

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 7 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

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知られているが、抗甲状腺物質の検出および次世代影響の有無を適切に評価するためのエンドポイントは未だ確立されていない。本研究では、化学物質の抗甲状腺作用の評価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 7 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における甲状腺の病理組織学的解析が、①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤、②ヨウ素取込み阻害剤、③脱ヨウ素酵素阻害剤、④甲状腺ホルモン代謝促進剤の検出において最も鋭敏な指標であることが示された。網羅的遺伝子発現解析により新たに見出された DPP4・SNPH を用いた免疫染色は、病理解析結果をサポートする指標として利用できる可能性がある。また、甲状腺 T3・NIS、下垂体 TSH および肝 UGT1A6 等の各種免疫染色を併用することで、抗甲状腺作用の機序推定が可能であることが示された。本手法は、既存の OECD ガイドライン試験（TG407）に容易に組み込みが可能であり、化学物質の抗甲状腺作用検出のための簡便かつ効率的な *in vivo* 評価法として利用し得る。

マウス周産期甲状腺機能低下モデルを用いた統合的な解析の結果、妊娠末期の母動物と離乳期の児動物の甲状腺指標（T4 等）には強い線形関係を示し、母体甲状腺ホルモン環境の変動が児動物における甲状腺機能低下の程度と整合して変化することが示唆された。この結果は、児動物の甲状腺ホルモン測定を含む DNT 試験（TG426）や拡張一代生殖毒性試験（EOGRTS, TG443）といった高負荷の試験に進む前に、出生前発生毒性試験（TG414）や生殖発生毒性スクリーニング試験（TG421）で取得可能な妊娠末期母動物の T4/FT4 および TSH を“早期警戒（トリガー）指標”として活用し、追加試験の要否判断や優先順位付けに資する可能性を示す。また、*in vivo* イメージング解析（BLI）が、母動物および児動物の甲状腺ホルモン指標と一貫した関連を示すことを確認した。さらに BMD 解析により、BLI_mean の変動が生じる用量域が定量化され、行動学的変化が示唆される低用量域においても、脳発達影響を検出し得る可能性が示された。

ヒト iPS 細胞を用いた検討の結果、甲状腺ホルモン受容体 α 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評価に有用であることが考えられる。

国際的には、OECD・EPA/ICCVAM 等の専門家会議において、甲状腺機能低下に関する *in vitro* 評価系の開発およびバリデーションが進められている。一方、提案されている評価法はいずれもリスク評価ではなく、ハザード評価を主眼としている点に留意すべきであり、使用する培養細胞の安定供給やヒト由来細胞の使用における倫理的な課題についても継続的な情報収集が必要と考えられた。

研究分担者

小川久美子 星薬科大学 薬学部 教授
 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 講師
 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

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；21KD1003/1004）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、甲状腺の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

A. 研究目的

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 (Ishida *et al.*, *Biochem Pharmacol*, 2022)。

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 28 日間反復経口投与試験 (赤根・豊田)

令和 6 年度までに、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 (ER)
- 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)
- ⑤ TSH 産生阻害: Bexarotene (BEX) および LG100268 (LG)
- ⑥ TSH 受容体拮抗: VA-K-14 および LM224 (LM)

令和 7 年度は、昨年度に投与実験を実施した 2 物質 (LG・LM) について、病理組織学的・免疫組織化学的解析を行った。また、新規被験物質として、④ 甲状腺ホルモン代謝促進剤である Pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN) の投与実験を実施した。さらに予備検討として、以下の計 7 種の抗甲状腺物質を、各物質 1 用量にて 28 日間反復経口投与した。

- ② ヨウ素取込み阻害: Ammonium perrhenate (APR)、Potassium hexafluorophosphate (PHF)、Oxyfluorfen (OFF) および Etoxazole (ETX)
- ③ 脱ヨウ素酵素阻害: Fluazinam (FLU)、Chlorothalonil (PTN) および Octhilinone (OIT)

その他の物質について、令和 7 年度は新たなバイオマーカー候補を用いた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 7 年度実施分。APC, PTC, ER 以外は強制経口投与)。

- ① PTU: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg

- MMI: 0.3, 1, 3, 10 mg/kg
- ② APC: 1, 10, 100, 1000 ppm (飲水)
PTC: 10, 100, 1000, 2000, 5000 ppm (飲水)
- ③ IOP: 3, 10, 30, 100, 300 mg/kg
ER: 0.06, 0.25, 1, 4% (混餌)
- ④ NaPB: 10, 30, 100 mg/kg
NCD: 15, 50, 150 mg/kg
PCN: 8, 25, 80 mg/kg
- ⑤ BEX: 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg
LG: 0.016, 0.8, 0.4, 2 mg/kg
- ⑥ VA-K-14: 1, 3, 10, 30, 100 mg/kg
LM: 1, 3, 10 mg/kg

予備検討試験 (APR, PHF 以外は強制経口投与)

- ② APR: 2000 ppm (飲水)
PHF: 2000 ppm (飲水)
OFF: 300 mg/kg
ETX: 500 mg/kg
- ③ FLU: 100 mg/kg
TPN: 300 mg/kg
OIT: 200 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・ナトリウム/ヨウ素共輸送体 (NIS; sodium-iodide symporter)・NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1)・glutathione peroxidase 2 (GPX2)、dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) および syntrophin (SNPH)、下垂体前葉における TSH、肝臓における甲状腺ホルモン代謝に関するグルクロン酸転移酵素 (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・DPP4・SNPH (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、令和 7 年度は⑤ TSH 産生阻害剤 (LG) 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、コーン油に懸濁した LG を 2 mg/kg/day の用量で強制経口投与した。投与濃度は令和 6 年度の赤根・豊田らの検討結果に基づき、抗甲状腺作用が認められた用量として設定した。各群 7 例のうち 3 例は病理組織学的解析用とし、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°C で凍結保存した。

また、令和 7 年度の追加検討物質として、① 甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤 4,4'-oxydianiline (ODA) および Sulfamethazine (SMT)、③ 脱ヨウ素酵素阻害剤

Chlorothalonil (TPN) を用いたラット 28 日間反復経口投与試験を実施した。各群 4 匹の雄 SD ラットを用い、投与方法は混餌投与とし、抗甲状腺作用が認められる濃度として ODA は 400 ppm、SMT は 3200 ppm、TPN は 6000 ppm を設定した。なお、本実験は前項の赤根らの試験と同時に実施するため、病理所見確認用の群は設けなかった。甲状腺および下垂体の重量測定、RNA 抽出用組織の採材は、前述の LG と同様に実施した。

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

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

令和 7 年 7 月 9 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 (ICCVAM; Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) の要請による甲状腺機能評価法のバリデーション (VMT; Validation Management Team) 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 (EPA; Environmental Protection Agency) 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。

令和 7 年 9 月 22 日および 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。さらに、OECD の専門家会議の議論の元となるデータを提供している EU-NETVAL (European Union Network of Laboratories for the Validation of Alternative Methods)、PEPPER (Public-Private Platform for the Validation of Endocrine Disruptors Characterization Method) および PARC (The European Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals) 等の諸団体の動向調査を行った。

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・松丸・石田・田熊・早田)

4-1. 動物および被験物質の投与

実験には ICR 系の妊娠マウス、ならびに雄性 Syn-Rep マウスと野生型雌性 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。

動物実験は OECD が定める DNT 試験のテストガイドライン (TG426) に準じて実施した。PTU またはクロロピリフォス (CPF) を完全調整飼料の AIN-93M に混餌し、

妊娠 Syn-Rep マウスに E6.5 より自由摂取させ、児動物の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。PTU 曝露においては、生後 13 日齢 (P13) ~P21 の期間は混餌飼料の PTU 濃度をそれぞれ半量に変更した。出生後、得られた児動物については、成長の不均一性を排除するために TG426 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。なお、雄性 Syn-Rep マウスと野生型雌性 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コホートにおいては、Syn-Rep マウスの実験制約により、非同時の独立コホートとして各用量群で陰性対照群を設定し、検討を行った。

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、LD21 に後大静脈から採血を行った。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、3,000×g、4°C で 10 分間遠心分離し、血清を -80°C で保存した。麻酔下での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. *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。吸入麻酔下で 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 (BLI; Bioluminescence Imaging) を Total flux (photons/second) として定量化した。

4-4. 児動物の剖検

in vivo イメージング解析の終了後、P21 の児動物から採血を行った。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。

4-5. 血清中マーカーの測定

児動物の血液検体は、基本的に各腹から雌雄 1 匹を選抜し、測定を行った。血液生化学マーカーについては、血液検体が不足する場合においてのみ、同腹内の同性の検体をプールして測定を行った。T3・T4 の測定はあすか製薬メディカルに、血液生化学マーカーの測定はオリエンタル酵母に依頼した。また TSH の測定は既報 (Minami *et al.*, *Regul Toxicol Pharmacol*, 2023) に従い、MILLIPLEX MAP Mouse Pituitary Magnetic Bead Panel - Endocrine Multiplex Assay (TSH) (メルクミリポア) を用いた FACS 法により測定を行った。

4-6. μ CT 解析

摘出した甲状腺を 4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定し、1%リンタングステン酸溶液に数日浸漬後、R_mCT2 (リガク) を用いて CT 撮影を行った。

4-7. イメージング MS 解析

イメージングMS解析は、株式会社ミルイオンに委託した。質量分析イメージング(MSI)はiMScope TRIO(島津製作所)を用いて実施した。装置は光学顕微鏡を備え、大気圧MALDI(AP-MALDI)イオン源を搭載し、Nd:YAGレーザー(355 nm, 1 kHz)によりイオン化した。質量分析部はイオントラップおよび飛行時間型質量分析計(TOF)で構成され、測定質量範囲はm/z 50-3000とした。レーザー集光径は可変であり、最小5 μmまで設定可能である。T3およびT4を解析対象とし、資料記載のイオンとして[M+H]⁺m/z 651.79→605.79 および[M+H]⁺m/z 777.69→731.68を対象とした。前処理として、脳組織を切片厚8 μmで切片化し、マトリックス溶液をスプレー法で供給した後、MALDI-MSI測定を行った。マトリックスにはα-Cyano-4-hydroxycinnamic acid(CHCA)およびGrapheneを用い、CHCA:Grapheneの調製溶液をコンビマトリックス溶液として使用した。測定条件は、レーザー照射回数100 shots、レーザー強度68.0(任意単位)、検出器電圧2.1 kV、データ解像度45×45 μm、顕微鏡倍率1.25×、測定モードはポジティブ(正イオン)とした。

4-8. 網羅的遺伝子発現解析

P4およびP21の児動物脳から内側前頭前皮質(mPFC)、一次体性感覚野(S1)(P21のみ)、海馬を回収し、total RNAを抽出・精製し、RNA-seqを実施した。サンプルは各群9-10腹を解析した。得られた遺伝子発現データについて、発現パターンの全体的な類似性を可視化する目的で、UMAP(Uniform Manifold Approximation and Projection)による次元削減解析を行った。

4-9. 組織学的解析

甲状腺、肝臓、腎臓、脾臓、肺、胸腺の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、NeuN(成熟神経細胞)、IBA1(ミクログリア)およびGFAP(アストロサイト)に対する特異的抗体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、内側前頭前皮質(mPFC)、一次体性感覚野(S1)および一次運動野(M1)の第5層、ならびに海馬CA1領域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。また、解析ソフトNuerolucida(MBF Bioscience)を用いて、mPFCの第5層錐体神経細胞の基底樹状突起の形態解析および複雑性を算出した。

4-10. 児動物の行動解析

児動物の行動解析として、4・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、新奇環境下における自発運動量/不安様行動ならびに社会性行動をそれぞれ評価した。さらに8週齢時には、断崖回避試験による衝動性や不注意さの評価と、Y字型迷路試験による短期作業記憶能の評価を加えるとともに、雄についてはガラス玉覆い隠し試験を実施し、強迫様行為や不安様行動も評価した。また、PTU投与により発現する雄児動物の自発運動量の亢進に対して、注意欠陥多動症(ADHD)治療薬であるアトモキセチン(ATX,

3 mg/kg)を試験30分前に投与し、その効果を赤外線センサーによる自発運動量試験により検討した。

4-11. BBDR (Biologically Based Dose-Response) の枠組みに基づくホルモン-アウトカム連関解析

解析対象として、本研究で実施した授乳期末(LD21)に測定した母動物甲状腺関連ホルモン(T4、T3、TSH)、P21に測定した児動物の甲状腺関連ホルモン(T4、T3、TSH)と血液生化学マーカー、また脳イメージング指標として、P4、7、10、13、16に取得されたBLIを用いた。児動物データの同腹内相関を避けるため、解析単位は主に腹単位として独立性を担保した。性別を分けた解析についても同様に腹単位で解析を行った。また、先行研究(21KD1004)で実施された、PTU投与マウスを用いた出生前発生毒性試験(TG414)における出生前日(GD18.5)の母動物甲状腺関連ホルモン(T4、FT4、T3、TSH)のデータも解析に使用した。母動物の各甲状腺関連ホルモンと児動物の各指標との関係性を、線形単回帰モデルにより評価した。各モデルについて、回帰係数(β)、決定係数(R^2)、p値および解析対象数(n)を算出した。

4-12. BMD (Benchmark Dose) 解析

BLIの用量反応関係について、4パラメータ・ロジスティックモデル(LL.4)へのフィッティングを行い、ベンチマーク反応(BMR)として10%変化(BMD10)を用いてBMDを算出した。BMR、応答方向(増加/低下)および正規化方法は解析目的に合わせて設定した。

4-13. 統計学的解析

データは全て腹単位で解析を行い、平均値±標準偏差で表した。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またはTukey's multiple comparisons testを用いた。雄性Syn-Repマウスと野生型雌性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コホートにおいては、非同士の独立コホートとして各用量群で陰性対照群を設定しているため、二群間を対応のないt検定で評価した。有意水準は $P < 0.05$ とした。なお、BBDR解析における統計解析にはR(version 4.5.2)を用いた(主な使用パッケージ; dplyr, tidyr, purrr, tibble, ggplot2, stringr, emmeans, drc, patchwork および writexl)。

5. 甲状腺ホルモン関連指標の変動を考慮したヒト細胞試験法の構築(諫田)

5-1. 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。

5-2. 外胚葉分化

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。

5-3. 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。

5-4. NGS 解析

THR α 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 THR α 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審査・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 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 7 年度に解析を実施した抗甲状腺物質では、以下の変動が統計学的有意差をもって認められた。

LG : T4 低下 ; 0.4 mg/kg 以上、T3 低下 ; 2 mg/kg
LM : 有意な変動なし
PCN : T4 低下 ; 25 mg/kg 以上、TSH 増加 ; 80 mg/kg
予備検討試験 :
APR・PHF : T4 低下、TSH 増加
OFF・FLU : T4 低下
TPN : TSH 増加
OIT : T4 増加

なお、前年度までに実施した投与実験においては、①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤 (PTU・MMI)、②ヨウ素取込み阻害剤 (APC・PTC)、④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。③脱ヨウ素酵素阻害剤 (IOP・ER) では TSH の有意な増加に加え、IOP で血清 T3・T4 の有意な増加がみられた。⑤TSH 産生阻害剤 (BEX) では T3・T4 の有意な減少がみられたが、TSH の有意な変動は認められなかった。

1-2. 臓器重量

LG・LM・PCN の投与実験および 7 物質 (APR・PHF・OFF・ETX・FLU・TPN・OIT) の予備検討試験について、解剖時体重ならびに臓器重量 (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。

LG (Table 1-1) : 2 mg/kg で肝絶対/相対重量の増加
LM (Table 1-2) : 有意な変動なし (1 mg/kg 群の下垂体相対重量の増加は、用量依存性を欠くことから偶発的変化と考えられた)

PCN (Table 1-3) : 80 mg/kg で甲状腺絶対/相対重量の増加、25 mg/kg 以上で肝絶対/相対重量の増加、8 mg/kg で肝相対重量の増加

予備検討試験 (Table 1-4、1-5) :

APR・PHF : 甲状腺絶対/相対重量の増加

OFF・ETX : 肝絶対/相対重量の増加

FLU : 甲状腺相対重量の増加、肝絶対/相対重量の増加

TPN : 甲状腺絶対/相対重量の低下

OIT : 甲状腺絶対重量の低下、肝絶対重量の低下、副腎絶対/相対重量の増加

1-3. 病理組織学的解析

LG・LM・PCN の投与実験および 7 物質の予備検討試験における甲状腺・下垂体・肝臓の病理組織学的所見を Table 2 に示す。

LG (Table 2-1) : 甲状腺におけるコロイド退縮が 0.08 mg/kg 以上の各 1 例で観察された。

LM (Table 2-2) : 甲状腺におけるコロイド退縮が 10 mg/kg の 1 例で観察された。下垂体前葉では、統計学的有意差はないものの、空胞化/肥大が 1 mg/kg 以上で散見された。

PCN (Table 2-3) : 甲状腺における濾胞上皮細胞肥大/過形成 (全群で有意) およびコロイド退縮 (25 mg/kg 以上で有意) の発生頻度が全群で用量依存的に増加した。下垂体前葉では、肥大/空胞化が全群で散見された。肝臓の小葉中心性/周辺性肝細胞肥大が全群で観察され、中心性肥大は 80 mg/kg、周辺性肥大は 25 mg/kg 以上で有意に増加した。

予備検討試験 (Table 2-4、2-5) :

甲状腺 : 7 物質すべての投与群において濾胞上皮細胞肥大/過形成が観察され、肥大の発生頻度の有意な増加が APR・PHF・ETX・FLU・TPN 投与群で認められた。

下垂体 : APR・PHF・ETX・FLU・TPN 投与群で前葉の肥大/空胞化がみられ、APR・PHF 投与群で有意な発生頻度増加を示した。

肝臓 : OFF・ETX・FLU 投与群で小葉中心性肝細胞肥大が観察され、FLU 投与群で有意な発生頻度増加を示した。

なお、前年度までに投与実験を実施した①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤 (PTU・MMI)、②ヨウ素取込み阻害剤 (APC・PTC)、③脱ヨウ素酵素阻害剤 (IOP・ER)、④甲状腺ホルモン代謝促進剤 (NaPB・NCD) の各物質においては、甲状腺濾胞上皮細胞の肥大が、血中ホルモン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、血中ホルモン値の有意な変動がみられた用量よりも低用量から、小葉中心性肝細胞肥大が有意な増加を示した。これらのうち PTU・APC・IOP・NaPB・BEX の甲状腺および肝臓の病理組織学的所見を Table 2-6~2-10 に示す。

1-4. 免疫組織化学的解析 : 甲状腺 T4・T3

令和7年度は、LG・LM・PCNの投与実験および7物質の予備検討試験について、甲状腺におけるT4・T3産生を免疫染色により検索した。

その結果、LG・LM・PCN投与群ではいずれも、T4・T3染色性の低下は認められなかった(Figure 2~3, Table 2-1~3)。予備検討の7物質のうち、APR・PHFはT4・T3の有意な低下を引き起こした。一方、OFF・ETX・FLU・TPN・OIT投与群ではT4・T3の低下はみられなかった。

なお、前年度までに実施した甲状腺におけるT4・T3の検索において、①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤(PTU・MMI)および②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、③脱ヨウ素酵素阻害剤(IOP・ER)、④甲状腺ホルモン代謝促進剤(NaPB・NCD)および⑤TSH産生阻害剤(BEX)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・IOP・NaPB・BEXの検索結果をFigure 2~3、Table 2-6~2-10に示す。

1-5. 免疫組織化学的解析：甲状腺NIS

前年度まで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、PTU・MMI・APC・PTC投与群で発現増加を、IOP投与群で発現低下を示したNISについて、免疫染色を用いて新規マーカーとしての可能性を検討した。令和7年度は、LG・LM・PCNおよび7物質の予備検討試験について甲状腺におけるNIS発現(陽性面積率)を検索した(Figure 4)。

LG・LM：有意な変動なし

PCN：80 mg/kgで有意に増加

予備検討試験：APR・PHF・ETX投与群で有意に増加

なお、前年度までに実施した甲状腺NIS発現解析では、PTU・MMI・APC・PTC・VA-K-14投与群において有意な増加が、IOP・ER投与群では対照的に有意な低下が認められた。⑤TSH産生阻害剤であるBEX投与群では有意な変化は認められず、今回のLGの結果と一致していた。これらのうち、PTU・APC・IOP・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NQO1およびGPX2

前年度までに実施した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について、甲状腺における発現(陽性面積率)を免疫染色により検索した。令和7年度は、LG・LMの2物質について解析を実施した。その結果、LG・LMともにNQO1・GPX2発現の有意な変動は認められなかった(Figure 5~6)。

なお、令和6年度に実施した発現解析では、PTU・MMI・APC・PTC・IOP投与群でNQO1発現の有意な増加、PTU・MMI・PTC・IOP・ER投与群でGPX2発現の有意な増加が検出された。⑤TSH産生阻害剤であるBEX投与群では有意な変化は認められず、今回のLGの結果と一致していた。これらのうちPTU・APC・IOP・NaPB・BEXの検索結果をFigure 5~6に示す。

1-7. 免疫組織化学的解析：甲状腺DPP4およびSNPH

前年度までに実施した甲状腺のマイクロアレイ解析の結果、PTU・APC・PTC投与群に共通して発現増加を示したDPP4、およびPTU・MMI・APC・PTC・NaPB・NCD投与群に共通して発現増加を示したSNPHについて、それぞれPTU・MMI・APC・PTC投与群の甲状腺における発現(陽性面積率)を免疫染色により検索した(Figure 7~8)。

DPP4：①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤(PTU・MMI)では、病理組織学的解析における濾胞上皮細胞肥大の増加に一致した増加傾向を示し、3 mg/kg PTUおよび10 mg/kg MMIで有意であった。②ヨウ素取込み阻害剤(APC・PTC)では、100 ppm以上APC、1000および5000 ppm PTCで統計学的有意差をもって増加した。

SNPH：血清TSH増加に一致した増加傾向を示し、①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤(PTU・MMI)では1 mg/kg以上PTUおよび10 mg/kg MMI、②ヨウ素取込み阻害剤(APC・PTC)では100 ppm以上APCで有意に増加した。

1-8. 免疫組織化学的解析：下垂体TSH

令和7年度は、LG・LM・PCNおよび予備検討試験の7物質について、下垂体前葉におけるTSH発現(陽性面積率)を免疫染色により検索した(Figure 9)。

LG：0.4 mg/kg以上で有意に低下

LM：有意な変動なし

PCN：全ての投与群で有意に増加

予備検討試験：APR・PHF・OFF・ETX・FLU・TPN・OIT投与群で有意に増加

なお、前年度まで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・IOP・NCD・VA-K-14投与群でTSH発現の有意な増加が認められた。対照的に、⑤TSH産生阻害剤であるBEX投与群では有意な低下が認められ、今回のLGの結果と一致していた。これらのうち、PTU・APC・IOP・BEXの検索結果をFigure 9に示す。

1-9. 免疫組織化学的解析：甲状腺Ki67

令和7年度は、LGについて甲状腺におけるKi67発現(陽性細胞率)を免疫染色により検索した結果、有意な変動は認められなかった(Figure 10)。

なお、前年度まで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発現の有意な増加が検出された。⑤TSH産生阻害剤であるBEX投与群では有意な変化は認められず、今回のLGの結果と一致していた。これらのうち、PTU・APC・IOP・NaPB・BEXの検索結果をFigure 10に示す。

1-10. 免疫組織化学的解析：肝臓UGT1A6

令和7年度は、LG・LM・PCNおよび予備検討試験の7物質について、肝臓におけるUGT1A6発現(陽性面積率)を免疫染色により検索した(Figure 11)。

LG・LM：有意な変動なし

PCN：全ての投与群で有意に増加し、特に小葉周辺域において顕著に認められた

予備検討試験：OFF・FLU・OIT投与群で有意に増加

なお、前年度までに実施した解析では、NaPB・NCD 投与群で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 投与群でも有意な増加が認められたが、血清ホルモン値変動および甲状腺の病理組織学的所見がみられた用量よりも高用量であった。これらのうち、NaPB・NCD・PTU・IOP の検索結果を Figure 11 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・摂餌量・臓器重量

LG 投与群では、対照群と比較し摂餌量の増加がみられ、最終体重は対照群に比して 5% の高値を示した (Figure 12A)。

ODA、SMT および TPN 投与群では、いずれの群においても投与 2 週目で摂餌量の減少がみられた。ODA 投与群では投与 2 週目以降に体重増加抑制が認められ、最終体重では対照群に比して 6.6% の低値を示した。一方、SMT・TPN 投与群では、体重への影響は認められなかった (Figure 12B)。

2-2. マイクロアレイ解析

甲状腺および下垂体では、対照群および LG 投与群はそれぞれ異なるクラスターとして分類された (Figure 13)。甲状腺では、LG 投与群において発現増加した遺伝子が 7、発現低下した遺伝子が 21 認められた。下垂体では、LG 投与群において発現増加した遺伝子は認められず、22 遺伝子で発現低下が認められた。発現変動を示した遺伝子の一覧を Table 3-1~3-3 に示す。

甲状腺では、甲状腺ペルオキシダーゼ阻害作用を示す ODA・SMT 投与群の一部は重なりが認められたものの、対照群・TPN 群はそれぞれ異なるクラスターとして分類された (Figure 14)。発現増加した遺伝子数は、ODA 投与群で 32、SMT 投与群で 42、TPN 投与群で 126 であり、このうち 4 遺伝子が共通していた。発現低下した遺伝子数は ODA 投与群で 366、SMT 投与群で 397、TPN 投与群で 1046 であり、このうち 164 遺伝子が共通していた (Figure 15)。発現変動を示した遺伝子の一覧を Table 3-4~3-9 に示す。

3. 国際機関および諸外国等における甲状腺機能評価に関する情報収集

令和 7 年 7 月 9 日に開催された ICCVAM による、米国 EPA の 3D Human Thyroid Microtissue Assay のバリデーション進捗報告に関する Web 会議には、事務局の Inotiv、開発者の EPA および NIEHS・CPSC・EC・JRC・NIHS/JaCVAM から合計 9 名の参加者があった。4 施設におけるバリデーションの結果が示され、試験法そのものは一定の再現性を保持したデータが得られると考えられた。一方で、ヒトの正常甲状腺組織を用いた検討のため、必要な甲状腺組織の入手については、安定供給や倫理的な問題点も残ると考えられた。

令和 7 年 9 月 22 日および 10 月 1 日に開催された 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・デンマーク・ドイツ・オランダ・英国・スイス・ノルウェー・スロバキア・日本・ECHA・EFSA・BIAC・ICAP0 から合計 48 名の参加者があった。以下の内容について、報告と質疑が行われた。

- 1) アッセイ開発者から本専門家会議に対して評価依頼のあった NIS、TPO および 2 種類の DIO アッセイについて、評価内容を元に議論された。

・NIS assay (KalyCell)

4 名のレビュアーの評価は概ね肯定的であり、本アッセイが他の類似した NIS アッセイと同等であること (同等の活性、陽性反応) を示した。結論として、本アッセイはバリデーションへ移行する準備が整っており、PEPPER への提案が可能であるとされた。一方、ライセンス契約および将来のユーザーにとっての受容性について若干の疑問が提起された。

・TPO inhibition (guaiacol oxidation, using of microsomes from multiple species) (CLS)

4 名のレビュアーが評価し、ミクロソームの使用による問題と、それに伴う結果のばらつきが議論された。また、ヒト由来ミクロソームの場合、商業目的での使用に関する倫理的問題が提起された。可能な限り *in vitro* 由来の試料を使用することが推奨され、これにより上記 2 つの問題が同時に解決される (細胞株に関連するその他の問題としては、認証・維持のための生物資源センターへの保護・寄託等がある)。その他の制限事項: 1) 現在のアッセイは酸化反応における色干渉に対処していない; 2) 検出技術 (グアヤコール酸化に基づく) は AUR よりも感度が低い。

・DIO の 2 アッセイ (Kalycell および CLS) のうち Kalycell のアッセイ評価には小川も参加したが、レビュアー数がいずれも 2 名と不十分であったことから、グループでの評価は見送られた。

- 2) PEPPER project のバリデーション報告

・DIO 1 アッセイの検証: 第 2 段階が進行中。1 施設から得られたデータの品質が不十分であった。BfR (ドイツ) は 2026 年に追加で 2 施設を支援し、この検証において 3 カ所の独立した施設のセットを構築する予定。

・FITC-T4 TTR: 移転可能性の検証は完了。参加ラボすべてが盲検試験を適切に実施中。VMG は 2026 年の盲検リング試験移行を承認予定。

・TYRO-IOD アッセイ: ECCAC (欧州細胞培養認定コレクション) における細胞株寄託の問題により、検証開始が遅延している。

- 3) ドイツにおける 3 種のアッセイ (DIO 1, 2, 3-SK、NIS-SK、TPO-AUR) の検証に関する状況報告

・3 施設 (BASF、BfR、Charite Berlin) における 3 アッセイのバリデーション計画が紹介された。

・アッセイ担当者の熟練度、被験物質の EU-NETVAL との重複が限られていること、酵素源が

Pepper と異なることなどが議論された。

- 4) 米国 EPA による 3D マイクロ組織法の状況
 - ・4 施設 (バイエル、ライフネットヘルス、EPA、コルテバ) がバリデーショナルに参加している。この取り組みは ICCVAM-NICEATM が調整を担当している。試験システムは 4 人のドナー由来の一次甲状腺細胞 (プールなし) で構成される。実験設定: 4 プレート (4 物質/プレート)、6 日間処理、T4 産生測定は 14 日目に実施する。陽性対照として PTU を使用。施設間で一貫性が確認され、受容基準を満たしている。報告書はほぼ完成し、論文は投稿済み。
 - ・T4 産生測定法は ELISA を使用しており、細胞計数は標準化が必要との意見があった。
 - ・ヒト組織の使用に関連し、倫理的配慮と一次細胞の商業利用可能性について質問があり内部協議することとなった。
 - ・T4 測定の信頼性問題が指摘され、これは高濃度 T4 のみに関わる可能性がある。
- 5) プロジェクト 2.64 の魚類試験法への甲状腺エンドポイントの追加について
 - ・検証中の 4 種の新規甲状腺関連エンドポイントは、TG236 (FET) および TG210 (FELS) の付属書として追加される予定である。標準操作手順書 (SOP) は現在、提携研究所と協議中である。欧州、日本、米国の計 16 施設がこの活動に参加している。4 種の生物種が試験対象となる。
- 6) 甲状腺機能障害に関する PARC IATA 作成プロジェクトの進捗について
 - ・魚類および *in vitro* 法を用いた甲状腺ホルモン影響に焦点を当てた IATA の現状が提示された。
 - ・ECHA および EFSA と協議しながら、さらに多くのケーススタディ (約 10 種類の化学物質) を開発する予定である。
 - ・OECD 事務局は、PARC の IATA 活動の進捗状況を事前に把握していなかったものの、*in vitro* 試験法の評価で得られた知見に基づき、TDM EG が戦略策定において取る可能性のある方向性について、出発点を策定した。事務局は、IATA で使用される方法が必ずしも試験ガイドラインである必要はないことを参加者に説明した。
 - ・一部の反応として、*in vitro* で検証済みの方法が存在せず、OECD レベルで IATA を開発するリソースが不十分であることから、IATA の開発は時期尚早である可能性が示唆された。また、規制上の問題 (分類かあるいは有害性評価か) を明確にする必要があるとの意見があった。

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

令和 5 年度までに我々は、PTU を用いたマウス周産期甲状腺機能低下モデルを確立し、出生前までの曝露に

ついては 4 用量 (2、10、50、250 ppm) の混餌投与の影響を検討してきた。一方で出生後の影響の検討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 用量のみであったため、本研究では出生後における各エンドポイントの用量反応性を明確にするため、50 ppm 投与群を設定して検討を行った。その結果、母動物の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、甲状腺組織像および血液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) の血清中甲状腺関連ホルモン (T3・T4・TSH) レベルならびに血液生化学マーカーについては未測定であったため、令和 7 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 (21KD1004; 総合研究報告書を参照) と同様に、T3・T4 の有意な低下ならびに TSH の有意な上昇が認められた (Figure 17)。50 ppm 投与群では、出生前の結果では T3・T4 の有意な低下ならびに TSH の有意な上昇が認められたが、LD21 では T4 の有意な低下が認められた (Figure 17)。一方で、10 ppm 投与群においては、出生前の母動物で有意な変化は認められなかったが、LD21 では T4 のみ有意な低下が認められた (Figure 17)。

また P21 児動物についても、250 ppm 投与群では雌雄ともに T3・T4 の有意な低下ならびに TSH の有意な上昇が認められた (Figure 18)。50 ppm 投与群においては、雌雄ともに T4 の有意な低下と、雌でのみ TSH の有意な上昇が認められた。また、T3 では 10 ppm の雄児動物と 50 ppm の母動物および雌児動物において有意な上昇が認められた。10 ppm 投与群においては、雌雄ともに T4 の有意な低下と、雌でのみ TSH の有意な上昇が認められた。また、T3 においては 10 ppm の児動物雄と 50 ppm の母動物および児動物雌において有意な上昇が認められた (Figure 17, 18)。

出生後 (LD21 および P21) の甲状腺組織学的解析については、50 ppm 投与群において未実施であったため、今年度解析を行った。50 ppm 投与群の母動物の LD21 における甲状腺組織像は、250 ppm 投与群と同様に、色調変化、濾胞細胞の顕著な肥厚、コロイド部分の異常形態や欠失が観察された (Figure 17)。児動物においても、50 ppm 投与群の P21 において、濾胞細胞の同様な変化が観察された (Figure 18)。

血液生化学マーカーについては、10 ppm および 50 ppm 投与群の母動物では特に影響は認められなかったが、250 ppm 投与群の母動物で尿素窒素、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 および 50 ppm 投与群では明らかな影響は認められなかったが、250 ppm 投与群では雌雄ともに総ビリルビンの有意な増加が認められた。また、雌のみで Ca の有

意な低下が、雄のみで Na、無機リンの有意な低下および総タンパク質、アルブミン、中性脂肪の有意な上昇が認められた (Data not shown)。

4-3. 母動物および児動物における甲状腺関連指標の統計的リンク解析

P21 に測定した児動物の甲状腺関連ホルモン (T4・T3・TSH) をアウトカムとし、母動物の妊娠末期 (GD18.5) および授乳期末 (LD21) における甲状腺関連ホルモン指標との関連を線形回帰モデルにより評価した。本研究では、各投与群の影響に関するコホートが複数回に分けて実施されており、測定条件差の影響を低減する目的で、児動物 T4 および T3 については同一時点の対照群平均で正規化した対照比 (RelT4_P21、RelT3_P21) についても主解析指標とした。なお、絶対値 (T4_P21、T3_P21) を用いた解析も補足として実施し、結論の頑健性を確認した。児動物 TSH については、分布の歪みが大きく分散不均一を生じやすいため、主解析では自然対数変換した logTSH_P21 を用いた。加えて、対照比指標 (RelTSH_P21) およびその対数 (logRelTSH_P21) による感度解析も行い、指標定義の違いによって解釈が大きく変わらないことを確認した。また本検討で用いる GD18.5 の母動物データは、LD21/P21 のコホートとは独立したコホートで得られた結果のため、用量群ごとの平均値を算出し、各用量群に対応する児動物データに付与して解析した (用量群レベルの関連評価)。各モデルについて回帰係数 (β)、決定係数 (R^2)、p 値、解析対象数 (n) を算出した。ただし母動物 GD18.5 ホルモンは別コホートの用量群平均値を説明変数として付与しているため、GD18.5 に関する回帰の p 値は独立な個体反復に基づく推定とは言えず、統計学的有意性の解釈には注意を要する。したがって GD18.5 解析は主として用量依存的傾向 (説明力 R^2 および回帰係数の方向) を示す目的で用いている。Figure 19 に、今回の解析で得られた結果から導き出された各甲状腺関連ホルモンの変動相関図 (KER; Key Event Relationship) を示す。

4-3-1. 児動物 T4 について

児動物 P21 の T4 について、母動物 GD18.5 の甲状腺関連ホルモン (T4・FT4・TSH・T3) との関連を線形単回帰で評価した。その結果、児動物 RelT4 は母動物 T4 および FT4 と強く正の相関を示し (Dam T4: $R^2=0.72$, $\beta=0.0994$, $p=1.8 \times 10^{-36}$; Dam FT4: $R^2=0.72$, $\beta=0.0700$, $p=3.9 \times 10^{-36}$)、TSH とは強い負の相関を示した ($R^2=0.72$, $\beta=-0.0824$, $p=4.1 \times 10^{-36}$)。一方、母動物 T3 との相関は前 3 者より弱いものの有意であった ($R^2=0.47$, $\beta=6.85$, $p=3.47 \times 10^{-19}$)。児動物 T4 を絶対値で評価した場合も、相関の強さおよび方向性は同様であった (Table 4)。

母動物 LD21 のホルモンとの関連では、児動物 T4 は母動物 T4 と強い正の相関を示した ($R^2=0.67$, $\beta=0.0202$, $p=9.65 \times 10^{-25}$)。母動物 TSH とは有意な負の相関が認められたが説明力は中等度であった。母動物 T3 は児動物 T4 との関連を示さなかった (Table 4)。

雌雄差については、雌雄別に線形単回帰解析も実施したが、主要な結論を変更するような顕著な差は認め

られなかった (データは示さず; T3・TSH も同様)。

4-3-2. 児動物 T3 について

児動物 P21 の T3 について、母動物 GD18.5 の甲状腺関連ホルモンとの関連を評価したところ、児動物 RelT3 は母動物 T3 と最も強い正の相関を示した ($R^2=0.412$, $\beta=5.47$, $p=3.24 \times 10^{-16}$)。また、母動物 TSH とは負の相関を示した ($R^2=0.30$, $\beta=-0.0459$, $p=1.7 \times 10^{-11}$)。母動物 T4 および FT4 との相関は有意であったが説明力は比較的小さかった (Table 5)。児動物 T3 を絶対値で評価した場合も同様の傾向を示した。

母動物 LD21 のホルモンとの関連では、児動物 RelT3 は母動物 TSH と負の相関 ($R^2=0.34$, $\beta=-0.0525$, $p=3.0 \times 10^{-10}$)、母動物 T3_LD21 と正の相関 ($R^2=0.31$, $\beta=1.50$, $p=2.5 \times 10^{-9}$) を示した。一方、母動物 T4 と児動物 T3 の関連は認められなかった (Table 5)。

4-3-3. 児動物 TSH について

児動物 P21 の TSH は分布の歪みを考慮し、主解析として自然対数変換した logTSH (および logRelTSH) を用いて母動物ホルモンとの関連を評価した。未変換の TSH (TSH、RelTSH) でも解析を行ったが、以降は主として log 変換結果に基づき解釈した (Table 6)。

母動物 GD18.5 ホルモンとの関連では、児動物 logTSH は母動物 T3 および TSH と特に強く関連した (T3: $R^2=0.58$, $\beta=-30.4$, $p=5.4 \times 10^{-25}$; TSH: $R^2=0.56$, $\beta=0.289$, $p=3.62 \times 10^{-23}$)。また、母動物 T4 および FT4 とも有意な負の相関が認められた (T4: $R^2=0.43$, $\beta=-0.302$, $p=1.72 \times 10^{-16}$; FT4: $R^2=0.42$, $\beta=-0.21$, $p=5.1 \times 10^{-16}$)。logRelTSH でも同一の推定値が得られ、対照比化の有無による結論の差は認められなかった。

母動物 LD21 ホルモンとの関連では、児動物 logTSH は母動物 TSH と強い正の相関を示した ($R^2=0.62$, $\beta=0.266$, $p=8.07 \times 10^{-22}$)。母動物 T3 ($R^2=0.22$, $\beta=-4.79$, $p=1.0 \times 10^{-6}$)、母動物 T4 ($R^2=0.171$, $\beta=-0.0339$, $p=2.26 \times 10^{-5}$) はともに負の相関を示した。未変換 TSH でも母動物 TSH との強い関連は同様に確認されたが、主解析としては分布特性を踏まえ logTSH を採用した。

4-4. μ CT を用いた授乳期児動物の甲状腺解析

P10 の児動物から甲状腺を摘出し μ CT を用いて観察したところ、10 ppm および 250 ppm 投与群の甲状腺で肥大が観察された (Figure 20A)。また、得られた CT 撮影画像から甲状腺を 3D 再構築し、表面積と体積を定量化したところ、雌においては表面積・体積ともに PTU の用量依存的な増加が認められた。一方、雄においては 10 ppm と 250 ppm で同程度の表面積・体積を示した。表面積・体積を体重で補正したところ、雄においても PTU の用量依存的な増加が認められた (Figure 20B-C)。

4-5. 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について 50 ppm 投与群では、雌雄とも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・脾臓について組織学的解析を行ったが、対照群と比較して明らかな変化は認められなかった（データは示さず）。

4-6. 児動物脳の組織学的解析

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、M1 領域の II/III 層において、成熟神経細胞およびミクログリアの数に 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 21)。

令和 6 年度に、10 ppm 投与群の児動物の脳において、生後 8 週齢時に mPFC 領域第 5 層で錐体神経細胞の樹状突起スパイン密度が増加していることを報告した。令和 7 年度は、S1・M1・海馬 CA1 領域での解析を追加したが、樹状突起スパイン密度の変化は認められなかった。一方、250 ppm 投与群の児動物 (8 週齢) の脳では、mPFC 領域に加えて S1 領域でも、第 5 層錐体神経細胞の樹状突起スパイン密度の増加が認められた。一方、10 ppm 投与群と同様に、M1 および海馬 CA1 領域では変化は認められなかった。さらに、10 ppm 投与群の児動物 (8 週齢) の脳については、mPFC 領域の第 5 層錐体細胞の基底樹状突起形態を NeuroLucida により解析したが、一次樹状突起長および突起数、総樹状突起長および突起数や樹状突起の複雑性において、対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

4-7. 児動物の頭部 BLI への影響と脳の組織学的解析

4-7-1. 日齢別 BLI の用量影響

児動物脳への影響を検討するため、これまでに 10 ppm および 250 ppm 投与群において児動物頭部の *in vivo* イメージング解析を実施してきた。その結果、BLI は早期 (P4 付近) では低下方向、より後期 (P10 以降) では上昇方向の変化が主体となり、脳発達ステージにより反応方向が異なる可能性が示唆されている。

令和 7 年度は、中間用量である 50 ppm 投与群を追加して検討したところ、P7-P16 において雌雄ともに対照群と比較して BLI が高い傾向を示した。二群間の比較では、雌では P10・P16 で、雄では P10・P13・P16 で有意であった (Figure 22A)。50 ppm 投与群のレポーター活性の経時変化は、10 ppm および 250 ppm 投与群 (総合研究報告書; 21KD1004) の中間型のパターンを示し、PTU の用量依存的な頭部 BLI への影響が認められた。

4-7-2. 日齢別 BLI と母動物および児動物甲状腺関連ホルモンとの相関

本研究の目的は、PTU の用量反応を評価すること自体ではなく、甲状腺機能低下の重症度を表すホルモン指標と、各アウトカムの変動との関係性を整理することである。この観点から、甲状腺ホルモン軸の変動 (低下の重症度) が BLI に与える影響を明らかにし、BLI が甲状腺機能低下による児動物脳への影響評価に有用な指標となり得るかを検討した。

P4・P7・P10・P13・P16 に測定した BLI (※各日齢の陰性対照群平均で正規化した値) について、母動物 (GD18.5、LD21) および児動物 (P21) の甲状腺関連ホルモン指標 (T4・FT4・T3・TSH [児 TSH は自然対数変換を含む]) との関連を線形回帰により評価し、各組合せの決定係数 (R^2) をヒートマップとして可視化した (Figure 23)。ヒートマップでは各セルの色が R^2 (説明力) を表し、日齢ごとに「どのホルモン指標が BLI 変動をより強く説明するか」を比較した。今回は雌雄の区別は行わずに解析した。

その結果、BLI と甲状腺関連ホルモンの対応は日齢により大きく異なることが示された。具体的には、P4 の BLI は、GD18.5、LD21、P21 のいずれの甲状腺関連ホルモン指標とも R^2 が低く、甲状腺ホルモン軸の変動を反映する指標としての説明力は限定的であった。一方、P7 以降ではホルモン指標との対応が明瞭となり、P10~P16 にかけて説明力が高い組合せが増加した。

母動物指標との関係では、GD18.5 の T4/FT4 および TSH (用量群平均) が、P10~P16 の BLI と比較的高い説明力を示し、妊娠末期の母体甲状腺ホルモン状態と後期日齢の BLI 変動が同じ方向性で変化する傾向が認められた。LD21 の母動物指標についても、BLI との関連が認められる組合せが存在したが、全体としては GD18.5 指標よりも R^2 が同程度またはやや低い組合せが多く、BLI 変動の説明力は指標により差がみられた。

児動物 P21 指標との関係では、児 T4 (Re1T4) および児 TSH (logTSH) と、P10~P16 の BLI の間で相対的に高い R^2 を示す組合せが認められた。これらの結果は、P10~P16 の BLI が、離乳期 (P21) に観察される児動物の甲状腺機能低下状態 (T4 低下・TSH 上昇) と方向性を揃えて変動し得ることを示唆する。一方で、児 T3 (Re1T3) との関係は、T4・TSH と比較して R^2 が低い組合せが多く、BLI 変動の主要な説明変数としては相対的に弱い傾向がみられた (Figure 31)。またこれらの一連の解析を雌雄別に行った際にも、ほぼ同様の傾向が認められた (データは示さず)。

以上より、日齢別 BLI の中では、P4 は甲状腺関連ホルモンとの対応が弱く、P10~P16 で対応が明瞭化するという時間依存性が示された。したがって、甲状腺ホルモン軸の変動を反映する指標として BLI を位置付ける場合、「どの日齢の BLI を用いるか」が解析結果 (説明力) を大きく左右することが明確となった。

4-7-3. 脳発達アウトカムとしての BLI と母動物および児動物甲状腺関連ホルモンとの相関

前項の検討により、日齢によって BLI と相関する甲状腺関連ホルモン指標に差異が認められた。そこで本検討では日齢変化を考慮するため、P4・P7・P10・P13・P16 で取得した BLI を各日齢の陰性対照群平均で正規化 (Figure 30B) した上で、P4-P16 の平均値 (BLI_mean) を算出し、脳発達アウトカムとしての有用性を評価した。BLI_mean と甲状腺関連ホルモン指標との関係性は線形単回帰モデルにより評価した。

その結果、母動物 GD18.5 の甲状腺関連ホルモン (用量群平均) と BLI_mean の間には、複数の指標で明確な線形関係が認められた (Figure 32)。特に母動物 GD18.5

の T4/FT4 が低い(または低下率が大きい)用量群ほど、BLI_mean が高い方向の関連が認められた (T4/FT4; $R^2 \approx 0.46$)。また TSH とも正の相関が認められた ($R^2 \approx 0.56$)。以上より、BLI_mean は妊娠末期 (GD18.5) における母体甲状腺ホルモン状態 (T4/FT4 等) と中等度以上の説明力に対応して変動することが示された。なお、本解析における GD18.5 の各指標は、LD21/P21 とは別コホートで測定された値を用量群平均として付与したものであるため、本結果は個体ごとの母子対応を示すものではない。一方で、用量群としての比較において、母体甲状腺機能低下が大きい群ほど BLI_mean の変動も大きいことを示しており、用量依存的な整合性が支持された。

LD21 の甲状腺関連ホルモンについても単回帰で評価したところ、LD21 の TSH と正の相関が認められた ($R^2 \approx 0.48$)。また T4 とも中程度の負の相関が認められた ($R^2 \approx 0.32$)。一方で T3 は BLI_mean との関連が相対的に弱い ($R^2 \approx 0.18$) など、指標により説明力は異なった。児動物 P21 の甲状腺関連ホルモンとの関係では、T4 (または ReIT4) で比較的強い負の相関が認められた ($R^2 \approx 0.39$)。また T3 および TSH でも中程度の相関が認められた (T3 : $R^2 \approx 0.26$, TSH : $R^2 \approx 0.23$)。方向性としては概ね、児動物 P21 の T4/T3 低下および TSH 上昇が大きい条件ほど BLI_mean が高い傾向を示した。

さらに、BLI_mean と用量の関係について BMD 解析を行ったところ、BLI_mean は用量依存的な上昇を示した (Figure 33A)。BMR を「対照比から+10%変化 (=1.1)」として算出した BMD (BMD10 相当) は約 12.8 ppm であり、推定の不確実性は比較的大きいものの (SE \approx 22.8 ppm)、PTU 10-50 ppm の範囲で上昇が生じ得ることが示唆された (Figure 33B-C)。

4-8. イメージング MS を用いた児動物脳の TH 分布の解析

イメージング MS を用いて、P21 児動物脳での組織切片上の T3/T4 分布の評価を試みた。初期条件においては検出下限が 0.1-1 $\mu\text{g/mL}$ であったが、マトリックスの条件検討の結果、検出下限を 10 ng/mL まで改善することができた。しかしながら、決定したマトリックス条件を用いて、組織切片上で T3/T4 の検出を試みたところ、T3/T4 のピークの検出には至らなかった (Figure 26)。脳組織切片上で T3/T4 を検出するためには検出感度のさらなる向上が必要であると考えられた。

4-9. 児動物脳の網羅的遺伝子発現解析

0、10、250 ppm の PTU を投与した雌雄の児動物について、P4・P21 の各脳領域 (mPFC・S1・海馬) における遺伝子発現量を RNA-seq により測定した。得られた遺伝子発現データについて、発現プロファイル全体の類似性および条件間の関係性を可視化するため、正規化後データを用いて次元削減を行い、UMAP による可視化を行った。その結果、一部のサンプルで個体差に起因すると考えられる外れ値が認められたものの、全体としては脳領域および日齢ごとに異なる遺伝子発現プロファイルを示す傾向が認められた (Figure 27A, C)。また、PTU の用量に着目すると P21 において mPFC・S1・海馬の 3 領域で概ね用量ごとにプロットが一定のまとまり

を示す傾向が観察され、用量ごとに異なる遺伝子発現プロファイルを示す可能性が示唆された (Figure 27B)。特に P21 雄の海馬においては 0 と 10 ppm のプロットを多く含むグループと 10 と 250 ppm のプロットを多く含むグループに分かれる傾向が認められた。P4 に関しては、海馬では概ね用量ごとにまとまったプロット分布が確認された。一方、P4 の mPFC では各用量のプロットが均一に分布しており、この時点では用量による明瞭な分離は認められなかった (Figure 27B)。

4-10. 児動物の行動への影響

これまでの検討により、10 および 250 ppm 投与群の雄性児動物では、オープンフィールド試験において総移動距離が有意に増加し、自発運動量が亢進することが確認されている (Figure 28)。この過活動 (hyperactivity-like) に対し、ADHD 治療薬として用いられている ATX を用いた薬理学的検証を実施した。その結果、ATX は対照群の活動量に明確な変化を及ぼさず、10 ppm 投与群で認められた活動量の増加を有意に抑制した (Figure 29)。

また社会性相互作用試験では、10 ppm 投与群の雄性児動物において、4 週齢時に嗅ぎ時間が有意に増加することをこれまで示してきた。一方、8 週齢時の児動物では、統計学的に十分な検出力を満たす結果には至らなかった。そこで令和 7 年度は、例数を追加して検討を行った。その結果、8 週齢時の雄性児動物ならびに 4 週齢および 8 週齢時の雌性児動物において、有意差には至らないものの嗅ぎ時間が増加する傾向を認めた (Figure 30)。さらに、8 週齢時の雄性児動物を対象にガラス玉覆い隠し試験を実施したが、10 ppm 投与群と対照群の間で覆い隠したガラス玉数に有意差は認められなかった (データは示さず)。

4-11. 周産期の CPF 曝露による影響評価

周産期曝露により児動物に行動異常が誘導されることが報告されている、10 および 50 ppm の 2 用量で検討を行った。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。

児動物頭部の *in vivo* イメージング解析を実施したところ、雄では 10 ppm 投与群の P10 と、50 ppm 投与群の P13 において、対照群と比較して有意な BLI の低下が認められた (Figure 31)。雌では CPF 投与による頭部 BLI への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。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変化は認められなかった。

CPF を投与した児動物の P21 における血液生化学マーカーを測定したところ、雌雄ともにいずれの用量においても対照群と比較してコリンエステラーゼ活性 (ChE) の有意な低下が認められた (Figure 32)。

5. 甲状腺ホルモン関連指標の変動を考慮したヒト細胞試験法の構築

5-1. バルプロ酸投与したヒト及びラットにおける甲状腺ホルモン量への影響

ヒトにおける既存情報は、OECD TG426 が発出された2006年以降の文献に対して行い、Googleなどでキーワード valproic acid, human, T3, T4, thyroid などの組み合わせ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2報を選定した。ヒトに投与した影響を調べた文献 (Figure 33) では、Alhyan (2023)らはヒトに10~20 mg/kgで6ヶ月間経口投与し、ELISA法にて血清中の甲状腺ホルモンのT3は増加し、T4は減少することを報告した。T4はT3の前駆体であり大半を占める安定供給型の甲状腺ホルモンとして知られている。一方、T3は活性は高いが不安定でありごく微量にしか存在しない。従って本結果は総じて甲状腺ホルモンの減少を示唆する。Güngör (2024)らはヒトに10~40 mg/kgで12ヶ月間経口投与し、ELISA法にて血清中の甲状腺ホルモン (T4) が変化しないことを報告した。いずれの論文もCmaxを記載していなかった。

次に、同様のアプローチで、ラットの文献についても2報を選定した (Figure 34)。しかし、TG426への準拠はいずれも記載されていなかった。El-Bermawy (2015)らはラットに200 mg/kgで5週間胃管投与し、ELISA法にて血清中の甲状腺ホルモン (T3, T4) が減少することを報告した。Mahmoud (2020)らはラットに200 mg/kgで8週間経口投与し、ELISA法にて血清中の甲状腺ホルモン (T3, T4) が減少することを報告した (いずれもCmaxの記載無し)。

以上の文献調査により、バルプロ酸をヒト及びラットに投与した場合、血清中の甲状腺ホルモン量が減少する報告が多いことが示唆された。

2. THR α ノックダウンしたヒトiPS細胞のNGS解析

THR α 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 α 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解析を行い、THR α の下流で神経(外胚葉)分化に関わる遺伝子の網羅的検討を試みた。

NGSデータとパスウェイ解析によりTHR α ノックダウンで発現が低下する遺伝子を探索した結果、NRG2, NRG4などの神経の分化や発達に関与する因子が選定された (Figure 35)。またSlit2, PAKなどの神経細胞の移動や軸索誘導に関与する因子も選定された (Figure 36)。さらにSNAP25, Complexinなどのシナプスに局在して神経分化や成熟に関与する因子も選定された (Figure 37)。

D. 考察

1. ラット28日間反復経口投与試験

OECDガイドライン (TG407) および化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律に規定される齧歯類を用いた28日間反復経口投与試験に準じて、様々な機序に基づく抗甲状腺物質をラットに複数用量で投与し、臓器重量測定、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6年度までに、①甲状腺ホルモン合成に必須の酵素である甲状腺ペルオキシダーゼの阻害剤 (PTU・MMI)、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阻害剤 (APC・PTC)、③末梢におけるT4→T3変換を担う脱ヨウ素酵素 (DIO) の阻害剤 (IOP・ER)、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物質 (NaPB・NCD)、⑤下垂体におけるTSH産生抑制による甲状腺機能低下誘発物質 (BEX・LG)、⑥*in vitro*においてTSH受容体拮抗作用が報告されている物質 (VA-K-14・LM)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7年度は、上記のうちLG・LMの詳細な検索、新たな被験物質として④甲状腺ホルモン代謝促進剤PCN、および各物質1用量を用いた予備試験として③ヨウ素取込み阻害剤4種 (APR・PHF・OFF・ETX)と④脱ヨウ素酵素阻害剤3種 (FLU・TPN・OIT)の検討を実施した。

④PCN投与群では、血清T4減少が中用量から、TSH増加が高用量で検出された一方、病理組織学的解析における甲状腺濾胞上皮細胞肥大が低用量から、肝細胞肥大が中用量から観察された。また、肝重量および肝UGT1A6発現の有意な増加が低用量から、甲状腺重量および甲状腺NIS発現の増加が高用量で認められた。

⑤LG投与群では、用量依存的な血清T3・T4の低下が検出された一方、血清TSH、甲状腺・下垂体重量の変動は認められなかった。病理組織学的解析では、甲状腺のコロイド退縮が散見され、免疫染色により下垂体におけるTSH発現の有意な減少が観察された。

⑥LM投与群では、血清T3・T4・TSH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。病理組織学的解析では下垂体前葉の肥大/空胞化が散見された一方、免疫染色において甲状腺T3・T4産生、NIS・NQO1・GPX2発現および下垂体TSH発現の変動はいずれも認められなかった。

令和6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解析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7年度に実施した④PCN投与群において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最も高感度な指標となり得ることが示された。一方、⑤LG投与群では、BEXと同様に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。また、⑥LM投与群では、⑤と同様に濾胞上皮細胞肥大は認められなかったものの、下垂体前葉の肥大/空胞化が誘発され、TSH受容体拮抗作用による影響を反映した特徴である可能性が考えられた。

免疫染色による甲状腺T3・T4染色性の低下が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7年度検討分 (LG・LM・PCN)を含む、他の機序による抗甲状腺物質では同様の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 (APC・PTC) 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 染色と比較してより低い用量から検出された。対照的に、③脱ヨウ素酵素阻害剤 (IOP・ER) では、血清ホルモン値変動・病理組織学的所見と同用量またはより低用量から NIS 発現の低下が観察された。令和 7 年度検討分の⑤LG および⑥LM では NIS 発現変動は認められず、④PCN では発現が増加したものの、血清 T4 低下の方が高感度であった。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な指標であることが示された。

網羅的遺伝子発現解析の結果からバイオマーカー候補として見出された NQ01 および GPX2 について、①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤、②ヨウ素取込み阻害剤、③脱ヨウ素酵素阻害剤について免疫染色を実施した結果、血清ホルモン値変動と同用量で有意な発現増加が検出された。これらの結果は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、対照的に⑤ (BEX・LG) および⑥ (LM) で NQ01 または GPX2 発現の減少傾向がみられたことから、TSH 産生抑制等、④～⑥の機序予測への利用可能性も示唆された。

網羅的遺伝子発現解析の結果から、令和 7 年度に新たなバイオマーカー候補として DPP4・SNPH が見出された。DPP4 は②ヨウ素取込み阻害剤投与群の甲状腺において、血清ホルモン値変動と同用量 (APC) またはより低用量 (PTC) から発現が有意に増加したことから、同機序を有する抗甲状腺物質の検出に有用な指標であることが示された。加えて①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤では、濾胞上皮細胞肥大の程度に伴った発現増加傾向を示した。また SNPH は、①・②の各投与群の甲状腺において、血清ホルモン変動と同用量で発現増加傾向を示した。以上の結果から、いずれも病理組織学的解析をサポートする所見として有用である可能性が示唆された。

甲状腺重量、免疫染色による下垂体 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 の変動と同程度の感度で検出されたから、これらの解析は同機序による抗甲状腺物質の検出に有用と考えられた。一方、⑤TSH 産生阻害剤 (LG) は、BEX と同様に下垂体 TSH 発現低下を誘発した。LG 投与群における発現低下は血清 T4 値の有意な減少と同用量から統計学的有意差をもって認められたことから、TSH 免疫染色は TSH 発現亢進のみならず、TSH 産生阻害の機序の推定に有用である可能性が示された。

齧歯類では肝臓における UGT の発現亢進によって血中 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 7 年度の解析を含め、④ (NaPB・NCD・PCN) による 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と同用量またはより低用量から認められ、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 7 年度に予備検討実験を実施した 7 種の抗甲状腺物質は、*in vitro*における②ヨウ素取込み阻害または③脱ヨウ素酵素阻害作用が知られる一方、*in vivo*での血中ホルモン値への影響に関する情報は乏しい。今回のラットを用いた 28 日間反復投与試験において、以下の結果が得られた。

②ヨウ素取込み阻害剤では、APR・PFH 投与群において血清 T4 減少および TSH 増加が検出され、病理組織学的解析における甲状腺濾胞上皮細胞肥大、免疫染色における甲状腺 T3・T4 減少および NIS 発現増加、下垂体 TSH 発現増加が認められ、同機序の検討済物質 (APC・PTC) の結果と一致した。OFF 投与群では血清 T4 減少および下垂体 TSH 発現増加が同様に検出されたが、濾胞上皮細胞肥大の有意な増加は認められなかった。ETX 投与群では甲状腺濾胞上皮細胞肥大、下垂体 TSH および甲状腺 NIS 発現増加が同様に誘発されたが、血清および甲状腺の T3・T4 低下はみられなかった。

③脱ヨウ素酵素阻害剤では、TPN 投与群において血清 TSH 増加、下垂体 TSH 発現増加および甲状腺濾胞上皮細胞肥大が誘発され、NIS 発現は減少傾向を示し、これらの結果は同機序の検討済物質 (IOP・ER) と一致した。FLU 投与群では血清 T4 減少が検出されたが、④代謝促進物質 (NaPB) と同様の小葉中心性肝細胞肥大および顕著な UGT1A6 発現増加が認められたことから、*in vivo*では④肝臓を介した抗甲状腺作用の影響が大きいことが示唆された。OIT 投与群では IOP と同様に血清 T4 増加がみられたが、濾胞上皮細胞肥大の有意な増加は認められなかった。

以上の結果を考慮し、令和 8 年度に実施する複数用量を設定した 28 日間反復投与実験の被験物質として、②ヨウ素取込み阻害剤：APR・PHF および③脱ヨウ素酵素阻害剤：TPN の 3 物質を選択した。また、評価法としての信頼性向上のため、①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤についても、新たに追加の被験物質として ODA および SMT を用いた検索を実施する。

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 6 年度までに、①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤 (PTU・MMI)、②ヨウ素取込み阻害剤 (APC・PTC)、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) の計 8 物質について、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を行ってきた。令和 7 年度は新たに、①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤 (ODA・SMT)、③脱ヨウ素酵素阻害剤 (TPN) および⑤TSH 産生阻害剤 (LG) の 4 物質を被験物質として選定し、LG は甲状腺・下垂体のマイクロアレイ解析を、ODA・SMT・TPN は甲状腺のマイクロアレイ解析を実施した。

LG 投与群では、対照群と比較して体重の増加傾向がみられたが、甲状腺および下垂体重量に変化は認められなかった。同様の傾向は、今年度に先行して実施された赤根らの結果とも一致しており、本試験の再現性が確認された。

マイクロアレイ解析の結果、LG 投与群では甲状腺および下垂体における遺伝子発現変動はわずかであり、過去に実施した⑤TSH 産生阻害剤 BEX と同様の傾向を示した。ODA・SMT 投与群の甲状腺では、過去に検討した①甲状腺ペルオキシダーゼ阻害剤 PTU・MMI に比較して遺伝子発現変動は軽度であったが、これは抗甲状腺作用の程度を反映したものと考えられた。また、TPN 投与群の甲状腺では、③脱ヨウ素酵素阻害剤 IOP と同程度の発現増加遺伝子が認められた。今後は、作用機序ごとにデータの再解析を行い、機序特異的な遺伝子変化について検討する予定である。また、マイクロアレイ解析の詳細なデータは豊田・赤根らに提供し、新たなバイオマーカーとしての活用に加え、抗甲状腺作用機序の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 の専門家会議においては、甲状腺機能障害を誘発する種々の機序に基づく複数の *in vitro* 評価法が開発されつつあり、一部ではあるものの着実にバリデーション評価が進められている。また、EU-NETVAL 以外の組織 (PEPPER、PARC 等) との協力や魚類を用いた評価法など多様化していく可能性もみられた。

EPA のヒト甲状腺細胞を用いた評価系については、4 施設におけるバリデーション結果が一定の精度をもって示され、その内容が論文化された (*Toxicol Sci.* 2024; 199: 89-107; *Toxicol Sci.* 2025; 207: 415-34; *Toxicol Sci.* 2025; kfaf166.)。一方で、EPA での主担当であった研究者の退任が報告されており、研究の継続性については不透明な部分が示された。

一方、これらの評価法はいずれもリスク評価ではなく、ハザード評価を主眼としている点は留意が必要と考えられた。また、アッセイに必要な培養細胞の恒常的な供給および血清や細胞を含むヒトサンプルを用いた評価系の倫理的な問題に関する意見も提起されており、継続的な情報収集が必要と考えられた。

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について

我々はこれまでに、GD18.5 における母動物の検討から、マウスへの PTU 混餌投与において 250 ppm は典型的な甲状腺機能低下を誘導し、10 ppm は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、LD21 の母動物および P21 の児動物 (雌雄) の T3・T4・TSH を測定したところ、10 ppm 投与により母動物・児動物ともに T4 低下が認められた一方、T3 低下は明確ではなかった。TSH については、10 および 50 ppm 投与群の児動物雌で有意な上昇が認められたが、その上昇幅は 250 ppm 投与群と比較して約 1/10 程度であった。

さらに、10 および 50 ppm 投与群の母動物と児動物雄では TSH の明確な上昇は認められなかったことを踏まえると、改めて 10 ppm PTU は甲状腺機能低下を誘導し得る閾値域の用量である可能性が示唆された。

また、10 ppm 投与群の児動物雄および 50 ppm 投与群の母動物・児動物雌で認められた T3 の有意な上昇は、閾値域の用量で散見される反応であり、甲状腺ホルモン軸の負のフィードバックや代償機構 (末梢変換、分泌動態、クリアランスの変化など) に伴う現象である可能性がある。すなわち、T3 は甲状腺機能低下の“中核指標”というより、T4 低下に対して生体が恒常性維持を試みる過程で変動し得る従属的指標として解釈するのが妥当と考えられる。この点は、母動物と児動物それぞれの指標の回帰解析 (BBDR 解析) から得られた所見とも整合する (Table 3)。児動物側の甲状腺機能低下を表す指標としては、P21 の T4、とりわけ対照比で正規化した Re1T4 が最も解釈性が高く、母動物ホルモン環境の変化との対応も一貫していた。一方、TSH は分布の歪みが大いことから自然対数変換 (logTSH) により関係性が安定し、母動物側ホルモン環境の変化を鋭敏にトレースする指標であったが、負のフィードバックの結果として大きく変動する“応答指標”の性格が強い。したがって、TSH は高感度マーカーとして有用である一方、甲状腺機能低下の中核指標というより、T4/FT4 低下に伴う二次的変化として位置づけるのが適切である。

母動物側では、GD18.5 の T4/FT4/TSH/T3 (用量群平均) と児動物 P21 の指標の間に強い線形関係 (高い R² で説明) が認められ、特に児動物 T4 (および Re1T4) に対する説明力は高かった。本解析で得られた強い相関は、「妊娠末期 (GD18.5) の母体 T4/FT4 の低下が大きい用量群ほど、離乳期 (P21) の児動物でも T4 低下や TSH 上昇が大きい」という一貫した用量依存性を示すものである。すなわち、児動物の甲状腺ホルモン測定を含む DNT (TG426) や拡張世代繁殖毒性試験 (EOGRTS; TG443) といった負荷の大きい試験に進む前の段階でも、出生前発生毒性試験 (TG414) や生殖発生毒性スクリーニング試験 (TG421) 等で得られる妊娠末期の母動物 T4 を“早期警戒指標”として、児の甲状腺影響リスクを推定し、追加試験 (DNT/EOGRTS) の実施判断のトリガー (判断材料) として活用できる可能性を示した点で、試験戦略 (tiered testing) 上の意義は大きい。一方で本解析は、GD18.5 母動物と P21 児動物のデータが別コホートで得られたものであるため、ここで示された関係は「同一母子ペアの個体差」を直接示すものではなく、用量群レベルでの整合性を示した結果である点に留意が必要である。今後は、同一コホートで GD18.5 と P21 を同時に測定して再確認するとともに、PTU 以外の甲状腺攪乱物質でも同様に成立するかを検証し、さらに母体 T4/FT4 がどの程度低下した時点で児動物指標が動き始めるか (例: 10-20%低下など) をトリガー値 (閾値) として数値化することで、行政判断に直結する指標としての実装性を高めることが期待される。

一方、LD21 母動物と P21 児動物のデータは同一コホートであり、DamID に基づく個体対応が成立する。この条件下では、母動物 LD21 の T4 および TSH は児動物 P21 の T4 および logTSH と有意に関連し、とりわけ母動物

LD21 の T4 は児動物 T4/ReT4 と強く対応した。したがって、母動物指標としては、(i) 妊娠末期 (GD18.5) における T4/FT4 が“母体甲状腺ホルモン環境”の代表指標として感度が高く、(ii) 授乳末期 (LD21) の T4/TSH は母子対応の取れる実測指標として児動物の甲状腺機能低下状態をよく反映する、という二層の位置づけが可能と考えられる。総合すると、児動物の甲状腺機能低下を最も端的に示すのは P21 の T4 (ReT4) であり、TSH (logTSH) はそれに随伴するフィードバック応答として変動する高感度マーカー、T3 は代償・調節の影響を受けやすい従属の指標として解釈するのが適切である。

10 ppm 投与群の児動物も、8 週齢時には P21 で検出された甲状腺の組織学的所見 (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 投与群の児動物においても、8 週齢時には甲状腺で濾胞上皮細胞肥大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所見 (コロイド消失等) 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たことから、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。

さらに本研究において、 μ CT 解析により P10 児動物における甲状腺の体積・表面積の PTU 用量依存的な増加を検出できることが明らかとなった。発達期マウスの甲状腺は小さく、周辺組織からの単離には高い技術が必要であることから、 μ CT 撮影・3D 再構築による体積・表面積の定量化は甲状腺重量を補完する指標としての活用が期待される。また透明化した組織を用いて内部構造の変化についても解析し、様々なパラメータを設定することで客観的評価ができる可能性がある。このような解析結果は、既存の病理組織学的解析を補完するのみならず、BBDR 解析への活用も期待されることである。今後はさらに若い日齢においても検討する予定である。

4-2. 周産期甲状腺機能低下と行動異常について

令和 6~7 年度にかけて自発運動量、不安様行動、衝動性・不注意性行動、社会性行動、作業記憶などを評価する一連の行動試験を児動物で実施してきた。その結果、軽度で閾値付近の甲状腺ホルモン不足が想定される条件 (PTU 10 ppm 投与群) において、4 週齢および 8 週齢の新奇環境下オープンフィールド試験で総移動距離の増加が認められた。本所見は中心滞在時間の変化を伴わなかったことから、回避・不安様反応の変化よりも、新奇環境下における過活動様行動 (novelty-induced hyperactivity) として解釈するのが妥当である。また、8 週齢時にオープンフィールド試験を実施した個体を対象に、9 週齢で新奇環境下の赤外線センサー試験を実施し、ATX 投与の影響を評価したところ、ATX は対照群の活動量を明確に変化させずに PTU 群の活動量増加を抑制した。これは、PTU 曝露で惹起された新奇環境下の過活動様行動が、少なくとも一部はノルアドレナリン系で修飾され得る行動出力であることを支持

している。また 8 週齢雄で実施したガラス玉覆い隠し試験では群間差が認められなかったことから、行動変化が反復的覆い隠し行動の様な亢進として表れるわけではなく、主たる表現型が「新奇環境下での運動活動亢進」に偏っている可能性が高い。すなわち、行動プロファイルの重心は反復行動の広範な増加というよりも、新奇刺激に対する反応の持続 (馴化過程の遅延) や覚醒調節・注意配分の変化にあると考えられる。一方、社会性相互作用試験で認められた匂い嗅ぎ時間の増加は、社会的探索の増大として解釈し得るが、同時に刺激への反応性や馴化過程の変化を反映する可能性もある。

PTU 10 ppm 投与群は、母動物および児動物のいずれにおいても T4 (FT4) 低下のみを示し TSH は変化しないという内分泌学的特徴を示しており、ヒト疫学研究でしばしば用いられる妊娠初期 hypothyroxinemia/hypothyroxinaemia (FT4 低値・TSH 基準範囲) に近い状況として位置づけられる。実際、オランダで行われた約 3,800 組の母子を対象とした前向き出生コホート (Generation R) では、妊娠初期の母体 hypothyroxinemia (TSH 基準範囲かつ FT4 が分布下位 5%) が、8 歳時の ADHD 症状 (Conners 尺度 ADHD index) の上昇と関連し、IQ で調整すると軽度に減弱するものの、TPO 抗体陽性者を除外または自閉症状態で調整しても概ね同様であった (Modesto *et al.*, *JAMA Pediatrics*, 2015)。さらに、「過活動/注意の問題が状況依存的 (家庭よりも外的要求の高い場面に顕在化し得る)」という観点では、教師報告に関する疫学調査がある。教師評価は、家庭外のより構造化された場面 (園・学校) での行動制御を反映しやすく、個体が置かれる状況の“新奇性/要求水準”に依存して表出する過活動・不注意を捉えやすい特徴がある。オランダで 2000 組を対象として行われた ABCD コホートでは、妊娠初期の母体 hypothyroxinaemia が教師報告の hyperactivity/inattention と関連 (調整後 OR 1.70) した一方、親報告では関連がみられず、また他の問題行動 (情緒、素行など) との関連も明確ではなかった (Oostenbroek *et al.*, *Psychoneuroendocrinology*, 2017)。同様に、デンマーク出生コホート (DNBC) 内の 5 歳追跡研究でも、母体甲状腺機能と児の実行機能・行動問題の関連は教師報告でのみ認められ、その関連は IQ 低下よりもむしろ “isolated fT4 変化 (= hypothyroxinemia)” が優位であることが示されている (Andersen *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab*, 2018)。これらを踏まえると、本研究で観察された「新奇環境下での運動活動亢進」は、家庭内よりも外的要求が高い状況で顕在化しやすい“過活動/注意・行動制御 (実行機能)”の問題として捉えられる疫学知見と、状況依存性という観点で方向性が整合しており、ヒトに外挿する際の概念的な橋渡しとなり得る表現型と考えられる。

その一方で、前述の通り Generation R においても母体 hypothyroxinemia と ADHD 症状の関連は IQ で調整すると一定程度減弱し得ることが示されており、甲状腺機能低下の影響が単一の側面に限定されない可能性が示唆される。従って、本研究の匂い嗅ぎ増加は、過活動様行動と併存し得る「探索・刺激反応性」の変化として位置づけ、社会性そのものの変化か、反応性/馴化過程

の変化を今後の解析（刺激種、反復提示、回数と1回当たり時間の分解など）で精緻化する必要がある。

他方、実験動物を用いた甲状腺機能低下時のDNTに関する報告はこれまでも存在するが、典型的な（より重度の）甲状腺機能低下条件に偏っている場合や、行動指標の提示にとどまり、甲状腺機能低下の程度と有害事象(A0)との関係を定量的に整理できていない場合が多く、情報は断片的であった。これに対し本研究では、軽度で閾値付近の甲状腺ホルモン不足が想定される条件でも、新奇環境下の過活動様行動を中心とする行動変化が検出され得ることをマウスモデルで初めて提示した。本知見は、甲状腺機能低下を介して作用する化学物質について、低用量域の影響評価やリスク管理を検討する際の議論に資する情報になると考えている。

4-3. Syn-Rep マウス頭部BLI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 投与群において、Syn-Rep マウス児動物の頭部BLIが対照群と比較して生後早期は低値、その後高値へ転じること、また10 ppm 投与群は250 ppm 投与群と比較して変化が軽度であることを示してきた(21KD1004: 総合研究報告書)。本研究では用量依存性の確認を目的として、中間用量である50 ppm 投与群のBLIを評価した。その結果、10 ppm および 250 ppm 投与群と同様の方向性(早期低下～後期上昇)を示し、変化の程度も両者の中間であった。これらの結果から、BLI変化に関してPTUの用量依存性が支持され、周産期の甲状腺機能低下の程度とBLI変動が対応し得る可能性が示唆された。

この対応関係をより明確にするため、母動物および児動物の甲状腺関連ホルモン指標とBLIの関係についてBBDRの考え方に基づく解析(相関構造の整理)を行った。BLIは複数日齢から得られる脳イメージング指標であるため、日齢差を見た上で、BLI_meanとして統合した指標を作成した。その結果、BLI_meanは母動物GD18.5のT4/FT4低下およびTSH上昇と明瞭に対応して変動し、妊娠末期に形成される甲状腺ホルモン状態(用量群レベル)と整合するアウトカムである可能性が示された。またLD21母動物およびP21児動物の指標とも中程度の相関が認められ、周産期の甲状腺ホルモン軸の変動とBLI変動が一定程度並行することが支持された。一方で、GD18.5指標は別コホートの用量群平均であるため、本結果は同一母子ペアの個体差を直接示すものではなく、「用量群として、母体甲状腺機能低下が大きい群ほどBLI_meanの変動も大きい」という整合性を示す結果として解釈すべきである。

TSHはT4低下に対する負のフィードバックを反映する二次的指標として位置づけられるが、本研究ではBLIがGD18.5のTSHと比較的高い相関を示した。これは、BLI変動が甲状腺ホルモン軸の変化(特にT4低下に伴う調節応答)と整合しているという点で矛盾しない。さらに日齢別の解析においてP16のBLIとP21児動物TSHで相対的に高い相関が認められたことは、後期日齢のBLIが離乳期に確認される甲状腺機能低下状態と方向性を揃えて変動し得ることを示す所見と考えられる。

なお、BLI_meanの代わりにP4の陰性対照群平均で正

規化した指標を用いた同様の解析では、甲状腺関連ホルモン指標との相関の方向性や、相関が強い指標の組合せは概ね一致していた。一方で、日齢別解析で示した通りBLIの変動はP10以降でより明瞭であるため、P4基準で正規化すると、基準日(P4)のばらつきが以降の日齢の相対値にも影響しやすくなり、結果として説明力(R^2)がBLI_meanより低下する傾向が認められた。以上より、本研究の目的(P4-16の脳発達影響を統合して評価する)に照らすと、以降の解析ではBLI_meanを主解析指標として用いることが妥当と判断した。

BMD解析では、BLI_meanのBMD10(対照比+10%)は約12.8 ppmであった。推定には不確実性を伴うものの、母体ホルモン指標(例:GD18.5のT4/FT4)から算出されたBMD10(対照比-10%、約14.5 ppm)と近い用量域に位置したことは、BLIが周産期の甲状腺機能低下の程度と整合して変動し得る脳発達アウトカムである可能性を補強する所見と考えられる。さらに、BLI_meanが変動し始める用量域が、これまでの検討で行動変化が示唆される用量域(例:10 ppm付近)と近接していることから、BLIは行動試験に進む前段階で脳発達影響の可能性を示す“追加試験検討のトリガー指標(候補)”として活用できる可能性がある。今後は、脳の組織学的解析およびRNA-seq解析との対応関係を検討することで、BLIの定量的評価系としての妥当性をさらに強化したい。

4-4. 児動物脳の組織学的解析および網羅的遺伝子発現解析について

P21児動物においては、脳の相対重量の増加が認められたが、250 ppm投与群では体重増加抑制に起因したものであると考えられた。しかし50 ppm雄では有意な体重増加抑制が起きてい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の変動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(Bernal, *Endotext*, 2025)。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投与群の情動行動変化をもたらしたものと推察される。以上のことより、周産期の甲状腺機能低下が、児動物の脳発達に悪影響を及ぼし、新奇環

境下における過活動を引き起こした可能性が示唆された。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。

イメージング MS を用いて脳組織切片上の T3/T4 分布の検出を試みたが、現状の測定条件では検出できなかった。ラットの脳内 T3/T4 濃度は 1–3 ng/g であると報告されていることから (Kunisue *et al.*, *Anal Chem*, 2011)、マウスにおいても現在の検出下限 (10 ng/mL) から 10 倍以上感度を上げる必要があると考えられる。今後は、引き続き測定条件の検討を行うことで、脳内 T3/T4 局在評価を試みるとともに、イメージング MS を用いた神経伝達物質の評価も検討する予定である。

RNA-seq 解析で得られた遺伝子発現データについて、UMAP 解析で発現プロファイルの全体像を可視化したところ、P21 の mPFC・S1・海馬に加えて、P4 の海馬でも概ね用量ごとに異なる分布を示す傾向が観察され、PTU 投与により遺伝子発現プロファイルが変化している可能性が示唆された。特に P21 雄の海馬においては 0 と 10 ppm のプロットを多く含むグループと 10 と 250 ppm のプロットを多く含むグループの 2 つに分かれる傾向が認められた。今後はこの 2 グループ間で発現量に差が認められる遺伝子を抽出し、海馬での KE の探索を検討したいと考えている。一方、P4 の mPFC では PTU 投与による明瞭な分離は認められなかったことから、この時点では当該領域において PTU 投与による遺伝子発現プロファイルの変化は顕在化していない可能性が考えられた。mPFC に関しては P4~P21 にかけて PTU 投与による遺伝子発現プロファイルが変化すると考えられる。今後は遺伝子発現変化を領域ごとに経時的に捉えていくことで AOP の構築につながると期待される。今回の UMAP 解析は遺伝子発現データの全体像を俯瞰的に把握する目的で実施したものである。今後は解析パラメータや対象とする群の検討に加え、様々な手法を取り入れて多様な角度から詳細な解析を進める予定である。さらに、ヒトの神経発達症では発症に性差があることも報告されている。したがって、今後は PTU 誘発異常行動発現の性差についても組織学的解析と合わせて総合的に検討を行う予定である。

4-5. 母体甲状腺機能低下による児動物の甲状腺・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)。本研究では、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 児動物の血液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。

4-6. 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。*in vivo* イメージングの結果より、CPF 投与により雄でのみ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ものの、雌では影響は認められなかった。CPF は DNT 陽性対照候補物質とされているが、Syn-Rep マウスのレポーター活性を指標とした場合には顕著な影響として捉えることは難しい可能性が示唆された。また、各種脳構成細胞マーカーの染色像においても、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。

CPF の甲状腺機能への影響については、DNT に着目した研究ではないものの、マウス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 (De Angelis *et al.*, *Toxicol Sci*, 2009)。また、CPF 類縁化合物である chlorpyrifos-methyl については、ラットにおける甲状腺ホルモン変動および甲状腺組織変化が報告されている (Jeong *et al.*, *Toxicology*, 2006)。これらの既報は CPF 投与方法や甲状腺関連指標のエンドポイントが本研究で用いた条件とは異なるものの、少なくとも今回用いた試験条件下においては、甲状腺組織像への明らかな影響を与えない可能性が示唆された。

5. 甲状腺ホルモン関連指標の変動を考慮したヒト細胞試験法の構築

本研究ではまず文献調査を行い、ヒト及びラットへのバルプロ酸投与では、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確認した。こうした文献情報は、発達期におけるバルプロ酸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)。また、双極 I 型障害の 44 歳女性において、バルプロ酸投与後に中枢性甲状腺機能低下症を発症した症例が報告された (Kanamori *et al.*, *Ann. Gen. Psychiatry*, 19:49, 2020)。患者はバルプロ酸の投薬開始後に躁症状は改善した一方、約 1 か月後から強い疲労感を訴えた。血液検査では free T4 および free T3 の低下が認められたが、TSH は正常範囲内であり、中枢性甲状腺機能低下症が疑われた。また、バルプロ酸の中止後には疲労症状および甲状腺ホルモン値はいずれも改善したことから、バルプロ酸誘発性の甲状腺機能低下症と考えられた。以上の先行研究から、

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、バルプロ酸は golden standard になると考えられる。

甲状腺ホルモン受容体 THR には α と β 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 α は神経発生に関係するが、THR β 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 α の発現が選択的に亢進したことから、今回は THR α を優先的に評価した。しかしながら、THR α と β 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 THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の NGS 解析により、神経分化時に THR α の下流で働く可能性のある因子を探索した結果、神経分化・発達に関与する遺伝子や神経細胞の移動や成熟・軸索誘導に関与する遺伝子などいくつか選定した。NRG2, NRG4 はシナプス形成・可塑性に重要である ErbB 受容体のリガンドとしても知られており、本解析で同定した軸索誘導因子 Slit2, PAK やシナプス成熟因子 SNAP25, Complexin といった因子とクロストークしている可能性も考えられる。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アスピリンなどの発達神経毒性の陰性対照化合物を用いてさらなる検証を行う必要がある。

バルプロ酸の神経毒性メカニズムに関しては、最近、ヒト胎盤を用いた *ex vivo* 胎盤灌流系や胎盤絨毛培養研究において、バルプロ酸は葉酸輸送体や甲状腺ホルモン輸送体などの発現を変化させ、胎盤機能に影響を及ぼす可能性が報告されている (*Birth Defects Res.*, 2025 Apr 11;117(4):e2471.)。これらの知見から、バルプロ酸の発達毒性には、胎児への直接作用に加え、ヒト胎盤における栄養・ホルモン輸送異常に関与する可能性が示唆されている。さらに、動物を用いた研究では、従来から知られる HDAC 阻害を介したエピジェネティック異常に加え、CYP450 関連代謝異常、神経炎症、腸脳相関を介した神経伝達異常が複合的に関与することが報告された (*Food Chem. Toxicol.*, 2026 Feb;208:115882.)。妊娠期 VPA 曝露ラットでは、社会性低下などの ASD 様行動異常や脳組織変化に加え、ステロイド代謝やアラキドン酸代謝の異常も認められており、VPA 誘発神経発達毒性には多層的な分子ネットワーク異常に関与する可能性が示されている。一方で、バルプロ酸が血液脳関門の機能や甲状腺ホルモン輸送に及ぼす影響については依然として不明な点が多く、ヒト iPSC 由来 BBB モデルなどを用いた詳細な検討が必要と考えられる。

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、甲状腺ホルモンの解析を行うこと、中西グループのレポーターマウスの NGS データなどと比較することなどにより、有用なバイオマーカーなどを検討し、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 7 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

剤、②ヨウ素取込み阻害剤、③脱ヨウ素酵素阻害剤、④甲状腺ホルモン代謝促進剤の検出において、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かつ最も高感度な指標となり得ることが示された。網羅的遺伝子発現解析により、令和 7 年度に新たに見出された DPP4・SNPH を用いた免疫染色は、これらの病理所見をサポートする指標として有用である可能性が示された。また、甲状腺 T3・T4・NIS、下垂体 TSH および肝 UGT1A6 等の各種免疫染色を併用することで、抗甲状腺作用の機序推定が可能であることが示された (Figure 16)。本手法は、既存の OECD ガイドライン試験であるラット 28 日間反復経口投与毒性試験 (TG407) に容易に組み込みが可能であり、化学物質の抗甲状腺作用検出のため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た。一方、提案されている評価法はいずれもリスク評価ではなく、ハザード評価を主眼としている点は留意が必要と考えられた。また、OECD の専門家会議では、アッセイに必要な培養細胞の恒常的な供給、および血清や細胞を含むヒトサンプルを用いた評価系の倫理的問題に関する意見も提起された。さらに、EPA の組織再編による影響も懸念され、今後の動向について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、母動物および児動物の甲状腺関連ホルモン、脳 *in vivo* イメージング指標 (Syn-Rep マウス頭部 BLI)、ならびに行動試験結果を統合的に解析した。その結果、母動物 (GD18.5, LD21) と児動物 (P21) の甲状腺指標 (特に T4 [Re1T4 を含む]、logTSH) との間に強い線形関係が認められ、妊娠末期の母体甲状腺ホルモン環境の変動が、離乳期の児動物における甲状腺機能低下の程度と整合して変化することが示唆された。以上の結果は、児動物の甲状腺ホルモン測定を含む DNT 試験 (TG426) や EOGRTS (TG443) といった負荷の大きい試験に進む前段階において、出生前発生毒性試験 (TG414) や生殖発生毒性スクリーニング試験 (TG421) で取得可能な妊娠末期 (GD18.5) の母動物 T4/FT4 および TSH を“早期警戒 (トリガー) 指標”として活用し、追加試験の要否判断や優先順位付けに資する可能性を示すものである。

また Syn-Rep マウスを用いた *in vivo* イメージング解析では、各日齢の対照比で正規化した BLI を P4-P16 で統合した指標 (BLI_{mean}) が、母動物および児動物の甲状腺関連ホルモン指標と一貫した関連を示すことを確認した。これは、BLI が周産期の甲状腺ホルモン軸の変動に整合して変動し得る脳発達アウトカムである可能性を示唆する所見である。さらに BMD 解析により BLI_{mean} の変動が生じる用量域が定量化され、行動学的変化が示唆される用量域 (10 ppm 付近) においても、脳発達影響を検出し得る可能性が示された。以上より、甲状腺機能低下を誘導する化学物質のリスク管理にお

いては、明確な甲状腺機能低下が成立する前段階(閾値域)でも児動物の脳発達影響が生じ得る点に留意が必要であり、妊娠末期母動物の甲状腺関連指標およびSyn-RepマウスのBLIの活用が期待される。

甲状腺ホルモン受容体 α 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評価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] Matsushita K, Akane H, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K, Toyoda T. Possible involvement of tubular interleukin-34 in macrophage recruitment during colistin-induced nephrotoxicity in rats. *J Toxicol Sci.* (in press)
- [2] Murata Y, Akagi J, Doi Y, Iso T, Umano T, Masumura K, Matsumoto M, Toyoda T, Ogawa K. Evaluation of 13-week repeated-dose oral toxicity of zirconium(IV) butoxide in Crl:CD(SD) rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2026; 164: 105968.
- [3] Mitsumoto T, Ishii Y, Takimoto N, Takasu S, Namiki M, Toyoda T, Ogawa K. Evaluation of 2-isopropyl-N-2,3-trimethylbutyramide by a comprehensive toxicity study using *gpt* delta rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2026; 507: 117686.
- [4] 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.
- [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 Pharmacol.* 2025; 496: 117243.
- [6] Matsushita K, Tsuji G, Akane H, Ishii Y, Takasu S, Ogawa K, Ito T, Yokoo H, Sennari G, Iwatsuki M, Hirose T, Hanaki H, Demizu Y, Hirabayashi Y, Saito Y, Honma M, Toyoda T. A 28-day subacute toxicity study of puberulic acid in Crl:CD(SD) rats. *J Toxicol Pathol.* 2025; 38: 223-36.
- [7] Yoshida A, Hashimoto Y, Akane H, Matsuyama S, Toyoda T, Ogawa K, Saito Y, Kikura-Hanajiri R, Arakawa N. Analysis of stratifin expression and proteome variation in a rat model of acute lung injury. *J Proteome Res.* 2025; 24: 1941-55.
- [8] Celardo I, Aschner M, Ashton RS, Carstens KE, Cediel-Ulloa A, Cöllen E, Crofton KM, Debad SJ, Dreser N, Fitzpatrick S, Fritsche E, Gutsfeld S, Hardy B, Hartung T, Hessel E, Heusinkveld H, Hogberg HT, Hsieh JH, Kanda Y, Knight GT, Knudsen T, Koch K, Kuchovska E, Mangas I, Marty MS, Melching-Kollmuss S, Müller I, Müller P, Myhre O, Paparella M, Pitzer E, Bal-Price A, Sachana M, Schlüppmann K, Shafer TJ, Schäfer J, Smirnova L, Tal T, Tanaskov Y, Tangianu S, Testa G, Ückert AK, Whelan M, Leist M. Developmental neurotoxicity (DNT): A call for implementation of new approach methodologies for regulatory purposes: Summary of the 5th International Conference on DNT Testing. *ALTEX.* 2025; 42: 323-49.
- [9] OECD (2025), Workshop Proceedings on Critical Innovations in pesticides safety testing and chemical risk assessment for developmental neurotoxicity (DNT), OECD Series on Testing and Assessment, No 412, OECD Environment, Health and Safety, Paris, [https://one.oecd.org/official-document/ENV/CBC/MONO\(2025\)10/en](https://one.oecd.org/official-document/ENV/CBC/MONO(2025)10/en) (2025.9.30. 分担執筆: Kanda Y)
- [10] Nakanishi T, Matsumaru D, Ishida K. Advances in bioluminescence imaging for assessment of developmental neurotoxicity. *BPB Rep.* 2025; 8: 176-81.
- [11] Ono A, Miyaoka T, Koan D, Jin Z, Chen L, Hayata-Takano A, Asan S, Yokoyama R, Ishimoto K, Hino N, Harada A, Nakazawa T, Hashimoto H, Waschek JA, Nakagawa S, Tanimoto K, Ago Y. Neuron-specific overexpression of human vasoactive intestinal peptide receptor 2 in mice causes cognitive dysfunction and abnormal dendritic morphology in the prefrontal cortex. *J Pharmacol Sci.* 2026; 160: 111-21.
- [12] Shintani Y, Hayata-Takano A, Takasaki I, Kurihara T, Miyata A, Yamano Y, Ikuta M, Takeshita R, Murata K, Oguri T, Asaka C, Nunomura K, Lin B, Nakagawa S, Okada T, Toyooka N, Takumi T, Ago Y, Takuma K, Hashimoto H. Rapid and long-lasting antidepressant-like effects of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor antagonist PA-915 in chronic stress mouse models. *Mol Psychiatry.* 2026; 31: 1014-26.
- [13] Ueno H, Iyanaga Y, Kunida K, Hara Y, Miura H, Nakai Y, Tanuma M, Hayashida M, Yokoyama R, Ohkubo J, Seiriki K, Hayata-Takano A, Ao T, Yamaguchi S, Kitaoka S, Furuyashiki T, Ago Y, Nakazawa T, Takuma K, Yoshimoto J, Hashimoto H, Kasai A. Recovery of centralities in medial prefrontal and sensory-related cortices

associated with social behavior improvements in an autism mouse model. *Sci Rep.* 2025; 15: 22895.

2. 学会発表

- 1) 豊田武士、赤根弘敏、石井雄二、小川久美子. ラット反復経口投与毒性試験における抗甲状腺物質の検出および機序推定. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025 年 7 月)
- 2) 豊田武士. 抗甲状腺物質の *in vivo* 評価法開発および *in vitro* 系との比較. 第 32 回 HAB 研究機構学術年会 (2025 年 5 月)
- 3) Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Toyoda T, Ogawa K. Characterization of remaining titanium dioxide in Peyer's patches of rats after subchronic oral exposure. 65th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2026. 3)
- 4) 赤木純一、水田保子、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の休薬後動態の検討. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2026 年 1 月)
- 5) 西村拓也、高橋祐次、豊田武士、角田聡、鈴木睦、佐藤玄、小川久美子、平林容子. 毒性試験用語の標準化に向けた用語集改訂と継続的な更新が可能なデータベース化への取り組み. 第 8 回医薬品毒性機序研究会 (2025 年 12 月)
- 6) 赤木純一、横井雅幸、三宅ゆみ、松下幸平、菅澤薫、岩井成憲、豊田武士. アクリルアミド代謝物により誘導される多様な DNA 修飾とその生理的影響. 第 48 回日本分子生物学会年会 (2025 年 12 月)
- 7) Akagi J, Yokoi M, Miyake Y, Matsushita K, Sugasawa K, Iwai S, Toyoda T. Distinct replicative and mutagenic consequences of different glycidamide DNA adducts in human cells. ISNAC 2025 (2025. 11)
- 8) 赤木純一、曹永晚、横井雅幸、花岡文雄、松下幸平、豊田武士、小川久美子. 野生型および Pol κ 欠損マウスにおけるベンゾ[a]ピレン誘発前胃腫瘍の突然変異解析. 第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月)
- 9) 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. 急性腎障害から慢性腎臓病への移行における CD44 の予測指標としての有用性の検証. 第 168 回日本獣医学会学術集会 (2025 年 9 月)
- 10) 井上亮、松下幸平、西銘千代子、豊田武士、畠山雅彦、文随友花、山本大地、小川久美子、鈴木雅実. コモンマーモセットを用いた免疫毒性評価における T 細胞依存性抗体産生試験. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025 年 7 月)
- 11) 西村次平、豊田武士、西川秋佳、小川久美子. WoE 評価を用いたがん原性評価の留意事項について - 規制当局の視点から -. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025 年 7 月)
- 12) 小川久美子、赤根弘敏、豊田武士. 機序に基づく抗甲状腺物質の *in vivo* 評価法開発と国際動向. 日本動物実験代替法学会第 38 回大会 (2025 年 11 月)
- 13) 小川久美子、松下幸平、豊田武士. 非ヒト霊長類の代替法に関する研究 -免疫毒性の視点から-. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025 年 7 月)
- 14) 西村拓也、平林容子、小川久美子、角田聡、鈴木睦、佐藤玄、豊田武士、高橋祐次. 『毒性試験用語集』の改訂と利活用可能なデータベースの構築の取り組み. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025 年 7 月)
- 15) 石井雄二. 山上洋平、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、小川久美子. Acetamide のラット肝発がんに寄与する大型小核の形成機序. 日本薬学会第 146 年会 (2026 年 3 月)
- 16) 石井雄二、高須伸二、山上洋平、相馬明玲、豊田武士、小川久美子. カルバミン酸メチルのラット肝発がん過程におけるクロモスリプシスの関与. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2026 年 1 月)
- 17) 石井雄二、高須伸二、山上洋平、相馬明玲、豊田武士、小川久美子. カルバミン酸メチルのラット肝発がんにおけるクロモスリプシス様染色体再構成の関与の検討. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025 年 11 月)
- 18) 石井雄二、高須伸二、山上洋平、相馬明玲、豊田武士、小川久美子. カルバミン酸メチルのラット肝発がん機序の検討. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025 年 7 月)
- 19) 石井雄二、瀧本憲史、山上洋平、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、渋谷淳、小川久美子. ラットを用いたカルバミン酸メチルの *in vivo* 遺伝毒性評価. 日本食品化学学会第 31 回総会・学術大会 (2025 年 6 月)
- 20) 山上洋平、石井雄二、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、村上智亮、小川久美子. アセトアミドのラット肝発がんに寄与する肝細胞質内封入体の形成機構. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2026 年 1 月)
- 21) 山上洋平、石井雄二、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、村上智亮、小川久美子. アセトアミド誘発大型小核によるクロモスリプシス様染色体再構成と肝発がんへの寄与. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025 年 11 月)
- 22) 高須伸二、石井雄二、相馬明玲、豊田武士、小川久美子. レポーター遺伝子導入動物を用いた香料化合物の *in vivo* 遺伝毒性・発がん性の評価. 第 38 回発癌病理研究会 (2025 年 8 月)
- 23) 相馬明玲、石井雄二、山上洋平、高須伸二、豊田武士、小川久美子. アセトアミドの大型小核形成に関わる構造的特徴の検討. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025 年 7 月)
- 24) 山上洋平、石井雄二、中村賢志、原島洋文、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、村上智亮、小川久美子. アセトアミド誘発ラット肝腫瘍で見られた染色体外環状 DNA の特徴とクロモスリプシスの関与. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025 年 7 月)
- 25) 増村健一、安東朋子、堀端克良、石井雄二、杉山圭一. マウスを用いたアクリルアミドの *in vivo* 変異原性と次世代に誘発される生殖細胞系列突然変異の解析. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025 年 7 月)
- 26) 赤根弘敏、高須伸二、畠山瑞穂、森川朋美、小坂忠

- 司、青山博昭、小川久美子、豊田武士。免疫組織化学的解析を用いたヨウ素取込み及び脱ヨウ素酵素阻害剤のラットにおける抗甲状腺作用の評価。第42回日本毒性病理学会総会及び学術集会（2026年1月）
- 27) 赤根弘敏、松下幸平、畝山瑞穂、森川朋美、高須伸二、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VA-K-14のラットにおける抗甲状腺作用機序の評価。第84回日本癌学会学術総会（2025年9月）
- 28) 赤根弘敏、畝山瑞穂、森川朋美、小坂忠司、青山博昭、小川久美子、豊田武士。ラット28日間反復投与毒性試験における病理組織学的及び免疫組織化学的解析によるTSH産生阻害剤の検出および機序推定。第52回日本毒性学会学術年会（2025年7月）
- 29) Matsushita K, Akane H, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K, Toyoda T. CD44 expression in renal tubules during maladaptive repair in AKI to CKD transition. World Congress of Nephrology 2026 (2026.3)
- 30) 畝山瑞穂、高須伸二、赤根弘敏、森川朋美、豊田武士。雄性Cr1:CD(SD)ラットを用いた2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanolの28日間反復経口投与毒性試験。第13回日本獣医病理学専門家協会学術集会（2026年3月）
- 31) 高須伸二、赤根弘敏、畝山瑞穂、森川朋美、豊田武士。フラン誘発肝傷害の早期に生じる肝漿膜下領域における変化の経時的解析。第42回日本毒性病理学会総会及び学術集会（2026年1月）
- 32) 松下幸平、赤根弘敏、赤木純一、森川朋美、水田保子、小川久美子、豊田武士。シクロスポリン誘発ラットAKI to CKDモデルにおけるCD44陽性尿細管の特徴の経時的解析。第42回日本毒性病理学会総会及び学術集会（2026年1月）
- 33) 畝山瑞穂、高須伸二、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子、豊田武士。免疫染色結果に基づく決定木分析によるラット肝発がん物質の早期検出法の検討。第42回日本毒性病理学会総会及び学術集会（2026年1月）
- 34) 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。ラットを用いたさまざまな結晶子径の二酸化チタンの反復経口投与毒性の検討。第8回医薬品毒性機序研究会（2025年12月）
- 35) 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。薬剤性間質性肺炎におけるStratifinの発現変動の機序解析。第46回日本臨床薬理学会学術総会（2025年12月）
- 36) Yoshida A, Hashimoto Y, Akane H, Toyoda T, Ogawa K, Saito Y, Kikura-Hanajiri R, Arakawa N. Proteomics-based study on expression dynamics of a novel biomarker candidate in interstitial lung disease rat models. 12th Asia Oceania Human Proteome Organisation (2025.10)
- 37) 畝山瑞穂、赤根弘敏、森川朋美、高須伸二、小川久美子、豊田武士。免疫染色を用いたラット肝発がん物質早期検出法の開発。第11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（2025年9月）
- 38) 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。反復経口投与によりラット小腸パイエル板に取り込まれた二酸化チタンによる免疫毒性影響の検討。第32回日本免疫毒性学会学術年会（2025年9月）
- 39) 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。Stratifinの発現変動とDAD病態の関連:肺組織およびBALFのプロテオーム解析。日本プロテオーム学会2025年大会（2025年8月）
- 40) 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。異なる結晶子径の二酸化チタン粒子の90日間反復経口投与によるラット小腸パイエル板における免疫毒性影響の検討。第52回日本毒性学会学術年会（2025年7月）
- 41) 畝山瑞穂、赤根弘敏、森川朋美、豊田武士。Cr1:CD(SD)ラットにおけるPerfluorobutanesulfonic acidの生体影響解析。第52回日本毒性学会学術年会（2025年7月）
- 42) 松下幸平、辻巖一郎、赤根弘敏、石井雄二、高須伸二、小川久美子、伊藤貴仁、横尾英知、出水庸介、平林容子、齋藤嘉朗、本間正充、豊田武士。プベルル酸のラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験。第52回日本毒性学会学術年会（2025年7月）
- 43) 水田保子、赤木純一、畝山瑞穂、赤根弘敏、六鹿元雄、磯貴子、松本真理子、小川久美子、豊田武士。ラットを用いた4-(ベンジルオキシ)フェノールの13週間反復経口投与毒性試験。日本食品化学学会第31回総会・学術大会（2025年6月）
- 44) Yamada S, Yasuhiko Y, Kanda Y. Involvement of thyroid hormone receptor α in developmental neurotoxicity. フォーラム2025 衛生薬学・環境トキシコロジー（2025年9月）
- 45) Kanda Y. Current Status and Challenges of NAMs for Chemical Safety Assessment in Japan. 第7回ラテンアメリカMAPEF(規制目的の農薬毒性試験における動物実験代替法)ワークショップ（2025年11月）
- 46) 諫田泰成。甲状腺ホルモンと発達神経毒性。日本動物実験代替法学会第38回大会（2025年11月）
- 47) 諫田泰成。発達神経毒性ガイドランスの現状と課題。第11回ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会（2025年11月）
- 48) 山田茂，諫田泰成。発達期神経毒性における甲状腺ホルモン受容体 α の役割，第99回日本薬理学会年会，仙台（2026年3月）
- 49) 中西剛。甲状腺機能低下を誘導する化学物質の神経発達症リスクをどう評価するのか？～マウスモデル用いた検証と今後の展望～、第66回日本児童青年精神医学会総会（2025年11月）
- 50) Nakanishi T. Evaluating Reproductive and Developmental Toxicity of Thyroid-Disrupting Chemicals: From Scientific Evidence to Risk Management, The 9th Chemical Hazard Symposium (2025.10)

- 51) 中西剛. *In vivo* イメージングで探る発達神経毒性評価～マウス甲状腺機能低下モデルによる検証～、第4回環境化学物質合同大会 (2025年7月)
- 52) 中西剛. マウス甲状腺機能低下モデルにおける甲状腺関連指標の変動と次世代影響との関連、第65回日本先天異常学会学術集会 (2025年7月)
- 53) 中西剛. マウス甲状腺機能低下モデルを用いた次世代影響評価～甲状腺関連指標との関連～、第52回日本毒性学会学術年会 (2025年7月)
- 54) 石田慶土、松丸大輔、中西剛. 甲状腺関連指標の変動と発達神経毒性の関連評価：周産期抗甲状腺薬投与モデルによる検証. 日本薬学会第146年会 (2026年3月)
- 55) 石田慶土、内藤紀咲、目加田京子、松丸大輔、中西剛. 鉛の発達神経毒性における adverse outcome pathway の検討、フォーラム2025：衛生薬学・環境トキシコロジー (2025年9月)
- 56) 石田慶土、内藤紀咲、目加田京子、松丸大輔、中西剛. 神経分化レポーターマウスを用いた鉛誘導性発達神経毒性の有害性発現経路に関する検討、第65回日本先天異常学会学術集会 (2025年7月)
- 57) 石田慶土、奥田悠斗、糟谷佐保里、目加田京子、松丸大輔、永瀬久光、早田敦子、田熊一敏、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脳発達への影響評価、第71回日本薬学会東海支部総会・大会 (2025年7月)
- 58) 石田慶土. レポーターマウスを用いた毒性評価系構築と化学物質リスク評価への応用、第52回日本毒性学会学術年会 (2025年7月)
- 59) 関本菜月、石田慶土、金子悠花、目加田京子、鈴木悠五、田中佐弥、立花優果、永田彩、松丸大輔、中西剛. ペルフルオロノナン酸 (PFNA) 周産期曝露における次世代影響の多角的解析. 日本薬学会第146年会 (2026年3月)
- 60) 立花優果、石田慶土、富田俊維、松丸大輔、中西剛. Gfap ノックインレポーターマウスの特性評価と神経炎症応答の解析. 日本薬学会第146年会 (2026年3月)
- 61) 永田彩、石田慶土、富田俊維、松丸大輔、中西剛. Synapsin 1 ノックインレポーターマウスの作製とその特性評価. 日本薬学会第146年会 (2026年3月)
- 62) 内藤紀咲、辰巳佳乃子、石田慶土、松丸大輔、中西剛. 鉛曝露による発達神経毒性の Adverse outcome pathway に関する検討、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2025 (2025年10月)
- 63) 奥田悠斗、石田慶土、目加田京子、鈴木悠五、富田俊維、永瀬久光、早田敦子、田熊一敏、松丸大輔、中西剛. マウス周産期甲状腺機能低下モデルによる児の脳発達への影響評価、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2025 (2025年10月)
- 64) 金子悠花、石田慶土、目加田京子、関本菜月、鈴木悠五、田中佐弥、立花優果、永田彩、松丸大輔、中西剛. ペルフルオロノナン酸の周産期曝露における次世代影響評価、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2025 (2025年10月)
- 65) 富田俊維、石田慶土、松丸大輔、宮良政嗣、古武弥一郎、中西剛. ヒト神経芽細胞腫 IMR-32 細胞の *in vitro* 発達神経毒性評価における有用性検討、フォーラム2025：衛生薬学・環境トキシコロジー (2025年9月)
- 66) 金子悠花、石田慶土、目加田京子、松丸大輔、中西剛. ペルフルオロノナン酸の周産期曝露における次世代影響評価、第65回日本先天異常学会学術集会 (2025年7月)
- 67) 奥田悠斗、石田慶土、糟谷佐保里、目加田京子、松丸大輔、永瀬久光、早田敦子、田熊一敏、中西剛. マウス周産期甲状腺機能低下モデルによる児の脳発達への影響評価、第65回日本先天異常学会学術集会 (2025年7月)
- 68) 富田俊維、石田慶土、松丸大輔、中西剛. ヒト神経芽細胞腫 IMR-32 細胞を用いた *in vitro* 発達神経毒性評価モデルの構築に関する検討、第52回日本毒性学会学術年会 (2025年7月)
- 69) 内藤紀咲、石田慶土、松丸大輔、中西剛. 低用量域鉛曝露による発達神経毒性の adverse outcome pathway に関する検討、第52回日本毒性学会学術年会 (2025年7月)
- 70) 早田敦子. PGD₂受容体 DP₁作動薬の胎生期曝露が誘導するマウスの自閉スペクトラム症様の行動変化. 日本薬学会第146年会 (2026年3月)
- 71) Hayata-Takano A, Hashimoto H. The pivotal role of PACAP-PAC1 signaling for stress control mechanisms. 第99回日本薬理学会年会 (2026年3月)
- 72) 早田敦子. ストレス関連障害の治療薬創成を目指した低分子 PAC 1 受容体遮断薬の行動薬理学的研究. BPCNPNP2025 (2025年11月)
- 67) 村田拳一郎、早田敦子、原田和生、菊池泰河、橋雅弥、田熊一敏、谷池雅子、毛利育子、橋本均. 胎生期 PGD₂-DP₁ シグナル活性化が誘導するマウスの自閉症様の遺伝子発現変容. BPCNPNP2025 (2025年11月)
- 73) 早田敦子、豊田博紀、吾郷由希夫、加藤隆史、田熊一敏. 低分子 PAC 1 受容体選択的遮断薬が慢性ストレス負荷マウスに与える影響 第67回歯科基礎医学会学術大会 (2025年9月)
- 74) 毛利育子、早田敦子、片桐綾乃、橋本均、加藤隆文、谷池雅子. 幼若期の閉塞性睡眠時無呼吸の脳発達への影響について. 第67回日本小児神経学会 (2025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 LG 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 1-2. Organ weight data for male SD rats treated with LM 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 1-3. Organ weight data for male SD rats treated with PCN for 28 days

Dose (mg/kg)	0	8	25	80
No. of animals examined	5	5	5	5
Males				
Body weight (g)	424 ± 30	437 ± 23	451 ± 32	412 ± 25
Thyroids (mg)	24.4 ± 2.7	24.8 ± 1.9	27.8 ± 3.9	34.4 ± 2.5**
(mg%)	5.8 ± 0.6	5.7 ± 0.6	6.2 ± 1.1	8.4 ± 1.0**
Pituitary (mg)	14.0 ± 0.3	13.7 ± 1.2	14.3 ± 1.6	14.8 ± 2.1
(mg%)	3.3 ± 0.2	3.1 ± 0.4	3.2 ± 0.1	3.6 ± 0.4
Adrenals (mg)	55.3 ± 7.8	53.8 ± 5.6	61.1 ± 4.1	53.6 ± 7.5
(mg%)	13.1 ± 2.4	12.3 ± 1.0	13.7 ± 1.7	13.1 ± 2.6
Liver (g)	12.15 ± 1.14	14.31 ± 1.09	14.68 ± 2.06*	16.26 ± 1.12**
(g%)	2.87 ± 0.19	3.27 ± 0.14**	3.25 ± 0.27*	3.95 ± 0.09**

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 iodide uptake inhibitors for 28 days

Dose (ppm · mg/kg)	0	APR	PHF	0	OFF	ETX
		2000	2000		300	500
No. of animals examined	5	5	5	5	5	5
Males						
Body weight (g)	407 ± 33	411 ± 25	422 ± 36	389 ± 32	404 ± 30	406 ± 22
Thyroids (mg)	23.2 ± 3.6	46.6 ± 4.2**	42.4 ± 6.4**	25.1 ± 1.8	24.9 ± 2.5	24.8 ± 2.9
(mg%)	5.67 ± 0.49	11.38 ± 1.34**	10.15 ± 2.18**	6.46 ± 0.46	6.18 ± 0.66	6.12 ± 0.78
Pituitary (mg)	16.1 ± 2.3	14.9 ± 2.4	15.8 ± 0.7	14.2 ± 1.5	13.6 ± 1.6	13.9 ± 1.6
(mg%)	3.95 ± 0.37	3.62 ± 0.55	3.75 ± 0.22	3.66 ± 0.35	3.36 ± 0.31	3.42 ± 0.36
Adrenals (mg)	54.6 ± 3.2	55.5 ± 6.6	56.3 ± 11.0	52.5 ± 4.7	47.6 ± 16.2	53.7 ± 8.5
(mg%)	13.5 ± 1.8	13.5 ± 1.6	13.3 ± 2.1	13.6 ± 1.8	11.7 ± 3.6	13.2 ± 2.0
Liver (g)	11.19 ± 1.75	11.04 ± 1.25	11.77 ± 1.20	10.35 ± 1.01	12.30 ± 1.55*	13.81 ± 0.86**
(g%)	2.74 ± 0.27	2.68 ± 0.16	2.79 ± 0.12	2.66 ± 0.11	3.04 ± 0.23*	3.40 ± 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 deiodinase inhibitors for 28 days

Dose (mg/kg)	0	FLU	TPN	OIT
		100	300	200
No. of animals examined	5	5	5	5
Males				
Body weight (g)	424 ± 30	406 ± 30	410 ± 11	381 ± 15
Thyroids (mg)	24.4 ± 2.7	28.8 ± 4.7	20.3 ± 1.9*	20.4 ± 2.3*
(mg%)	5.78 ± 0.64	7.08 ± 0.71*	4.96 ± 0.46*	5.35 ± 0.52
Pituitary (mg)	14.0 ± 0.3	14.4 ± 1.5	14.6 ± 1.3	13.7 ± 0.7
(mg%)	3.32 ± 0.22	3.56 ± 0.39	3.56 ± 0.35	3.61 ± 0.30
Adrenals (mg)	55.3 ± 7.8	53.4 ± 8.1	56.4 ± 2.2	76.3 ± 6.3**
(mg%)	13.1 ± 2.4	13.2 ± 1.8	13.8 ± 0.7	20.1 ± 1.8**
Liver (g)	12.15 ± 1.14	15.53 ± 1.60**	12.29 ± 1.10	10.33 ± 0.53*
(g%)	2.87 ± 0.19	3.83 ± 0.25**	3.00 ± 0.22	2.71 ± 0.09

Each value represents the mean ± SD.

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

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

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	0	0.016	0.08	0.4	2
			No. of animals examined	5	5	5	5
Males	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell	0	0	0	0	0
		Hyperplasia, follicular cell	0	0	0	0	0
	Colloid depletion (±)	0	0	1	1	1	
	Decrease in T4 level ^{a)}	0	0	0	0	0	
	Decrease in T3 level ^{b)}	0	0	0	0	0	
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis	0	0	0	0	0
Hypertrophy, pars distalis (±)		0	0	1	0	0	
Liver		0	0	0	0	0	

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

No significant difference was detected from the control group.

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

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

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

No significant difference was detected from the control group.

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

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	No. of animals examined			
			0	8	25	80
Males	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (\pm , +, ++)	0	5(5, 0, 0)**	5(1, 4, 0)**	5(0, 3, 2)**
		Hyperplasia, follicular cell (\pm , +, ++)	0	4(4, 0, 0)*	5(2, 3, 0)**	5(0, 4, 1)**
		Colloid depletion (\pm , +, ++)	0	3(3, 0, 0)	5(4, 1, 0)**	5(2, 2, 1)**
		Decrease in T4 level ^{a)}	0	0	0	0
		Decrease in T3 level ^{b)}	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis (\pm)	0	1	2	2
		Hypertrophy, pars distalis (\pm , +)	0	1(1, 0)	3(2, 1)	3(1, 2)
	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (\pm)	0	1	3	5**
		Hypertrophy, hepatocyte, periportal (\pm , +, ++)	0	2(0, 2, 0)	5(2, 3, 0)**	5(0, 3, 2)**

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

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

Table 2-4. Histopathological findings in male SD rats treated with iodide uptake inhibitors for 28 days

Sex	Organs and findings	Dose (ppm*mg/kg)	APR		PHF	OFF		ETX
			2000	2000	2000	0	300	500
Males	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (\pm , +, ++, +++)	0	5(0, 0, 5, 0)**	5(0, 0, 4, 1)**	0	3(3, 0, 0, 0)	5(4, 1, 0, 0)**
		Hyperplasia, follicular cell (\pm , +, ++)	0	5(0, 5, 0, 0)**	5(0, 2, 3, 0)**	0	3(3, 0, 0, 0)	5(4, 1, 0, 0)**
		Colloid depletion (\pm , +, ++, +++)	0	5(0, 2, 3, 0)**	5(0, 1, 3, 1)**	0	0	4(4, 0, 0, 0)*
		Decrease in T4 level ^{a)} (\pm , +)	0	5(3, 2)**	5(2, 3)**	0	0	0
		Decrease in T3 level ^{b)} (\pm , +, ++, +++)	0	5(0, 1, 4, 0)**	5(0, 0, 2, 3)**	0	0	0
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis (\pm , +)	0	1(1, 0)	4(4, 0)*	0	0	1(1, 0)
		Hypertrophy, pars distalis (\pm , +)	0	4(4, 0)*	4(2, 2)*	0	0	3(3, 0)
	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (\pm)	0	0	0	0	1	3

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

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

Table 2-5. Histopathological findings in male SD rats treated with deiodinase inhibitors for 28 days

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	No. of animals examined			
			0	FLU 100	TPN 300	OIT 200
Males	Thyroid	Hypertrophy, follicular cell (±, +)	0	5(2, 3)**	4(4, 0)*	3(3, 0)
		Hyperplasia, follicular cell (±, +)	0	5(3, 2)**	3(3, 0)	2(2, 0)
		Colloid depletion (±, +)	0	3(2, 1)	2(2, 0)	1(1, 0)
		Decrease in T4 level ^{a)}	0	0	0	0
		Decrease in T3 level ^{b)}	0	0	0	0
	Pituitary	Vacuolation, pars distalis (±)	0	1	2	0
		Hypertrophy, pars distalis (±)	0	1	2	0
	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (±)	0	4*	0	0

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

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

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

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

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

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

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

Sex	Organs and findings	Dose (ppm)	No. of animals examined				
			0	1	10	100	1000
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 (±, +, ++) ^{a)}	0	0	1(1,0,0)	2(2,0,0)	5(0,2,3)**
		Decrease in T3 level (±, +, ++, +++) ^{b)}	0	0	0	5(0,4,1,0)**	5(0,0,0,4)**
	Liver		0	0	0	0	-

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

^{c)}: Total of two experiments

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

Table 2-8. Histopathological findings in male SD rats treated with IOP for 28 days

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	No. of animals examined							
			0	3	10	30	0	30	100	300
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 ^{a)}	-	-	-	-	0	0	0	0
		Decrease in T3 level ^{b)}	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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

-: not examined

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

Table 2-9. Histopathological findings in male SD rats treated with NaPB for 28 days

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	No. of animals examined			
			0	10	30	100
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 ^{a)}	0	0	0	0
		Decrease in T3 level ^{b)}	0	0	0	0
	Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular (±, +, ++, +++)	0	4(4,0,0,0)*	5(0,4,1,0)**	5(0,0,3,2)**

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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

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

Table 2-10. Histopathological findings in male SD rats treated with BEX for 28 days

Sex	Organs and findings	Dose (mg/kg)	No. of animals examined							
			0	0.1	0.3	1	0	1	3	10
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 ^{a)}	-	-	-	-	0	0	0	0
		Decrease in T3 level ^{b)}	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

^{a)}: Immunohistochemistry for T4

^{b)}: Immunohistochemistry for T3

-: not examined

No significant difference was detected from the control group.

Table 3-1. Upregulated genes in the thyroid gland of SD rats treated with LG for 28 days

Probe Name	Gene Symbol	Fold change
A_43_P11558	Apod	4.0
A_44_P308925	Abat	3.5
A_44_P377886	Smtnl2	2.8
A_42_P826938	LRRTM1	2.4
A_64_P042292	Lrtm1	2.4
A_44_P262593	Ankrd2	2.3
A_64_P147225	Plagl1	2.3

Table 3-2. Downregulated genes in the thyroid gland of SD rats treated with LG for 28 days

Probe Name	Gene Symbol	Fold change
A_64_P069729	Hapl1	-5.0
A_44_P126938	Csap1	-3.6
A_64_P064873	RGD1563590	-3.4
A_64_P131224	LOC102556709	-2.8
A_64_P081972	Ppcdc	-2.7
A_64_P136716	Arid3c	-2.5
A_64_P011959	Slc2a2	-2.5
A_44_P313272	Slc6a13	-2.4
A_64_P156523	Olr551	-2.4
A_64_P391760	Hrh3	-2.2
A_64_P008166	Slc19a3	-2.0

Table 3-3. Downregulated genes in the pituitary gland of SD rats treated with LG for 28 days

Probe Name	Gene Symbol	Fold change
A_64_P072900	Astl	-3.9
A_64_P395073	Kcnj1	-3.9
A_43_P15837	Ntrk2	-3.1
A_64_P118447	Adgrl4	-3.0
A_64_P156523	Olr551	-2.8
A_44_P560485	RGD1560110	-2.7
A_64_P053751	LOC684208	-2.5
A_64_P131224	LOC102556709	-2.4
A_44_P461917	Cacna2d4	-2.4
A_64_P159019	Olr1413	-2.3
A_64_P209731	Tet3	-2.2
A_64_P095635	Niban3	-2.0

Table 3-4. Upregulated genes in the thyroid gland of SD rats treated with ODA for 28 days

Probe Name	Gene Symbol	Fold change
A_64_P071478	RGD1565660	13.3
A_64_P129891	pramef20l	4.8
A_64_P029268	LOC501901	4.1
A_64_P120679	Cck	4.1
A_44_P1032771	Fxyd4	4.0
A_64_P059710	LOC691921	3.0
A_44_P447373	Ass1	2.9
A_43_P17060	Them5	2.8
A_64_P163386	LOC691921	2.8
A_64_P101056	Padi2	2.7
A_44_P289637	Slc4a1	2.7
A_44_P142925	Tprg1	2.7
A_42_P534172	Cd52	2.7
A_44_P1034209	Lamb3	2.4
A_44_P252483	Ackr3	2.4
A_64_P010648	Ccl12	2.4
A_64_P045927	Ap3b2	2.4
A_43_P12437	Hhex	2.3
A_42_P529550	Gng8	2.3
A_64_P142625	Gprc5a	2.3
A_64_P149071	Glis1	2.2
A_44_P541461	Alas2	2.2
A_64_P048927	Hbe2	2.2
A_64_P156319	Hbb-bs	2.1
A_64_P024720	Ripply1	2.1
A_44_P306307	Hbb	2.1
A_44_P577899	Myt1	2.1
A_64_P068363	Dync1i1	2.1
A_64_P119588	Tmem163	2.0
A_64_P163822	Cks2	2.0
A_64_P034414	Tnf	2.0

Table 3-5. Top 100 downregulated genes in the thyroid gland of SD rats treated with ODA for 28 days

Probe Name	Gene Symbol	Fold change	Probe Name	Gene Symbol	Fold change
A_42_P614984	Ucp1	-13	A_64_P021601	Nkx6-1	-2.9
A_44_P1017367	Alb	-8.6	A_44_P690802	LOC498236	-2.9
A_44_P346408	Egfr	-4.4	A_44_P139291	Prodh1	-2.9
A_64_P039923	Pkd1l1	-4.2	A_64_P139549	Scara3	-2.9
A_64_P037313	Zscan4f	-4.1	A_44_P164138	Flacc1	-2.9
A_42_P464974	Ly6d	-4	A_44_P545935	Klb	-2.9
A_44_P517258	Pck1	-4	A_64_P119602	Xcr1	-2.9
A_44_P515417	Scgb3a2	-3.7	A_64_P055659	LOC500948	-2.9
A_64_P147929	RGD1560436	-3.6	A_64_P186630	Vom2r60	-2.9
A_64_P037150	Olr12	-3.5	A_44_P304432	Tcp10b	-2.9
A_44_P556556	Trhde	-3.5	A_64_P120827	Krt82	-2.9
A_44_P1030258	Cnr1	-3.5	A_64_P080484	Hmgb4	-2.8
A_64_P016978	Ccl11	-3.5	A_44_P284915	Ccn6	-2.8
A_64_P104895	Olr1128	-3.5	A_44_P185613	Pip5kl1	-2.8
A_44_P337064	Slc36a2	-3.5	A_64_P109297	Olr87	-2.8
A_44_P104776	Olr1743	-3.5	A_64_P025583	RGD1311343	-2.8
A_64_P095005	Mmd2	-3.4	A_44_P332545	Olr184	-2.8
A_64_P220198	LOC679045	-3.4	A_64_P118227	Hhat	-2.8
A_64_P120729	Olr499	-3.4	A_42_P749184	Penk	-2.7
A_64_P000452	Cyp2c7	-3.4	A_64_P011764	Plin1	-2.7
A_64_P080598	Cntnap5a	-3.3	A_44_P498981	T2	-2.7
A_64_P122497	Erc2	-3.3	A_64_P024585	RGD1559903	-2.7
A_64_P028849	LOC680190	-3.3	A_43_P13086	P2rx5	-2.7
A_44_P121063	Aqp7	-3.2	A_44_P365584	Il1rl1	-2.7
A_64_P147438	Slc35f4	-3.2	A_64_P111310	Olr1687	-2.7
A_64_P102196	Olr1219	-3.2	A_64_P055062	Mast3	-2.7
A_64_P051054	Prss33	-3.2	A_64_P026052	Olr229	-2.7
A_44_P698466	Lrrtm2	-3.2	A_64_P138874	RGD1559772	-2.7
A_64_P036285	Scgb1c1	-3.2	A_64_P050918	Gpa33	-2.6
A_64_P127858	Ntrk3	-3.2	A_44_P121875	RGD1304745	-2.6
A_64_P074029	Slc14a2	-3.2	A_44_P621475	Iqub	-2.6
A_44_P302043	Ccdc63	-3.2	A_44_P408395	Ugt2a1	-2.6
A_44_P557487	Cpb2	-3.1	A_64_P154548	Kcnd2	-2.6
A_64_P077950	Zg16b	-3.1	A_44_P971836	Nup62cl	-2.6
A_64_P078025	LOC360933	-3.1	A_44_P498905	Itga8	-2.6
A_44_P1071620	Mmp27	-3.1	A_64_P114420	Olr1137	-2.6
A_64_P113079	LOC690686	-3.1	A_44_P543439	Slc35d3	-2.6
A_64_P090971	Olr896	-3.1	A_64_P103414	Dkk2	-2.6
A_64_P162442	LOC100911984	-3.1	A_64_P064684	Spem2	-2.6
A_44_P349273	F13b	-3	A_64_P140025	Tyrp1	-2.6
A_44_P527117	Mcpt3	-3	A_64_P107509	Garem2	-2.6
A_64_P116981	Suv39h1l1	-3	A_64_P154469	Ccdc166	-2.6
A_64_P104319	Tas2r139	-3	A_64_P023068	Ccbe1	-2.5
A_44_P698124	MGC94891	-3	A_44_P899127	Depp1	-2.5
A_64_P082768	Olr1073	-3	A_64_P009142	Olr327	-2.5
A_64_P021085	LOC680227	-3	A_64_P132309	LOC685125	-2.5
A_43_P13131	Fgf19	-3	A_64_P080530	Nrxn3	-2.5
A_64_P013802	Dcp2	-3	A_44_P278794	Etv2	-2.5
A_64_P047137	Olr137	-3	A_64_P018236	Lyz1l	-2.5
A_64_P012009	Mov101l	-3	A_64_P014366	Sorbs2	-2.5

Table 3-6. Upregulated genes in the thyroid gland of SD rats treated with SMT for 28 days

Probe Name	Gene Symbol	Fold change
A_42_P540920	Arpp21	8.7
A_64_P120679	Cck	8.0
A_64_P071478	RGD1565660	6.6
A_44_P1032771	Fxyd4	5.2
A_64_P019200	Lbhd2	4.9
A_64_P101056	Padi2	4.2
A_44_P142925	Tprg1	4.1
A_64_P154122	Rpe65	4.0
A_44_P930152	Mpped1	3.3
A_44_P447373	Ass1	3.2
A_43_P12258	Hpse	3.1
A_64_P129891	pramef20l	3.1
A_64_P010648	Ccl12	3.1
A_64_P059710	LOC691921	2.9
A_64_P129945	Krt75	2.8
A_64_P163386	LOC691921	2.8
A_64_P068363	Dync1i1	2.8
A_44_P289637	Slc4a1	2.8
A_64_P149071	Glis1	2.8
A_44_P409965	Dnah14	2.6
A_64_P117658	Dync1i1	2.6
A_64_P034414	Tnf	2.6
A_64_P089400	Hpse	2.5
A_64_P029268	LOC501901	2.4
A_42_P738549	Napsa	2.4
A_64_P004539	Rnase12	2.2
A_64_P045927	Ap3b2	2.2
A_43_P16491	Col16a1	2.2
A_44_P545193	Hsd11b2	2.2
A_44_P175041	Nr1d1	2.1
A_43_P17060	Them5	2.1
A_64_P054676	Tmprss6	2.1
A_64_P005501	Evx1	2.0
A_64_P087380	Efna3	2.0
A_64_P065789	Mcub	2.0
A_42_P838822	Slc52a3	2.0
A_64_P083474	Ttc9	2.0

Table 3-7. Top 100 downregulated genes in the thyroid gland of SD rats treated with SMT for 28 days

Probe Name	Gene Symbol	Fold change	Probe Name	Gene Symbol	Fold change
A_42_P614984	Ucp1	-5.6	A_64_P072288	Lcn8	-2.9
A_64_P036285	Scgb1c1	-4.0	A_44_P392359	Myrip	-2.9
A_64_P045696	Spf2	-3.7	A_64_P220198	LOC679045	-2.9
A_44_P295376	LOC102548927	-3.7	A_64_P086781	Vom1r92	-2.9
A_44_P498981	T2	-3.7	A_64_P037150	Olr12	-2.9
A_64_P082062	Olr78	-3.6	A_64_P062665	Chst9	-2.9
A_44_P899127	Depp1	-3.6	A_64_P020203	Olr1629	-2.9
A_64_P138874	RGD1559772	-3.5	A_64_P044380	Olr1570	-2.9
A_64_P098636	Sptlc3	-3.5	A_64_P009937	Dbx1	-2.9
A_64_P071302	Olr468	-3.5	A_64_P078884	Olr271	-2.8
A_64_P055813	Olv562	-3.5	A_64_P127858	Ntrk3	-2.8
A_64_P055659	LOC500948	-3.5	A_64_P155059	Slc22a12	-2.8
A_44_P510738	Pigr	-3.5	A_64_P022461	Eomes	-2.8
A_44_P447344	Slc26a5	-3.4	A_64_P018361	RGD1559804	-2.8
A_44_P353446	Afm	-3.4	A_64_P104713	Xkr4	-2.8
A_44_P1030258	Cnr1	-3.4	A_64_P085971	Arntl2	-2.8
A_64_P032258	LOC102547811	-3.4	A_64_P056806	Olr367	-2.8
A_64_P007880	Frmf1	-3.4	A_42_P749184	Penk	-2.8
A_64_P137063	Kng1	-3.4	A_64_P132309	LOC685125	-2.8
A_64_P073829	Lcn3	-3.4	A_44_P918404	LOC682102	-2.8
A_44_P187120	Ear1	-3.3	A_43_P14764	Nrxn1	-2.8
A_64_P025729	Olr1545	-3.3	A_64_P137877	Olr581	-2.8
A_44_P304432	Tcp10b	-3.3	A_44_P346408	Egfr	-2.8
A_64_P073382	Cbx3	-3.3	A_44_P118695	LOC286960	-2.8
A_64_P141888	Noto	-3.2	A_64_P154650	Slc7a15	-2.8
A_64_P104895	Olr1128	-3.2	A_44_P519871	Srd5a1	-2.7
A_44_P698466	Lrrtm2	-3.2	A_64_P018236	Lyz11	-2.7
A_44_P363009	Scin	-3.2	A_64_P016423	Kb23	-2.7
A_64_P000930	Spta1	-3.2	A_44_P302043	Ccdc63	-2.7
A_44_P635089	Etv5	-3.2	A_44_P1071620	Mmp27	-2.7
A_64_P027814	Zfp488	-3.2	A_64_P025853	Hmgb4	-2.7
A_64_P027615	Olr255	-3.2	A_64_P108120	LOC688691	-2.7
A_44_P693350	Ccdc38	-3.1	A_64_P020358	Pla2g4e	-2.7
A_44_P423765	Olr610	-3.1	A_44_P168637	Ogfod1	-2.7
A_64_P086714	Zc3h12b	-3.1	A_64_P004929	LOC690348	-2.7
A_64_P108484	Dnajc27	-3.1	A_64_P032375	Ddx43	-2.7
A_44_P210668	Pdilt	-3.1	A_44_P563049	C8a	-2.7
A_43_P13131	Fgf19	-3.1	A_44_P1017367	Alb	-2.7
A_64_P026815	Defb49	-3.1	A_44_P116660	Clec4m	-2.7
A_64_P093912	Olr1326	-3.0	A_64_P090971	Olr896	-2.7
A_44_P609518	RGD1564053	-3.0	A_64_P021080	LOC108350921	-2.7
A_64_P092020	Ankrd36	-3.0	A_44_P116369	Smoc1	-2.6
A_64_P013666	Pde6a	-3.0	A_44_P515417	Scgb3a2	-2.6
A_64_P162010	H2ac21	-3.0	A_44_P157087	Lrrc74a	-2.6
A_64_P080821	Olr473	-3.0	A_64_P053666	Aox3	-2.6
A_44_P698124	MGC94891	-3.0	A_64_P036168	Olr1718	-2.6
A_64_P050918	Gpa33	-3.0	A_64_P000452	Cyp2c7	-2.6
A_64_P049921	Sned1	-2.9	A_64_P024585	RGD1559903	-2.6
A_44_P454331	Olr1086	-2.9	A_64_P115086	Capn12	-2.6
A_44_P775974	C2cd6	-2.9	A_64_P147929	RGD1560436	-2.6

Table 3-8. Top 100 upregulated genes in the thyroid gland of SD rats treated with TPN for 28 days

Probe Name	Gene Symbol	Fold change	Probe Name	Gene Symbol	Fold change
A_42_P540920	Arpp21	12.0	A_64_P100559	Asphd1	2.5
A_64_P027449	Mepe	6.1	A_44_P527809	Celf6	2.5
A_44_P572699	Rasgef1a	5.9	A_64_P152154	Aldh1b1	2.5
A_64_P010648	Ccl12	4.8	A_44_P339518	Scg3	2.5
A_64_P019200	Lbhd2	4.6	A_64_P156840	Slco4a1	2.5
A_44_P941612	Elavl4	4.0	A_43_P12658	Kcnh1	2.5
A_44_P577899	Myt1	3.9	A_64_P147878	Hs3st6	2.5
A_42_P614984	Ucp1	3.8	A_64_P087856	Slc7a14	2.5
A_64_P005586	Slc25a53	3.6	A_64_P080509	Fut1	2.5
A_44_P290656	Dnah3	3.5	A_43_P12258	Hpse	2.4
A_64_P011854	Elavl4	3.2	A_44_P121063	Aqp7	2.4
A_64_P027971	Dnase2b	3.1	A_64_P058430	Cnpy1	2.4
A_64_P010333	Edn2	3.1	A_64_P064606	Dll3	2.4
A_64_P138216	Gch1	3.0	A_64_P034654	Ndrgr4	2.4
A_64_P136805	Celf4	3.0	A_42_P637279	Foxa2	2.4
A_43_P22561	Sox6	3.0	A_64_P080429	Hoxb6	2.4
A_64_P079870	Vwa5b2	3.0	A_43_P22556	Cidea	2.4
A_44_P175041	Nr1d1	3.0	A_64_P080434	Hoxb7	2.4
A_64_P059710	LOC691921	3.0	A_64_P156333	Cidea	2.4
A_43_P12992	Kcnh2	2.9	A_44_P536825	Lhfp15	2.4
A_64_P046948	Rundc3a	2.9	A_64_P038873	A2m	2.3
A_42_P511187	Hgfac	2.9	A_42_P626447	Csdc2	2.3
A_44_P379347	Ppp1r17	2.9	A_43_P14867	Sult5a1	2.3
A_64_P134445	Timem179	2.8	A_64_P154919	Rundc3a	2.3
A_64_P038872	A2m	2.8	A_64_P129925	Serpini1	2.3
A_64_P163386	LOC691921	2.8	A_42_P787410	Cacna1b	2.3
A_44_P482629	Pcsk2	2.8	A_64_P077648	Hs3st6	2.3
A_64_P041219	Pcsk1	2.8	A_44_P555767	Unc79	2.3
A_64_P153045	Abcc8	2.8	A_64_P132852	Insc	2.3
A_64_P048043	Krt7	2.7	A_64_P153091	Sel1l3	2.3
A_44_P1029805	Krt7	2.7	A_64_P109202	Ctxn3	2.3
A_64_P081287	Klhdc8a	2.6	A_42_P724510	Epdr1	2.3
A_64_P017505	Slc7a14	2.6	A_64_P150876	Cst6	2.3
A_44_P360501	Gabrb1	2.6	A_44_P489608	Gfra4	2.3
A_64_P031581	Sgsm1	2.6	A_64_P150662	Corin	2.3
A_64_P109018	Hs3st3a1	2.6	A_64_P004307	Pipox	2.2
A_64_P070208	Gdap111	2.6	A_44_P768777	Klf14	2.2
A_64_P157044	Cbx2	2.6	A_64_P121926	Sun5	2.2
A_44_P242958	Ttpa	2.6	A_64_P111020	Mslnl	2.2
A_64_P092342	Camk2b	2.6	A_44_P214288	Cabp7	2.2
A_44_P691593	Celf3	2.6	A_64_P006285	Lhx1	2.2
A_42_P630269	Rbm38	2.6	A_44_P192083	Ffar4	2.2
A_44_P129412	Dcx	2.6	A_64_P066631	Smarcc1	2.2
A_44_P421375	Ina	2.5	A_44_P761505	Syt4	2.2
A_64_P101185	Slc45a1	2.5	A_64_P032683	Mest	2.1
A_64_P034414	Tnf	2.5	A_64_P038877	LOC297568	2.1
A_44_P601699	LOC102555659	2.5	A_64_P093737	Tubg2	2.1
A_64_P160484	Trem3	2.5	A_64_P147149	Tubg2	2.1
A_42_P593020	Rln1	2.5	A_64_P041507	Slamf8	2.1
A_64_P014096	Htr3a	2.5	A_64_P249785	Sez6	2.1

Table 3-9. Top 100 downregulated genes in the thyroid gland of SD rats treated with TPN for 28 days

Probe Name	Gene Symbol	Fold change	Probe Name	Gene Symbol	Fold change
A_64_P028642	Olr1165	-8.2	A_64_P107534	Prame	-4.9
A_64_P108029	RGD1559970	-8.2	A_64_P027940	Olr1196	-4.9
A_64_P092299	Olr1666	-7.7	A_44_P187120	Ear1	-4.9
A_44_P307064	Rhox13	-6.8	A_64_P048466	Pramel6	-4.9
A_64_P044380	Olr1570	-6.8	A_64_P072288	Lcn8	-4.9
A_64_P078884	Olr271	-6.7	A_64_P006207	Oxgr1	-4.9
A_64_P010683	Olr363	-6.7	A_44_P107220	Olr395	-4.8
A_44_P444247	Tmf1	-6.4	A_44_P928825	Msr1	-4.8
A_64_P070636	LOC689730	-6.4	A_44_P498905	Itga8	-4.8
A_64_P144253	Shank2	-6.3	A_64_P089316	Syt15	-4.8
A_64_P080821	Olr473	-6.3	A_44_P215808	Fer116	-4.8
A_64_P141888	Noto	-6.2	A_44_P729113	Igbp1b	-4.8
A_64_P078025	LOC360933	-6.1	A_44_P392359	Myrip	-4.8
A_64_P131611	Depdc5	-6.1	A_64_P028046	Olr1625	-4.7
A_64_P047137	Olr137	-6.1	A_44_P552670	LOC499715	-4.7
A_44_P121347	Serpina6	-6.1	A_44_P529994	Stox1	-4.7
A_64_P165376	Nrcam	-6.1	A_64_P131395	Defb33	-4.7
A_64_P108474	Olr1055	-5.9	A_64_P153566	Padi6	-4.7
A_64_P119602	Xcr1	-5.9	A_64_P037150	Olr12	-4.7
A_64_P001294	Ssx1	-5.8	A_64_P117149	LOC100912405	-4.7
A_64_P003639	Olr67	-5.8	A_64_P057412	Samt3	-4.7
A_64_P082768	Olr1073	-5.8	A_64_P165031	Olr1445	-4.6
A_64_P033011	LOC102546495	-5.7	A_64_P086365	Nxf3	-4.6
A_64_P011479	Spint5p	-5.7	A_64_P088655	Olr878	-4.6
A_64_P020591	Piezo2	-5.7	A_64_P025729	Olr1545	-4.6
A_64_P082062	Olr78	-5.6	A_64_P008371	Olr811	-4.6
A_64_P130937	Insyn2b	-5.6	A_64_P037313	Zscan4f	-4.6
A_64_P094352	Vom1r96	-5.5	A_44_P349273	F13b	-4.6
A_44_P271569	Olr1376	-5.5	A_64_P034814	P22k15	-4.6
A_64_P156403	LOC100364769	-5.5	A_64_P074126	Efcc1	-4.6
A_64_P123944	Olr324	-5.4	A_64_P016941	Olr477	-4.6
A_64_P095231	LOC503116	-5.4	A_64_P085966	Olr74	-4.6
A_44_P250144	Olr1686	-5.3	A_64_P055813	Olr562	-4.5
A_44_P227132	RGD1564324	-5.3	A_44_P408395	Ugt2a1	-4.5
A_64_P009937	Dbx1	-5.3	A_64_P148971	Mageb3	-4.5
A_64_P066231	Olr778	-5.2	A_64_P145163	LOC685303	-4.5
A_44_P339490	Ica11	-5.2	A_44_P501536	Armc4	-4.5
A_64_P136056	Olr883	-5.2	A_64_P006511	Akp3	-4.5
A_64_P068463	Olr848	-5.2	A_64_P114455	Olr1737	-4.5
A_44_P353446	Afin	-5.2	A_64_P110679	Olr1235	-4.5
A_64_P019460	Olr614	-5.2	A_44_P510442	Trim50	-4.5
A_64_P104895	Olr1128	-5.2	A_44_P422356	Trim80	-4.4
A_64_P041737	Olr852	-5.1	A_64_P154054	Olr439	-4.4
A_64_P022220	LOC103690896	-5.1	A_64_P153402	Olr475	-4.4
A_44_P516160	Abca12	-5.0	A_64_P098523	LOC102549174	-4.4
A_64_P065071	Lpal2	-5.0	A_64_P120827	Krt82	-4.4
A_44_P419079	Olr465	-5.0	A_64_P161640	Sorcs3	-4.4
A_44_P470808	Nab1	-4.9	A_64_P036158	Olr1218	-4.4
A_64_P016525	Ffar3	-4.9	A_64_P055062	Mast3	-4.4
A_44_P304432	Tcp10b	-4.9	A_64_P150794	LOC102550256	-4.3

Table 4. Simple linear regression analyses of pup (P21) T4 and RelT4 predicted by maternal thyroid-related hormones at GD18.5 and LD21.

Outcome (Pup)	Predictor (Dam)	Dam stage	R ²	β	P value ^{a)}	n
T4	Dam T4	GD18	0.718	4.597	1.80×10 ⁻³⁶	128
	Dam FT4		0.715	3.237	3.88×10 ⁻³⁶	128
	Dam TSH		0.715	-3.812	4.11×10 ⁻³⁶	128
	Dam T3		0.472	316.549	3.47×10 ⁻¹⁹	128
	Dam T4	LD21	0.665	0.934	9.55×10 ⁻²⁵	99
	Dam TSH		0.222	-2.264	8.82×10 ⁻⁷	99
	Dam T3		0	-3.055	0.835	99
RelT4	Dam T4	GD18	0.718	0.099	1.80×10 ⁻³⁶	128
	Dam FT4		0.715	0.07	3.88×10 ⁻³⁶	128
	Dam TSH		0.715	-0.082	4.11×10 ⁻³⁶	128
	Dam T3		0.472	6.846	3.47×10 ⁻¹⁹	128
	Dam T4	LD21	0.665	0.02	9.55×10 ⁻²⁵	99
	Dam TSH		0.222	-0.049	8.82×10 ⁻⁷	99
	Dam T3		0	-0.066	0.835	99

a) Note: For regressions involving maternal GD18.5 hormones, the predictor values were assigned as dose-group means from a separate cohort rather than independent maternal measurements paired to each pup. Therefore, the reported p-values for GD18.5-based regressions do not reflect inference based on independent biological replicates, and the interpretation of statistical significance requires caution.

Table 5. Simple linear regression analyses of pup (P21) T3 and RelT3 predicted by maternal thyroid-related hormones at GD18.5 and LD21.

Outcome (Pup)	Predictor (Dam)	Dam stage	R ²	β	P value ^{a)}	n
T3	Dam T4	GD18	0.204	0.017	8.84×10 ⁻⁸	128
	Dam FT4		0.197	0.012	1.56×10 ⁻⁷	128
	Dam TSH		0.303	-0.017	1.70×10 ⁻¹¹	128
	Dam T3		0.412	2.008	3.24×10 ⁻¹⁶	128
	Dam T4	LD21	0.003	0	0.609	99
	Dam TSH		0.337	-0.019	3.00×10 ⁻¹⁰	99
	Dam T3		0.308	0.552	2.52×10 ⁻⁹	99
RelT3	Dam T4	GD18	0.204	0.045	8.84×10 ⁻⁸	128
	Dam FT4		0.197	0.031	1.56×10 ⁻⁷	128
	Dam TSH		0.303	-0.046	1.70×10 ⁻¹¹	128
	Dam T3		0.412	5.466	3.24×10 ⁻¹⁶	128
	Dam T4	LD21	0.003	0.001	0.609	99
	Dam TSH		0.337	-0.052	3.00×10 ⁻¹⁰	99
	Dam T3		0.308	1.504	2.52×10 ⁻⁹	99

a) Note: For regressions involving maternal GD18.5 hormones, the predictor values were assigned as dose-group means from a separate cohort rather than independent maternal measurements paired to each pup. Therefore, the reported p-values for GD18.5-based regressions do not reflect inference based on independent biological replicates, and the interpretation of statistical significance requires caution.

Table 6. Simple linear regression analyses of pup (P21) TSH and RelTSH predicted by maternal thyroid-related hormones at GD18.5 and LD21.

Outcome (Pup)	Predictor (Dam)	Dam stage	R ²	β	P value ^{a)}	n
TSH	Dam T4	GD18	0.239	-0.748	8.12×10 ⁻⁹	124
	Dam FT4		0.231	-0.518	1.60×10 ⁻⁸	124
	Dam TSH		0.354	0.765	3.32×10 ⁻¹³	124
	Dam T3		0.418	-85.291	5.01×10 ⁻¹⁶	124
	Dam T4	LD21	0.15	-0.08	8.08×10 ⁻⁵	98
	Dam TSH		0.652	0.686	9.50×10 ⁻²⁴	98
	Dam T3		0.238	-12.451	3.60×10 ⁻⁷	98
RelTSH	Dam T4	GD18	0.239	-0.89	8.12×10 ⁻⁹	124
	Dam FT4		0.231	-0.617	1.60×10 ⁻⁸	124
	Dam TSH		0.354	0.91	3.32×10 ⁻¹³	124
	Dam T3		0.418	-101.52	5.01×10 ⁻¹⁶	124
	Dam T4	LD21	0.15	-0.095	8.08×10 ⁻⁵	98
	Dam TSH		0.652	0.817	9.50×10 ⁻²⁴	98
	Dam T3		0.238	-14.82	3.60×10 ⁻⁷	98
logTSH	Dam T4	GD18	0.428	-0.302	1.72×10 ⁻¹⁶	124
	Dam FT4		0.418	-0.21	5.10×10 ⁻¹⁶	124
	Dam TSH		0.555	0.289	3.62×10 ⁻²³	124
	Dam T3		0.584	-30.417	5.44×10 ⁻²⁵	124
	Dam T4	LD21	0.171	-0.034	2.26×10 ⁻⁵	98
	Dam TSH		0.619	0.266	8.07×10 ⁻²²	98
	Dam T3		0.222	-4.792	1.01×10 ⁻⁶	98
logRelTSH	Dam T4	GD18	0.428	-0.302	1.72×10 ⁻¹⁶	124
	Dam FT4		0.418	-0.21	5.10×10 ⁻¹⁶	124
	Dam TSH		0.555	0.289	3.62×10 ⁻²³	124
	Dam T3		0.584	-30.417	5.44×10 ⁻²⁵	124
	Dam T4	LD21	0.171	-0.034	2.26×10 ⁻⁵	98
	Dam TSH		0.619	0.266	8.07×10 ⁻²²	98
	Dam T3		0.222	-4.792	1.01×10 ⁻⁶	98

a) Note: For regressions involving maternal GD18.5 hormones, the predictor values were assigned as dose-group means from a separate cohort rather than independent maternal measurements paired to each pup. Therefore, the reported p-values for GD18.5-based regressions do not reflect inference based on independent biological replicates, and the interpretation of statistical significance requires caution.

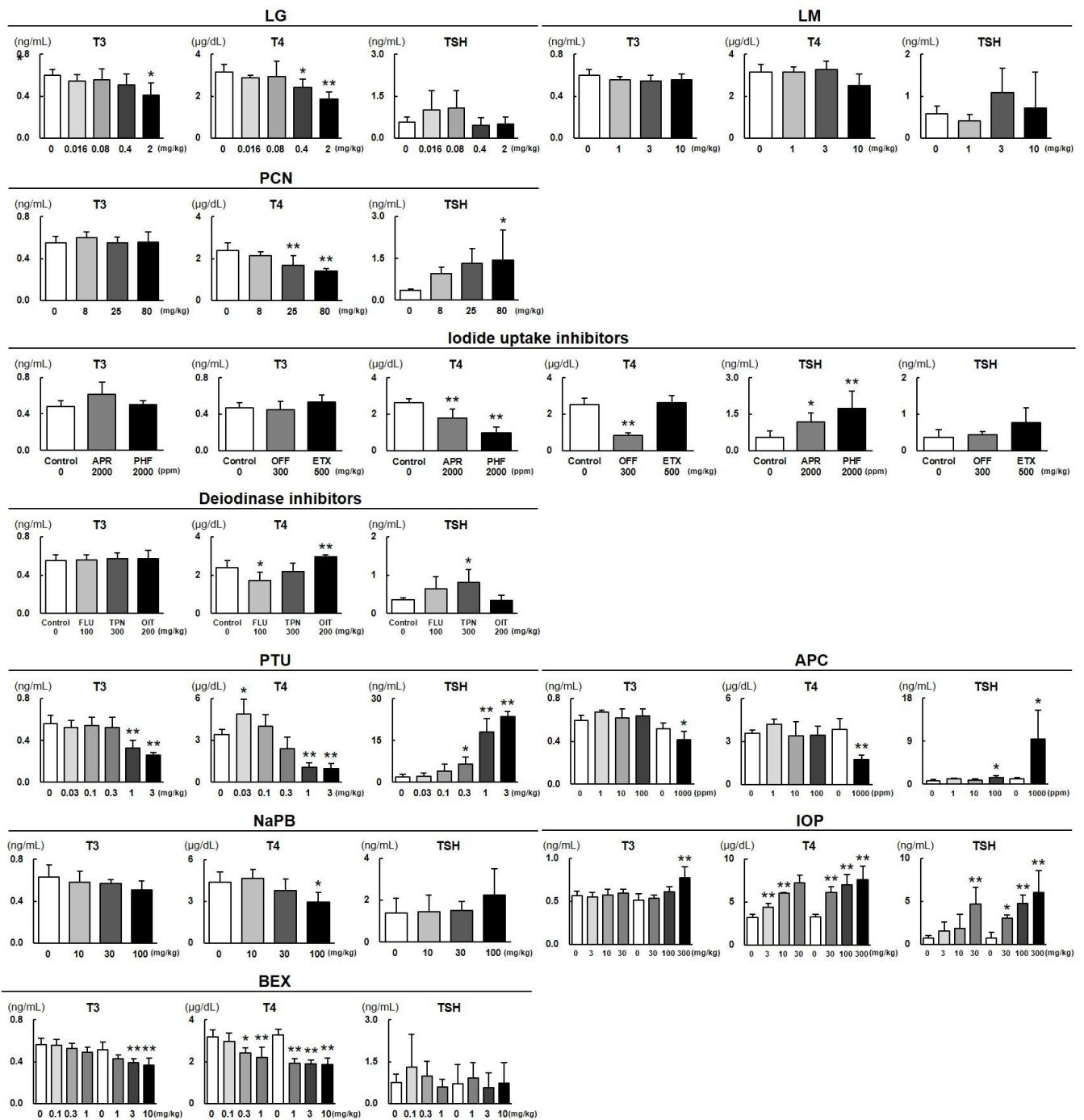


Figure 1. Serum hormone levels in male SD rats. * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

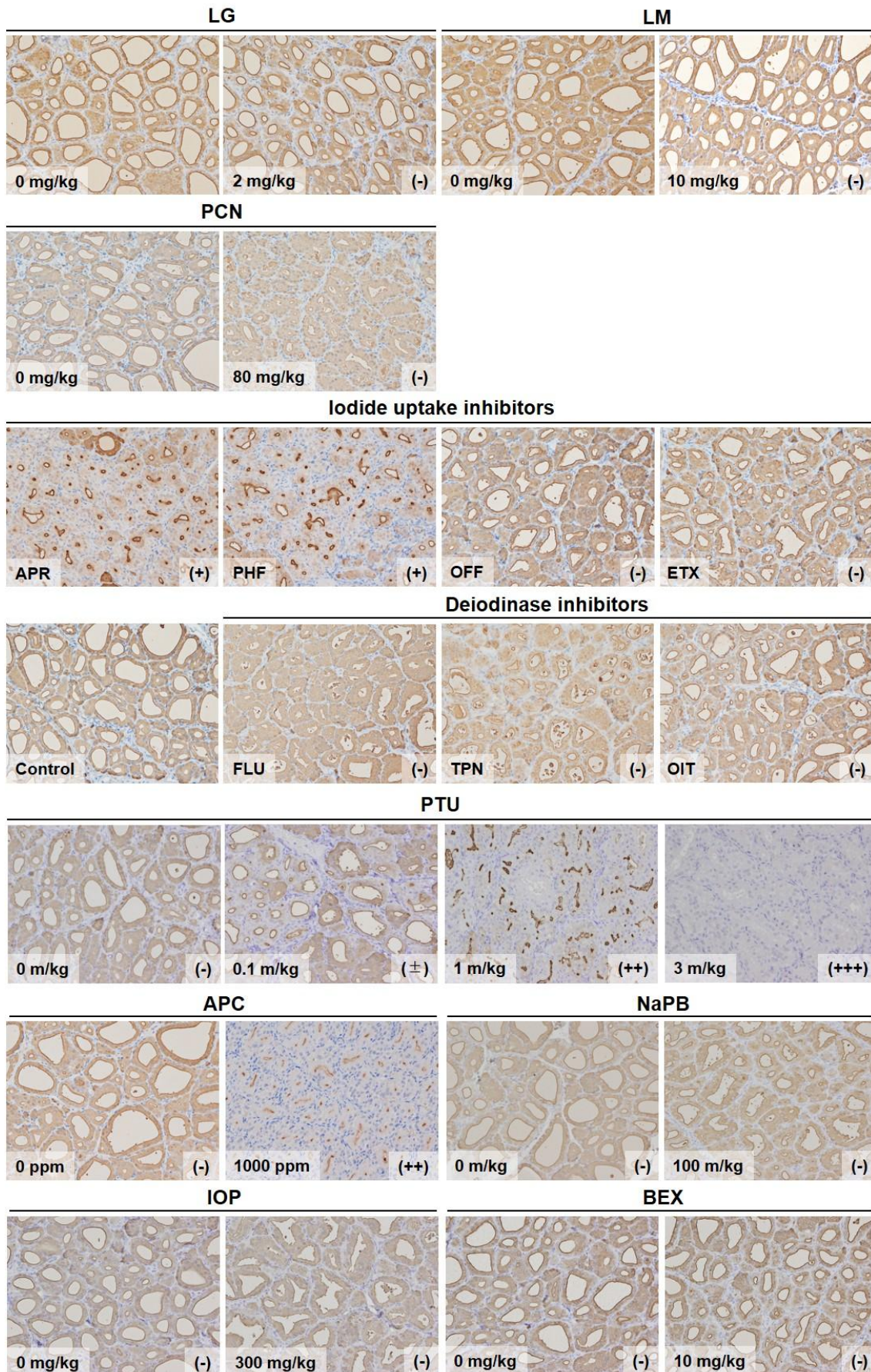


Figure 2. Immunohistochemistry for T4 in the thyroid gland of male SD rats.

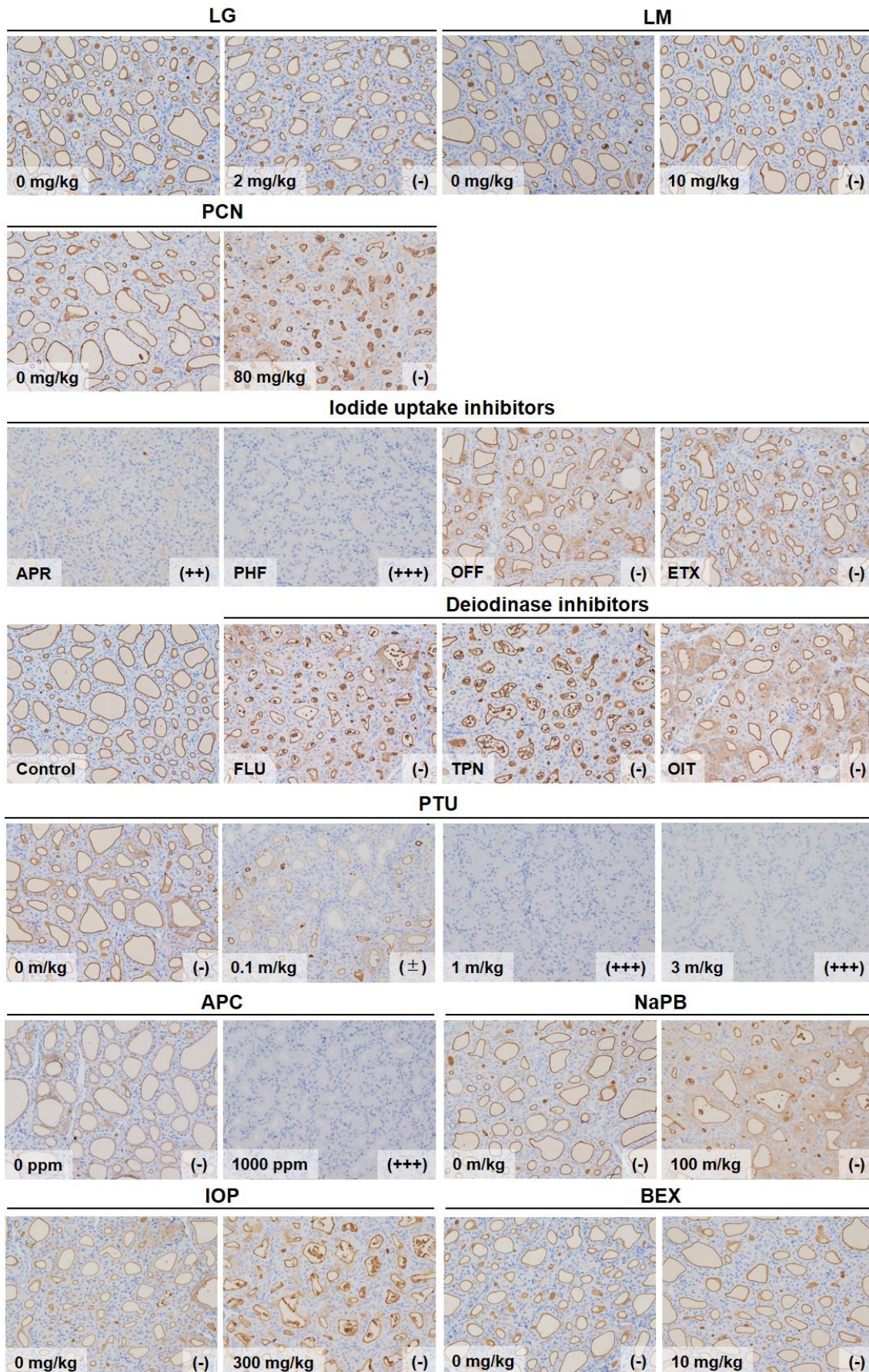


Figure 3. Immunohistochemistry for T3 in the thyroid gland of male SD rats.

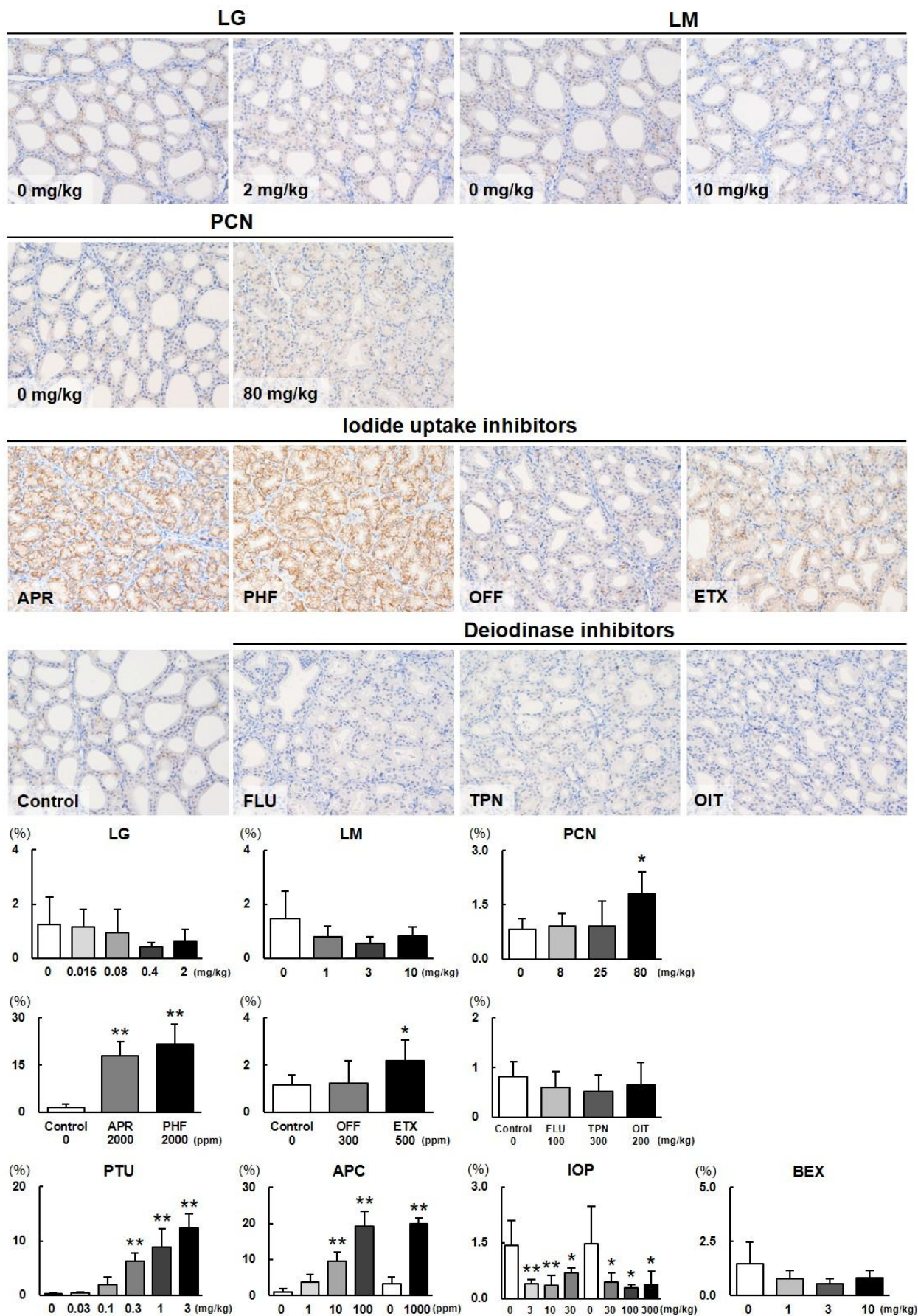


Figure 4. Immunohistochemistry for NIS in the thyroid gland of male SD rats. * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

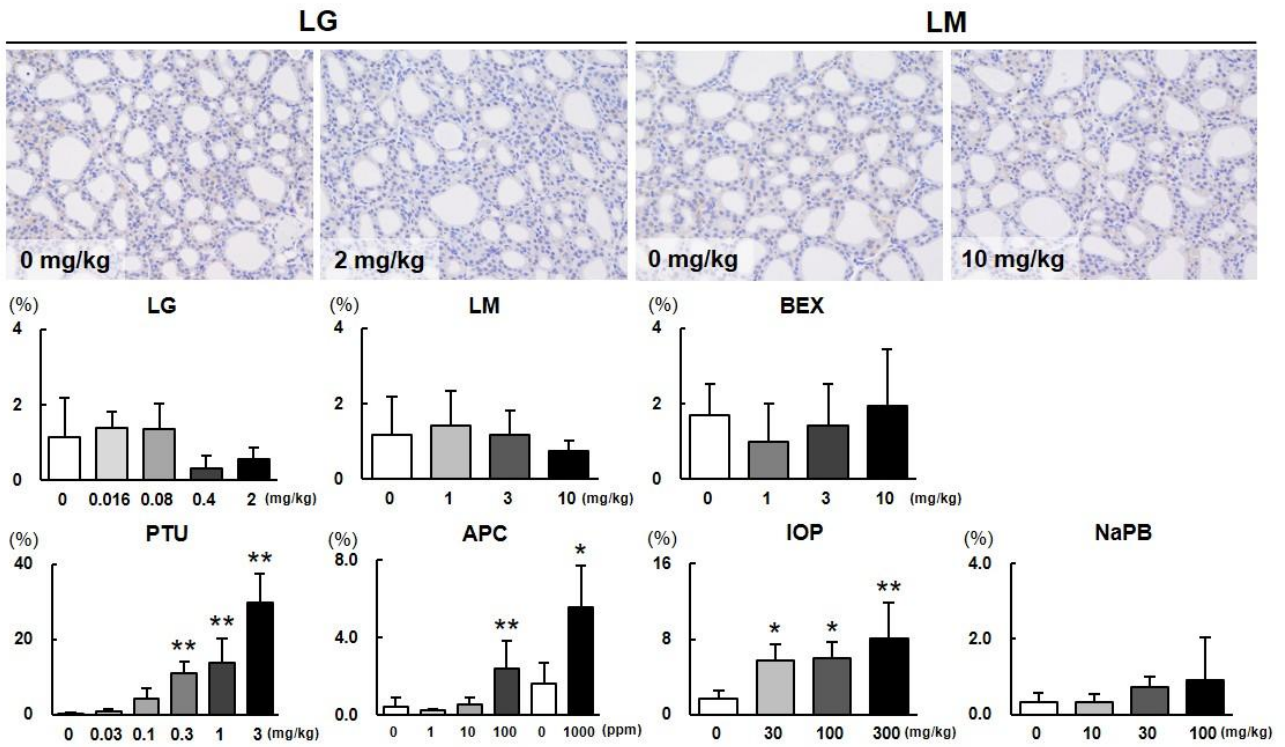


Figure 5. Immunohistochemistry for NQO1 in the thyroid gland of male SD rats. * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

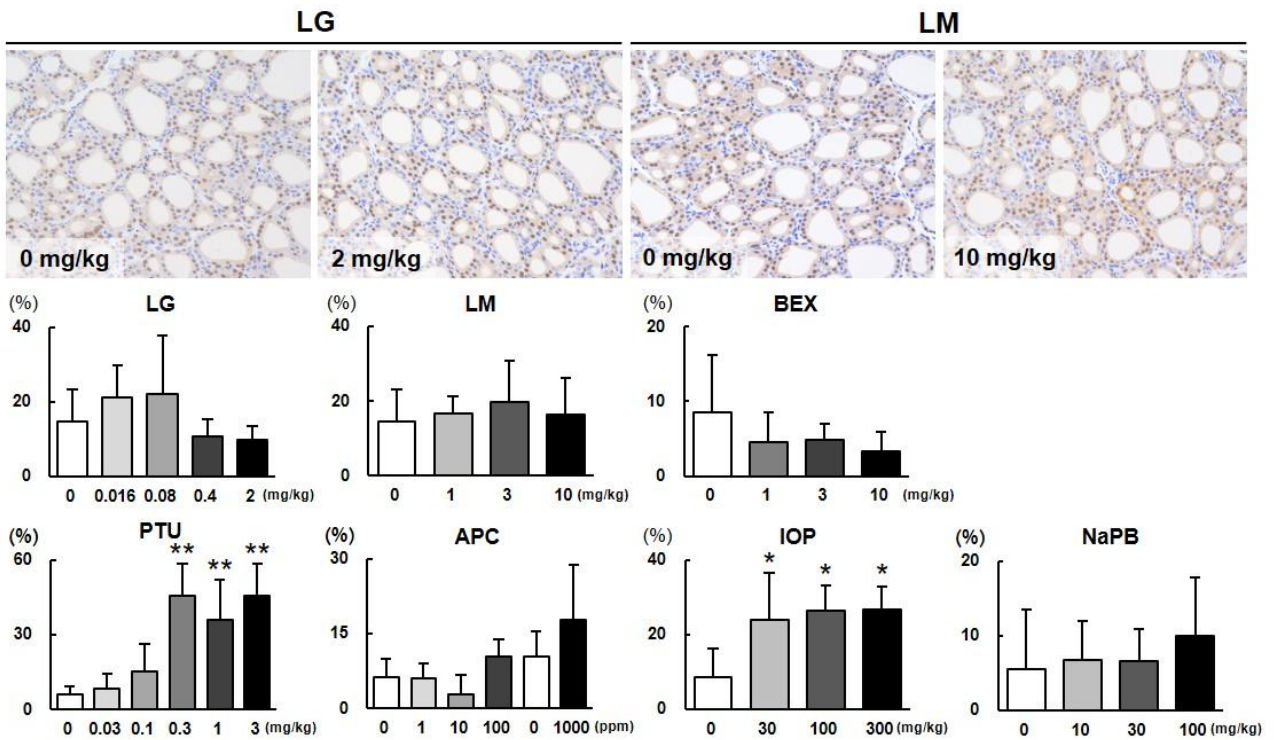


Figure 6. Immunohistochemistry for GPX2 in the thyroid gland of male SD rats. * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

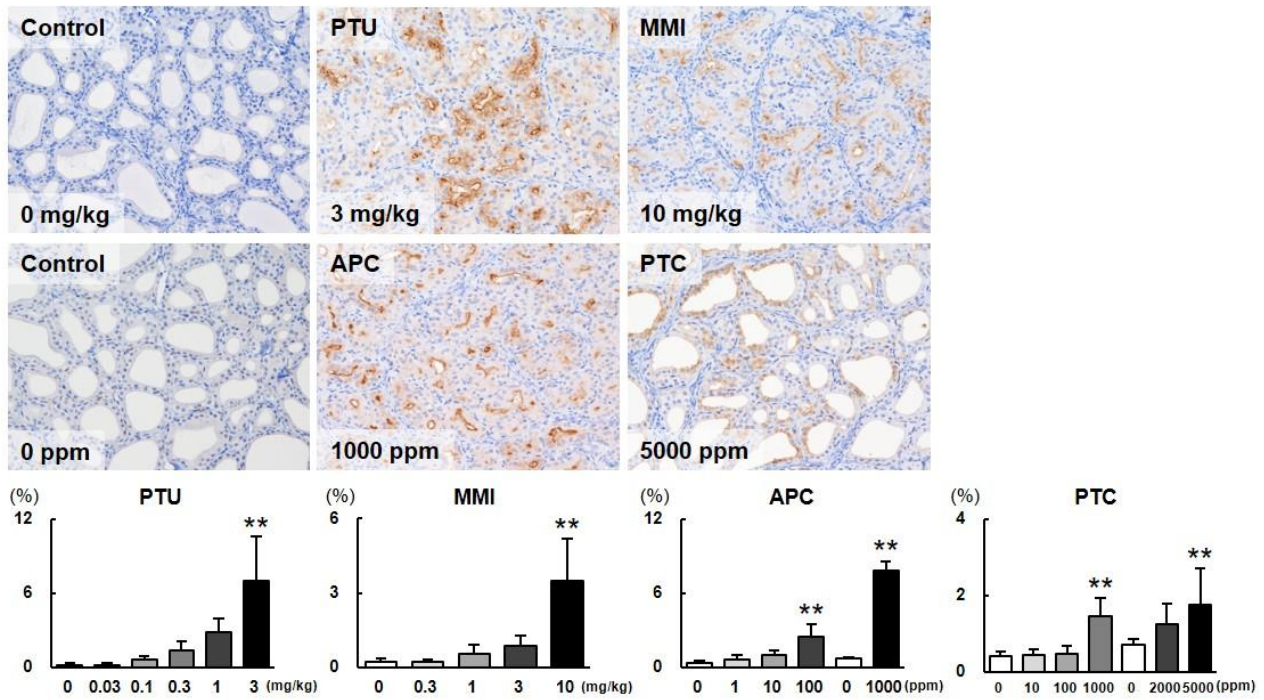


Figure 7. Immunohistochemistry for DPP4 in the thyroid gland of male SD rats. **: significantly different from the controls at $P < 0.01$.

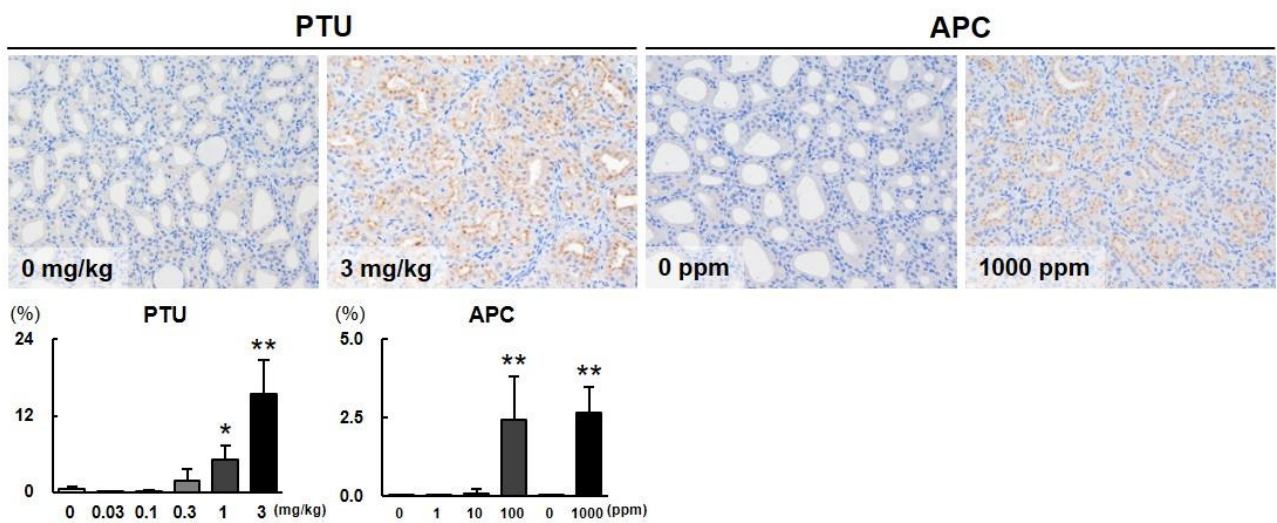


Figure 8. Immunohistochemistry for SNPH in the thyroid gland of male SD rats. * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

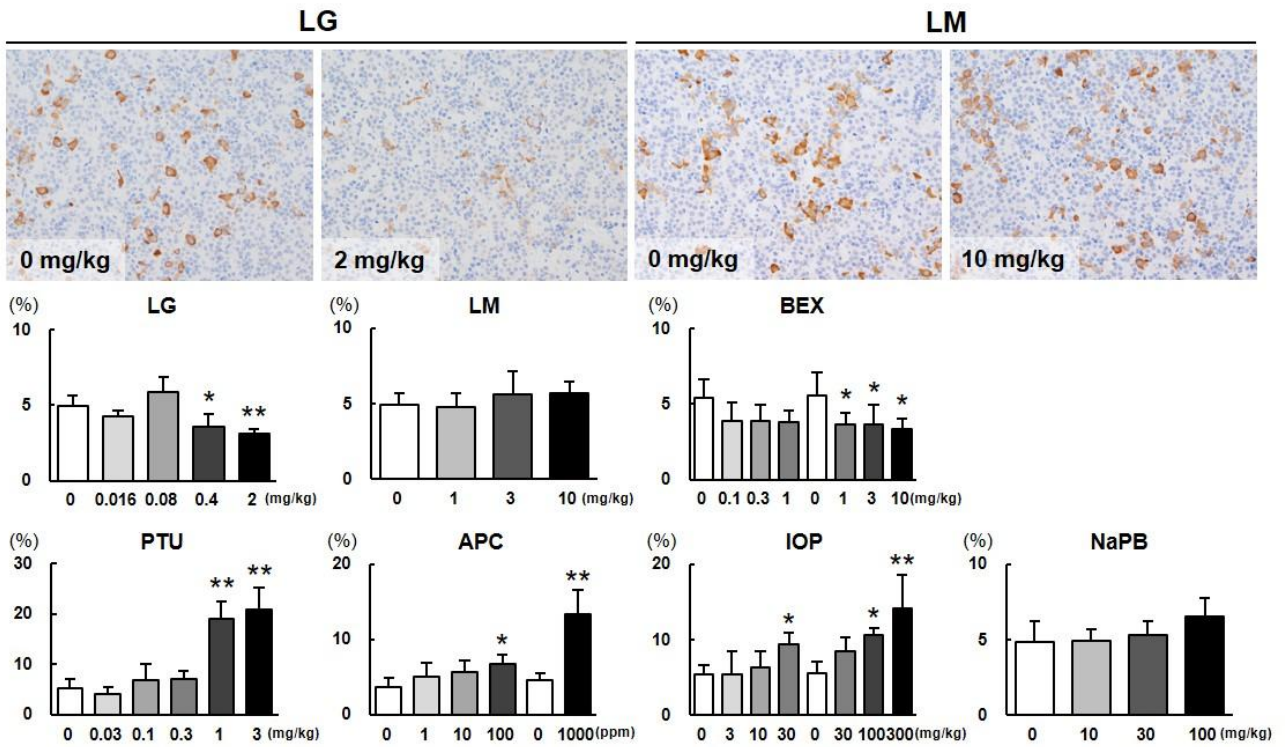


Figure 9. Immunohistochemistry for TSH in the pituitary gland of male SD rats. * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

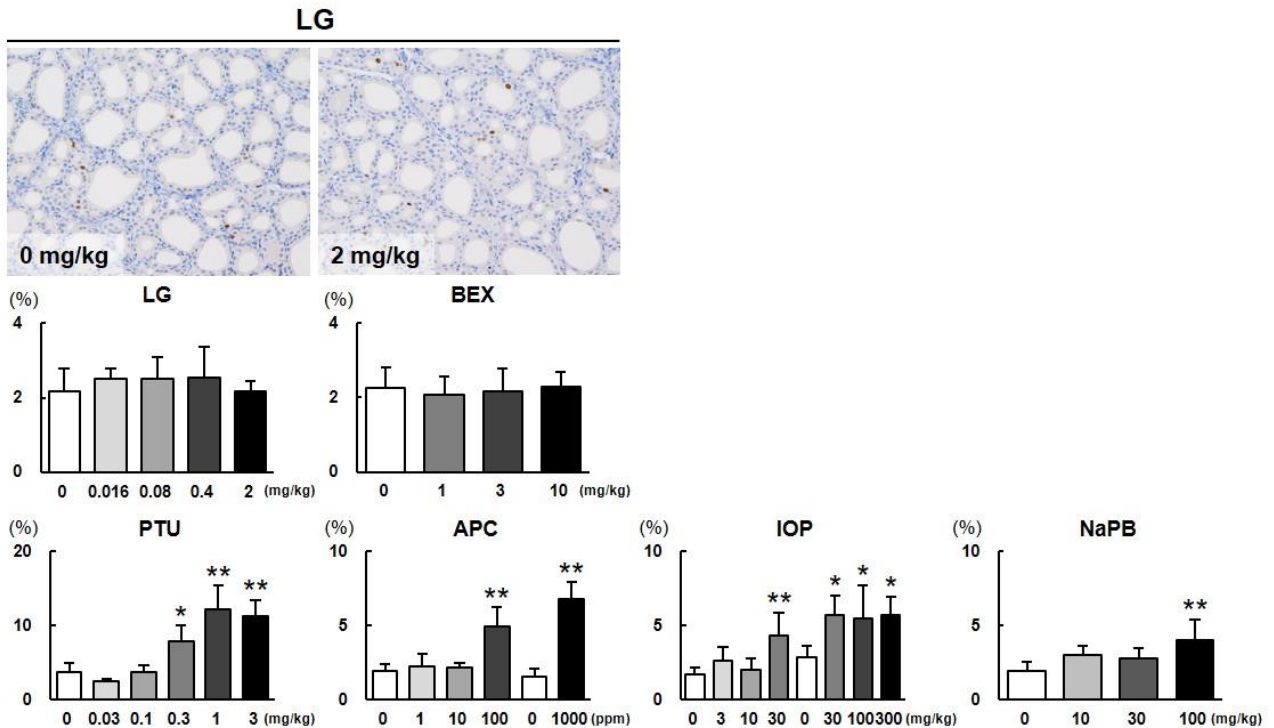


Figure 10. Immunohistochemistry for Ki67 in the thyroid gland of male SD rats. * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

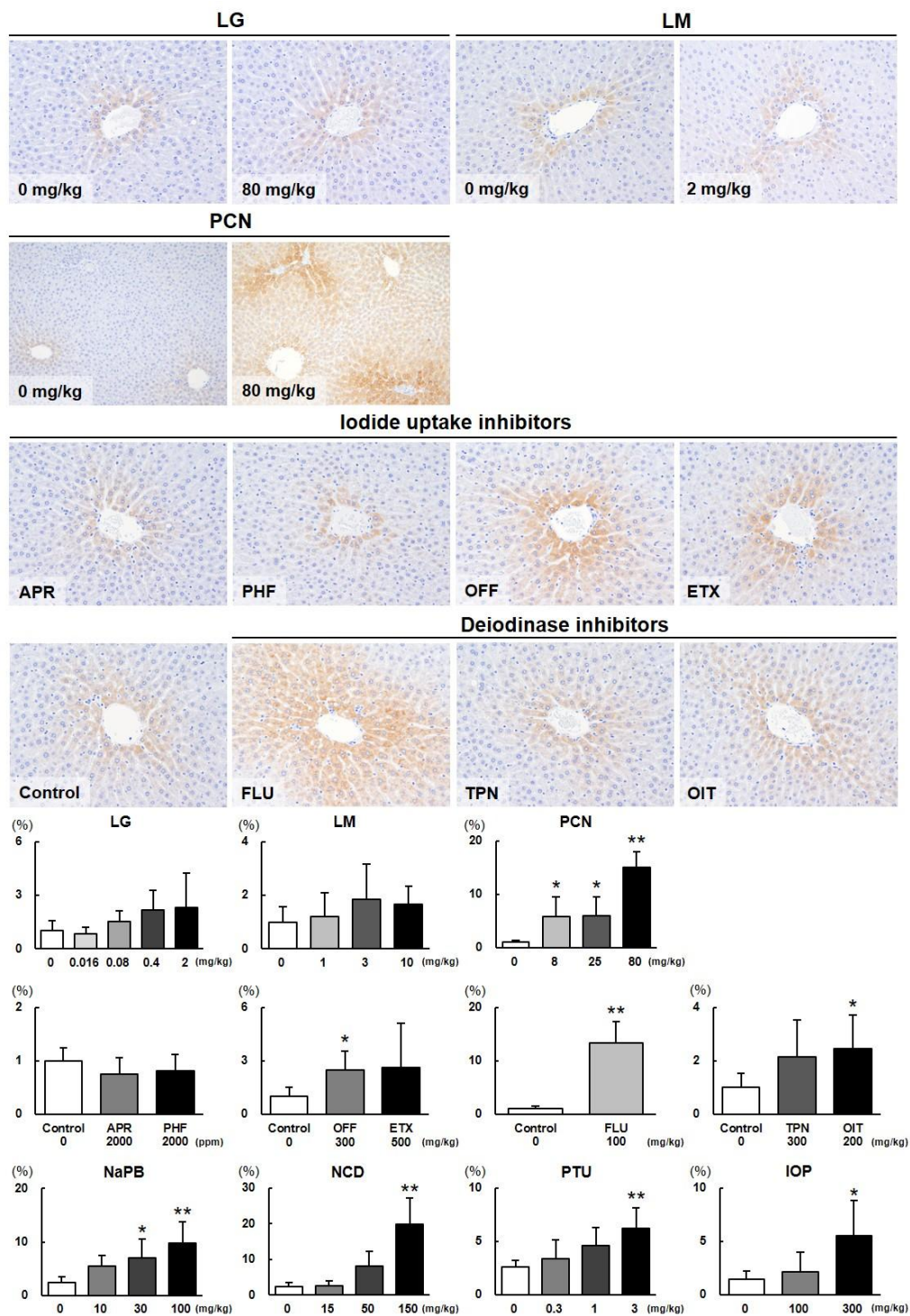


Figure 11. Immunohistochemistry for UGT1A6 in the liver of male SD rats. * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

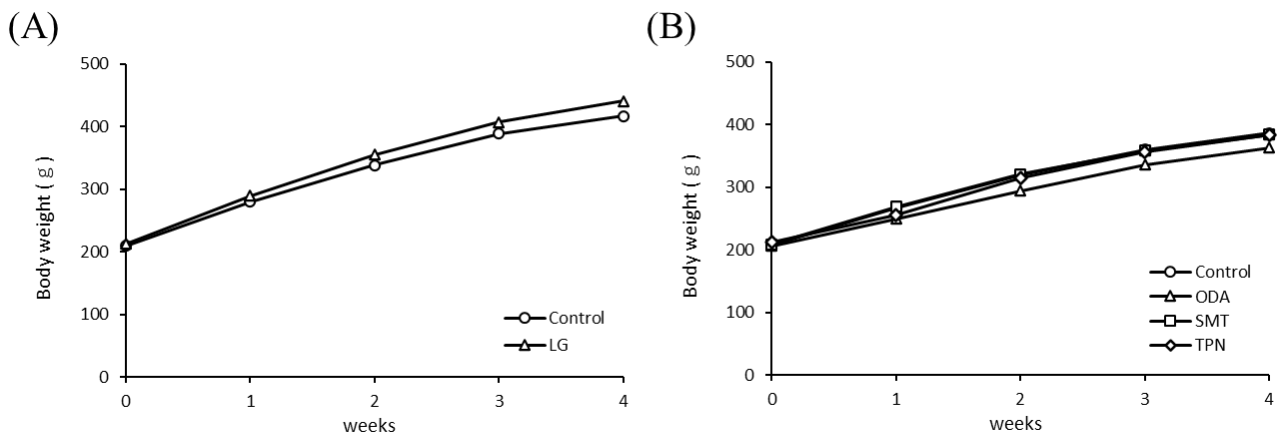


Figure 12. Mean body weight for SD rats treated with LG (A), ODA, SMT, and TPN (B) for 28 days.

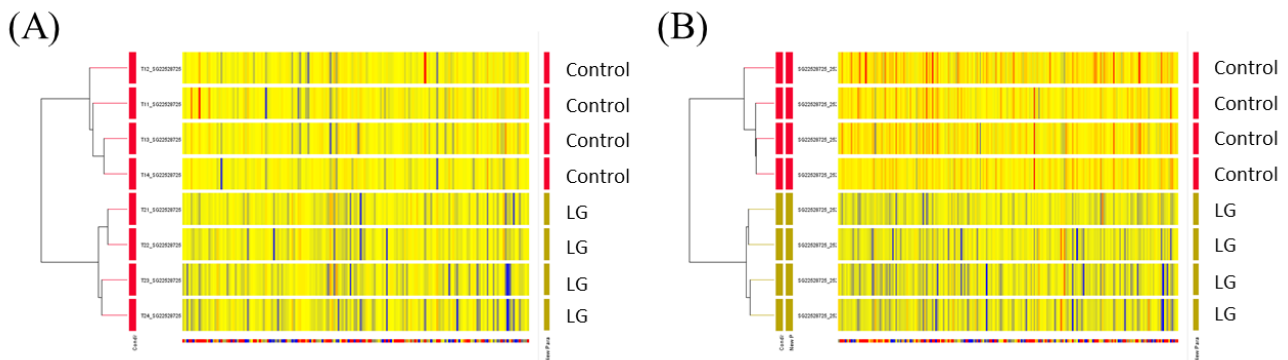


Figure 13. Cluster analysis of microarray data obtained from thyroid gland (A) and pituitary gland (B) of SD rats treated with LG for 28 days.

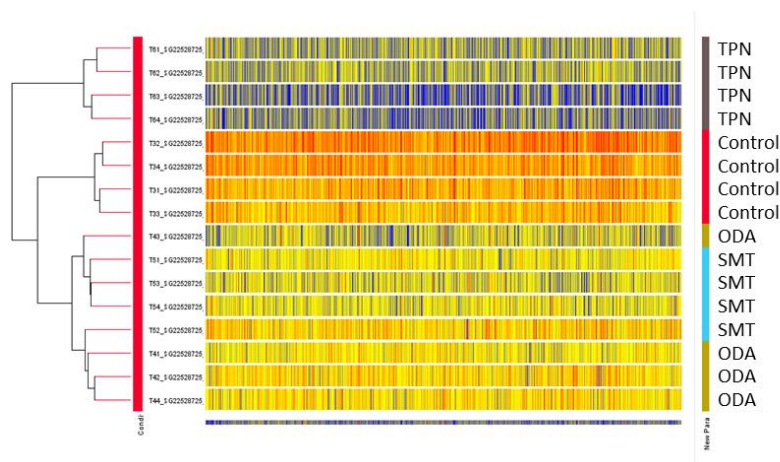


Figure 14. Cluster analysis of microarray data obtained from thyroid gland of SD rats treated with ODA, SMT, and TPN for 28 days.

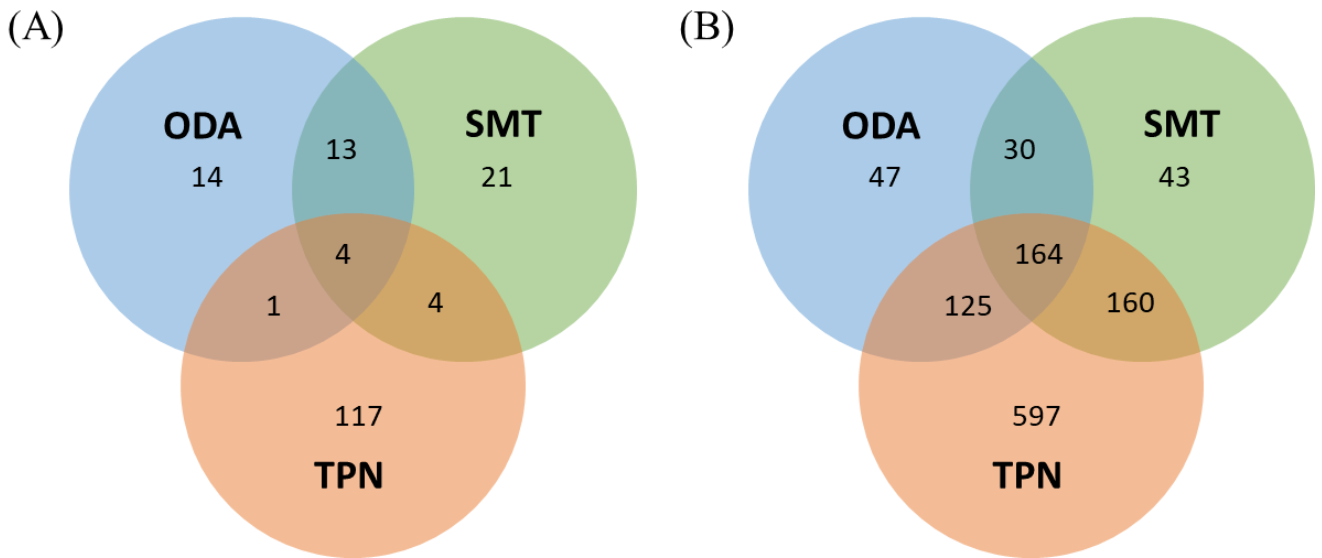


Figure 15. Ven diagrams of upregulated genes (A) and downregulated genes (B) in the thyroid gland of SD rats treated with ODA, SMT, and TPN for 28 days.

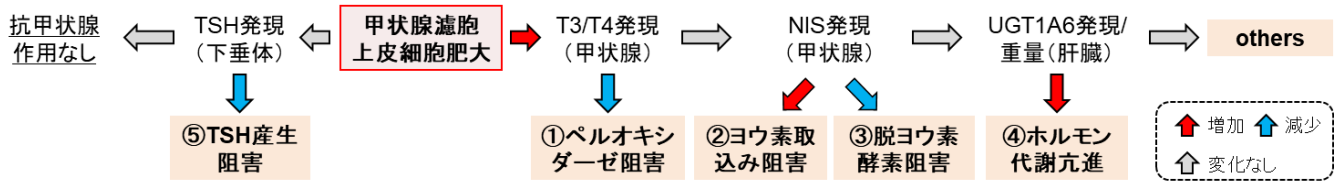


Figure 16. Flowchart for detection and mechanism estimation of antithyroid chemicals in 28-day repeated-dose oral toxicity studies in rats.

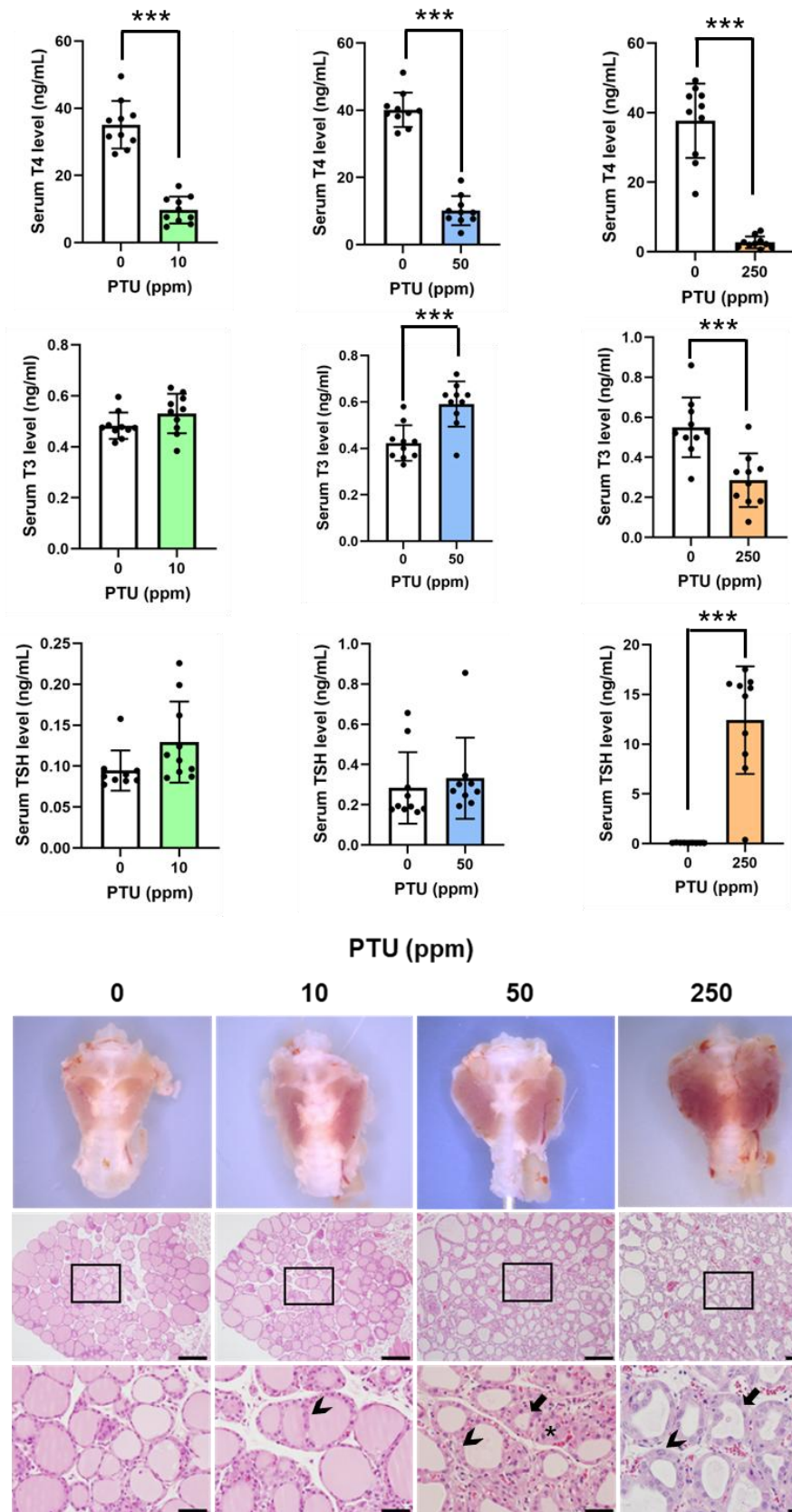


Figure 17. Effects of perinatal exposure to PTU on serum T4, T3, and TSH levels and histology in the thyroid of dams. ***: significantly different from the controls at $P < 0.001$. Scale bars: 200 μm (central panels), 50 μm (lower panels). Arrows, irregular-shaped follicles. Arrowheads, enlarged follicular cells. Asterisks, depletion of colloids.

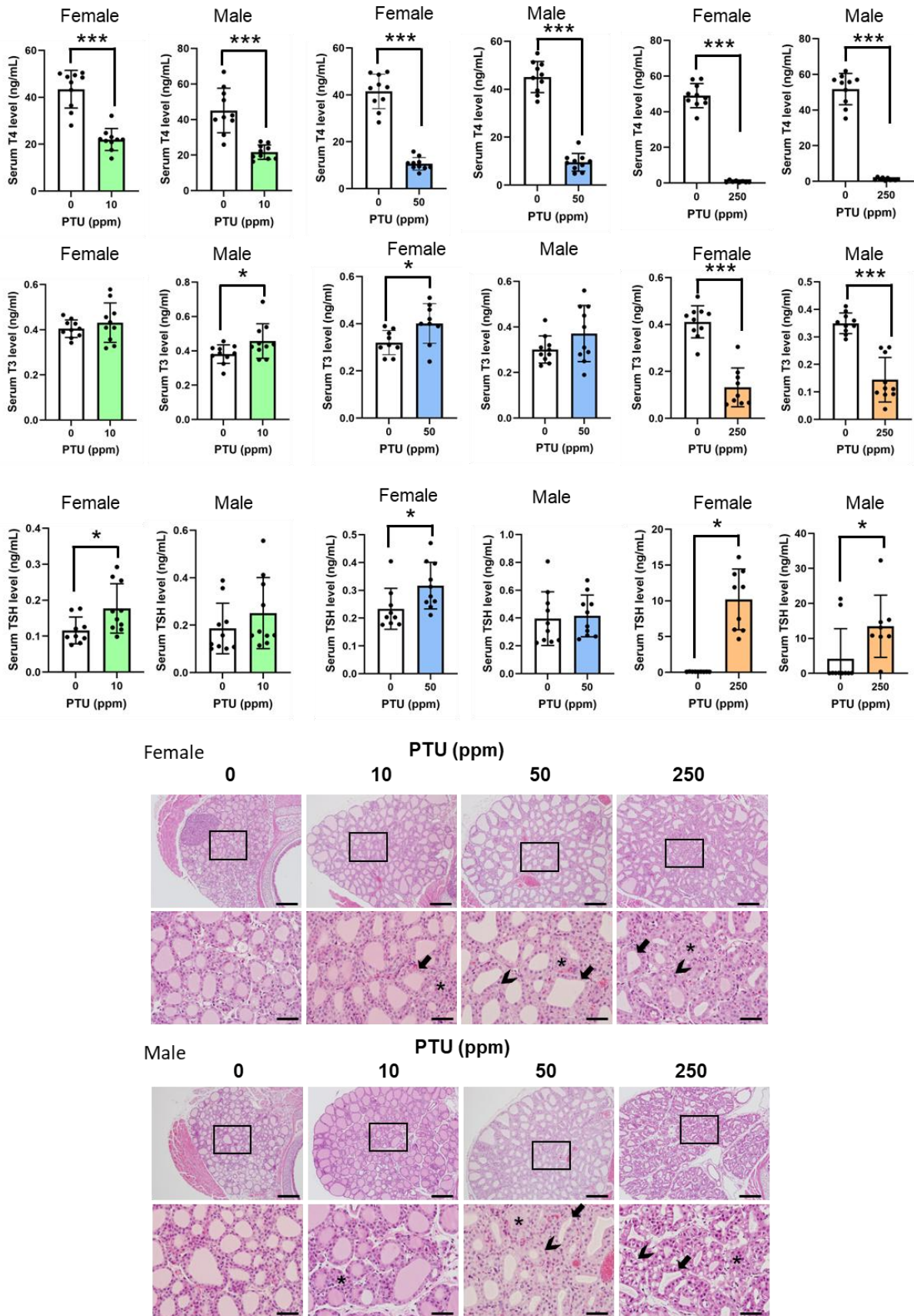


Figure 18. Effects of perinatal exposure to PTU on serum T4, T3, and TSH levels and histology in the thyroid of pups. * and ***: significantly different from the controls at $P < 0.05$ and 0.001 , respectively. Scale bars: 200 μm (upper panels), 50 μm (lower panels). Arrows, irregular-shaped follicles. Arrowheads, enlarged follicular cells. Asterisks, depletion of colloid.

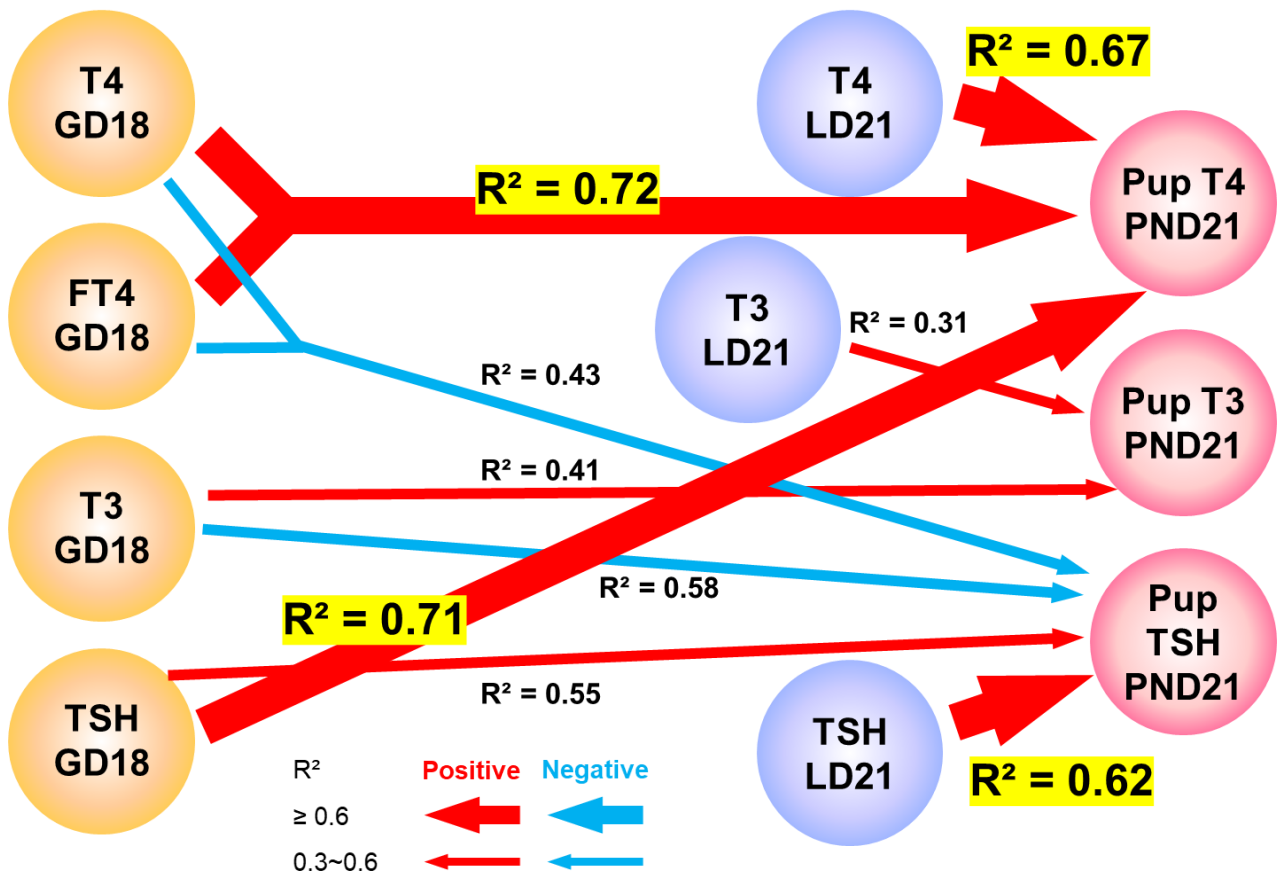


Figure 19. Key event relationships (KERs) from maternal (GD18.5 and LD21) to pup (P21) thyroid hormone (T4, FT4, and T3) and TSH levels. Arrows depict hypothesized maternal-to-pup KERs linking thyroid-related hormone levels in dams at GD18.5 and LD21 to hormone levels measured in pups at P21. For each arrow (maternal–pup hormone pairing), simple linear regression was performed (pup hormone = $\beta_0 + \beta_1 \times$ maternal hormone), and the resulting coefficient of determination (R^2) is shown adjacent to the corresponding arrow. Higher R^2 values indicate stronger linear associations between the endpoints.

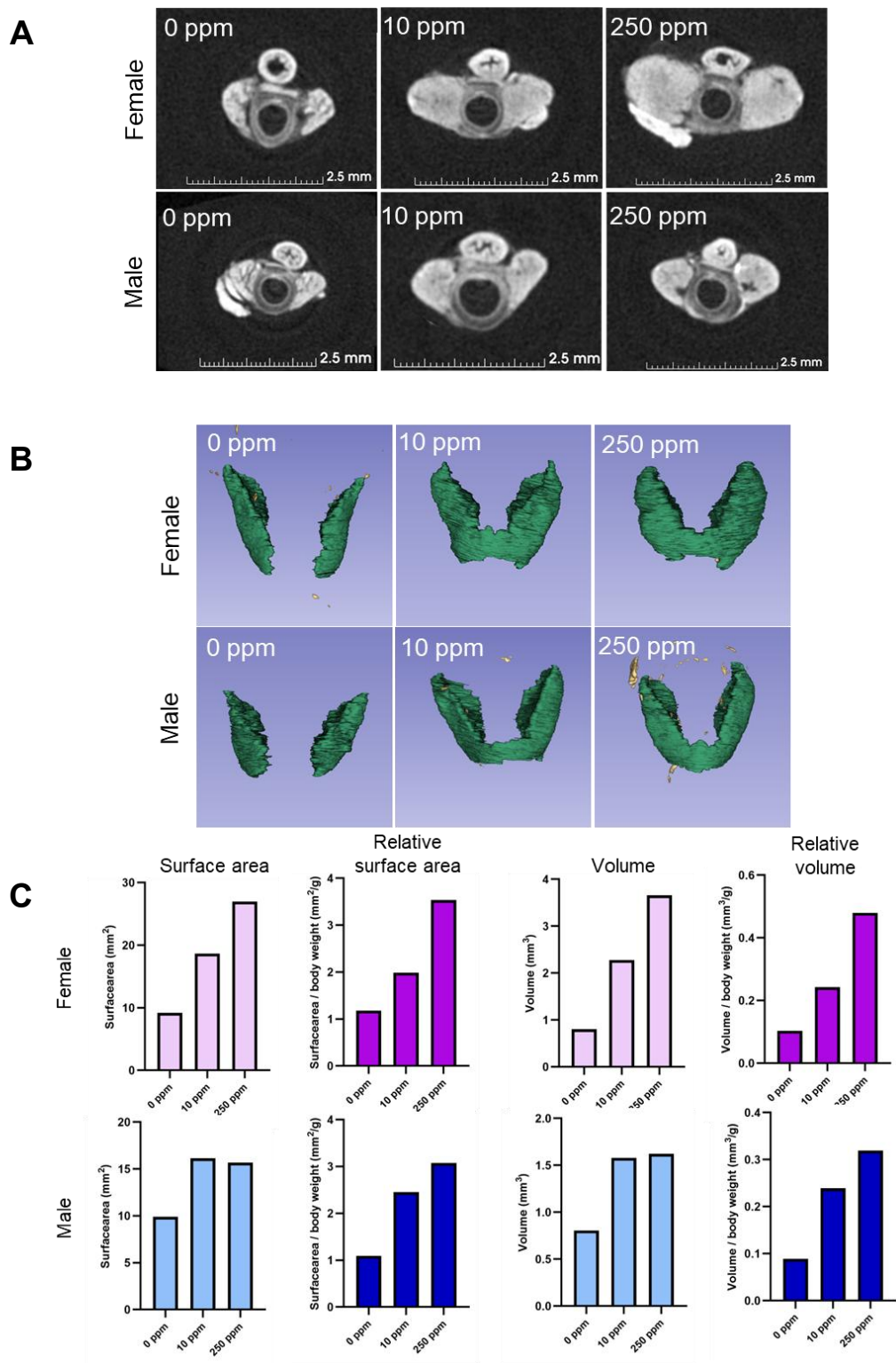


Figure 20. Micro-CT imaging, 3D reconstruction, and volumetric analysis in P10 pups following perinatal PTU exposure (GD6.5-P21).

(A) Representative micro-computed tomography (micro-CT) images of P10 pups from the perinatal PTU-induced hypothyroidism model.

(B) 3D reconstructions generated from the micro-CT datasets.

(C) Graphical summary of tissue volume quantified from the 3D reconstructed data.

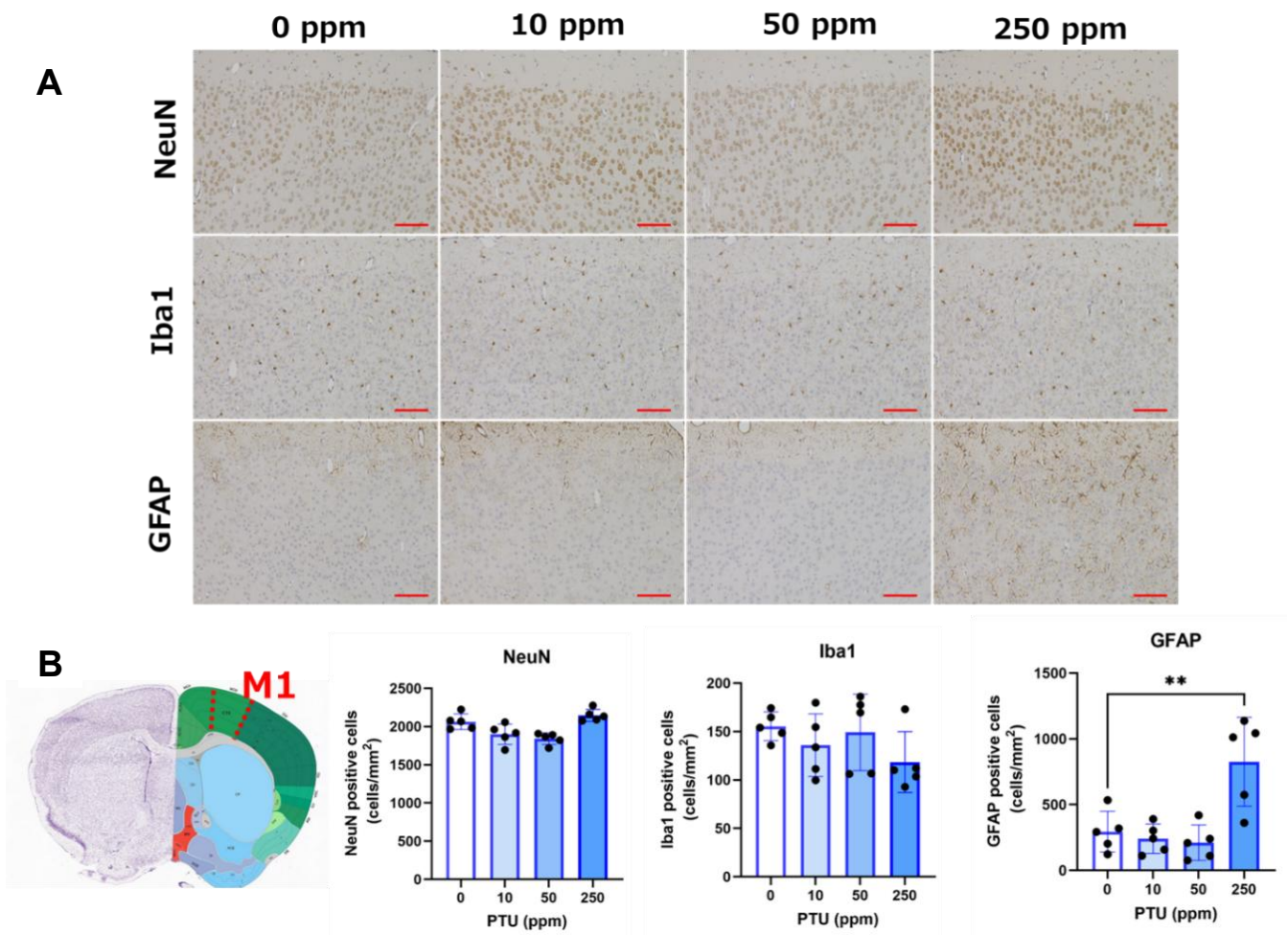


Figure 21. Immunohistochemical analysis of neurons, microglia, and astrocytes in the primary motor cortex (M1) of P21 pups following maternal PTU exposure (GD6.5–PND21).

(A) Representative immunohistochemical images of the M1 region stained for NeuN (neuronal marker), Iba1 (microglial marker), and GFAP (astrocytic marker). Scale bar, 100 μ m.

(B) Schematic (or low-magnification overview) indicating the M1 region of interest (ROI) used for quantification, together with dot-and-bar plots of NeuN⁺, Iba1⁺, and GFAP⁺ cell counts within the M1 ROI. Each dot represents an individual pup, and bars indicate the group mean \pm SD. n = 5 pups per group. one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test vs. control group; $P < 0.01$.

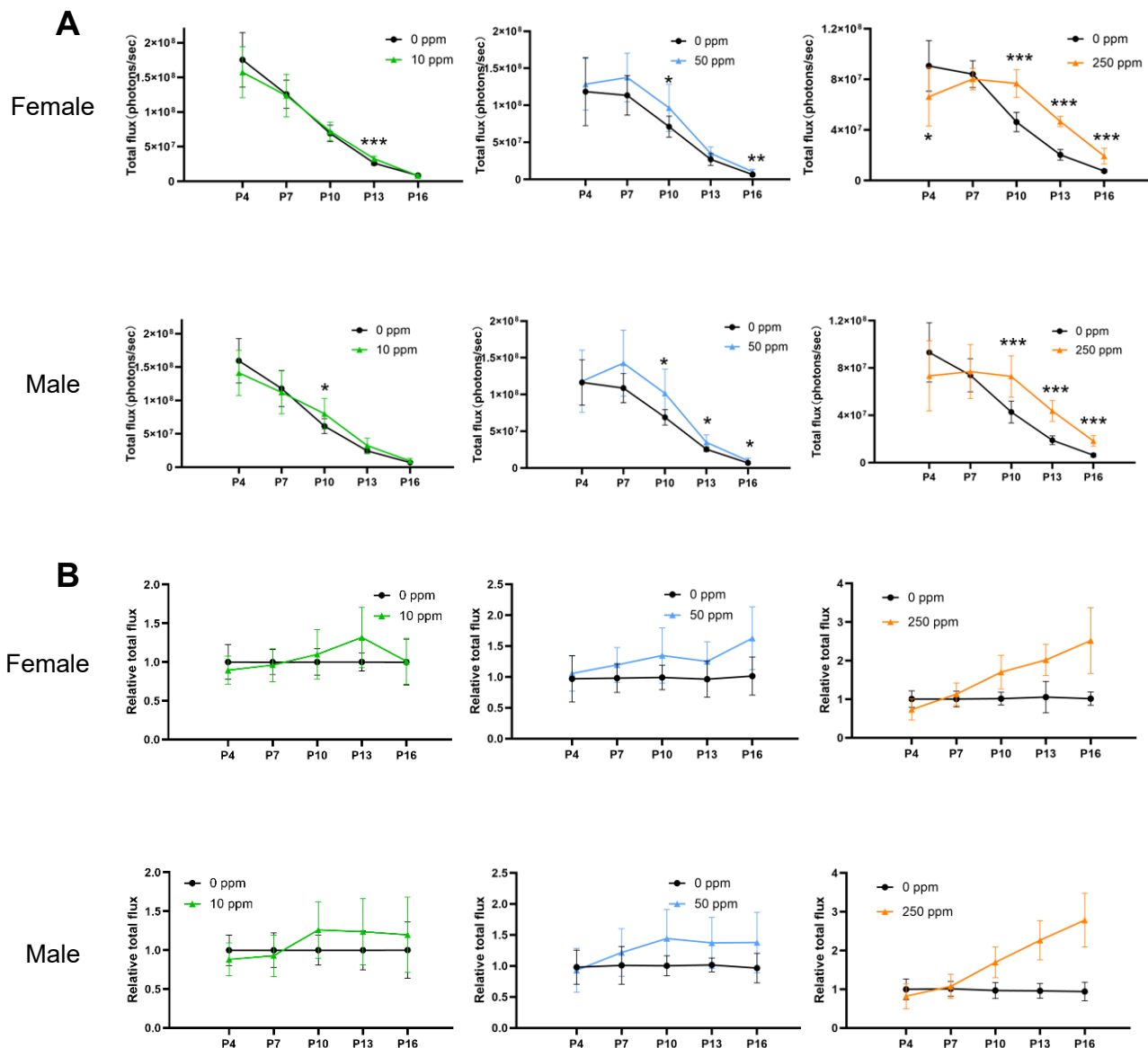


Figure 22. Time-course of head bioluminescence signals in Syn-Rep pups following maternal PTU exposure (GD6.5–PND21). Syn-Rep pups were subjected to in vivo bioluminescence imaging (BLI) at postnatal day (P) 4, 7, 10, 13, and 16. Head-region BLI signals were quantified using a predefined region of interest (ROI).

(A) Time-course of head BLI signals (raw values) in head BLI signals shown as total flux (photons/s). Data are presented as mean \pm SD ($n = 8-10$ pups per group). For each postnatal day, groups were compared using unpaired (two-tailed) Student's t -test against the age-matched control; *, **, and ***: significantly different from the controls at $P < 0.05$, 0.01 , and 0.001 , respectively.

(B) The same data as in (A), re-expressed as fold change by normalizing each pup's head BLI value to the age-matched control mean at each postnatal day (control mean = 1.0). Values are shown as mean \pm SD, with lines connecting group means across time.

Hormone predictor

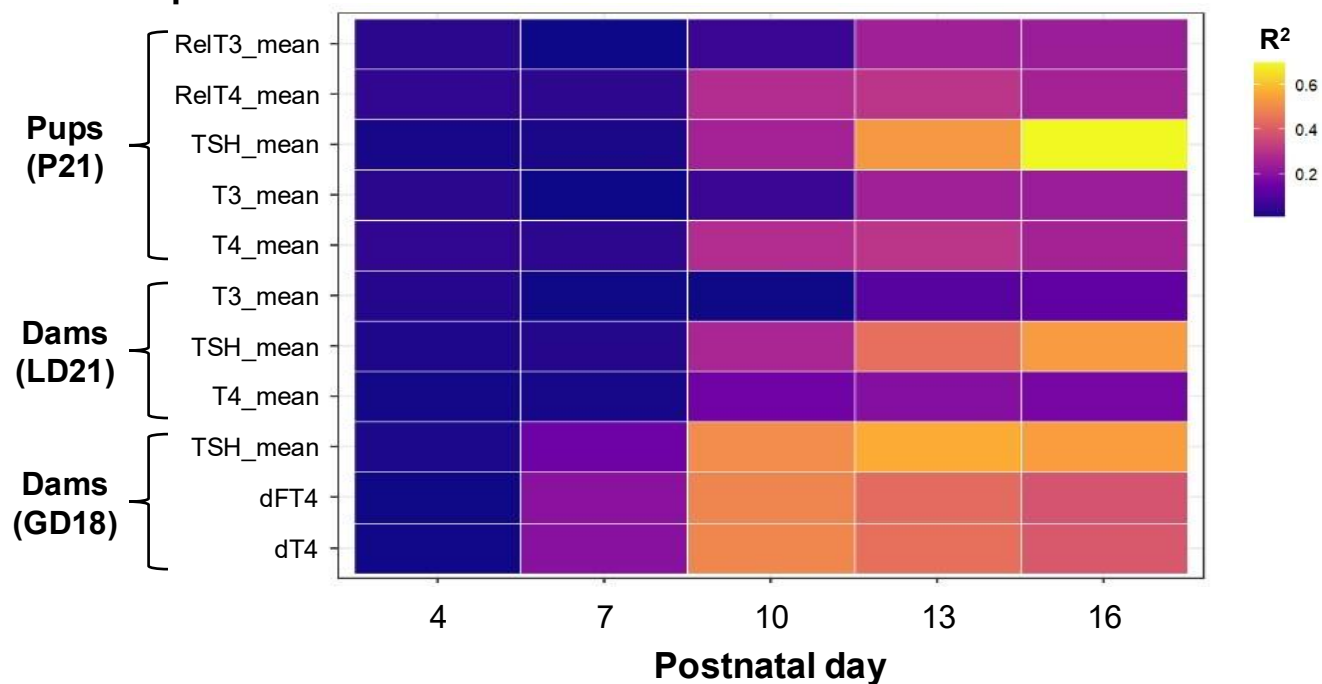


Figure 23. Heatmap of R^2 values from simple linear regressions between age-matched control-normalized head BLI in Syn-Rep pups and thyroid-related hormones in dams (GD18.5 and LD21) and pups (P21). Head-region BLI was performed in Syn-Rep pups at P4, P7, P10, P13, and P16. For each postnatal day, BLI values were expressed as fold change relative to the age-matched control mean (control mean = 1.0), corresponding to the normalized values shown in the BLI time-course plot (Figure 22B). Thyroid-related hormones (T4, FT4, T3, and TSH) were measured in dams at GD18.5 and LD21, and in pups at P21. For each combination of postnatal day and hormone endpoint, simple linear regression was performed (BLI fold change = $\beta_0 + \beta_1 \times$ hormone level), and the coefficient of determination (R^2) was extracted. The heatmap summarizes R^2 values, where higher values indicate stronger linear associations. Note that R^2 reflects the strength of association but not its direction (which is given by the regression slope, β_1).

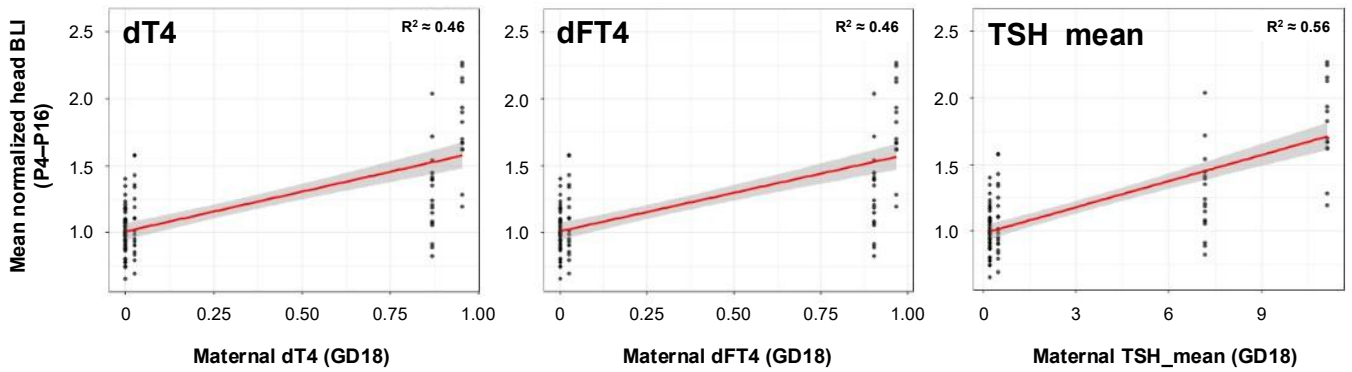


Figure 24. Simple linear regression between maternal thyroid hormone indices at GD18.5 and mean normalized head BLI in Syn-Rep pups. Maternal thyroid-related hormone indices at GD18.5 (dT4, dFT4, and TSH_mean) were regressed against the mean normalized head bioluminescence imaging (BLI) metric derived from the time-course data shown in the BLI plot (Figure 22B). Specifically, head BLI values were expressed as fold change relative to the age-matched control mean at each postnatal day (control mean = 1.0), and the fold-change values were then averaged across postnatal days (P4–P16) to obtain a single mean normalized BLI value per litter (dam). Scatter plots show the observed data points and the least-squares regression line from a simple linear regression model (mean normalized BLI = $\beta_0 + \beta_1 \times$ hormone index). The coefficient of determination (R^2) are reported in each panel. (dT4 and dFT4 were defined as change from control / percent decrease.)

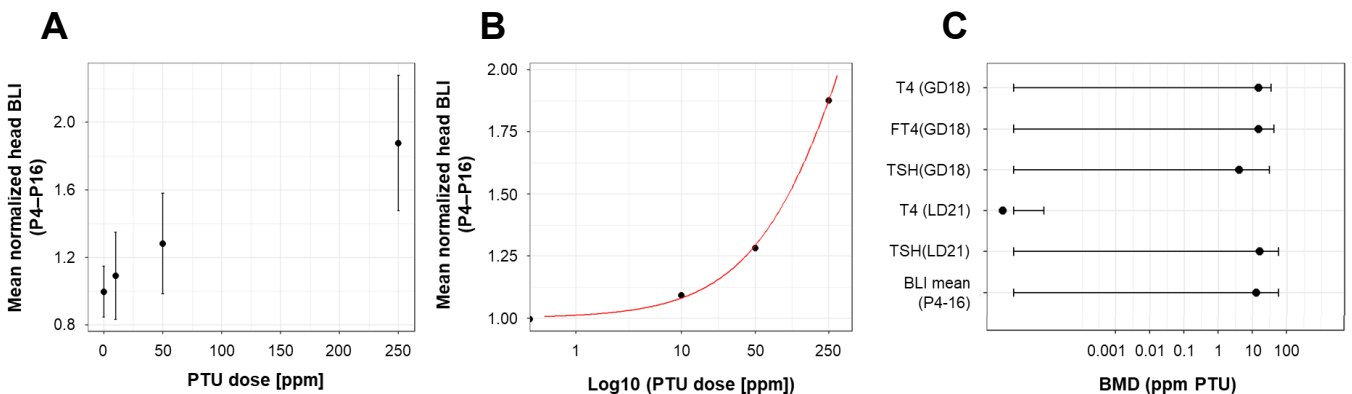
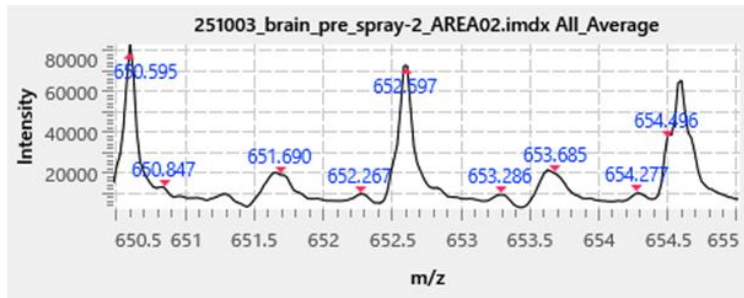


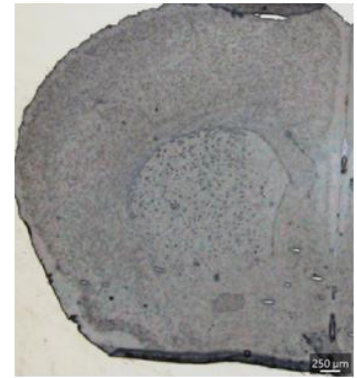
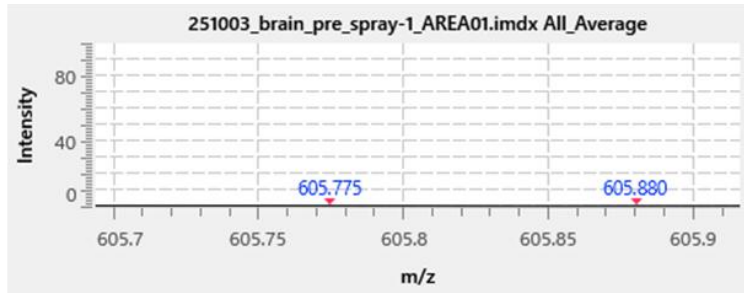
Figure 25. Benchmark dose analysis of mean normalized head BLI in Syn-Rep pups following maternal PTU exposure (GD6.5–P21). Mean normalized head BLI (P4–P16) was calculated as the P4–P16 average of head BLI fold changes relative to the age-matched control mean (control = 1.0). (A) Relationship between PTU dose [ppm] and mean normalized head BLI (P4–P16). Points show [mean \pm SD] ($n = 8-10$ per group). (B) Dose–response curve of mean normalized head BLI as a function of $\log_{10}(\text{PTU dose [ppm]})$, fitted using a four-parameter log-logistic model (LL.4). The fitted curve is overlaid on the data. (C) BMD estimated for mean normalized head BLI, and corresponding BMDs summarized alongside thyroid-related hormones measured in dams and pups (GD18.5: T4, FT4, TSH; LD21: T4, TSH). BMDs were derived using a benchmark response (BMR) of 10% change from control and are presented as point estimates with 95% confidence intervals (BMDL and BMDU).

T3

MS

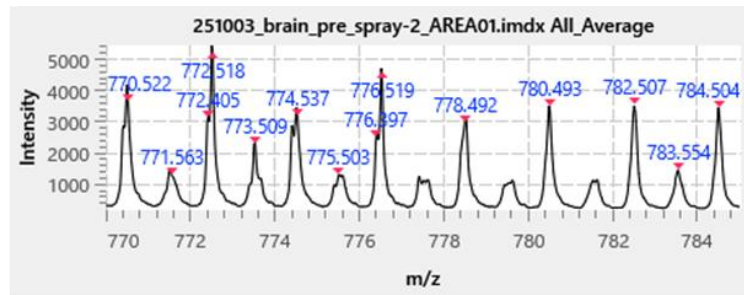


MS²



T4

MS



MS²

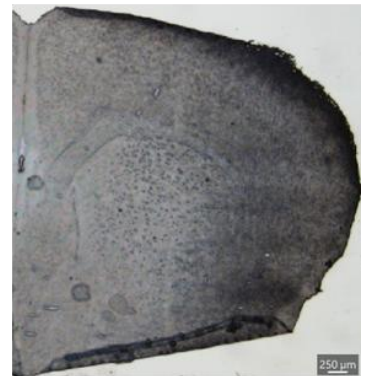
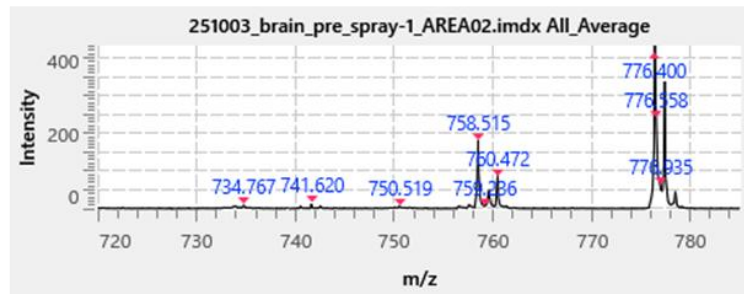


Figure 26. Mass spectrometry imaging (MSI) of thyroid hormone transitions (T3 and T4) in adult mouse brain sections with a phase-contrast reference image and MS/MSⁿ spectra. A phase-contrast micrograph of the analyzed adult mouse brain section is shown alongside the corresponding MS and MS/MSⁿ charts used for targeted evaluation. The scale bar in the phase-contrast image is 250 μm. Targeted transitions were set to T3 (m/z 651.79 → 605.79) and T4 (m/z 777.69 → 731.68). Under the current acquisition conditions, no discernible peaks were confirmed in the MS/MS spectra for either transition; therefore, the displayed distributions represent signals associated with the targeted transitions and do not constitute confirmed identification of T3 or T4.

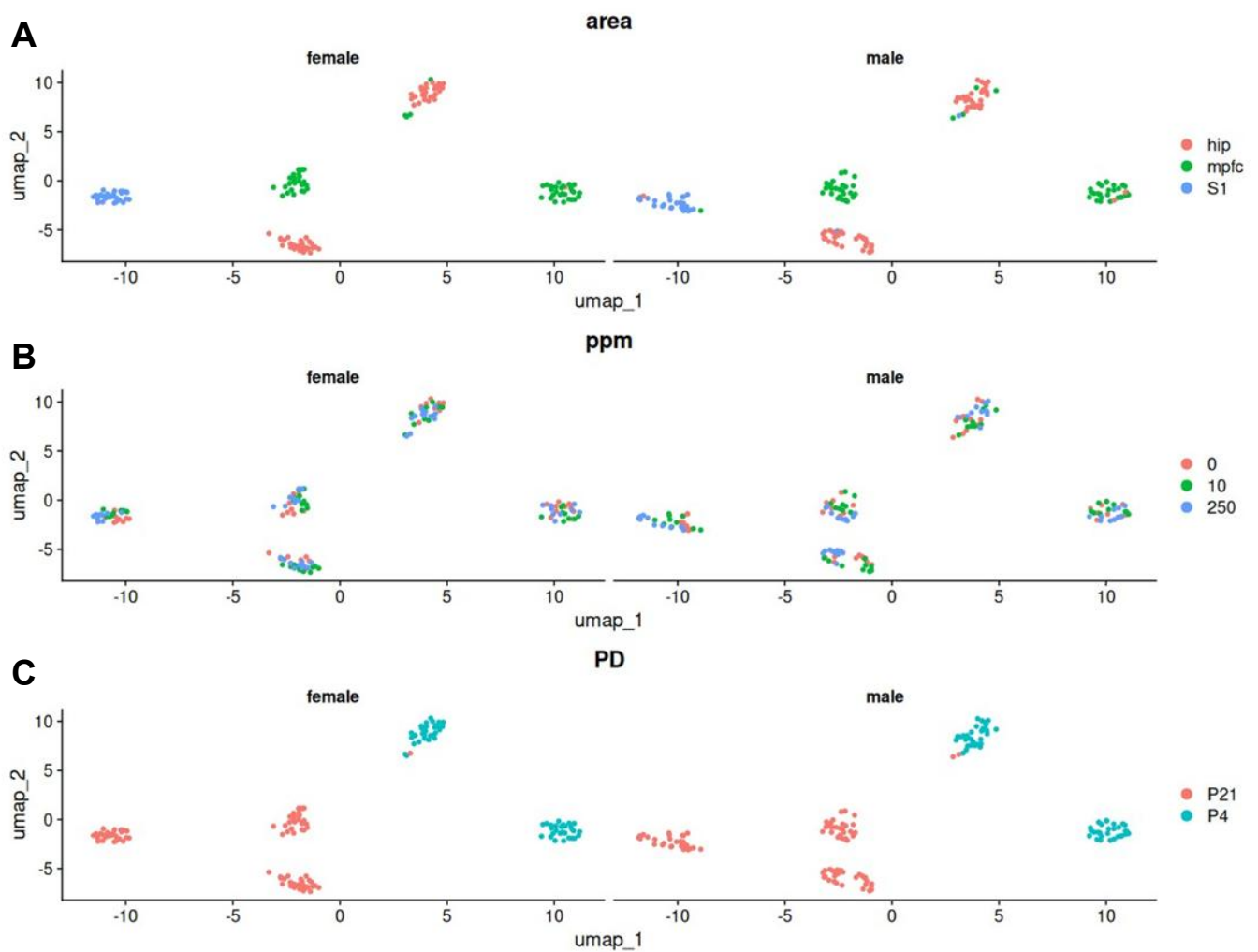


Figure 27. Uniform manifold approximation and projection (UMAP) visualization of RNA-seq profiles reveals sex-, age-, brain region-, and PTU dose-dependent transcriptomic differences in pup brain (P4 and P21). RNA sequencing (RNA-seq) was performed on medial prefrontal cortex (mPFC), primary somatosensory cortex (S1), and hippocampus from male and female pups at postnatal day (P) 4 and P21 exposed to PTU at 0, 10, or 250 ppm. Normalized gene expression data were subjected to dimensionality reduction using UMAP, and UMAP was performed separately for males and females. Each point represents one sample.

(A) UMAP plots colored by brain region (mPFC, S1, hippocampus), showing region-associated clustering patterns.

(B) The same UMAP embedding colored by PTU dose (0, 10, 250 ppm).

(C) The same UMAP embedding colored by postnatal age (P4 vs P21).

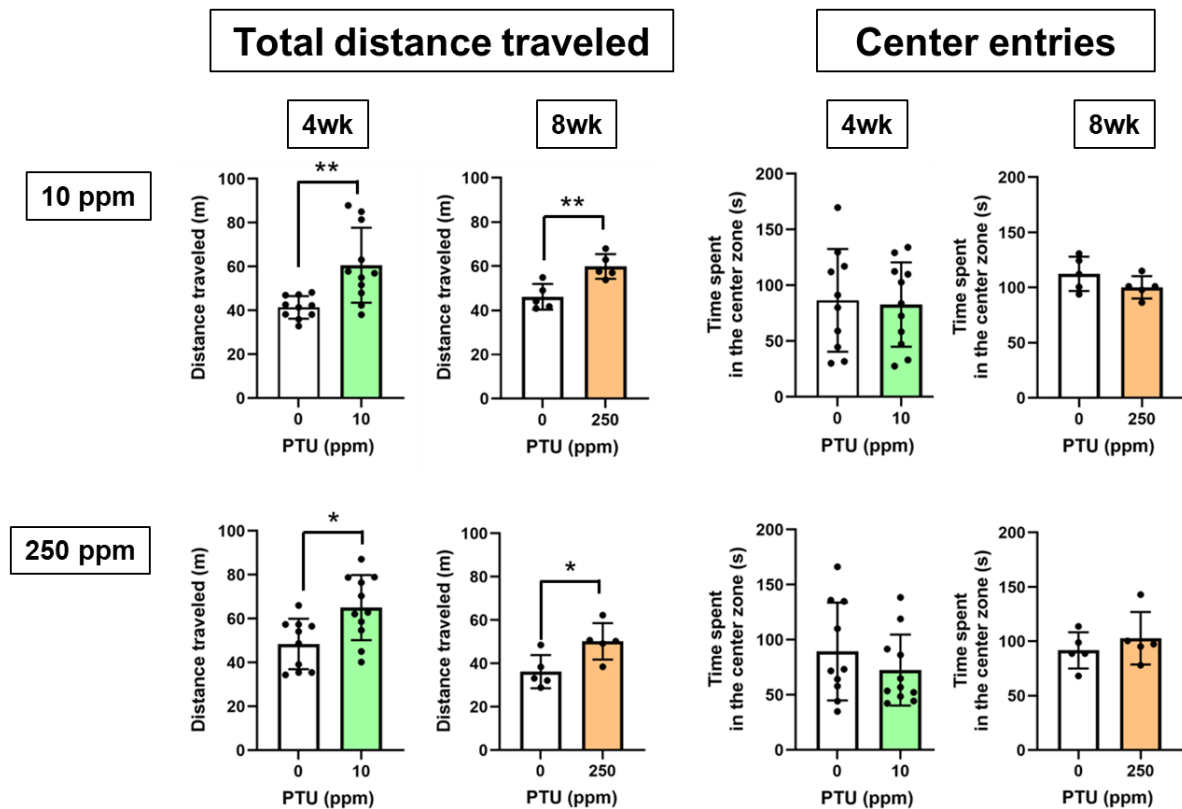


Figure 28. Open-field test measures in male pups exposed to PTU. Male pups from the control and PTU-treated groups (10 and 250 ppm) were assessed in the open-field test. The time spent in the center zone and the total distance traveled are shown. Individual data are presented as dot plots, with bars indicating the group mean and error bars representing SD. $n = 5-11$ per group. Statistical analysis was performed using unpaired (two-tailed) Student's t -test against the age-matched control; * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$, and 0.01 , respectively.

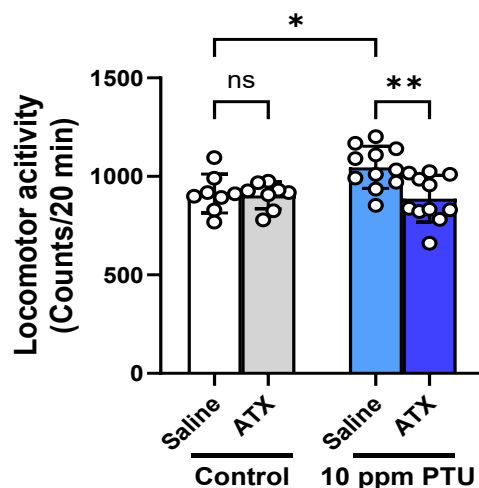


Figure 29. Effect of atomoxetine (ATX) on PTU-associated hyperactivity in male offspring assessed by infrared activity monitoring. A 2×2 factorial design was used with exposure group (Control vs PTU) and treatment (Vehicle vs ATX) as factors. Male offspring were assessed in an infrared sensor-based locomotor activity assay at 9 weeks of age. Atomoxetine (ATX; 3 mg/kg) or vehicle was administered 30 min before the activity test. The same animals had previously undergone an open-field test at 8 weeks of age. Data are presented as individual dots with bars indicating the group mean and error bars representing SD ($n = 8-11$ per group). Statistical analysis was performed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test; * and **: significantly different from the controls at $P < 0.05$, and 0.01 , respectively.

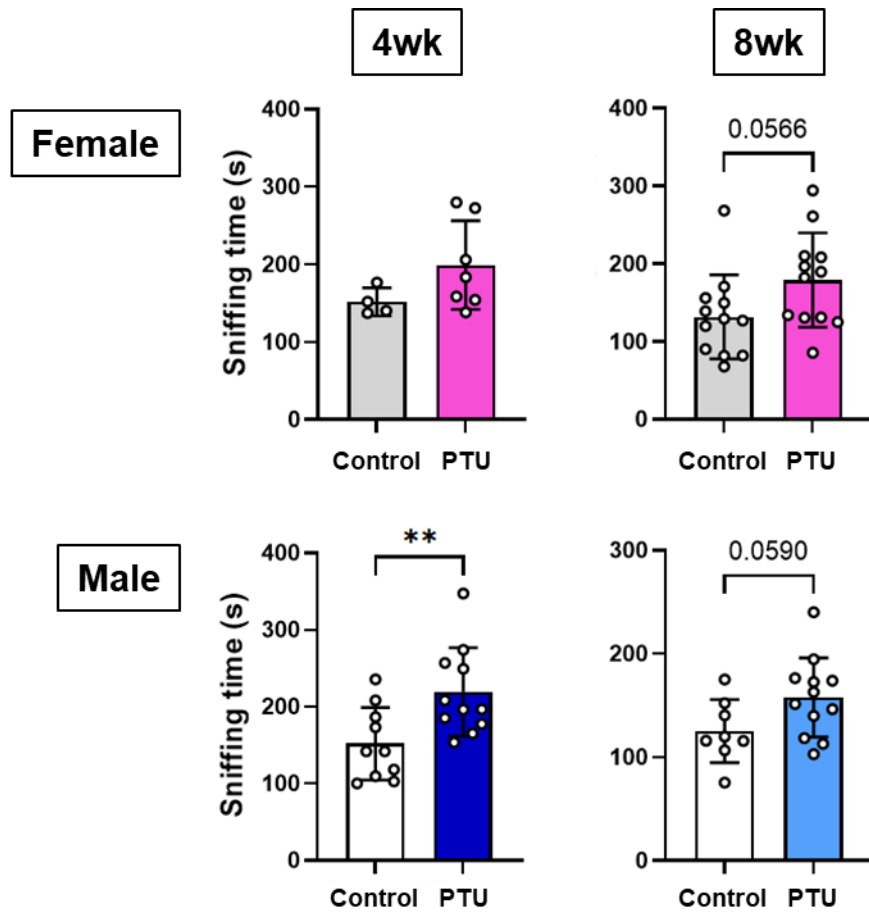


Figure 30. Juvenile conspecific sniffing test as a measure of social interaction. Each test mouse was placed in the same cage with an unfamiliar 1-week-old juvenile mouse of the same sex for 20 min, and the total time spent sniffing the juvenile was recorded. Individual values are shown as dot plots, with bars indicating the group mean and error bars representing SD. $n = 4-12$ per group. Statistical analysis was performed using unpaired (two-tailed) Student's t -test against the age-matched control; **: significantly different from the controls at $P < 0.01$.

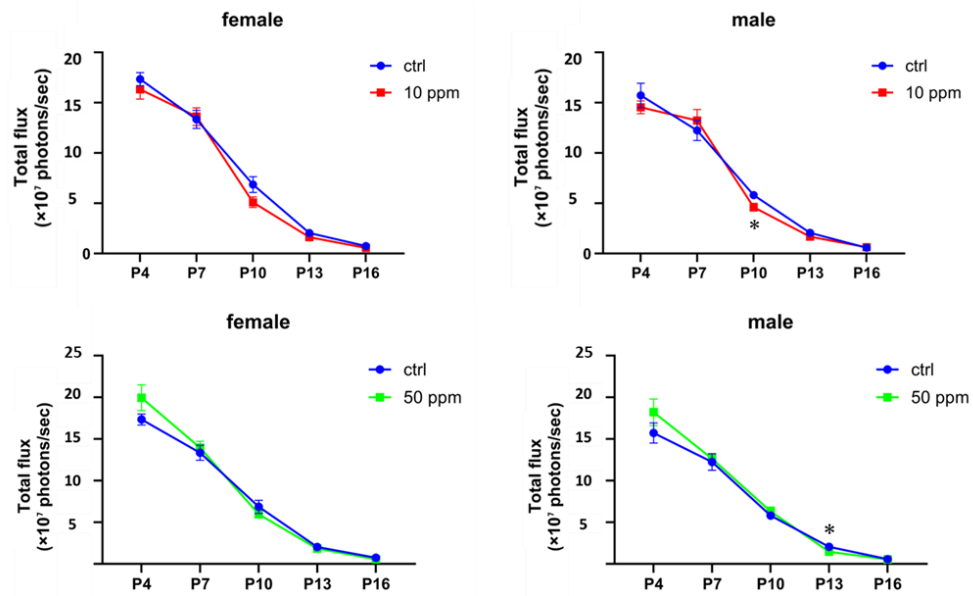


Figure 31. Effects of perinatal exposure to chlorpyrifos on in vivo luminescence in Syn-Rep mice. *: significantly different from the controls at $P < 0.05$.

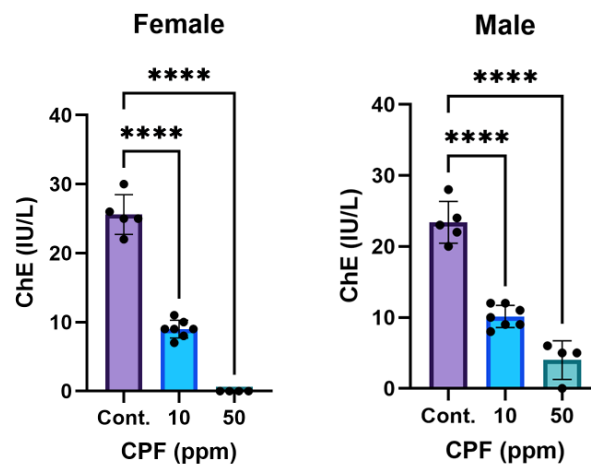


Figure 32. Effects of perinatal exposure to chlorpyrifos on serum cholinesterase (ChE) levels in pups. ****: significantly different from the controls at $P < 0.0001$.

No.	投与期間 (方法)	用量 (mg/kg 体重 /日)	定量方法	変動	文献
1	6ヶ月 (経口)	10~20	ELISA	T3: 増加 T4: 減少	Alhyan et al. Cureus. 2023;15:e39712
2	12ヶ月 (経口)	10~40	ELISA	T4: 変化なし	Güngör et al. Rev Assoc Med Bras. 2024;70:e20241177

Figure 33. A review of the literature on the administration of valproic acid to humans. A decrease in thyroid hormone levels in human serum was observed following administration.

No.	動物種 (系統)	投与期間 (方法)	用量 (mg/kg 体重/ 日)	定量方法	変動	文献
1	ラット (Albino)	5週 (胃管)	200	ELISA	T3: 減少 T4: 減少	El-Bermawy M. The Egyptian J. Histol. 2015;38:10- 20.
2	ラット (Albino)	8週 (経口)	200	ELISA	T3: 減少 T4: 減少	Mahmoud. Indones. Biomed. J. 2020;12:304-312

Figure 34. A review of the literature on the administration of valproic acid to rats. A decrease in thyroid hormone levels in rat serum was observed following administration.

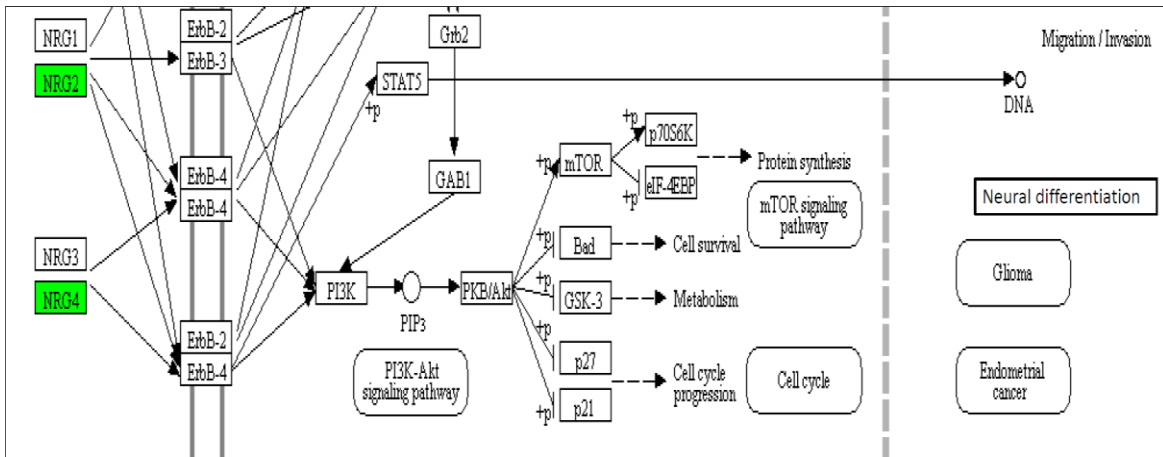


Figure 35. Genes whose expression decreases during neural (ectodermal) differentiation following THRA knockdown (NGS analysis). NRG2 and NRG4, which are involved in neural differentiation, were screened.

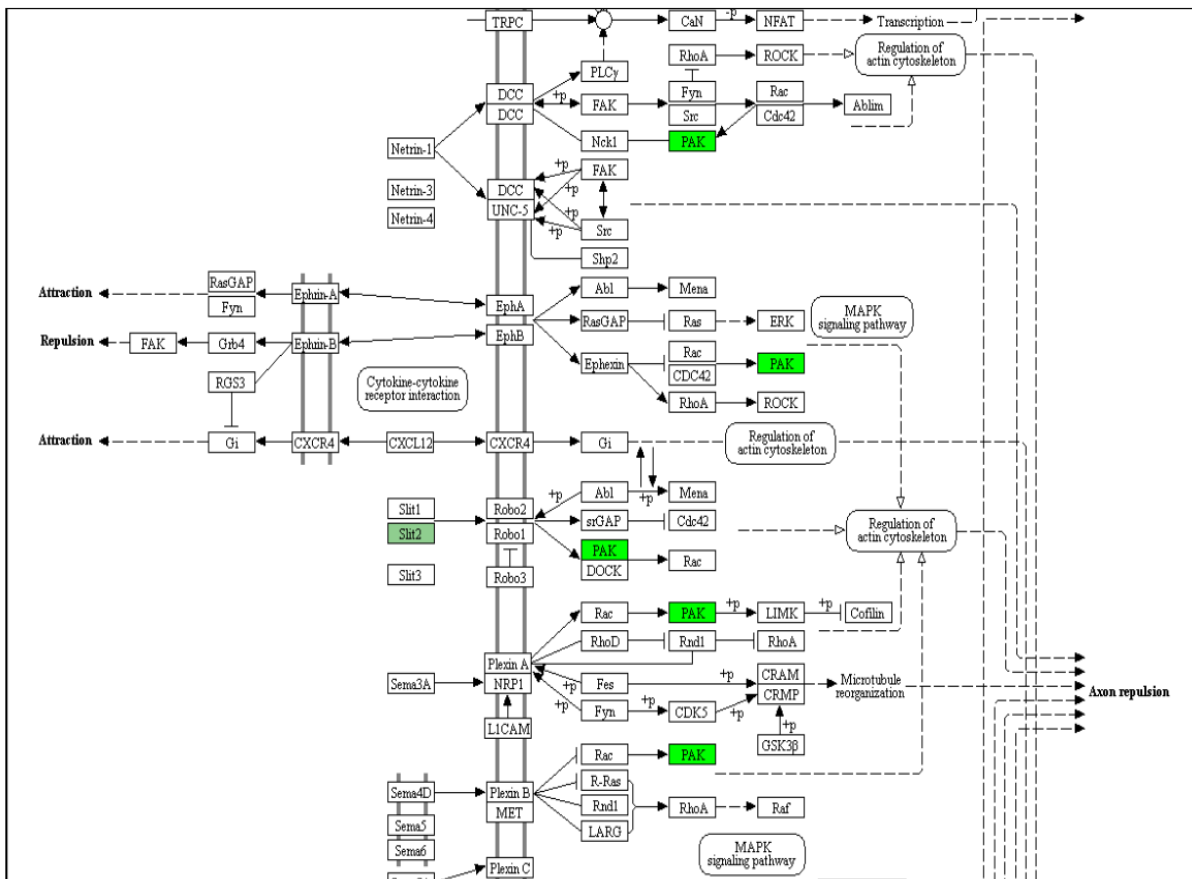


Figure 36. Genes whose expression decreases during neural (ectodermal) differentiation following THRA knockdown (NGS analysis). Slit2 and PAK, which are involved in neuronal migration and axon guidance, were screened.

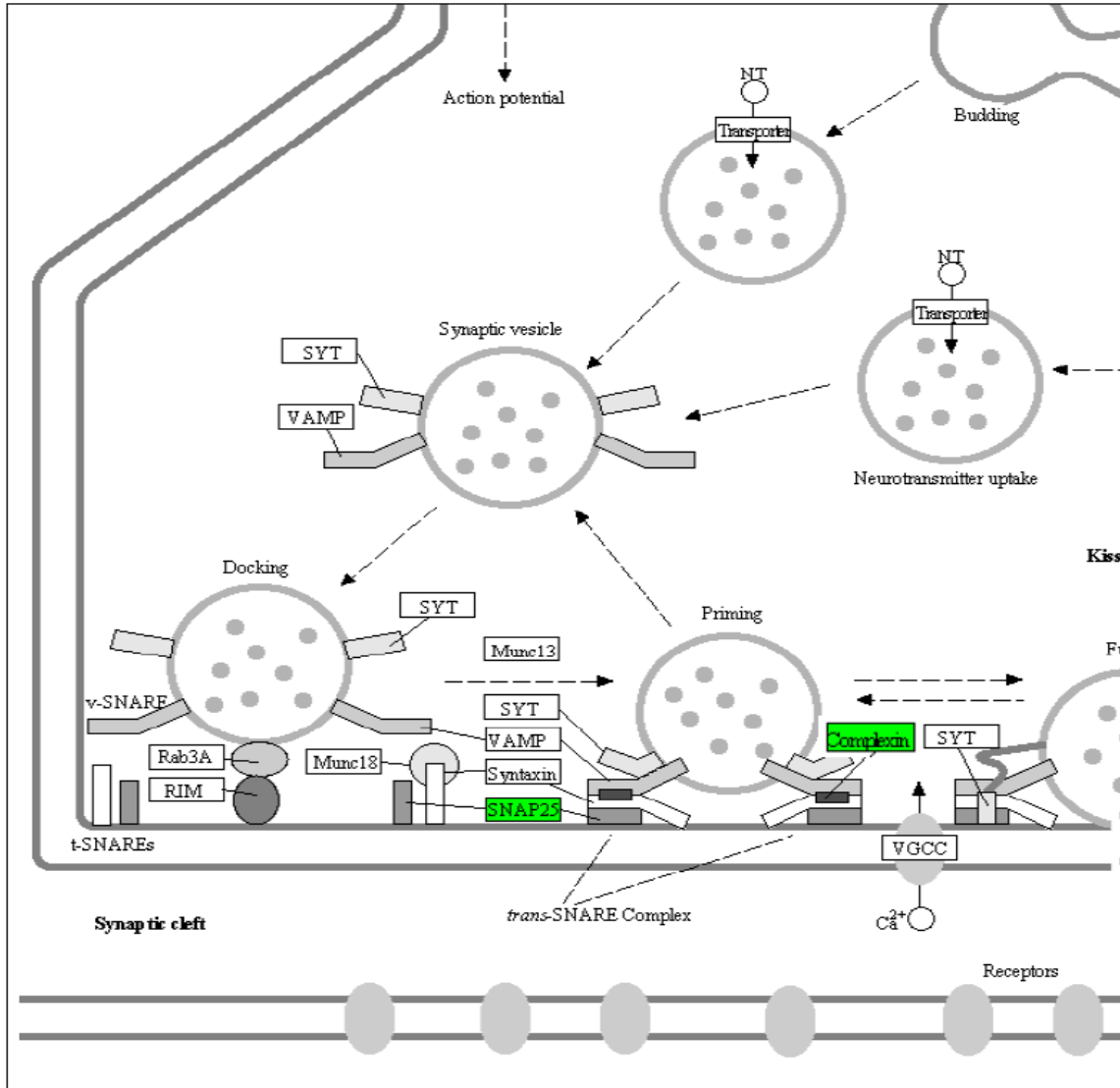


Figure 37. Genes whose expression decreases during neural (ectodermal) differentiation following THRa knockdown (NGS analysis). SNAP25 and Complexin, which are involved in neural differentiation and maturation, were screened.