝細胞肥大に一致した陽性面積の増加がみられ、NaPB 投与群では雌雄 30 mg/kg 以上、NCD 投与群では雄 150 mg/kg および雌 50 mg/kg 以上で陽性面積率の有意な増加が認められた。UGT1A1 は、NaPB 投与群の雌 100 mg/kg および NCD 投与群の雌 150 mg/kg で、陽性面積率の有意な増加がみられた。UGT1A7 については、検索を行った雌雄 NaPB 100 mg/kg および NCD 150 mg/kg 群と対照群との間で差は認められなかった。

### 1-8. 免疫組織化学的検索 (甲状腺 NIS)

令和 3 年度に実施した PTU・MMI 投与ラット甲状腺を用いたマイクロアレイ解析の結果、両投与群に共通して発現増加を示す多数の遺伝子群が抽出された。発現増加量が特に大きい遺伝子の中から NIS を選択し、PTU・MMI 投与群の甲状腺における発現を免疫染色により検索した (Figure 5)。

対照群では濾胞上皮細胞の基底膜側に、ごく軽微な NIS 発現が観察された。NIS 陽性面積率は病理組織学的検索において濾胞上皮細胞肥大が認められた用量と一致した増加傾向を示し、PTU 投与群では雌雄 0.3 mg/kg 以上、MMI 投与群では雄 3 mg/kg 以上および雌 1 mg/kg 以上で、陽性面積率の有意な増加が認められた。

## 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

網羅的遺伝子発現解析のための SD ラットを用いた NaPB/NCD 投与実験では、投与期間中に一般状態の変化は認められず、体重および摂餌量は対照群と同様に推移した。また、甲状腺および下垂体重量に有意な変化は認められなかった。

### 2-2. 病理組織学的検索

病理組織学的検索の結果、甲状腺濾胞上皮細胞の肥大/過形成およびコロイド退縮が NaPB ならびに NCD 投与群の全例で認められた (Figure 6)。下垂体前葉では、NaPB 投与群の全例で軽度の肥大が、2 例で空胞化がみられた。NCD 投与群では、3 例中 2 例で軽度の肥大/空胞化が認められた。

## 2-2. マイクロアレイ解析

甲状腺では、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 6)。一方、NaPB と NCD 投与群は完全に異なるクラスターとしては分類されず、一部の個体は類似した集団として認識された。また下垂体では、対照群と投与群は別個のクラスターとして分類されたものの、群間の遺伝子発現変動に顕著な差はみられなかった。

甲状腺では、NaPB/NCD 投与によって発現増加した遺伝子がそれぞれ 21 および 37 あり、うち 18 遺伝子が共通していた (Table 4)。また、発現低下した遺伝子は NaPB で 115、NCD で 178 あり、うち 111 遺伝子が共通していた。下垂体では、NaPB/NCD 投与によって発現増加した遺伝子がそれぞれ 1 および 0 であり、共通の遺伝子はみられなかった。発現低下した遺伝子は NaPB で 5、NCD で 5 あり、うち 4 遺伝子が共通であった。

## 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

OECD の Thyroid Disruption Method Expert Group では 2022 年 6 月と 11 月に Web 会議が開催され、主に EU-NETVAL (European Union Network of Laboratories for the Validation of Alternative Methods) による Thyroid Validation Study について検討された。これは欧州動物実験代替法評価センター (ECVAM) の活動の一環であり、2014 年に OECD から発出された甲状腺ホルモン攪乱物質検出のための *in vitro/ex vivo* アッセイに関する Scoping Document において挙げられた機序に基づく 8 種のアッセイ系に対応する *in vitro* 評価法の提案 (Table 5) と、その進捗状況について議論された。検証手順として、評価方法の定義と信頼性の検討および外挿性を検証する 2 段階が想定されている。提案された評価法のうち、SOP を作成し約 30 物質について validation を進めているものが複数ある一方で、2 つの提案については中止となった。

ICCVAM においては、新規の手法 (Deisenroth *et al.*, *Toxicol Sci*, 174: 63-78, 2020) を応用し EPA を中心に開発中の "The human thyroid microtissue assay" について、研究施設間の prevalidation が検討されている。2022 年 9 月の Web 会議において、本手法の概要および妥当性について議論が行われた。本手法は、ヒトから抽出された甲状腺組織の培養系を用いて、TSH の存在下あるいは欠損培養条件下において、化学物質曝露に対する T4 および ATP 産生などの反応を検討する方法である。方法論および用いるヒト甲状腺組織の均一性や結果の再現性について担保可能か等の意見があり、SOP の確定に向けた議論が継続されている。

欧州毒性学会においては、シンポジウムとして「齧歯類における甲状腺ホルモン恒常性変化とヒト神経発達

への潜在的影響との関連性」と題するセッションがあり、以下の 4 つの講演があった。

- ・ヒトおよび動物における甲状腺ホルモンの妊娠/胎児発育に対する影響
- ・ラットにおける化学物質の出生前曝露による肝臓を介した甲状腺影響に関する AOP の開発
- ・成体ラット対ヒトの血中濃度における甲状腺ホルモン代謝モデルの開発
- ・ヒトに対する甲状腺ホルモン攪乱物質検出法とはどのようなものか

新規毒性評価法開発のセッションにおいて、甲状腺を標的とした生体模倣システムの提案があった。

また、個別の演題として、

- ・初代ヒト培養細胞を用いた甲状腺機能攪乱物質による甲状腺ホルモン合成抑制 (EPA)
  - ・雄ラットにおける過塩素酸誘発甲状腺ホルモン抑制におけるピロキシカムの改善効果
  - ・甲状腺ホルモン攪乱物質の作用検討のための 2 種の *in vitro* 評価系の確立
  - ・ヒト生物学に則った甲状腺を介した発達神経毒性の動物を用いない革新的な評価法 (オランダ RIVM)
  - ・ゼブラフィッシュ胚を用いた異なる機序に関するメタボロミクス解析
  - ・甲状腺ホルモン攪乱物質検出のための階層的試験および評価 (欧米の複数の製薬企業)
- など多くの発表があり、引き続き本課題が注目されていることが示唆された。

米国毒性学会においては、「ヒト関連甲状腺障害評価への取り組み」と題するシンポジウムが開催され、以下の 5 つの講演があった。

- ・ヒトへの外挿性に関する情報提供: 甲状腺ホルモン生理学に関する齧歯類を用いた現在の研究 (マサチューセッツ大学)
  - ・*In vitro* の新しいアプローチ方法を用いた、潜在的な甲状腺攪乱物質のヒトへの外挿性評価 (EPA)
  - ・ラットおよびヒトにおける甲状腺ホルモン恒常性および PXR/CAR 誘導剤の効果に基づいた動態モデル (BASF)
  - ・定量的 AOP: 神経変性のケーススタディ (アリゾナ州立大学)
  - ・甲状腺ホルモン攪乱物質の試験および評価スキーム (ダウケミカル)
- その他にも、神経発達毒性ならびにゼブラフィッシュを用いた研究に関する演題も複数みられた。

## 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、様々な機序に基づく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。

①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 (PTU・MMI) は、いずれ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。一方、病理組織学的解析における甲状腺濾胞上皮細胞肥大および免疫染色による T4 発現の低下は、これら

の血清ホルモン値の変化が認められた用量よりも、さらに低い用量から観察された。

また、甲状腺重量および免疫染色による下垂体 TSH 発現の増加が血清 T4 の低下と同用量で、甲状腺における Ki67 発現の増加が血清 TSH の増加と同用量で検出された。

②肝薬物代謝酵素の発現誘導を介した甲状腺ホルモンの代謝促進による抗甲状腺機能が知られる NaPB・NCD は、用量依存的な血清 T4 低下および TSH 増加を引き起こした一方、肝重量増加および小葉中心性肝細胞肥大はより低い用量から誘発された。①と同様に、病理組織学的解析における甲状腺濾胞上皮細胞肥大は、血清ホルモン値より鋭敏な指標であった。

また、甲状腺重量、下垂体 TSH 発現および甲状腺 Ki67 発現の増加が、血清ホルモン値の変化と概ね同用量で認められた。

③甲状腺ホルモンの重要な構成成分であるヨウ素の甲状腺濾胞上皮細胞内への取込みを阻害する APC・PTC は、血清 T3・T4 の有意な変動を引き起こさなかった一方、APC の高用量群では血清 TSH 増加が認められた。病理組織学的解析において、APC 投与群ではより低い用量で甲状腺濾胞上皮細胞肥大が観察され、PTC 投与群でも低頻度ながら同様の病変が誘発された。

また、APC 投与群では、甲状腺重量、下垂体 TSH 発現および甲状腺 Ki67 発現の増加が血清 TSH 増加と同用量で認められた。PTC 投与群では、甲状腺関連ホルモン値の変化は認められなかったが、高用量群では甲状腺重量および下垂体 TSH 発現の増加が観察された。

④T4 から T3 への変換を担う脱ヨウ素酵素(デオジナーゼ)の阻害剤である IOP は、用量依存的な血清 TSH 増加を、また①～③とは逆に血清 T3・T4 の増加を引き起こした。T3 への変換抑制による持続的な T4 の高値と、TSH 分泌亢進が生じた結果と考えられた。病理組織学的解析において、甲状腺濾胞上皮細胞の肥大/過形成が同用量で観察された。また、甲状腺重量および下垂体 TSH 発現の増加が、中用量群以上で認められた。

⑤下垂体における TSH 産生抑制による中枢性甲状腺機能低下を誘発する BEX は、用量依存的な血清 T3・T4 低下を引き起こした。一方、甲状腺および下垂体に明らかな病理組織学的所見は認められず、甲状腺重量にも変化はみられなかった。血清 TSH 値に変化はみられなかったが、下垂体 TSH 発現は全投与群で減少した。

以上①～⑤の投与実験における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が、①～③の各物質において血清 T3・T4・TSH 値の有意な変動がみられた用量よりも、さらに低い用量から統計学的有意差をもって認められた。④脱ヨウ素酵素阻害剤 (IOP) においても、濾胞上皮細胞肥大は血清ホルモン値の変化と同じ用量で認められた。この結果は、抗甲状腺物質の検出において、甲状腺の病理組織学的検索が血中ホルモン値測定よりも鋭敏な指標となり得ることを示唆している。

一方、⑤TSH 産生阻害剤 (BEX) は血清 T3・T4 値の有意な変動を引き起こしたが、甲状腺および下垂体に病理組織学的所見は認められなかった。今後、同機序によ

る甲状腺機能低下を誘発する物質の検出に適した指標の探索を継続する予定である。

甲状腺重量、免疫染色による下垂体前葉の TSH 発現および甲状腺の Ki67 発現の増加が、①～③の投与実験において血清 T4 または TSH 値の変動と同程度の感度で検出された。③のうち PTC は血清ホルモン値の有意な変動を示さなかったが、甲状腺重量および下垂体 TSH 発現の増加が認められた。以上の結果から、甲状腺重量、免疫染色による下垂体 TSH・甲状腺 Ki67 発現も、抗甲状腺物質の評価に有用と考えられた。一方で④脱ヨウ素酵素阻害剤 (IOP) では、甲状腺重量・下垂体 TSH 発現の増加と比較し、血清 T4 値の増加がより低い用量から検出された。現在解析を実施中の Erythrosine の結果と併せて、同機序による抗甲状腺作用の検出手法について検討する予定である。

また、⑤TSH 産生阻害剤 (BEX) は甲状腺重量を変化させなかったが、下垂体 TSH 発現の有意な低下が、血清 T4 値低下に伴って認められた。この結果から、TSH 発現亢進だけでなく産生阻害作用の検出においても、下垂体における TSH 免疫染色が有用である可能性が示唆された。

①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤による甲状腺 T4 発現低下は免疫染色で比較的容易に検出可能であり、病理組織学的検索における濾胞上皮細胞肥大と同等の感度を有することが示された。③ヨウ素取込み阻害剤は、今回の用量では血清 T4 値の有意な低下を示さなかったが、免疫染色では甲状腺 T4 発現低下が散見され、同様に高感度の指標となり得ることが示唆された。一方で、②甲状腺ホルモン代謝促進物質では、血清 T4 低下および濾胞上皮細胞肥大が認められた高用量群においても、免疫染色による T4 発現の低下はみられなかった。以上の結果は、甲状腺における T4 産生を直接的に阻害する物質 (①/③) と、肝臓での代謝促進による間接的な抗甲状腺物質 (②) を区別するために、T4 免疫染色が有用であることを示している。

齧歯類では肝臓におけるグルクロン酸転移酵素 (UGT) の発現亢進によって血清 T4 の代謝・排泄が促進され、間接的な抗甲状腺作用が誘導されることが知られている。本研究においても、②の物質による肝肥大および UGT1A6 発現の増加は、血清ホルモン値の変動ならびに甲状腺の病理組織学的所見に先行して認められ、間接的な抗甲状腺作用を反映していた。①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤では対照的に、肝 UGT1A6 発現の増加よりも血清ホルモン値等の方が鋭敏な指標であった。以上の結果から、肝臓の重量測定・病理検査と UGT1A6 免疫染色は、間接的な抗甲状腺物質の検出に有用である可能性が示唆された。

令和 3 年度に実施した網羅的遺伝子発現解析の結果から、NIS が新たなバイオマーカーとして見出された。①PTU/MMI 投与群における免疫染色により、甲状腺濾胞上皮における NIS 発現は肥大を呈する細胞に一致して増加し、病理組織学的解析をサポートする手法として有用である可能性が示唆された。今後、他の投与群についても解析を行い、有用性を検証する予定である。



## 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

前年度に実施した①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤の解析に続き、②甲状腺ホルモン代謝促進物質 (NaPB/NCD) 投与ラットの甲状腺・下垂体を用いたマイクロアレイ解析を実施した。

NaPB および NCD を投与したラットでは有意な体重増加抑制はみられなかったものの、いずれも 4 週目において対照群に比して低値を示した。病理組織学的検索では、甲状腺濾胞上皮細胞の肥大および下垂体前葉における肥大等が観察され、豊田・赤根らの先行実験における結果と一致していた。

マイクロアレイ解析の結果、NaPB・NCD に共通して発現増加がみられた遺伝子は、甲状腺で 18・下垂体ではゼロであり、①の物質 (それぞれ 336・239 遺伝子) と比較して著しく少ないことが明らかとなった。この結果は、②の物質による肝臓を介した間接的な抗甲状腺作用を反映したものと考えられる。マイクロアレイ解析の詳細なデータは豊田・赤根らに提供し、新たなバイオマーカー探索とともに抗甲状腺機能メカニズム特定への応用を目指す。

## 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

OECD の Thyroid Disruption Method Expert Group における活動は、甲状腺機能障害を誘発する様々な機序について、各々を検討する評価系を包括的に実施する IATA の考えに沿ったものと考えられる。現時点ではいずれの評価系も validation の終了に至っていないが、より重要と考えられる機序から開発を進める方針とされている。ただし、これらの手法はハザードの有無を評価するものであり、曝露用量などのリスク評価に応用するには、さらなる検討が必要との意見もあった。

EPA のヒト甲状腺培養組織を用いた評価系については、すでに論文発表はあるものの、現在施設間 validation の開始に向けて詳細な実施方法を明確化する作業が行われている。ヒト細胞の均一性・再現性の問題および培養液中のホルモンのコントロールなどを含め、評価法としての確立に向けた課題が提示された。

OECD や ICCVAM/EPA に主導されるこれらの *in vitro* 評価系開発は、妊娠期の特定期間に誘発される甲状腺機能低下が、ごく短期間であっても胎児の神経発達に重大な影響を及ぼす懸念への対応が重視されているためと考えられる。欧州毒性学会および米国毒性学会においても、シンポジウムの他にも複数のグループから甲状腺ホルモン攪乱物質の評価法に関する研究発表がなされていた。特に EU では、内分泌攪乱物質は使用できないとの原則があるため、ヒトへの外挿性の有無が重要な論点になっていると考えられた。

## E. 結論

令和 4 年度までの結果から、抗甲状腺物質の検出において、ラット 28 日間反復経口投与試験から得られた甲状腺の病理組織学的検索が、血中ホルモン値測定よりも鋭敏な指標となり得ることが示された。また、甲状

腺重量、下垂体 TSH および甲状腺 Ki67 の免疫染色も、血中ホルモン値と概ね同等の感度を示し、抗甲状腺物質の評価に有用と考えられた。

ヒトへの外挿性を考慮する上で特に重要な、甲状腺への直接影響かあるいは肝臓での代謝を介した間接的な影響かを区別するために、甲状腺の T4 免疫染色、肝臓における病理検査および UGT1A6 免疫染色を利用し得る可能性が示唆された。

これまでの甲状腺・下垂体を用いた網羅的遺伝子発現解析により、病理組織学的解析をサポートし得る新規バイオマーカーとして NIS を見出した。

国際的には OECD および ICCVAM/EPA を中心とした専門家会議において、抗甲状腺物質の *in vitro* 評価系開発が進んでいるものの、実用化には多くの課題が残されており、既存の試験に組み込みが可能な *in vivo* 評価手法の確立が引き続き重要であることが確認された。

## 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.* 2022; 42: 1603-17.
- [2] Toyoda T, Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for  $\gamma$ -H2AX: a review from analyses of 100 chemicals. *J Toxicol Pathol.* 2022; 35: 283-98.
- [3] Toyoda T, Kobayashi T, Miyoshi N, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Toxicological effects of two metabolites derived from *o*-toluidine and *o*-anisidine after 28-day oral administration to rats. *J Toxicol Sci.* 2022; 47: 457-66.
- [4] Ishii Y, Namiki M, Takasu S, Nakamura K, Takimoto N, Mitsumoto T, Ogawa K. Lack of genotoxic mechanisms in isoeugenol-induced hepatocellular tumorigenesis in male B6C3F1 mice. *Jpn J Food Chem Safety.* 2023; 30: 9-22.
- [5] Ishii Y, Nakamura K, Mitsumoto T, Takimoto N, Namiki M, Takasu S, Ogawa K. Visualization of the distribution of anthraquinone components from madder roots in rat kidneys by desorption electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry imaging. *Food Chem Toxicol.* 2022; 161: 112851.
- [6] 小川久美子, 石井雄二, 豊田武士. 医薬品と化学物質の毒性評価における病理組織標本の役割と応用. *日本薬理学会誌.* 2022; 157: 139-45.
- [7] 小川久美子, 西村次平, 野中瑞穂, 西川秋佳. ICH-S1B(R1): 医薬品のがん原性試験ガイドライン改定について. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス.* 2022; 53: 25-8.

- [8] Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Cho YM, Ogawa K. Persistent  $\gamma$ -H2AX formation and expression of stem cell markers in *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *Toxicol Sci.* 2022; 189: 51-61.
- [9] Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic homo- and hetero-dimers of *o*-toluidine, *o*-anisidine, and aniline formed by *in vitro* metabolism. *Chem Res Toxicol.* 2022; 35: 1625-30.
- [10] Arakawa N, Ushiki A, Abe M, Matsuyama S, Saito Y, Kashiwada T, Horimasu Y, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Tsushima K, Miyashita K, Saito K, Nakamura R, Toyoda T, Ogawa K, Sato M, Takamatsu K, Mori K, Nishiya T, Izumi T, Ohno Y, Saito Y, Hanaoka M. Stratifin as a novel diagnostic biomarker in serum for diffuse alveolar damage. *Nat Commun.* 2022; 13: 5854.
- [11] Takasu S, Ishii Y, Mamiki M, Nakamura K, Mitsumoto T, Takimoto N, Nohmi T, Ogawa K. Comprehensive analysis of the general toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 3-acetyl-2,5-dimethylfuran in male *gpt* delta rats. *Food Chem Toxicol.* 2023; 172: 113544.
- [12] Kuroda K, Ishii Y, Takasu S, Matsushita K, Kijima A, Nohmi T, Umemura T. Toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 2-methylfuran in a 90-day comprehensive toxicity study in *gpt* delta rats. *Food Chem Toxicol.* 2022; 168: 113365.
- [13] Saito K, Ishikawa R, Kitamura I, Ogawa K, Arakawa N, Sun Y, Imai K, Maeda T, Saito Y, Hasegawa C. Characterization of serotonin as a candidate biomarker of severity and prognosis of COVID-19 using LC/MS analysis. *J Pharmacol Sci.* 2022; 150: 49-55.
- [14] Arakawa N, Matsuyama S, Matsuoka M, Kitamura I, Miyashita K, Kitagawa Y, Imai K, Ogawa K, Maeda T, Saito Y, Hasegawa C. Serum stratifin and presepsin as candidate biomarkers for early detection of COVID-19 disease progression. *J Pharmacol Sci.* 2022; 150: 21-30.
- 3) 豊田武士, 赤根弘敏, 小川久美子. 化学物質誘発ラット膀胱腫瘍の発生過程における $\gamma$ -H2AXの役割. 第81回日本毒学会学術総会、神奈川県、(2022年9月)
- 4) 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子.  $\gamma$ -H2AXを指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発. 第49回日本毒学会学術年会、北海道、(2022年7月)
- 5) Ogawa K, Akagi J, Mizuta Y, Akane H, Toyoda T. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023.3)
- 6) 小川久美子, 長野嘉介, 小島肇, 福島昭治, 西川秋佳. 鼻腔発がんの機序について—AOP的考え方. 第5回医薬品毒性機序研究会、東京都、(2022年12月)
- 7) 小川久美子, 西村次平, 西川秋佳. ICH S1ガイドラインの改定と *rasH2-Tg* マウス. 第49回日本毒学会学術年会、北海道、(2022年7月)
- 8) 石井雄二, 中村賢志, 瀧本憲史, 高須伸二, 満元達也, 小川久美子. Acetamideが誘発する肝細胞質内封入体の意義と肝発がんへの関与. 日本薬学会第143年会、北海道、(2023年3月)
- 9) 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子. Acetamide投与ラットの肝臓に生じる大型小核の形成機序. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2023年1月)
- 10) 石井雄二, 中村賢志, 高須伸二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 小川久美子. 全ゲノム解析から明らかになった acetamide のラット肝腫瘍形成におけるがん遺伝子 *c-Myc* の関与. 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会、広島県、(2022年11月)
- 11) 石井雄二. 病理学から見た化学物質安全性評価におけるイメージング質量分析の有用性. 第47回日本医用マススペクトル学会、Web開催、(2022年9月)
- 12) 石井雄二, 瀧本憲史, 河上強志, 田原麻衣子, 中村賢志, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子. Acetamideの肝発がん機序に関する検討: 血液及び肝臓中動態のラット系統差の比較. 第49回日本毒学会学術年会、北海道、(2022年7月)
- 13) Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Comparison of sensitivity between histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors and promoters of thyroid hormone metabolism. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023.3)
- 14) 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. ヨウ素取込み阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出指標としての病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値の比較. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2023年1月)
- 15) 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. ラットを用いた

## 2. 学会発表

- 1) Toyoda T, Yamada T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for  $\gamma$ -H2AX. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023.3)
- 2) 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子.  $\gamma$ -H2AX免疫染色を指標とした腎発がん性の短期評価法開発. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2023年1月)

- 病理組織学的及び免疫組織化学的手法による抗甲状腺物質の検出. 第 81 回日本癌学会学術総会、神奈川県、(2022 年 9 月)
- 16) 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. 甲状腺ホルモン代謝促進物質投与ラットにおける抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較. 第 49 回日本毒性学会学術年会、北海道、(2022 年 7 月)
- 17) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. 結晶子径 6 nm の超微小粒子径アナターゼ型二酸化チタンナノ粒子の反復経口投与毒性. 日本薬学会第 143 年会、北海道、(2023 年 3 月)
- 18) 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、渡邊正悟、岸本真治、松下幸平、赤根弘敏、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新規尿中代謝物はラット膀胱上皮における ALDH1A1 の発現を誘導する. 日本農芸化学会 2023 年度大会、Web 開催、(2023 年 3 月)
- 19) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 腎線維化における部分的上皮間葉転換の生じた尿細管の役割と CD44 との関連. 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2023 年 1 月)
- 20) 満元達也、石井雄二、瀧本憲史、並木萌香、高須伸二、梅村隆志、能美健彦、小川久美子. *gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験による 2-isopropyl-N-2,3-trimethyl butylamide (ITB) の評価. 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2023 年 1 月)
- 21) 瀧本憲史、石井雄二、中村賢志、並木萌香、高須伸二、満元達也、渋谷淳、小川久美子. アセトアミドのラット肝発がん機序における chromoanagenesis の関与の可能性. 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2023 年 1 月)
- 22) 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病変における CD44 陽性尿細管の病態生理学的意義. 第 5 回医薬品毒性機序研究会、東京都、(2022 年 12 月)
- 23) 岡本悠佑、福井千恵、赤根弘敏、豊田武士、梶山健次、権英淑、神山文男、小川久美子、伊豆津健一、山本栄一、野村祐介. コーティング型マイクロニードルアレイにおける高極性薬剤の皮膚透過性の評価. 第 44 回日本バイオマテリアル学会、東京都、(2022 年 11 月)
- 24) 増田寛喜、豊田武士、宮下知治、吉田寛、瀬戸泰之、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 33 回日本消化器癌発生学会総会、東京都、(2022 年 11 月)
- 25) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. ナノサイズ二酸化チタンの 90 日間反復経口投与毒性. 第 59 回全国衛生化学技術協議会年会、神奈川県、(2022 年 11 月)
- 26) 満元達也、石井雄二、瀧本憲史、高須伸二、並木萌香、梅村隆志、能美健彦、小川久美子. アカネ色素のラット腎臓における部位特異的な腫瘍形成の機序. 日本環境変異原ゲノム学会第 51 回大会、広島県、(2022 年 11 月)
- 27) 瀧本憲史、石井雄二、満元達也、並木萌香、高須伸二、渋谷淳、小川久美子. ラット肝細胞における Acetamide の大型小核誘発機序に関する研究. 日本環境変異原ゲノム学会第 51 回大会、広島県、(2022 年 11 月)
- 28) 日比大介、高須伸二、石井雄二、梅村隆志. フランのラット肝発がん葉特異性に着目した変異原性評価. 日本環境変異原ゲノム学会第 51 回大会、広島県、(2022 年 11 月)
- 29) 増村健一、安東朋子、石井雄二、杉山圭一. *gpt delta* マウスを用いたアクリルアミドの生殖器細胞変異原性と次世代個体ゲノム変異. 日本環境変異原ゲノム学会第 51 回大会、広島県、(2022 年 11 月)
- 30) 赤木純一、横井雅幸、曹永晩、花岡文雄、菅澤薫、岩井成憲、小川久美子. Ring-opened N7-deoxyguanosine adduct of glycidamide induces DNA replication inhibition and mutagenesis. 第 49 回国際核酸化学シンポジウム、東京都、(2022 年 11 月)
- 31) 増田寛喜、豊田武士、宮下知治、吉田寛、瀬戸泰之、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 81 回日本癌学会学術総会、神奈川県、(2022 年 9 月)
- 32) 赤木純一、豊田武士、小川久美子.  $\gamma$ -H2AX との組み合わせによる肝発癌物質検出のためのバイオマーカーとしての EpCAM およびアミノペプチダーゼ N の有用性. 第 81 回日本癌学会学術総会、神奈川県、(2022 年 9 月)
- 33) 岡本悠佑、福井千恵、赤根弘敏、豊田武士、梶山健次、権英淑、神山文男、小川久美子、伊豆津健一、山本栄一、野村祐介. コーティング型マイクロニードルアレイにおける穿刺性及び薬剤透過性の評価. 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京都、(2022 年 8 月)
- 34) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 薬剤性腎障害から慢性腎臓病への移行を予測するバイオマーカーの探索. 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京都、(2022 年 8 月)
- 35) Kobayashi T, Toyoda T, Yoshioka Y, Murai N, Kishimoto S, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic metabolites of *o*-toluidine and *o*-anisidine induce ALDH1A1 in rat bladder epithelium. 13th International Conference on Environmental Mutagens, Canada, (2022. 8)
- 36) 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、赤根弘敏、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. 細胞毒性を有する *o*-Toluidine と *o*-anisidine の尿中代謝物はラット膀胱上皮で ALDH1A1 を誘導する. 第 29 回日本がん予防学会総会、京都府、(2022 年 7 月)

- 37) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. アロプリノール誘発腎線維化モデルラットを用いたCD44の腎線維化バイオマーカーとしての有用性の検証. 第49回日本毒性学会学術年会、北海道、(2022年7月)
- 38) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. ナノサイズ酸化チタン(IV)の毒性研究. 第49回日本毒性学会学術年会、北海道、(2022年7月)
- 39) 山下修司、小川久美子、平田岳史. レーザーアブレーション-単一粒子誘導結合プラズマ質量分析法によるナノ粒子・溶存イオンの定量イメージング分析. 第49回日本毒性学会学術年会、北海道、(2022年7月)
- 40) 瀧本憲史、石井雄二、満元達也、並木萌香、高須伸二、渋谷淳、小川久美子. Acetamideが誘発するラット肝細胞における大型小核の形成機序. 第49回日本毒性学会学術年会、北海道、(2022年7月)
- 41) 相馬明玲、石黒聖奈、日比大介、高須伸二、石井雄二、梅村隆志. ラット肝発がん物質フラン投与によるSOX9陽性肝細胞の葉特異的出現. 第49回日本毒性学

- 会学術年会、北海道、(2022年7月)
- 42) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. AKIからCKDへの移行におけるCD44の役割とバイオマーカーとしての応用. 第65回日本腎臓学会学術総会、兵庫県、(2022年6月)
- 43) 森川朋美、豊田武士、赤根弘敏、松下幸平、小川久美子. ラットを用いたオリゴガラクトシドの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28回総会・学術大会、東京都、(2022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**
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**

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**
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**

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
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

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*
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*

Each value represents the mean ± S.D.

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

Table 1-5. Serum hormone levels in SD rats treated with APC for 28 days

Dose (ppm)	0	1	10	100
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
T3 (ng/mL)	0.59 ± 0.05	0.67 ± 0.02	0.62 ± 0.09	0.64 ± 0.06
T4 (µg/dL)	3.6 ± 0.3	4.2 ± 0.4	3.4 ± 1.0	3.5 ± 0.6
TSH (ng/mL)	0.75 ± 0.21	1.06 ± 0.24	0.87 ± 0.31	1.34 ± 0.45*
Female				
T3 (ng/mL)	0.61 ± 0.08	0.61 ± 0.10	0.66 ± 0.14	0.65 ± 0.10
T4 (µg/dL)	2.8 ± 0.5	2.6 ± 0.3	3.8 ± 0.8	2.9 ± 1.0
TSH (ng/mL)	0.53 ± 0.11	0.74 ± 0.13*	0.73 ± 0.15	0.56 ± 0.14

Each value represents the mean ± S.D.

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

Table 1-6. Serum hormone levels in SD rats treated with PTC for 28 days

Dose (ppm)	0	10	100	1000
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
T3 (ng/mL)	0.59 ± 0.05	0.65 ± 0.09	0.64 ± 0.07	0.64 ± 0.12
T4 (µg/dL)	3.6 ± 0.3	3.8 ± 0.7	4.0 ± 0.8	3.0 ± 0.4
TSH (ng/mL)	0.75 ± 0.21	1.02 ± 0.14	1.06 ± 0.55	1.05 ± 0.45
Female				
T3 (ng/mL)	0.61 ± 0.08	0.61 ± 0.06	0.59 ± 0.10	0.59 ± 0.07
T4 (µg/dL)	2.8 ± 0.5	3.1 ± 0.7	3.5 ± 1.1	2.4 ± 0.8
TSH (ng/mL)	0.53 ± 0.11	0.64 ± 0.12	0.56 ± 0.12	0.54 ± 0.07

Each value represents the mean ± S.D.

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

Table 1-7. Serum hormone levels in SD rats treated with IOP for 28 days

Dose (mg/kg)	0	30	100	300
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
T3 (ng/mL)	0.51 ± 0.07	0.53 ± 0.04	0.61 ± 0.06	0.77 ± 0.13**
T4 (µg/dL)	3.3 ± 0.3	6.1 ± 0.7**	7.0 ± 1.2**	7.6 ± 1.6**
TSH (ng/mL)	0.71 ± 0.69	3.08 ± 0.33*	4.74 ± 0.97**	6.03 ± 2.54**

Each value represents the mean ± S.D.

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

Table 1-8. Serum hormone levels in SD rats treated with BEX for 28 days

Dose (mg/kg)	0	1	3	10
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
T3 (ng/mL)	0.51 ± 0.07	0.43 ± 0.03	0.39 ± 0.04**	0.37 ± 0.06**
T4 (µg/dL)	3.3 ± 0.3	1.9 ± 0.2**	1.9 ± 0.2**	1.9 ± 0.3**
TSH (ng/mL)	0.71 ± 0.69	0.92 ± 0.54	0.56 ± 0.53	0.72 ± 0.74

Each value represents the mean ± S.D.

\*\* : Significantly different from the control group at p<0.01.

Table 2-1. Organ weight data 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)	356 ± 19	378 ± 16	370 ± 18	358 ± 22	339 ± 38	278 ± 21
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*
Liver (g)	9.99 ± 0.90	11.00 ± 0.81	10.14 ± 0.32	9.96 ± 1.06	8.68 ± 1.26	6.57 ± 0.70**
(g%)	2.80 ± 0.12	2.91 ± 0.14	2.75 ± 0.23	2.78 ± 0.21	2.56 ± 0.13	2.36 ± 0.08**
Female						
Body weight (g)	225 ± 18	217 ± 15	229 ± 8	219 ± 12	222 ± 14	188 ± 6
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**
Liver (g)	6.08 ± 0.65	5.71 ± 0.29	6.10 ± 0.52	5.95 ± 0.39	5.98 ± 0.77	4.63 ± 0.21**
(g%)	2.70 ± 0.11	2.63 ± 0.16	2.66 ± 0.22	2.72 ± 0.19	2.69 ± 0.19	2.46 ± 0.14

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 weight data 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)	356 ± 19	386 ± 31	372 ± 24	361 ± 17	299 ± 29
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
Liver (g)	9.99 ± 0.90	11.18 ± 1.07	11.17 ± 1.43	10.37 ± 0.74	8.35 ± 1.46
(g%)	2.80 ± 0.12	2.90 ± 0.17	3.00 ± 0.19	2.87 ± 0.09	2.78 ± 0.23
Female					
Body weight (g)	225 ± 18	225 ± 20	215 ± 14	222 ± 15	224 ± 12
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**
Liver (g)	6.08 ± 0.65	6.46 ± 0.97	6.20 ± 0.57	6.35 ± 0.58	6.61 ± 0.80
(g%)	2.70 ± 0.11	2.86 ± 0.17	2.89 ± 0.21	2.86 ± 0.13	2.95 ± 0.28

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 weight data 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)	355 ± 22	348 ± 19	366 ± 33	353 ± 27
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
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**
Female				
Body weight (g)	239 ± 23	233 ± 21	235 ± 22	237 ± 12
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*
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**

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 weight data 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)	355 ± 22	352 ± 17	348 ± 28	332 ± 17
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
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**
Female				
Body weight (g)	239 ± 23	224 ± 11	234 ± 13	234 ± 14
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
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**

Each value represents the mean ± S.D.

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



Table 2-5. Organ weight data in SD rats treated with APC for 28 days

Dose (ppm)	0	1	10	100
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
Body weight (g)	407 ± 32	405 ± 35	419 ± 35	388 ± 25
Thyroids (mg)	21.1 ± 1.6	25.3 ± 4.4	26.6 ± 4.8	35.1 ± 4.1**
(mg%)	5.19 ± 0.17	6.24 ± 0.98	6.32 ± 0.82	9.08 ± 1.24**
Pituitary (mg)	14.2 ± 1.3	14.5 ± 1.3	14.0 ± 1.0	14.3 ± 0.7
(mg%)	3.48 ± 0.23	3.59 ± 0.15	3.36 ± 0.29	3.68 ± 0.17
Adrenals (mg)	56.6 ± 9.2	51.6 ± 9.0	55.0 ± 7.0	53.3 ± 8.8
(mg%)	14.0 ± 2.5	12.9 ± 2.8	13.1 ± 1.4	13.8 ± 2.8
Liver (g)	11.05 ± 0.63	11.41 ± 1.43	12.17 ± 1.90	11.11 ± 0.88
(g%)	2.72 ± 0.07	2.81 ± 0.12	2.89 ± 0.23	2.87 ± 0.14
Female				
Body weight (g)	230 ± 13	223 ± 12	230 ± 15	238 ± 22
Thyroids (mg)	15.2 ± 1.2	16.2 ± 1.6	17.1 ± 2.8	22.8 ± 4.0**
(mg%)	6.59 ± 0.38	7.26 ± 0.47	7.47 ± 1.45	9.58 ± 1.25**
Pituitary (mg)	16.2 ± 1.2	16.8 ± 2.1	18.1 ± 1.1	17.5 ± 1.1
(mg%)	7.07 ± 0.86	7.51 ± 0.78	7.87 ± 0.84	7.39 ± 0.55
Adrenals (mg)	60.3 ± 3.9	59.4 ± 10.7	63.2 ± 10.9	63.5 ± 7.1
(mg%)	26.3 ± 2.7	26.6 ± 4.0	27.4 ± 4.5	26.8 ± 3.2
Liver (g)	6.30 ± 0.30	5.79 ± 0.18	6.37 ± 0.80	6.62 ± 0.41
(g%)	2.74 ± 0.09	2.60 ± 0.07	2.76 ± 0.18	2.78 ± 0.14

Each value represents the mean ± S.D.

\*\*: Significantly different from the control group at p<0.01.

Table 2-6. Organ weight data in SD rats treated with PTC for 28 days

Dose (ppm)	0	10	100	1000
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
Body weight (g)	407 ± 32	405 ± 17	423 ± 45	403 ± 18
Thyroids (mg)	21.1 ± 1.6	22.8 ± 2.5	23.0 ± 4.4	27.4 ± 3.4*
(mg%)	5.19 ± 0.17	5.63 ± 0.50	5.48 ± 1.09	6.79 ± 0.69**
Pituitary (mg)	14.2 ± 1.3	14.6 ± 0.6 <sup>a)</sup>	15.0 ± 0.9	14.4 ± 1.1
(mg%)	3.48 ± 0.23	3.64 ± 0.26 <sup>a)</sup>	3.57 ± 0.26	3.57 ± 0.16
Adrenals (mg)	56.6 ± 9.2	59.2 ± 14.2	64.6 ± 7.8	56.4 ± 8.6
(mg%)	14.0 ± 2.5	14.6 ± 3.2	15.3 ± 1.2	14.1 ± 2.4
Liver (g)	11.05 ± 0.63	11.61 ± 1.04	12.53 ± 1.49	11.19 ± 0.69
(g%)	2.72 ± 0.07	2.87 ± 0.14	2.96 ± 0.07*	2.78 ± 0.19
Female				
Body weight (g)	230 ± 13	238 ± 9	234 ± 21	225 ± 15
Thyroids (mg)	15.2 ± 1.2	16.7 ± 1.7	16.8 ± 2.1	17.2 ± 0.8
(mg%)	6.59 ± 0.38	7.01 ± 0.69	7.18 ± 0.76	7.67 ± 0.81
Pituitary (mg)	16.2 ± 1.2	15.9 ± 1.3	16.2 ± 1.8	16.7 ± 2.0
(mg%)	7.07 ± 0.86	6.69 ± 0.72	6.93 ± 0.76	7.44 ± 1.04
Adrenals (mg)	60.3 ± 3.9	62.9 ± 3.5	69.1 ± 11.8	61.9 ± 10.4
(mg%)	26.3 ± 2.7	26.5 ± 1.8	29.3 ± 3.3	27.6 ± 5.2
Liver (g)	6.30 ± 0.30	6.38 ± 0.42	6.42 ± 0.89	6.33 ± 0.75
(g%)	2.74 ± 0.09	2.68 ± 0.17	2.73 ± 0.24	2.81 ± 0.19

Each value represents the mean ± S.D.

<sup>a)</sup>: The number of effective animals was reduced to 4 due to failed tissue sampling.

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

Table 2-7. Organ weight data in SD rats treated with IOP for 28 days

Dose (mg/kg)	0	30	100	300
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
Body weight (g)	418 ± 26	397 ± 34	394 ± 15	406 ± 34
Thyroids (mg)	20.8 ± 2.2	24.0 ± 4.1	25.9 ± 4.3	28.2 ± 3.7*
(mg%)	5.0 ± 0.4	6.1 ± 0.8	6.6 ± 1.3*	7.0 ± 1.0*
Pituitary (mg)	12.6 ± 1.0	13.7 ± 0.6	13.7 ± 0.5	14.3 ± 2.1
(mg%)	3.0 ± 0.3	3.5 ± 0.3	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.4*
Adrenals (mg)	51.8 ± 7.9	51.3 ± 4.1	44.4 ± 10.3	47.7 ± 5.8
(mg%)	12.4 ± 1.9	12.9 ± 0.7	11.3 ± 2.9	11.8 ± 1.7
Liver (g)	12.73 ± 0.64	11.76 ± 1.10	12.37 ± 1.13	14.54 ± 1.52
(g%)	3.05 ± 0.11	2.96 ± 0.13	3.14 ± 0.22	3.58 ± 0.14**

Each value represents the mean ± S.D.

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

Table 2-8. Organ weight data in SD rats treated with BEX for 28 days

Dose (mg/kg)	0	1	3	10
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
Body weight (g)	418 ± 26	416 ± 28	452 ± 40	435 ± 29
Thyroids (mg)	20.8 ± 2.2	22.8 ± 3.9	20.9 ± 3.2	18.1 ± 2.7
(mg%)	5.0 ± 0.4	5.5 ± 1.2	4.7 ± 0.9	4.2 ± 0.6
Pituitary (mg)	12.6 ± 1.0	14.0 ± 0.7	13.5 ± 1.5	12.6 ± 1.1
(mg%)	3.0 ± 0.3	3.4 ± 0.3	3.0 ± 0.6	2.9 ± 0.3
Adrenals (mg)	51.8 ± 7.9	54.6 ± 12.6	60.4 ± 13.1	62.6 ± 3.5
(mg%)	12.4 ± 1.9	13.2 ± 2.9	13.3 ± 1.8	14.4 ± 1.3
Liver (g)	12.73 ± 0.64	12.20 ± 1.22	14.98 ± 3.04	16.67 ± 2.15*
(g%)	3.05 ± 0.11	2.93 ± 0.17	3.29 ± 0.42	3.82 ± 0.29**

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(1,0,0,0)	5(4,1,0,0)**	5(0,5,0,0)**	5(0,0,3,2)**	5(0,0,2,3)**	
		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(1,0,0,0)	3(2,1,0,0)	5(2,3,0,0)**	5(0,0,3,2)**	5(0,0,3,2)**	
		Decrease in T4 level (±, +, ++, +++) <sup>a)</sup>	0	1(1,0,0,0)	4(4,0,0,0)*	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)**	
	Liver		0	0	0	0	0	0	
	Female	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +, ++, +++)	0	0	5(5,0,0,0)**	5(0,5,0,0)**	5(0,0,4,1)**	5(0,0,3,2)**
			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(2,0,0,0)	4(2,2,0,0)*	5(0,0,4,1)**	5(0,0,2,3)**	
Decrease in T4 level (±, +, ++, +++) <sup>a)</sup>			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	5**	
		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)**	
Liver			0	0	0	0	0	0	

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

<sup>a)</sup>: 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 0,0,0)**	5(1,4,0,0)**	5(0,2,3,0)**	5(0,1,2,2)**	
		Hyperplasia, follicular cell (±, +, ++)	0	0	3(2, 1, 0)	5(0, 4, 1)**	5(0, 2, 3)**	
		Colloid depletion (±, +, ++, +++)	0	2(2,0,0,0)	3(2,1,0,0)	5(0,2,3,0)**	5(0,0 3,2)**	
		Decrease in T4 level (±, +, ++) <sup>a)</sup>	0	4(4,0,0)*	5(5,0,0)**	5(2,2,1)**	5(0,0,5)**	
	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)**	
	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (±, +)	0	0	0	0	4(3, 1)*	
	Female	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +, ++, +++)	0	3(3,0,0,0)	5(4,1,0,0)**	5(4,1,0,0)**	5(0,0,4,1)**
			Hyperplasia, follicular cell (±, +, ++)	0	0	3(2, 1, 0)	5(2, 3, 0)**	5(0, 3, 2)**
Colloid depletion (±, +, ++, +++)			0	0	1(1,0,0,0)	3(2,1,0,0)	5(0,0,4,1)**	
Decrease in T4 level (±, +, ++) <sup>a)</sup>			0	3(3,0,0)	5(5,0,0)**	5(3,2,0)**	5(0,2,3)**	
Pituitary		Vacuolation, pars distalis (±)	0	0	0	0	1	
		Hypertrophy, pars distalis (±, +)	0	0	0	1(1, 0)	5(4, 1)**	
Adrenal		Atrophy, cortical (±)	0	0	0	0	1	
Liver		Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (±)	0	0	0	0	1	

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

<sup>a)</sup>: Immunohistochemistry for T4

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

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

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	0	10	30	100
			No. of animals examined	5	5	5
Male	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular ( $\pm$ , +, ++, +++)	0	4(4,0,0,0)*	5(0,4,1,0)**	5(0,0,3,2)**
		Thyroid	Hypertrophy, follicular cell ( $\pm$ , +)	0	2(2, 0)	4(3, 1)*
		Hyperplasia, follicular cell ( $\pm$ )	0	0	2	5**
		Colloid depletion ( $\pm$ )	0	1	3	4*
		Decrease in T4 level <sup>a)</sup>	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis ( $\pm$ )	0	0	0	2
		Hypertrophy, pars distalis ( $\pm$ )	0	0	0	2
Adrenal		0	0	0	0	
Female	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular ( $\pm$ , +, ++)	0	3(3,0,0)	5(1,4,0)**	5(1,2,2)**
		Thyroid	Hypertrophy, follicular cell ( $\pm$ )	0	2	4*
		Hyperplasia, follicular cell	0	0	0	0
		Colloid depletion ( $\pm$ )	0	0	1	1
		Decrease in T4 level <sup>a)</sup>	0	0	0	0
	Pituitary		0	0	0	0
	Adrenal		0	0	0	0

$\pm$ , minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe

<sup>a)</sup>: Immunohistochemistry for T4

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

Table 3-4. Histopathological findings in SD rats treated with NCD for 28 days

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	0	15	50	150
			No. of animals examined	5	5	5
Male	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular ( $\pm$ , +)	0	0	5(5,0)**	5(2,3)**
		Vacuolation, hepatocyte, periportal ( $\pm$ , +, ++)	0	0	3(1,2,0)	4(0,2,1)*
	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell ( $\pm$ , +)	0	3(3, 0)	4(2, 2)*	5(1, 4)**
		Hyperplasia, follicular cell ( $\pm$ )	0	0	3	5**
		Colloid depletion ( $\pm$ )	0	1(1, 0)	3(2, 1)	3(3, 2)
		Decrease in T4 level <sup>a)</sup>	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis ( $\pm$ )	0	0	0	2
Hypertrophy, pars distalis ( $\pm$ )		0	0	0	2	
Adrenal		0	0	0	0	
Female	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular ( $\pm$ , +)	0	0	3(3,0)	5(0,5)**
		Vacuolation, hepatocyte, periportal ( $\pm$ , +, ++)	0	4(3,1,0)*	5(0,3,2)**	5(1,4,0)**
	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell ( $\pm$ , +)	0	3(3, 0)	4(4, 0)*	5(3, 2)**
		Hyperplasia, follicular cell ( $\pm$ )	0	0	0	3
		Colloid depletion ( $\pm$ )	0	0	1(1, 0)	3(2, 1)
		Decrease in T4 level <sup>a)</sup>	0	0	0	0
	Pituitary		0	0	0	0
Adrenal		0	0	0	0	

$\pm$ , minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe

<sup>a)</sup>: Immunohistochemistry for T4

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

Table 3-5. Histopathological findings in SD rats treated with APC for 28 days

Sex	Organs and findings	Dose (ppm)	0	1	10	100
			No. of animals examined	5	5	5
Male	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell ( $\pm$ , +)	0	1(1, 0)	4(4, 0)*	5(1, 4)**
		Hyperplasia, follicular cell ( $\pm$ , +)	0	0	2(2, 0)	4(2, 2)*
		Colloid depletion ( $\pm$ , +, ++)	0	0	2(2, 0, 0)	5(1, 2, 2)**
		Decrease in T4 level ( $\pm$ ) <sup>a)</sup>	0	0	1	2
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis ( $\pm$ )	0	0	1	2
		Hypertrophy, pars distalis ( $\pm$ )	0	0	1	3
	Adrenal		0	0	0	0
Female	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell ( $\pm$ , +)	0	1(1, 0)	3(3, 0)	5(2, 3)**
		Hyperplasia, follicular cell ( $\pm$ )	0	0	2	5**
		Colloid depletion ( $\pm$ , +, ++)	0	0	2(2, 0, 0)	5(2, 2, 1)**
		Decrease in T4 level ( $\pm$ ) <sup>a)</sup>	0	0	1	2
	Pituitary		0	0	0	0
	Adrenal		0	0	0	0

$\pm$ , minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe

<sup>a)</sup>: Immunohistochemistry for T4

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

Table 3-6. Histopathological findings in SD rats treated with PTC for 28 days

Sex	Organs and findings	Dose (ppm)	0	10	100	1000
			No. of animals examined	5	5	5
Male	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell ( $\pm$ )	0	1	2	3
		Hyperplasia, follicular cell	0	0	0	0
		Colloid depletion	0	0	0	0
		Decrease in T4 level <sup>a)</sup>	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis ( $\pm$ )	0	1 <sup>b)</sup>	1	2
		Hypertrophy, pars distalis ( $\pm$ )	0	1 <sup>b)</sup>	1	2
Adrenal		0	0	0	0	
Female	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell ( $\pm$ )	0	0	1	1
		Hyperplasia, follicular cell	0	0	0	0
		Colloid depletion ( $\pm$ )	0	0	0	1
		Decrease in T4 level <sup>a)</sup>	0	0	0	0
	Pituitary		0	0	0	0
	Adrenal		0	0	0	0

$\pm$ , minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe

<sup>a)</sup>: Immunohistochemistry for T4

<sup>b)</sup>: The number of effective animals was reduced to 4 due to failed tissue sampling.

No significant difference was detected from the control group.

**Table 3-7. Histopathological findings in SD rats treated with IOP for 28 days**

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	0	30	100	300
			No. of animals examined	5	5	5
Male	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +)	0	5(4, 1)**	5(3, 2)**	5(1, 4)**
		Hyperplasia, follicular cell (±, +)	0	4(4, 0)*	4(4, 0)*	5(4, 1)**
		Colloid depletion (±)	0	0	0	1
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis (±, +)	1(1, 0)	3(3, 0)	4(4, 0)	5(2, 3)*
		Hypertrophy, pars distalis (±, +)	1(1, 0)	4(4, 0)	5(5, 0)*	5(2, 3)*

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

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

**Table 3-8. Histopathological findings in SD rats treated with BEX for 28 days**

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	0	1	3	10
			No. of animals examined	5	5	5
Male	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell	0	0	0	0
		Hyperplasia, follicular cell	0	0	0	0
		Colloid depletion (±)	0	0	1	1
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis	0	0	0	0
		Hypertrophy, pars distalis	0	0	0	0

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

No significant difference was detected from the control group.

**Table 4. Overexpressed genes in the thyroid gland of male SD rats treated with NaPB and NCD for 28 days**

Probe Name	Gene Symbol	Fold change	
		NCD vs Control	NaPB vs Control
A_44_P317639	Vash2	4.2	6.3
A_42_P791677	Areg	3.6	6.8
A_64_P138011	Adra1b	3.3	5.2
A_42_P559414	Wnt4	3.1	4.2
A_64_P152753	Ciart	3.0	11.6
A_64_P149071	Glis1	2.9	4.1
A_64_P120640	Pgf	2.8	4.7
A_64_P120634	Pgf	2.6	4.3
A_42_P811256	Vnn1	2.6	4.1
A_64_P151259	C2cd4a	2.5	2.5
A_64_P015562	Meiob	2.4	2.6
A_64_P144278	Snph	2.3	3.6
A_44_P959259		2.2	2.9
A_64_P131688		2.2	2.9
A_64_P049266	Msx3	2.2	4.0
A_43_P11922	Crem	2.1	2.9
A_64_P053631	Doc2a	2.0	2.7
A_64_P126493	Crem	2.0	3.1

**Table 5. Assay system for evaluation of thyroid hormone signaling disruption by EU-NETVAL**

Block	Mode of Action	Method name
Block #1	Central regulation	1.a Thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor activation of pituitary thyrotropes 1.b Thyrotropin-stimulating hormone (TSH) receptor mediated activation (non-radioactive)
Block #2	Thyroid hormone synthesis	2.a Thyroid peroxidase (TPO) inhibition method: AUR-TRO 2.b Thyroid peroxidase (TPO) inhibition method: Luminol 2.c Tyrosine iodination method 2.d Sodium /Iodide uptake method based on Sandell-Kolthoff reaction (non-radioactive)
Block #3	Secretion and transport	3.a Thyroxine-binding prealbumin (TTR) / thyroxine-binding globulin (TBG) 8-anilino naphthalene sulfonic acid ammonium salt (ANSA) fluorescence displacement method 3.b Thyroxine-binding prealbumin(TTR) displacement method using (T4-FITC)
Block #4	Metabolism and excretion	4.a Colorimetric method for assessing deiodinases activities 4.b Chromatography/mass spectrometry (LC/MS) glucuronidation method 4.c Inhibition of thyroid hormone sulfation
Block #5	Local cellular concentrations	5.a T3/T4 cellular uptake assay based on Sandell-Kolthoff reaction (non-radioactive)
Block #6	Cellular responses	6.a Human thyroid hormone receptor alpha (TR $\alpha$ ) and Human thyroid hormone receptor beta (TR $\beta$ ) reporter gene 6.b Thyroid hormone receptor beta (TR $\beta$ ) CALUX assay
Block #7	Relevant short term alternative	7.a Zebrafish eleutheroembryo thyroid assay
Block #8	Integrative cellular in vitro methods	8.a T-screen assay 8.b Proliferation, migration and oligodendrocyte differentiation of human neural progenitor cells, adapted to human induced pluripotent 3D stem cells 8.c Human adipose stromal cell-human umbilical vein endothelial cell (hASC-HUVEC) vasculogenesis/angiogenesis

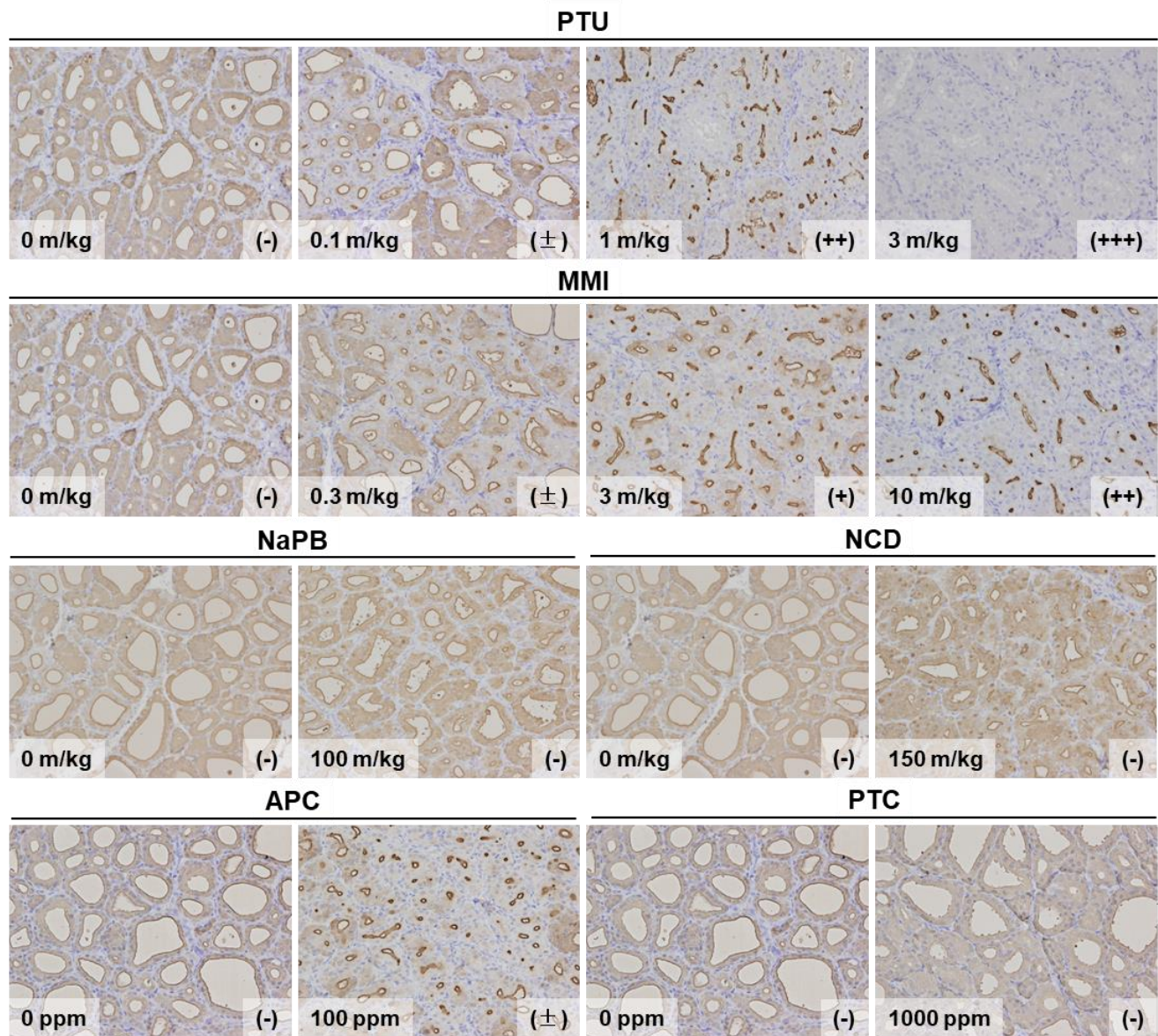


Figure 1. Immunohistochemistry for T4 in the thyroid gland of male SD rats.

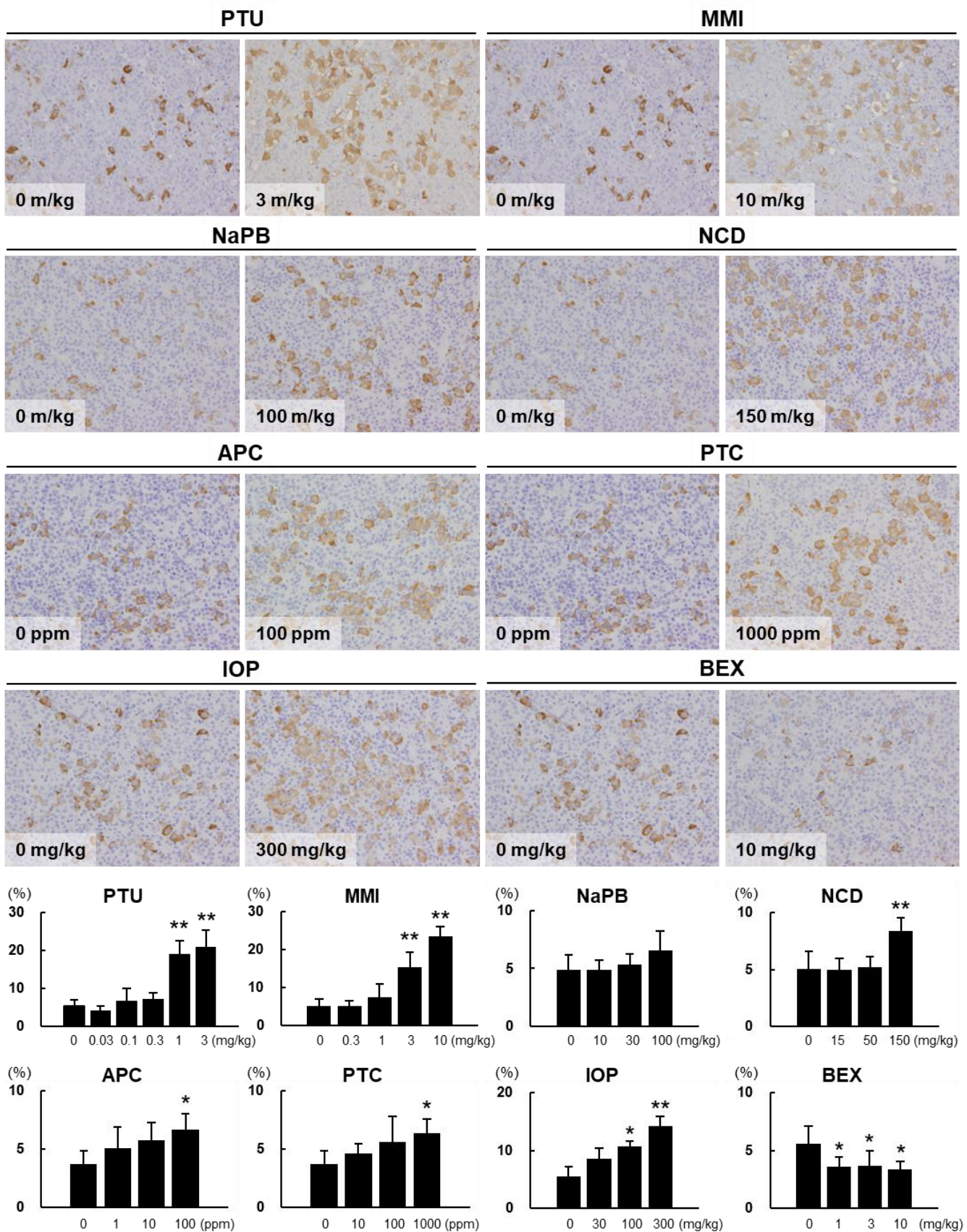


Figure 2. Immunohistochemistry for TSH in the pituitary gland of male SD rats. \* and \*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.



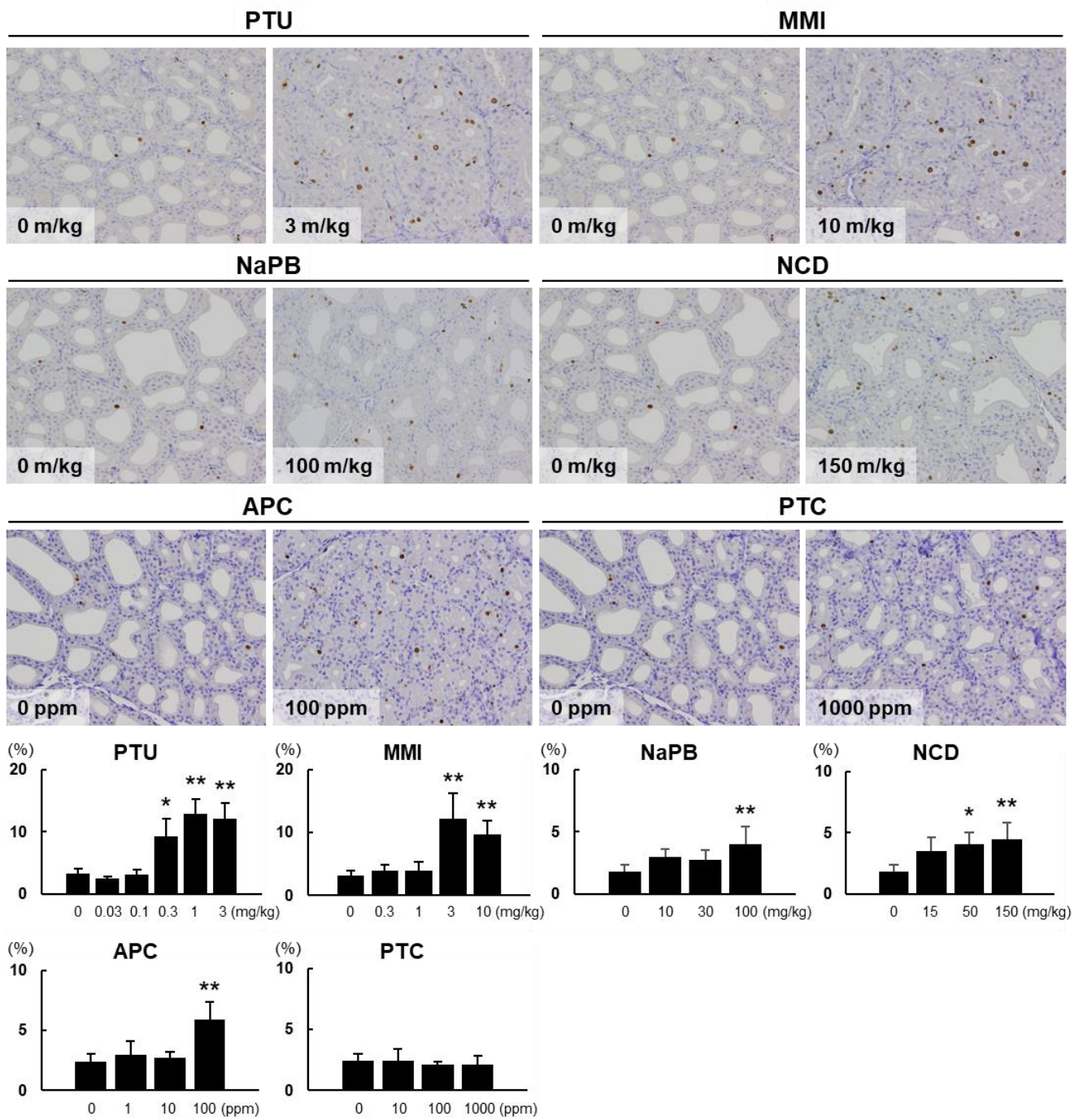


Figure 3. Immunohistochemistry for Ki67 in the thyroid gland of male SD rats. \* and \*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

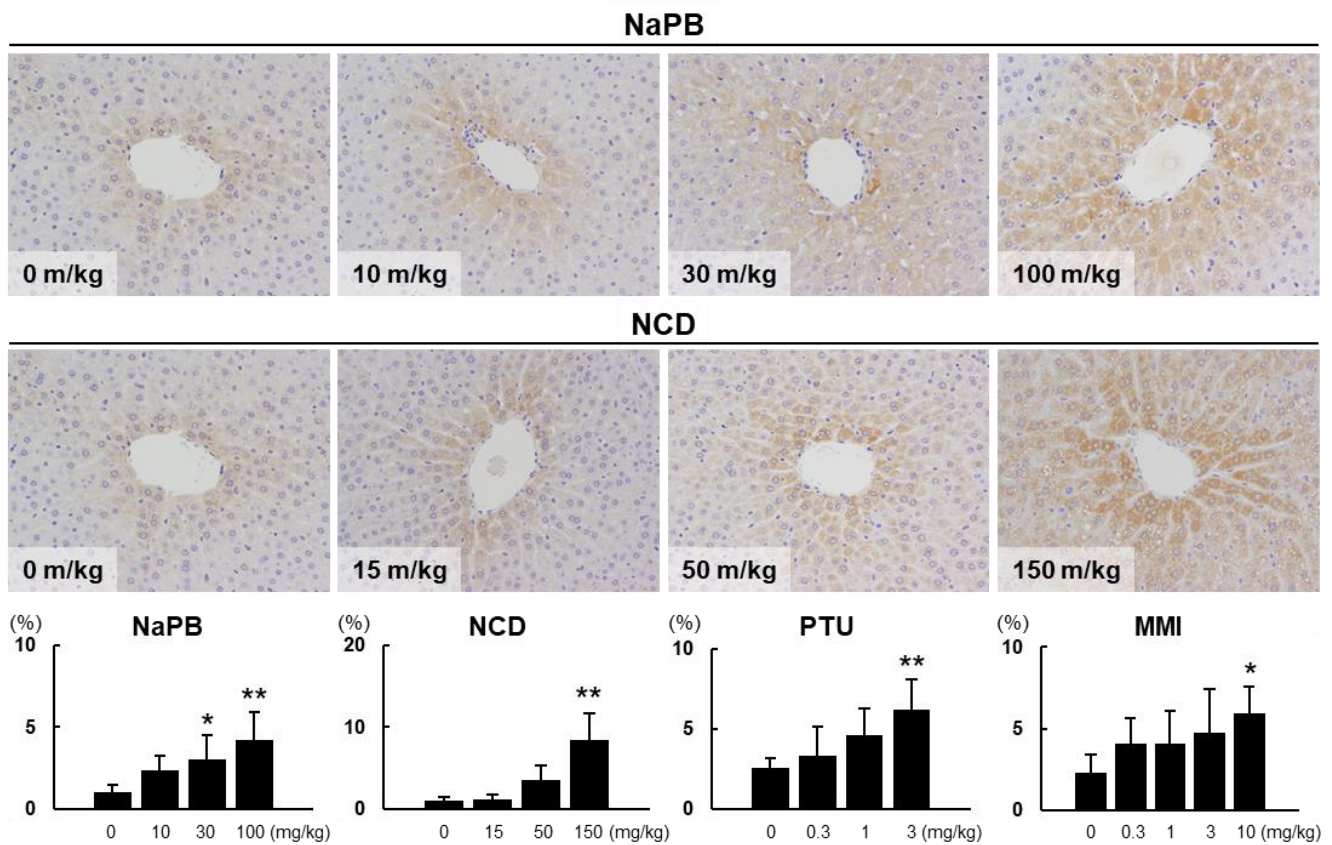


Figure 4. Immunohistochemistry for UGT1A6 in the liver of male SD rats. \* and \*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

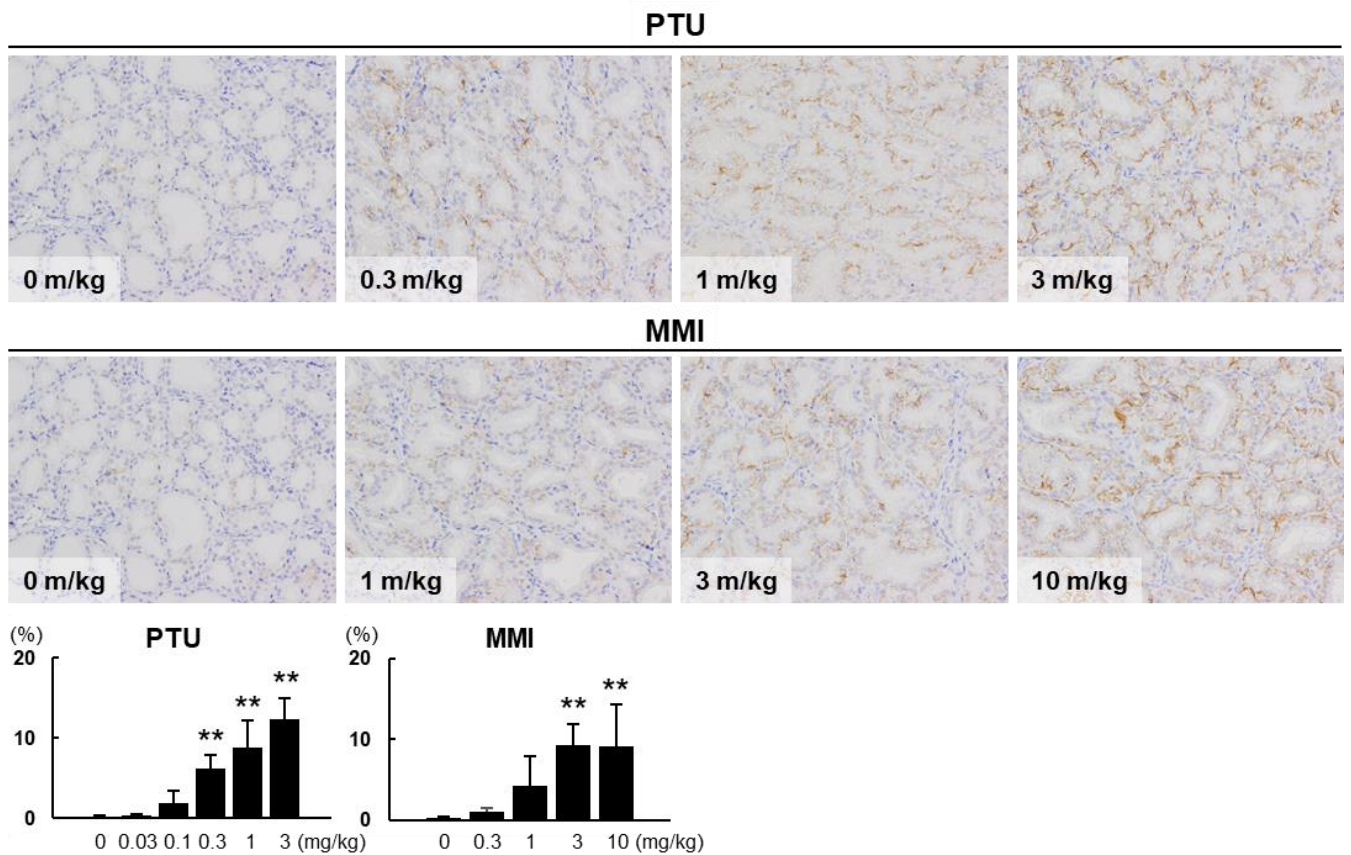


Figure 5. Immunohistochemistry for NIS in the thyroid gland of male SD rats. \*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.01$ .

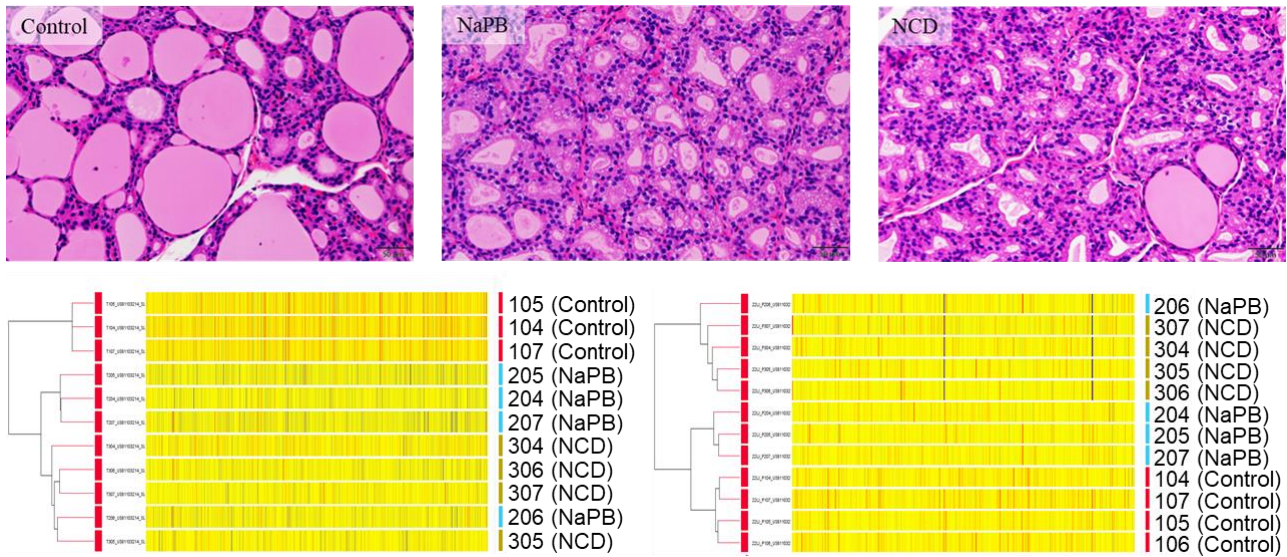


Figure 6. Representative histopathological findings in the thyroid gland of male SD rats treated with NaPB and NCD for 28 days (upper column). Cluster analysis of microarray data obtained from thyroid (left) and pituitary (right) glands (lower column).

## 別紙4

## 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
該当なし					

令和 5 年 5 月 23 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 4 年 5 月 27 日 衛研発第0527013号

補助事業名：令和4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4年4月1日から令和5年3月31日まで

（3）年計画の（2）年目

国庫補助金精算所要額：金11,135,000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4年4月1日～令和5年3月31日	3,435,000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、効率的な抗甲状腺物質検出のために <i>in vivo</i> 評価手法開発が引き続き重要であることが確認された。	令和4年4月1日～令和5年3月31日	2,000,000円	0円
国立医薬品食品衛生研究所・安全	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4年4月1日～令和5	4,200,000円	0円

性生物試験 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。	年3月31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4年 4月1日 ～令和5 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：抗甲状腺物質の検出において、病理組織学的検索による甲状腺濾胞上皮細胞の肥大が、血中ホルモン値測定よりも鋭敏な指標となり得ることが示された。また、甲状腺重量、下垂体前葉の TSH および甲状腺の T4・Ki67 免疫染色も、血中ホルモン値と概ね同等の感度を示し、抗甲状腺作用の評価に有用と考えられた。これまでの甲状腺・下垂体を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果から、免疫組織化学的解析に利用可能な新規バイオマーカーとして、ナトリウム/ヨウ素共輸送体 (NIS) を見出した。国際的な動向調査として OECD および ICCVAM/EPA が主導する専門家会議に参画し、*in vitro* 評価系の実用化には課題が多く残されており、既存の試験に組み込みが可能な *in vivo* 評価手法の開発が引き続き重要であることが確認された。

研究の実施経過：令和4年度は、計6種の抗甲状腺物質をラットに28日間経口投与し、血清ホルモン値の変化と病理組織学的・免疫組織化学的解析手法との比較を行った。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関わる研究発表の動向を調査した。

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)



令和5年3月30日

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4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4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4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。

令和5年3月30日

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4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。