## 厚生労働行政推進調査事業費補助金(化学物質リスク研究事業) 化学物質による抗甲状腺作用および周産期の甲状腺機能低下に伴う 次世代影響の評価に関する総合研究(24KD2003)

令和6年度分担研究報告書 分担研究課題:化学物質による抗甲状腺作用の評価に関する研究

研究分担者 豊田武士(国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部 部長) 研究分担者 小川久美子(国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部 主任研究官) 研究分担者 石井雄二(国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部 室長) 研究分担者 赤根弘敏(国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部 主任研究官)

### 研究要旨

本研究では、抗甲状腺物質の検出および機序推定に有用なパラメータを特定し、効率的な in vivo 評価法を 確立することを目的とする。令和6年度までの解析結果から、ラット28日間反復経口投与試験を用いた①甲 状腺ペルオキシダーゼ阻害、②ヨウ素取込み阻害、③脱ヨウ素酵素阻害、④甲状腺ホルモン代謝促進の検出 において、甲状腺の病理組織学的解析が、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。甲状腺における NQO1・GPX2 の免疫染色は、これらの病理所見を支持する手法として有用である。ま た、免疫染色による甲状腺T3・T4・NIS および肝 UGT1A6発現の解析ならびに肝重量は、①~④の機序推定 に利用し得る。さらに、下垂体における TSH 免疫染色は、発現亢進のみならず⑤TSH 産生阻害の検出にも利 用可能である。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。本手法は、既存の OECD ガイドライン試験(TG407)において実 施可能であり、抗甲状腺物質の簡便かつ効率的な in vivo 評価法として利用し得る。

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 状腺機能低下に関する *in vitro* 評価系の開発が検討されている。進行中のバリデーションによって、これら複 数の *in vitro* 評価系についてそれぞれ適切な利用範囲および改良すべき課題が明らかになると期待され、継続 的な情報収集が必要と考えられた。

### A. 研究目的

化学物質による妊娠期の甲状腺機能低下は、発達神 経毒性(DNT)等の次世代影響を誘発することが懸念さ れている。2018年に改定されたOECD試験ガイドライン (TG407、408および414)では、甲状腺ホルモン等、関 連指標の検索が必須あるいは推奨項目となった。しか し、血中ホルモン測定は採血/測定時の条件による変動 等の問題があることに加え、抗甲状腺物質を効率的に 検出するための指標はいまだ明らかではなく、次世代 影響の発現機序および適切に評価するためのエンドポ イントも不明である。

我々は、厚生労働科学研究費補助金・化学物質リスク 研究事業(令和3~5年度)において、抗甲状腺物質を ラットに28日間経口投与した際、病理組織学的所見が 最も鋭敏な指標となること、臓器重量および免疫組織 化学的解析によりその機序を推定し得ることを報告し た(Akane et al., J Appl Toxicol, 2024)。

本研究では、先行研究をさらに発展させ、既存ガイド ライン試験を活用した抗甲状腺物質の効率的な検出お よび機序推定を可能とする *in vivo* 試験法の確立を目 的とする。

### B. 研究方法

<u>1. ラットを用いた 28 日間反復経口投与試験(豊田・</u> 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)(雄5匹/群)に対し、以下の6種の機序に基づく計12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ヨウ素取込み阻害: Ammonium perchlorate (APC)お よび Potassium thiocyanate (PTC)
- ③脱ヨウ素酵素阻害: Iopanoic acid (IOP)および Erythrosine
- ④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)

⑤TSH 産生阻害:Bexarotene (BEX)およびLG100268 ⑥TSH 受容体拮抗:VA-K-14 およびLM224

令和6年度は新たに TSH 産生阻害剤である LG100268 および TSH 受容体拮抗剤である LM224 の投与実験を実施した。

また令和5年度までの検討において、③IOP 30、100、 300 mg/kg 投与群では血清 T4・TSH 値増加、甲状腺の病 理組織所見の発現増加および甲状腺 NIS 発現減少が、 ⑤BEX 1、3、10 mg/kg 投与群では血清 T4 低下および下 垂体 TSH 発現低下が、いずれも低用量群から有意に認 められたため、抗甲状腺物質検出におけるこれらのパ ラメータの感度を比較するためにさらに低用量群を追 加設定して投与実験を実施した。⑥VA-K-14は、血清T3・ T4・TSH 測定および病理組織学的検査、免疫組織化学的 解析において有意な変動が認められなかったため、高 用量群を追加設定して投与実験を実施した。VA-K-14の 追加投与実験では、28日間に加えて7日間反復投与翌 日に解剖を行う群を設け、血清ホルモン値変動等の経 時的変化を検討した。その他の物質の投与実験は令和5 年度までに実施済みであり、令和6年度は新たなバイ オマーカー候補の免疫組織化学的解析を実施した。

各物質の投与用量は以下の通りである(下線は令和6 年度に投与実験を実施した用量群。APC, PTC, Erythrosine以外は強制経口投与)。 ①PTU: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg MMI: 0.3, 1, 3, 10 mg/kg ②APC: 1, 10, 100, 1000 ppm (飲水) PTC: 10, 100, 1000, 2000, 5000 ppm (飲水) ③<u>IOP: 3, 10, 30</u>, 100, 300 mg/kg Erythrosine: 0.06, 0.25, 1, 4% (混餌) ④NaPB: 10, 30, 100 mg/kg NCD: 15, 50, 150 mg/kg ⑤<u>BEX: 0.1, 0.3, 1</u>, 3, 10 mg/kg LG100268: 0.016, 0.8, 0.4, 2 mg/kg

<u>⑥VA-K-14</u>: 1, 3, <u>10, 30, 100</u> mg/kg (7日間投与: 10, 30, 100 mg/kg) LM224: 1, 3, 10 mg/kg

各実験において、最終投与翌日に採血および解剖を 実施し、甲状腺・下垂体・肝臓等の重量測定ならびに病 理組織学的解析を実施した。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)・抗酸化酵素であるNAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQ01) および glutathione peroxidase 2 (GPX2)、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(UGT1A6)の免疫組織化学的解析を実施した。 Ki67については甲状腺濾胞上皮における陽性細胞率、 NIS・NQ01・GPX2(甲状腺)、TSH(下垂体)およびUGT1A6 (肝臓)についてはそれぞれ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、②ヨウ 素取込み阻害剤である APC および PTC 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、APC は 1000 ppm、PTC は 5000 ppm の濃度で飲水に溶解し、自由摂取 させた。投与濃度は前項の豊田・赤根らの検討において、 抗甲状腺作用が認められた濃度を設定した。各群7例 のうち3例は病理組織学的解析用とし、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 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、Aglent) 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。

## <u>3. 国際機関および諸外国等における甲状腺機能評価</u> に関する情報収集(小川)

令和6年6月18日および9月30日-10月1日に開 催された OECD Thyroid Disruption Methods Expert Group の Web 会議に参加し、本専門家会議参加団体にお ける甲状腺機能障害評価法の開発動向を調査した。ま た、令和6年11月12日に開催された米国動物実験代 替 法 検 証 省 庁 間 連 絡 委 員 会 ( Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods; ICCVAM) の要請による、甲状腺機 能評価法のバリデーション(Validation Management Team; VMT)に関する専門家作業部会の Web 会議に参加 し、米国環境保護庁 (Environmental Protection Agency;EPA)が提案する 3D Human Thyroid Microtissue Assay のバリデーションの進捗状況について、情報収集 を行った。さらに、欧州毒性学会及び米国毒性学会にお ける甲状腺ホルモン関連毒性に関する研究動向を調査 予定である。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立医薬品食品衛生研究所における動物 実験に係る規定に基づく承認を得た上で、使用する動 物数ならびに動物が受ける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 Figure 1 に示す。 令和 6 年度に実施した IOP、BEX、LG100268、VA-K-14 お よび LM224 を用いた実験において、以下の変動が統計 学的有意差をもって認められた。

IOP:T3 增加;300 mg/kg、T4 増加;3 mg/kg 以上、 TSH 増加;30 mg/kg 以上

BEX:T3低下;3 mg/kg以上、T4低下;0.3 mg/kg以上

LG100268:T3低下;2 mg/kg、T4低下;0.4 mg/kg以上

VA-K-14:7日間投与:T4低下;100 mg/kg、TSH 增加;

100 mg/kg (Table 1-4)。28 日間投与:T4 低下;100 mg/kg (10 mg/kg の変化は用量依存性を欠くことから偶 発的なものと考えられた)

LM224:血清 T3・T4 値の有意な変動は認められなか った

なお、令和3~5年度に実施した投与実験においては、 甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤(PTU・MMI)、ヨウ素取 込み阻害剤(APC・PTC)、肝臓における甲状腺ホルモン 代謝促進剤(NaPB・NCD)は、用量依存的な血清T3・T4 低下およびTSH 増加を引き起こした。脱ヨウ素酵素阻 害剤(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。これらの うち PTU、APC および NaPBの血清T3・T4・TSH 値の測 定結果を Figure 1 に示す。

### 1-2. 臓器重量

IOP、BEX、LG100268、VA-K-14 および LM224 の投与実 験について、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 1 に示す。以下の 変動が統計学的有意差をもって認められた。

IOP:100 mg/kg 以上で甲状腺相対重量、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 (Table 1-1)。

BEX:10 mg/kg で肝絶対/相対重量の増加 (Table 1-2)。

LG100268:2 mg/kg で肝絶対/相対重量の増加(Table 1-3)。

VA-K-14:7日間投与群の100 mg/kgで甲状腺相対重 量、30 mg/kg以上で肝相対重量、100 mg/kg 群で肝絶 対重量の増加(Table 1-4)。28日間投与群の30 mg/kg 以上で甲状腺絶対/相対重量、10 mg/kg以上で肝相対重 量、30 mg/kg以上で肝絶対重量、100 mg/kgで副腎相 対重量の増加(Table 1-5)。

LM224:1 mg/kg で下垂体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 (Table 1-6)。

### 1-3. 病理組織学的解析

IOP、BEX および VA-K-14 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 2 に示 す。

IOP:甲状腺濾胞上皮細胞の肥大/過形成の有意な増 加がそれぞれ3 mg/kg 以上および10 mg/kg 以上でみら れた(Table 2-1)。下垂体前葉では、肥大/空胞化がそ れぞれ100 mg/kg 以上および300 mg/kg で有意に増加 した。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。

BEX: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 0.1 mg/kg 以上に検出された (Table 2-2)。下垂体に病理組織学的変化は認められなかった。

VA-K-14:7日間投与において、甲状腺でコロイド退縮が10 mg/kg以上で散見された(Table 2-3)。また、 甲状腺濾胞上皮細胞の肥大および過形成が100 mg/kg の2例で観察された。下垂体前葉では、肥大が100 mg/kg の1例でみられた。肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が30 mg/kg以上で認められ、100 mg/kgで有意な発生頻度増 加を示した。28 日間投与後には、甲状腺のコロイド退縮の発生頻度が1 mg/kg以上で用量依存的に増加し、100 mg/kgで有意な増加を示した(Table 2-4)。また、甲状腺濾胞上皮細胞の肥大/過形成が1 mg/kg以上で散見され、100 mg/kgで有意な発生頻度増加を示した。下垂体前葉では、肥大/空胞化がそれぞれ10 mg/kg以上でみられ、肥大の有意な発生頻度増加が100 mg/kgで認められた。肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が10 mg/kg 以上で観察され、30 mg/kg以上で有意に増加した。

なお、令和 3~5 年度に投与実験を実施した甲状腺ペ ルオキシダーゼ阻害剤 (PTU・MMI)、甲状腺ホルモン代 謝促進剤 (NaPB・NCD)、ヨウ素取込み阻害剤 (APC・PTC)、 脱ヨウ素酵素阻害剤 (Erythrosine)、肝臓における甲状 腺ホルモン代謝促進剤 (NaPB・NCDI の各物質において は、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。また、NaPB・NCD 投与群では、 肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が血清 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有意な増 加を示した。これらのうち PTU、NaPB、APC の甲状腺お よび肝臓の病理組織学的所見を Table 2-5~2-7 に示 す。

### 1-4. 免疫組織化学的解析:甲状腺 T4·T3

令和6年度は VA-K-14 投与群の T4 および T3、IOP お よび BEX 投与群の T3 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。その結果、IOP・BEX・VA-K-14 (7 および 28 日間)のいずれの投与群も、T4・T3 の 明らかな低下は示さなかった (Figure 2~3, Table 2-1~4)。

なお、令和 3~5 年度に実施した甲状腺における T4 および T3 の検索において、甲状腺ペルオキシダーゼ阻 害剤 (PTU・MMI) およびヨウ素取込み阻害剤 (APC・PTC) では、用量依存的な T4・T3 の有意な低下が認められ、 PTU・MMI では病理組織学的解析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。一方、脱ヨウ素 酵素阻害剤 (Erythrosine) および甲状腺ホルモン代謝 促進剤 (NaPB・NCD) では、いずれの投与群においても、 T4・T3 の明らかな低下は認められなかった。これらの うち PTU、APC および NaPB の検索結果を Figure 2~3, Table 2-5~2-7 に示す。

### 1-5. 免疫組織化学的解析:甲状腺NIS

令和3~5年度に実施した甲状腺を用いたマイクロア レイ解析において、発現量の変動が特に大きい遺伝子 の中から PTU・MMI 投与群で発現増加を、IOP 投与群で 発現低下を示した NIS を選択し、免疫染色を用いた新 規マーカーとしての可能性を検討した。

令和6年度はIOPについて解析を実施した(Figure
 4)。その結果、3 mg/kg以上で、甲状腺におけるNIS陽
 性面積率の有意な低下が認められた。

なお、令和 3~5 年度に実施した甲状腺 NIS 発現解析 では、PTU・MMI・APC・PTC 投与群において有意な増加 が、Erythrosine 投与群では対照的に有意な低下が認め られ、NaPB・NCD・BEX の各投与群では有意な変化は検 出されなかった。これらのうち、Erythrosine・PTU・APC・ NaPB・BEXの検索結果をFigure 4に示す。

1-6. 免疫組織化学的解析:甲状腺 NQ01 および GPX2

甲状腺のマイクロアレイ解析の結果、PTU・MMI・IOP 投与群に共通して発現増加を示した NQO1 および GPX2 を選択し、甲状腺における発現を免疫染色により検索 した。PTU・MMI・APC・PTC・IOP・Erythrosine・NaPB・ NCD・BEX の計 9 物質について解析を実施した(Figure 5~6)。

①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤

NOQ1・GPX2のいずれも、陽性面積率は病理組織学的 解析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の0.3 mg/kg以上および MMIの3 mg/kg以上で有意な増加を示した。

②ヨウ素取込み阻害剤

NQ01 陽性面積率の増加が APC の 100 ppm 以上、PTC の 1000 および 5000 ppm で統計学的有意差をもって検 出された。GPX2 については、PTC の 1000 ppm で有意な 増加がみられたが、APC では各投与群に有意な変動は認 められなかった。

### ③脱ヨウ素酵素阻害剤

IOP 投与群では、30 mg/kg 以上で NQ01 および GPX2 の陽性面積率が有意に増加した。Erythrosine 投与群では 4%で GPX2 の有意な増加がみられた。

④肝臓における甲状腺ホルモン代謝促進剤

NQ01 および GPX2 のいずれも、NaPB・NCD 投与群に有 意な変化は認められなかった。

⑤TSH 産生阻害剤

NQ01 および GPX2 のいずれも、BEX 投与群に有意な変 化は認められなかった。

### 1-7. 免疫組織化学的解析:下垂体 TSH

令和6年度はIOP、BEXおよびVA-K-14の3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 7)。

IOP: 雄 30 mg/kg 以上で TSH 陽性面積率の有意な増 加がみられた。

BEX:雄1 mg/kg以上でTSH陽性面積率の有意な低下 が検出された。

VA-K-14:28 日間投与群の 100 mg/kg で TSH 陽性面積 率が有意に増加した。7 日間投与群においては統計学的 に有意な変化は認められなかった。

なお、令和 3~5 年度に実施した下垂体前葉における TSH 発現解析では、PTU・MMI・APC・PTC ・NCD 投与群で TSH 陽性面積率の有意な増加が認められた。 Erythrosine および NaPB 投与群では、各投与群に有意 な変動は認められなかった。これらのうち、PTU・APC・ NaPB の検索結果を Figure 7 に示す。

### 1-8. 免疫組織化学的解析:甲状腺 Ki67

令和 6 年度は IOP 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。その結果、30 mg/kg 以 上で Ki67 陽性率の有意な増加がみられた (Figure 8)。

なお、令和 3~5 年度に実施した甲状腺における Ki67 発現解析では、PTU・MMI・APC・NaPB・NCD 投与群で Ki67 陽性濾胞上皮細胞の有意な増加が検出された。PTC・ Erythrosine・BEX の各投与群では、有意な変化は認め られなかった。これらのうち、PTU・・APCNaPB・BEX の 検索結果を Figure 8 に示す。

### 1-9. 免疫組織化学的解析: 肝臓 UGT1A6

令和6年度はVA-K-14について、肝臓におけるUGT1A6 の発現を免疫染色により検索した。その結果、7日間投 与群の10 mg/kg以上、28日間投与群の3 mg/kg以上 で UGT1A6 陽性面積率の有意な増加が認められた (Figure 9)。

なお、令和 3~5 年度に実施した解析では、NaPB・NCD 投与群で UGT1A6 陽性面積率の有意な増加が認められ、 病理組織学的解析で認められた肝細胞肥大に一致して いた。その他、PTU・MMI・IOP 投与群で UGT1A6 陽性面 積率の有意な増加が血清ホルモン値変動および甲状腺 における病理組織学的所見がみられた用量よりも高用 量で認められた。これらのうち、NaPB・NCD・PTU・IOP の検索結果を Figure 9 に示す。

### <u>2. ラット甲状腺および下垂体における網羅的遺伝子</u> <u>発現解析</u>

### 2-1. 体重・臓器重量・病理組織学的解析

APC 投与群の体重は対照群と同等であったが、PTC 投 与群では投与期間を通じて体重増加抑制がみられた。 下垂体重量に投与による変化は認められなかった一方、 甲状腺の絶対・相対重量は APC・PTC 投与群でそれぞれ 増加および増加傾向が認められた。

病理組織学的解析では、APC・PTC 投与群の全例で甲 状腺濾胞上皮細胞肥大が認められ、APC 投与群ではさら に甲状腺濾胞上皮の過形成およびコロイド退縮がみら れた。下垂体前葉では、APC・PTC 投与群ともに肥大/空 胞化が認められた(Figure 10)。

### 2-2. マイクロアレイ解析

甲状腺および下垂体における遺伝子発現変化は、対 照群とAPC・PTC 投与群がそれぞれ異なるクラスターと して分類された(Figure 10)。甲状腺では、発現増加し た遺伝子がAPC で860、PTC で111 種認められ、うち86 遺伝子が共通していた。また、発現低下した遺伝子は APC で709、PTC で208 種あり、うち142 遺伝子が共通 していた。下垂体では、発現増加した遺伝子が APC で 18、PTC で17 種認められ、うち3 遺伝子が共通してい た。また、発現低下した遺伝子はAPC で10、PTC で31 種あり、うち6 遺伝子が共通していた。

## <u>3. 国際機関および諸外国等における甲状腺機能評価</u> に関する情報収集

6月に開催された OECD の Thyroid Disruption Method Expert Group の Web 会議には、OECD 事務局に加えてカ ナダ (議長)・EC-JRC・フランス・米国・スウェーデン・ ベルギー・チェコ・デンマーク・ドイツ・オランダ・英 国・スイス・ノルウェー・BIAC・ICAPO から合計 44 名 の参加者があった。

以下の各種 *in vitro* 検討法の進捗について、報告 と質疑が行われた。

- TSH receptor assay アゴニストのみが検討され、全ての化学物質は陰 性を示し、再現性は乏しかった。アンタゴニスト の検出も望まれるが、EU-NETVAL では開発されて いない。より多くの化合物での検討が必要とされ た。
- 2) T-SCREEN and TR assays 陽性化合物は限定的であるが、アゴニスト活性については評価できており再現性も比較的良好であった。アンタゴニスト活性については明確ではなく、より多くの結果が必要と指摘された。
- TPO-AUR assay 追加情報 EU-NETVAL 主導で 2023 年から評価されており、 基準値の変動の問題が示され、さらなる検討が必 要とされた。
- 4) MCT-8 assay 2017 年までに 10 種類の陽性化学物質と 7 種 類の陰性化学物質について結果が公表されてお り、このアッセイがすでに他の研究室に移行され ていることを示している。一方で、細胞内の甲状 腺ホルモンからヨウ素を分泌する過程について 疑問が出された。
- 5) NIS assay レポートは EURL-ECVAM に随時公開される予定で ある。ただし、使用された細胞株の生産が中止と なっており、入手可能な代替細胞株での確認が必 要とされた。
- PEPPER platformの現状 TTR-FITC T4および DI01 アッセイの検証に関す るタイムラインの最新情報が提供された。DI01 については、フェーズ1は3種類の化学物質に ついて進行中であり、フェーズ2は15種類の化 学物質を3回の独立した検討による盲検方式の テストを実施しており、2024年末に完了予定と された。
- 7) DI01,2,3, NIS and TPO assay from Kaly-Cell (開発企業)

5 つのアッセイについて、開発企業である Kaly Cell が提出した情報の要約が発表された。TPO-AUR アッセイについては、酵素の供給元はラット またはヒトのミクロソームのいずれかであるこ とが示された。しかし、全ての国がヒト由来の材 料を受け入れているわけではないことから、ヒト のミクロソームを TG に含めることは推奨されな い。複数の機関がアッセイの検証に協力している。

## Reference chemicals 情報の少ない MIE (Molecular initiating event) に対しては、Toxcast 等の情報源を用いて、陽性 対照として利用し得る化学物質の中から、さらな る検証に資する化学物質を特定して選別する必 要があるとの提案があった。

9-10 月に開催された OECD の Web 会議には、ノルウェ ーからの参加者はなく、6 月のメンバーに加えて韓国・ ルクセンブルグ・ECHA から 50 名の参加者があり、6 月 の Web 会議以降の活動が議論された。

- NIS KalyCell assayの結果 バリデーションに進める前により多くの陽性化 合物について検討する必要があるとされた。
- TPO-AUR KalyCell assay の結果 このテスト設計は、EU-NETVAL で検討中の TPO-AUR アッセイとは異なっている。ヒト甲状腺のミ クロソームを用いる場合、TPO 活性の変動があり、 感染性因子の汚染に留意が必要である。さらなる 検証が必要とされた。
- 3) EU-NETVAL TPO-AUR assay の結果 被験物質が活性(明らかな阻害剤)の場合、実施 あるいは検討全体で良好な再現性が示された。被 験物質が不活性であるか、高濃度でのみ活性であ る場合、実施あるいは検討全体で大きな変動があ り、再現性は低い可能性がある。
- DI0 1, 2, 3 KalyCell assay
   現時点では DI01、2、3 アッセイの評価を行わな
   いことが合意された。
- 5) 今後の評価法候補の検証方法について 新規提案が提出された場合の対応について、取り 決めが必要とされた。
- KakyCell UGT induction assay
   UGT 発現にはヒトとラットの相違がある点は留 意が必要であり、有用性について、さらに検討が 必要とされた。
- Thyroid Receptor assay TR CALUX 様々な議論があり、検証には進めないとの意見が 多く見られた。
- 8) 甲状腺ホルモン(TH)測定法に関する ECHA のレビュー ECHA による拡張型1世代生殖発生試験のレビュー結果から、TH 測定には大きなばらつきがあり、 F2 世代では省略されることが多く、F1 と F2 の 比較が制限され、一般的に意味のあるデータ解釈 が妨げられているとされた。TH が測定されるす べての試験ガイドラインには、実施基準が必要で ある。また、TSH 測定は、特に低 TSH レベルの場 合、感度が不足しているとされた。

11月に開催された Thyroid VMT group の Web 会議に は、Inotiv (オーガナイザー)、NIEHS, FDA, CPSC, EC JRC, EPA,日本 (NIHS), health Canada, NIST から12 名の参加者があった。

EPA から、施設間バリデーションの状況について説明 があった。ラボ間で同様の T4 応答が見られたが、2 つ のラボ (Corteva と Bayer) では、提供された最初の細 胞バッチで結果を再現できなかった。1 つのラボでは 2 番目のバッチで成功したが、もう 1 つのラボではまだ 結果を再現できていなかった。

## D. 考察

1. ラットを用いた 28 日間反復経口投与試験

0ECD ガイドラインおよび化審法に規定されるげっ歯 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 解析を実施し、血清ホルモン値との比較を行った。

令和3~5年度にかけて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の PTU および MMI、②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を阻害する APC お よび PTC、③末梢における T4→T3 変換を担う脱ヨウ素 酵素 (デイオジナーゼ)の阻害剤である IOP および Erythrosine、④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 および NCD、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、⑥培養細胞を用 いた研究において TSH 受容体の拮抗剤として作用し、 濾胞上皮細胞において TSH の作用を遮断することが知 られるものの、これまでに in vivo における研究報告 のない VA-K-14 を用いた、ラット 28 日間反復経口投与 試験を実施してきた。令和 6 年度は新たな被験物質と して、⑤TSH 産生阻害剤 LG100268 および⑥TSH 受容体 拮抗剤LM224の投与実験、また追加の検討として④IOP および(5)BEX の低用量、(6)VA-K-14 の高用量を設定した 投与実験を実施した。

令和6年度の検討の結果、③脱ヨウ素酵素阻害に関 して、IOP投与群において血清T4の増加が最低用量か ら認められ、同用量で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甲状腺でのNIS発現の有意 な低下が観察された。また、甲状腺重量、甲状腺Ki67 発現および下垂体TSH発現の増加も認められた。

⑤TSH 産生阻害に関して、BEX 投与群では用量依存的 な血清 T3・T4 の低下が検出された。病理組織学的検査 では、統計学的有意差はないものの甲状腺のコロイド 退縮が散見された。下垂体では明らかな病理所見は認 められなかった一方、TSH 発現の有意な減少が観察され た。また、LG100268 投与群においては、用量依存的な 血清 T3・T4 の低下がみられたが、甲状腺および下垂体 重量の変動は認められなかった。

⑥TSH 受容体拮抗に関して、VA-K-14の高用量投与で は、7日間投与後に血清 T4減少および TSH 増加、28日 間投与後には血清 T4減少を引き起こした。7日間およ び 28日間ともに甲状腺重量増加を誘発し、28日間投与 後には下垂体 TSH 発現増加を誘導した。また、病理組 織学的所見として、甲状腺濾胞上皮細胞肥大/過形成/ コロイド退縮の発現頻度増加が血清ホルモン値変動と 同用量で認められた。一方、これらの変化よりも低い用 量から、肝重量増加、小葉中心性肝細胞肥大および肝 UGT1A6発現の増加が検出された。また、LM224投与群 では、血清 T3・T4 値および甲状腺・下垂体重量の有意 な変動は認められなかった。

令和5年度までに得られた最も重要な結果として、 ①~④の機序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、血清ホルモン値の 変動がみられた用量と同等もしくは低用量から、統計 学的有意差をもって認められた。令和6年度に実施し た③IOP低用量投与群の解析からも同様の結果が得ら れ、①~④の抗甲状腺物質の検出に際し、甲状腺の病理 組織学的解析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。一方、⑤の機序を有する BEX では濾胞上皮細胞肥大は認められなかったが、コロ イド退縮が誘発され、TSH 産生阻害による影響を反映し た変化である可能性がある。

免疫染色による甲状腺T3・T4の低下が①甲状腺ペル オキシダーゼ阻害剤および②ヨウ素取込み阻害剤によ り誘発された一方で、令和6年度実施分を含めた他の 機序による抗甲状腺物質ではT3・T4低下は認められな かった。したがって、甲状腺におけるT3・T4産生を直 接的に阻害する物質(①・②)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が示された。

免疫染色による甲状腺 NIS の検索では、②ヨウ素取 込み阻害剤による発現増加が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。対照的に③脱ヨウ素酵素阻害 剤では、IOP 低用量群の追加解析結果も含め、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 発現の低下が観察された。以上の結果か ら、NIS 免疫染色は②および③の機序を高感度に鑑別可 能であることが示された。

令和5年度までに実施した網羅的遺伝子発現解析の 結果から、NQ01 および GPX2 が抗甲状腺物質検出のため の新たなバイオマーカー候補として見出された。①甲 状腺ペルオキシダーゼ阻害剤での免疫染色では、NQ01・ GPX2 発現は肥大を呈する甲状腺濾胞上皮細胞に一致し 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。同様に、②ヨウ素取込み阻 害剤・③脱ヨウ素酵素阻害剤でも NQ01 または GPX2 の 発現増加が検出された。これらの変動は血清ホルモン 値変動と同用量で、統計学的有意差をもって認められ た。以上の結果は、甲状腺における NQ01・GPX2 免疫染 色は①~③の機序を有する抗甲状腺物質の検出に利用 可能であることを示している。また、統計学的有意差は ないものの、④ (NaPB・NCD) で血清ホルモン変動・甲 状腺肥大に伴う NQ01・GPX2 発現の増加傾向、⑤ (BEX) で GPX2 発現の減少傾向がみられたことから、病理組織 学的解析の支持に加えて TSH 産生抑制の予測への利用 可能性も示唆された。

甲状腺重量、免疫染色による下垂体前葉 TSH 発現お よび甲状腺 Ki67 発現の増加が、①・②・④の各物質に 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。一方で③脱ヨウ素酵素阻害剤(IOP)では、 低用量群の追加実験の結果、甲状腺重量・下垂体 TSH 発 現・甲状腺 Ki67 発現の増加と比較し、血清 T4 値の増 加がより低い用量から検出された。以上の結果から、こ れらの解析は①・②・④の機序による抗甲状腺物質の検 出に有用と考えられた。また⑤TSH 産生阻害剤(BEX) は、下垂体 TSH 発現低下を誘発したものの、血清 T4 値 の有意な減少はより低用量から認められ、両者の併用 が機序の推定に有用である可能性が示唆された。現在 LG100268 の病理組織学的・免疫組織化学的解析を実施 中であり、それらの結果と併せて、⑤の機序による抗甲 状腺作用の最適な検出法を探索する予定である。

げっ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。令和5年度まで の解析においても、④ (NaPB・NCD) 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、血清ホルモ ン値の変動がより鋭敏であった①・③の各物質とは対 照的であった。以上の結果から、肝臓の重量測定・病理 検査と UGT1A6 免疫染色は、④甲状腺ホルモン代謝促進 剤の検出に有用であると考えられた。令和 6 年度に投 与実験を実施した VA-K-14 は、培養細胞を用いた実験 において TSH 受容体拮抗剤として作用し、濾胞上皮細 胞における TSH の作用を遮断することが想定される一 方、これまでに in vivo での実証実験は報告されてい なかった。 今回のラットを用いた VA-K-14 の 28 日間反 復投与の結果、血清 T4 減少・TSH 増加がみられたもの の、肝肥大および UGT1A6 発現の増加がより低用量から 認められた。これらの結果は、VA-K-14による抗甲状腺 作用には、甲状腺ホルモン代謝亢進の機序が関与して いることを示唆している。今後、LM224 投与群の病理組 織学的・免疫組織化学的解析を行い、TSH 受容体拮抗に よる抗甲状腺作用の検出手法について検討する予定で ある。

### 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

令和5年までに実施した①甲状腺ペルオキシダーゼ 阻害剤(PTU・MMI)、③脱ヨウ素酵素阻害剤(IOP)、④ 甲状腺ホルモン代謝促進物質(NaPB・NCD)および⑤TSH 産生阻害剤(BEX)に引き続き、令和6年度は②ヨウ素 取込み阻害(APC・PTC)投与ラットの甲状腺・下垂体を 用いたマイクロアレイ解析を実施した。

APC・PTC 投与群のいずれも、甲状腺絶対・相対重量 の増加傾向を示した一方、下垂体重量に変化はみられ なかった。また、これらの臓器で認められた病理組織学 的変化は令和5年までに実施した豊田・赤根らの検討 と一致しており、試験の再現性が確認された。

マイクロアレイ解析の結果、甲状腺と下垂体の遺伝 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。甲状腺では PTC 投与群に比べ、APC 投与群で多くの 遺伝子に発現変動がみられた。一方、共通して発現増加 /低下した遺伝子も多く認められていることから、両群 の遺伝子数の差は抗甲状腺作用の程度を反映したもの と考えられた。下垂体では APC・PTC いずれの投与群に おいて遺伝子発現の変動はわずかであった。見出され た候補遺伝子の詳細なデータを豊田・赤根らに提供し、 新たなバイオマーカーとしての活用とともに抗甲状腺 作用機序特定への応用を目指す。

### <u>3. 国際機関および諸外国等における甲状腺機能評価</u> に関する情報収集

0ECD の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 in vitro評価系を組み合わせて評価する方法の確立で ある。現時点では、ほとんどの系で追加検討が必要とさ れている。また、細胞の供給停止により、代替の細胞を 用いた系の同等性を再検討する必要性が発生するなど、 細胞の継続的な供給に関する問題がみられた。

EPA のヒト甲状腺細胞を用いた評価系についても、 EPA が主導する施設間バリデーションが進行中である が、再現性に問題のある例が認められており、進捗をフ ォローする必要があると考えられた。

### E. 結論

令和6年度までの解析結果から、ラット28日間反復 経口投与試験を用いた①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害、 ②ヨウ素取込み阻害、③脱ヨウ素酵素阻害、④甲状腺ホ ルモン代謝促進の検出において、甲状腺の病理組織学 的解析が、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。甲状腺における NQO1・GPX2 の 免疫染色は、これらの病理所見を支持する手法として 有用である。また、免疫染色による甲状腺 T3・T4・NIS および肝 UGT1A6 発現の解析ならびに肝重量は、①~④ の機序推定に利用し得る。さらに、下垂体における TSH 免疫染色は、発現亢進のみならず⑤TSH 産生阻害の検出 にも利用可能である。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 11)。本手法は、既存の OECD ガイドライン試験 (TG407) において実施可能であり、抗甲状腺物質の簡便かつ効 率的な in vivo評価法として利用し得る。

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 低下に関する *in vitro*評価系の開発が検討されてい る。進行中のバリデーションによって、これら複数の *in vitro*評価系についてそれぞれ適切な利用範囲および 改良すべき課題が明らかになると期待され、継続的な 情報収集が必要と考えられた。一方、OECDではDNTに 対する甲状腺ホルモンの影響を評価できるヒト細胞モ デルがないことから、今後、ヒト iPS 細胞の分化など の活用が期待される。

### F. 研究発表

## 1. 論文発表

- [1] Uneyama M, <u>Toyoda T</u>, Doi Y, Matsushita K, <u>Akane H</u>, Morikawa T, <u>Ogawa K</u>. A 13-week subchronic toxicity study of linalool oxide in Cr1:CD(SD) rats. J Toxicol Pathol. 2024; 37(4): 151-61.
- [2] Matsushita K, <u>Toyoda T</u>, <u>Akane H</u>, Morikawa T, <u>Ogawa K</u>. 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(3): 455-69.
- [3] Matsushita K, <u>Toyoda T</u>, <u>Akane H</u>, Morikawa T, <u>Ogawa K</u>. CD44 expression in renal tubular epithelial cells in the kidneys of rats with cyclosporine-induced chronic kidney disease. J Toxicol Pathol. 2024; 37(2): 55-67.

- [4] Nishikawa A, Nagano K, Kojima H, Fukushima S, <u>Ogawa K</u>. Pathogenesis of chemically induced nasal cavity tumors in rodents: contribution to adverse outcome pathway. J Toxicol Pathol. 2024; 37: 11-27.
- [5] Takimoto N, <u>Ishii Y</u>, Mitsumoto T, Takasu S, Namiki M, <u>Toyoda T</u>, Shibutani M, <u>Ogawa K</u>. Involvement of nuclear atrophy of binucleated hepatocytes in the large micronucleus formation induced by rat hepatocarcinogen acetamide. Toxicol Appl Pharm. 2025; 496: 117243.
- [6] Nakamura K, <u>Ishii Y</u>, Takasu S, Namiki M, Soma M, Takimoto N, Matsushita K, Shibutani M, <u>Ogawa K</u>. Chromosome aberrations cause tumorigenesis through chromosomal rearrangements in the hepatocarcinogenesis rat model. Cancer Sci. 2024; 115: 3612-21.
- [7] Hibi D, Soma M, Suzuki Y, Takasu S, <u>Ishii Y</u>, Umemura T. Appearance of SOX9- and GST-Ppositive hepatocytes as possible carcinogenic events in the early stage of furan-induced hepatocarcinogenesis. J Appl Toxicol. 2024; 44: 1976-85.
- [8] Kuroda K, <u>Ishii Y</u>, Takasu S, Kijima A, Matsushita K, Masumura K, Nohmi T, Umemura T. Possible contribution of 8hydroxydeoxyguanosine to gene mutations in the kidney DNA of gpt delta rats following potassium bromate treatment. Mutat Res. 2024; 894: 503729.
- [9] Takimoto N, <u>Ishii Y</u>, Mitsumoto T, Takasu S, Namiki M, Shibutani M, <u>Ogawa K</u>. Formation of hepatocyte cytoplasmic inclusions and their contribution to methylcarbamate-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats. Toxicol Sci. 2024; 198: 40-9.
- [10] <u>Akane H, Toyoda T</u>, Matsushita K, Uneyama M, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, <u>Ogawa</u> <u>K</u>. Comparisons of the sensitivity of histopathological and immunohistochemical analyses with blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with promoters of thyroid hormone metabolism. Toxicol Pathol. 2025; 53: 251-66.
- [11] Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa Κ. 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. 2024; 44: 1084-103.
- [12] 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, <u>Akane H</u>, <u>Toyoda T</u>, <u>Ogawa K</u>, 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 druginduced interstitial lung diseases. Respir Res. 2024; 25: 31.

## 2. 学会発表

- 1) <u>Toyoda T</u>, Matsushita K, <u>Akane H</u>, Uneyama M, Morikawa T, <u>Ogawa K</u>. Short-term evaluation of mucosal toxicity and carcinogenicity of aromatic amines in the rat urinary bladder by histopathology and  $\gamma$ -H2AX immunostaining. 64th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2025.3)
- <u>豊田武士、赤根弘敏、小川久美子</u>,γ-H2AX 免疫染 色を指標としたラット腎発がん物質の早期検出.第 83回日本癌学会学術総会(2024年9月)
- 3) 豊田武士、赤根弘敏、高須伸二、石井雄二、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. ラット 28 日間反復投与毒性試験における病理組織学的/免疫組織化学的解析による抗甲状腺物質の早期検出および機序推定.第51回日本毒性学会学術年会(2024年7月)
- 松下幸平、<u>豊田武士</u>、赤木純一、水田保子、小川久 <u>美子</u>. コリスチン腎毒性のメカニズム解明.第41回 日本毒性病理学会総会及び学術集会(2025年1月)
- 5) 畝山瑞穂、豊田武士、赤木純一、赤根弘敏、森川朋 美、小川久美子.発がん機序に基づく免疫染色を用い たラット肝発がん物質の早期検出法の検討.第41回 日本毒性病理学会総会及び学術集会(2025年1月)
- 6) 久下恒明、杜婉瑩、豊田武士、大本安一、安川佳美、 大津洋、吉田寛、竹島秀幸、牛島俊和、野村幸世. 胃 癌切除後も門脈血流を介した IL-6 の刺激により肝 で TFF3 が高発現するメカニズム. 第83回日本癌学 会学術総会(2024年9月)
- 7) 松下幸平、<u>豊田武士、赤根弘敏</u>、赤木純一、森川朋 美、水田保子、小川久美子.シスプラチン誘発ラット AKI to CKD モデルにおける CD44 の発現動態及び上 皮間葉転換との関連.第167 回日本獣医学会学術集 会(2024年9月)
- 8) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、赤木純一、森川朋美、水田保子、小川久美子.アロプリノール誘発ラット AKI to CKD モデルにおける CD44 の発現. 第51 回日本毒性学会学術年会(2024 年 7 月)
- 9) 畝山瑞穂、豊田武士、赤木純一、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子.γ-H2AXと幹細胞マーカーの免疫染色を用いたラット肝発がん物質早期検出法の検討. 第 51 回日本毒性学会学術年会(2024 年 7 月)
- 10) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、水田保 子、小川久美子. アロプリノール誘発ラット AKI to CKD モデルにおける CD44 の発現. 第 67 回日本腎臓学 会学術総会(2024 年 6 月)
- 11) 森川朋美、豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、畝山瑞 穂、小川久美子. ラットを用いた L-ラムノースの 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 30 回総会・学術大会(2024 年 6 月)

- 12) Ogawa K, Akane H, Takasu S, Gi M, Fujioka M, <u>Ishii Y</u>, Uneyama M, Morikawa T, Wanibuchi H, Tsuda H, <u>Toyoda T</u>. Comparison of the intratracheal intrapulmonary spraying (TIPS) and the systemic inhalation methods in rats for the classification of hazardous chemicals based on the GHS acute inhalation toxicity. 64th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2025.3)
- 13) <u>Ishii Y</u>, Nakamura K, Yamagami Y, Takasu S, Nohmi T, <u>Toyoda T</u>, Shibutani M, <u>Ogawa K</u>. Investigations of the mechanism underlying acetamide-induced hepatocarcinogenesis in rat. 64th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2025.3)
- 14) <u>石井雄二</u>、相馬明玲、山上洋平、笠松建吾、高須伸 二、<u>豊田武士、小川久美子</u>.低分子アミド化合物によ るラット肝細胞質内封入体形成の検討.第41回日本 毒性病理学会総会及び学術集会(2025年1月)
- 15) <u>石井雄二</u>. 化学発がんにおけるクロモスリプシスの関与.日本環境変異原ゲノム学会第53回大会(2024年12月)
- 16) <u>石井雄二</u>.安全性研究への質量分析イメージングの応用.第51回日本毒性学会学術年会(2024年7月)
- 17) Yamagami Y, <u>Ishii Y</u>, Nakamura K, Takasu S, <u>Toyoda T</u>, Murakami T, Shibutani M, <u>Ogawa K</u>. Investigation of the involvement of chromothripsis in the acetamide-induced hepatocarcinogenesis in rats. 64th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2025.3)
- 18)山上洋平、石井雄二、高須伸二、相馬明玲、笠松建 吾、豊田武士、村上智亮、小川久美子.アセトアミド 誘発の大型小核による chromothripsis の発生機構. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2025年 1月)
- 19) 高須伸二、<u>石井雄二</u>、相馬明玲、笠松建吾、山上洋 平、<u>豊田武士、小川久美子</u>. gpt delta ラットを用い た 6-methoxyquinoline の in vivo 変異原性の評価. 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会(2024 年 12 月)
- 20) 山上洋平、<u>石井雄二</u>、笠松建吾、高須伸二、相馬明 玲、<u>豊田武士</u>、村上智亮、<u>小川久美子</u>. ラット初代肝 細胞を用いた acetamide が誘発する大型小核の形成 機序に関する研究. 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会(2024 年 12 月)
- 21) 増村健一、安東朋子、堀端克良、石井雄二、杉山圭 一.アクリルアミドが誘発する生殖系列突然変異の 解析.日本環境変異原ゲノム学会第53回大会(2024 年12月)
- 22)山上洋平、<u>石井雄二</u>、鈴木孝昌、中村賢志、原島洋 文、笠松建吾、高須伸二、相馬明玲、杉山圭一、村上 智亮、<u>小川久美子</u>.アセトアミドのラット肝発がん過 程における染色体再構成の関与の検討.第51回日本 毒性学会学術年会(2024年7月)
- 23) 相馬明玲、<u>石井雄二</u>、山上洋平、笠松建吾、高須伸 二、<u>小川久美子</u>.アセトアミドのラット肝細胞質内封 入体形成に関わる化学構造の特徴.日本食品化学学

会第30回総会・学術大会(2024年5月)

- 24) <u>Akane H, Toyoda T</u>, Uneyama M, Morikawa T, Kosaka T, Aoyama H, <u>Ogawa K</u>. Effective method for early detection and mechanism estimation of antithyroid chemicals by histopathological and immunohistochemical analyses in rats. 64th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2025.3)
- 25) <u>赤根弘敏</u>、高須伸二、魏民、藤岡正喜、<u>豊田武士</u>、 <u>石井雄二</u>、畝山瑞穂、森川朋美、津田洋幸、<u>小川久美</u> <u>子</u>.吸入による毒劇物の判定における経気管肺内噴 霧投与(TIPS)法の有用性の検討.第41回日本毒性 病理学会総会及び学術集会(2025年1月)
- 26) <u>赤根弘敏</u>、高須伸二、<u>石井雄二、小川久美子、豊田</u> <u>武士</u>.病理組織学的及び免疫組織化学的解析を用い た抗甲状腺物質の早期検出.第83回日本癌学会学術 総会(2024年9月)
- 27) 赤根弘敏、高須伸二、魏民、藤岡正喜、豊田武士、 <u>石井雄二</u>、 畝山瑞穂、森川朋美、津田洋幸、小川久 <u>美子</u>. ラットを用いた化学物質の吸入による毒劇物 の判定における経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 法と全身 吸入暴露法の比較. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月)
- 28) Akagi J, Mizuta Y, Uneyama M, <u>Akane H</u>, Matsushita K, <u>Toyoda T</u>, <u>Ogawa K</u>. Study of the biological effects of titanium dioxide with three different crystallite sizes following repeated oral administration in F344 rats. 64th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2025.3)
- 29)赤木純一、水田保子、畝山瑞穂、赤根弘敏、松下幸平、豊田武士、小川久美子. ラットへの経口摂取によりパイエル板に取り込まれた二酸化チタンナノ粒子の毒性影響の検討.日本薬学会第145年会(2025年3月)
- 30) 吉田彩夏、橋本由弥、<u>赤根弘敏、豊田武士、小川久美子</u>、齋藤嘉朗、花尻(木倉)瑠理、荒川憲昭. オレイン酸誘発急性肺損傷ラットモデルにおけるストラテフィン発現とプロテオームの変動. 日本薬学会第145年会(2025年3月)
- 31)高須伸二、赤根弘敏、石井雄二、豊田武士、津田洋 幸、小川久美子.経気管肺内噴霧投与(TIPS)法によ る急性毒性試験における投与液量および投与濃度の 影響.第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2025年1月)
- 32) 赤木純一、水田保子、畝山瑞穂、<u>赤根弘敏</u>、松下幸 平、<u>豊田武士</u>、<u>小川久美子</u>. F344 ラットへの反復経 口投与によりパイエル板に沈着した二酸化チタン粒 子による生体影響の検討. 第 41 回日本毒性病理学会 総会及び学術集会(2025 年 1 月)
- 33)赤木純一、水田保子、畝山瑞穂、赤根弘敏、松下幸 平、豊田武士、小川久美子.ラットを用いた二酸化チ タンナノ粒子の反復経口曝露による生体影響の検討. 第47回日本分子生物年会(2024年11月)
- 34) 吉田彩夏、橋本由弥、<u>赤根弘敏</u>、<u>豊田武士、小川久</u> <u>美子</u>、齋藤嘉朗、花尻(木倉)瑠理、荒川憲昭. 急性肺

損傷ラットモデルによる新規びまん性肺胞傷害マー カーSFNの発現機序解析. 第 10 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年大 会(2024年9月)

- 35) 赤木純一、水田保子、畝山瑞穂、<u>赤根弘敏</u>、松下幸 平、<u>豊田武士、小川久美子</u>.さまざまな結晶子径の二 酸化チタン粒子のラットへの90日間反復経口投与に よる生体影響と蓄積性の検討.第37回発癌病理研究 会(2024年8月)
- 36) 吉田彩夏、橋本由弥、<u>赤根弘敏、豊田武士、小川久</u> <u>美子</u>、齋藤嘉朗、花尻(木倉)瑠理、荒川憲昭、急性肺 傷害ラットモデルを用いた新規間質性肺炎バイオマ ーカーの発現機序解析.日本プロテオーム学会 2024

年大会(2024年6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. Organ weight data for male SD rats treated with IOP for 28 days

Dose (mg/kg)			0	3		1	0		30		0		30	1	100	3	800
No. of animals	s examined		5	5		5			5		5		5		5		5
Males																	
Body weig	sht (g)	385	± 16	386 ±	27	384 ±	: 29	371	± 25	418	± 26	397	± 34	394	± 15	406	± 34
Thyroids	(mg)	21.4	± 3.0	20.7 ±	2.0	22.4 ±	2.7	24.1	± 2.9	20.8	± 2.2	24.0	± 4.1	25.9	± 4.3	28.2	± 3.7*
	(mg%)	5.6	± 0.9	5.4 ±	0.4	5.9 ±	0.9	6.5	± 0.7	5.0	± 0.4	6.1	± 0.8	6.6	± 1.3*	7.0	± 1.0*
Pituitary	(mg)	13.4	± 0.6	15.1 ±	1.5	15.0 ±	1.8	14.2	± 1.1	12.6	± 1.0	13.7	± 0.6	13.7	± 0.5	14.3	± 2.1
	(mg%)	3.5	± 0.1	3.9 ±	0.2	3.9 ±	0.6	3.8	± 0.3	3.0	± 0.3	3.5	± 0.3	3.5	± 0.1	3.5	± 0.4*
Adrenals	(mg)	49.6	± 8.2	49.0 ±	5.7	51.8 ±	6.1	48.9	± 2.7	51.8	± 7.9	51.3	± 4.1	44.4	± 10.3	47.7	± 5.8
	(mg%)	12.9	± 1.7	12.7 ±	1.6	13.5 ±	1.8	13.2	± 1.2	12.4	± 1.9	12.9	± 0.7	11.3	± 2.9	11.8	± 1.7
Liver	(g)	11.07	± 0.94	11.88 ±	1.63	11.39 ±	1.22	11.24	± 0.54	12.73	± 0.64	11.76	± 1.10	12.37	± 1.13	14.54	± 1.52
	(g%)	2.87	± 0.16	3.07 ±	0.22	2.96 ±	0.11	3.04	± 0.12	3.05	± 0.11	2.96	± 0.13	3.14	± 0.22	3.58	± 0.14**

Each value represents the mean  $\pm$  SD.

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

Table 1-2. Organ weight data for male SD rats treated with BEX for 28 days

Dose (mg/kg)			0			0.1			0.3	3			1				0			1			3			1	0	
No. of animals	examined		5			5			5			:	5				5			5			5			5	;	
Males																												
Body weig	ht (g)	385	±	16	393	±	17	387	±	22	39	3 :	±	28		418	±	26	416	±	28	452	±	40	435	±	: 2	29
Thyroids	(mg)	21.4	±	3.0	23.1	±	6.6	23.2	±	3.4	21.	) :	±	3.0		20.8	±	2.2	22.8	±	3.9	20.9	±	3.2	18.1	. ±	: 2	2.7
	(mg%)	5.6	±	0.9	5.9	±	1.8	6.0	±	0.7	5.	5 :	±	0.5		5.0	±	0.4	5.5	±	1.2	4.7	±	0.9	4.2	. ±	: 0	0.6
Pituitary	(mg)	13.4	±	0.6	14.2	±	0.6	14.3	±	2.1	13.	5 :	±	2.0		12.6	±	1.0	14.0	±	0.7	13.5	±	1.5	12.6	i ±	: 1	l.1
	(mg%)	3.5	±	0.1	3.6	±	0.2	3.7	±	0.4	3.	4 :	±	0.5		3.0	±	0.3	3.4	±	0.3	3.0	±	0.6	2.9	) ±	: C	).3
Adrenals	(mg)	49.6	±	8.2	54.8	±	2.0	53.6	±	10.2	61.	) :	±	7.8		51.8	±	7.9	54.6	±	12.6	60.4	±	13.1	62.6	i ±	: 3	3.5
	(mg%)	12.9	±	1.7	14.0	±	0.6	13.9	±	3.1	15.	5 :	±	2.0		12.4	±	1.9	13.2	±	2.9	13.3	±	1.8	14.4	±	: 1	L.3
Liver	(g)	11.07	±	0.94	11.71	±	0.84	11.24	±	0.69	11.8	5 :	±	1.35	1	L2.73	±	0.64	12.20	±	1.22	14.98	±	3.04	16.67	' ±	: 2	2.15*
	(g%)	2.87	±	0.16	2.98	±	0.11	2.90	±	0.15	3.0	1 :	±	0.22		3.05	±	0.11	2.93	±	0.17	3.29	±	0.42	3.82	±	: 0	0.29**

Each value represents the mean  $\pm$  SD.

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

Dose (mg/kg)			0		C	0.01	6		0.0	8		0.4	Ļ		2	
No. of animals	examined		5			5			5			5			5	
Males																
Body weig	ht (g)	385	±	38	395	±	28	388	±	26	381	±	29	415	±	21
Thyroids	(mg)	21.9	±	2.4	21.0	±	1.7	19.6	±	2.5	21.4	±	3.0	23.2	±	2.6
	(mg%)	5.7	±	0.4	5.4	±	0.6	5.0	±	0.6	5.6	±	0.8	5.6	±	0.5
Pituitary	(mg)	13.2	±	1.1	14.5	±	1.1	14.0	±	1.8	13.5	±	2.0	15.0	±	1.5
	(mg%)	3.4	±	0.2	3.7	±	0.3	3.6	±	0.3	3.6	±	0.6	3.6	±	0.3
Adrenals	(mg)	55.9	±	11.3	51.0	±	5.5	52.1	±	7.6	52.8	±	7.5	61.5	±	6.0
	(mg%)	14.6	±	2.8	13.0	±	1.9	13.4	±	1.9	13.9	±	1.6	14.8	±	1.1
Liver	(g)	11.14	±	1.81	11.02	±	0.99	10.99	±	0.76	10.57	±	0.95	13.57	±	1.10*
	(g%)	2.88	±	0.23	2.79	±	0.10	2.83	±	0.16	2.78	±	0.15	3.27	±	0.13**

Table 1-3. Organ weight data for male SD rats treated with LG100268 for 28 days

Each value represents the mean ± SD.

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

Table 1-4. Organ weight data for male SD rats treated with VA-K-14 for 7 days

Dose (mg/kg)			0			10			30		:	100	)
No. of animal	s examined		5			5			5			5	
Males													
Body weig	ht (g)	255	±	6	251	±	10	244	±	6	239	±	13
Thyroid	(mg)	17.0	±	1.5	18.3	±	3.3	18.0	±	3.4	21.1	±	3.1
	(mg%)	6.7	±	0.5	7.3	±	1.2	7.4	±	1.4	8.9	±	1.5*
Pituitary	(mg)	12.0	±	1.3	12.0	±	0.9	11.8	±	0.4	11.5	±	0.9
	(mg%)	4.7	±	0.6	4.8	±	0.4	4.8	±	0.1	4.8	±	0.4
Adrenals	(mg)	44.5	±	6.9	43.3	±	2.0	46.9	±	7.1	46.6	±	3.2
	(mg%)	17.5	±	2.6	17.3	±	1.4	19.2	±	2.8	19.4	±	1.2
Liver	(g)	8.02	±	0.53	8.43	±	0.62	8.89	±	0.72	11.59	±	0.79**
	(g%)	3.15	±	0.20	3.36	±	0.21	3.65	±	0.28**	4.85	±	0.11**

Each value represents the mean ± SD.

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

## Table 1-5. Organ weight data for male SD rats treated with VA-K-14 for 28 days

Dose (mg/kg)			0	1	3	10	0	10	30	100
No. of animal	s examined		5	5	5	5	5	5	5	5
Males										
Body weig	ht (g)	391	± 30	372 ± 13	360 ± 25	378 ± 18	404 ± 26	405 ± 32	404 ± 35	366 ± 14
Thyroids	(mg)	20.1	± 2.9	19.7 ± 2.1	20.0 ± 2.2	20.3 ± 2.3	21.4 ± 2.7	22.9 ± 1.7	31.8 ± 5.0**	29.6 ± 3.8**
	(mg%)	5.1	± 0.4	5.3 ± 0.6	5.6 ± 0.5	5.4 ± 0.7	5.3 ± 0.6	5.7 ± 0.4	7.9 ± 1.2**	8.1 ± 0.9**
Pituitary	(mg)	13.2	± 1.2	13.2 ± 0.4	13.5 ± 2.3	13.9 ± 1.0	13.7 ± 0.9	15.4 ± 1.0	14.1 ± 1.5	13.8 ± 1.7
	(mg%)	3.4	± 0.2	3.5 ± 0.2	3.8 ± 0.6	3.7 ± 0.4	3.4 ± 0.2	3.8 ± 0.3	3.5 ± 0.2	3.8 ± 0.4
Adrenals	(mg)	51.4	± 6.7	53.9 ± 5.2	51.2 ± 11.5	58.0 ± 11.9	57.3 ± 7.7	56.4 ± 5.8	54.2 ± 7.3	66.9 ± 4.8
	(mg%)	13.2	± 1.6	14.5 ± 1.9	14.3 ± 3.2	15.4 ± 3.6	14.2 ± 1.5	13.9 ± 1.0	13.4 ± 1.4	18.3 ± 1.2**
Liver	(g)	11.06	± 1.53	10.44 ± 0.52	9.95 ± 1.19	11.93 ± 1.18	11.01 ± 0.86	13.06 ± 1.54	15.40 ± 2.37**	18.61 ± 1.14**
	(g%)	2.82	± 0.25	2.80 ± 0.08	2.76 ± 0.16	3.15 ± 0.20**	2.72 ± 0.10	3.22 ± 0.18**	3.79 ± 0.27**	5.09 ± 0.15**

Each value represents the mean ± SD.

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

			0			1			2			10	
Dose (mg/kg)			0			1			5			10	
No. of animals	examined		5			5			5			5	
Males													
Body weigl	ht (g)	385	±	38	364	±	13	376	±	31	366	±	31
Thyroids	(mg)	21.9	±	2.4	23.8	±	3.5	20.6	±	2.7	20.7	±	2.9
	(mg%)	5.7	±	0.4	6.5	±	0.8	5.5	±	0.4	5.6	±	0.6
Pituitary	(mg)	13.2	±	1.1	14.5	±	1.2	14.4	±	1.0	13.5	±	1.9
	(mg%)	3.4	±	0.2	4.0	±	0.2*	3.9	±	0.4	3.7	±	0.4
Adrenals	(mg)	55.9	±	11.3	49.9	±	5.9	49.5	±	5.3	48.3	±	5.8
	(mg%)	14.6	±	2.8	13.7	±	1.8	13.2	±	0.8	13.2	±	1.1
Liver	(g)	11.14	±	1.81	10.15	±	0.59	10.88	±	1.41	9.95	±	1.67
	(g%)	2.88	±	0.23	2.79	±	0.09	2.89	±	0.16	2.70	±	0.23

## Table 1-6. Organ weight data for male SD rats treated with LM224 for 28 days

Each value represents the mean  $\pm$  SD.

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

Table 2-1. Histopathological findings in male SD rats treated with IOP for 28 days

	0		Dose (mg/kg)	0	3	10	30	0	30	100	300
Sex	Organs a	na finaings	No. of animals examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Males	Thyroid	Hypertrophy,	follicular cell (±, +)	0	4(4, 0)*	5(4, 1)**	5(4, 1)**	0	5(4, 1)**	5(2, 3)**	5(1, 4)**
		Hyperplasia,	follicular cell (±, +)	0	3(3, 0)	5(4, 1)**	5(5 <i>,</i> 0)**	0	4(4, 0)*	4(4, 0)*	5(4, 1)**
		Colloid deple	etion (±)	0	2	1	0	0	0	0	1
		Colloid altera	ation (±, +)		4(4, 0)*	4(3, 1)*	5(5 <i>,</i> 0)**	0	5(4, 1, 0)**	5(2, 2, 1)**	5(1, 2, 2)**
		Decrease in	T4 level <sup>a)</sup>	-	-	-	-	0	0	0	0
		Decrease in	T3 level <sup>b)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolation,	pars distalis (±, +)	0	1(1, 0)	0	2(2, 0)	1(1, 0)	3(3, 0)	4(4, 0)	5(2, 3)*
		Hypertrophy,	pars distalis (±, +)	0	1(1, 0)	0	3(3, 0)	1(1, 0)	4(4, 0)	5(4, 1)*	5(2, 3)*
	Adrenal	nypertrophy		0	0	0	0	0	0	0	0
	Liver	Hypertrophy, centrilobula	hepatocyte, r (±)	0	0	0	0	0	0	1	5**

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

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

<sup>b)</sup>: Immunohistochemistry for T3

-: not examined

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

Table 2-2. Histopathological findings in male SD rats treated with BEX for 28 days

<b>C</b>	0	مرما الأنبر والنبر مرم	Dose (mg/kg)	0	0.1	0.3	1	0	1	3	10
Sex	Organs a	ina finaings	No. of animals examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Males	Thyroid	Hypertroph	ıy, follicular cell	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hyperplasi	a, follicular cell	0	0	0	0	0	0	0	0
		Colloid dep	olloid depletion (±) ecrease in T4 level <sup>a)</sup>	0	1	1	1	0	0	1	3
		Decrease in	n T4 level <sup>a)</sup>	-	-	-	-	0	0	0	0
		Decrease i	crease in T4 level <sup>a)</sup> crease in T3 level <sup>b)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolatio	n, pars distalis	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pituitary Vacuolation, Hypertrophy	ıy, pars distalis	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Adrenal		chiophy, purs distants	0	0	0	0	0	0	0	0
	Liver	Glycogen a	ccumulation (±, +)	0	0	0	0	0	0	2(2, 0)	3(1, 2)

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

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

<sup>b)</sup>: Immunohistochemistry for T3

-: not examined

No significant difference was detected from the control group.

## Table 2-3. Histopathological findings in male SD rats treated with VA-K-14 for 7 days

		1.6. 1.	Dose (mg/kg)	0	10	30	100
Sex	Organs a	nd findings	No. of animals examined	5	5	5	5
Males	Thyroid	Hypertrop	ny, follicular cell (±)	0	0	0	2
		Hyperplas	ia, follicular cell (±)	0	0	0	2
		Colloid de	pletion (±)	0	1	3	1
		Colloid alt	eration	0	0	0	0
		Decrease	in T4 level <sup>a)</sup>	0	0	0	0
		Decrease	in T3 level <sup>b)</sup>	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolatio	on, pars distalis (±)	0	0	0	0
		Hypertrop	ny, pars distalis (±)	0	0	0	1
	Adrenal	Vacuolatic	on, cortical, increased (±)	0	0	0	2
	Liver	Hypertrop centrilobu	ny, hepatocyte, ılar (±, +,++, +++)	0	0	2(2,0,0,0)	5(0,2,3,0)**

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

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

<sup>b)</sup>: Immunohistochemistry for T3

No significant difference was detected from the control group.

Table 2-4.	Histopathol	logical finding	s in male Sl	D rats treated	with VA-K	-14 for 28 days
	· · · · · · · · ·					

For	Organs a	ad findings	Dose (mg/kg)	0	1	3	10	0	10	30	100
JEX	Organs al		No. of animals examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Males	Thyroid	Hypertrop	hy, follicular cell (±, +)	0	1(1, 0)	0	1(1, 0)	0	0	3(3, 0)	5(0, 5)**
		Hyperplasi	ia, follicular cell (±)	0	0	0	1	0	0	3	4*
		Colloid de	pletion (±)	0	1	2	3	0	3	3	5*
		Colloid de	pletion (±)	0	0	0	0	0	0	2	2
		Colloid depl Decrease in	in T4 level <sup>a)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
		Decrease i	in T3 level <sup>b)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolatio	on, pars distalis (±)	0	0	0	1	1	2	2	3
		Hypertroph	hy, pars distalis (±, +)	0	0	0	1(1, 0)	1(1, 0)	2(2, 0)	2(2, 0)	5(4, 1)*
	Adrenal	Vacuolatio	on, cortical, increased (±)	0	0	0	0	0	0	0	5**
	Liver	Hypertropl centrilobu	hy, hepatocyte, ılar (±, +, ++, +++)	0	0	0	2(2,0,0,0)	0	3(3,0,0,0)	5(2,3,0,0)**	5(0,0,3,2)**

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

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

<sup>b)</sup>: Immunohistochemistry for T3

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

Table 2-5.	Histopathol	ogical findir	igs in male	SD rats tr	eated with	PTU for 2	28 davs
			0.0				

Sex	Organs and findings		Dose (mg/kg)	0	0.03	0.1	0.3	1	3
			No. of animals examined	5	5	5	5	5	5
Males	Thyroid	Hypertrophy	/, follicular cell (±, +, ++, +++)	0	1(1,0,0,0)	5(4,1,0,0)**	<sup>•</sup> 5(0,5,0,0)**	* 5(0,0,3,2)**	* 5(0,0,2,3)**
		Hyperplasia, follicular cell (±, +, ++) Colloid depletion (±, +, ++, +++)		0	0	3(2, 1, 0)	5(2, 3, 0)**	5(0, 0, 5)**	* 5(0, 0, 5)**
				0	1(1,0,0,0)	3(2,1,0,0)	5(2,3,0,0)**	* 5(0,0,3,2)**	* 5(0,0,3,2)**
		Decrease in	T4 level (±, +, ++, +++) <sup>a)</sup>	0	1(1,0,0,0)	4(4,0,0,0)*	5(1,4,0,0)**	* 5(0,0,4,1)**	* 5(0,0,0,5)**
		Decrease in	T3 level (±, +, ++, +++) <sup>b)</sup>	0	0	5(5,0,0,0)**	<sup>•</sup> 5(0,2,3,0)**	* 5(0,0,0,5)**	* 5(0,0,0,5)**
	Liver			0	0	0	0	0	0

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

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

<sup>b)</sup>: Immunohistochemistry for T3

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

## Table 2-6. Histopathological findings in male SD rats treated with APC for 28 days

Sex	Organs and findings		Dose (ppm)	0	1	10	100	1000
			No. of animals examined	10 <sup>c)</sup>	5	5	5	5
Males	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 deple	etion (±, +, ++, +++)	0	0	2(2,0,0,0)	5(1,2,2,0)*	* 5(0,0,1,4)**
		Decrease in	T4 level (±, +, ++) <sup>a)</sup>	0	0	1(1,0,0)	2(2,0,0)	5(0,2,3)**
		Decrease in	T3 level (±, +, ++, +++) <sup>b)</sup>	0	0	0	5(0,4,1,0)*	* 5(0,0,0,4)**
	Liver			0	0	0	0	-

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

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

<sup>b)</sup>: Immunohistochemistry for T3

c): Total of two experiments

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

## Table 2-7. Histopathological findings in male SD rats treated with NaPB for 28 days

Sex	Organs and findings		Dose (mg/kg)	0	10	30	100
			No. of animals examined	5	5	5	5
Males	Thyroid	Hypertroph	y, follicular cell (±, +)	0	2(2, 0)	4(3, 1)*	5(3, 2)**
	Hyperplasia, follicular cell (±)		, follicular cell (±)	0	0	2	5**
		Colloid dep	letion (±)	0	1	3	4*
		Decrease ir	1 T4 level <sup>a)</sup>	0	0	0	0
		Decrease ir	1 T3 level <sup>b)</sup>	0	0	0	0
	Liver	Hypertroph (±, +, ++, +	y, hepatocyte, centrilobular ++)	0	4(4,0,0,0)*	5(0,4,1,0)**	5(0,0,3,2)**

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

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

<sup>b)</sup>: Immunohistochemistry for T3

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



Figure 1. Serum hormone levels in male SD rats.



BEX



Figure 2. Immunohistochemistry for T4 in the thyroid gland of male SD rats.



BEX



Figure 3. Immunohistochemistry for T3 in the thyroid gland of male SD rats.



Figure 4. 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 5. Immunohistochemistry for NQO1 in the thyroid gland of male SD rats. \* and \*\*: significantly different from the controls at P < 0.05 and 0.01, respectively.



Figure 6. Immunohistochemistry for GPX2 in the thyroid gland of male SD rats. \* and \*\*: significantly different from the controls at P < 0.05 and 0.01, respectively.



BEX



Figure 7. 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 8. 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 9. 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 10. Representative histopathological findings in the thyroid gland of male SD rats treated with APC and PTC for 28 days (upper column). Cluster analysis of microarray data obtained from thyroid gland and pituirary gland (lower column).



Figure 11. Flowchart for detection and mechanism estimation of antithyroid chemicals.