

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 3～5 年度にかけて、計 11 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、甲状腺重量および Ki67 免疫染色も血中ホルモン値と同等の感度を示し、補完的指標として有用であると考えられた。さらに、甲状腺における T3・T4 および網羅的遺伝子発現解析によって見出されたナトリウム/ヨウ素共輸送体（NIS）の免疫染色に加え、肝重量および肝 UGT1A6 発現は、抗甲状腺作用の機序推定に利用し得る可能性が示唆された。以上の結果を踏まえ、ラット 28 日間反復投与毒性試験における抗甲状腺物質の検出・機序推定のためのフローチャートを作成した。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依然として多くの課題が残され、既存の *in vivo* 試験に組み込みが可能な本研究の成果は大きな意義を持つものと考えられた。

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薬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出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出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した。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した。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* 評価法確立について検討を行った。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した。

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①～⑦の機序に基づく計 11 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
- ⑦ 甲状腺ホルモン遊離阻害：Lithium carbonate (LC)

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、④～⑦については雄のみを対象に実験を行った。また③の令和4年度の検討において、APC投与群で血清TSH値の増加が検出されたものの、APC・PTC投与群にT3・T4の有意な変動は認められなかった。そこで、追加の高用量群を用いた投与実験を実施した。各物質の投与用量は以下の通りである(APC, PTC, Erythrosine, LC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, 1000 ppm (飲水)
PTC: 10, 100, 1000, 2000, 5000 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
- ⑦ LC: 250, 500, 1000 ppm (飲水)

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T3・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与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6種(PTU・MMI・NaPB・NCD・IOP・BEX)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(精製水またはコーン油)、1 mg/kg PTU、10 mg/kg

MMI、100 mg/kg NaPB、150 mg/kg NCD、300 mg/kg IOP、10 mg/kg BEXを28日間強制経口投与した。投与用量は先行して実施した豊田・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)でホモジナイズした後、-80℃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)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)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)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)

令和3～5年度にかけて、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。

2022年4月より、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た。令和5年5月15～16日、OECD本部(パリ)にて開催された対面会議に出席し、各国における甲状腺機能障害評価法の開発動向を調査した。また、当会議において本研究班の研究成果を発表し、参加者と意見交換を行った。さらに、令和4～5年度にかけて計3回のWeb会議にも参加し、各国の検討状況に関する議論に加わった。

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、米国環境保護庁(Environmental Protection Agency; 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た。令和5年7月14日に開催されたWeb会議に参加し、3D Human Thyroid Microtissue Assayのバリデーションに関するOperation Procedure(OPs)について議論を行った。

(倫理面への配慮)

使用する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

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って認められた (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。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 (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。

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) : T3・T4 低下 ; 雄 1000 ppm、TSH 増加 ; 雄 100 ppm 以上。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) : T4 低下 ; 雄 5000 ppm。

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。

Erythrosine 投与群 (Table 1-8) : TSH 増加 ; 雄 4%。

⑤ TSH 産生阻害剤

BEX 投与群 (Table 1-9) : T3 低下 ; 雄 3 mg/kg 以上、T4 低下 ; 雄 1 mg/kg 以上

⑥ TSH 受容体拮抗剤

VA-K-14 投与群 (Table 1-10) : 血清 T3・T4・TSH 値の有意な変動は認められなかった。

⑦ 甲状腺ホルモン遊離阻害剤

LC 投与群 (Table 1-11) : TSH 減少 ; 雄 1000 ppm。

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、雄 1000 ppm および雌雄 100 ppm で甲状腺絶対/相対重量の増加、雄 1000 ppm で下垂体絶対重量の増加がみられた (Table 2-5)。

PTC 投与群では、雄 1000 ppm 以上で甲状腺絶対重量の増加、雄 1000 および 5000 ppm で甲状腺相対重量の増加、雄 5000 ppm で肝絶対重量の低下が認められた (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)。

Erythrosine 投与群では、検索した臓器重量に有意な変動は認められなかった (Table 2-8)。

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 2-9)。

⑥ TSH 受容体拮抗剤

VA-K-14 投与群では、雄 10 mg/kg で肝相対重量の増加が認められた (Table 2-10)。

⑦ 甲状腺ホルモン遊離阻害剤

LC 投与群では、雄 500 ppm 以上で甲状腺絶対/相対重量の増加、雄 1000 ppm で下垂体相対重量の増加および肝絶対重量の低下が認められた (Table 2-11)。

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が雌雄 0.3 mg/kg 以上で有意に増加し、このうち濾胞上皮細胞肥大は 0.1 mg/kg においても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 においても有意な増加を示した (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 で有意に増加した。

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 以上で統計学的有意差を示した (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 で統計学的有意差を示した (Table 3-4)。小葉周辺性の肝細胞空胞化が、雌 15 mg/kg 以上で有意に増加した。また、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。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 以上で統計学的に有意な増加を示した (Table 3-5)。下垂体前葉では、雄 1000 ppm で肥大/空胞化の有意な増加が認められた。

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 以上で散見され、雄 5000 ppm において統計学的に有意な増加を示した (Table 3-6)。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。

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/過形成が雄 30 mg/kg 以上で有意に増加した (Table 3-7)。下垂体前葉では、肥大/空胞化の有意な増加がそれぞれ 100 mg/kg 以上および 300 mg/kg で認められた。また、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が 300 mg/kg で有意な発生頻度増加を示した。

Erythrosine 投与群では、甲状腺濾胞上皮細胞の肥大/過形成がそれぞれ雄 0.25% 以上および 4% で有意に増加した (Table 3-8)。下垂体前葉では、肥大/空胞化が雄 0.25% 以上で散見された。

⑤ TSH 産生阻害剤

BEX 投与群の甲状腺では、統計学的有意差はないものの、コロイド退縮が雄 3 mg/kg 以上に認められた (Table 3-9)。下垂体に病理組織学的変化は認められなかった。

⑥ TSH 受容体拮抗剤

VA-K-14 投与群の甲状腺では、統計学的有意差はないものの、コロイド退縮の発生頻度が雄 1 mg/kg 以上で用量依存的に増加した (Table 3-10)。また、甲状腺濾胞上皮細胞の肥大が 1 および 10 mg/kg、過形成が 10 mg/kg の各 1 例で観察された。下垂体には病理組織学的変化は認められず、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が雄 10 mg/kg で散見された。

⑦ 甲状腺ホルモン遊離阻害剤

LC 投与群では、検索した臓器に病理組織学的変化は認められなかった (Table 3-11)。

1-4. 免疫組織化学的解析 (甲状腺 T4・T3)

①~⑦の計 11 物質について、甲状腺における T4 および T3 発現を免疫染色により検索した (Figure 1/2, Table 3)。対照群では T4・T3 のいずれも、濾胞上皮細胞

の細胞質および濾胞内腔表面に発現が認められた。細胞質における T3 発現レベルは、T4 と比べて低い傾向がみられた。

① 甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤

PTU・MMI 投与群では、T4・T3 発現レベルの低下がそれぞれ雌雄 0.1 mg/kg 以上および雄 0.3 mg/kg 以上・雌 1 mg/kg 以上で認められ、これら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ていた (Table 3-1/2)。

② 肝臓における甲状腺ホルモン代謝促進剤

NaPB・NCD 投与群のいずれにおいても、T4・T3 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 投与群では、T4・T3 発現レベルの有意な低下がそれぞれ雄 1000 ppm、100 ppm 以上で認められた (Table 3-5)。PTC 投与群では、雄 5000 ppm で T3 発現の有意な低下がみられた (Table 3-6)。

④ 脱ヨウ素酵素阻害剤

IOP・Erythrosine 投与群のいずれも、T4・T3 発現の明らかな低下は示さなかった (Table 3-7/8)。

⑤ TSH 産生阻害剤

BEX 投与群では、T4・T3 発現の明らかな低下は認められなかった (Table 3-9)。

⑥ TSH 受容体拮抗剤

VA-K-14 投与群では、T4・T3 発現の明らかな低下は認められなかった (Table 3-10)。

⑦ 甲状腺ホルモン遊離阻害剤

LC 投与群では、T4・T3 発現の明らかな低下は認められなかった (Table 3-11)。

1-5. 免疫組織化学的解析 (下垂体 TSH)

①~⑦の計 11 物質について、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 3)。

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、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、各投与群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 以上、PTC 投与群では雄 1000 および 5000 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。Erythrosine 投与群では、各投与群に有意な変化は認められなかった。

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。

⑥ TSH 受容体拮抗剤

VA-K-14 投与群では、各投与群に統計学的に有意な変化は認められなかった。

⑦ 甲状腺ホルモン遊離阻害剤

LC 投与群では、各投与群に統計学的に有意な変化は認められなかった。

1-6. 免疫組織化学的解析 (甲状腺 Ki67)

これまでに①～⑤・⑦の計 10 物質 (PTU・MMI・NaPB・NCD・APC・PTC・IOP・Erythrosine・BEX・LC) 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 4)。

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 投与群では、雄 100 ppm 以上で Ki67 陽性率の有意な増加がみられた。PTC 投与群では、各投与群に有意な変化は認められなかった。

④ 脱ヨウ素酵素阻害剤

IOP 投与群では、雄 30 mg/kg 以上で Ki67 陽性率の有意な増加がみられた。Erythrosine 投与群では、各投与群に有意な変化は認められなかった。

⑤ TSH 産生阻害剤

BEX 投与群では、各投与群に有意な変化は認められなかった。

⑦ 甲状腺ホルモン遊離阻害剤

LC 投与群では、雄 1000 ppm で Ki67 陽性率の有意な増加がみられた。

1-7. 免疫組織化学的解析 (肝臓 UGT)

①～②・④の計 5 物質 (PTU・MMI・NaPB・NCD・IOP) 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 5)。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。

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

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、UGT1A6 陽性面積率の有意な増加が認められ、病理組織学的検索で認められた肝細胞肥大に一致していた。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。

④ 脱ヨウ素酵素阻害剤

IOP 投与群では、雄 300 mg/kg で UGT1A6 陽性面積率の有意な増加が認められた。

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、①

～⑦の計 11 物質について、甲状腺における発現を免疫染色により検索した (Figure 6)。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。

① 甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤

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、各投与群に有意な変化は認められなかった。NCD 投与群では、雌 150 mg/kg で NIS 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 投与群では雌雄 10 ppm 以上、PTC 投与群では雌雄 100 ppm 以上で有意な増加がみられた。

④ 脱ヨウ素酵素阻害剤

IOP 投与群では雄 30 mg/kg 以上、Erythrosine 投与群では雄 0.06%以上で、NIS 陽性面積率の有意な減少が認められた。

⑤ TSH 産生阻害剤

BEX 投与群では、各投与群に有意な変化は認められなかった。

⑥ TSH 受容体拮抗剤

VA-K-14 投与群では、各投与群に有意な変化は認められなかった。

⑦ 甲状腺ホルモン遊離阻害剤

LC 投与群では、各投与群に有意な変化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

PTU・MMI 投与群では投与 2 週目から摂餌量の減少がみられ、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。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。

NaPB・NCD 投与群では、体重・摂餌量および甲状腺・下垂体重量に有意な変化は認められなかった。

BEX 投与群では、投与 2・4 週目に体重の有意な高値がみられた。IOP 投与群では、摂餌量の低下傾向がみられたが、体重に有意な差は認められなかった。下垂体重量には投与による影響はみられなかった一方、甲状腺絶対/相対重量は IOP 投与群で増加傾向を示した。

2-2. 病理組織学的検索

PTU・MMI・NaPB・NCD 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認められた (Figure 7-8)。下垂体では、各投与群に下垂体前葉の肥大/空胞化が認められた。

2-3. マイクロアレイ解析

PTU・MMI 投与群では甲状腺および下垂体のいずれも、NaPB・NCD・IOP・BEX 投与群では甲状腺における遺伝子発現変化は、対照群と異なるクラスターとして分類さ

れた (Figure 7-9)。PTU・MMI 投与群の下垂体では両群は異なるクラスターとして分類された一方、甲状腺では類似した集団として認識された。NaPB・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。IOP 投与群の下垂体では、1 例が BEX 投与群のクラスターに分類された。

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、うち 336 遺伝子が共通していた (Table 4-1)。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。NaPB・NCD 投与によって発現増加した遺伝子はそれぞれ 21・37、うち 18 遺伝子が共通していた (Table 4-4)。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。IOP・BEX によって発現増加した遺伝子がそれぞれ 131・8 (Table 4-3)、発現低下した遺伝子は 92・19 個認められた。

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、うち 239 遺伝子が共通していた (Table 4-2)。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。NaPB・NCD 投与によって発現増加した遺伝子はそれぞれ 1・0 で、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。IOP・BEX 投与によって発現増加した遺伝子がそれぞれ 5・4、発現低下した遺伝子は 3・13 個認められた。

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

2021 年度の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, 2016) および Levie (J Clin Endocrinol Metab, 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, 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, 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, 2020) に沿った内容と考えられた。

2022 年度の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。

2023 年度の欧州毒性学会においては、シンポジウムとして New approach methods for risk assessment of thyroid disrupting chemicals および Integration of developmental neurotoxicity data across adverse outcomes for improved safety assessment of chemicals の 2 セッションが設定された。甲状腺ホルモン攪乱物質のアッセイ系開発、および甲状腺機能低下に起因する発生期の神経発達毒性を含めた毒性への関心の高さが示唆された。

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-gluc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。

第62回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。

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, 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, 2020) については、イタリアのグループ (Coperchini et al., Frontier Endocrinol, 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。

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。

2023年5月に開催された対面会議では、OECD事務局に加えてカナダ (議長)・EU・フランス・米国・スウェーデンおよび日本から計約20名が現地参加した。オーストラリア・オーストリア・ベルギー・チェコ・デンマーク・ドイツ・ギリシャ・オランダ・英国・BIACからも多数のWeb参加者があり、本課題に対する注目の高さが窺われた。ECVAMからは、EU-NETVALの進捗状況について以下の通り報告があった。

- ・Method 1a (TRH受容体活性化): リソース不足のため活動停止
- ・Method 1b (TSH受容体活性化): 陰性/陽性対照を用いてそれぞれ1/3回検討を実施。報告書準備中
- ・Method 2b (甲状腺ペルオキシダーゼ阻害): 特異的反応を得られず、バリデーションを中止
- ・Method 2d (NIS活性化): SOPを確定し、工程短縮のためのオプションについて議論
- ・Method 4c (TH硫酸化阻害): さらなる最適化を要し、バリデーション開始は見送り
- ・Method 5a (MCT-8阻害): 評価物質を検討中
- ・Method 8b (増殖・遊走・希突起膠細胞成熟): 試験系の標準化を要する
- ・Method 8c (血管新生): 現時点で陽性対照1物質による報告書のみ

また、Bayerの参加者からラット・ヒト由来の臓器チップ、アムステルダム大学・アントワープ大学からゼブラフィッシュを用いた検討について紹介された。我々からは、種々の作用機序の甲状腺機能攪乱物質をラットに投与した場合、血清ホルモン値の変動よりも甲状腺の病理組織学的変化がより低用量から観察され、臓器重量や免疫染色を組み合わせることで機序の推定も可能になることを発表した。また、病理組織学的検索が適切に実施されている限り、甲状腺ホルモンの測定がなくとも、反復経口投与毒性試験において抗甲状腺物質が見逃された可能性は低いとの判断にも言及した。英国のDr. Miriam Jacobsからは、SPSFとしてまとめることを提案された。さらに2023年10月のWeb会議では、EU-NETVALの進捗報告とアッセイ系を組み合わせ

て IATA として取り纏めるための議論がなされた。

ICCVAM においては、新規の手法 (Deisenroth et al., Toxicol Sci, 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、ヒトから摘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。2023 年 7 月の Web 会議でも、実施方法に関する議論が継続された。

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 T3・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・NIS 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、甲状腺重量および下垂体 TSH・甲状腺 Ki67・肝 UGT1A6 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濾胞上皮細胞内への取込み阻害剤については、APC では用量依存的な血清 T3・T4 低下および TSH 増加が誘発され、PTC では血清 T4 低下が認められた。病理組織学的解析において、APC では血清ホルモン値の変化が認められた用量よりも低い用量から甲状腺濾胞上皮細胞肥大が観察され、PTC でも同用量で病変が誘発された。また甲状腺 T4・T3 免疫染色と血清ホルモン値の比較では、APC では T4 発現低下が同用量、T3 発現低下がより低用量から認められ、PTC では T3 発現低下が同用量で観察された。さらに、NIS 発現増加が、APC・PTC ともに血清ホルモン値の変化より低用量から認められた。

APC 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 では、甲状腺重量および下垂体 TSH 発現の増加がより低用量から観察された。

④末梢における T4→T3 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・Erythrosine の検索では、IOP では用量依存的な血清 TSH 増加に加え、①～③とは異なる特徴的な変化として、血清 T3・T4 の増加が認められた。T3 への変換抑制による持続的な T4 の高値に伴い、TSH 分泌亢進が生じた結果と考えられた。Erythrosine では血清 T3・T4 の変動は検出されなかったが、TSH の有意な増加がみられた。

病理組織学的解析において、甲状腺濾胞上皮細胞肥大が IOP では血清ホルモン値の変化と同用量で、Erythrosine ではより低い用量から観察された。IOP では甲状腺重量、甲状腺 Ki67 発現および下垂体 TSH 発現の増加が認められたが、Erythrosine では検出されなかった。また③とは異なり、甲状腺での NIS 発現は IOP・Erythrosine のすべての投与群で有意に低下した。

⑤下垂体における TSH 産生抑制を介して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。統計学的有意差はないものの、甲状腺ではコロイド退縮が認められた。下垂体では明らかな病理組織学的所見は認められなかった。また、甲状腺・下垂体重量および Ki67 発現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。

⑥TSH 受容体の拮抗剤として作用し、濾胞上皮細胞において TSH の作用を遮断する VA-K-14 は、今回の実験条件下では血清ホルモン値、甲状腺重量および下垂体 TSH 発現に変化を誘導しなかった。一方、統計学的有意差はないものの、病理組織学的所見として⑤と同様に甲状腺におけるコロイド退縮が認められた。

⑦サイログロブリンからの甲状腺ホルモンの遊離を阻害する LC の投与では、血清 T3・T4 の変動は検出されなかったが、TSH は有意に低下し、甲状腺重量および Ki67 発現の増加が概ね同用量で認められた。一方で、病理組織学的解析では甲状腺に明らかな変化は観察されず、下垂体 TSH 発現の変動も認められなかった。

以上の投与実験における最も重要な結果として、①～④の各物質におい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、血清 T3・T4・TSH 値の有意な変動がみられた用量よりも低用量からもしくは同用量で、統計学的有意差をもって認められた。この結果は、①～④の機序を有する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ることを示している。

一方、⑤・⑥の物質では濾胞上皮細胞肥大は認められなかったが、ともにコロイド退縮が誘発された。BEX・VA-K-14 は TSH 産生または TSH 受容体を阻害することで、共通する影響を甲状腺に及ぼしている可能性がある。また、⑦の物質 (LC) では甲状腺・下垂体に病理組織学的所見が確認できず、他のパラメータを組み合わせた検討が必要と考えられた。

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。よって、甲状腺重量、下垂体 TSH・甲状腺 Ki67 免疫染色も、これらの機序による抗甲状腺物質の検出に有用と考えられた。

一方で④脱ヨウ素酵素阻害剤では、甲状腺重量・下垂体 TSH 発現の増加と比較し、血清 T4・TSH 値の増加がより低い用量から検出された。また、⑤TSH 産生阻害剤は甲状腺重量を変化させなかったが、下垂体 TSH 発現の低下が、血清 T4 値低下に伴って認められた。この結果から、下垂体 TSH 免疫染色は発現亢進のみならず抑制の検出にも有用であり、TSH 産生阻害剤の評価における鋭敏な指標となる可能性が示唆された。

さらに、⑦甲状腺ホルモン遊離阻害剤の検索では、血清ホルモン値変動が認められなかったにも関わらず、甲状腺の重量および Ki67 発現増加が観察され、これらが有用な指標となり得ることが示唆された。

①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤による甲状腺 T3・T4 発現低下は免疫染色で比較的容易に検出可能であり、血清ホルモン値測定よりも高感度であることが示された。③ヨウ素取込み阻害剤でも、甲状腺 T3・T4 発現低下が認められ、同様に高感度の指標となり得る。また、T3・T4 免疫染色の結果を比較すると、T3 がより高感度であった。一方で、他の機序による抗甲状腺物質では、いずれの用量においても T3・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 T3・T4 産生を直接的に阻害する物質 (①・③) と、他の機序を介した間接的な抗甲状腺物質を区別するために、T3・T4 免疫染色が有用であることを示している。

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。①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤での免疫染色では、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支持する所見として有用であることが示唆された。

より重要な結果として、③ヨウ素取込み阻害剤では、NIS 発現増加は血清ホルモン値変動、病理組織学的所見、甲状腺 T3/T4 発現と比較してより低い用量から認められた。投与物質によるヨウ素取り込みの低下とそれに伴う T3・T4 合成阻害を代償する反応として、最も鋭敏に検出されたものと考えられた。反対に④脱ヨウ素酵素阻害剤では、血清ホルモン値変動・病理組織学的所見と同用量またはより低用量から NIS 発現が低下し、過剰な T4 合成に応答してヨウ素取込みを抑制する作用が示唆された。その他②・⑤～⑦では、血清ホルモン変動・病理組織学的所見の有無に関わらず、NIS 発現の変化は認められなかった。以上の結果は、NIS 免疫染色は③ヨウ素取込み阻害・④脱ヨウ素酵素阻害の機序を高感度に鑑別可能であることを示している。

齧歯類では肝臓における 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病理組織学的所見に先行して認められた。①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤・④脱ヨウ素酵素阻害剤では対照的に、肝肥大および UGT1A6 発現の増加よりも血清ホルモン値の変動が先行して認められた。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、②甲状腺ホルモン代謝促進剤の検出に有用である可能性が示唆された。

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

①PTU・MMI 投与群では、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 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た結果、有用な新規バイオマーカーとして NIS を見出した。

②NaPB・NCD 投与群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、28 日間反復投与試験での結果と一致した。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た。

④IOP 投与群では甲状腺絶対/相対重量の増加が認められたのに対し、⑤BEX 投与群では臓器重量の変化はみられず、いずれも 28 日間反復投与試験の結果と一致していた。マイクロアレイ解析の結果、甲状腺の遺伝子発現変化は各群が異なるクラスターとして分類されたのに対し、下垂体では IOP 投与群 1 例が異なるクラスターに分類された。これは IOP・BEX 投与群のいずれも、下垂体における遺伝子発現変動が少なかったことに起因すると考えられた。甲状腺では IOP 投与群で多くの遺伝子発現変動がみられたのに対し、BEX 投与群での発現変動はわずかであった。同一プロトコルで実施された 28 日間投与試験において、IOP 投与群では甲状腺濾胞上皮細胞肥大/過形成等の病理組織学的所見が誘発されたのに対し、BEX 投与群ではこれらの変化は認められておらず、発現変動を示した遺伝子数の差は甲状腺への直接/間接影響の違いを反映したものと考えられた。

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

欧州毒性学会および米国毒性学会においては、甲状腺ホルモンの神経発達への影響が継続的に話題とされ、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。

OECD 専門家会議における活動は、甲状腺機能障害を誘発する種々の機序に基づき、それぞれを検討する評価系を包括的に実施する IATA の考えに沿った方法であるが、現時点でいずれの系もバリデーションの終了には至っていない。経済的サポートの問題もあり、すべてを網羅したアッセイ系の構築には、高い障壁があると考えられた。2023 年 5 月の対面会合において事務局に確認したところ、目指す評価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は考慮していないとのことであった。EU においては、内分泌攪乱物質は用量を問わず使用を制限する方針であり、日本や米国における方針との違いを考慮する必要があると考えられた。

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。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 5 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での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。甲状腺重量および Ki67 免疫染色も血中ホルモン値と同等の感度を示し、抗甲状腺物質の評価に有用と考えられた。また、甲状腺における T3・T4 および網羅的遺伝子発現解析によって見出された NIS の免疫染色に加え、肝重量および肝 UGT1A6 発現は、抗甲状腺作用の機序推定に利用し得る。以上の結果に基づき、ラット 28 日間反復投与毒性試験における、抗甲状腺物質の検出・機序推定のためのフローチャートを作成した (Figure 10)。

国際的には、EU-NETVAL を中心とした OECD および EPA が主導する ICCVAM の専門家会議において、甲状腺機能障害に関する *in vitro* 評価系の開発が行われている。将来的には、網羅的なハザード評価に適用し得るアッ

セイ系として成立する可能性があるが、現時点では多くの課題が残されている。既存の *in vivo* 反復投与毒性試験における評価項目を拡張することによって抗甲状腺物質のリスク評価を可能とする本研究の成果は、大きな意義を持つものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] [Toyoda T](#), Kobayashi T, Miyoshi N, Matsushita K, [Akane H](#), Morikawa T, [Ogawa K](#). Mucosal damage and γ -H2AX formation in the rat urinary bladder induced by aromatic amines with structures similar to *o*-toluidine and *o*-anisidine. Arch Toxicol. 2023; 97: 3197-207.
- [2] [Toyoda T](#), Sone M, Matsushita K, [Akane H](#), Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Cho YM, [Ogawa K](#). Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of γ -H2AX. J Toxicol Sci. 2023; 48: 323-32.
- [3] [Toyoda T](#), Sone M, Matsushita K, [Akane H](#), Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Cho YM, [Ogawa K](#). Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of γ -H2AX. J Toxicol Sci. 2022; 47: 457-466.
- [4] [Toyoda T](#), [Ogawa K](#). Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX: a review from analyses of 100 chemicals. J Toxicol Pathol. 2022; 35: 283-98.
- [5] [Toyoda T](#), Matsushita K, [Akane H](#), Morikawa T, [Ogawa K](#). A 13-week subchronic toxicity study of 2-(*l*-menthoxy)ethanol in F344 rats. J Toxicol Pathol. 2021; 34: 309-17.
- [6] [小川久美子](#). 食品中残留動物用医薬品の急性参照用量と水産動物用医薬品の規制の現状. 食品衛生研究. 2023; 73: 7-25.
- [7] [小川久美子](#), 西村次平, 西川秋佳. 安全性に関するトピックの動向 ICH-S1B(R1): 医薬品のがん原性試験ガイドライン改定. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2023; 54: 87-91.
- [8] [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.
- [9] [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.
- [10] [Ishii Y](#), Shi L, Takasu S, [Ogawa K](#), Umemura T. A 13-week comprehensive toxicity study with adductome analysis demonstrates the toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of the natural flavoring agent elemicin. Food Chem Toxicol. 2023; 179: 113965.
- [11] [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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Comparison of the sensitivity of histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors. *J Appl Toxicol*. (in press)
- [15] 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.
- [16] Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Role of CD44 expressed in renal tubules during maladaptive repair in renal fibrogenesis in an allopurinol-induced rat model of chronic kidney disease. *J Appl Toxicol*. 2024; 44: 455–69.
- [17] Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Expression of CD44 in renal tubular epithelial cells in fibrotic lesions in the kidney of rat model of chronic kidney disease induced by cyclosporine. *J Toxicol Pathol*. 2024; 37: 55–67.
- [18] Takimoto N, Ishii Y, Mitsumoto T, Takasu S, Namiki M, Shibutani M, Ogawa K. Formation of hepatocyte cytoplasmic inclusions and their contribution to methylcarbamate-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats. *Toxicol Sci*. 2024; 198: 40–9.
- [19] Nishikawa A, Nagano K, Kojima H, Fukushima S, Ogawa K. Pathogenesis of chemically induced nasal cavity tumors in rodents: contribution to adverse outcome pathway. *J Toxicol Pathol*. 2024; 37: 11–27.
- [20] Sun Y, Saito K, Ushiki A, Abe M, Saito Y, Kashiwada T, Horimasu Y, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Tsushima K, Takemoto K, Ishikawa R, Momiyama T, Matsuyama S, Arakawa N, Akane H, Toyoda T, Ogawa K, Sato M, Takamatsu K, Mori K, Nishiya T, Izumi T, Ohno Y, Saito Y, Hanaoka M. Identification of kynurenine and quinolinic acid as promising serum biomarkers for drug-induced interstitial lung diseases. *Respir Res*. 2024; 25: 31.
- [21] Akagi J, Yokoi M, Miyake Y, Shirai T, Baba T, Cho YM, Hanaoka F, Sugasawa K, Iwai S, Ogawa K. A formamidopyrimidine derivative from the deoxyguanosine adduct produced by food contaminant acrylamide induces DNA replication block and mutagenesis. *J Biol Chem*. 2023; 299: 105002.
- [22] Akagi J, Mizuta Y, Akane H, Toyoda T, Ogawa K. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. Part Fibre Toxicol. 2023; 20: 13.
- [23] Akagi J, Cho YM, Toyoda T, Mizuta Y, Ogawa K. EpCAM and APN expression in combination with γ -H2AX as biomarkers for detecting hepatocarcinogens in rats. *Cancer Sci*. 2023; 114: 4763–9.
- [24] Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats. *Food Chem Toxicol*. 2023; 175: 113702.
- [25] Mitsumoto T, Ishii Y, Takimoto N, Takasu S, Namiki M, Nohmi T, Umemura T, Ogawa K. Site-specific genotoxicity of rubiadin: localization and histopathological changes in the kidneys of rats. *Arch Toxicol*. 2023; 97: 3273–83.
- [26] Riboli E, Beland FA, Lachenmeier DW, Marques MM, Phillips DH, Schernhammer E, Afghan A, Assunção R, Caderni G, Corton JC, Umbuzeiro GA, de Jong D, Deschasaux-Tanguy M, Hodge A, Ishihara J, Levy DD, Mandrioli D, McCullough ML, McNaughton SA, Morita T, Nugent AP, Ogawa K, Pandiri AR, Sergi CM, Touvier M, Zhang L, Benbrahim-Tallaa L, Chittiboyina S, Cuomo D, DeBono NL, Debras C, de Conti A, Ghissassi FE, Fontvieille E, Harewood R, Kaldor J, Mattock H, Pasqual E, Rigutto G, Simba H, Suonio E, Viegas S, Wedekind R, Schubauer-Berigan MK, Madia F: Carcinogenicity of aspartame, methyleugenol, and isoeugenol. *Lancet Oncol*. 2023; 24: 848–50.
- [27] Strupp C, Corvaro M, Cohen SM, Corton JC, Ogawa K, Richert L, Jacobs MN. Increased cell proliferation as a key event in chemical carcinogenesis: application in an integrated approach for the testing and assessment of non-genotoxic carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2023; 24: 13246.
- [28] Takasu S, Ishii Y, Namiki 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.
- [29] Cattley RC, Kromhout H, Sun M, Tokar EJ, Abdallah MA, Bauer AK, Broadwater KR, Campo L, Corsini E, Houck KA, Ichihara G, Matsumoto M, Morais S, Mráz J, Nomiya T, Ryan K, Shen H, Toyoda T, Vähäkangas K, Yakubovskaya MG, Yu IJ, DeBono NL, de Conti A, Ghissassi FE, Madia F, Mattock H, Pasqual E, Suonio E, Wedekind R, Benbrahim-Tallaa L, Schubauer-Berigan MK. Carcinogenicity of anthracene, 2-bromopropane, butyl methacrylate, and dimethyl hydrogen phosphite. *Lancet Oncol.* 2023; 24: 431-2.
- [30] Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Cho YM, Ogawa K. Persistent γ -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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] 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*-(2-methoxyphenyl) benzene-1,4-diamine, in rat urine associated with urinary bladder carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 2021; 34: 912-9.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] 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.

- [46] 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, Misaki 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.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] 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) Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Uneyama M, Morikawa T, Ogawa K. Early detection of renal carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Salt Lake City (2024.3)
- 2) 豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、畝山瑞穂、森川朋美、小川久美子. γ -H2AX 免疫染色によるラット腎発がん物質の早期検出. 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2024 年 1 月)
- 3) 豊田武士、赤根弘敏、小川久美子. 腎発がん物質の 28 日間反復経口投与はラット腎臓に γ -H2AX 形成を誘導する. 第 82 回日本癌学会学術総会、神奈川県、(2023 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. γ -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 50 回日本毒性学会学術年会、神奈川県、(2023 年 6 月)
- 5) Ogawa K, Akagi J, Mizuta Y, Uneyama M, Akane H, Toyoda T. Titanium dioxide with crystallite diameters of 6, 30, and 180 nm induced no toxicological effects after oral administration to rats for 90 days. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Salt Lake City (2024.3)

- 6) 小川久美子. 日本食品化学学会第 39 回食品化学シンポジウム、神奈川県、(2023 年 11 月)
- 7) 小川久美子、西村次平、西川秋佳. ICH S1B (R1) のアウトライン. 第 50 回日本毒性学会学術年会、神奈川県、(2023 年 6 月)
- 8) 石井雄二、瀧本憲史、満元達也、高須伸二、相馬明玲、小川久美子. アセトアミドのラット肝発がん性に寄与する肝細胞質内封入体の形成機序. 日本薬学会第 144 年会、神奈川県、(2024 年 3 月)
- 9) 石井雄二、山上洋平、田原麻衣子、河上強志、瀧本憲史、笠松建吾、高須伸二、相馬明玲、小川久美子. Acetamide のラット肝臓における代謝物と核の形態異常への関与. 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2024 年 1 月)
- 10) 石井雄二、瀧本憲史、田原麻衣子、河上強志、相馬明玲、高須伸二、小川久美子. アセトアミドの大型小核誘発機序に関わる代謝物の検索. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会、福岡県、(2023 年 11 月)
- 11) 石井雄二、高須伸二、小川久美子. アセトアミド誘発ラット肝腫瘍におけるクロモソリプシス様染色体再構成の関与. 第 82 回日本癌学会学術総会、神奈川県、(2023 年 9 月)
- 12) 石井雄二. 化学発がんにおける chromothripsis の関与. 第 50 回日本毒性学会学術年会、神奈川県、(2023 年 6 月)
- 13) 石井雄二、瀧本憲史、満元達也、高須伸二、並木萌香、能美健彦、小川久美子. 2-Isopropyl-N-2,3-trimethyl butylamide の包括的毒性評価. 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会、富山県、(2023 年 6 月)
- 14) 石井雄二. 食品香料の安全性に関する研究. 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会、富山県、(2023 年 6 月)
- 15) Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Uneyama M, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Effective method for early detection of antithyroid chemicals by histopathological and immunohistochemical analyses in rats. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Salt Lake City (2024.3)
- 16) 赤根弘敏、豊田武士、松下幸平、畝山瑞穂、森川朋美、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子. TSH 産生阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出における病理学的解析と血中ホルモン値の比較. 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2024 年 1 月)
- 17) 赤根弘敏、豊田武士、石井雄二、高須伸二、小川久美子. ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的解析による抗甲状腺物質の効率的な検出. 第 82 回日本癌学会学術総会、神奈川県、(2023 年 9 月)
- 18) 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. 脱ヨウ素酵素阻害剤によるラット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 50 回日本毒性学会学術年会、神奈川県、(2023 年 6 月)

- 19) 岡本悠佑、長谷川千恵、赤根弘敏、豊田武士、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。医療用マイクロニードルアレイにおける皮膚透過性評価及び滅菌要否検証。日本薬学会第144回年会、神奈川県、(2024年3月)
- 20) 赤木純一、横井雅幸、三宅ゆみ、白井剛、馬場智弘、曹永晩、花岡文雄、菅澤薫、岩井成憲、小川久美子。グリシドアミド付加体のホルムアミドピリミジン誘導体はDNA複製阻害と突然変異を誘発する。日本薬学会第144回年会、神奈川県、(2024年3月)
- 21) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。シクロスポリン誘発ラット腎線維化モデルにおける尿細管の形態とCD44発現。第40回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2024年1月)
- 22) 笠松建吾、石井雄二、山上洋平、高須伸二、相馬明玲、小澤俊介、渋谷淳、小川久美子。免疫組織化学染色による小核化肝細胞の検出。第40回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2024年1月)
- 23) 高須伸二、石井雄二、相馬明玲、松本真理子、小川久美子。SDラットを用いたdecyltrimethoxysilaneの13週間反復投与試験。第40回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2024年1月)
- 24) 畷山瑞穂、豊田武士、赤木純一、赤根弘敏、水田保子、森川朋美、小川久美子。ラット肝発がん物質の早期検出におけるALDH3A1と γ -H2AX免疫染色の有用性評価。第40回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2024年1月)
- 25) 赤木純一、水田保子、畷山瑞穂、小川久美子。結晶子径が異なる二酸化チタン粒子のラットを用いた90日間反復経口投与による毒性影響とチタン蓄積の検討。第40回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2024年1月)
- 26) 水田保子、赤木純一、豊田武士、木村美恵、爲廣紀正、安達玲子、曹永晩、小川久美子。経皮/経口暴露によるアレルギーマウスモデルにおけるナノ銀のアジュバント作用の検討。第40回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2024年1月)
- 27) 佐藤順子、藤原利久、飯田麻里、小川久美子、高橋祐次、平林容子、甲斐清徳、柿本恒知、神鳥仁志、中辻俊二、畷山洋文、岩田聖。一般毒性試験及び発がん性試験の肉眼所見用語集 - JSTP国際用語委員会より。第40回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都、(2024年1月)
- 28) 赤木純一、横井雅幸、三宅ゆみ、白井剛、馬場智弘、曹永晩、花岡文雄、菅澤薫、岩井成憲、小川久美子。食品汚染物質アクリルアミドの活性代謝物によ生じるホルムアミドピリミジン誘導体の突然変異誘発機構。第46回日本分子生物学会年会、兵庫県、(2023年12月)
- 29) 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34回日本消化器癌発生学会総会、群馬県、(2023年11月)
- 30) 赤木純一、横井雅幸、三宅ゆみ、白井剛、馬場智弘、曹永晩、花岡文雄、菅澤薫、岩井成憲、小川久美子。食品汚染物質アクリルアミドの活性代謝物によ生じるホルムアミドピリミジン誘導体の突然変異誘発機構。第46回日本分子生物学会年会、兵庫県、(2023年12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82回日本癌学会学術総会、神奈川県、(2023年9月)
- 32) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。急性腎障害から慢性腎臓病への移行におけるCD44の発現およびその役割。第36回発癌病理研究会、神奈川県、(2023年8月)
- 33) 西村次平、笛木修、小川久美子、西川秋佳。本邦でのICH S1B (R1) ガイドラインの実装について。第50回日本毒性学会学術年会、神奈川県、(2023年6月)
- 34) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。シクロスポリン誘発慢性腎障害におけるCD44の役割及びバイオマーカーとしての可能性。第50回日本毒性学会学術年会、神奈川県、(2023年6月)
- 35) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、畷山瑞穂、豊田武士、小川久美子。結晶子径6nmの酸化チタンナノ粒子のラットにおける90日間反復経口投与毒性試験。第50回日本毒性学会学術年会、神奈川県、(2023年6月)
- 36) 瀧本憲史、石井雄二、満元達也、相馬明玲、高須伸二、渋谷淳、小川久美子。齧歯類に見られるacetamideの肝発がん性の種差に関する研究。第50回日本毒性学会学術年会、神奈川県、(2023年6月)
- 37) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。シクロスポリン誘発慢性腎障害モデルラットにおけるCD44の役割。第66回日本腎臓学会学術総会、神奈川県、(2023年6月)
- 38) Masuda H, Toyoda T, Nomura S. Examination of the therapeutic effect of MEK inhibitor on columnar metaplasia in a rat surgical reflux model. Digestive Disease Week 2023, Chicago (2023.5)
- 39) Toyoda T, Yamada T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023.3)
- 40) 豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。 γ -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)
- 41) 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 γ -H2AXの役割。第81回日本癌学会学術総会、神奈川県、(2022年9月)
- 42) 豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。 γ -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回日本毒性学会学術年会、北海道、(2022年7月)
- 43) Ogawa K, Akagi J, Mizuta Y, Akane H, Toyoda

1. 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)
- 44) 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の考え方. 第5回医薬品毒性機序研究会、東京都、(2022年12月)
- 45) 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回日本毒性学会学術年会、北海道、(2022年7月)
- 46) 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)
- 47) 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)
- 48) 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)
- 49) 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)
- 50) 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回日本毒性学会学術年会、北海道、(2022年7月)
- 51) 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)
- 52) 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)
- 53) 赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. ラットを用いた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)
- 54) 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)
- 55) 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)
- 56) 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)
- 57) 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)
- 58) 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)
- 59) 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)
- 60) 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)
- 61) 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)
- 62) 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)
- 63) 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)
- 64) 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)
- 65) 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)
- 66) 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)
- 67) 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)
- 68) 赤木純一、横井雅幸、曹永暉、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)
- 69) 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)
- 70) 赤木純一、豊田武士、小川久美子. γ -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)
- 71) 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)
- 72) 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)
- 73) 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)
- 74) 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、戸塚ゆかり、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)
- 75) 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)
- 76) 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)
- 77) 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)
- 78) 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)
- 79) 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)
- 80) 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)
- 81) 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ミンの 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)
- 82) 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)
- 83) 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)
- 84) 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)
- 85) 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)
- 86) 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)
- 87) 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)
- 88) 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)
- 89) 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)
- 90) 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)
- 91) 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)
- 92) 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)
- 93) 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)
- 94) 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)
- 95) 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)
- 96) 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)
- 97) 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)
- 98) 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)
- 99) 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)
- 100) 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)
- 101) 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)
- 102) 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)
- 103) 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)
- 104) 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)
- 105) 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)
- 106) 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、斎藤嘉朗、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)
- 107) 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)
- 108) 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)
- 109) 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)
- 110) 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)
- 111) 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)
- 112) 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)
- 113) 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)
- 114) 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)
- 115) 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)
- 116) 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)
- 117) 山本栄一、高橋祐次、栗形麻樹子、齊藤洋克、松下幸平、豊田武士、佐藤太、北嶋聡、小川久美子、伊豆津健一、斎藤嘉朗、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 μm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. 日本薬剤学会第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 male and female 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 ± SD.

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

Table 1-2. Serum hormone levels in male and female 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 ± SD.

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

Table 1-3. Serum hormone levels in male and female 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 ± SD.

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

Table 1-4. Serum hormone levels in male and female 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 ± SD.

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

Table 1-5. Serum hormone levels in male and female 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 ± SD.

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

Dose (ppm)		0	1000
No. of animals examined		5	5
Male			
T3	(ng/mL)	0.52 ± 0.05	0.42 ± 0.08*
T4	(µg/dL)	3.8 ± 0.8	1.7 ± 0.3**
TSH	(ng/mL)	1.05 ± 0.35	10.00 ± 6.46*

Each value represents the mean ± SD.

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

Table 1-6. Serum hormone levels in male and female 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 ± SD.

No significant difference was detected from the control group.

Dose (ppm)		0	2000	5000
No. of animals examined		5	5	5
Male				
T3	(ng/mL)	0.52 ± 0.05	0.56 ± 0.07	0.62 ± 0.08
T4	(µg/dL)	3.8 ± 0.8	3.0 ± 0.6	2.4 ± 0.3**
TSH	(ng/mL)	1.05 ± 0.35	1.70 ± 1.58	2.14 ± 0.59

Each value represents the mean ± SD.

** : Significantly different from the control group at $P < 0.01$.

Table 1-7. Serum hormone levels in male 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 ± SD.

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

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

Dose (%)	0	0.06	0.25	1	4
No. of animals examined	5	5	5	5	5
Male					
T3 (ng/mL)	0.52 ± 0.07	0.54 ± 0.05	0.55 ± 0.06	0.48 ± 0.09	0.50 ± 0.07
T4 (µg/dL)	3.1 ± 0.4	4.0 ± 1.4	4.0 ± 1.1	4.1 ± 0.5	4.4 ± 1.1
TSH (ng/mL)	1.3 ± 0.5	2.0 ± 0.8	3.8 ± 1.4	2.0 ± 1.4	4.8 ± 3.5*

Each value represents the mean ± SD.

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

Table 1-9. Serum hormone levels in male 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 ± SD.

** : Significantly different from the control group at $P < 0.01$.

Table 1-10. Serum hormone levels in male SD rats treated with VA-K-14 for 28 days

Dose (mg/kg)	0	1	3	10
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
T3 (ng/mL)	0.57 ± 0.05	0.57 ± 0.11	0.59 ± 0.12	0.64 ± 0.10
T4 (µg/dL)	3.9 ± 0.7	4.0 ± 0.8	3.8 ± 1.0	3.4 ± 0.4
TSH (ng/mL)	1.7 ± 1.0	2.5 ± 1.7	2.5 ± 2.0	3.1 ± 1.1

Each value represents the mean ± SD.

No significant difference was detected from the control group.

Table 1-11. Serum hormone levels in male SD rats treated with LC for 28 days

Dose (ppm)	0	250	500	1000
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
T3 (ng/mL)	0.52 ± 0.05	0.53 ± 0.07	0.50 ± 0.09	0.44 ± 0.07
T4 (µg/dL)	3.8 ± 0.8	4.1 ± 0.4	3.9 ± 0.4	3.2 ± 0.5
TSH (ng/mL)	1.0 ± 0.4	1.4 ± 0.4	1.4 ± 0.5	0.4 ± 0.2*

Each value represents the mean ± SD.

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

Table 2-1. Organ weight data in male and female 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 ± SD.

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

Table 2-2. Organ weight data in male and female 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	51.9 ± 7.7	44.5 ± 4.3	33.3 ± 6.5**
(mg%)	14.5 ± 1.3	14.4 ± 3.7	13.9 ± 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 ± SD.

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

Table 2-3. Organ weight data in male and female 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 ± SD.

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

Table 2-4. Organ weight data in male and female 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 ± SD.

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

Table 2-5. Organ weight data in male and female 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 ± SD.

** : Significantly different from the control group at $P < 0.01$.

Dose (ppm)	0	1000
No. of animals examined	5	5
Male		
Body weight (g)	394 ± 29	386 ± 18
Thyroids (mg)	18.5 ± 3.7	61.4 ± 15.3**
(mg%)	4.7 ± 0.8	15.9 ± 3.9**
Pituitary (mg)	13.1 ± 0.9	14.8 ± 1.0*
(mg%)	3.3 ± 0.4	3.8 ± 0.1
Adrenals (mg)	54.3 ± 8.0	51.2 ± 9.7
(mg%)	13.8 ± 1.5	13.3 ± 2.4
Liver (g)	11.23 ± 1.01	10.74 ± 0.94
(g%)	2.85 ± 0.05	2.78 ± 0.16

Each value represents the mean ± SD.

** : Significantly different from the control group at $P < 0.01$.

Table 2-6. Organ weight data in male and female 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 ^{a)}	15.0 ± 0.9	14.4 ± 1.1
(mg%)	3.48 ± 0.23	3.64 ± 0.26 ^{a)}	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 ± SD.

^{a)}: 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.

Dose (ppm)	0	2000	5000
No. of animals examined	5	5	5
Male			
Body weight (g)	394 ± 29	381 ± 21	343 ± 19
Thyroids (mg)	18.5 ± 3.7	27.1 ± 3.8*	31.4 ± 6.5**
(mg%)	4.7 ± 0.8	6.9 ± 0.8	9.2 ± 2.1**
Pituitary (mg)	13.1 ± 0.9	14.0 ± 1.5	12.1 ± 1.1
(mg%)	3.3 ± 0.4	3.7 ± 0.4	3.5 ± 0.2
Adrenals (mg)	54.3 ± 8.0	57.7 ± 10.4	44.6 ± 4.5
(mg%)	13.8 ± 1.5	15.2 ± 2.8	13.0 ± 0.7
Liver (g)	11.23 ± 1.01	10.99 ± 0.84	9.42 ± 0.60**
(g%)	2.85 ± 0.05	2.88 ± 0.10	2.75 ± 0.10

Each value represents the mean ± SD.

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

Table 2-7. Organ weight data in male 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 ± SD.

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

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

Dose (%)	0	0.06	0.25	1	4
No. of animals examined	5	5	5	5	5
Male					
Body weight (g)	346 ± 27	347 ± 18	356 ± 19	350 ± 13	378 ± 18
Thyroids (mg)	18.1 ± 2.1	17.3 ± 3.4	17.0 ± 2.6	20.1 ± 1.9	20.3 ± 1.0
(mg%)	5.2 ± 0.6	5.0 ± 0.9	4.8 ± 0.6	5.7 ± 0.5	5.8 ± 0.3
Pituitary (mg)	13.2 ± 1.4	14.0 ± 1.3	14.0 ± 1.3	14.3 ± 1.2	13.7 ± 1.5
(mg%)	3.8 ± 0.5	4.0 ± 0.4	3.9 ± 0.2	4.1 ± 0.4	3.9 ± 0.3
Adrenals (mg)	48.8 ± 4.5	48.5 ± 10.5	54.6 ± 8.8	46.4 ± 8.1	50.4 ± 4.6
(mg%)	14.2 ± 1.8	13.9 ± 2.6	15.4 ± 2.7	13.3 ± 2.7	14.5 ± 1.4
Liver (g)	8.84 ± 0.63	8.79 ± 0.55	9.24 ± 0.71	9.18 ± 0.35	8.65 ± 0.37
(g%)	2.55 ± 0.08	2.53 ± 0.14	2.59 ± 0.06	2.62 ± 0.11	2.48 ± 0.07

Each value represents the mean ± SD.

No significant difference was detected from the control group.

Table 2-9. Organ weight data in male 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 ± SD.

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

Table 2-10. Organ weight data in male SD rats treated with VA-K-14 for 28 days

Dose (mg/kg)	0	1	3	10
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
Body weight (g)	391 ± 30	372 ± 13	360 ± 25	378 ± 18
Thyroids (mg)	20.1 ± 2.9	19.7 ± 2.1	20.0 ± 2.2	20.3 ± 2.3
(mg%)	5.1 ± 0.4	5.3 ± 0.6	5.6 ± 0.5	5.4 ± 0.7
Pituitary (mg)	13.2 ± 1.2	13.2 ± 0.4	13.5 ± 2.3	13.9 ± 1.0
(mg%)	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.8 ± 0.6	3.7 ± 0.4
Adrenals (mg)	51.4 ± 6.7	53.9 ± 5.2	51.2 ± 11.5	58.0 ± 11.9
(mg%)	13.2 ± 1.6	14.5 ± 1.9	14.3 ± 3.2	15.4 ± 3.6
Liver (g)	11.06 ± 1.53	10.44 ± 0.52	9.95 ± 1.19	11.93 ± 1.18
(g%)	2.82 ± 0.25	2.80 ± 0.08	2.76 ± 0.16	3.15 ± 0.20**

Each value represents the mean ± SD.

** : Significantly different from the control group at $P < 0.01$.

Table 2-11. Organ weight data in male SD rats treated with LC for 28 days

Dose (ppm)	0	250	500	1000
No. of animals examined	5	5	5	5
Male				
Body weight (g)	394 ± 29	391 ± 32	385 ± 26	298 ± 74
Thyroids (mg)	18.5 ± 3.7	23.5 ± 3.3	24.7 ± 1.6*	24.9 ± 4.4*
(mg%)	4.7 ± 0.8	6.1 ± 1.2	6.6 ± 0.4*	8.9 ± 1.6**
Pituitary (mg)	13.1 ± 0.9	13.6 ± 1.5	14.1 ± 1.9	13.0 ± 1.7
(mg%)	3.3 ± 0.4	3.5 ± 0.6	3.6 ± 0.3	4.6 ± 1.1*
Adrenals (mg)	54.3 ± 8.0	63.4 ± 6.4	49.1 ± 7.6	45.9 ± 9.6
(mg%)	13.8 ± 1.5	16.3 ± 2.4	12.9 ± 2.8	16.7 ± 7.3
Liver (g)	11.23 ± 1.01	11.24 ± 1.59	10.24 ± 1.02	7.93 ± 2.12**
(g%)	2.85 ± 0.05	2.86 ± 0.18	2.66 ± 0.12	2.65 ± 0.13

Each value represents the mean ± SD.

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

Table 3-1. Histopathological findings in male and female 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
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 (±, +, ++, +++) ^{a)}	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)**
		Decrease in T3 level (±, +, ++, +++) ^{b)}	0	0	5(5,0,0,0)**	5(0,2,3,0)**	5(0,0,0,5)**	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)**
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 (±, +, ++, +++) ^{a)}			0	0	5(5,0,0,0)**	5(2,2,1,0)**	5(0,3,2,0)**	5(0,0,0,5)**
Decrease in T3 level (±, +, ++, +++) ^{b)}			0	0	5(5,0,0,0)**	5(2,2,1,0)**	5(0,2,3,0)**	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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

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

Table 3-2. Histopathological findings in male and female 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
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 (±, +, ++) ^{a)}	0	4(4,0,0)*	5(5,0,0)**	5(2,2,1)**	5(0,0,5)**
		Decrease in T3 level (±, +, ++, +++) ^{b)}	0	4(4,0,0,0)*	5(5,0,0,0)**	5(0,3,2,0)**	5(0,0,0,5)**
	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*
	Female	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +, ++, +++)	0	3(3,0,0,0)	5(4,1,0,0)**	5(4,1,0,0)**
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 (±, +, ++) ^{a)}			0	3(3,0,0)	5(5,0,0)**	5(3,2,0)**	5(0,2,3)**
Decrease in T3 level (±, +, ++, +++) ^{b)}			0	1(1,0,0,0)	4(4,0,0,0)*	5(4,1,0,0)**	5(0,0,0,5)**
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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

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

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

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	No. of animals examined				
			0	10	30	100	
			5	5	5	5	
Male	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (±, +, ++, +++)	0	4(4,0,0)*	5(0,4,1,0)**	5(0,0,3,2)**	
		Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +)	0	2(2, 0)	4(3, 1)*	5(3, 2)**
			Hyperplasia, follicular cell (±)	0	0	2	5**
			Colloid depletion (±)	0	1	3	4*
			Decrease in T4 level ^{a)}	0	0	0	0
			Decrease in T3 level ^{b)}	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis (±)	0	0	0	2	
		Hypertrophy, pars distalis (±)	0	0	0	2	
	Adrenal		0	0	0	0	
	Female	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (±, +, ++)	0	3(3,0,0)	5(1,4,0)**	5(1,2,2)**
Thyroid			Hypertrophy, follicular cell (±)	0	2	4*	5**
			Hyperplasia, follicular cell	0	0	0	0
			Colloid depletion (±)	0	0	1	1
			Decrease in T4 level ^{a)}	0	0	0	0
			Decrease in T3 level ^{b)}	0	0	0	0
Pituitary			0	0	0	0	
Adrenal			0	0	0	0	

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

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

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

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	No. of animals examined				
			0	15	50	150	
			5	5	5	5	
Male	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (±, +)	0	0	5(5,0)**	5(2,3)**	
		Vacuolation, hepatocyte, periportal (±, +, ++)	0	0	3(1,2,0)	3(0,2,1)	
	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +)	0	3(3, 0)	4(2, 2)*	5(1, 4)**	
		Hyperplasia, follicular cell (±)	0	0	3	5**	
			Colloid depletion (±)	0	1(1, 0)	3(2, 1)	3(3, 2)
			Decrease in T4 level ^{a)}	0	0	0	0
			Decrease in T3 level ^{b)}	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis (±)	0	0	0	2	
		Hypertrophy, pars distalis (±)	0	0	0	2	
	Adrenal		0	0	0	0	
Female	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (±, +)	0	0	3(3,0)	5(0,5)**	
		Vacuolation, hepatocyte, periportal (±, +, ++)	0	4(3,1,0)*	5(0,3,2)**	5(1,4,0)**	
	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +)	0	3(3, 0)	4(4, 0)*	5(3, 2)**	
		Hyperplasia, follicular cell (±)	0	0	0	3	
			Colloid depletion (±)	0	0	1(1, 0)	3(2, 1)
			Decrease in T4 level ^{a)}	0	0	0	0
			Decrease in T3 level ^{b)}	0	0	0	0
	Pituitary		0	0	0	0	
	Adrenal		0	0	0	0	

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

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

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

Sex	Organs and findings	Dose (ppm)	No. of animals examined				
			0	1	10	100	1000
			10 ^{c)}	5	5	5	5
Male	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +, ++, +++)	0	1(1,0,0,0)	4(4,0,0,0)*	5(1,4,0,0)**	5(0,0,4,1)**
		Hyperplasia, follicular cell (±, +, ++)	0	0	2(2,0,0)	4(2,2,0)*	5(0,1,4)**
		Colloid depletion (±, +, ++, +++)	0	0	2(2,0,0,0)	5(1,2,2,0)**	5(0,0,1,4)**
		Decrease in T4 level (±, +, ++) ^{a)}	0	0	1(1,0,0)	2(2,0,0)	5(0,2,3)**
		Decrease in T3 level (±, +, ++, +++) ^{b)}	0	0	0	5(0,4,1,0)**	5(0,0,0,4)**
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis (±, +)	0	0	1	2	5(4, 1)**
		Hypertrophy, pars distalis (±, +)	0	0	1	3	5(2, 3)**
	Adrenal		0	0	0	0	-
	Liver		0	0	0	0	-
	Female	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +)	0	1(1, 0)	3(3, 0)	5(2, 3)**
Hyperplasia, follicular cell (±)			0	0	2	5**	
Colloid depletion (±, +, ++)			0	0	2(2,0,0)	5(2,2,1)**	
Decrease in T4 level (±) ^{a)}			0	0	1	2	
Decrease in T3 level (±, +) ^{b)}			0	0	0	2(0, 2)	
Pituitary			0	0	0	0	
Adrenal			0	0	0	0	
Liver			0	0	0	0	

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

^{c)}: Total of two experiments

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

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

Sex	Organs and findings	Dose (ppm)	No. of animals examined					
			0	10	100	1000	2000	5000
			10 ^{c)}	5	5	5	5	5
Male	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±)	0	1	2	3	3	4*
		Hyperplasia, follicular cell (±)	0	0	0	0	3	4*
		Colloid depletion	0	0	0	0	0	0
		Decrease in T4 level ^{a)}	0	0	0	0	0	0
		Decrease in T3 level (±, +, ++) ^{b)}	0	0	0	0	0	5(0, 3, 2)**
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis (±)	0	1 ^{d)}	1	2	1	3
		Hypertrophy, pars distalis (±)	0	1 ^{d)}	1	2	1	3
	Adrenal		0	0	0	0	-	-
	Liver		0	0	0	0	-	-
	Female	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±)	0	0	1	1	
Hyperplasia, follicular cell			0	0	0	0		
Colloid depletion (±)			0	0	0	1		
Decrease in T4 level ^{a)}			0	0	0	0		
Decrease in T3 level ^{b)}			0	0	0	0		
Pituitary			0	0	0	0		
Adrenal			0	0	0	0		
Liver			0	0	0	0		

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

^{c)}: Total of two experiments

^{d)}: 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 male SD rats treated with IOP for 28 days

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	No. of animals examined			
			0	30	100	300
Male	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +)	0	5(4, 1)**	5(2, 3)**	5(1, 4)**
		Hyperplasia, follicular cell (±, +)	0	4(4, 0)*	4(4, 0)*	5(4, 1)**
		Colloid depletion (±)	0	0	0	1
		Decrease in T4 level ^{a)}	0	0	0	0
		Decrease in T3 level ^{b)}	0	0	0	0
	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(4, 1)*	5(2, 3)*
	Adrenal		0	0	0	0
	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (±)	0	0	1	5**

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

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

Table 3-8. Histopathological findings in male SD rats treated with erythrosine for 28 days

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	No. of animals examined				
			0	0.06	0.25	1	4
Male	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +)	0	1(1, 0)	4(4, 0)*	4(4, 0)*	5(4, 1)**
		Hyperplasia, follicular cell (±)	0	0	1	1	5**
		Colloid depletion (±)	0	0	0	1	1
		Decrease in T4 level ^{a)}	0	0	0	0	0
		Decrease in T3 level ^{b)}	0	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis (±)	0	0	1	0	2
		Hypertrophy, pars distalis (±)	0	0	1	1	3
	Adrenal		0	0	0	0	0
	Liver		0	0	0	0	0

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

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

Table 3-9. Histopathological findings in male SD rats treated with BEX for 28 days

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	No. of animals examined			
			0	1	3	10
Male	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell	0	0	0	0
		Hyperplasia, follicular cell	0	0	0	0
		Colloid depletion (±)	0	0	1	3
		Decrease in T4 level ^{a)}	0	0	0	0
		Decrease in T3 level ^{b)}	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis	0	0	0	0
		Hypertrophy, pars distalis	0	0	0	0
	Adrenal		0	0	0	0
	Liver	Glycogen accumulation (±, +)	0	0	2(2, 0)	3(1, 2)

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

No significant difference was detected from the control group.

Table 3-10. Histopathological findings in male SD rats treated with VA-K-14 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	1	0	1
		Hyperplasia, follicular cell (±)	0	0	0	1
		Colloid depletion (±)	0	1	2	3
		Decrease in T4 level ^{a)}	0	0	0	0
		Decrease in T3 level ^{b)}	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis (±)	0	0	0	1
		Hypertrophy, pars distalis (±)	0	0	0	1
	Adrenal		0	0	0	0
	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (±)	0	0	0	2

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

No significant difference was detected from the control group.

Table 3-11. Histopathological findings in male SD rats treated with LC for 28 days

Sex	Organs and findings	Dose (ppm)	0	250	500	1000
			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	0	0
		Decrease in T4 level ^{a)}	0	0	0	0
		Decrease in T3 level ^{b)}	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis	0	0	0	0
		Hypertrophy, pars distalis	0	0	0	0
	Adrenal		0	0	0	0
	Liver		0	0	0	0

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

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	Adamts12	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	Vnn1	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	F2rl1	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	Vtcn1	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	Cxadr11	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	Gilb1	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	Gilb1	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	Cgrefl	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	Rasl11b	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	Atp5fld	3.0	2.1
A_64_P038887	Cdca71	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

Table 4-3. Overexpressed genes in the thyroid gland of male SD rats treated with IOP for 28 days

Probe Name	Gene Symbol	Fold change	Probe Name	Gene Symbol	Fold change	Probe Name	Gene Symbol	Fold change
A_64_P050084	Npw	13.0	A_44_P362954	Cat	2.6	A_64_P038168		2.3
A_44_P142925	Tprg1	9.2	A_64_P010373	RGD1563378	2.6	A_64_P139516		2.3
A_42_P811256	Vnn1	8.3	A_64_P164227		2.6	A_43_P16491	Col16a1	2.2
A_64_P005208	Nqo1	7.8	A_64_P056846	Gclc	2.6	A_64_P116274	Ripor2	2.2
A_64_P101499	Bmp3	7.8	A_44_P806154		2.6	A_42_P723173	Id1	2.2
A_64_P099973	Bhmt2	6.1	A_44_P478066	Incenp	2.6	A_64_P116276		2.2
A_64_P138011	Adra1b	6.0	A_64_P047542	Tmem54	2.6	A_64_P119722		2.2
A_64_P170600	Gstp1	6.0	A_44_P175584		2.6	A_64_P102796	Lgr5	2.2
A_64_P011489	Gdf15	5.0	A_43_P12580	Scnn1a	2.6	A_64_P149970		2.2
A_64_P098979	Tsku	4.8	A_64_P117101	Cfap99	2.6	A_44_P508566	Olfml2b	2.2
A_64_P015305	Scube2	4.7	A_64_P077597	Pgm2l1	2.6	A_64_P054568	Vash2	2.1
A_44_P1042754	Slc7a10	4.6	A_44_P402578	Il7	2.5	A_44_P386359	Ninj1	2.1
A_64_P087380	Efna3	4.6	A_44_P273777	Masp1	2.5	A_64_P051229	Kcnk7	2.1
A_42_P842833	Srxn1	4.5	A_44_P335446	Dusp2	2.5	A_44_P823749	Scn5a	2.1
A_43_P11861	Dio3	4.4	A_44_P403532	Garnl3	2.5	A_64_P036381	Paqr7	2.1
A_64_P120679	Cck	4.3	A_44_P531741	Masp1	2.5	A_64_P011229	Kcnk7	2.1
A_64_P006354	Sfn	4.3	A_43_P11754	Akr7a3	2.5	A_64_P053785	Adra2a	2.1
A_64_P119053		3.9	A_44_P317639	Vash2	2.5	A_44_P402507	Retsat	2.1
A_44_P1034209	Lamb3	3.8	A_64_P003572	Lgr5	2.5	A_42_P787775	Plekhd1	2.1
A_43_P12258	Hpse	3.8	A_44_P881194	Dram1	2.5	A_44_P309081	Hspa2	2.1
A_64_P033761	Abcc3	3.7	A_64_P150338	Tmem132c	2.5	A_44_P522827	Htra3	2.0
A_64_P093522	Dtna	3.7	A_44_P421391	Slc1a4	2.5	A_64_P005328		2.0
A_64_P040176	Nrip3	3.7	A_43_P11560	Aqp5	2.4	A_44_P286788	Ncf4	2.0
A_64_P132666	Nol4	3.6	A_44_P335974	Aldh1a7	2.4	A_64_P099923	Dap	2.0
A_64_P059565	Gpx2	3.6	A_44_P493005	Foxq1	2.4	A_64_P068809	Gpd2	2.0
A_44_P483360	Nrip3	3.5	A_44_P137448	Ptgs1	2.4	A_64_P060497	Apoc4	2.0
A_43_P11472	Hmox1	3.5	A_44_P1038028	Tnfrsf12a	2.4	A_44_P886690	Lpar2	2.0
A_44_P214811	Tfrc	3.4	A_42_P525886	Crabp1	2.4	A_44_P490308	Muc20	2.0
A_64_P062462	Pir	3.4	A_64_P072883		2.4	A_64_P100289		2.0
A_64_P126300		3.2	A_64_P072032		2.4	A_64_P005108	Cesl1	2.0
A_64_P078303	Angpt4	3.2	A_42_P704348	Pgm2l1	2.4	A_64_P074029	Slc14a2	2.0
A_64_P051430	Gpx2	3.2	A_64_P130547		2.4			
A_44_P499271	Asphd2	3.1	A_64_P142119		2.4			
A_43_P11770	G6pd	3.1	A_64_P093899	Elf3	2.4			
A_42_P698240	Ptgr1	3.1	A_64_P013531	Gphb5	2.4			
A_43_P12032	Slc14a2	3.0	A_64_P014872	Pgm2l1	2.3			
A_64_P093599	Abcc4	3.0	A_44_P409965	Dnah14	2.3			
A_64_P082693	Egr1	3.0	A_44_P438675	Pappa1	2.3			
A_64_P130380		2.9	A_44_P575006		2.3			
A_44_P194803	Baalc	2.8	A_44_P1030081	Ccdc33	2.3			
A_44_P289637	Slc4a1	2.8	A_44_P1037706	Glod5	2.3			
A_44_P1051894	Tmem132c	2.8	A_64_P164504		2.3			
A_64_P060938	Abhd11-as1	2.8	A_43_P11685	Id2	2.3			
A_44_P255694		2.8	A_64_P071297	LOC691895	2.3			
A_44_P325599	Vwa7	2.7	A_42_P692476	Slc39a4	2.3			
A_64_P057340	Abcc4	2.7	A_44_P1057585	Htatip2	2.3			
A_64_P089400	Hpse	2.7	A_64_P045114		2.3			
A_44_P382255	Dtna	2.7	A_64_P144913	Nab2	2.3			
A_64_P126387	Tmem151a	2.7	A_44_P1037972	Ckmt1	2.3			
A_64_P011324	Ahrr	2.7	A_44_P300183	Slc48a1	2.3			

Table 4-4. 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 α) and Human thyroid hormone receptor beta (TR β) reporter gene
		6.b Thyroid hormone receptor beta (TR β) 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

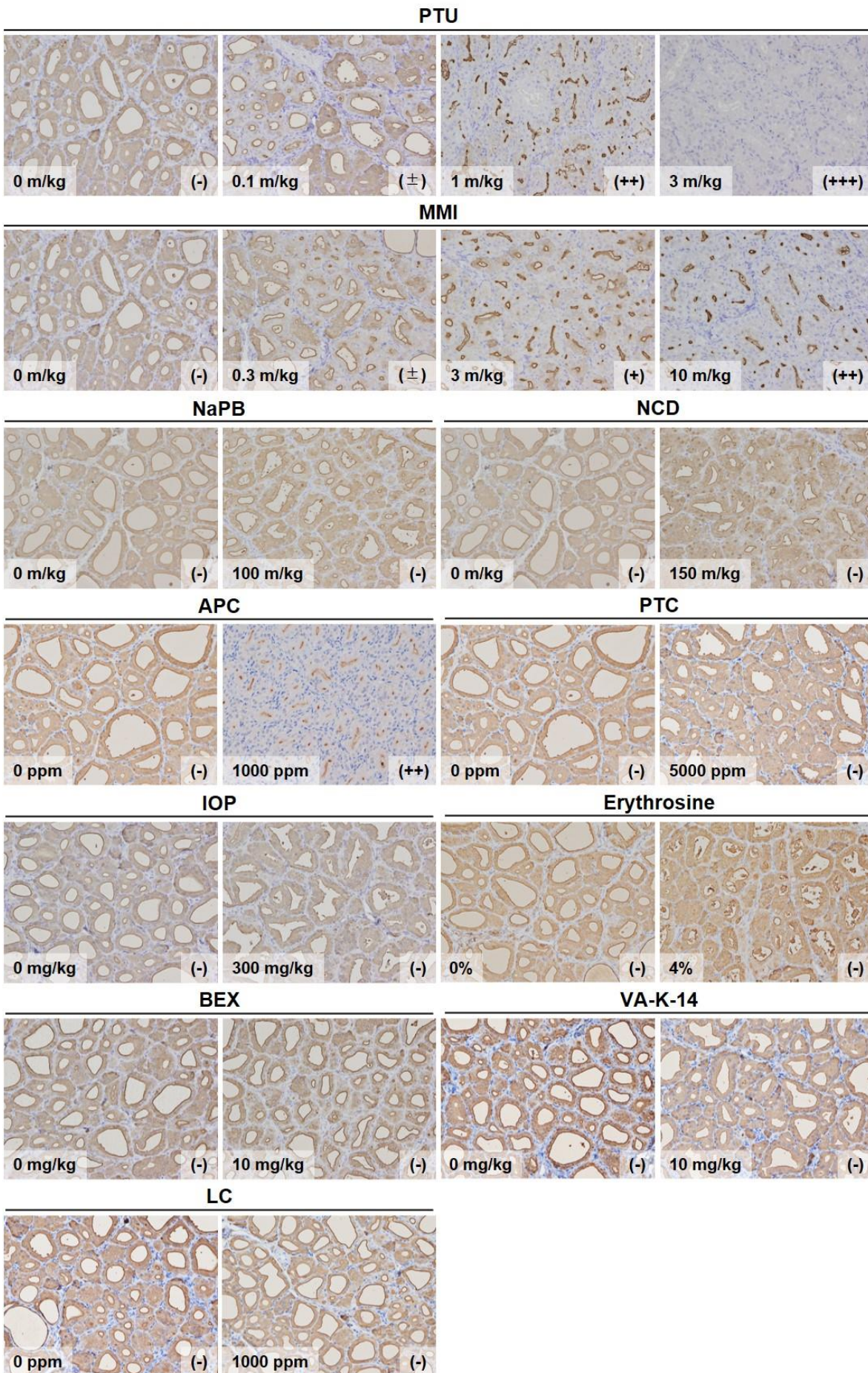


Figure 1. Immunohistochemistry for T4 in the thyroid gland of male SD rats.

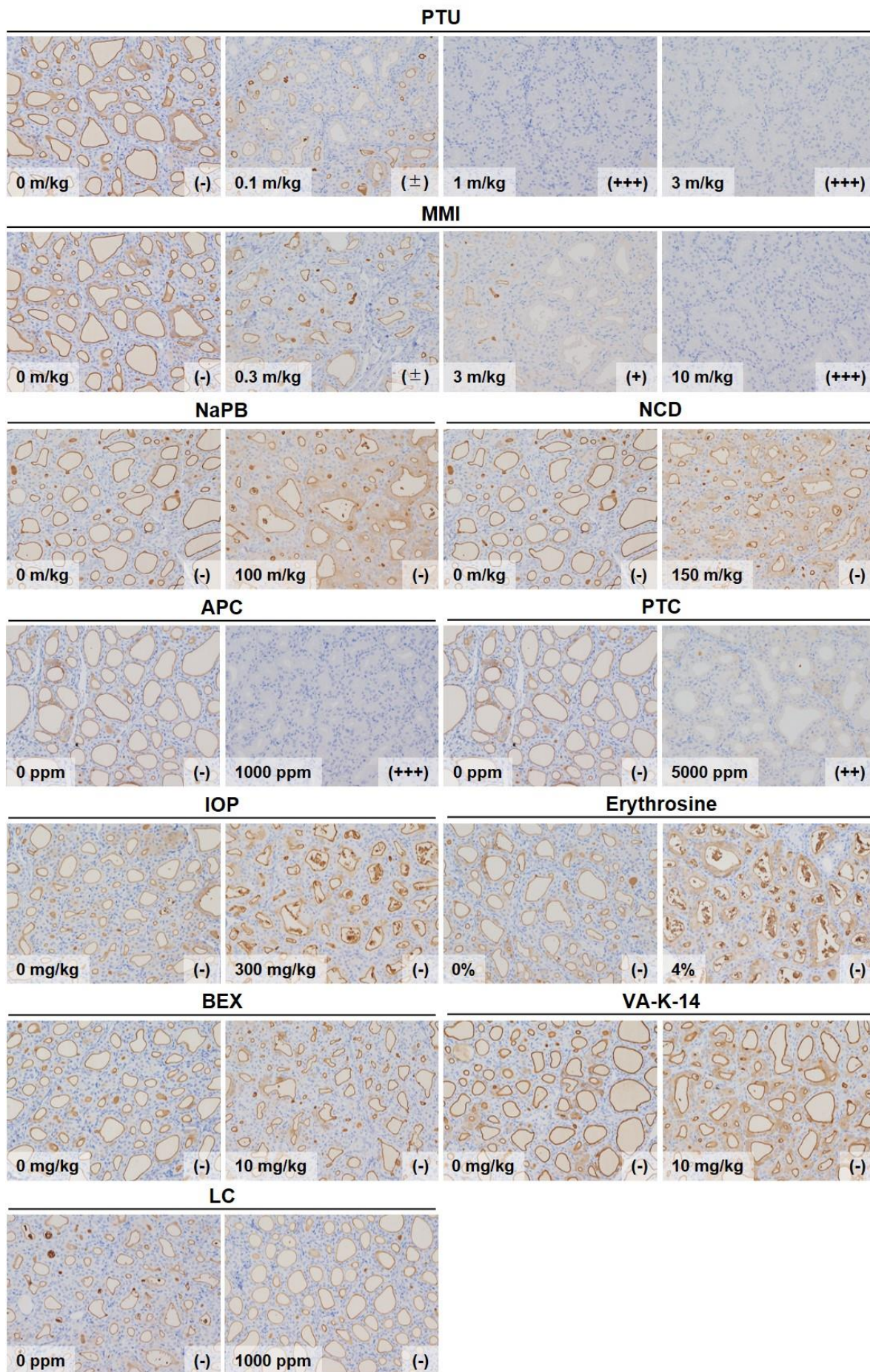


Figure 2. Immunohistochemistry for T3 in the thyroid gland of male SD rats.

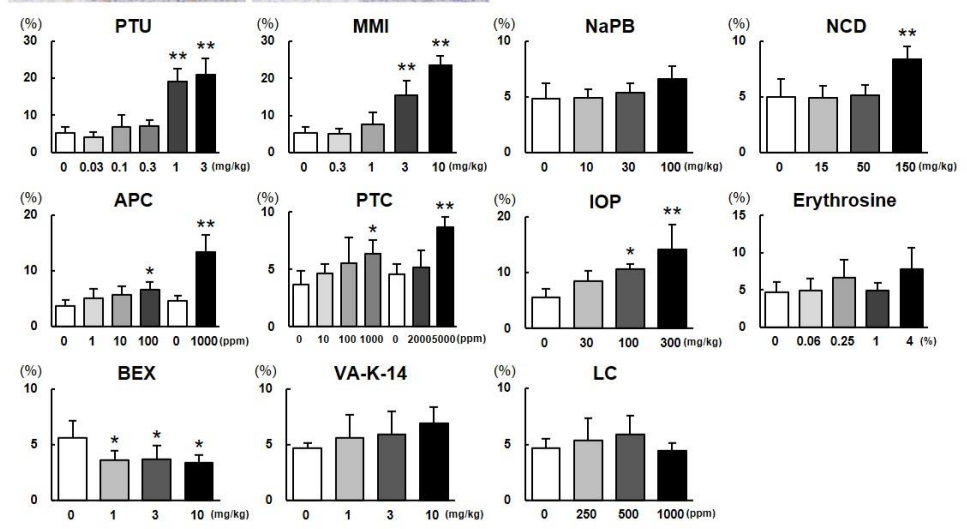
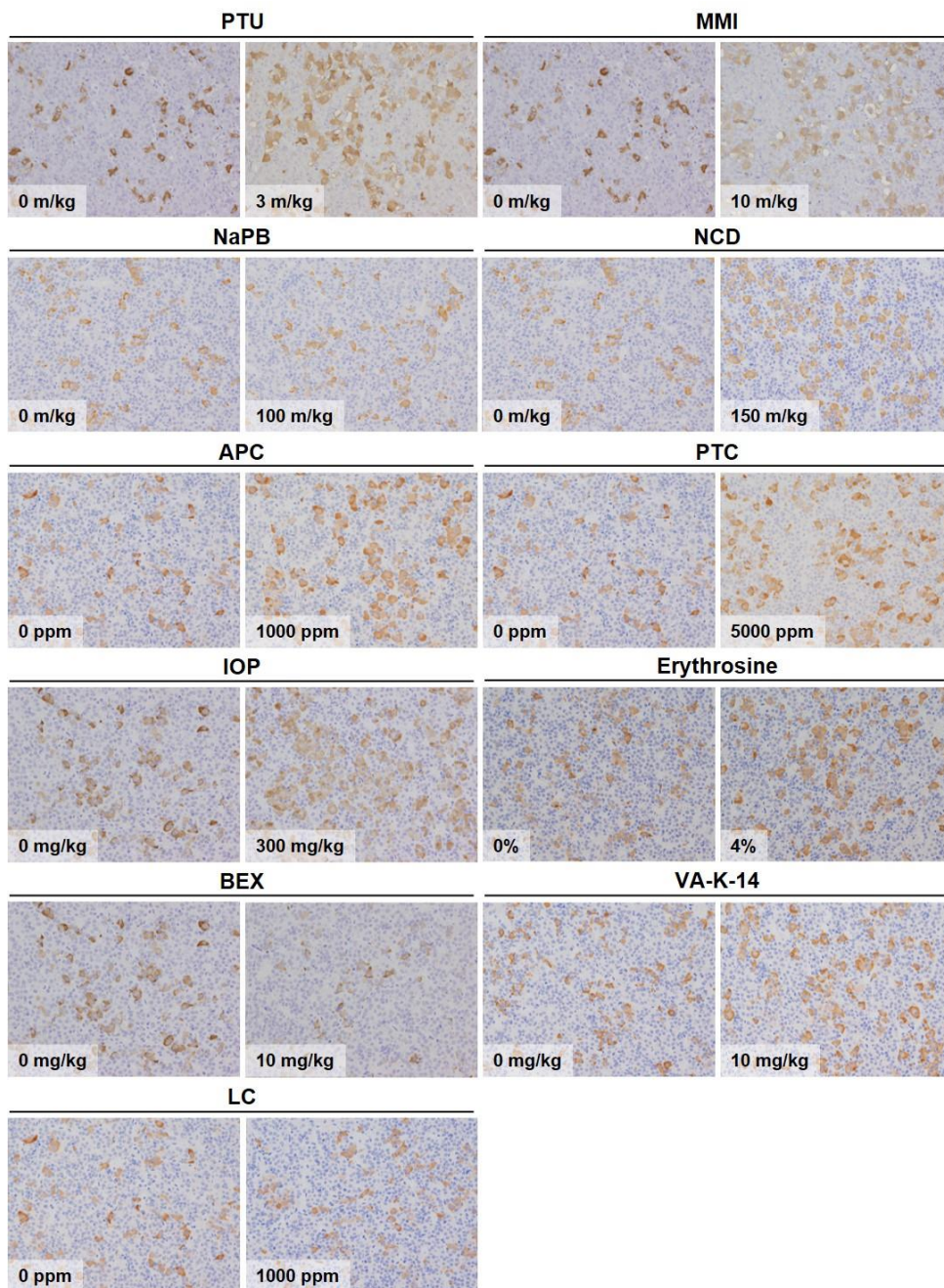


Figure 3. Immunohistochemistry for TSH in the pituitary gland of male SD rats. * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

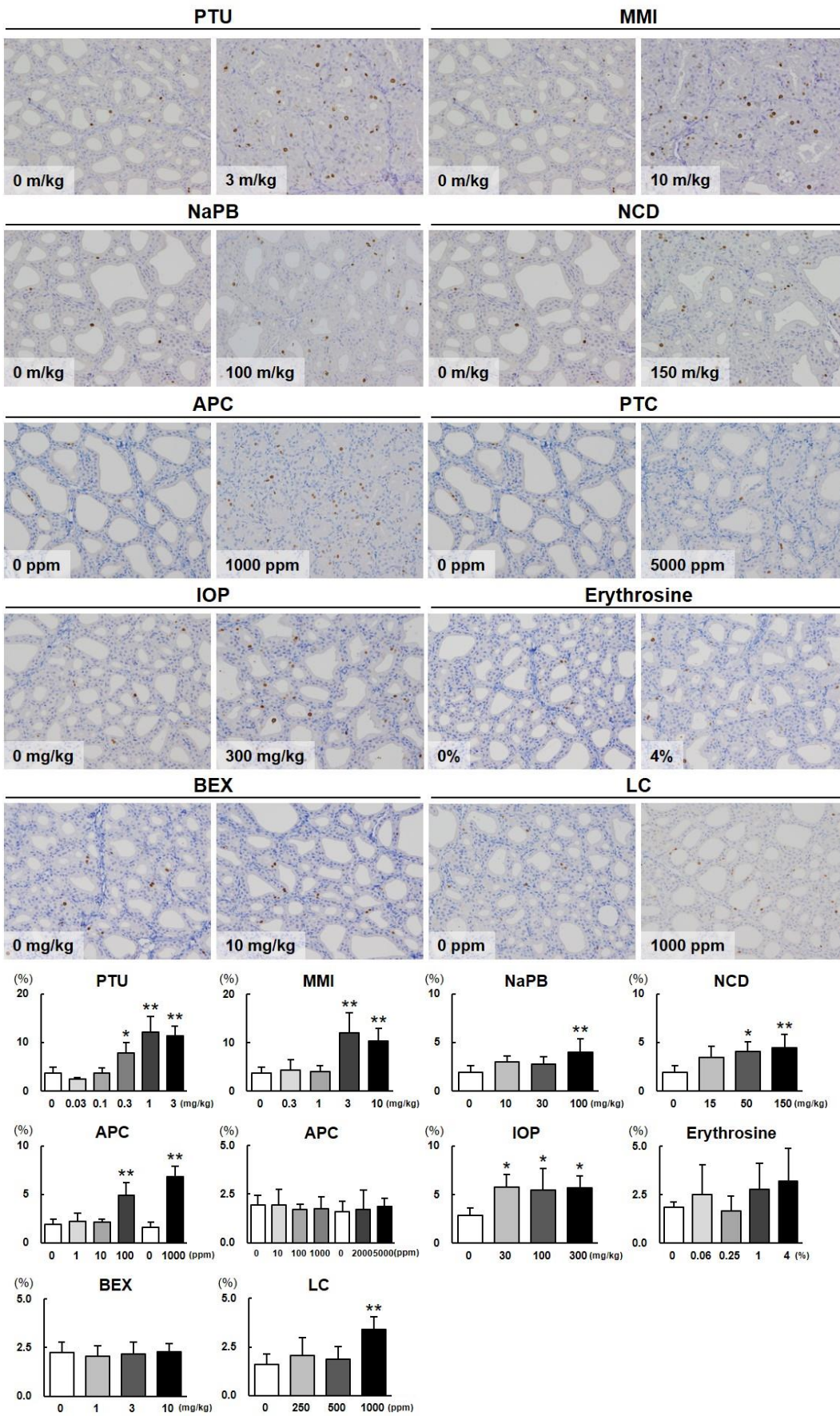


Figure 4. Immunohistochemistry for Ki67 in the thyroid gland of male SD rats. * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

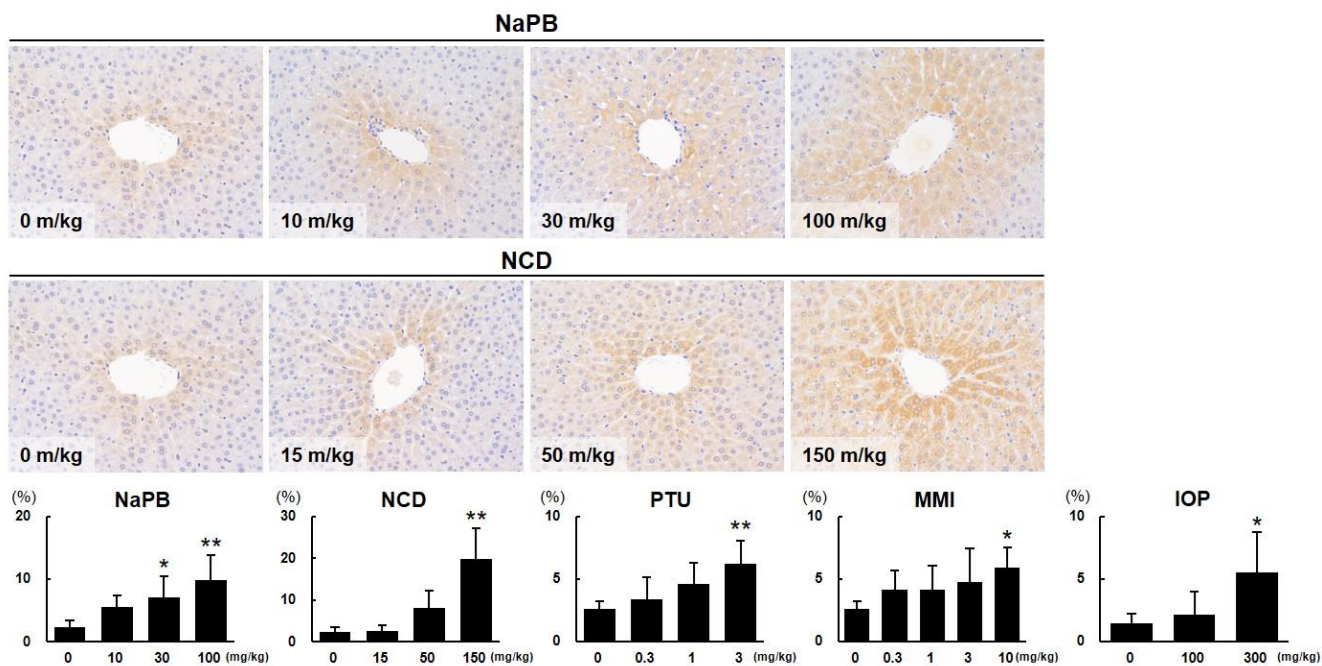


Figure 5. Immunohistochemistry for UGT1A6 in the liver of male SD rats. * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

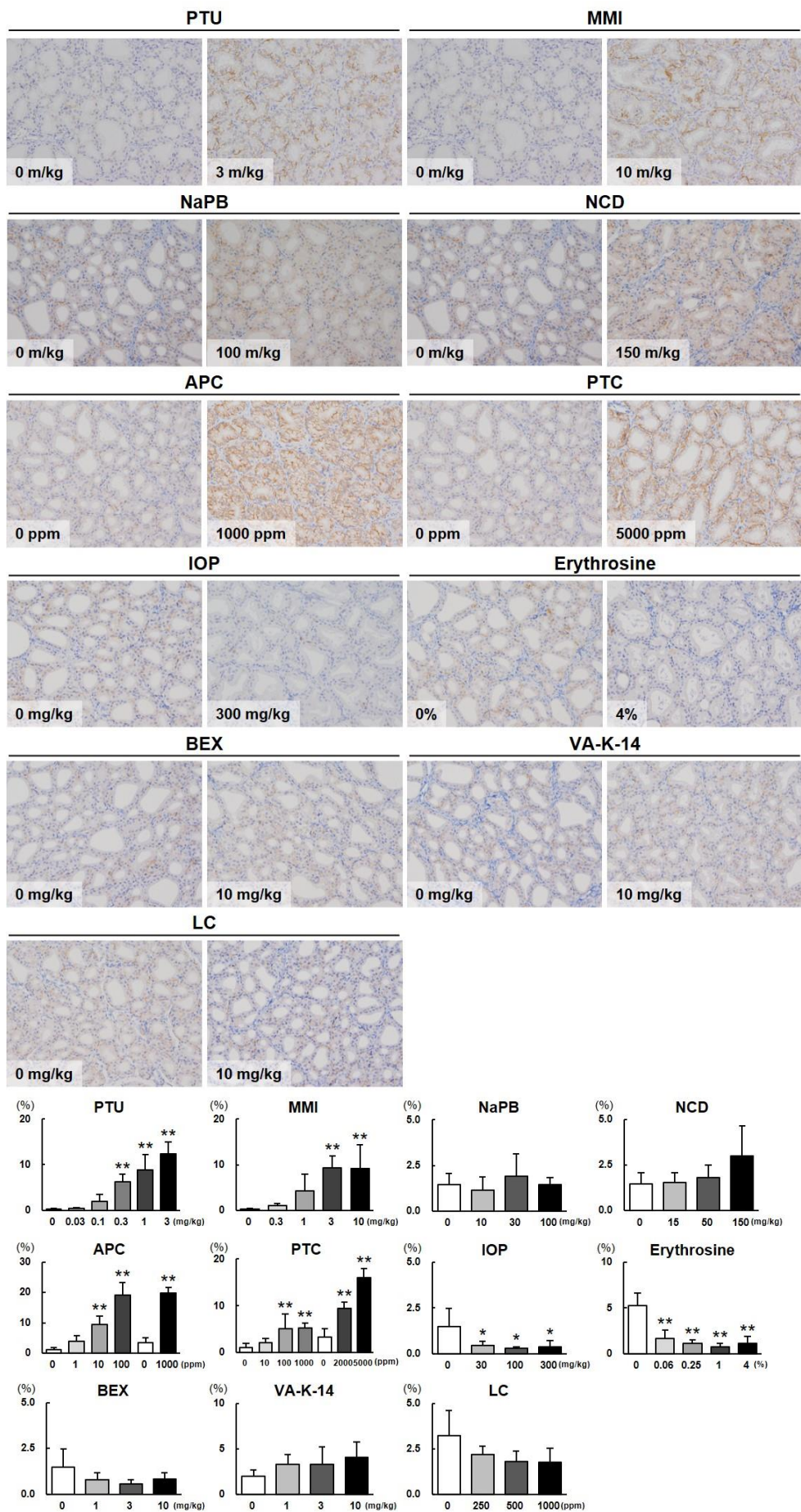


Figure 6. Immunohistochemistry for NIS in the thyroid gland of male SD rats. * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

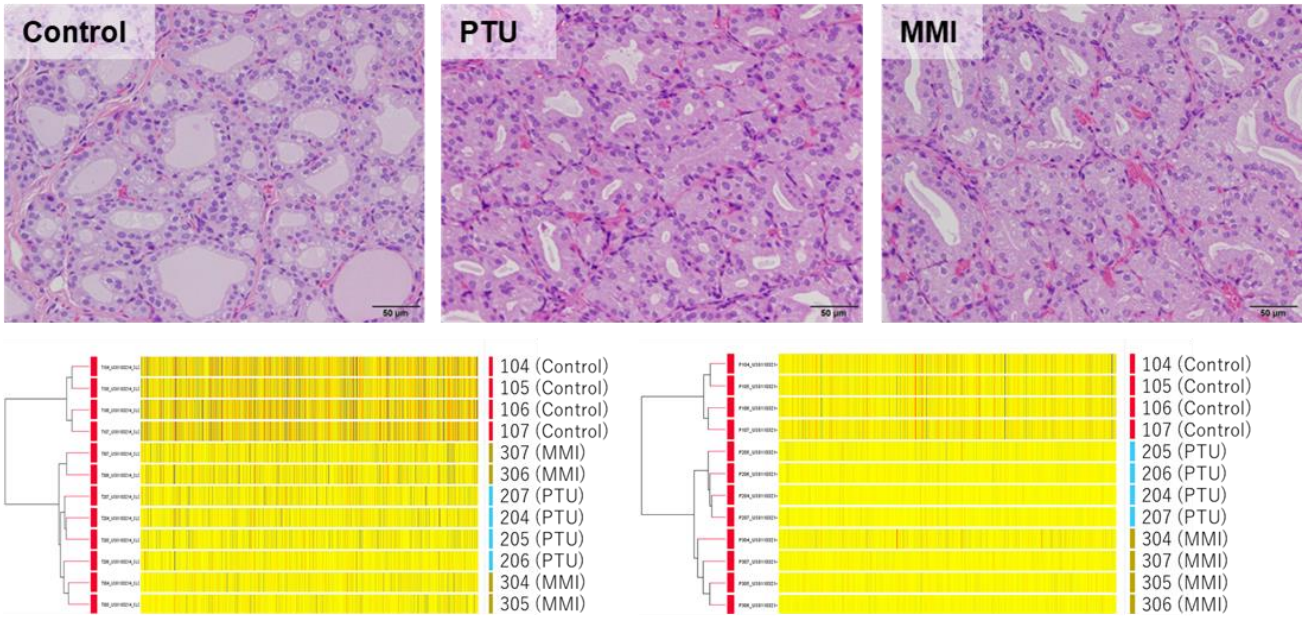


Figure 7. Representative histopathological findings in the thyroid gland of male SD rats treated with PTU and MMI for 28 days (upper column). Cluster analysis of microarray data obtained from thyroid (lower left) and pituitary gland (lower right).

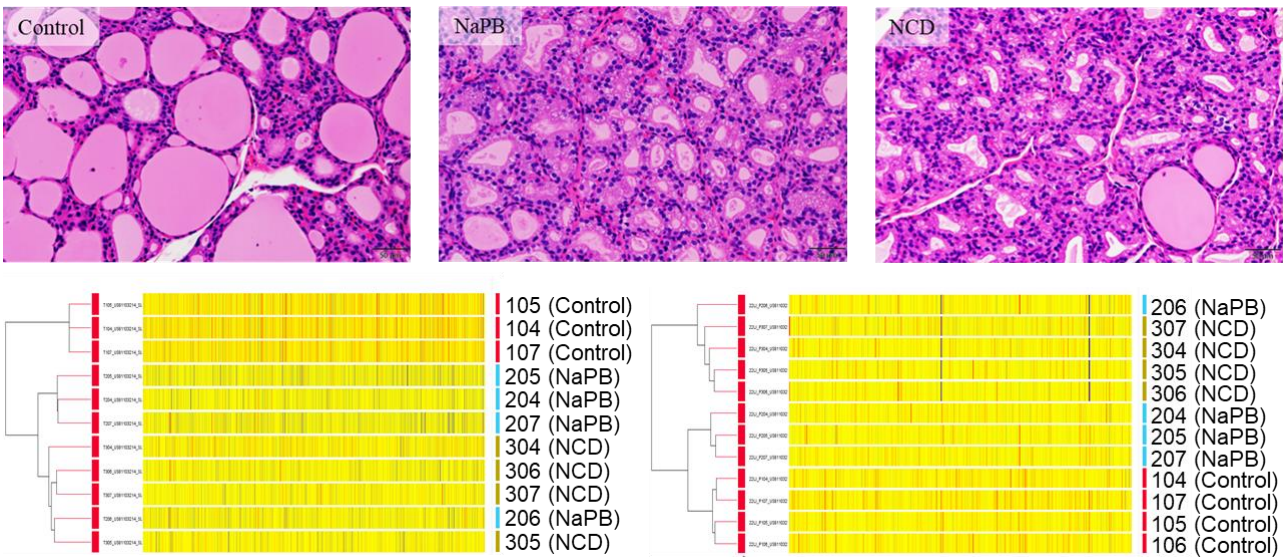


Figure 8. Representative histopathological findings in the thyroid gland of male SD rats treated with NaPB and NCD for 28 days (upper column). Cluster analysis of microarray data obtained from thyroid (lower left) and pituitary gland (lower right).

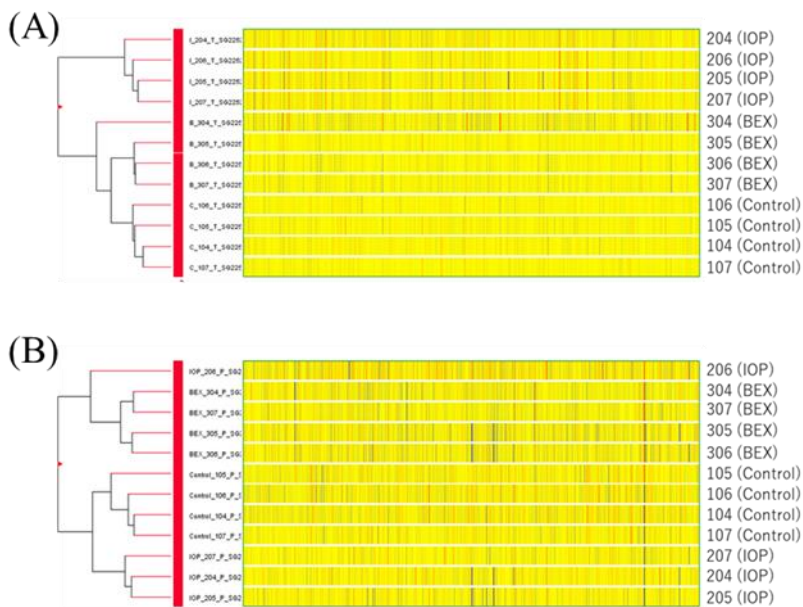


Figure 9. Cluster analysis of microarray data obtained from thyroid (A) and pituitary gland (B) of male SD rats treated with IOP and BEX for 28 days.

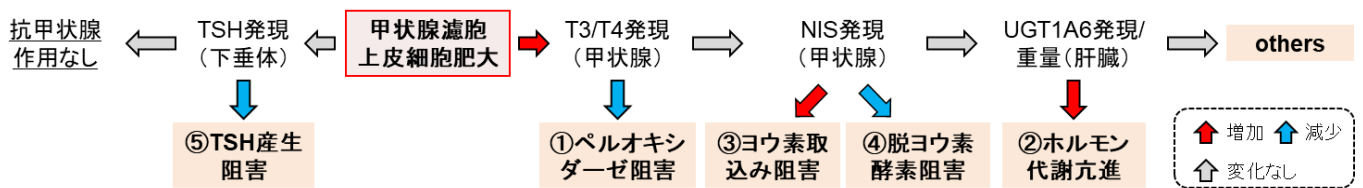


Figure 10. Flowchart for detection and mechanism estimation of antithyroid chemicals.