

層が部分的に不連続となり、包皮と癒着している例があった。その他、精巣や副生殖器に相対重量の低値がみられたこれらの群では、いずれの器官も萎縮性であったが顕著な変化は認められなかった。

#### D. 考察

化学物質の曝露時期と包皮分離に対する影響は、それぞれの化学物質により異なった。抗アンドロゲン剤の FLU および VZ では PND 35 からの性成熟直前の曝露で包皮分離に遅延がみられたが PND 1 からの出生直後の曝露では包皮分離に影響が見られなかった。一方、EE および TAM では出生直後からの曝露で顕著な影響が認められ、多くの例が PND 56 の解剖時でも包皮分離は完了しなかったが、離乳直前および性成熟直前の曝露では明らかな変化はなかった。これらの化学物質とは異なり、DES 曝露による包皮分離の遅延は新生児でも性成熟直前でも認められた。出生直後の曝露で影響が明らかであった化学物質でも、離乳期に近づくと影響が少ないことから、新生児曝露として影響が期待できるのは出生から離乳までの前半の時期であると考えられる。一方、使用した抗アンドロゲン剤では、今回は PND 35 から 5 日間の投与であったが、さらに長期間投与を続けると、より低用量から影響を検出できると思われる。

器官重量については、FLU では包皮分離に対する影響が見られた群で前立腺や精囊の萎縮がみられたが、VZ では影響は明らかではなかった。EE および TAM の PND 1-5 の曝露では副生殖器だけでなく精巣も小型化し、解剖時の体重も低値を示した。体重増加の抑制は包皮分離時期に影響を及ぼすと考えられるが、これら新生児期曝露で包皮分離に遅延がみられた群の包皮分離完了時の体重はいずれ

も高値を示していることから、これらの群の包皮分離の遅延は体重増加抑制だけではなく化学物質の包皮分離に対する影響も関与していると思われる。

#### E. 結論

抗アンドロゲン剤の FLU、DDE および VZ による包皮分離遅延は性成熟直前の曝露で明らかであり、エストロゲン剤の EE あるいは TAM では新生児曝露により体重増加抑制および生殖器成長抑制とともに包皮分離を遅延させた。DES では新生児および性成熟直前のいずれの曝露でも包皮分離を遅延させた。これらのことから、包皮分離試験を用いた内分泌かく乱化学物質の検出のためには、新生児期、特に出生から離乳までの時期の前半に投与する試験と、性成熟直前から連続して投与する試験の 2 種の試験が必要であると考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

雑誌

Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K. and Ono, H.: Reproductive effects in male and female rats from neonatal exposure to p-octylphenol. *Reproductive Toxicology* 15: 683-692 (2001)

Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K., Ono, H.: Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reproductive Toxicology* 15: 399-411 (2001)

表 1 新生児期に化学物質を曝露した雄ラットの包皮分離完了時期

被験物質	曝露時期	群	例数	腹数	分離完了時日齢	分離完了時体重(g)	未完例
FLU							
PND 1-5	Control		16	4	44.4 ± 2.4	268.4 ± 21.2	0
	1 mg/kg		16	4	42.7 ± 2.3	246.5 ± 22.4	0
	10 mg/kg		16	4	42.8 ± 2.1	257.6 ± 21.4	0
	30 mg/kg		15	4	44.0 ± 2.0	252.7 ± 27.9	0
PND 17-21	Control		12	3	44.3 ± 1.4	258.3 ± 19.0	0
	1 mg/kg		12	3	45.0 ± 3.2	256.7 ± 29.7	0
	10 mg/kg		12	3	43.2 ± 2.0	250.6 ± 23.5	0
	30 mg/kg		12	3	43.6 ± 2.5	256.5 ± 28.9	0
PND 35-39	Control		16	4	43.5 ± 1.7	253.1 ± 18.6	0
	1 mg/kg		16	4	44.6 ± 1.4	272.2 ± 20.4	0
	10 mg/kg		15	4	46.8 ± 2.0 **	287.9 ± 19.6 **	0
	30 mg/kg		16	4	47.1 ± 2.2 **	294.5 ± 30.0 **	0
VZ							
PND 1-5	Control		16	4	41.9 ± 1.5	244.3 ± 16.3	0
	10 mg/kg		12	3	42.8 ± 1.4	253.7 ± 24.9	0
	30 mg/kg		15	4	42.3 ± 1.7	251.2 ± 19.2	0
	100 mg/kg		16	4	41.6 ± 1.0	242.4 ± 15.9	0
PND 17-21	Control		16	4	44.6 ± 2.2	249.3 ± 19.6	0
	10 mg/kg		16	4	44.1 ± 1.8	253.6 ± 13.4	0
	30 mg/kg		16	4	43.8 ± 1.8	257.7 ± 19.2	0
	100 mg/kg		16	4	42.6 ± 1.2 **	242.2 ± 16.1	0
PND 35-39	Control		16	4	43.6 ± 2.0	248.0 ± 14.2	0
	10 mg/kg		12	3	43.9 ± 1.4	256.4 ± 18.7	0
	30 mg/kg		12	3	46.8 ± 1.4 **	267.4 ± 29.0	0
	100 mg/kg		12	3	45.5 ± 1.7 *	261.5 ± 17.9	0
DES							
PND 1-5	Control		16	4	44.4 ± 2.5	259.5 ± 30.4	0
	10 µg/kg		16	4	44.9 ± 1.5	261.4 ± 27.5	0
	100 µg/kg		16	4	48.9 ± 4.0 **	311.8 ± 46.0 **	2
	300 µg/kg		16	4	49.9 ± 3.9 **	288.0 ± 39.8	3
PND 17-21	Control		15	4	44.5 ± 2.1	241.2 ± 21.7	0
	10 µg/kg		12	3	46.3 ± 2.3	250.4 ± 19.9	0
	100 µg/kg		16	4	44.8 ± 1.1	243.3 ± 15.3	0
	300 µg/kg		16	4	45.4 ± 2.0	253.1 ± 22.2	0
PND 35-39	Control		16	4	44.4 ± 2.2	251.6 ± 24.6	0
	10 µg/kg		12	3	43.9 ± 1.6	240.8 ± 32.5	0
	100 µg/kg		16	4	46.3 ± 2.4 *	243.3 ± 19.8	0
	300 µg/kg		16	4	48.7 ± 2.6 **	267.5 ± 34.0	0
EE							
PND 1-5	Control		16	4	43.3 ± 1.6	267.5 ± 17.4	0
	10 µg/kg		12	3	47.9 ± 4.6 *	282.7 ± 39.3	1
	100 µg/kg		12	3	56.4 ± 1.5 **	366.8 ± 16.3 **	10
PND 17-21	Control		12	3	44.0 ± 1.1	243.7 ± 23.7	0
	10 µg/kg		8	2	43.8 ± 1.9	239.4 ± 18.8	0
	100 µg/kg		12	3	43.8 ± 1.7	252.7 ± 13.0	0
PND 35-39	Control		16	4	44.3 ± 1.1	251.7 ± 22.5	0
	10 µg/kg		16	4	43.4 ± 1.9	240.0 ± 22.6	0
	100 µg/kg		16	4	45.9 ± 2.2	254.0 ± 28.3	0
TAM							
PND 1-5	Control		16	4	43.3 ± 1.6	267.5 ± 17.4	0
	0.3 mg/kg		16	4	46.1 ± 4.6	276.8 ± 54.0	2
	1 mg/kg		16	4	49.8 ± 5.0 **	291.3 ± 50.2	5
	3 mg/kg		15	4	55.7 ± 1.0 **	325.2 ± 29.6 **	13
PND 17-21	Control		16	4	44.6 ± 2.2	249.3 ± 19.6	0
	0.3 mg/kg		11	3	43.2 ± 2.0	243.3 ± 25.6	0
	1 mg/kg		15	4	43.7 ± 3.2	243.2 ± 27.3	0
	3 mg/kg		12	3	43.7 ± 2.3	246.5 ± 17.8	0
PND 35-39	Control		16	4	43.6 ± 2.0	248.0 ± 14.2	0
	0.3 mg/kg		12	3	45.2 ± 2.1	246.0 ± 29.7	0
	1 mg/kg		12	3	44.5 ± 3.2	235.4 ± 26.3	0
	3 mg/kg		12	3	44.6 ± 1.6	231.6 ± 14.2	0

PND, 日齢; \*, p<0.05; \*\*, p<0.01

表 2 新生児期に化学物質を曝露した雄ラットの器官相対重量

化学物質 曝露時期	群	例数	腹数	解剖時体重(g)	精巢(mg/g)	精巢上体(mg/g)	前立腺(mg/g)	精囊(mg/g)
<b>FLU</b>								
1-5	Control	15	4	383.1 ± 242	7,294 ± 0.799	1,397 ± 0.105	1,014 ± 0.170	1,986 ± 0.304
	1 mg/kg	16	4	378.1 ± 21.8	7,536 ± 0.528	1,511 ± 0.130	0.986 ± 0.194	1,895 ± 0.255
	10 mg/kg	16	4	388.8 ± 34.8	7,441 ± 0.751	1,443 ± 0.111	0.998 ± 0.146	1,774 ± 0.249
	30 mg/kg	15	4	371.0 ± 27.8	7,574 ± 0.684	1,431 ± 0.107	1,049 ± 0.112	1,801 ± 0.276
17-21	Control	12	3	376.2 ± 15.8	7,446 ± 0.542	1,438 ± 0.124	0.989 ± 0.124	1,758 ± 0.292
	1 mg/kg	11	3	369.1 ± 21.3	7,388 ± 0.609	1,511 ± 0.205	1,016 ± 0.132	1,862 ± 0.307
	10 mg/kg	12	3	372.1 ± 27.8	7,508 ± 0.590	1,451 ± 0.084	0.951 ± 0.185	1,918 ± 0.170
	30 mg/kg	12	3	376.4 ± 20.4	7,707 ± 0.428	1,484 ± 0.100	1,043 ± 0.127	1,923 ± 0.388
35-39	Control	16	4	377.3 ± 33.2	7,654 ± 0.377	1,520 ± 0.067	1,068 ± 0.094	2,065 ± 0.238
	1 mg/kg	16	4	382.8 ± 26.3	8,108 ± 0.811	1,603 ± 0.165	1,097 ± 0.172	2,108 ± 0.301
	10 mg/kg	15	4	378.4 ± 26.7	7,778 ± 0.859	1,411 ± 0.139	1,053 ± 0.192	1,755 ± 0.324*
	30 mg/kg	16	4	381.1 ± 22.1	7,951 ± 0.487	1,398 ± 0.114*	0.866 ± 0.154*	1,788 ± 0.266*
<b>VZ</b>								
1-5	Control	15	4	368.9 ± 30.7	7,917 ± 1.053	1,590 ± 0.158	1,039 ± 0.153	2,168 ± 0.277
	10 mg/kg	16	3	380.8 ± 31.8	7,233 ± 0.666	1,436 ± 0.120*	0.958 ± 0.163	1,982 ± 0.220
	30 mg/kg	15	4	379.6 ± 16.8	8,020 ± 0.761	1,505 ± 0.136	0.917 ± 0.130	2,048 ± 0.302
	100 mg/kg	15	4	376.3 ± 24.8	7,361 ± 1.030	1,589 ± 0.134	1,025 ± 0.187	2,115 ± 0.195
17-21	Control	16	4	357.5 ± 28.1	7,791 ± 0.655	1,432 ± 0.086	0.967 ± 0.133	1,903 ± 0.317
	10 mg/kg	16	4	366.8 ± 24.6	7,981 ± 0.658	1,562 ± 0.126	0.987 ± 0.101	2,041 ± 0.302
	30 mg/kg	16	4	378.3 ± 26.0	7,629 ± 0.831	1,550 ± 0.182	0.891 ± 0.117	1,931 ± 0.287
	100 mg/kg	15	4	373.2 ± 30.3	8,056 ± 0.710	1,527 ± 0.146	1,022 ± 0.156	2,117 ± 0.277
35-39	Control	16	4	368.8 ± 25.8	7,711 ± 0.746	1,502 ± 0.098	0.885 ± 0.153	1,752 ± 0.190
	10 mg/kg	12	3	373.3 ± 35.7	7,420 ± 0.647	1,572 ± 0.122	0.910 ± 0.100	1,911 ± 0.231
	30 mg/kg	12	3	361.7 ± 31.7	8,125 ± 0.562	1,546 ± 0.076	0.982 ± 0.114	1,885 ± 0.154
	100 mg/kg	12	3	363.1 ± 14.2	7,719 ± 0.393	1,508 ± 0.134	0.941 ± 0.132	1,907 ± 0.203
<b>DES</b>								
1-5	Control	16	4	367.5 ± 31.8	8,089 ± 0.914	1,560 ± 0.174	1,064 ± 0.155	1,948 ± 0.262
	10 µg/kg	16	4	365.7 ± 26.6	7,296 ± 0.829	1,391 ± 0.152*	0.917 ± 0.167*	1,870 ± 0.390
	100 µg/kg	16	4	383.6 ± 23.0	8,277 ± 2.095	1,431 ± 0.127	0.769 ± 0.129**	1,668 ± 0.527
	300 µg/kg	15	4	343.0 ± 38.6	7,893 ± 2.723	1,569 ± 0.271	0.835 ± 0.120**	1,321 ± 0.232**
17-21	Control	15	4	340.4 ± 35.0	7,783 ± 0.497	1,566 ± 0.156	0.927 ± 0.097	1,962 ± 0.353
	10 µg/kg	12	3	337.2 ± 26.7	7,906 ± 0.674	1,432 ± 0.106*	0.922 ± 0.132	1,781 ± 0.209
	100 µg/kg	16	4	348.9 ± 24.8	6,940 ± 0.743**	1,455 ± 0.118	0.900 ± 0.109	1,939 ± 0.283
	300 µg/kg	16	4	352.8 ± 20.5	7,309 ± 0.846	1,417 ± 0.121**	0.933 ± 0.117	1,935 ± 0.346
35-39	Control	15	4	360.3 ± 36.2	7,793 ± 0.609	1,539 ± 0.168	1,052 ± 0.194	2,299 ± 0.488
	10 µg/kg	12	3	344.9 ± 39.7	7,472 ± 0.686	1,588 ± 0.155	1,035 ± 0.140	1,963 ± 0.240
	100 µg/kg	16	4	330.4 ± 26.3	7,920 ± 0.736	1,556 ± 0.089	0.997 ± 0.193	1,910 ± 0.351
	300 µg/kg	16	4	336.5 ± 36.5	7,986 ± 0.777	1,611 ± 0.153	0.970 ± 0.134	2,017 ± 0.260
<b>EE</b>								
1-5	Control	16	4	391.7 ± 17.3	7,908 ± 0.437	1,533 ± 0.131	1,024 ± 0.128	1,947 ± 0.269
	10 µg/kg	12	3	367.0 ± 22.9*	7,681 ± 0.690	1,477 ± 0.103	0.850 ± 0.110**	1,548 ± 0.270**
	100 µg/kg	10	3	372.7 ± 15.4*	6,919 ± 0.402**	1,387 ± 0.149*	0.882 ± 0.114**	1,223 ± 0.166**
17-21	Control	12	3	353.9 ± 32.3	7,154 ± 0.561	1,456 ± 0.126	0.908 ± 0.147	1,978 ± 0.207
	10 µg/kg	8	2	357.0 ± 27.4	7,201 ± 0.538	1,366 ± 0.101	1,013 ± 0.149	1,875 ± 0.277
	100 µg/kg	12	3	373.1 ± 23.1	6,980 ± 0.530	1,521 ± 0.101	1,053 ± 0.187	2,118 ± 0.245
35-39	Control	16	4	357.4 ± 29.4	7,766 ± 0.783	1,567 ± 0.118	1,078 ± 0.196	1,954 ± 0.286
	10 µg/kg	16	4	353.6 ± 17.8	7,586 ± 0.738	1,569 ± 0.149	0.980 ± 0.147	1,910 ± 0.347
	100 µg/kg	16	4	347.1 ± 31.1	7,637 ± 0.870	1,517 ± 0.144	0.936 ± 0.123*	1,783 ± 0.267
<b>TAM</b>								
1-5	Control	16	4	391.7 ± 17.3	7,908 ± 0.437	1,533 ± 0.131	1,024 ± 0.128	1,947 ± 0.269
	0.3 mg/kg	16	4	368.7 ± 27.9*	7,153 ± 0.772	1,498 ± 0.115	0.813 ± 0.161**	1,625 ± 0.352*
	1 mg/kg	16	4	356.4 ± 28.8*	6,756 ± 1.135*	1,454 ± 0.219	0.790 ± 0.181**	1,601 ± 0.403*
	3 mg/kg	15	4	327.9 ± 29.0**	5,043 ± 0.550**	1,162 ± 0.114*	0.606 ± 0.124**	1,218 ± 0.371**
17-21	Control	16	4	357.5 ± 28.1	7,791 ± 0.655	1,432 ± 0.086	0.967 ± 0.133	1,903 ± 0.317
	0.3 mg/kg	11	3	364.5 ± 29.6	7,768 ± 0.452	1,530 ± 0.189	0.950 ± 0.196	1,936 ± 0.244
	1 mg/kg	15	4	354.0 ± 31.8	7,913 ± 0.812	1,530 ± 0.126	0.945 ± 0.243	1,873 ± 0.236
	3 mg/kg	12	3	363.5 ± 21.1	7,457 ± 0.901	1,516 ± 0.121	0.927 ± 0.212	2,060 ± 0.374
35-39	Control	16	4	368.8 ± 25.8	7,711 ± 0.746	1,502 ± 0.098	0.885 ± 0.153	1,752 ± 0.190
	0.3 mg/kg	12	3	348.8 ± 37.5	7,357 ± 0.457	1,548 ± 0.095	0.900 ± 0.102	1,733 ± 0.173
	1 mg/kg	12	3	348.8 ± 42.4	8,189 ± 0.787	1,581 ± 0.134	0.959 ± 0.141	1,909 ± 0.291
	3 mg/kg	12	3	339.8 ± 16.1*	8,159 ± 0.596	1,626 ± 0.134*	0.934 ± 0.139	1,866 ± 0.194

曝露時期, 日齢; \*, p<0.05; \*\*, p<0.01

## 10. 28日間試験の改良— $\alpha_{2u}$ グロブリン評価の利用について—

分担研究者 武吉正博、宮浦英樹

財団法人 化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所 課長

**研究要旨** 3次元培養ラット肝細胞 (TestLiver) を用いて $\alpha_{2u}$ グロブリン (AUG) 産生下における $17\beta$ -Estradiol (E2)及びClofibrateによる発現量変動遺伝子探索をアジレント社製cDNA microarrayを用いて検討した。E2  $10^{-10}$  M及びClofibrate  $10^{-6}$  Mで24時間培養した場合、いずれも培養上清中のAUGタンパク質は明らかな変動は示さなかったが、細胞中のmRNAレベルでは有意に減少していた。また、昨年の研究でAUGの発現との関連が示唆されたrat senescence marker protein 2 (SMP-2)はE2、Clofibrateの暴露でいずれも誘導が確認され、両化合物は同様のメカニズムでAUG産生を抑制する可能性が示された。

### A. 研究目的

内分泌かく乱作用の検出を目的とした改良28日間反復投与毒性試験における $\alpha_{2u}$ グロブリンの測定意義を明白にする。

### B. 研究方法

E2  $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  MもしくはClofibrate  $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  Mで3次元培養ラット肝細胞 (TESTLIVER™-Rat-, Toyobo)を24時間培養し、遺伝子発現をDNA microarrayで検討すると共にELISA法にて培養上清中のAUG変動を同時に検討した。

### C. 研究結果

TestLiver培養後、経時的に培地を採取し、AUGの産生をELISA法にて確認したところ、経時的なAUGの蓄積が観察され、AUGを産生することが確認された (図1)。同TestLiverを同一培養条件にてE2  $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M及びClofibrate  $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  Mを作

用させた場合、いずれも培養上清中のAUG分泌量には明らかな変動は示さなかった (図2)。本実験に使用した細胞から得られたtotal RNAをTemplateとして蛍光標識cDNA (Cy3, Cy5)を作製しAgilent社製glass cDNA microarrayを用いて網羅的に遺伝子の変動を観察した結果、E2  $10^{-10}$  M及びClofibrate  $10^{-6}$  Mで細胞中のmRNAレベルではAUGは有意に減少していた (図3及び図4)。また、rat senescence marker protein 2 (SMP-2)の発現量はE2及びClofibrateのいずれの曝露でも増加が認められた。

### D. 考察

E2  $10^{-10}$  M及びClofibrate  $10^{-6}$  Mでいずれも培養上清中のAUGタンパク質は明らかな変動は示さなかったが、細胞中のmRNAレベルではAUGは有意に減少していたことから、タンパク質生合成のタイムラグがあるものと考えられる。しかしながら、

microarray による遺伝子発現解析の結果、E2 及び Clofibrate とともに AUG の減少、SMP-2 の増加を引き起こすことが確認された。Clofibrate は estrogenic な影響或いは内分泌かく乱性を疑わせる報告もなされていることから、同様の機序により AUG 産生を抑制する可能性が示唆された。

## E 結論

本研究結果から AUG の発現と SMP-2 は密接に関連し、estrogen 様化合物の作用により発現が低下する可能性が示唆された。AUG 減少に関わる例外的な機序の存在も否定できないが、estrogen 様作用を正常動物で検出する手法として AUG 測定は有効と思われる。

## F 健康危惧情報

特になし

## G 研究発表

### 雑誌

Takeyoshi M, Sawaki M, Noda S, Muroi T, Yamasaki K., Effect of gonadotropin-releasing hormone antagonist on ovarian and uterine weights in immature female rats. *Reprod Toxicol.* 2002 Jul-Aug; 16(4):367-9.

Yamasaki K, Takeyoshi M, Noda S, Takatsuki M., Changes of serum alpha 2u-globulin in the subacute oral toxicity study of ethynyl estradiol and bisphenol A based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline No. 407'. *Toxicology.* 2002 Jul 1;176(1-2):101-12.

Takeyoshi M, Anai S, Shinoda K. Hepatic alpha(2u)-globulin mRNA levels and diethylstilbestrol-associated testicular atrophy in rats. *Reprod Toxicol.* 2000 Jul-Aug;14(4):355-7.

Takeyoshi M, Anai S, Shinoda K. Changes in serum alpha2u-globulin levels in male rats given diethylstilbestrol and applicability to a screening test for endocrine-disrupting chemicals. *Arch Toxicol.* 2000 Mar;74(1):48-53.

## H 知的財産所有権の出願、登録状況

特になし。

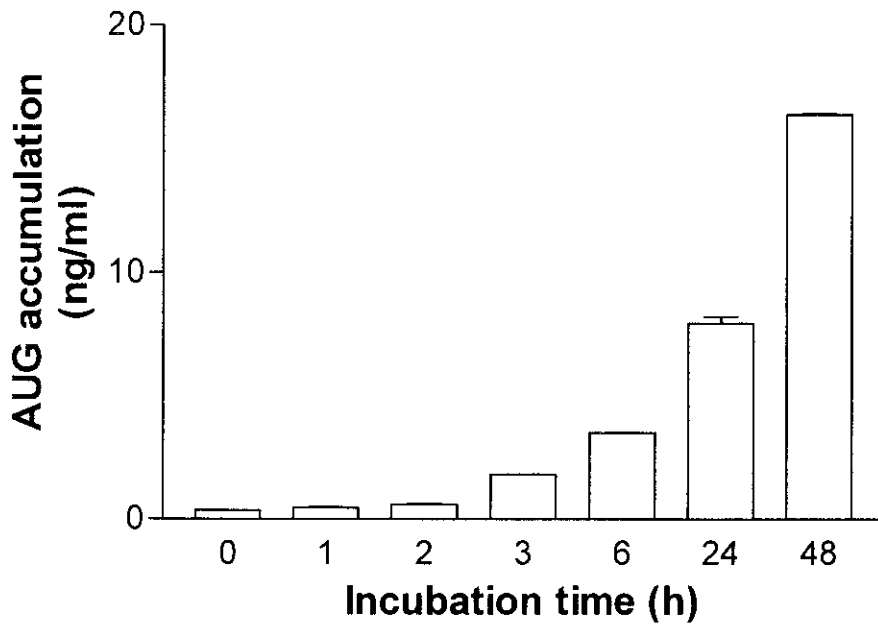


図1 TestLiver による *in vitro* AUG 産生

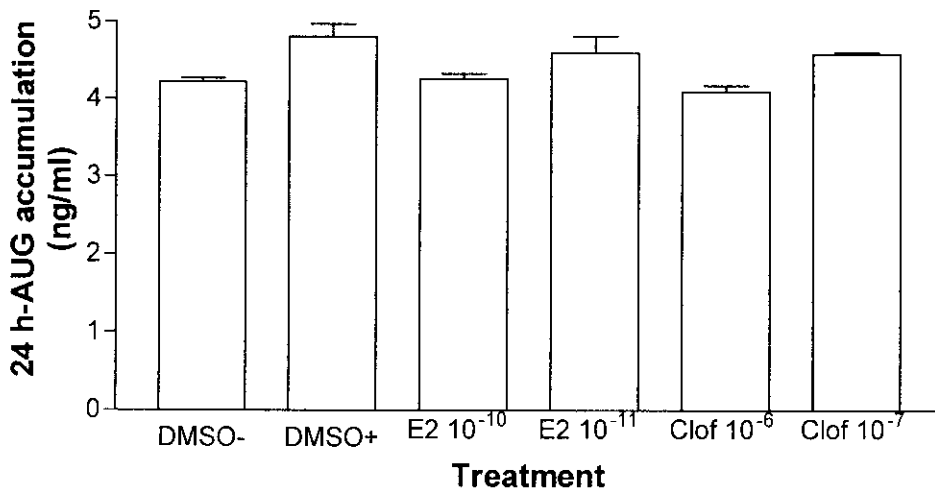


図2 TestLiver の AUG 産生に対する E2 及び Clofibrate の影響

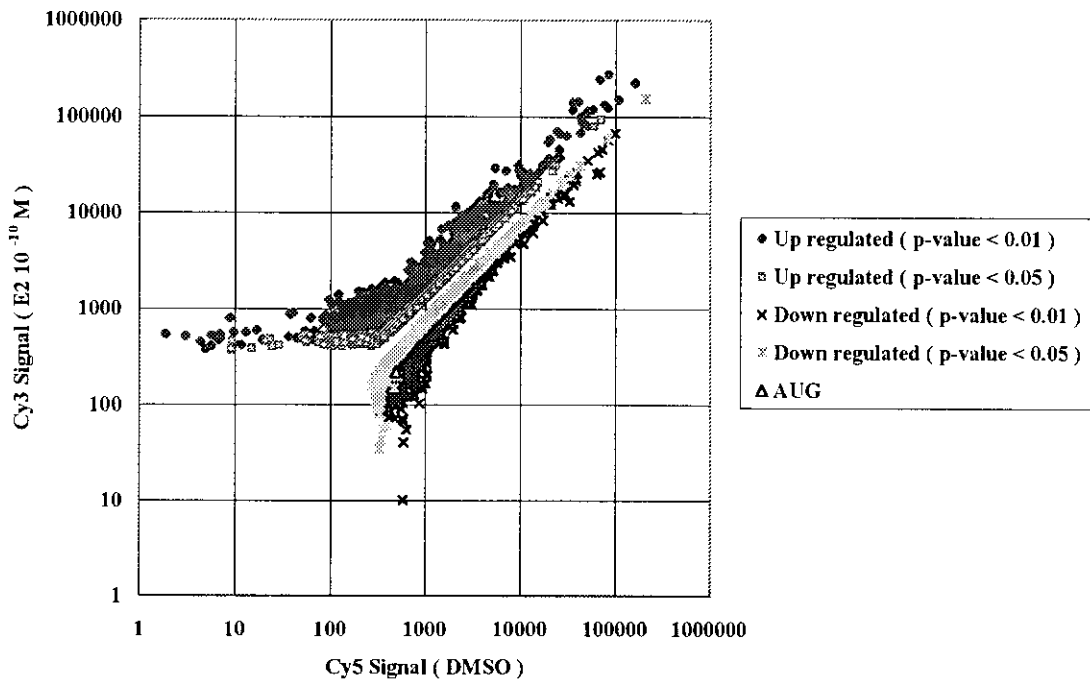


図3 TestLiver の遺伝子発現に及ぼす E2 の影響 (Scattered blot)

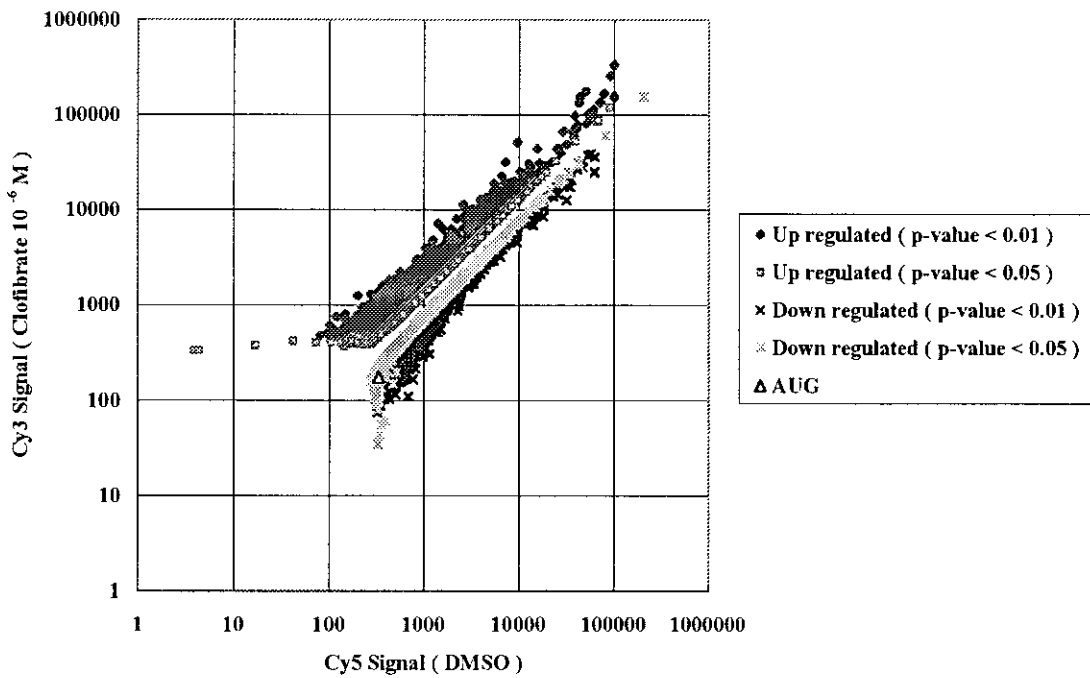


図4 TestLiver の遺伝子発現に及ぼす Clofibrate の影響 (Scattered blot)

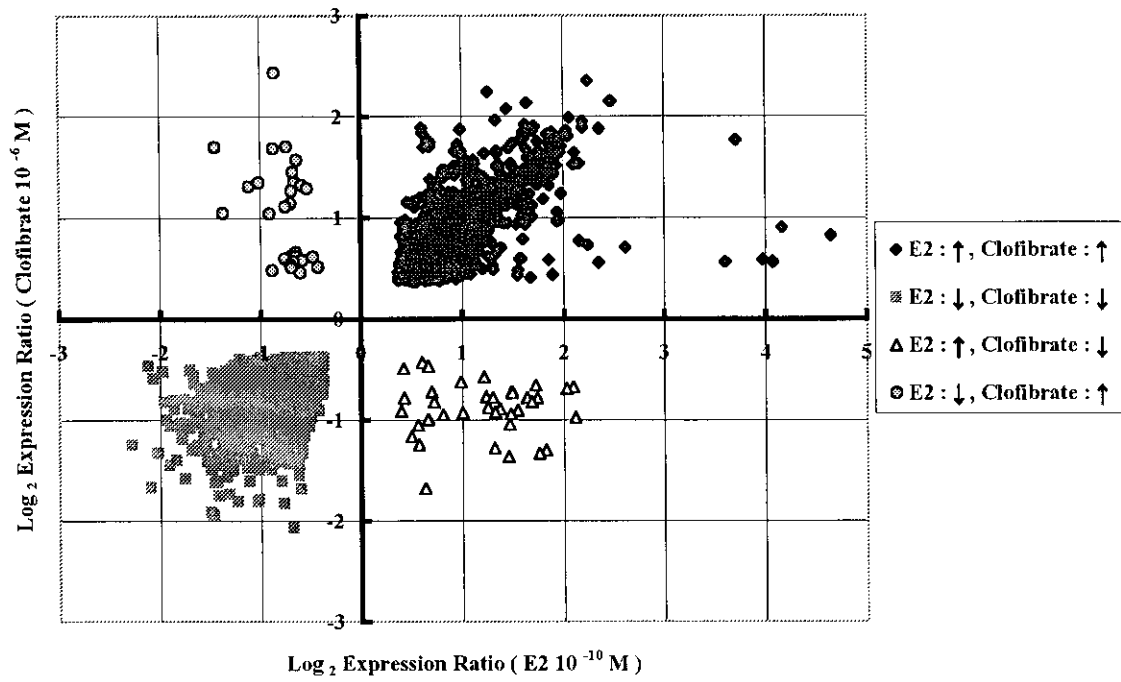


図5 E2 と Clofibrate 曝露による TestLiver の発現遺伝子の相違



## 11. 国内外の Hershberger 試験に関するデータ整理 とその問題点の把握及び解決策の検討

分担研究者 山崎 寛治

(財) 化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所 所長

研究要旨 OECD Validation phase 2 試験の一環として国内の 7 試験機関において Hershberger 試験を実施し、2003 年の OECD、学会に日本のデータとして報告、発表し、さらに論文掲載した。また、近年の本試験に関する文献の検索では試験法開発に関連する論文は少なく、androgen receptor binding assay と Hershberger 試験の相関性については概ね良好であるという報告、30 物質の Hershberger 試験実施などがみられた。一方、OECD における動向については、validation phase 2 の全体的な結果のまとめ中であり、さらに non-castrated rat を使用した assay と blind 物質を使用した試験が含まれる validation phase 3 を行うことが決定された。

### A. 研究目的

国内で実施された試験をもとに、本試験法の問題点の抽出し、その解決法を考慮し、さらに本試験法に関連する情報を収集する。

### B. 研究方法

OECD Validation phase 2 試験の一環として国内の 7 試験機関において Hershberger 試験を実施し、2003 年の OECD、学会（ユーロトックス）に日本のデータとして報告、発表した。また、Environmental Health Perspective に掲載した。また、本試験に関する文献の検索、OECD の動向を調査した。

なお、上記掲載論文の要約、調査した文献の要約、さらには学会

（ユーロトックス）出張報告内容を 2 ページ以降に添付資料 1-4 として記載する。

### C. 研究結果及び考察

①日本における Validation phase 2 試験：日本で実施した androgen agonist である methyltestosterone、antagonist である vinclozolin、*p, p'*-DDE の結果について、各機関間における本質的な差は認められなかった。また、antagonist 検出系で Testosterone propionate (TP) について 0.2mg/kg/day を使用したが（日本を除く機関では 0.4mg/kg/day を使用）、影響の検出に問題ないものと考えられた。しかし、この TP の用量については今

後の世界的に実施されている phase 2 試験のデータを含め議論されるべきと考えられた。また、器官別の反応性ではどの器官の反応性が良好であるかは、一律には決定できないと考えられた。

②文献調査：平成 15 年度に公表された論文、学会発表について調査した。主な内容を以下に記載する。

・ *in vitro* と *in vivo* の相関性について：12 物質 (phthalic acid di-*n*-hexyl ester, phthalic acid di-*n*-amyl ester, phthalic acid di-*n*-propyl ester, EDS, 17 $\beta$ -estradiol, tamoxifen, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, dichlorodiphenyldichloroethane, cyproterone acetate, 6 $\alpha$ -methyl-17 $\beta$ -hydroxy-progesterone, atrazine, spironolactone) について androgen receptor binding assay と Hershberger 試験の相関性について検討した結果、両試験の相関性は本質的に良好であった。しかし、一部の物質においては必ずしも両試験の結果は一致せず、receptor binding assay で affinity がみられたにもかかわらず、Hershberger 試験で陰性の物質が認められる。

・ 30 物質 (4-*n*-amylphenol, *p*-dodecyl-phenol, *p*-(*tert*-pentyl)phenol, 4-cyclohexylphenol, 4-(1-adamantyl)phenol, 4,4'-thiobis-phenol, diphenyl-*p*-

phenylenediamine, 4-hydroxyazobenzene, 4-(phenylmethyl) phenol, 4,4'-(hexafluoroisopropylidene)diphenol, 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-*n*-pentane, 4,4'-(octahydro-4,7-methano-5H-inden-5-ylidene)bisphenol, 4,4'-dihydroxybenzophenone, 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone, 4-hydroxybenzophenone, 2,4,4'-trihydroxybenzophenone, testosterone enanthate, methyltestosterone, 17 $\alpha$ estradiol, estrone, equilin, norethindrone, norgestrel, ethynyl estradiol, bisphenol A, bisphenol B, bisphenol F, 4-*tert*-octylphenol, *p*-cumyl phenol, and nonylphenol) について

Hershberger 試験を実施した報告がみられ、この中では estrogen 物質が陽性の反応を示していることが注目される。

・ Hershberger assay において、甲状腺機能を傷害する内分泌かく乱物質の影響がとらえられたという学会発表もみられ、興味深い。

③OECD における動向：OECD においては validation phase 2 の結果をまとめている途中であり、2004 年の VMG で報告される予定である。新たな動きとして、validation phase 3 を行うことが 2003 年の VMG

会議で提案され、承認された。内容としては non-castrated rat を使用した試験と既知の物資を blind 物質として行う試験である。今年度末から開始予定である。

#### D. 結論

OECD Validation phase2 試験の一環として国内の 7 試験機関において Hershberger 試験を実施した各機関における本質的な差はみとめられなかった。この結果については、OECD、国際学会で報告し、論文掲載を行った。文献調査の結果では、in vitro における androgen receptor binding assay と Hershberger 試験の相関性については概ね良好であるという報告、30 物質の Hershberger 試験実施などがみられた。OECD における動向は validation phase 2 については現在全体的な結果をまとめ中であり、さらに non-castrated rat を使用した assay と blind 物質を使用した試験が含まれる validation phase 3 を行うことが決定された。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 発表論文

##### 1) 雑誌

Yamasaki K, Sawaki M, Ohta R, Okuda H, Katayama S, Yamada T, Ohta T, Kosaka T, Owens W. OECD validation of the Hershberger assay in Japan: Phase 2-Dose response of methyltestosterone, vinclozolin and p,p'-DDE. Environ Health Perspect, 111, 1912-1919, 2003.

##### 2. 学会発表

OECD validation of the Hershberger assay in Japan: Phase 2-Dose response of methyltestosterone, vinclozolin and p,p'-DDE, EUROTOX, 2003.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

無し

## 添付資料 1

### 日本における Phase 2 の掲載論文 (Environmental Health Perspect, 111, 1912-1919, 2003) 要約

OECD Validation of the Hershberger Assay in Japan: Phase 2-Dose Response of Methyltestosterone, Vinclozolin and p,p'-DDE

Kanji Yamasaki<sup>1</sup>, Masakuni Sawaki<sup>1</sup>, Ryo Ohta<sup>2</sup>, Hirokazu Okuda<sup>3</sup>, Seiichi Katayama<sup>4</sup>, Tomoya Yamada<sup>5</sup>, Takafumi Ohta<sup>6</sup>, Tadashi Kosaka<sup>7</sup> and William Owens<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Chemicals Evaluation and Research Institute, Oita, Japan 3-822

<sup>2</sup> Food Drug Safety Center, Kanagawa, Japan 257-8523

<sup>3</sup> Japan Bioassay Research Center, Kanagawa, Japan 257-0015

<sup>4</sup> Mitsubishi Chemical Safety Institute, Ibaraki, Japan 314-0255

<sup>5</sup> Sumitomo Chemical Company, Osaka, Japan 554-8558

<sup>6</sup> Panapham Laboratories Co., Ltd., Kumamoto, Japan 869-0425

<sup>7</sup> Institute of Environmental Toxicology, Ibaraki, Japan 303-0043

<sup>8</sup> Environmental Health and Safety Division, OECD, Paris, France 75016

#### Abstract:

The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) has initiated the development of new guidelines for the screening and testing of potential endocrine disrupters. The Hershberger assay is one of the assays selected for validation based on the need for in vivo screening to detect androgen agonists or antagonists by measuring the response of five sex accessory organs and tissues of castrated juvenile male rats: the ventral prostate, the seminal vesicles with coagulating glands, the levator ani and bulbocavernosus muscle complex, the Cowper's glands, and the glans penis. The Phase 1 feasibility demonstration stage of the Hershberger validation program has been successfully completed with

single androgen agonist and a single antagonist as reference substances. Phase 2 validation program as employs a range of additional androgen agonists and antagonists as well as 5 $\alpha$ -reductase inhibitors. Seven Japanese laboratories have contributed Phase 2 validation studies of the Hershberger assay using methyltestosterone, vinclozolin and p,p'-DDE. The methyltestosterone doses were 0, 0.05, 0.5, 5 and 50 mg/kg/day and those of vinclozolin and p,p'-DDE were 0, 3, 10, 30 and 100 mg/kg/day. All chemicals were orally administered by gavage for 10 consecutive days. In the antagonist version of the assay using vinclozolin and p,p'-DDE, 0.2 mg/kg/day of testosterone propionate was coadministered by subcutaneous injection. All five accessory sex preproductive organs and tissues consistently responded with statistically significant changes in weight within narrow window. Therefore, the Japanese studies support the Hershberger assay as a reliable and reproducible screening assay for the detection of androgen agonistic and antagonistic effects.

## 添付資料 2

文献要約 (Hershberger 試験と Androgen receptor binding assay の関連性 : Toxicology, 2004, in press)

### Comparison of the Hershberger Assay and Androgen Receptor Binding Assay of Twelve Chemicals

Kanji Yamasaki, Masakuni Sawaki, Shoji Noda, Takako Muroi, Saori Takakura, Hideo Mitoma, Satoko Sakamoto, Makoto Nakai, Yoshikuni Yakabe

Chemicals Evaluation and Research Institute, 3-822, Ishii, Hita, Oita 877-0061, Japan

#### Abstract:

We performed the Hershberger assay of 12 chemicals based on the OECD draft protocol. The chemicals tested by the Hershberger assay were phthalic acid di-*n*-hexyl ester, phthalic acid di-*n*-amyl ester, phthalic acid di-*n*-propyl ester, diethylstilbestrol, 17 $\beta$ -estradiol, tamoxifen, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, dichlorodiphenyldichloroethane, cyproterone acetate, 6 $\alpha$ -methyl-17 $\beta$ -hydroxy-progesterone, atrazine, and spironolactone. Phthalic acid di-*n*-hexyl ester, phthalic acid di-*n*-amyl ester, and phthalic acid di-*n*-propyl ester are phthalates; diethylstilbestrol and 17 $\beta$ -estradiol are estrogenic chemicals; tamoxifen is partial estrogen receptor antagonist with mainly estrogenic properties; 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone is an androgen derivatives; dichlorodiphenyldichloroethane is a reference androgen antagonistic chemical; cyproterone acetate, 6 $\alpha$ -methyl-17 $\beta$ -hydroxy-progesterone, and spironolactone have an androgenic steroid structure and are known as androgen antagonistic chemicals; and atrazine is a reference endocrine disruptor. We also subjected these chemicals to the receptor binding assay for androgen. A clear androgen agonistic effect was detected in 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, and an androgen antagonistic effect was observed in five chemicals: cyproterone acetate, spironolactone, 6 $\alpha$ -methyl-17 $\beta$ -hydroxy-

progesterone, phthalic acid di-*n*-amyl ester, and dichlorodiphenyldichloroethane. By contrast, diethylstilbestrol, 17 $\beta$ -estradiol, tamoxifen, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, dichlorodiphenyldichloroethane, cyproterone acetate, 6 $\alpha$ -methyl-17 $\beta$ -hydroxyprogesterone, and spironolactone were positive in the receptor binding assay for androgen. Three estrogenic chemicals, diethylstilbestrol, 17 $\beta$ -estradiol, and tamoxifen, were negative in the Hershberger assay with receptor binding affinity. On the other hand, the Hershberger assays of three phthalates were performed at the same dosages, and the results showed androgen antagonistic affinity only in the assay of phthalic acid di-*n*-amyl ester without receptor binding affinity.

### 添付資料 3

文献要約 (30 物質における Hershberger 試験 : Toxicology, 183: 95-115, 2003)

#### Immature Rat Uterotrophic Assay of Eighteen Chemicals and Hershberger Assay of Thirty Chemicals

Kanji Yamasaki, Masahiro Takeyoshi, Masakuni Sawaki, Nobuya Imatanaka, Kazutoshi Shinoda, Mineo Takatsuki

Chemicals Evaluation and Research Institute, 3-822, Ishii, Hita, Oita 877-0061, Japan

#### Abstract:

We performed an immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals to assess the relationship between the results of two assays. The chemicals tested by the immature assay were 4-n-amyphenol, p-dodecyl-phenol, p-(tert-pentyl)phenol, 4-cyclohexylphenol, 4-(1-adamantyl)phenol, 4,4'-thiobis-phenol, diphenyl-p-phenylenediamine, 4-hydroxyazobenzene, 4-(phenylmethyl)phenol, 4,4'-(hexafluoroisopropylidene)diphenol, 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-n-pentane, 4,4'-(octahydro-4,7-methano-5H-inden-5-ylidene)bisphenol, 4,4'-dihydroxybenzophenone, 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone, 4-hydroxybenzophenone, 2,4,4'-trihydroxybenzophenone, testosterone enanthate, and methyltestosterone. The chemicals tested by the Hershberger assay were the 18 chemicals tested in the uterotrophic assay plus the following: 17alpha estradiol, estrone, equilin, norethindrone, norgestrel, ethynyl estradiol, bisphenol A, bisphenol B, bisphenol F, 4-tert-octylphenol, p-cumyl phenol, and nonylphenol. All chemicals examined in this study were positive in a reporter gene assay for ER-alpha. In the immature rat uterotrophic assay, all chemicals induced uterotrophy and p-(tert-pentyl)phenol, 4,4'-thiobis-phenol, 4-(phenylmethyl)phenol, 4,4'-(hexafluoroisopropylidene)diphenol, 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-n-pentane, 4,4'-(octahydro-4,7-methano-5H-inden-5-



ylidene)bisphenol, 4,4'-dihydroxybenzophenone, 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone, 4-hydroxybenzophenone, and 2,4,4'-trihydroxybenzophenone exerted both estrogen agonistic effect and reduced the estrogenic effect of ethynylestradiol. In the Hershberger assay, a clear androgen agonistic effect was detected in the androgen derivatives testosterone enanthate and methyltestosterone.

## 添付資料 4

### 出張報告

#### EUROTOX2003 annual meeting

1. 開催日時：2003年9月28日（日） - 10月1日（水）
2. 場所：フィレンツェ（イタリア）
3. 参加目的：EUROTOX2003 annual meetingにおける発表、情報収集
4. 学会参加人数：約1200名
5. 内分泌かく乱作用に関する発表

演題は poster を含め約 400 であった。そのなかで内分泌かく乱に関する発表は poster を中心に 24 題があり、またエコトキシコロジーに関する発表は 25 題であった。内分泌かく乱に関する発表は 24 題のうち 6 題が日本からの発表であった。

担当している Hershberger assay と内分泌かく乱作用に関連する発表の一部を記載する。

##### – Hershberger assay: dose response studies on trenbolone and vinclozoline

Krotlinger et al., Bayer AG.

trenbolone と vinclozoline を使用した Hershberger assay であり、OECD Phase 2 の報告である。Androgen agonist である trenbolone、antagonist である vinclozoline 共に良好な反応性がみられたことから、Hershberger assay は有用な assay であると結論づけていた。

phase 2 のヨーロッパにおける 1 機関の報告である。日本で実施できなかった Androgen agonist の代表物質である trenbolone における良好な反応性が確認されたことは Hershberger assay をプロトコール化していく上で有意義なデータと考えられる。一方、他の機関でのデータ、さらにはヨーロッパ全体での作業について質問したが、未だ進んでいないとのことであった。このことから、本 assay のプロトコール化は遅れる可能性がある。

なお、前回の OECD, VMG 会議では、Hershberger assay の phase2 に関して既に終了している日本のデータと、残るヨーロッパのデータと合わせ phase2 を終了しようということになっている。

##### – Effects of some phthalates on the selected enzymes activities in wistar rat testis.

Wiadrowska et al., National Institute of Hygien, Poland.

DEHP ; 2000mg/kg, BBP ; 2000mg/kg, DBP; 2400mg/kg を wistar rat に 10

日間飲水投与し、精子形成に関連する enzyme である SDH,  $\gamma$ -GT, hyaluronidase を計測した結果、変動がみられた。

phthalate が精子形成に関与することは既知のことであり、論文も出始めている。今回の発表は enzyme の観点からの検索したもので興味もたれた。既に形態的には精巢のセルトリ細胞に変化が報告されている。発表者も、今回形態的变化は提示しなかったが、セルトリ細胞に変化がみられたことを回答した。

– Pituitary-thyroid axis in the postnatal rat offspring following gestational and lactational exposure to bisphenol.

Kobayashi et al., Chiba University.

BPA ; 0, 4, 40mg/kg を雌 SD ラットの親に妊娠 6 日目から離乳 20 日まで経口投与し、出生児に対する影響をみた試験である。甲状腺関連ホルモン、AGD、器官重量に変化がみられず、BPA は妊娠から離乳間での投与では Pituitary-thyroid axis に影響がないと結論づけていた。

実験の前提条件が不明である。即ち estrogen 物質ある BPA が in vivo 試験において thyroid あるいは pituitary に作用が認められているかどうかは前提である。in vivo 試験において、多くの estrogen 物質では BPA を含め thyroid , pituitary に作用するという報告はない。また、AGD のみでなく、cleft phalus の発現について質問したが、発表者はこの試験の担当者ではないそうで回答がなかった。

– Analysis of microarray data revealed the long-term effects of neonatal exposure to genistein and bisphenol on gene expression in mice.

Fukata, et al., Ciba Universtiy.

BPA, genistein, DES を生後 0~5 日間投与し、4, 12 週目の DNA の動態を検索した。その結果、12 週後においても変動しない遺伝子が観察された。遺伝子は精巢の発育に関連するものであった。

estrogen 物質を投与し、精巢の発育に関与する遺伝子に変化がみられたことは興味深い。しかし、変動した遺伝子の解析については今後の問題である。

– Possible effects of metoxychlor on ACTH secretion through domanine

Lufente, et al., Spain.

Metoxychlor(MTX)を投与し、ACTH と dopamine への影響をみた発表である。

結果として、MTX は ACTH に影響を与え、視床下部からの dopamine の発

現を促すという報告であった。

- その他、韓国の機関から 4 題の報告があり、その中の 3 題は **non-animal** に関連するものであった。しかし、発表時に発表者は不在であった。感想としては韓国の研究はやや遅れていると考えられる。

## 6. 発表

今回の学会参加の目的の一つは、日本で実施した **OECD Hershberger Validation Phase 2** の結果の発表であった。

発表に関しては、**OECD** との関係もあり実施し、データも **Environmental Health Perspective** の 9 月号に掲載されたことから、日本の **phase2** に関する活動は一応終了したと考える。

今後は **phase3** 対応が残るが、**OECD** における情報によればかなりの遅延が予想される。従って、**2005** 年度のガイドライン化も遅れる可能性ある。