

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 年度総括研究報告書

研究代表者：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* 評価法を確立するとともに、妊娠期の甲状腺機能低下により影響を受ける脳の部位・時期を特定し、次世代影響評価における最適なエンドポイントの同定を目的とする。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。

マウス周産期甲状腺機能低下モデルを用いた母動物・児動物への影響評価により、閾値レベルの甲状腺機能低下状態においても行動異常を誘導し、児動物の脳発達に影響を及ぼす可能性が示された。このことから、甲状腺機能低下を誘導する化学物質のリスク管理では特に発達神経毒性（DNT）の評価に注意が必要であることが示された。一方、周産期の甲状腺機能低下は、児動物の甲状腺や脳以外の臓器に対してはほとんど影響を与えない可能性が示唆された。また、Syn-Rep マウスのレポーター分子が、甲状腺機能低下による DNT を検出するための有用なバイオマーカーとなる可能性が示された。

甲状腺ホルモン受容体  $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経分化を指標にして、甲状腺機能低下時における化学物質の発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。本モデルは甲状腺機能低下時の化学物質影響に有用であることが考えられる。

## 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  
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  
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  
諫田泰成 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 薬理部 部長  
中西 剛 岐阜薬科大学 薬学部 教授  
松丸大輔 岐阜薬科大学 薬学部 准教授  
石田慶士 岐阜薬科大学 薬学部 助教  
田熊一敏 大阪大学 大学院歯学研究科 教授  
早田敦子 大阪大学 大学院歯学研究科 准教授

## 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）。また、神経細胞分化マーカーである Synapsin 1 (Syn) をレポーター遺伝子としたトランスジェニックマウス（Syn-Rep マウス）を作製し、神経細胞の分化成熟状態を *in vivo* イメージングにより非侵襲的に観察できる New Approach Methodologies (NAMs) として有用であることを見出した。

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。また、Syn-Rep マウスを用いて、甲状腺機能低下時の児動物、特に発達期脳における影響の解析を通じて、DNT 試験実施の trigger となるエンドポイント/バイオマーカーを同定するとともに、Adverse Outcome Pathway (AOP) の解明を試みる。さらに、*in vivo* 実験で得られた結果を基に、ヒト iPS 細胞等を用いた *in vitro* 評価法の構築を目指す。

## B. 研究方法

### 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）（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）
- ③IOP: 3, 10, 30, 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
- ⑤BEX: 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg
- LG100268: 0.016, 0.8, 0.4, 2 mg/kg
- ⑥VA-K-14: 1, 3, 10, 30, 100 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（NQO1）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・NQO1・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, 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 を使い、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。

### 4. 周産期の甲状腺機能低下時における次世代影響の検討（中西・田熊・早田・松丸・石田）

#### 4-1. 動物および被験物質の投与

ICR系マウスは日本エスエルシーより入手した。実験には雄性Syn-Repマウス（ICRマウスとの交配で系統維持したもの）と野生型雌性ICRマウスを交配することで得られた妊娠マウスを用いた。剖検時、各臓器の摘出は、イソフルランガス麻酔を用いて安楽死をさせた後に行った。

投与プロトコールはOECDテストガイドラインNo. 426（発達神経毒性試験）に準じて実施した。PTU（Sigma-Aldrich #P3755）およびクロルピリフォス（CPF: 富士フィルム和光純薬、純度: 99.0%）の投与は、完全調整飼料のAIN-93Mに混餌し、妊娠Syn-Repマウスに妊娠6.5日（GD6.5）より自由摂取させることで行った。PTUは10 ppm、50 ppm、250 ppm（w/w）で、CPFは10 ppmおよび50 ppm（w/w）の用量で投与した。出生後も母動物に混餌飼料を出産後21日目（LD21）まで継続して与えたが、PTU曝露においては、生後13日齢（P13）～P21の期間は児動物の摂食も始まるため、混餌飼料のPTU濃度をそれぞれ半量（5 ppm、25 ppm、125 ppm（w/w））に変更した。出生後、得られた児動物については、児の成長の不均一性を排除するためにOECDガイドラインに準じて、P4において1匹の母体から合計8匹（雌4匹・雄4匹）となるように間引きを行った。

#### 4-2. 母動物の観察および剖検

投与期間中は3日おきに摂餌量と体重を測定した。LD21に母体をイソフルラン深麻酔下で開腹し、後大静脈より全採血を行った。血液は凝固促進剤・血清分離剤入りの採血管に移し転倒混和した。30分静置し凝固させた後、3000g 10分の条件で遠心分離し血清を-80℃で保存した。放血致死後に速やかに各臓器を摘出し、重量を測定した。

#### 4-3. 児動物の剖検

P21で児動物をイソフルラン深麻酔下で開腹し、後大

静脈より全採血を行った。半数は灌流固定を行い、各臓器をパラフィン包埋した。半数は放血致死後に速やかに各臓器を摘出し、重量を測定した。

#### 4-4. 血清中マーカーの測定

血清中のT3、T4レベルの測定はあすか製薬メディカルに依頼した。また血清中の各種生化学マーカーの測定はオリエンタル酵母に依頼した。TSHの測定は、残留農薬研究所で確立されたMILLIPLEX MAP Mouse Pituitary Magnetic Bead Panel - Endocrine Multiplex Assay TSH用（EMD Millipore）を用いた免疫ビーズ法に準じて行った[Minami et al., Regul Toxicol Pharmacol, 137: 105283 (2023)]。各血清サンプルを抗TSH抗体ビーズと反応させ、ビーズを洗浄した。ビーズに検出用抗体を反応させ、洗浄後さらにStreptavidin-Phycoerythrinを反応させた。各試薬を反応させたビーズをFACSFlow（BD Bioscience、#342003）に懸濁後、BD FACSVerser（BD Bioscience）でビーズの蛍光強度を測定した。各動物の血清TSHレベルは作成した検量線より算出した。

#### 4-5. 組織学的解析

甲状腺、肝臓、腎臓、脾臓、肺、胸腺はパラフィン切片を作成し、組織像をHE染色で観察した。

脳の免疫組織化学的解析は、anti-NeuN抗体（成熟神経細胞特異的マーカー）、anti-IBA1抗体（ミクログリア特異的マーカー）、anti-GFAP抗体（アストロサイト特異的マーカー）、anti-MBP抗体（オリゴデンドロサイト特異的マーカー）を用いた免疫組織化学染色により観察した。脳のゴルジ染色は、FD Rapid GolgiStain Kit™（FD Neuro Technologies）を用いて行った。ビブラトームを用いて作製した冠状切片（厚さ100 μm）をgelatin-coated microscope slideに張り付け風乾し、キットのプロトコールに従って染色した。取得画像の内側前頭皮質（mPFC）第5層における錐体神経細胞の樹状突起スパイン数をImageJにて計数した。

#### 4-6. *In vivo* イメージング解析

児動物のin vivo イメージング解析は、in vivo imaging system（IVIS、住商ファーマ）を用いて行った。2%イソフルランガスで麻酔後、150 mg/kg体重のD-Luciferin溶液を腹腔内投与した後、マウス背側より1分ごとに撮影・計測し、測定値の減衰が始まる20-30分間にわたって測定した。得られたデータについてLiving Image（住商ファーマ）を用いて解析し、頭部の発光強度（Luc2由来のレポーター活性）をTotal flux（photons/second）として定量化した。

#### 4-7. 児動物の行動解析

行動解析としては4および8週齢時にオープンフィールド試験および社会性相互作用試験を実施した。オープンフィールド試験では、被験マウスが新奇環境下で探索行動を行う性質を利用して自発運動量を測定した。塩ビ製のボックス（30 cm×30 cm×30 cm）を中央部が照度40 lxとなる光度下に設置し、被験マウスをその中央部に置き、その後20分間の自由行動をビデオ

カメラにて記録した。記録動画より ANY-maze video-tracking software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) を用いて、マウスの総移動距離を計測した。社会性相互作用試験では、被験マウスが初めて遭遇した新奇侵入マウスへの接触時間を指標として社会性を評価した。まず被験マウスをホームケージから行動観察を行う新たなケージに移して 1 時間馴化させ、そのケージ内に被験マウスよりも 1 週齢若い同性の侵入マウスを入れ、その後 20 分間の相互的な自由行動をビデオカメラにて記録した。記録動画より侵入マウスに対する被験マウスの匂い嗅ぎ時間を目視で計測した。さらに、8 週齢時には、断崖回避試験と、Y 字型迷路試験を加えた。断崖回避試験では、高所でのマウスの回避行動を指標として、衝動性や不注意性を評価した。照度 50 lx とする光度下に、上端に直径 8 cm の円形ステージを付けた高さ 50 cm のポールを設置し、被験マウスをその中央部に置き、その後 15 分間の自由行動をビデオカメラにて記録した。マウスのステージからの落下の有無を記録し、落下割合を算出した。

Y 字型迷路試験では、長さ 30 cm の 3 つのアームを Y 字型に配置した迷路装置における被験マウスの各アームへの侵入行動より空間作業記憶を評価した。被験マウスを装置の中央部に置き、その後 5 分間の自由行動をビデオカメラにて記録した。記録動画よりマウスが侵入したアームを順に記録し、アームに侵入した回数 (total entry) および連続して異なる 3 本のアームに侵入した組み合わせの数 (alternation) を求め、交替行動率を次式 “Percent alternation=number of spontaneous alternations/(Total entry-2)x100” より算出した。

#### 4-8. 統計学的解析

データは全て平均値±標準偏差で表し、統計学的処理には解析ソフト GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, USA) を用いた。多重比較検定は Dunnett's test、二群の比較は対応のない *t* 検定を行い、有意水準は *P* < 0.05 とした。

### 5. 甲状腺機能低下を考慮した *in vitro* 試験法構築(諫田)

#### 5-1. CPF を投与したげっ歯類における甲状腺ホルモン量への影響

本年度は、まず *in vitro* の実験で得た結果を動物実験データと比較するために、OECD TG426 が発出後の文献を調査し、クロルピリホスを投与したげっ歯類の甲状腺ホルモン量に関する論文の収集を行った。

#### 5-2. ヒト iPS 細胞

ヒト iPS 細胞株 253G1 (Nakagawa et al., Nat. Biotechnol., 2008) は、TeSR-E8 培地 (Stem Cell Technologies) にてフィーダーフリー [マトリゲル (BD Biosciences) コート] の条件で培養した。

#### 5-3. ヒト iPS 細胞の神経分化

外胚葉への分化は Dual smad 阻害法 (Chambers et al., Nat. Biotechnol., 2009) に従い、BMP シグナル

阻害剤 LDN193189 (Wako) 及び Activin シグナル阻害剤 SB431542 (Wako) を用いてヒト iPS 細胞を 4 日間培養した。

#### 5-4. shRNA によるノックダウン

shRNA 導入はレンチウイルス (SIGMA) を用いた。ヒト iPS 細胞にウイルスを moi 1 で感染させた。さらに 24 時間後にピューロマイシンを添加して感染細胞のセレクションを行い、分化実験などに使用した。

#### 5-5. NGS 解析

THRα ノックダウンした細胞 (外胚葉) より RNA 抽出を行い、Novogene 社に委託して NGS データを取得した。また、scramble control に対して THRα ノックダウンした細胞 (外胚葉) で発現が低下する遺伝子の探索を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立医薬品食品衛生研究所・岐阜薬科大学・大阪大学における動物実験および遺伝子組換え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。また、ヒト iPS 細胞は細胞バンクより購入する等、適切に実験を実施した。

### 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 増加 ; 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 増加 ; 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 NQ01 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

NQ01・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・APC・NaPB 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。

## 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・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。

## 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

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・ICAP0 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。

#### 1) 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。

#### 3) 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。
- 6) PEPPER platform の現状  
TTR-FITC T4 および DIO1 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。DIO1 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) DIO1, 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。
- 8) 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。

- 1) 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。
- 2) 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。
- 4) DIO 1, 2, 3 KalyCell assay  
現時点では DIO1、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。
- 6) KalyCell 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。
- 7) 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。

#### 4. マウス周産期甲状腺機能低下モデルにおける母動物・児動物への影響評価

##### 4-1. 母動物の摂餌量、体重および臓器重量への影響

これまでに我々は、PTU を用いたマウス周産期甲状腺機能低下モデルにおける出生後の影響については、甲状腺機能低下を誘導する閾値用量の 10 ppm と典型的な甲状腺機能低下を誘導する 250 ppm の 2 用量しか行っていないかった。そこで今年度は、出生後における各エンドポイントの用量反応性をより明確にするために中間用量である 50 ppm 曝露群を設定して検討を行った。その結果、妊娠期の母動物の摂餌量に影響は認められなかったが、授乳期の総摂餌量に有意な低下が認められた。また体重についても、LD1 - LD13 においては有意な低下が認められた。一方、LD16 - LD19 においては体重の回復が認められた。各主要臓器の重量については、肝臓と肺で有意な増加が認められたが、用量反応性は認められなかった。

##### 4-2. 母動物および児動物の血清中甲状腺ホルモンおよび生化学マーカーへの影響

PTU 曝露時における出生後 (LD21 および P21) の血清中甲状腺ホルモン (total T3 および T4) レベルならびに生化学マーカーについては未測定であったため、今



年度に測定を行った。その結果、250 ppm 投与群の母動物では出生前の結果（厚生労働科学研究費補助金 [21KD1004] の総合研究報告書を参照）を反映して、T3 と T4 の有意な低下と TSH の有意な上昇が認められた（Figure 12）。一方で、10 ppm 投与群の母動物では、出生前においては T3、T4、TSH の有意な変動は認められなかった（厚生労働科学研究費補助金 [21KD1004] の総合研究報告書を参照）が、LD21 では T4 で有意な低下が認められた（Figure 12）。また児動物についても、250 ppm 投与群では雌雄共に T3 と T4 の有意な低下と TSH の有意な上昇が認められたが、10 ppm 投与群においては雌雄共に T4 のみ有意な低下が認められ、T3 については、わずかではあるが雄で有意な上昇が認められた（Figure 13）。

母動物の生化学マーカーについては、10 ppm 投与群では特に影響は認められなかった。250 ppm 投与群では、尿素窒素、カリウム、無機リンの有意な低下、乳酸脱水素酵素（LDH）、総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロールの有意な上昇が認められた。一方、児動物についても、10 ppm 投与群では特に影響は認められなかったが、250 ppm 投与群では、雌雄共に、尿素窒素、無機リン、アミラーゼの有意な低下と総タンパク、アルブミン、中性脂肪、総ビリルビンの有意な増加が認められた。また雄のみで、Na、AST、ALT の有意な低下が、雌のみで Ca の有意な上昇が認められた。しかし総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロールなどの脂質代謝関連マーカーには影響が認められなかった。

#### 4-3. 児動物の体重および臓器への影響

出生後の児動物の体重は 50 ppm 投与群では、雌雄共に対照群と有意な差はみられなかった。また LD21 における児動物の絶対臓器重量を評価したところ、対照群と比較して PTU 投与により有意に変動している臓器がいくつか存在するものの、いずれも用量反応性は認められなかった。一方、相対臓器重量を評価したところ、雄において脳の相対重量の有意な増加が認められた。肝臓、腎臓、胸腺、肺、脾臓については、組織学的解析を行ったが、対照群と比較して明らかな異常は認められなかった。

#### 4-4. 児動物の脳への影響

児動物の脳における影響を検討するために、頭部の *in vivo* イメージング解析を行った。50 ppm 投与群においては、P7-16 で雌雄共に対照群と比較してレポーター活性は高い傾向を示し、雌では P16 で、雄では P10、P13、P16 で有意な差が認められた（Figure 14）。50 ppm 投与群のレポーター活性の経時変化は、10 ppm 投与群と 250 ppm 投与群（21KD1004：総合研究報告書）の間型のパターンを示し、PTU の用量依存的な脳のレポーター活性への影響が認められた。

また P21 における児動物脳の免疫組織学的解析を行ったところ、P21 における大脳皮質一時運動野（M1）領域の II/III 層において、成熟神経細胞、ミクログリア、およびオリゴデンドロサイトの数に PTU 投与による影響は認められなかった。一方、当該領域におけるアスト

ロサイトの数は 10、50 ppm 投与群では変化はみられなかったものの、250 ppm 投与群では対照群と比較して有意な増加が認められた（Figure 15）。

8 週齢時における 10 ppm 投与群の児動物脳についてゴルジ染色による解析を行ったところ、雄の mPFC 領域第 5 層の錐体神経細胞において基底樹状突起スパインの 10  $\mu$ m あたりの密度が有意に増加していることを認めた。また近年、神経発達症などの精神行動異常への関与が示唆されている神経炎症に着目し、mPFC と感覚情報処理を担う脳領域である第一次体性感覚野（S1BF）における、ミクログリアとアストロサイトの状態を各細胞種特異的のマーカーを用いて免疫組織学的解析により検討した。その結果、10 ppm PTU 投与群の雄児動物の S1BF において、ミクログリアマーカーである Iba1 陽性細胞数の増加傾向が認められた。一方、GFAP 陽性細胞数については変化が認められなかった。

#### 4-5. 児動物の行動への影響

これまでの検討で 250 ppm 投与群の児動物においてオープンフィールド試験における自発運動量の増加が認められるなど多動の症状を示すことを確認していたが、10 ppm 投与群については予備的に行った検討であったため、今期は 10 ppm 投与群における行動異常の再現性の確認を行った。その結果、生後 4 および 8 週齢時ともに、10 ppm 投与群の雄児動物においてオープンフィールド試験での総移動距離が有意に増加した（Figure 16）。社会性行動に及ぼす影響についても、4 週齢時における匂い嗅ぎ時間が有意に増加していることを認めた（Figure 17）。さらに 8 週齢時に行った断崖回避試験では、10 ppm 投与群の雄児動物において落下割合が増加する傾向が認められた。一方、Y 字型迷路試験においては、総アーム進入および自発的交替行動ともに特段の変化は認められなかった。雌の児動物において、10 ppm 投与群では生後 4 週齢時の匂い嗅ぎ時間、8 週齢時のオープンフィールド試験での総移動距離について、雄と同様の傾向が認められた。

#### 4-6. 周産期の CPF 曝露による影響評価

検討は、周産期曝露により児動物の行動異常が誘導されることが報告されている 10、50 ppm の 2 用量で行った。実験期間中の母動物および児動物の体重と摂餌量に CPF 投与による影響は認められなかった。

児動物の頭部レポーター活性について *in vivo* イメージングにて解析したところ、雄では 10 ppm 投与群では P10 で、50 ppm 投与群では P13 で対照群と比較して有意な低下が認められた（Figure 18）。雌では頭部レポーター活性における CPF 投与による影響は認められなかった。

児動物脳の免疫組織学的解析を行ったところ、成熟神経細胞、ミクログリア、およびアストロサイトの数に特段の影響は認められなかった。

CPF 投与による甲状腺組織像への影響を評価したところ、LD21 の母動物および P21 の児動物において対照群と比較して CPF 投与群で明らかな組織学的異常は認められなかった。

CPF を投与した児動物の P21 における血清中生化学



マーカーを測定したところ、雌雄共にいずれの用量においても対照群と比較して ChE 活性の有意な低下が認められた (Figure 19)。

## 5. ヒト iPS 細胞による甲状腺ホルモン受容体の機能解析

### 5-1. CPF を投与したげっ歯類における甲状腺ホルモン量への影響

既存情報は、OECD TG426 が発出された 2006 年以降の文献に対して行い、Pubmed でキーワード rat, mouse, chlorpyrifos, thyroid によりヒットした文献から、甲状腺ホルモンの定量を行った計 13 報を選定した (Figure 20, 21)。なお選出した 13 報に、TG426 への準拠が記載された文献は存在しなかった。

胎生期から生後にかけて投与した文献 (Figure 20) では、Jeong (2006) らはラットに 1, 10, 100 mg/kg で経口投与し、蛍光免疫法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。De Angelis (2009) らはマウスに 1, 3 mg/kg で皮下投与し、放射免疫測定法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。Peluso (2023) らはマウスに 0.1, 1, 10 mg/kg で経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。Colella (2023) らはマウスに 1, 10 mg/kg で経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。また Nittoli (2021) らはマウスに 0.1, 1, 10 mg/kg で経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。胎生期にのみ投与したケースでは、Haviland (2010) らがマウスに 1, 5 mg/kg で 4 日間経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンが増加することを報告した。

成体に投与したケース (Figure 21) では、Mosbah (2016) らがラットに 20 mg/kg で 4 週間経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。Chebab (2017) らはラットに 6.75 mg/kg で 30 日間経口投与し、化学発光法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。Farkhondeh (2025) らはラットに 30 mg/kg で 15 日間投与後、血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。Porreca (2016) らはマウスに 0.1, 1, 10 mg/kg で 7 日間経口投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンが減少することを報告した。

一方、Otênio (2022) らはラットに 0.01, 0.1, 1, 10 mg/kg で 5 日間経口投与し、血清中の甲状腺ホルモンが増加することを報告した。Cobilinschi (2021) らもラットに 100 mg/kg で 4 時間経口胃管投与し、ELISA 法にて血清中の甲状腺ホルモンが増加することを報告した。また Levin (2014) らはラットに 1 mg/kg で 4 日間経口投与し、ID-LC/MS/MS 法にて血清中の甲状腺ホルモン量を測定した結果、変化が認められなかった。

以上の文献調査により、クロルピリホスを胎生期から生後にかけて長期投与した場合、血清中の甲状腺ホルモン量が減少することが示唆された。一方、短期間の投与では血清中の甲状腺ホルモン量が増加あるいは変化しないことを報告する文献も存在した

### 5-2. THR $\alpha$ ノックダウンしたヒト iPS 細胞の NGS 解析

THR $\alpha$  ノックダウンしたヒト iPS 細胞を神経 (外胚葉) 分化誘導したところ、negative control の scramble shRNA を導入した細胞と比べて神経分化マーカーである PAX6 の発現が減少することを見出していることから、THR $\alpha$  は神経 (外胚葉) 分化に関与すると考えられる。

そこで本年度は、NGS 解析により、THR $\alpha$  の下流で神経 (外胚葉) 分化に関わる遺伝子の探索を試みた。NGS データとパスウェイ解析により THR $\alpha$  ノックダウンで発現が低下する遺伝子を探索した結果、Factor A, B などの薬剤排出トランスポーターが選定され (Figure 22)、THR $\alpha$  ノックダウン細胞の薬剤応答性への関与が考えられる。また Factor C~F などの神経ペプチド・ホルモン受容体も選定され、THR $\alpha$  ノックダウンによる神経内分泌機能に対する負の影響が想定される (Figure 23)。さらに神経分化に関わる転写因子として、以前報告した HES5 以外に Factor G~O などを選定した (Figure 24)。

## 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⑤BEX の低用量、⑥VA-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。

### 3. 国際機関および諸外国等における甲状腺機能評価に関する情報収集

OECD の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る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。

### 4. マウス周産期甲状腺機能低下モデルにおける母動物・児動物への影響評価

#### 4-1. 母動物と児動物の甲状腺関連指標の変動と行動異常について

我々はこれまでに検討を行ってきた PTU を用いたマウス甲状腺機能低下モデルにおいて、GD18.5 の母動物の解析から、50 ppm 以上が典型的な甲状腺機能低下を誘導する条件であり、10 ppm は甲状腺機能低下の閾値用量である可能性を示してきた (21KD1004: 総合研究報告書)。今回の検討において P21 の雌雄児動物と LD21 の母動物の T3 と T4 レベルを測定したところ、PTU 10 ppm 投与により母動物と児動物共に T4 の低下は認められたが、T3 の低下および TSH の変動は認められなかった。T3 については、児動物の雄で逆に有意な上昇が確認されたが、PTU の閾値用量で散見される現象で、ネガティブフィードバック機構による影響と考えられた。これらの結果から、改めて 10 ppm は甲状腺機能低下を誘導する閾値用量であることが確認された。また母動物の甲状腺関連指標は、児動物の甲状腺機能低下状態を反映したものである可能性も示された。

一方で、10 ppm 投与群の 4 週齢および 8 週齢児動物では、自発運動の増大 (多動) や匂い嗅ぎ行動の増加と

いう情動行動の異常が確認された。また成育後も多動の持続性や、衝動性や不注意さの増大傾向を認めた。甲状腺ホルモン不応症の患者では、注意欠陥多動障害 (ADHD) などの症状がしばしば認められる事が報告されている [N Engl J Med, 328:997-1001 (1993) 他] が、今回確認された児動物の行動異常はヒトにおける影響と類似したものであると言える。一方で、これまでも実験動物を用いて甲状腺機能低下時における行動異常が検証されているが、極端な甲状腺機能低下状態における検討であったり、甲状腺機能低下の程度と行動異常との相関が確認されていなかったりと、その情報が極めて断片的であった。今回の結果は、閾値レベルの甲状腺機能低下状態 (10 ppm) であっても、児動物の脳発達に対して有害影響を与える可能性があることを明示しており、甲状腺機能低下を誘導する化学物質のリスク管理に極めて重要な情報になると考えている。

他方で、8 週齢時の 10 ppm 投与群においては、P21 で検出された甲状腺組織学的異常 (21KD1004: 総合研究報告書) や血中 T4 レベルの低下は認められなかった。250 ppm 投与群においても甲状腺で濾胞上皮細胞の肥厚がわずかに観察される程度であり、P21 で認められた典型的な甲状腺機能低下の症状 (コロイドの消失等) は観察されなかった。これは P21 以降に PTU 混餌食から通常食に切り替えたためであり、PTU 投与による甲状腺機能低下は可逆的であることが示唆された。しかしその一方で、10 ppm 投与群の 8 週齢においても、行動異常が持続していることから、周産期の甲状腺機能低下は児動物の脳発達に不可逆的な影響を与えていると考えられた。

#### 4-2. Syn-Rep マウスレポーター分子のバイオマーカーとしての有用性について

我々はこれまでに、PTU 10 ppm および 250 ppm 投与群における Syn-Rep マウス児動物の脳におけるレポーター活性は、対照群と比較して生後直後は低値、その後高値となり、発育遅延が起こっているようなプロファイルを示した。またその影響は、10 ppm 投与群の方が 250 ppm 投与群と比較してマイルドであることを明らかにしている (21KD1004: 総合研究報告書)。今年度は用量依存性を確認するために、新たにその中間用量である 50 ppm 投与群のレポーター活性の変動を評価した。その結果、10 ppm および 250 ppm 投与群と類似したプロファイルを示し、影響の程度もそれらの中間であることが明らかとなった。このことから、レポーター活性変動は PTU の用量依存性であり、レポーター活性が脳発達への影響の程度を反映するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。10 ppm と 250 ppm 投与群の児動物では多動の行動異常が検出されることから、レポーター活性の変化は行動異常を反映したバイオマーカーとしても有用である可能性が示唆された。行動試験は定性的な評価であるため脳の影響の程度を評価することは困難であるのに対し、Syn-Rep マウスのレポーター活性は脳発達への影響の定量的な評価が可能であることから、今後は脳の組織学的解析や各種バイオマーカーとの相関を検討することで、定量評価系としての有用性も示していきたいと考えている。

#### 4-3. 児動物脳の組織学的解析について

P21 児動物においては、250 ppm 投与群において脳の相対重量の増加が認められたが、これは 250 ppm 投与群においては有意な体重増加の抑制が認められていることから、低体重に起因したものであると考えられた。しかし 50 ppm 投与群の雄では、体重の増加の抑制がないにも関わらず脳の相対重量の有意な増加が認められたことから、PTU 投与による脳の相対重量増加は必ずしも体重減少のみでは説明できない可能性が考えられた。

脳の構成細胞のうちアストロサイトは血中の T4 を取り込み細胞内で活性型の T3 に変換した後に神経細胞に供給する役割を担っている [Mol Cell Endocrinol, 458:22-28 (2017)]。250 ppm 投与群の P21 児動物では大脳皮質 M1 領域のアストロサイトの数が増加していたが、これは脳内の甲状腺ホルモンが減少しているため、より多くの T4 から T3 への変換を行うことを目的に存在量が増加している可能性が考えられた。しかし甲状腺機能低下による行動異常が確認されている 10 ppm 投与群の P21 児動物では、アストロサイトの数に影響は認められなかった。現状では PTU 投与マウスの多動の原因をアストロサイトの増加で説明することはできないが、用量依存性などを考慮した組織学的解析を進めることでアストロサイトに対する影響についても結論を導き出したいと考えている。

一方で、8 週齢の児動物脳においては、10 ppm 投与群でミクログリアの増加傾向が認められ、mPFC 第 5 層の錐体細胞の樹状突起スパイン密度についても増加がみられた。mPFC で示唆されているシナプス形成異常と精神疾患との関連を考え合わせると、mPFC での神経形態学的変化が 10 ppm 投与群における ADHD 様の情動行動変化をもたらしたものと推察される。また多動と社会性行動変化が発現していることより、今後は mPFC と S1BF に加えて、少なくとも運動野および海馬領域を対象に加えて詳細な脳組織学的解析を実施する必要があると考えている。また、ヒトの発達障害では男児の発現率が高いことが知られている。今後は、PTU 誘発異常行動発現の性差についても詳細な検討を行う予定である。

#### 4-4. 母体甲状腺機能低下による児動物の脳以外への影響について

我々はこれまでに、妊娠期における PTU 投与は、典型的な甲状腺機能低下を示す 250 ppm 投与群であっても胎児の臓器や骨格形成等にほとんど影響を与えないことを明らかにしている (21KD1004: 総合研究報告書)。今年度は、出生後 (P21) の児動物の器官形成への影響についても解析を行った。その結果、児動物の脳と甲状腺以外の臓器に関しては、重量、病理組織学的解析の結果、PTU の用量依存的な影響は認められなかった。P21 児動物の生化学マーカーに関しても 250 ppm 投与群でいくつかの項目で変化が認められるものの、特定の臓器への影響を判断できる結果は得られなかった。以上の結果を総合的に判断し、周産期の PTU 投与は児動物の甲状腺や脳以外の臓器に対してはほとんど影響を与えない可能性が示唆された。

その一方で、母動物においてはヒトの甲状腺機能低

下時の症状でも影響が確認されている LDH、T-CHO、LDL-C、HDL の上昇などの脂質代謝関連マーカーへ影響が、250 ppm 投与群で認められた。この結果は、母動物の脂質代謝マーカーに明確な異常が認められる場合には、甲状腺機能低下による児動物の DNT が起こっている可能性を示唆するものである。2018 年の改正農薬取締法に基づいて 2021 年度から我が国で登録されているすべての農薬を対象に、15 年ごとに安全性などを再評価する制度が開始されているが、これまで甲状腺関連指標評価されていない農薬で脂質代謝関連マーカーに明確な影響が認められる農薬については、甲状腺関連指標の評価はもちろんのこと、さらに甲状腺機能低下が認められた場合には DNT の評価を行うべきかもしれない。この点も含めて血液生化学マーカーについては、今後 50 ppm 投与群の血液検体を解析し、用量依存性を確認することで明確な結論を導き出せるものと期待される。

#### 4-5. 周産期の CPF 曝露による影響評価

本研究では、DNT 陽性対照候補物質である CPF を用いて、Syn-Rep マウスの応答性と脳発達への影響の相関を検証した。今回用いた 50 ppm は、5 mg/kg/day に相当する用量であるが、これは一般的に CPF が DNT を誘導するとされている用量である。また、血清中 ChE は CPF 投与群で有意な低下が認められたことから、殺虫剤としての作用点である ChE 阻害作用を、マウスに対して誘導する条件であることも確認された。一方で甲状腺関連指標に対する影響として甲状腺の病理組織学的解析を行ったが、特に影響は認められなかった。CPF の甲状腺機能への影響については、DNT にフォーカスした研究ではないものの、マウスやラットに対して甲状腺機能に影響を与える可能性が報告されている [Toxicology, 220:189-202 (2006), Toxicol Sci, 108:311-319 (2009)]。これら先行研究では、CPF 投与経路が皮下注射だったり、投与期間が長期間であるなど投与プロトコールが異なる上に、T3、T4 の測定方法もラジオイムノアッセイなどの古典的な手法で測定を行っていることから、これらの違いが我々との結果の違いに繋がっている可能性が考えられた。

脳に対する影響の検討については、CPF 投与群の雌の児動物では脳の *in vivo* イメージングで特に影響は認められなかったが、雄では発達期の一部の時点においてレポーター活性に有意な低下が認められた。しかし、各種脳構成細胞マーカーを用いた免疫組織学的解析においては、CPF 投与による明らかな影響は認められなかった。食品安全委員会の評価書においても本研究結果と同様に、5 mg/kg/day の投与条件において児動物脳の神経病理組織学的検査で異常は認められなかったと結論付けられており、CPF による DNT を組織学的解析により捉えることは難しい可能性が考えられる。

以上の結果から、CPF による DNT を Syn-Rep マウスで検出できる可能性は示唆されるものの、その影響は甲状腺機能低下に起因するものではなく、CPF は甲状腺機能低下に起因する DNT の陽性対照物質としては適さない可能性が示唆された。

#### 5. ヒト iPS 細胞による甲状腺ホルモン受容体の機能解

## 析

本研究ではまず文献調査を行い、胎生期から生後のげっ歯類への長期 CPF 投与では、血清中の甲状腺ホルモン量が減少する報告が多いことを見出した。一方、胎生期あるいは数日間以内の短期曝露では血清中の甲状腺ホルモン量が変化しないか増加する報告も存在することから、曝露の実験デザインの重要性が示唆された。

こうした文献情報は、発達期における CPF 長期曝露が甲状腺ホルモンの低下をもたらすことを示唆し、欧米の大規模疫学調査によって妊婦の甲状腺ホルモン低下と出生児の知能低下との間に明らかな相関性が認められる報告をサポートするものである (Gilbert et al., Neurotoxicology, 2012)。一方、CPF の短期曝露では ROS 産生・酸化ストレス誘発による炎症応答が生じることが知られており (Weis et al., Chemosphere, 2021)、甲状腺ホルモン増加が報告されたケースでは一過性の応答が引き起こされた可能性が考えられる。以上の文献調査により、甲状腺ホルモンは発達期の神経毒性に関与する可能性が高いことが示唆され、他の化学物質に関しても情報を収集して検証をする必要がある。

甲状腺ホルモン受容体 THR には  $\alpha$  と  $\beta$  の 2 種類のアイソフォームが存在する。ノックアウトマウスを用いた研究により、THR  $\alpha$  は神経発生に関係するが、THR  $\alpha$  はフェノタイプが認められていない (Krieger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2019)。また、分化誘導に伴い THR  $\alpha$  の発現が選択的に亢進したことから、今回は THR  $\alpha$  を優先的に評価した。しかしながら、THR  $\alpha$  と  $\beta$  の生理的な機能については明らかにされておらず、甲状腺機能低下による子どもの影響を考慮する上でどちらがより重要であるのかは慎重に検討する必要がある。さらに神経分化時に THR  $\alpha$  の下流で働く可能性のある因子を探索した結果、薬剤排出トランスポーター、神経ペプチド・ホルモン受容体、転写因子などに属する遺伝子をいくつか選定した。これまでの研究により THR  $\alpha$  ノックダウン細胞は薬剤感受性が少し高いことから薬剤排出トランスポーター発現との関連については興味深い。また転写因子については、既に THR  $\alpha$  の下流で作用する因子を報告済みであるが、他の選定因子と関連する可能性も考えられる。神経ペプチド・ホルモン受容体については甲状腺ホルモンシグナルとのクロストークという点で興味深い。以上の観点をもとに、選定した因子と甲状腺機能低下の関連についてさらに検討を進める必要がある。

今後は、神経毒性が懸念されている他の化学物質を用いて曝露影響の解析を行うこと、中西グループのレポーターマウスの NGS データなどと NGS データを比較することなどにより、本評価系の有用性を明らかにする予定である。

## 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。

マウス周産期甲状腺機能低下モデルを用いた母動物・児動物への影響評価により、閾値レベルの甲状腺機能低下状態においても行動異常を誘導し、児動物の脳発達に影響を及ぼす可能性が示された。このことから、甲状腺機能低下を誘導する化学物質のリスク管理では特に DNT の評価に注意が必要であることが示された。一方、周産期の甲状腺機能低下は、児動物の甲状腺や脳以外の臓器に対してはほとんど影響を与えない可能性が示唆された。また、Syn-Rep マウスのレポーター分子が、甲状腺機能低下による DNT を検出するための有用なバイオマーカーとなる可能性が示された。

甲状腺ホルモン受容体  $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経分化を指標にして、甲状腺機能低下時における化学物質の発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。本モデルは甲状腺機能低下時の化学物質影響に有用であることが考えられる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- [1] Uneyama M, Toyoda T, Doi Y, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of linalool oxide in Crl:CD(SD) rats. J Toxicol Pathol. 2024; 37(4): 151-61.
- [2] 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(3): 455-69.
- [3] Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. 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, Ogawa K. Pathogenesis of chemically induced nasal cavity tumors in rodents: contribution to adverse outcome pathway. *J Toxicol Pathol.* 2024; 37: 11-27.
- [5] Takimoto N, Ishii Y, Mitsumoto T, Takasu S, Namiki M, Toyoda T, Shibutani M, Ogawa K. 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, Ishii Y, Takasu S, Namiki M, Soma M, Takimoto N, Matsushita K, Shibutani M, Ogawa K. 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, Ishii Y, Umemura T. Appearance of SOX9- and GST-P-positive hepatocytes as possible carcinogenic events in the early stage of furan-induced hepatocarcinogenesis. *J Appl Toxicol.* 2024; 44: 1976-85.
- [8] Kuroda K, Ishii Y, Takasu S, Kijima A, Matsushita K, Masumura K, Nohmi T, Umemura T. Possible contribution of 8-hydroxydeoxyguanosine to gene mutations in the kidney DNA of gpt delta rats following potassium bromate treatment. *Mutat Res.* 2024; 894: 503729.
- [9] 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.
- [10] Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Uneyama M, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. 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 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.* 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, 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.
- [13] Hagiwara H, Hayata-Takano A, Miyakawa T, et al., Large-scale animal model study uncovers altered brain pH and lactate levels as a transdiagnostic endophenotype of neuropsychiatric disorders involving cognitive impairment, *Elife.* 2024; 12: RP89376.
- [14] Ohnami S, Naito M, Kawase H, Higuchi M, Hasebe S, Takasu K, Kanemaru R, Azuma Y, Yokoyama R, Kochi T, Imado E, Tahara T, Kotake Y, Asano S, Oishi N, Takuma K, Hashimoto H, Ogawa K, Nakamura A, Yamakawa H, Ago Y, Brain region-specific neural activation by low-dose opioid promotes social behavior, *JCI Insight.* 2024; 9: e182060.

## 2. 学会発表

- 1) Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Uneyama M, Morikawa T, Ogawa K. 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)
- 2) 豊田武士、赤根弘敏、小川久美子.  $\gamma$ -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、畠山瑞穂、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)
- 4) 松下幸平、豊田武士、赤木純一、水田保子、小川久美子. 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) 畠山瑞穂、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、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. 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) 畠山瑞穂、豊田武士、赤木純一、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子.  $\gamma$ -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、畠山瑞穂、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, Ishii Y, Uneyama M, Morikawa T, Wanibuchi H, Tsuda H, Toyoda T. Comparison of the intra-tracheal 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) Ishii Y, Nakamura K, Yamagami Y, Takasu S, Nohmi T, Toyoda T, Shibutani M, Ogawa K. Investigations of the mechanism underlying acetamide-induced hepatocarcinogenesis in rat. 64th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2025.3)
  - 14) 石井雄二、相馬明玲、山上洋平、笠松建吾、高須伸二、豊田武士、小川久美子. 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) 石井雄二. 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) 石井雄二. 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, Ishii Y, Nakamura K, Takasu S, Toyoda T, Murakami T, Shibutani M, Ogawa K. 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、石井雄二、相馬明玲、笠松建吾、山上洋平、豊田武士、小川久美子. *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、石井雄二、笠松建吾、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、村上智亮、小川久美子. 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、石井雄二、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、小川久美子. 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、石井雄二、山上洋平、笠松建吾、高須伸二、小川久美子. 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) Akane H, Toyoda T, Uneyama M, Morikawa T, Kosaka T, Aoyama H, Ogawa K. 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) 赤根弘敏、高須伸二、魏民、藤岡正喜、豊田武士、石井雄二、畠山瑞穂、森川朋美、津田洋幸、小川久美子. 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) 赤根弘敏、高須伸二、石井雄二、小川久美子、豊田武士. 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、石井雄二、畠山瑞穂、森川朋美、津田洋幸、小川久美子. 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, Akane H, Matsushita K, Toyoda T, Ogawa K. 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、畠山瑞穂、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、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子、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、赤根弘敏、松下幸平、豊田武士、小川久美子. 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 回日本分子生物学会 (2024 年 11 月)
  - 34) 吉田彩夏、橋本由弥、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子、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、赤根弘敏、松下幸平、豊田武士、小川久美子. 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、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子、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)
  - 37) Mima S, Hayata-Takano A, Tomita S, Iwahashi M, Ishida K, Matsumaru D, Nakanishi T, Takuma K. Maternal hypothyroidism during the fetal and neonatal periods causes behavioral abnormalities in mouse offspring. 第 98 回日本薬理学会年会 (2025 年 3 月)
  - 38) 石田慶士、松丸大輔、中西剛. 周産期甲状腺機能低下による甲状腺関連指標の変動と次世代影響の連関評価. 第 8 回先天異常学会勉強会 (2024 年 11 月)
  - 39) 長平萌花、石田慶士、田中雅己、松丸大輔、中西剛. 母体免疫活性化に起因する神経発達影響評価に資する神経分化トレーサーマウスの有用性検証. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2024 (2024 年 10 月)
  - 40) 田中雅己、石田慶士、松丸大輔、中西剛. 神経分化レポーターマウスを用いたクロロピリフォスの発達神経毒性評価. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2024 (2024 年 10 月)
  - 41) 中西剛. 毒性学研究における *in vivo* イメージングの応用. *In vivo* イメージングフォーラム 2024 (2024 年 10 月)
  - 42) Nakanishi T, Ishida K, Tatsumi K, Matsumaru D, Nagase H, Kanda Y, Takuma K. Utilizing neuronal differentiation reporter mice for *in vivo* detection of developmental neurotoxicity. EUROTOX 2024 (2024 年 9 月)
  - 43) 石田慶士、目加田京子、松丸大輔、中西剛. 妊娠期 fluorene-9-bisphenol 曝露による母体甲状腺関連パラメータと胎仔発生への影響評価. フォーラム 2024: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2024 年 9 月)
  - 44) 田中雅己、石田慶士、松丸大輔、中西剛. 神経分化レポーターマウスを用いた周産期クロロピリフォス曝露による脳発達への影響評価. フォーラム 2024: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2024 年 9 月)
  - 45) 長平萌花、石田慶士、田中雅己、松丸大輔、中西剛. 母体免疫活性化による神経発達影響評価における神経分化トレーサーマウスの有用性検証. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月)
  - 46) 田中雅己、石田慶士、松丸大輔、中西剛. 神経分化レポーターマウスを用いたクロロピリフォスの発達神経毒性に関する検討. 第 64 回日本先天異常学会学術集会 (2024 年 7 月)
  - 47) Murata K, Hayata-Takano A, Kikuchi T, Iwahashi M, Mohri I, Tachibana M, Takuma K, Katayama T, Taniike M, Hashimoto H. Prenatal PGD2-DP1 signaling activation exhibits behavioral abnormalities associated with autism-like mental/behavioral disorders in mice. Neuro 2024 (2024 年 7 月)
  - 48) Ono A, Koan D, Asano S, Miyaoka T, Chen L, Nakagawa S, Hayata-Takano A, Nakazawa T, Harada A, Hashimoto H, Waschek J, Tanimoto K, Ago Y. Overexpression of vasoactive intestinal peptide receptor 2 in neurons causes abnormal dendritic morphology in the prefrontal cortex and cognitive impairment. CINP 2024 (2024 年 5 月)
  - 49) Iwahashi M, Yoshimura T, Harigai W, Takuma K, Hashimoto H, Katayama T, Hayata-Takano A. Treatment for attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) drug normalizes AIS length abnormality along with hyperactivity in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. CINP 2024 (2024 年 5 月)
  - 50) Iwahashi M, Yoshimura T, Harigai W, Takuma K, Hashimoto H, Katayama T, Hayata-Takano A. Involvement of axon initial segment (AIS) abnormality in attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD)-like behaviors of mice. Oral Neuroscience 2023 (2024 年 4 月)
  - 51) Kanda Y. Evaluation of neurotoxicity for pesticide-related compounds in human iPS cell-derived neurons using MEA: Japanese experience. OECD Workshop on critical innovations in pesticides safety testing and chemical risk assessment for DNT (2024 年 10 月)
  - 52) 山田茂、安彦行人、中西剛、諫田泰成. 発達期の神経毒性における甲状腺ホルモン受容体の解析. 第 98 回日本薬理学会年会 (2025 年 3 月)
  - 53) 諫田泰成. NAMs による食品安全性評価の現状と今後の展望. 日本動物実験代替法学会第 37 回大会 (2024

年 12 月)

- 54) 諫田泰成. ヒト細胞を活用した代替法の国際動向. 第 10 回細胞凝集研究会 (2024 年 7 月)
- 55) Yoshida S, Tiong TKS, Nomura Y, Kanda Y. Glyphosate exposure in utero induced social behavior alteration and neuronal cell death, which could be rescued with postnatal butyrate administration. EuroTox 2024 (2024 年 9 月)
- 56) 諫田泰成、西田基宏、魏范研. 副作用メカニズムに基づく個人差予測. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月)
- 57) 安彦行人、諫田泰成. ヒト iPS 細胞由来神経細胞によるピレスロイド系農薬の神経毒性評価. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月)

- 58) 諫田泰成、川岸裕幸、安彦行人. ヒト iPS 細胞由来分化細胞を用いた in vitro 薬理評価系の開発と標準化. 第 96 回日本組織培養学会大会 (2024 年 6 月)

## H. 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            | 10           | 30           | 0            | 30           | 100          | 300           |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| No. of animals examined | 5            | 5            | 5            | 5            | 5            | 5            | 5            | 5             |
| Males                   |              |              |              |              |              |              |              |               |
| Body weight (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 ± 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          | 1            | 0            | 1            | 3            | 10            |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| No. of animals examined | 5            | 5            | 5            | 5            | 5            | 5            | 5            | 5             |
| Males                   |              |              |              |              |              |              |              |               |
| Body weight (g)         | 385 ± 16     | 393 ± 17     | 387 ± 22     | 393 ± 28     | 418 ± 26     | 416 ± 28     | 452 ± 40     | 435 ± 29      |
| Thyroids (mg)           | 21.4 ± 3.0   | 23.1 ± 6.6   | 23.2 ± 3.4   | 21.9 ± 3.0   | 20.8 ± 2.2   | 22.8 ± 3.9   | 20.9 ± 3.2   | 18.1 ± 2.7    |
| (mg%)                   | 5.6 ± 0.9    | 5.9 ± 1.8    | 6.0 ± 0.7    | 5.6 ± 0.5    | 5.0 ± 0.4    | 5.5 ± 1.2    | 4.7 ± 0.9    | 4.2 ± 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 ± 1.1    |
| (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 ± 0.3     |
| Adrenals (mg)           | 49.6 ± 8.2   | 54.8 ± 2.0   | 53.6 ± 10.2  | 61.0 ± 7.8   | 51.8 ± 7.9   | 54.6 ± 12.6  | 60.4 ± 13.1  | 62.6 ± 3.5    |
| (mg%)                   | 12.9 ± 1.7   | 14.0 ± 0.6   | 13.9 ± 3.1   | 15.6 ± 2.0   | 12.4 ± 1.9   | 13.2 ± 2.9   | 13.3 ± 1.8   | 14.4 ± 1.3    |
| Liver (g)               | 11.07 ± 0.94 | 11.71 ± 0.84 | 11.24 ± 0.69 | 11.85 ± 1.35 | 12.73 ± 0.64 | 12.20 ± 1.22 | 14.98 ± 3.04 | 16.67 ± 2.15* |
| (g%)                    | 2.87 ± 0.16  | 2.98 ± 0.11  | 2.90 ± 0.15  | 3.01 ± 0.22  | 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 1-3. Organ weight data for male SD rats treated with LG100268 for 28 days

| Dose (mg/kg)            | 0            | 0.016        | 0.08         | 0.4          | 2             |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| No. of animals examined | 5            | 5            | 5            | 5            | 5             |
| Males                   |              |              |              |              |               |
| Body weight (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** |

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 animals examined | 5           | 5           | 5             | 5              |
| Males                   |             |             |               |                |
| Body weight (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 animals examined | 5            | 5            | 5           | 5             | 5            | 5             | 5              | 5              |
| Males                   |              |              |             |               |              |               |                |                |
| Body weight (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  $P < 0.01$ .

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

| Dose (mg/kg)            | 0            | 1            | 3            | 10          |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| No. of animals examined | 5            | 5            | 5            | 5           |
| Males                   |              |              |              |             |
| Body weight (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 |

Each value represents the mean ± 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

| Sex   | Organs and findings | Dose (mg/kg)<br>No. of animals examined    | 0 | 3        | 10        | 30        | 0       | 30           | 100          | 300          |
|-------|---------------------|--------------------------------------------|---|----------|-----------|-----------|---------|--------------|--------------|--------------|
|       |                     |                                            | 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, 0)** | 0       | 4(4, 0)*     | 4(4, 0)*     | 5(4, 1)**    |
|       |                     | Colloid depletion (±)                      | 0 | 2        | 1         | 0         | 0       | 0            | 0            | 1            |
|       |                     | Colloid alteration (±, +)                  |   | 4(4, 0)* | 4(3, 1)*  | 5(5, 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             |                                            | 0 | 0        | 0         | 0         | 0       | 0            | 0            | 0            |
|       | Liver               |                                            |   |          |           |           |         |              |              |              |
|       |                     | Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (±) | 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

| Sex   | Organs and findings | Dose (mg/kg)<br>No. of animals examined | 0 | 0.1 | 0.3 | 1 | 0 | 1 | 3       | 10      |
|-------|---------------------|-----------------------------------------|---|-----|-----|---|---|---|---------|---------|
|       |                     |                                         | 5 | 5   | 5   | 5 | 5 | 5 | 5       | 5       |
| Males | Thyroid             | Hypertrophy, follicular cell            | 0 | 0   | 0   | 0 | 0 | 0 | 0       | 0       |
|       |                     | Hyperplasia, follicular cell            | 0 | 0   | 0   | 0 | 0 | 0 | 0       | 0       |
|       |                     | Colloid depletion (±)                   | 0 | 1   | 1   | 1 | 0 | 0 | 1       | 3       |
|       |                     | 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 | 0   | 0   | 0 | 0 | 0 | 0       | 0       |
|       |                     | Hypertrophy, pars distalis              | 0 | 0   | 0   | 0 | 0 | 0 | 0       | 0       |
|       | Adrenal             |                                         | 0 | 0   | 0   | 0 | 0 | 0 | 0       | 0       |
|       | Liver               |                                         |   |     |     |   |   |   |         |         |
|       |                     | Glycogen accumulation (±, +)            | 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

| Sex   | Organs and findings | Dose (mg/kg)<br>No. of animals examined                | 0 | 10 | 30         | 100          |
|-------|---------------------|--------------------------------------------------------|---|----|------------|--------------|
|       |                     |                                                        | 5 | 5  | 5          | 5            |
| Males | Thyroid             | Hypertrophy, follicular cell (±)                       | 0 | 0  | 0          | 2            |
|       |                     | Hyperplasia, follicular cell (±)                       | 0 | 0  | 0          | 2            |
|       |                     | Colloid depletion (±)                                  | 0 | 1  | 3          | 1            |
|       |                     | Colloid alteration                                     | 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           | Vacuolation, pars distalis (±)                         | 0 | 0  | 0          | 0            |
|       |                     | Hypertrophy, pars distalis (±)                         | 0 | 0  | 0          | 1            |
|       | Adrenal             | Vacuolation, cortical, increased (±)                   | 0 | 0  | 0          | 2            |
|       | Liver               |                                                        |   |    |            |              |
|       |                     | Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (±, +, ++, +++) | 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. 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         | 0       | 10         | 30           | 100          |
|-------|---------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------|---------|---|------------|---------|------------|--------------|--------------|
|       |                     |                                                              | No. of animals examined | 5       | 5 | 5          | 5       | 5          | 5            | 5            |
| Males | Thyroid             | Hypertrophy, follicular cell ( $\pm$ , +)                    | 0                       | 1(1, 0) | 0 | 1(1, 0)    | 0       | 0          | 3(3, 0)      | 5(0, 5)**    |
|       |                     | Hyperplasia, follicular cell ( $\pm$ )                       | 0                       | 0       | 0 | 1          | 0       | 0          | 3            | 4*           |
|       |                     | Colloid depletion ( $\pm$ )                                  | 0                       | 1       | 2 | 3          | 0       | 3          | 3            | 5*           |
|       |                     | Colloid depletion ( $\pm$ )                                  | 0                       | 0       | 0 | 0          | 0       | 0          | 2            | 2            |
|       |                     | Decrease in T4 level <sup>a)</sup>                           | 0                       | 0       | 0 | 0          | 0       | 0          | 0            | 0            |
|       |                     | Decrease in T3 level <sup>b)</sup>                           | 0                       | 0       | 0 | 0          | 0       | 0          | 0            | 0            |
|       | Pituitary           | Vacuolation, pars distalis ( $\pm$ )                         | 0                       | 0       | 0 | 1          | 1       | 2          | 2            | 3            |
|       |                     | Hypertrophy, pars distalis ( $\pm$ , +)                      | 0                       | 0       | 0 | 1(1, 0)    | 1(1, 0) | 2(2, 0)    | 2(2, 0)      | 5(4, 1)*     |
|       | Adrenal             | Vacuolation, cortical, increased ( $\pm$ )                   | 0                       | 0       | 0 | 0          | 0       | 0          | 0            | 5**          |
|       | Liver               | Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular ( $\pm$ , +, ++, +++) | 0                       | 0       | 0 | 2(2,0,0,0) | 0       | 3(3,0,0,0) | 5(2,3,0,0)** | 5(0,0,3,2)** |
|       |                     |                                                              |                         |         |   |            |         |            |              |              |

$\pm$ , 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. Histopathological findings in male SD rats treated with PTU for 28 days

| 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            |
| Males | Thyroid             | Hypertrophy, follicular cell ( $\pm$ , +, ++, +++)       | 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 ( $\pm$ , +, ++)            | 0                       | 0          | 3(2, 1, 0)   | 5(2, 3, 0)** | 5(0, 0, 5)** | 5(0, 0, 5)** |
|       |                     | Colloid depletion ( $\pm$ , +, ++, +++)                  | 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 ( $\pm$ , +, ++, +++) <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 ( $\pm$ , +, ++, +++) <sup>b)</sup> | 0                       | 0          | 5(5,0,0,0)** | 5(0,2,3,0)** | 5(0,0,0,5)** | 5(0,0,0,5)** |
|       | Liver               |                                                          | 0                       | 0          | 0            | 0            | 0            | 0            |

$\pm$ , 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            |
| 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 depletion (±, +, ++, +++)                  | 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            | -            |

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

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

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

<sup>c)</sup>: 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            |
| Males | 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 <sup>a)</sup>                     | 0                       | 0           | 0            | 0            |
|       |                     | Decrease in T3 level <sup>b)</sup>                     | 0                       | 0           | 0            | 0            |
|       | Liver               | Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (±, +, ++, +++) | 0                       | 4(4,0,0,0)* | 5(0,4,1,0)** | 5(0,0,3,2)** |
|       |                     |                                                        |                         |             |              |              |

$\pm$ , 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.



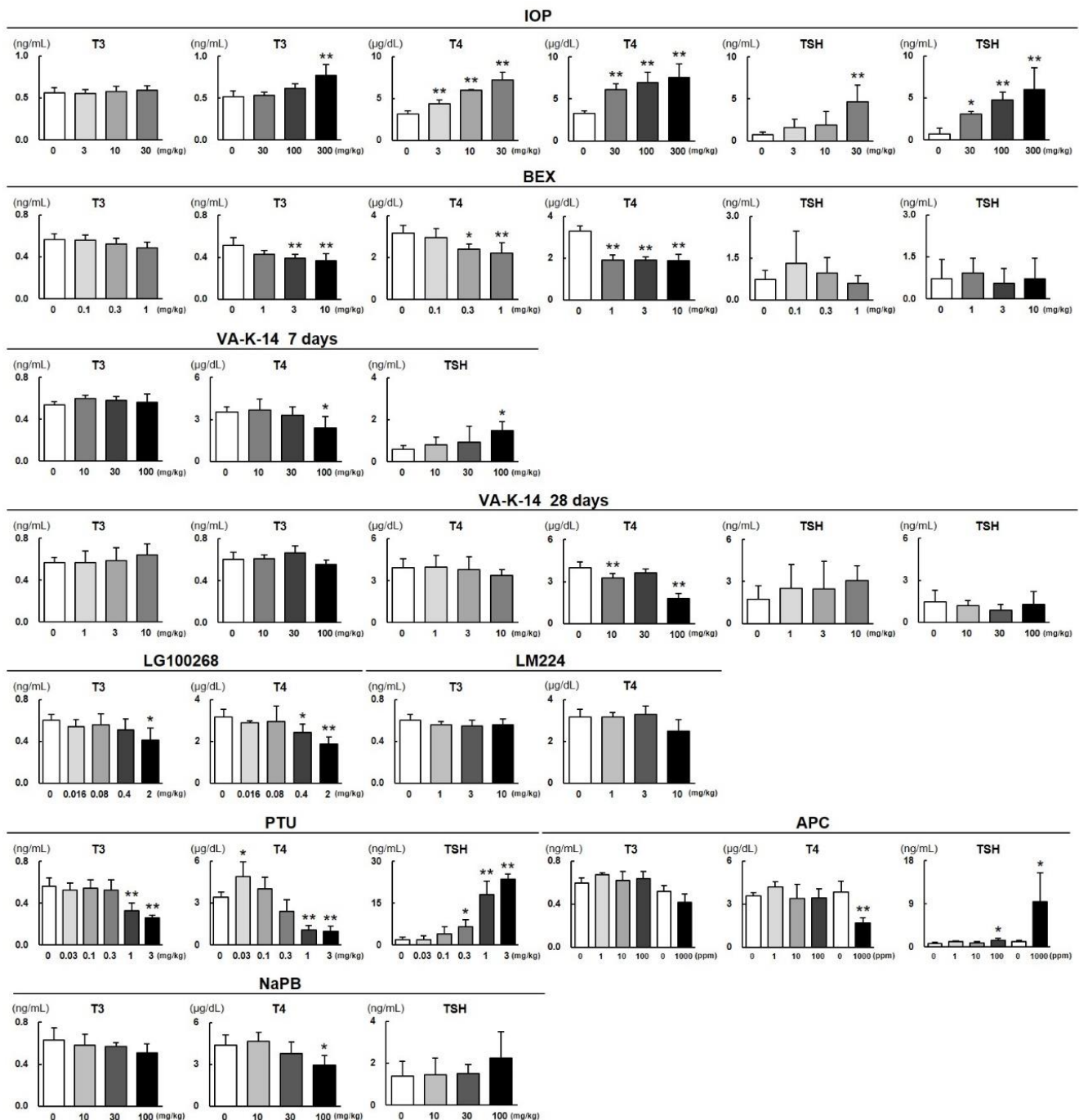


Figure 1. Serum hormone levels in male SD rats.

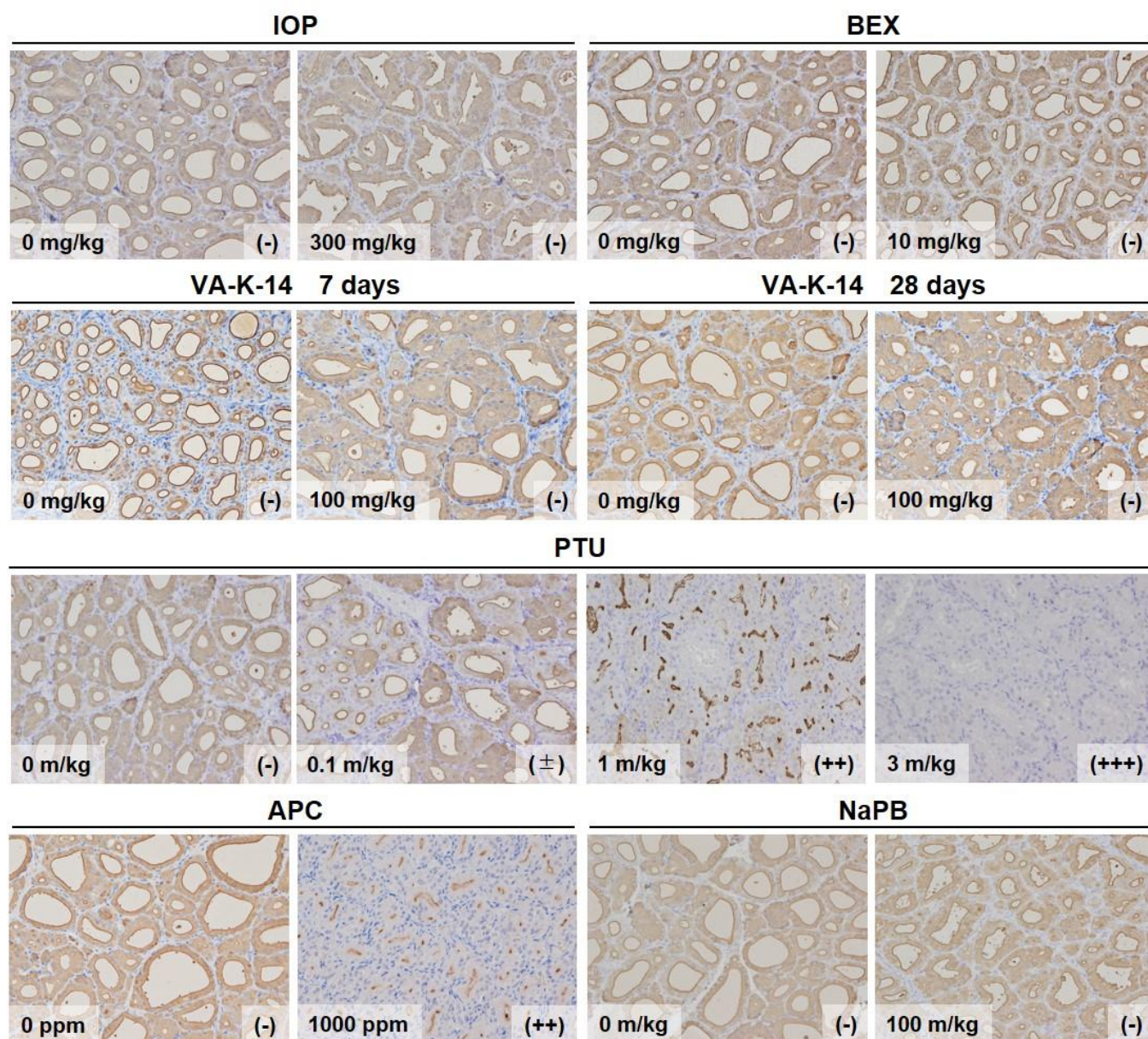


Figure 2. Immunohistochemistry for T4 in the thyroid gland of male SD rats.



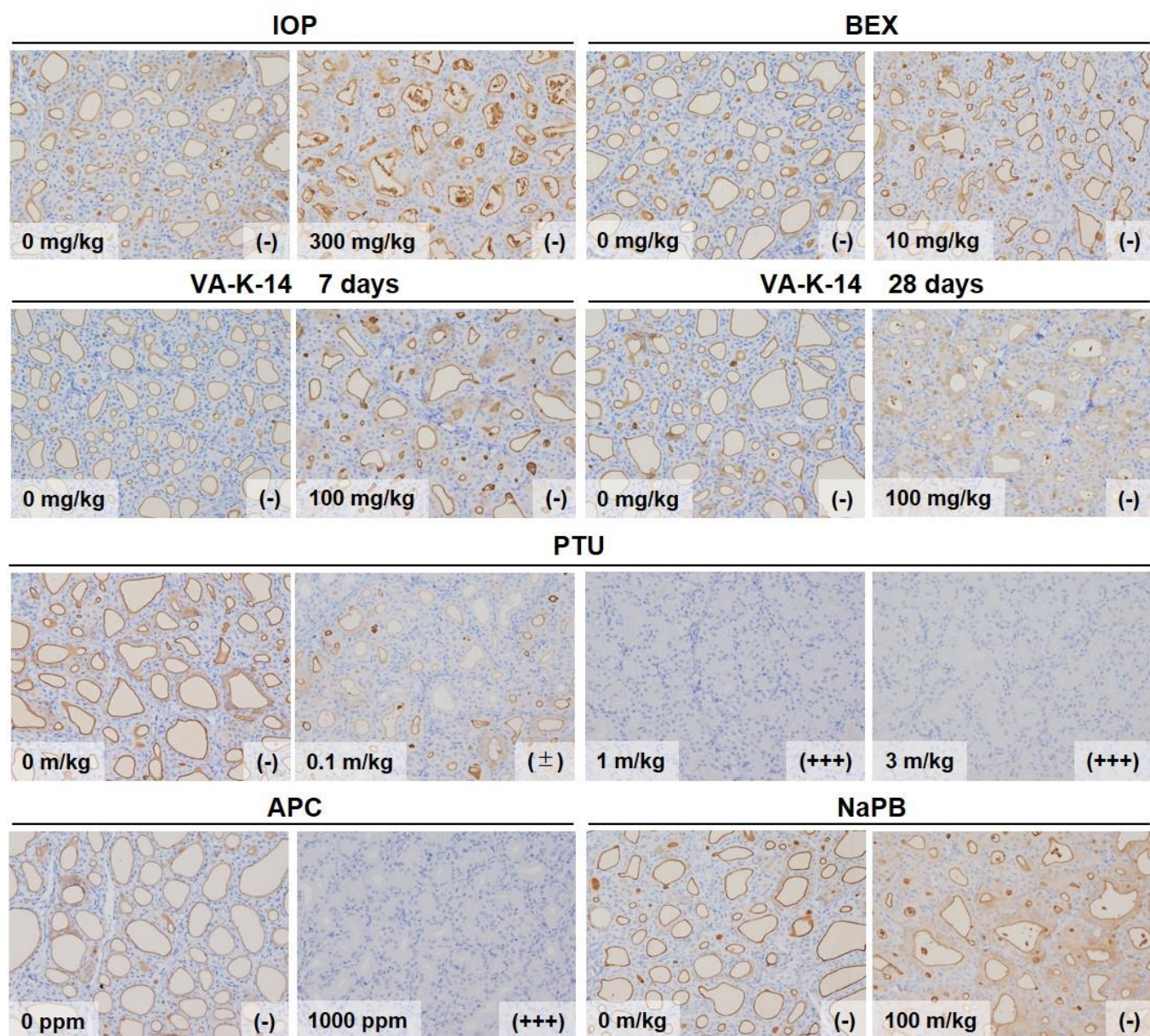


Figure 3. Immunohistochemistry for T3 in the thyroid gland of male SD rats.

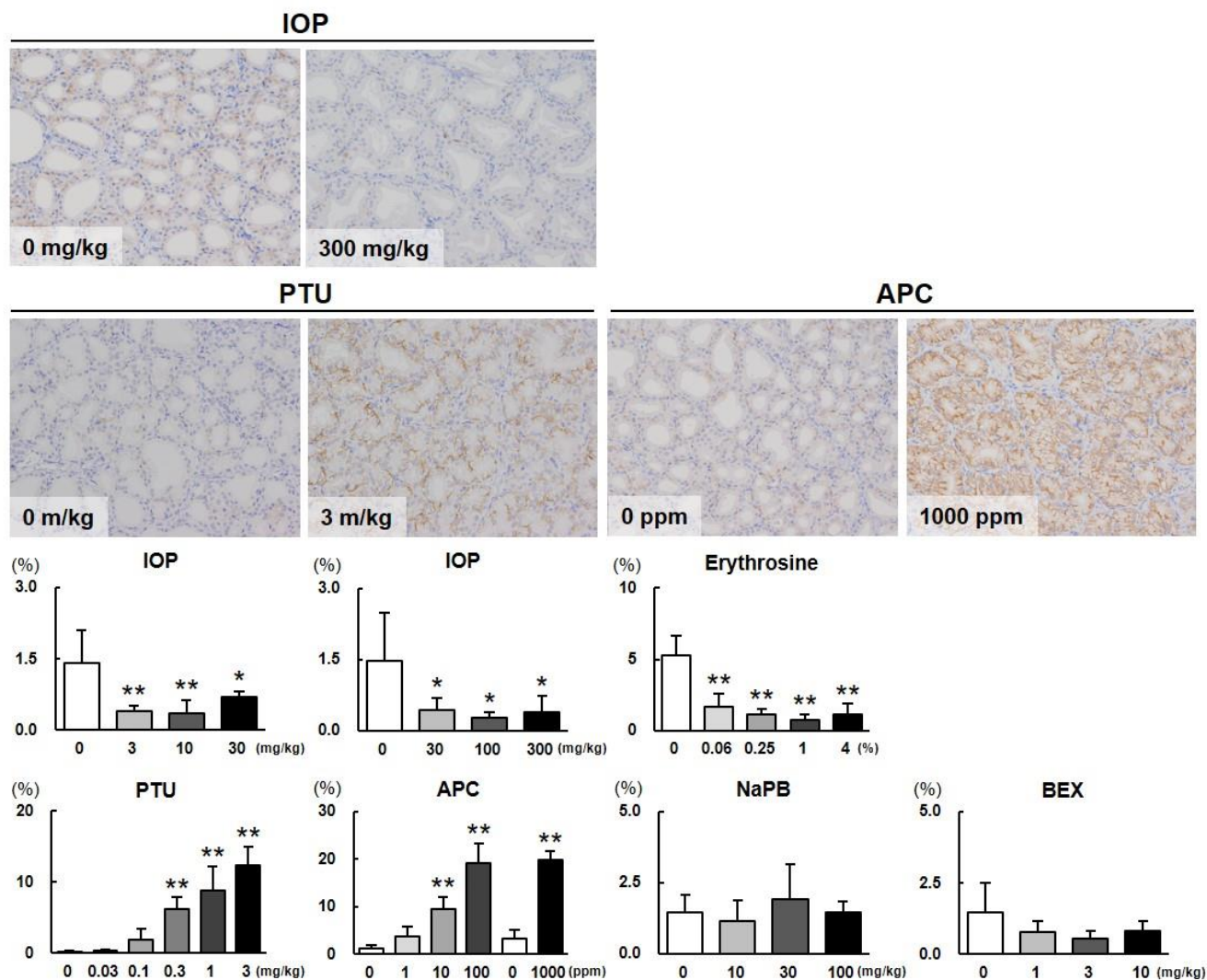


Figure 4. Immunohistochemistry for NIS in the thyroid gland of male SD rats. \* and \*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.



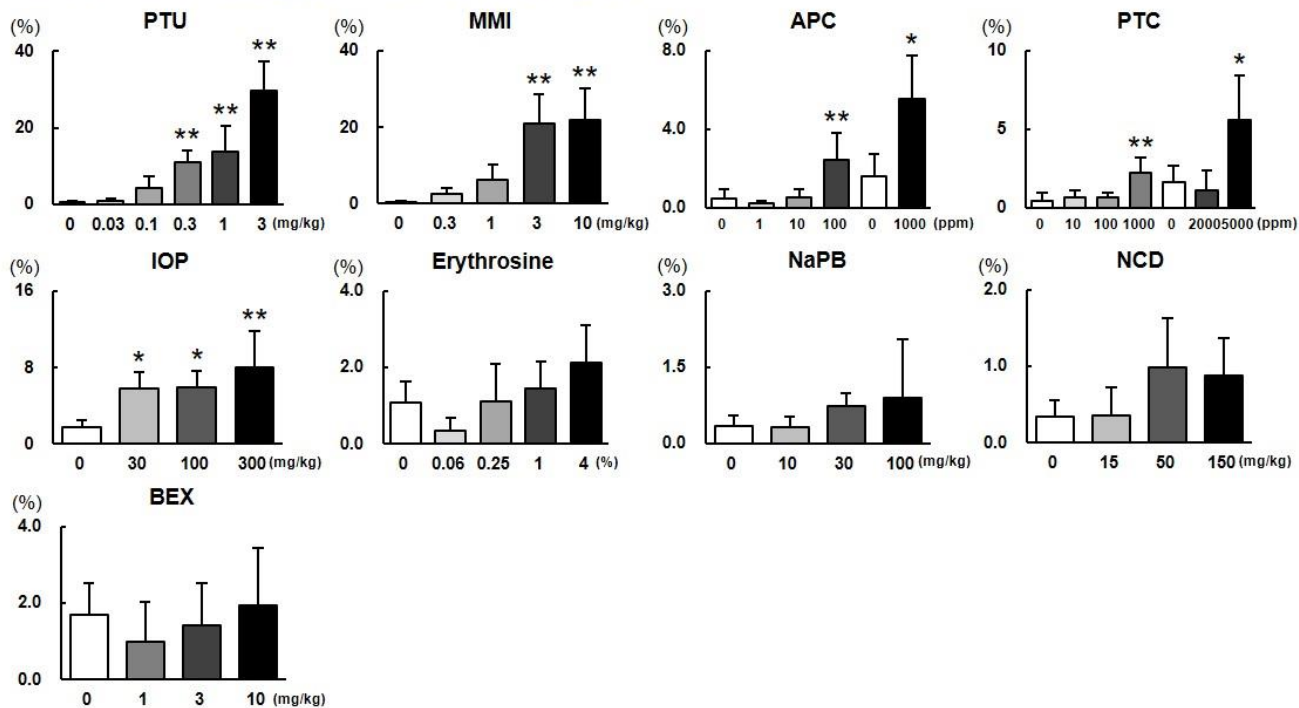
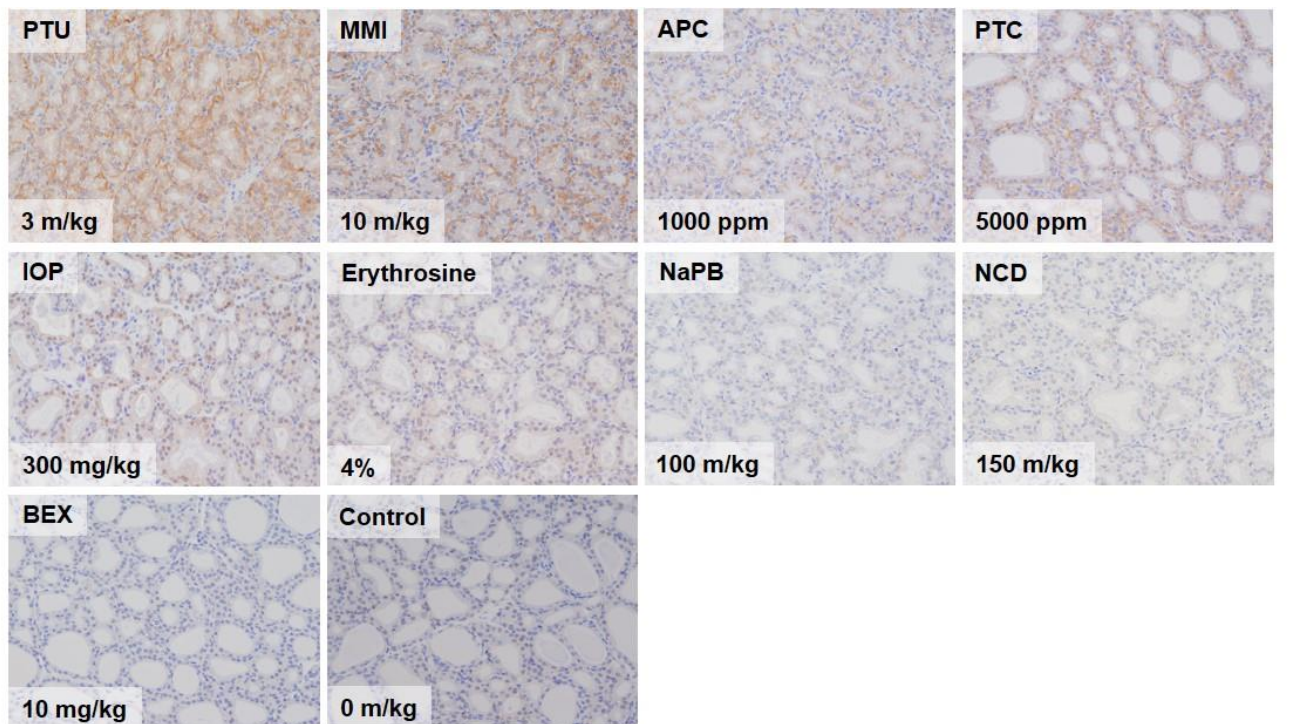


Figure 5. Immunohistochemistry for NQO1 in the thyroid gland of male SD rats. \* and \*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

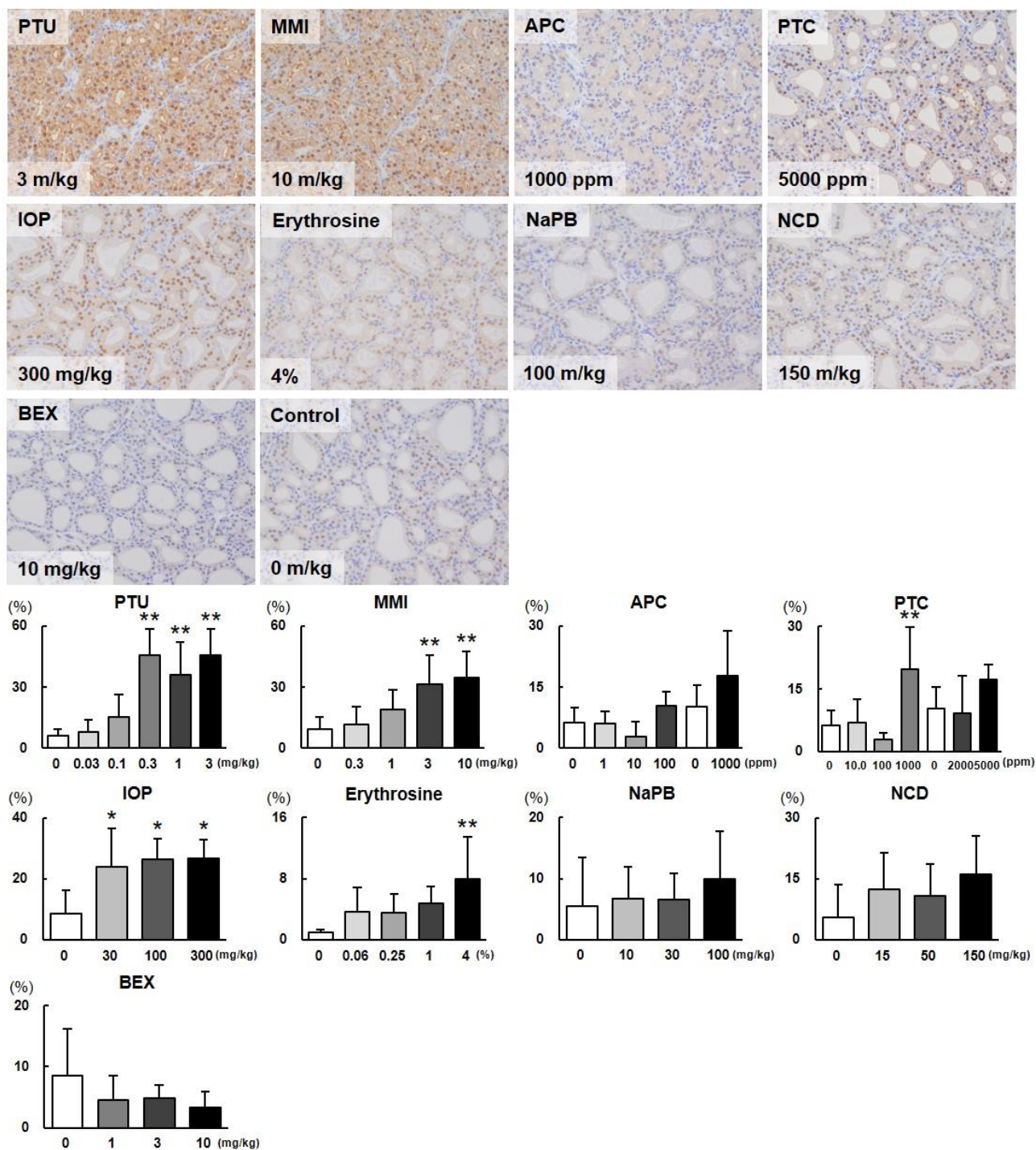


Figure 6. Immunohistochemistry for GPX2 in the thyroid gland of male SD rats. \* and \*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.



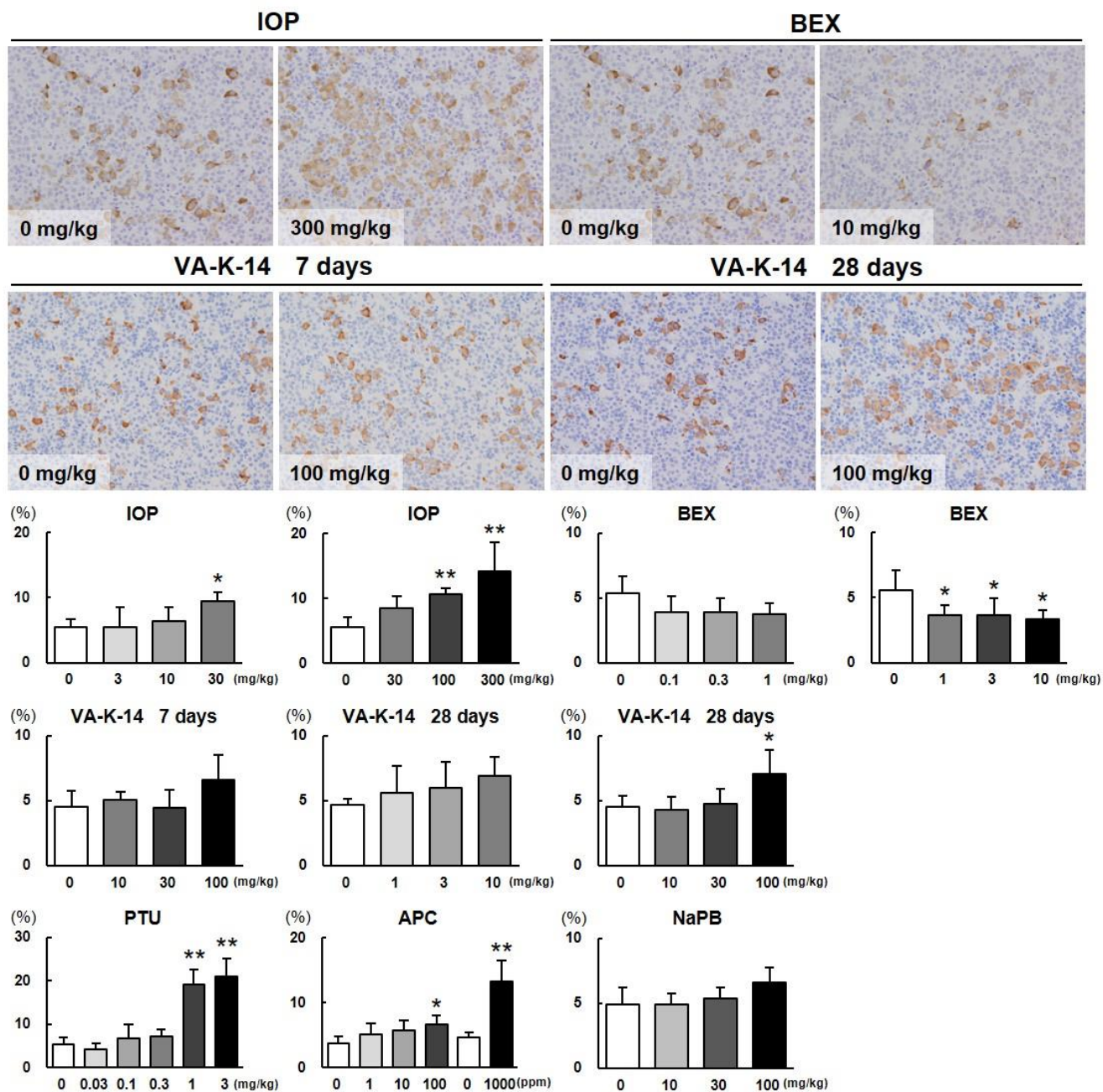


Figure 7. Immunohistochemistry for TSH in the pituitary gland of male SD rats. \* and \*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

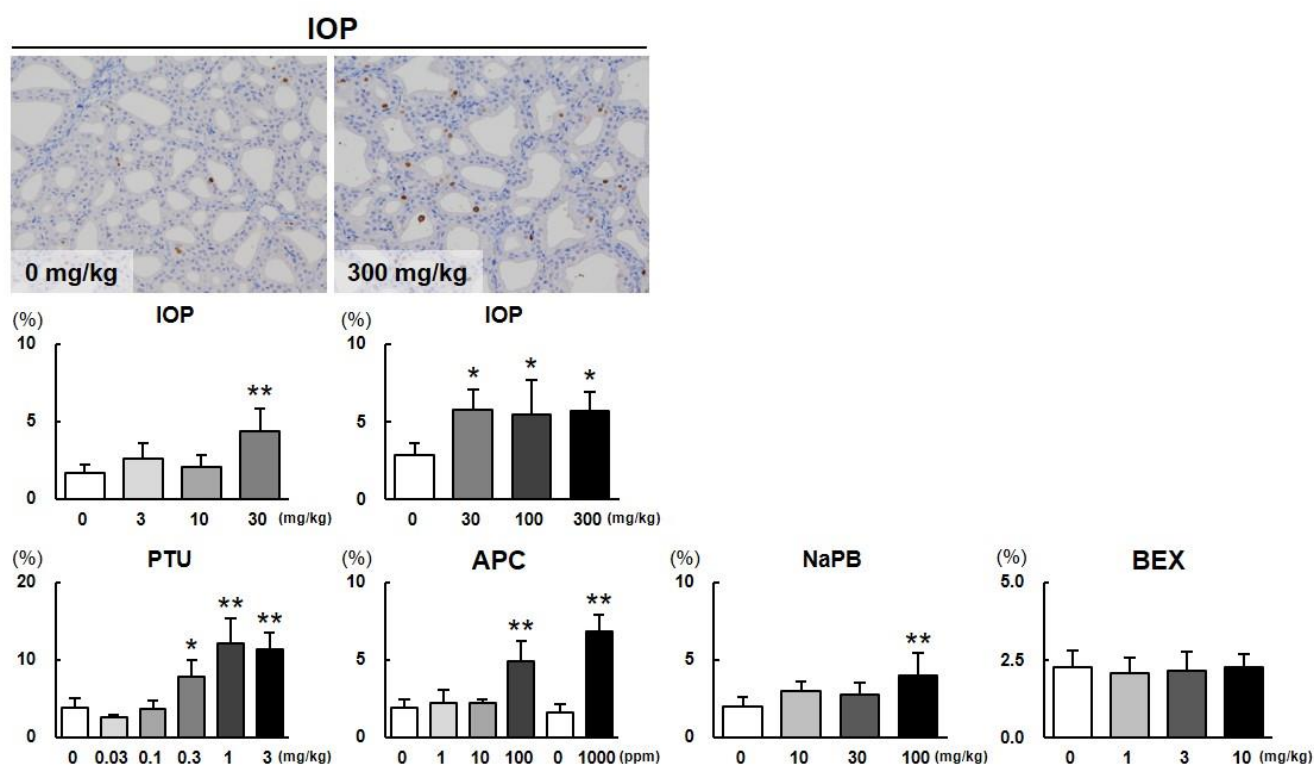


Figure 8. Immunohistochemistry for Ki67 in the thyroid gland of male SD rats. \* and \*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

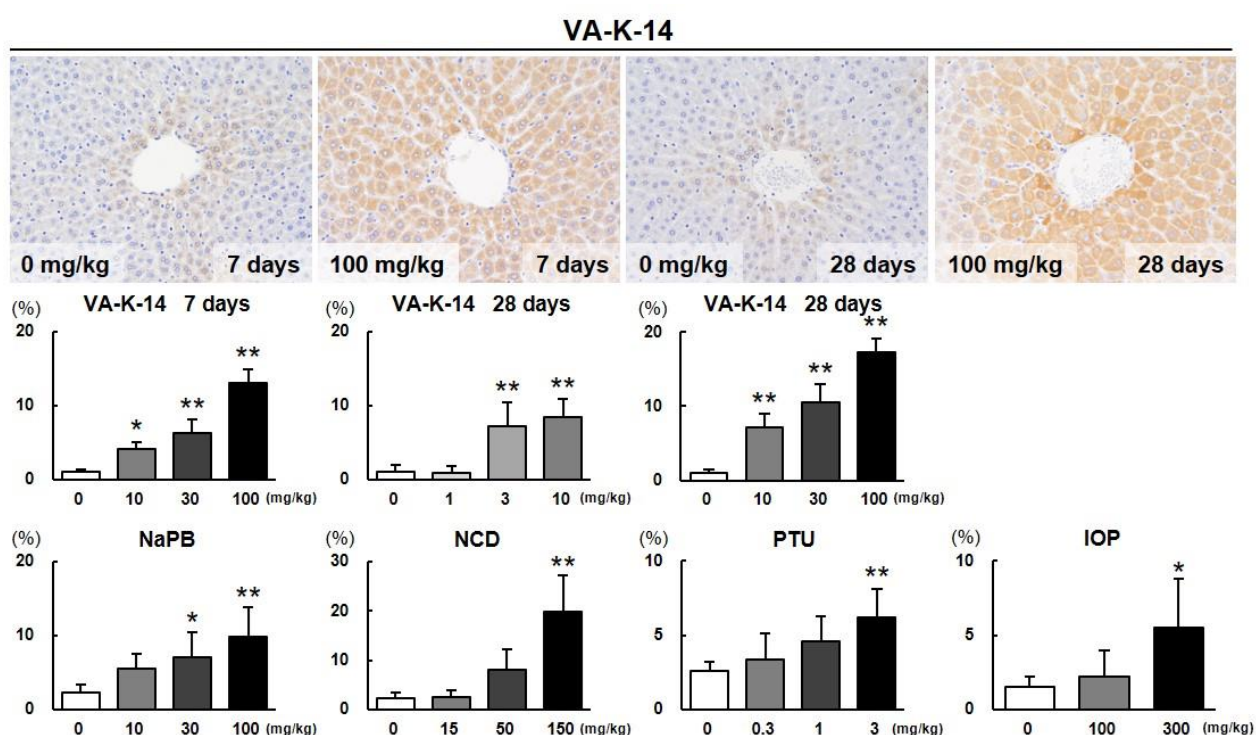


Figure 9. Immunohistochemistry for UGT1A6 in the liver of male SD rats. \* and \*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.



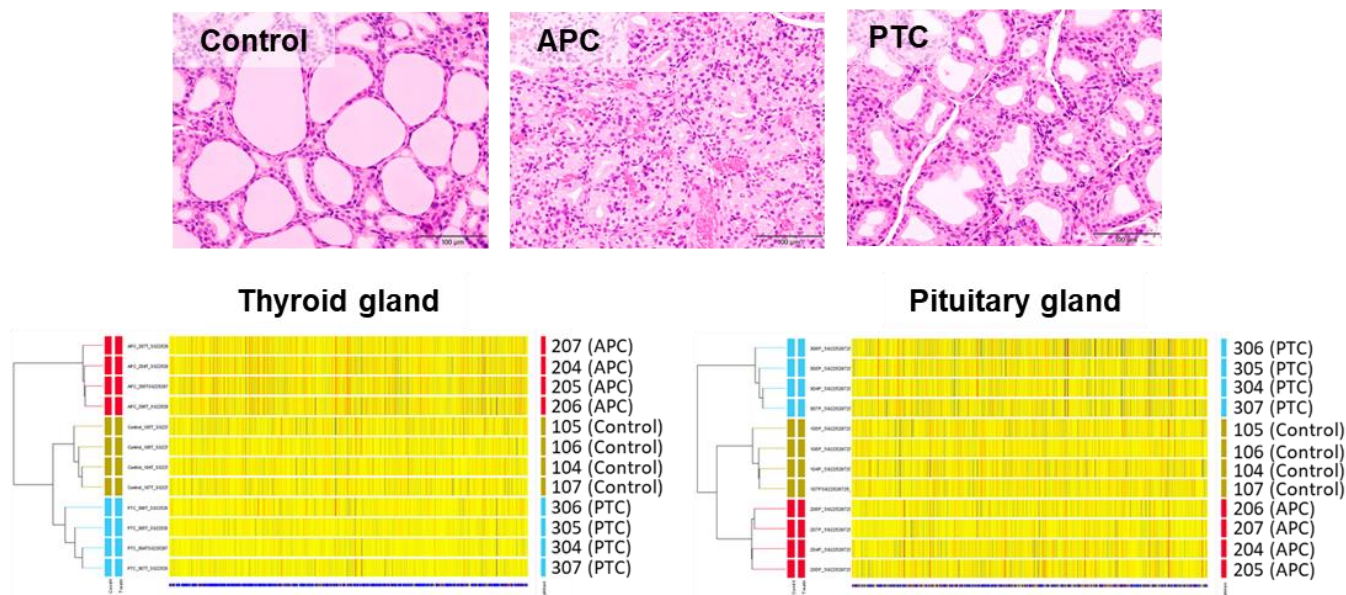


Figure 10. Representative histopathological findings in the thyroid gland of male SD rats treated with APC and PTC for 28 days (upper column). Cluster analysis of microarray data obtained from thyroid gland and pituitary gland (lower column).

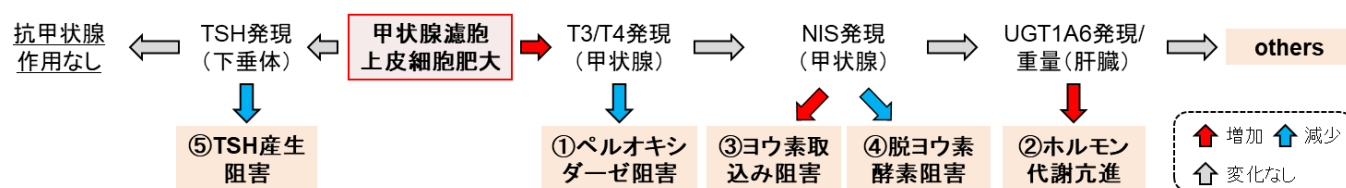


Figure 11. Flowchart for detection and mechanism estimation of antithyroid chemicals.

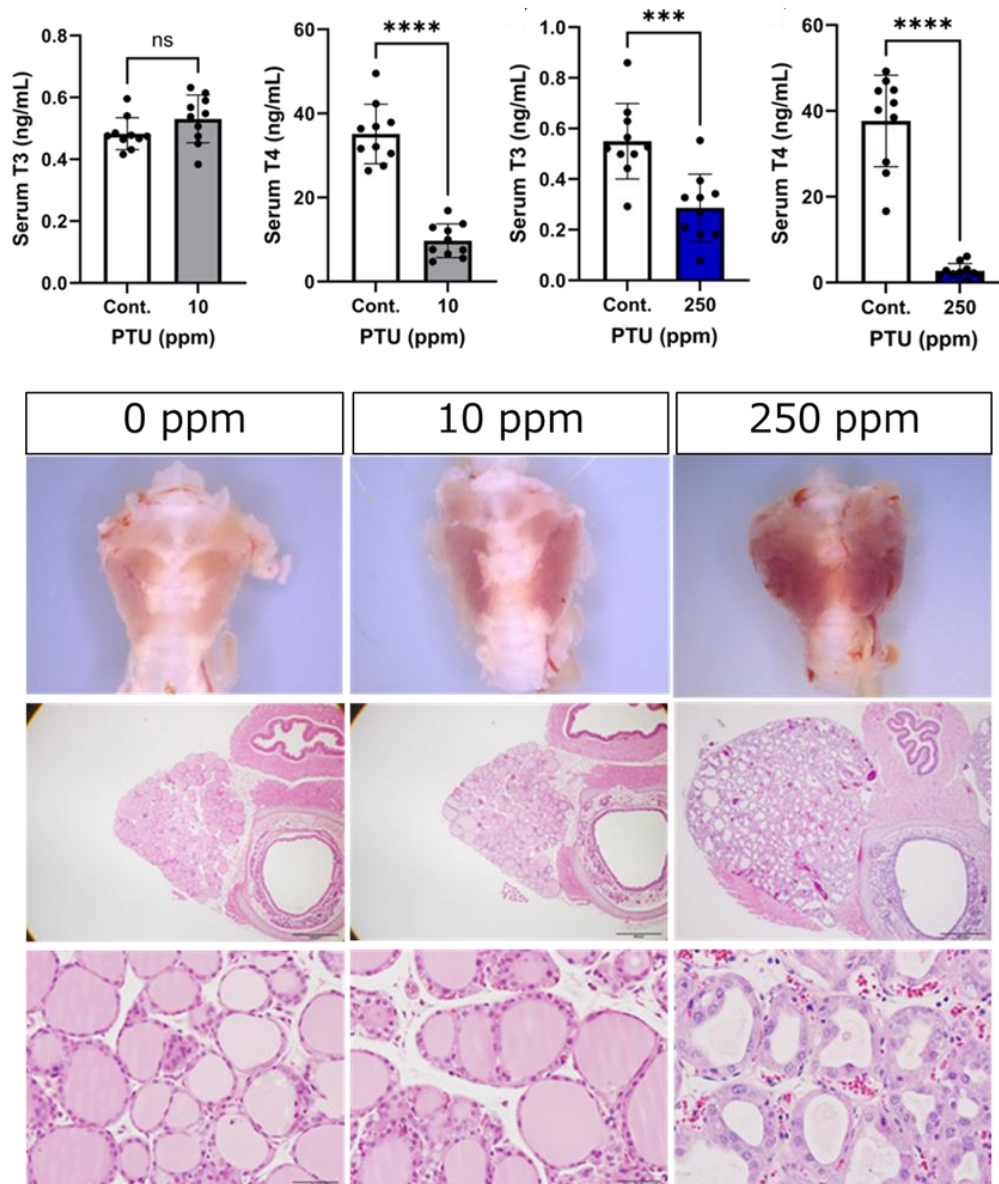


Figure 12. Effects of perinatal exposure to PTU on serum T3 and T4 levels and histology in the thyroid of dams. \*\*\* and \*\*\*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.001$  and  $0.0001$ , respectively. ns: not significant.

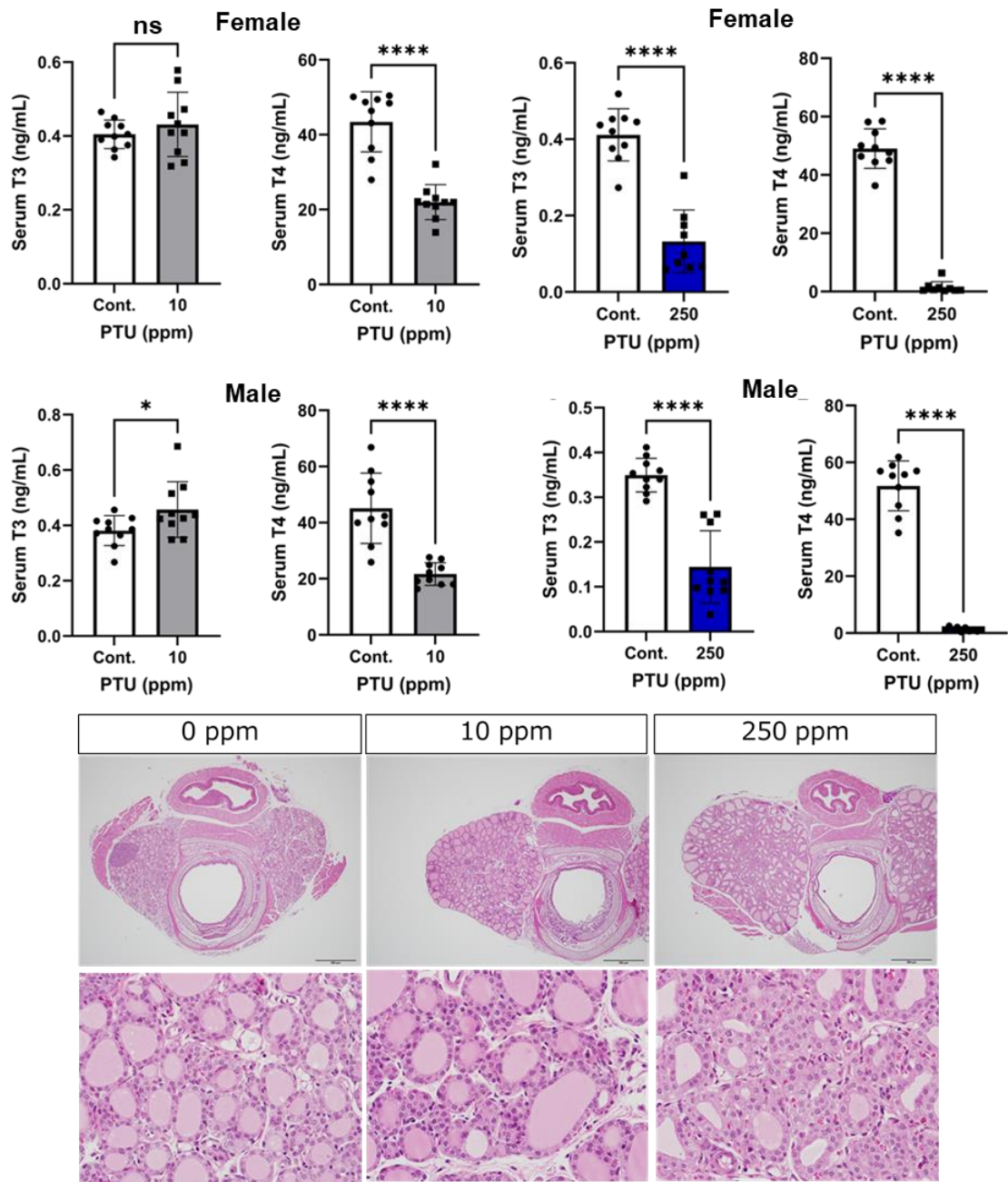


Figure 13. Effects of perinatal exposure to PTU on serum T3 and T4 levels and histology in the thyroid of pups. \* and \*\*\*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $0.0001$ , respectively. ns: not significant.

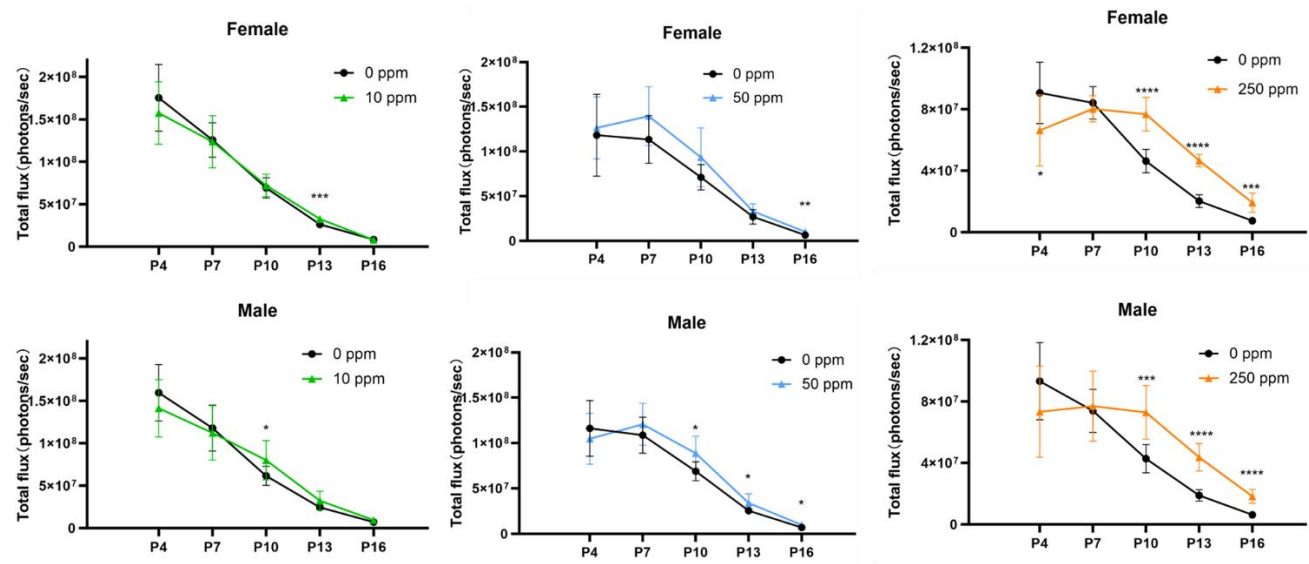


Figure 14. Effects of perinatal exposure to PTU on *in vivo* luminescence in Syn-Rep mice. \*, \*\*, \*\*\* and \*\*\*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.05$ , 0.01, 0.001 and 0.0001, respectively.

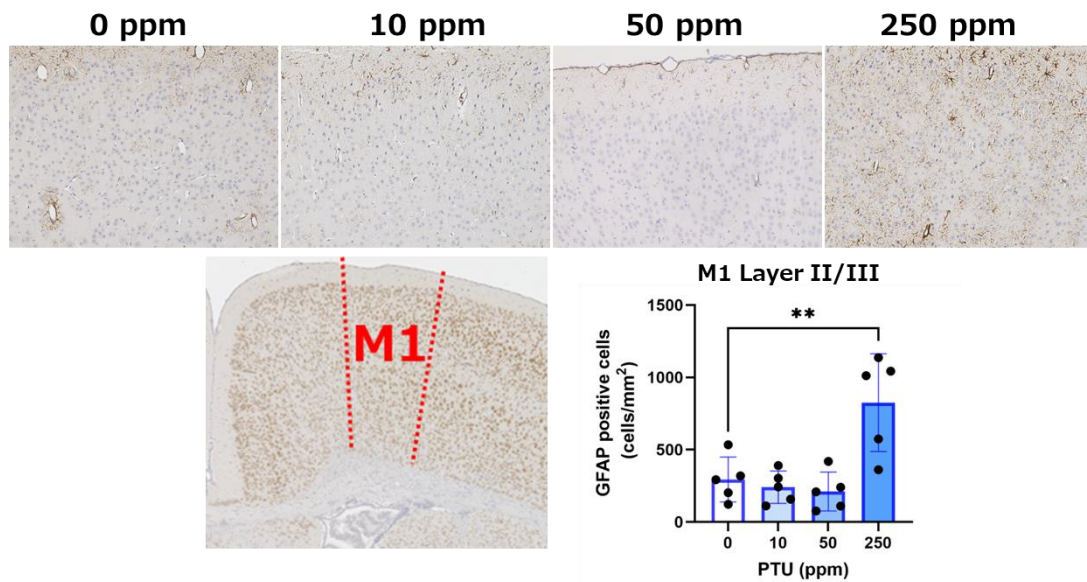


Figure 15. Immunohistochemistry for GFAP in the brain of PTU-treated pups. \*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.01$ .

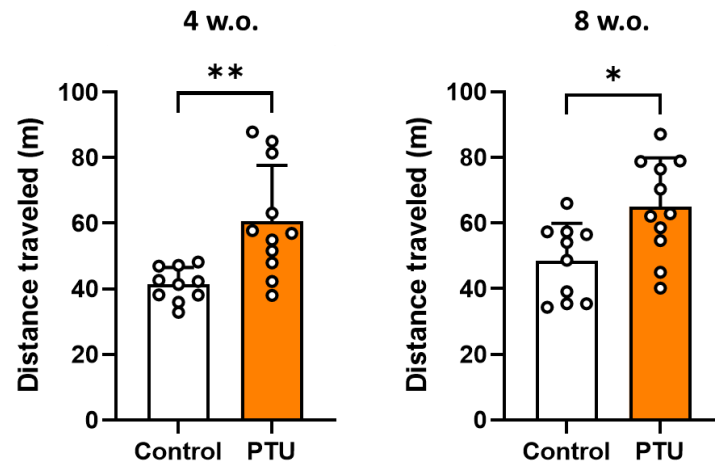


Figure 16. Effects of perinatal exposure to PTU on distance traveled in pups. \* and \*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

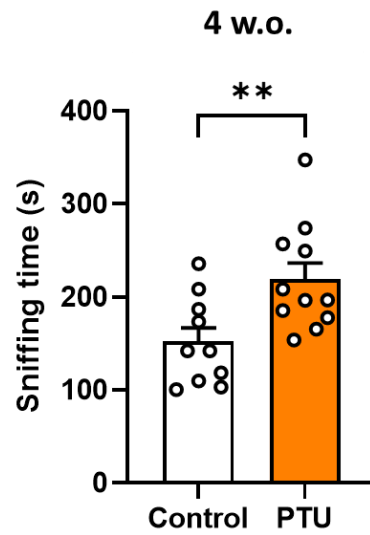


Figure 17. Effects of perinatal exposure to PTU on sniffing time in pups. \*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.01$ .



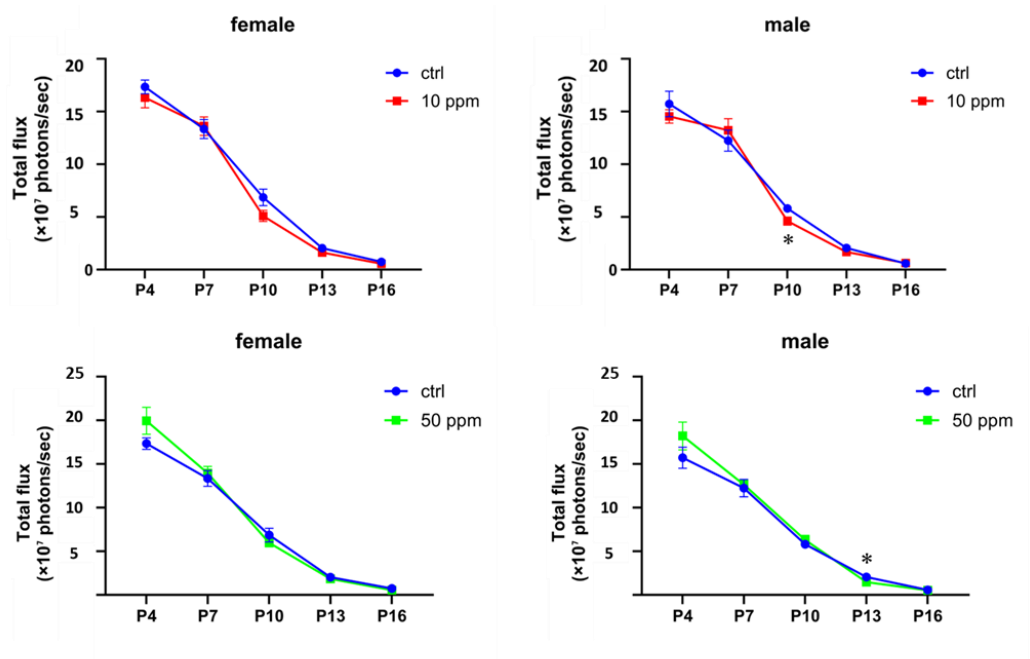


Figure 18. Effects of perinatal exposure to chlorpyrifos on *in vivo* luminescence in Syn-Rep mice. \*: significantly different from the controls at  $P < 0.05$ .

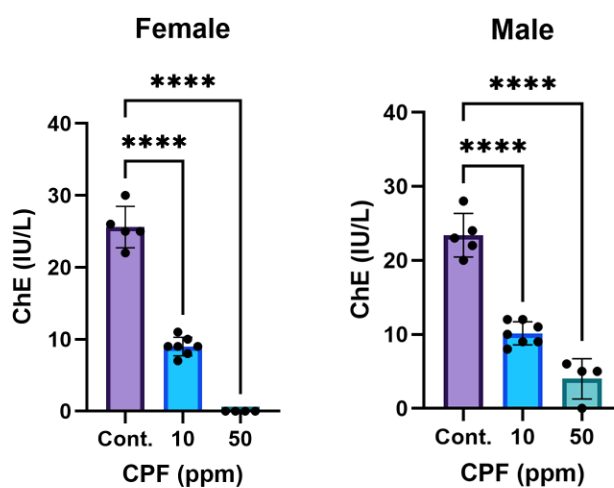


Figure 19. Effects of perinatal exposure to chlorpyrifos on serum cholinesterase (ChE) levels in pups. \*\*\*\*: significantly different from the controls at  $P < 0.0001$ .

| No. | 動物種<br>(系統)  | 世代 | 投与期間<br>(方法)                  | 用量<br>(mg/kg 体重/日) | 定量方法              | 変動                                    | 文献                                                        |
|-----|--------------|----|-------------------------------|--------------------|-------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1   | ラット<br>(SD)  | F0 | 交配前 2 週<br>～出産後 6 週<br>(強制経口) | 1, 10, 100         | 蛍光免疫<br>測定法       | 雌：変化なし、<br>雄：減少<br>(100mg/kg 体重/日)    | Jeong et al.<br>Toxicology.<br>2006;220:189-<br>202       |
|     |              | F1 | P21 から 13 週<br>(強制経口)         | 1, 10, 100         | 蛍光免疫<br>測定法       | 雌：減少<br>(100mg/kg 体重/日)、<br>雄：減少(全用量) |                                                           |
| 2   | マウス<br>(CD1) | F0 | E15～E18<br>(強制経口)             | 3, 6               | 放射標識<br>免疫測定<br>法 | 減少(6mg/kg 体重/日)                       | De Angelis et al.<br>Toxicol Sci.<br>2009;108:311-<br>319 |
|     |              | F1 | P11～P14<br>(皮下)               | 1, 3               | 放射標識<br>免疫測定<br>法 | 雌：変化なし、<br>雄：減少<br>(3mg/kg 体重/日)      |                                                           |
| 3   | マウス<br>(SW)  | F1 | GD17～GD20<br>(母動物皮下)          | 1, 5               | ELISA 法           | 増加<br>(雌 5mg/kg 体重/日)                 | Haviland et al.<br>Reprod Toxicol.<br>2010;29(1):74-79    |
| 4   | マウス<br>(CD1) | F0 | GD0～離乳<br>(強制経口)              | 0.1, 1, 10         | —                 | —                                     | Nittoli et al.<br>Cells.<br>2021;10(9):2187               |
|     |              | F1 | 離乳～<br>生後 180 日<br>(強制経口)     | 0.1, 1, 10         | ELISA 法           | 減少<br>(10mg/kg 体重/日)                  |                                                           |
| 5   | マウス<br>(CD1) | F0 | E0.5～離乳<br>(強制経口)             | 1, 10              | —                 | —                                     | Colella et al.<br>Int J Mol Sci.<br>2023;24(3):3054       |
|     |              | F1 | 離乳～P21<br>(強制経口)              | 1, 10              | ELISA 法           | 減少<br>(10mg/kg 体重/日)                  |                                                           |
| 6   | マウス<br>(CD1) | F0 | GD0～離乳<br>(強制経口)              | 0.1, 1, 10         | —                 | —                                     | Peluso et al.<br>Int J Mol Sci.<br>2023;24:9582           |
|     |              | F1 | 離乳～生涯<br>(強制経口)               | 0.1, 1, 10         | ELISA 法           | 変化なし                                  |                                                           |
|     |              | F2 | 離乳～生涯<br>(強制経口)               | 0.1, 1, 10         | ELISA 法           | 減少<br>(雄 1, 10mg/kg 体重/日)             |                                                           |

E: embryonic day    GD: gestational day    P: postnatal day

**Figure 20.** げっ歯類の胎生期から生後にかけてクロルピリホスを投与した文献の調査。投与後のげっ歯類の血清中の甲状腺ホルモン量は減少する傾向が見られた。

| No. | 動物種<br>(系統)     | 投与期間<br>(方法)   | 用量<br>(mg/kg 体重/日) | 定量方法      | 変動                      | 文献                                                              |
|-----|-----------------|----------------|--------------------|-----------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1   | ラット<br>(SD)     | 4 日<br>(強制経口)  | 1                  | LC/MS/MS  | 変化なし                    | Levin et al. Neurotoxicol Teratol. 2014;41:35-42                |
| 2   | ラット<br>(Wister) | 4 週<br>(強制経口)  | 20                 | ELISA 法   | 減少                      | Mosbah et al. Toxicol Ind Health. 2016;32(7):1266-77            |
| 3   | マウス<br>(CD1)    | 7 日<br>(強制経口)  | 0.1, 1, 10         | ELISA 法   | 減少<br>(1, 10mg/kg 体重/日) | Porreca et al. Sci Rep. 2016;6:38131                            |
| 4   | ラット<br>(Wister) | 30 日<br>(強制経口) | 6.75               | 化学発光免疫測定法 | 減少                      | Chebab et al. Biomed Pharmacother. 2017;96:1310-1316            |
| 5   | ラット<br>(Wister) | 4 時間<br>(経口胃管) | 100                | ELISA 法   | 増加                      | Cobilinschi et al. Acta Endocrinol (Buchar). 2021;17(2):177-185 |
| 6   | ラット<br>(Wister) | 5 日<br>(強制経口)  | 0.01, 0.1, 1, 10   | 電気化学発光法   | 増加<br>(全用量)             | Otenio et al. Drug Chem Toxicol. 2022;45(1):387-392             |
| 7   | ラット<br>(Wister) | 15 日<br>(強制経口) | 30                 | ELISA 法   | 減少                      | Farkhondeh et al. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.2025  |

**Figure 21.** げっ歯類の成体にクロルピリホスを投与した文献の調査。投与後のげっ歯類の血清中の甲状腺ホルモン量は減少・増加・変化なしのケースがあった。

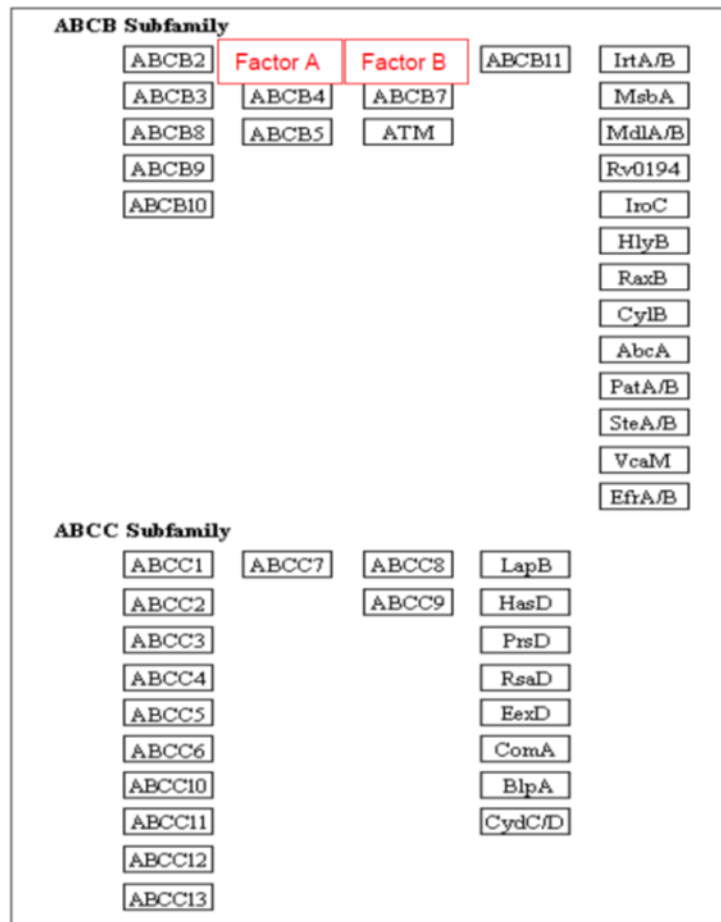


Figure 22.  $\text{THR}\alpha$  ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS解析）。薬剤排出トランスポーターFactor A, Bを選定した。

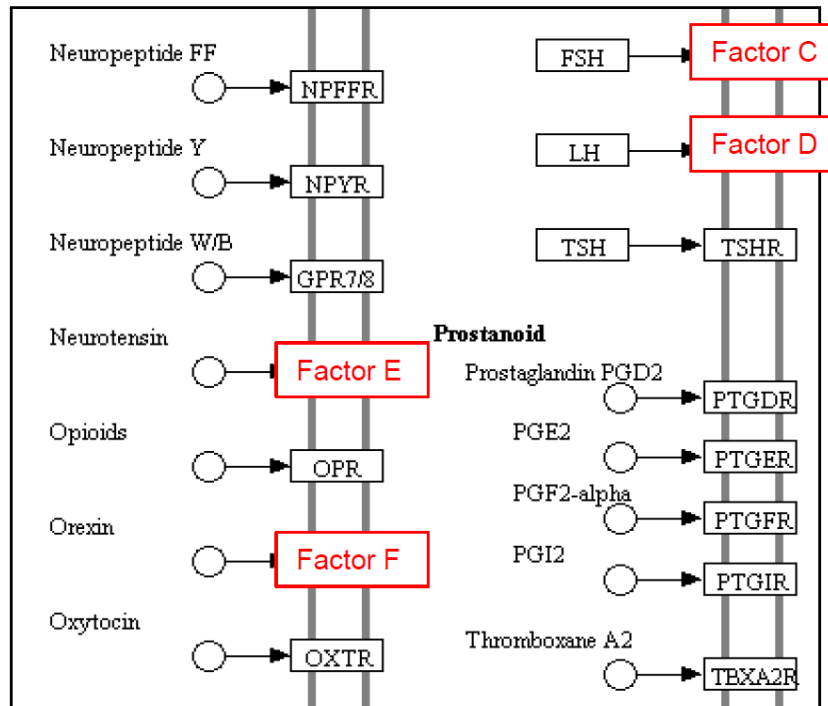


Figure 23.  $\text{THR}\alpha$  ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS解析）。神経ペプチド・ホルモン受容体Factor C~Fを選定した。

| Transcription factors |            |            |
|-----------------------|------------|------------|
| HSF4                  | GTF2IP14   | AC092810.1 |
| SIM2                  | CICP14     | AC090616.1 |
| BATF3                 | TCEA1P4    | Factor O   |
| GFI1                  | TCEAL6     | SCX        |
| TAL1                  | SPDEF      | AP001893.2 |
| EYA4                  | TFAP2B     | RIPPLY2    |
| Factor G              | Factor K   | ASXL3      |
| Factor H              | Factor L   | BATF2      |
| Factor I              | AC027644.1 |            |
| NOC2LP1               | YY2        |            |
| Factor J              | Factor M   |            |
| TCEA3                 | Factor N   |            |

Figure 24.  $\text{THR}\alpha$  ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS解析）。転写因子であるFactor G~Oを選定した。