

Weight of Evidenceに基づく毒性評価の展望

安全性生物試験研究センター 病理部
小川久美子

Prospects for Weight of Evidence-based toxicity assessment

Kumiko Ogawa

We are surrounded by or supported by many chemical substances, including those we directly ingest, such as pharmaceuticals, pesticides, food additives, and food constituent chemicals, as well as those we are unintentionally exposed to in our living and working environment. In this review, I would like to look back on the objectives of safety assessment of various chemicals around us, and discuss how we can ensure the safety of new chemical substances, that continue to increase year by year.

In addition, after more than 10 years of prospective evaluation study, the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guideline for carcinogenicity testing (ICH S1B(R1) guideline) has been revised and has also been implemented in Japan from March 2023. This revision allows waiver of conducting two-year rat carcinogenicity test if sufficient Weight of Evidence (WoE) can predict the carcinogenicity of a candidate pharmaceutical. In order to evaluate carcinogenicity without compromising safety and in line with the 3R principle with fewer resources, it is expected that additional evidence achieved from samples collected in chronic toxicity studies will complement the data. For this purpose, we aim to establish a carcinogenicity evaluation system using histopathological specimens that utilize γ -H2AX, a DNA damage marker, and also stem cell markers of target organs as indicators of dedifferentiation, one of the malignant phenotypes. We are also investigating an evaluation system using histopathological specimens for the detection of antithyroid agents, which have recently raised concerns about their impact on the developmental neurotoxicity of the next generation. Methods to visualize and quantify changes in biomarker proteins that explain the mechanism of toxicity should have further potential in WoE-based toxicity evaluation. The combination of *in silico* and *in vitro* screening systems with more in-depth *in vivo* evaluation is expected to lead to appropriate and safe use of useful chemicals.

Keywords: WoE, evaluation, immunohistochemistry, histopathological specimen, biomarker

1. 化学物質とヒトの関わり

ヒトの健康を障害する原因には、生物学的要因（細菌、ウイルス等）、物理学的要因（放射線、熱、振動等）、化学的要因（各種化学物質）及び社会心理学的要因があるとされる。その中でも、化学的要因の存在は、ギリシャ

哲学者ソクラテスのドクニンジン、クレオパトラの蛇毒、古代ローマの鉛中毒など、古代文明の頃から知られていた。

また、化学物質の有効利用についても、古代ギリシャのヒポクラテスは、ヤナギの皮や枝から鎮痛薬（のちにサリチル酸が含まれると判明）を作ったと伝えられ、その死後にまとめられたとされる「ヒポクラテス全集」の中には、多くの薬物療法が記されている。さらに遡るメソポタミアや古代エジプトにおいても、すでに生薬を用いた治療法に関する記述が残されている¹⁾。

16世紀の初頭、毒性学の父と称されるパラケルスス

To whom correspondence should be addressed:
Kumiko Ogawa; Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, 3-25-26, Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan;
Tel/Fax +81-44-270-6655; E-mail: ogawa93@nihs.go.jp

は、(1) 疾病は特定の臓器 (標的臓器) に局在する傾向がある。(2) 化学物質は体内の特定の部位において最大の効果を発揮する。(3) 物質が毒か否かは摂取量によってのみ判断される。(4) 化学物質の有益な作用と毒性作用の両方を研究するためには実験動物の使用が推奨される。(5) データ/事実なしに議論することはできない。と、現代にもつながる用量反応関係の原則、臓器特異性など毒性学の基礎を築いた²⁾。

その後、産業振興の流れの中、さまざまな目的で数多くの化学物質が作られるようになり、金属加工者、印刷工、織工、陶器職人、さらに煙突掃除人の職業病に端を発して、中毒事件・事故及び化学発がんも問題視されるようになった。その対応として、さまざまな化学物質の使用に関する規制と安全性評価のための枠組みが各国内及び国際協調のもとで構築されてきた。

2. 日本における各種化学物質の安全性確保の取り組み

日本では、医薬品の品質を確保するため規格・基準及び標準的試験法等を示す公的規範書として1886年に「日本薬局方」の初版が公布され、今日まで改正が重ねられている。また、1943年に最初の「薬事法」が制定公布され、1948年に新規の法律として医薬品等の製造及び輸入販売などについて登録制度が整備された。その後、サリドマイド禍などの副作用問題、並びに科学技術の進歩を踏まえて幾度も改正がおこなわれ、2014年には医療機器のプログラムや再生医療等製品も対象とした「医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保に関する法律 (薬機法)」に改正されている。医薬品開発時に必要とされるさまざまな安全性試験に関する規定は「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」³⁾や「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」⁴⁾などに定められている。

また、食品、食品添加物、器具又は容器包装、乳児用おもちゃなどについては、1947年に公布された「食品衛生法」で基準、表示、検査などが規制されている。1995年の改正において、すべての添加物が指定対象に拡大されたことに伴い、それまでに日本において既に使用され、長い食経験があるとされた489品目に対しては、既存添加物の枠組みが設けられた。これらについては、その後、安全性評価のため、当所安全性生物試験研究センターを中心に病理部においても反復投与毒性試験が実施されてきた⁵⁻²⁷⁾。実験動物を用いた検討によって発がん性が示されたアカネ色素²⁸⁻³⁰⁾については2004年に消除され、添加物としての使用実態のない品目も段階的に消除されている³¹⁾。牛海綿状脳症 (BSE) 問題等を契機とした2003年の改正では飲食に起因する衛生上の危害の防止

に加えて、食品の安全性確保についても目的に明記され、2018年には食中毒事例や食環境の変化への対応を目的にHazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) に基づく総合衛生管理製造過程の導入などの改正が行われた。申請時に求められる安全性試験等に関して、例えば食品添加物は「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」³²⁾に規定されている。

一方、一般化学物質については、昭和40年代初期に発生した、絶縁油等に広く使用されていたポリ塩化ビニル (PCB) による健康被害や環境汚染問題を背景に、ヒトの健康を損なうおそれ又は動植物の生息若しくは生育に支障を及ぼすおそれがある化学物質による環境の汚染を防止することを目的として、昭和48年 (1973年) に「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法)」が成立した。当初は、新規化学物質を製造輸入しようとする者に国への届出を求める「新規化学物質の事前審査制度」を設けることと、①難分解性、②高蓄積性及び③ヒトへの長期毒性を有する化学物質を「特定化学物質」として、その製造・輸入を厳しく規制するという内容であった。その後の改正で、経済協力開発機構 (OECD) での合意事項への対応、難分解性ではあるが高蓄積性を有せず、かつ相当程度広範な地域の環境に残留している化学物質への対応、ヒトへの健康影響に加え、動植物への影響の観点も含めた化学物質の審査と把握が加わり、現在に至っている。化審法では、作業員や消費者への直接的な暴露ではなく、化学物質が環境を経由した後、ヒト及び動植物への長期的な影響を及ぼすことの防止が目的とされている。化審法に基づき、年間に申請される新規化合物数は、平成20-30年度は合計500件を超えていたが、コロナ禍の影響もあって減少している可能性がある。令和5年度に届出された新規化合物は、事前審査を受けた上で製造・輸入が可能となる通常新規化学物質が169件、申出を行い、確認を受ける低生産量新規化学物質 (難分解性でありかつ高蓄積性ではない、年間製造・輸入数量が10トン以下のもの) が112件 (合計281件) と報告されている。そのうち、50品目がヒト健康影響の疑いありと判定されているが、多くは遺伝毒性試験及び短期間の投与試験の結果に基づいて判断される³³⁾。

さらに、職場における労働者の安全と健康を確保するとともに、快適な職場環境の形成を促進することを目的とした労働安全衛生法が昭和47年 (1972年) に制定され、職場における化学物質暴露に対する健康障害についても必要な措置が求められている³⁴⁾。

以上のような枠組みの中で、ヒトに直接摂取させることを意図して創出される化学物質のうち、医薬品は疾病の治療や症状の緩和というベネフィットを得るため、薬理作用に起因する副作用のリスクとのバランスを考慮の

うえ、医師の管理下で必要としている対象者へのみ投与される。一方、食品添加物などは防腐、加工補助、着香などの目的で、不特定多数のヒトが時に意図せず継続的に摂取することになるため、より厳しい安全性確保が必要と考えられる。これらについては、適切な試験データが申請時に求められ、評価の仕組みが構築されてきた。しかし、間接的暴露を含めたすべての化学物質について、実験動物を用いた詳細な試験を実施することは不可能である。それでも重大影響の懸念があるものを峻別し、適切な使用と廃棄に資するデータを確保する仕組みが、ヒト及び環境にとって重要であることは歴史が物語っているといえる。科学の発展に伴い、ナノマテリアルや新規モダリティーに基づく医薬品開発など、今後もそれまでにはなかった有用な物質の創出が期待される。類似化合物のない新規化合物の安全な利用には十分なエビデンスが必要である。多くの人命を救ったCOVID-19 mRNAワクチンも免疫への影響などの懸念に対して、前臨床試験などを経て承認に至ったことも記憶に新しい³⁵⁻³⁷⁾。

一方、ヒトや実験動物の全ゲノム解析、cDNAマイクロアレイ、トランスクリプトーム、リン酸化プロテオミクスなどの技術によって生命現象の分子機構の理解が進み、さらにNGS技術、抗体作製や蛍光色素の開発などによって検出感度が格段に向上し、微細な変化も捉えることが可能となってきた。また、測定・解析機器の自動化も目覚ましいものがあり、これらの技術を応用した新規評価方法の開発も期待されている。

3. 医薬品規制調和国際会議におけるがん原性試験ガイドラインの改定

医薬品規制調和国際会議 (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; ICH) では、2011年に米国研究製薬工業協会 (Pharmaceutical Research and Manufactures of America; PhRMA) から発表された未承認薬を含む182の医薬品における2年間ラットがん原性試験の結果とその回顧的解析に関する論文発表³⁸⁾を端緒として、医薬品のがん原性試験に関するガイドライン (S1ガイドライン) 改定の議論が開始された。PhRMAの論文に加え、米国食品医薬品局 (FDA) 及び日本製薬工業協会等による後ろ向き解析においても、薬理作用、遺伝毒性及び慢性毒性データなどに基づいて、2年間ラットがん原性試験が明らかに陰性又は陽性の結果となることが一定の確実性をもって予測可能と考えられたことから、S1の改定を目指して2012年4月に専門家作業部会 (EWG) が立ち上げられた。この仮説を検証するため、2013年8月に検証の実施方法を示す規制通知文

書 (Regulatory Notice Document; RND) が作成・公表され、前向き評価が開始された。その後、RNDは2016年1月に改訂され³⁹⁾、秘密保持契約が締結されている日米欧とカナダ保健省及びスイス医薬品局の5つの規制当局において、各製薬企業からの協力を得て提出された、開発中の低分子医薬品に関する試験データや文献情報に基づく証拠の重み付け (Weight of Evidence; WoE) 及びそれに基づく2年間ラットがん原性試験の予測結果をまとめたがん原性評価文書 (Carcinogenicity assessment document; CAD) と、実施後に得られた2年間ラットがん原性試験に関する要約報告書 (Final study report; FSR) が解析された。解析の詳細は、Bourcierら及び西村らの論文^{40, 41)}を参照いただきたい。2017年12月のCAD募集期間終了、2020年12月のFSR募集期間終了までに得られた45件のデータセットが解析に用いられ、約27%の品目については、2年間ラットがん原性試験はヒトでのリスク評価に追加情報を付与しない可能性が高いため、実施の意義はないとの見解が提出企業と全規制当局で一致した。この結果を受けて、医薬品のがん原性試験に関するガイドラインに統合的WoEアプローチを導入した改定が行われた。2022年5月のICHアテネ会合で改定案の承認が決定され、日本においても2023年3月に実装に移っている⁴²⁾。本改定では、がん原性のWoE評価で考慮すべき主要要素として、以下の6点が挙げられている。

1) 薬物標的の生物学的特性、ならびに親化合物およびヒトの主要代謝物の主な薬理学的機序に基づく、発がんの可能性を示すデータ。これにはラットおよびヒトにおける薬物標的の分布に加え、これらの動物種における親化合物および主要代謝物の薬理活性および薬効；遺伝子改変モデルから利用可能な情報；ヒト遺伝子関連研究；がん遺伝子データベース；また、利用可能であればクラス効果に関する発がん性情報が含まれる。

2) 親化合物および主要代謝物の選択性およびオフターゲット作用を示す副次的薬理学的スクリーニング結果、特に発がんリスクに関する結果 (例：核内受容体への結合性)。

3) 親化合物および主要代謝物の血漿暴露マージン評価を含む、特に6ヵ月間のラット試験を重視した、当該化合物を用いた実施済みの反復投与毒性試験の病理組織学的データ。

4) 薬物標的および代償性内分泌反応機序の情報を含むホルモン変動の証拠；反復投与毒性試験における内分泌器官および生殖器官の重量、肉眼的および病理組織学的変化；ならびに、利用可能であれば、生殖毒性試験に関連する結果。

5) ICH S2 (R1) (医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に

関するガイドランス)に基づく遺伝毒性試験データ: ICH S2 (R1) の推奨事項に従っても解決できない不確かな遺伝毒性データは、発がん性に関する不確実性を増大させる。

6) ICH S8 (医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン) に従った免疫調節の証拠。広範な免疫抑制の証拠は、標準的なラットおよびマウスがん原性試験からは追加の情報が得られないヒトへのリスクに対する十分な懸念を提起する可能性がある。

しかし、これらの要素が十分に得られている場合ばかりではなく、1つあるいは複数のWoE要素が決定的でない場合や、発がん性の懸念を示す場合もあり得る。その補足となる探索的アプローチの例として以下のものが挙げられている。

1) 追加の検討試験または過去の試験において採取した検体の分析 (例: 特殊組織化学染色, 分子バイオマーカー, 血清ホルモン値, 免疫細胞の機能, *in vitro*あるいは*in vivo*試験システム, 新規技術によるデータ)

2) 臨床用量および暴露におけるヒトへの機序的な外挿性を示すために得られた臨床データ (例: 尿中薬物濃度および結晶形成の証拠, ヒト血漿中ホルモンの変化を対象とした測定, ヒト画像データ)

今後, WoEによる評価を活用していくためには, これらの探索的アプローチの開発・応用が必要と考えられる。その中には, 毒性や発がんに関する主要な分子機構が動いていないことの証明がevidenceとして利用可能と考えられる。

4. 病理組織標本を用いた膀胱発がん物質の早期検出法 (γ -H2AXの有用性)

ICH S1B (R1) ガイドラインのPart I⁴²⁾及びOECDテストガイドライン451⁴³⁾ともに, げっ歯類を用いた長期がん原性試験には, 雌雄各群50匹以上を割り付けることになっている。これは, 被験物質3用量と溶媒対照群において病変の発生頻度を指標として比較する場合, 比較的稀な腫瘍も統計学的有意差を検出できることを目標に設定されている⁴⁴⁾。一方, 統計学的有意差の検出に必要なサンプルサイズは, 腫瘍の有無などの2値変数よりも, 分子発現の定量値などの連続変数の方が少数で可能となり得る⁴⁵⁾。例えば, OECD 442B-17のBRDU-ELISA or FCMの皮膚感作性試験のELISAデータ解析においても, 1群4匹以上で可とされている⁴⁶⁾。

我々は, 発がんに向かうシグナルを指標とした, 比較的短期の反復投与毒性試験の病理サンプルを用いた早期がん原性評価法の確立を目指して, 検討を進めている。発がんの機序や分子変化は単一ではないが, いずれかのタイミングでDNAに損傷が入った異常細胞が自律的に

増殖しているものと考えられる。そこでまず, 発がん過程ではDNA傷害に対する損傷修復機構が亢進しているとの仮説のもとで, 膀胱発がん物質*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) を4週間飲水投与後33週間経過観察したラットの膀胱標本を用いて, 各種のDNA損傷修復関連分子の発現を免疫組織化学染色で検出することを試みた⁴⁷⁾。DNA二重鎖切断 (γ -H2AX, MRE11, XRCC), メチル基転移 (MGMT), ミスマッチ修復 (MLH1, MSH6), 塩基除去修復 (APE1), ヌクレオチド除去修復 (DDB1, ERCC1), DNA分解 (TREX1), 細胞周期チェックポイント (SMC1), 及び複製後修復 (RAD18) に関連する酵素等について免疫染色を行ったところ, 多くの因子は対照群の膀胱尿路上皮や間質細胞でも陽性所見が認められ, 正常組織でも恒常的にDNA損傷修復機構が働いていることを反映していると考えられた。一方, γ -H2AXは対照群の膀胱の尿路上皮及び間質細胞ではほぼ陰性であるのに対して, BBN投与動物に誘発された膀胱がん細胞の核は陽性を示した。さらに興味深いことに, BBN投与動物では, がん化に至っていない正常様の尿路上皮においても, 核内にドット状の γ -H2AX陽性像を示す細胞が認められ, 発がん物質暴露による影響を発がんに至っていない領域でも検出できる可能性が示唆された。

γ -H2AXは, さまざまなDNA損傷のなかでも重篤と考えられる二重鎖切断が起こった部位に, コアヒストンの1つであるH2AX蛋白のセリン139のリン酸化によって形成される⁴⁸⁾。哺乳類では, DNA損傷の直後から損傷部位近傍に数百から数千の γ -H2AX分子が形成され, 抗体による可視化が可能である⁴⁹⁾。DNA二重鎖切断は, 放射線照射や化学物質による直接的なDNA損傷のみならず, 活性酸素種, 複製ストレス及びDNA修復不全などの間接的DNA損傷でも誘導され, DNA複製やクロマチン再構成因子の集積に関わっていることから, γ -H2AXは遺伝毒性及び発がん性マーカーとともに抗がん剤の標的としての応用が期待されてきた⁵⁰⁾。我々はさらに, ラットに対する膀胱発がん物質 (BBN, 2-nitroanisole [2-NA], 2-acetylaminofluorene [2-AAF], *p*-cresidine) 及び膀胱以外を標的とする発がん物質 (glycidol, *N*-nitrosodiethylamine [DEN], acrylamide [AA]) を発がん性が報告されている用量で28日間投与し, 膀胱粘膜上皮の γ -H2AX陽性細胞率を溶媒対照群と比較した⁵¹⁾。1群5匹の比較において, 上記の膀胱発がん物質投与群ではいずれも γ -H2AX陽性率の有意な増加が認められた。さらに, 重要なこととして, 発がん物質であっても, 膀胱を標的としないとされている物質の投与群では, γ -H2AX陽性細胞率は対照群と同等であり, 明らかな臓器特異性が認められた。また, マウスを用い

た28日間投与試験においても、膀胱粘膜上皮における γ -H2AX陽性細胞率は、マウスに対する遺伝毒性膀胱発がん物質投与によって有意な増加を示し、非膀胱発がん物質投与では有意な増加は見られなかった。特に、ラットでは膀胱発がん性を示すがマウスでは膀胱への発がん性を示さない2-NA投与群では、 γ -H2AX陽性細胞率の増加は見られず、種特異性を反映していると考えられた⁵²⁾。その後、疫学上、日本においても染料を使用する職業従事者に膀胱がんの発生が報告され⁵³⁾、その原因物質と考えられた芳香族アミン類についても検討を加えた (Fig. 1 A, B)。 γ -H2AXを指標とした膀胱発がん物質の早期検出について、これまでに合計100物質について解析を実施し、 γ -H2AX免疫染色によりラットを用いた28日間反復投与で膀胱発がん性を感度84.6% (33/39)、特異度95.1% (58/61) で評価可能であることを示した⁵⁴⁾。陽性を示した被験物質には遺伝毒性 (Ames陽性) 発がん物質のみならず、非遺伝毒性 (Ames陰性) 発がん物質も含まれ、遺伝毒性の有無に関わらず膀胱発がん物質を検出可能であった。

さらなる感度の向上を図るには偽陰性を補完するマーカーが必要と考えられたため、悪性形質の1つである幼若化 (脱分化) に注目し、尿路上皮の幹細胞マーカーである cytokeratin 14 (KRT14), aldehyde

dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1), 及びCD44について検討したところ、14種のラット膀胱発がん物質を投与した膀胱粘膜のうちそれぞれ9, 10, 10物質で発現増加及び局在異常が認められた⁵⁵⁾。特に、 γ -H2AX陽性細胞率の増加が見られなかった3物質のうち2物質において、これらの幹細胞マーカーの発現増加が認められたことから、 γ -H2AXを補完するマーカーとして有用であると考えられた。さらに、これらのマーカーはBBN投与による長期発がん過程においても、投与初期からがん化に至るまで一貫して発現増加が認められたことから、化学物質の暴露による一過性の影響ではなく、発がん過程に密接に関連している可能性が示された^{55, 56)}。

γ -H2AXの形成機序を考慮すると、すべての臓器で応用可能と考えられる。実際、ラットを用いた腎臓発がん物質の検討では、現在のところ感度84.6% (22/26物質) 及び特異度88.9% (8/9物質) と良好な結果が得られている (unpublished data)。一方、肝臓においても発がん物質の検出に有用であったが (Fig. 1 C, D), Ki67陽性率低値を示す細胞増殖を伴わない化合物において偽陰性を示す傾向が認められた⁵⁷⁾。これらについては、肝臓の幹細胞マーカーによる補完を検討中である⁵⁸⁾。いずれの臓器においても、 γ -H2AXと脱分化マーカーの適切な組み合わせによって感度及び特異度も高く、発がん性を早期

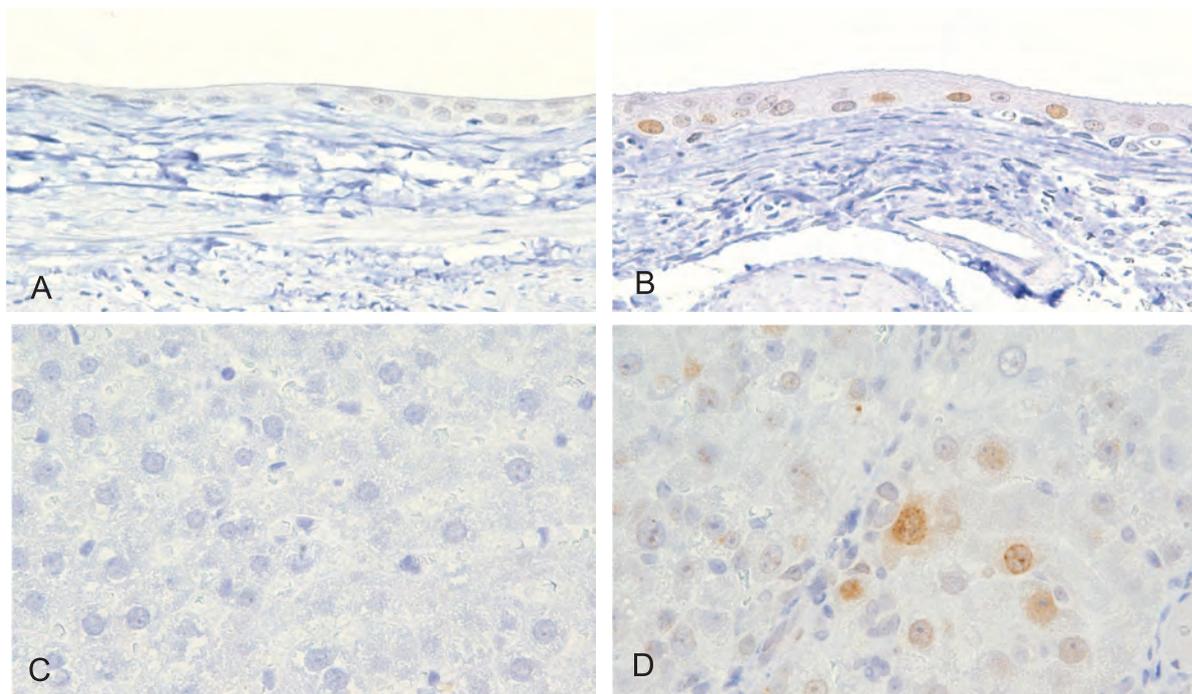


Fig. 1. Representative immunohistochemical staining with anti- γ -H2AX antibody in the urinary bladder (A, B) and liver (C, D) of male rats

A, C; non-treated control, B; 1% *o*-acetotoluidine in the basal diet for 4 weeks and D; 1000 ppm *N*-Ethyl-*N*-hydroxyethyl nitrosamine in drinking water for 4 weeks. γ -H2AX-positive fine dots are visible in the nuclei of the target cells in rats given carcinogen.

に評価できる可能性があり、WoE要素の1つとしての利用が期待される。一方で、全臓器において発がん性の懸念がないことの証明は、いずれかの臓器に懸念があることの証明より困難であり、用量相関性や閾値設定の考え方とともに更なる検討が必要と考えられる。

5. 病理組織標本を用いた抗甲状腺作用の評価の試み

近年、妊娠期の甲状腺機能低下が児の神経発達に悪影響を及ぼすとの報告がヒト及び実験動物で報告されている^{59,60}。妊娠期の特定の時期の変化が次世代に影響するという事実は、化学物質の長期暴露による毒性・発がん性の懸念のみならず、短期間暴露であっても重大な影響を及ぼすという点から、抗甲状腺物質のより厳密な評価が必要との機運が高まっている。OECDでは、2018年に既存のげっ歯類を用いた90日間反復経口投与毒性試験のテストガイドライン (TG408) を改訂し、チロキシシン (T4)、トリヨードチロニン (T3)、甲状腺刺激ホルモン (TSH) 及び甲状腺重量の測定並びに、血清総コレステロール、低比重リポ蛋白 (LDL) 及び高比重リポ蛋白 (HDL) も測定すべき評価項目に加えられた⁶¹。これらの項目は、28日間反復経口投与毒性試験 (TG407) においても実施が期待されているが、特に、T4、T3、TSHは感度や採取時のストレスなどによる測定値のばらつきが懸念されている⁶²。また、血清ホルモン定量には比較的多くの血液が必要となることから、特にマウスの場合には測定用に追加動物が必要となる可能性もある。加えて、すでに実施済みのホルモン定量データのない反復投与試験における抗甲状腺影響の精度についても懸念がもたれた。

そこで我々は、定型的なガイドラインに沿った試験で

得られる病理標本を用いたヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色による病理組織検査及び各種免疫組織化学染色評価で得られるデータの感度について、血清ホルモン値の感度との比較検討を実施している。具体的には、28日間反復経口投与毒性試験のプロトコールに沿ってさまざまな機序による抗甲状腺物質を3~5用量反復投与し、溶媒対照群と比較した。血清ホルモン値に加えて、甲状腺においては臓器重量、病理組織学的検討、T3、T4及びsodium/iodide symporter (NIS) の免疫組織化学染色による染色強度の解析、脳下垂体においては、臓器重量、病理組織学的検討、TSHの免疫組織化学染色による陽性細胞面積率の解析、さらに肝臓においては、臓器重量、病理組織学的検討、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1-6 (UGT1A6) の免疫組織化学染色による染色強度の解析を行い、いずれの項目がより高感度に抗甲状腺作用を検出可能か検討した。現在のところ、まだ限定的なデータではあるが、甲状腺の病理組織変化が概ね最も高感度であった。このことは、甲状腺の病理検査が適切に実施されている限りにおいては、既存試験での抗甲状腺影響は適切に評価されていると考えられることを示している。一方で、血清TSHの変動は脳下垂体のHE染色による病理組織観察のみからは判断できないが、免疫組織化学染色による下垂体のTSH陽性面積率 (Fig. 2) は被験物質に依らず血清TSHと有意に相関しており、有用なマーカーであることが示された。また、NIS及びUGT1A6の免疫組織化学的検討並びに肝重量データを加えることにより、抗甲状腺作用の有無の客観的傍証、機序の推定及びヒトへの外挿性の可否の判断が可能となることが示されつつある⁶³ (および unpublished data)。

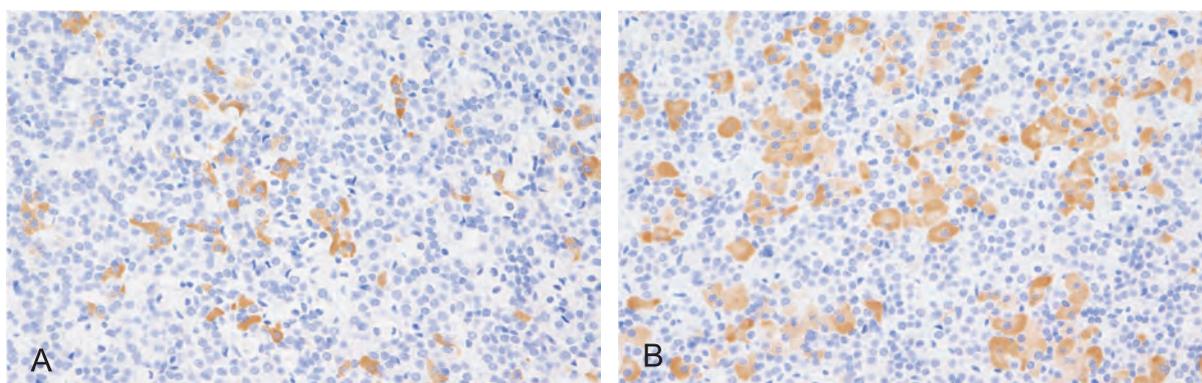


Fig. 2. Representative immunohistochemical staining with anti-thyroid stimulating hormone (TSH) antibody in the pituitary gland of non-treated control (A) and perchlorate-administered (B) male rats

It is evident that the inhibition of thyroid iodine uptake by perchlorate and the subsequent reduction in thyroid hormones increased TSH expression in the pituitary gland through a negative feedback mechanism. (increase in TSH-positive area by perchlorate)

6. 今後の毒性評価の展望

先に述べたように、我々は多くの化学物質に支えられて生活しており、その数は年々増加している。そのすべてについて、詳細な毒性データを求めることは現実的ではないが、環境・社会において広く利用される物質については、安全性の担保が必要と考えられる。そのためには、*in silico*, *in vitro*のスクリーニングの精度向上とともに*in vivo*試験についても、より短期間の、より少数の動物を用いた試験検体を活用し、WoE要素となるシグナル変化から毒性を予測する評価系が必要と考える。心毒性や神経毒性など、定型的な病理検査による形態学的変化の検討だけでは十分に評価できない毒性についても、機序を考慮した分子発現変動を標本上で検討することが可能になるかもしれない。動物実験において、分子生物学的解析用の凍結検体の追加採取は多くのマンパワーが必要となるうえ、甲状腺などの小器官の分割は困難であるが、ホルマリン固定標本を用いた追加の免疫組織化学染色は、染色の自動化や画像の機械学習技術の進化と相まって、評価の精緻化につながると考える。

同時に、生物は多種多様な細胞が繊細かつ複雑に相互に作用して成り立っていること、動物種を超えて共通する部分だけでなく酵素誘導能など個体差が大きい部分があることも理解しておく必要がある。その中で、レギュラトリーサイエンスとしては、最大公約数的データを用いた適切な評価が求められていると考える。また、喫緊の課題として、ヒトのみで認められる変化や既存の評価方法では見落とされる可能性の高い毒性についても検討が必要と考えられる。例えば、近年ヒトの死亡原因として増加している膵がん（膵膵がん）^{64, 65}は、げっ歯類ではほとんど発生しない。ヒトの膵がんの原因はほとんどわかっていないが、疫学的に喫煙^{65, 66}や過剰なアルコール摂取^{65, 67}がリスク因子として挙げられていることから、化学物質暴露の関与も否定できない。また、心筋梗塞や脳梗塞の原因となる動脈硬化についても、喫煙との関連が示唆されている⁶⁸ものの、げっ歯類やイスでは動脈硬化がほとんど起こらないこともあり、原因物質や修飾物質の検討が困難な状況にある。こうした、疫学研究の結果を実験動物で検証できていない毒性影響のリスク評価を可能とする評価系の確立も必要と考えられる。

7. 結語

毒性学の教科書として広く読まれているキャサレット & ドールのトキシコロジー (Casarett & Doull's Toxicology- The Basic Science of Poisons) は2019年に第9版として内容が刷新されたが、その中表紙には第7版 (2007年発行)、第8版 (2013年発行) に引き続きパラケルススの言葉が表題に添えられている。"What is

there that is not poison? All things are poison and nothing (is) without poison. Solely the dose determines that a thing is not a poison. Paracelsus (1493-1541)" 生物の生存に不可欠な酸素や水でさえ、過剰摂取では中毒となることから、毒性評価には、ハザードだけでなく、用量を考慮したリスク評価が必要であることが示されている。

ヒトの生活をより良いものとするための化学物質が危害を及ぼすものとならないように、我々の研究が少しでも役立つものに発展していくように期待している。

謝辞

本稿で紹介した内容は、平成8年度調査以降、既存添加物の安全性評価に関する研究調査に携わられた安全性生物試験研究センター、食品添加物部の先生方及び食品添加物協会はじめ関係企業の皆様、並びに厚生労働省科学研究補助金及びAMED補助金による研究事業の実施にご尽力いただいた皆様の多大なるご協力のもとで遂行されたものです。この場を借りて篤く御礼申し上げます。また、これまでの研究遂行におきまして、多くのご指導をいただきました歴代病理部長の故高橋道人先生、廣瀬雅雄先生及び西川秋佳先生並びに病理部現・元職員、研究生の皆様に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 久保道徳：薬学における過去の名著 - 欧州における薬学書 -。薬学図書館 1999;44:149-54. doi: 10.11291/jpla1956.43.435
- 2) Borzelleca JF: Paracelsus: Herald of Modern toxicology. *Toxicol Sci.* 2000;53:2-4. doi: 10.1093/toxsci/53.1.2
- 3) 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令 (平成九年厚生省令第二十一号). https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=81997378&dataType=0&pageNo=1
- 4) 医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス (薬食審査発0219第4号:平成22年2月19日). https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tb5874&dataType=1&pageNo=1
- 5) Niho N, Tamura T, Toyoda K, Uneyama C, Shibutani M, Hirose M: A 13-week subchronic toxicity study of chitin in F344 rats. *Bull Natl Inst Health Sci.* 1999;117:129-34. Japanese.
- 6) Yun L, Onodera H, Takagi H, Koujitani T, Yasuhara K, Mitsumori K, Hirose M: A 13-week subchronic oral toxicity study of Perilla extracts in

- F344 rats. *Bull Natl Inst Health Sci.* 1999;117:104-7. Japanese.
- 7) Nakamura H, Furukawa F, Nishikawa A, Miyauchi M, Son HY, Imazawa T, Hirose M: Oral toxicity of a tocotrienol preparation in rats. *Food Chem Toxicol.* 2001;39:799-805. doi: 10.1016/s0278-6915(01)00025-4
- 8) Niho N, Shibutani M, Tamura T, Toyoda K, Uneyama C, Takahashi N, Hirose M: Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2001; 39:1063-70. doi: 10.1016/s0278-6915(01)00054-0
- 9) Kanki K, Nishikawa A, Furukawa F, Kitamura Y, Imazawa T, Umemura T, Hirose M: A 13-week subchronic toxicity study of paprika color in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2003;41:1337-43. doi: 10.1016/s0278-6915(03)00136-4
- 10) Kitamura Y, Nishikawa A, Furukawa F, Nakamura H, Okazaki K, Umemura T, Imazawa T, Hirose M: A subchronic toxicity study of shea nut color in Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2003;41:1537-42. doi: 10.1016/s0278-6915(03)00170-4
- 11) Hasumura M, Yasuhara K, Tamura T, Imai T, Mitsumori K, Hirose M: Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-weeks dietary administration to Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2004;42:439-44. doi: 10.1016/j.fct.2003.10.006
- 12) Kuroiwa Y, Nishikawa A, Imazawa T, Kitamura Y, Kanki K, Ishii Y, Umemura T, Hirose M. A subchronic toxicity study of dunaliella carotene in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:138-45. doi: 10.1016/j.fct.2005.06.010
- 13) Cho YM, Onodera H, Ueda M, Imai T, Hirose M: A 13-week subchronic toxicity study of dietary administered morin in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:891-7. doi: 10.1016/j.fct.2005.12.002
- 14) Kuroiwa K, Shibutani M, Inoue K, Lee KY, Woo GH, Hirose M: Subchronic toxicity study of water pepper extract in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:1236-44. doi: 10.1016/j.fct.2006.01.020
- 15) Takami S, Imai T, Hasumura M, Cho YM, Onose J, Hirose M: Evaluation of toxicity of green tea catechins with 90-day dietary administration to F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:2224-9. doi: 10.1016/j.fct.2008.02.023
- 16) Tasaki M, Umemura T, Maeda M, Ishii Y, Okamura T, Inoue T, Kuroiwa Y, Hirose M, Nishikawa A: Safety assessment of ellagic acid, a food additive, in a subchronic toxicity study using F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:1119-24. doi: 10.1016/j.fct.2007.10.043
- 17) Inoue K, Shibutani M, Masutomi N, Toyoda K, Takagi H, Uneyama C, Nishikawa A, Hirose M: A 13-week subchronic toxicity study of madder color in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:241-52. doi: 10.1016/j.fct.2007.08.002
- 18) Takami S, Imai T, Hasumura M, Cho YM, Onose J, Hirose M: Evaluation of toxicity of green tea catechins with 90-day dietary administration to F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:2224-9. doi: 10.1016/j.fct.2008.02.023
- 19) Cho YM, Imai T, Ito Y, Takami S, Hasumura M, Yamazaki T, Hirose M, Nishikawa A: A 13-week subchronic toxicity study of dietary administered saponin-rich and isoflavones-containing soybean extract in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2009;47:2150-6. doi: 10.1016/j.fct.2009.06.001
- 20) Cho YM, Hasumura M, Takami S, Imai T, Hirose M, Ogawa K, Nishikawa A: A 13-week subchronic toxicity study of hinokitiol administered in the diet to F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2011;49:1782-6. doi: 10.1016/j.fct.2011.04.027
- 21) Hasumura M, Imai T, Cho YM, Ueda M, Hirose M, Nishikawa A, Ogawa K: Toxic effects of a horseradish extract and allyl isothiocyanate in the urinary bladder after 13-week administration in drinking water to F344 rats. *J Toxicol Sci.* 2011;36:763-74. doi: 10.2131/jts.36.763
- 22) Inoue K, Morikawa T, Takahashi M, Yoshida M, Ogawa K: A 13-week subchronic toxicity study of grape skin extract in F344 rats. *J Toxicol Sci.* 2013;38:559-70. doi: 10.2131/jts.38.559
- 23) Toyoda T, Takami S, Imai T, Cho YM, Hasumura M, Mizuta Y, Onami S, Suzuki I, Hirose M, Nishikawa A, Ogawa K: A 13-week subchronic toxicity study of garden balsam extract in F344 rats. *Jpn J Food Chem Safety.* 2013;20:52-60. doi: 10.18891/jjfc.20.1_52
- 24) Toyoda T, Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Ogawa K: A 13-week subchronic toxicity study of ferric citrate in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2014;74:68-75. doi: 10.1016/j.fct.2014.09.005
- 25) Toyoda T, Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Nishikawa A, Ogawa K: A 13-week subchronic toxicity study

- of sodium iron chlorophyllin in F344 rats. *J Toxicol Sci.* 2014;39:109-19. doi: 10.2131/jts.39.109
- 26) Mitsumoto T, Ishii Y, Namiki M, Nakamura K, Takasu S, Ogawa K: A 90-day subchronic toxicity study of Myrrh in F344 rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2021;127:105076. doi: 10.1016/j.yrtph.2021.105076
- 27) Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K: A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats. *Food Chem Toxicol.* 2023;175:113702. doi: 10.1016/j.fct.2023.113702
- 28) Inoue K, Shibutani M, Masutomi N, Toyoda K, Takagi H, Takahashi M, Fujimoto H, Hirose M, Nishikawa A: One-year chronic toxicity of madder color in F344 rats - Induction of preneoplastic/neoplastic lesions in the kidney and liver. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:3303-10. doi: 10.1016/j.fct.2008.07.025
- 29) Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, Fujimoto H, Shibutani M, Hirose M, Nishikawa A: Carcinogenic potential of alizarin and rubiadin, components of madder color, in a rat medium-term multi-organ bioassay. *Cancer Sci.* 2009;100:2261-7. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01342.x
- 30) Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, Shibutani M, Takagi H, Hirose M, Nishikawa A: Induction of kidney and liver cancers by the natural food additive madder color in a two-year rat carcinogenicity study. *Food Chem Toxicol.* 2009;47:184-91. doi: 10.1016/j.fct.2008.10.031
- 31) 既存添加物の安全性評価の見直しに関する調査研究. https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuten/kizon/index.html
- 32) 食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針(別添). <https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syokuten/960322/betu.html>
- 33) 経済産業省製造産業局 化学物質管理課化学物質安全室: 化審法の施工状況(令和5年度). (令和6年6月21日) https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/information/sekou_R5_240621.pdf
- 34) 労働安全衛生法(昭和四十七年六月八日, 法律第五十七号) https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=74001000&dataType=0&pageNo=1
- 35) Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, Abiona OM, Boyoglu-Barnum S, Gillespie RA, Himansu S, Schäfer A, Ziwawo CT, DiPiazza AT, Dinnon KH, Elbashir SM, Shaw CA, Woods A, Fritch EJ, Martinez DR, Bock KW, Minai M, Nagata BM, Hutchinson GB, Wu K, Henry C, Bahl K, Garcia-Dominguez D, Ma LZ, Renzi I, Kong WP, Schmidt SD, Wang L, Zhang Y, Phung E, Chang LA, Loomis RJ, Altaras NE, Narayanan E, Metkar M, Presnyak V, Liu C, Louder MK, Shi W, Leung K, Yang ES, West A, Gully KL, Stevens LJ, Wang N, Wrapp D, Doria-Rose, NA, Stewart-Jones, G, Bennett H, Alvarado GS, Nason MC, Ruckwardt TJ, McLellan JS, Denison MR, Chappell JD, Moore IN, Morabito, KM, Mascola JR, Baric RS, Carfi A, Graham BS: SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature.* 2020;586(7830):567-71. doi: 10.1038/s41586-020-2622-0
- 36) Jain S, Batra H, Yadav P, Chand S: COVID-19 vaccines currently under preclinical and clinical studies, and associated antiviral immune response. *Vaccines (Basel).* 2020;8:649. doi: 10.3390/vaccines8040649
- 37) Liu J, Budyłowski P, Samson R, Griffin BD, Babuadze G, Rathod B, Colwill K, Abioye JA, Schwartz JA, Law R, Yip L, Ahn SK, Chau S, Naghibosadat M, Arita Y, Hu Q, Yue FY, Banerjee A, Hardy WR, Mossman K, Mubareka S, Kozak RA, Pollanen MS, Martin ON, Gingras AC, Marcusson EG, Ostrowski MA: Preclinical evaluation of a SARS-CoV-2 mRNA vaccine PTX-COVID19-B. *Sci Adv.* 2022;8:eabj9815. doi: 10.1126/sciadv.abj9815
- 38) Sistare FD, Morton D, Alden C, Christensen J, Keller D, Jonghe SD, Storer RD, Reddy MV, Kraynak A, Trela B, Bienvenu JG, Bjurström S, Bosmans V, Brewster D, Colman K, Dominick M, Evans J, Hailey JR, Kinter L, Liu M, Mahrt C, Marien D, Myer J, Perry R, Potenta D, Roth A, Sherratt P, Singer T, Slim R, Soper K, Fransson-Steen R, Stoltz J, Turner O, Turnquist S, van Heerden M, Woicke J, DeGeorge JJ: An analysis of pharmaceutical experience with decades of rat carcinogenicity testing: support for a proposal to modify current regulatory guidelines. *Toxicol Pathol.* 2011;39:716-44. doi: 10.1177/0192623311406935
- 39) 厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課: 医薬品の

- がん原性試験に関するガイダンスの改正に係る前向き評価への参加協力依頼の改訂について (協力依頼) 事務連絡 (平成28年2月17日) <https://www.pmda.go.jp/files/000210004.pdf>
- 40) Bourcier T, McGovern T, Cavaliero T, Ebere G, Nishikawa A, Nishimura J, Ogawa K, Pasanen M, Vespa A, Van der Laan JW: ICH S1 prospective evaluation study: weight of evidence approach to predict outcome and value of 2-year rat carcinogenicity studies. A report from the regulatory authorities subgroup. *Front Toxicol.* 2024;6:1353783. doi: 10.3389/ftox.2024.1353783
- 41) 西村次平, 小川久美子, 西川秋佳: 医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改定の概要: ICH S1B (R1) ガイドライン. *レギュラトリーサイエンス学会誌.* 2024;14:237-47. doi: 10.14982/rsmp.14.237
- 42) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長: 医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改正について (薬生薬審発0310第1号: 令和5年3月10日) <https://www.pmda.go.jp/files/000251332.pdf>
- 43) OECD (2018), *Test No. 451: Carcinogenicity Studies*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. doi: 10.1787/9789264071186-en.
- 44) OECD (2014), *Guidance Document 116 on the Conduct and Design of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453: Second edition*, OECD Series on Testing and Assessment, No. 116, OECD Publishing, Paris. doi: 10.1787/9789264221475-en.
- 45) Burgess S: Sample size and power calculations in Mendelian randomization with a single instrumental variable and a binary outcome. *Int J Epidemiol.* 2014;43:922-9. doi: 10.1093/ije/dyu005
- 46) OECD (2024), *Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. doi: 10.1787/9789264090996-en.
- 47) Toyoda T, Akagi J, Cho YM, Mizuta Y, Onami S, Suzuki I, Ogawa K: Detection of γ -H2AX, a Biomarker for DNA Double-strand Breaks, in Urinary Bladders of N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl)-Nitrosamine-Treated Rats. *J Toxicol Pathol.* 2013;26:215-21. doi: 10.1293/tox.26.215
- 48) Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM: DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 1998;273:5858-68. doi: 10.1074/jbc.273.10.5858
- 49) Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM: Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J Cell Biol.* 1999;146:905-16. doi: 10.1083/jcb.146.5.905
- 50) Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y: GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:957-67. doi: 10.1038/nrc2523
- 51) Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Hirata T, Nishikawa A, Ogawa K: Early Detection of Genotoxic Urinary Bladder Carcinogens by Immunohistochemistry for γ -H2AX. *Toxicol Sci.* 2015;148:400-8. doi: 10.1093/toxsci/kfv192
- 52) Sone M, Toyoda T, Cho YM, Akagi JI, Matsushita K, Mizuta Y, Morikawa T, Nishikawa A, Ogawa K: Immunohistochemistry of γ -H2AX as a method of early detection of urinary bladder carcinogenicity in mice. *J Appl Toxicol.* 2019;39:868-76. doi: 10.1002/jat.3775
- 53) Nakano M, Omae K, Takebayashi T, Tanaka S, Koda S: An epidemic of bladder cancer: ten cases of bladder cancer in male Japanese workers exposed to ortho-toluidine. *J Occup Health.* 2018;60:307-11. doi: 10.1539/joh.2017-0220-OA
- 54) Toyoda T, Ogawa K: Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX: a review from analyses of 100 chemicals. *J Toxicol Pathol.* 2022;35:283-98. doi: 10.1293/tox.2022-0061
- 55) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Cho YM, Akagi JI, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K: Expression of stem cell markers as useful complementary factors in the early detection of urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for γ -H2AX. *Arch Toxicol.* 2021;95:715-726. doi: 10.1007/s00204-020-02950-9
- 56) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Cho YM, Ogawa K: Persistent γ -H2AX Formation and Expression of Stem Cell Markers in N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl) Nitrosamine-Induced Bladder Carcinogenesis in Rats. *Toxicol Sci.* 2022;189:51-61. doi: 10.1093/toxsci/kfac064
- 57) Toyoda T, Sone M, Matsushita K, Akane H, Akagi

- JI, Morikawa T, Mizuta Y, Cho YM, Ogawa K: Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of γ -H2AX. *J Toxicol Sci.* 2023;48:323-32. doi: 10.2131/jts.48.323
- 58) Akagi JI, Cho YM, Toyoda T, Mizuta Y, Ogawa K: EpCAM and APN expression in combination with γ -H2AX as biomarkers for detecting hepatocarcinogens in rats. *Cancer Sci.* 2023;114:4763-69. doi: 10.1111/cas.15990
- 59) Korevaar TI, Muetzel R, Medici M, Chaker L, Jaddoe VW, de Rijke YB, Steegers EA, Visser TJ, White T, Tiemeier H, Peeters RP: Association of maternal thyroid function during early pregnancy with offspring IQ and brain morphology in childhood: a population-based prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4:35-43. doi: 10.1016/S2213-8587(15)00327-7
- 60) Gilbert ME, Hassan I, Wood C, O'Shaughnessy KL, Spring S, Thomas S, Ford J: Gestational exposure to perchlorate in the rat: Thyroid hormones in fetal thyroid gland, serum, and brain. *Toxicol Sci.* 2022;188:117-30. doi: 10.1093/toxsci/kfac038
- 61) OECD (2018), *Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. doi: 10.1787/9789264070707-en.
- 62) Helmreich DL, Tylee D: Thyroid hormone regulation by stress and behavioral differences in adult male rats. *Horm Behav.* 2011;60:284-91. doi: 10.1016/j.yhbeh.2011.06.003
- 63) Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K: Comparison of the sensitivity of histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors. *J Appl Toxicol.* 2024;44:1084-103. doi: 10.1002/jat.4604
- 64) 公益財団法人 がん研究振興財団: がんの統計 2022 -Cancer statistics in Japan 2022. 20. 部位別がん死亡数年次推移 (1965~2020年) https://ganjoho.jp/public/qa_links/report/statistics/pdf/cancer_statistics_2022_fig_J.pdf
- 65) Klein AP: Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18:493-502. doi: 10.1038/s41575-021-00457-x
- 66) Parkin DM, Boyd L, Walker LC: 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Br J Cancer.* 2011;105 Suppl 2:S77-81. doi: 10.1038/bjc.2011.489
- 67) Tanaka H: Advances in cancer epidemiology in Japan. *Int J Cancer.* 2013;134:747-54. doi: 10.1002/ijc.28519
- 68) Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, Tokgözoğlu L, Lewis EF: Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5:56. doi: 10.1038/s41572-019-0106-z