

19. 反復投与毒性試験系 (TG407 を含む) への適用に関する調査研究

分担研究者 広瀬明彦 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室 主任研究官

研究の要旨

本研究は、反復投与毒性系、特に OECD407 のようにガイドライン化されている反復投与試験法の中で、内分泌かく乱作用を検出あるいは予測できるような試験項目等を取り入れることにより、スクリーニングとしての効率化を高める共に、OECD 等のガイドライン改訂等への貢献を図ることを目的とする。一方、生殖発生毒性試験系も内分泌かく乱作用を検出する意味においては重要なツールではあるが、現状の試験法に対してはより鋭敏で内分泌かく乱作用に特異的な検出法への改善が必要である。本年度は、発生神経毒性の検出における現状の試験法の問題点について調査を行った。

A. 研究目的

反復投与毒性系、特に OECD407 のようにガイドライン化されている反復投与試験法の中で、内分泌かく乱作用を検出あるいは予測できるような試験項目等を取り入れることにより、スクリーニングとしての効率化を高める共に、OECD 等のガイドライン改訂等への貢献を図ることを目的とする。

B. 研究方法

OECD においては化学物質の内分泌かく乱作用のスクリーニングの効率化、あるいは調和の目的の一つとして子宮肥大試験および Hershberger 試験のバリデーションと共に、Enhanced OECD407 試験のバリデーションを行い、Step2 が終了しているが、未だ最終的なとりまとめは公表されていない。

一方、生殖発生毒性試験系も内分泌かく乱作用を検出する意味においては重要なツールではあるが、現状の試験法に対してはより鋭敏で内分泌かく乱作用に特異的な検出法への改善が必要である。OECD では 2004 年 10 月に “GUIDANCE DOCUMENT ON REPRODUCTIVE TOXICITY TESTING” のファーストドラフトの回覧を行った。内分泌かく乱作用だけを念頭に置いたわけではないが、

このガイダンスは OECD のテストガイドライン 414、415、416、426 および 421 や 422 における試験法や定義等の捕捉を目的として作成されている。また、現在、発生神経毒性試験法である TG426 の改訂作業も進行中であり、2005 年の 5 月には、我が国での Expert Meeting も予定されている。

そこで、本年度は、今後の内分泌かく乱作用検出法としてのガイドラインのあり方に対する研究としてこれら OECD の動きを受けて、発生神経毒性の検出における現状の試験法の問題点について調査を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト個別の症例や個別の試料を用いたり実験動物を使用したりした研究ではなく、主に調査研究を行なったものであるため、特に倫理的に配慮すべき事項はないと考えられた。

C-D. 研究結果と考察

1. 28 日反復投与試験 (+FOB) の問題点

TG407 28 日反復投与試験：

神経毒性と筋肉毒性の判別のために観察項目に腓腹筋の追加が必要である。FOB により動物にストレス負荷が加わり、ICH ガイドラインで実施されている反復試験の結果と比較することが

困難となる可能性がある。また、臨床報告を考慮した動物実験における観察項目の検討を行い、ガイドラインの改変を随時行う必要があると考えられる。

神経毒性と筋毒性の識別の必要性（病理組織学的観察が必要）

FOBにおいて歩行異常が観察された場合、神経毒性か筋毒性かを判別する必要があると考えられる(Ogaw et al., *Neurotoxicology*, 21(4), 501-512, 2000, Mimura et al., 21(4), 513-520, 2000)。観察項目としては、筋肉（腓腹筋）を追加する必要性があり、支配する神経（座骨神経）と支配される筋肉（腓腹筋）との組み合わせが適当である。座骨神経と大腿筋では、筋毒性が発現しても運動試験障害に類似した歩行障害が観察される。

実例としては、抗がん剤であるVincristineを服用すると手足のしびれが副作用としてある。

ラットでは歩行異常が認められるが、病理組織学検査では末梢神経に変化はなく筋肉の著明な変性が認められる(Ogawa et al. *J. Toxicol. Sci.* 23(4), 1998, p. 353, Abstract no. P10-1)。

② 臨床報告を参考ににした観察項目の改変について

農薬、除草剤などの長期暴露とパーキンソン病（黒質のドーパミン神経の脱落死が特徴）との関連性が疫学調査および動物実験から既に明らかになってきている（麻薬の合成過程で生じるMPTP; 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine、除草剤パラコート、殺虫剤ロテロンなど）。同じような特性あるいは機序をもつ被験物質でTG407を実施する場合は、病理組織検査の観察に感受性のある領域の観察や免疫組織染色（この場合はTyrosine hydroxylase (TH) 染色）を積極的にとり入れることが必要であると思われる。

③ ストレス負荷と神経毒性

FOBの実施により動物にストレス負荷が加わることから、本来の一般毒性試験の指標（体重、血液生化学検査、副腎重量など）にストレスの

影響が加わり、一般毒性の観察項目に影響を及ぼす可能性がある。

2. 現行の発達神経毒性試験の問題点

現行の発達神経毒性試験は、発生毒性試験にアーウィン法などの行動薬理試験や病理組織学試験を組み合わせるにより編成されており、投与期間も発生毒性試験に準じており脳発達障害の臨界期は考慮されていない。また、行動試験に重点がおかれているが試験結果に及ぼす要因が多いことを考えると新たなエンドポイント（例えば神経生化学的観察）が必要となる可能性は高い。

臨床報告から、PCB、メチル水銀などの環境化学物質の妊娠期暴露、アルコール、タバコなど嗜好品や一部の医薬品といった妊娠期の服用が、IQ低下、ADHD、自閉症などの脳発達障害の発症に関与することが示唆されており、現在、動物実験における確認が実施されている。

① 行動試験の限界；

胎生期暴露に対し出生後の行動を評価することは、評価するまでの間に様々な因子加味される弱点がある。行動観察室の背景音、照度、時間などの環境条件も行動試験の結果に大きく影響を与える要因である。たとえば、自閉症に特徴的な「ものや行為への固執、言葉の遅れ、社会性の発達欠如」などを実験動物の行動観察のみから検出するには限界がある。自閉症の動物疾患モデルといわれている胎生期バルプロ酸暴露動物を用いて、常法のオープンフィールド試験を実施すると多動性を示すことが報告されている。また、放射状迷路試験、高架式十時迷路、Rich environmental conditions下において、すくみ（恐怖）や新規性への順応能力が検討されているが、スクリーニング試験への導入には時間を要すると思われる。

従って、行動試験のみに依存しない評価方法、あるいは行動試験をサポートできる新たな評価法の開発が必要であると考えられる。

② 脳発達障害発現の臨界期の存在；

バルプロ酸やサリドマイド誘発性の自閉症例は、

困難となる可能性がある。また、臨床報告を考慮した動物実験における観察項目の検討を行い、ガイドラインの改変を随時行う必要があると考えられる。

神経毒性と筋毒性の識別の必要性（病理組織学的観察が必要）

FOBにおいて歩行異常が観察された場合、神経毒性か筋毒性かを判別する必要があると考えられる(Ogaw et al., *Nerutotoxicology*, 21(4), 501-512, 2000, Mimura et al., 21(4), 513-520, 2000)。観察項目としては、筋肉（腓腹筋）を追加する必要性があり、支配する神経（座骨神経）と支配される筋肉（腓腹筋）との組み合わせが適当である。座骨神経と大腿筋では、筋毒性が発現しても運動試験障害に類似した歩行障害が観察される。

実例としては、抗がん剤である Vincristine を服用すると手足のしびれが副作用としてある。ラットでは歩行異常が認められるが、病理組織学検査では末梢神経に変化はなく筋肉の著明な変性が認められる(Ogawa et al. *J. Toxicol. Sci.* 23(4), 1998, p. 353, Abstract no. P10-1)。

② 臨床報告を参考ににした観察項目の改変について

農薬、除草剤などの長期暴露とパーキンソン病（黒質のドーパミン神経の脱落死が特徴）との関連性が疫学調査および動物実験から既に明らかになってきている（麻薬の合成過程で生じる MPTP; 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine、除草剤パラコート、殺虫剤ロテロンなど）。同じような特性あるいは機序をもつ被験物質でTG407を実施する場合は、病理組織検査の観察に感受性のある領域の観察や免疫組織染色（この場合はTyrosine hydroxylase (TH) 染色）を積極的にとり入れることが必要であると思われる。

③ ストレス負荷と神経毒性

FOBの実施により動物にストレス負荷が加わることから、本来の一般毒性試験の指標（体重、血液生化学検査、副腎重量など）にストレスの

影響が加わり、一般毒性の観察項目に影響を及ぼす可能性がある。

2. 現行の発達神経毒性試験の問題点

現行の発達神経毒性試験は、発生毒性試験にアーウィン法などの行動薬理試験や病理組織学試験を組み合わせることにより編成されており、投与期間も発生毒性試験に準じており脳発達障害の臨界期は考慮されていない。また、行動試験に重点がおかれているが試験結果に及ぼす要因が多いことを考えると新たなエンドポイント（例えば神経生化学的観察）が必要となる可能性は高い。

臨床報告から、PCB、メチル水銀などの環境化学物質の妊娠期暴露、アルコール、タバコなど嗜好品や一部の医薬品といった妊娠期の服用が、IQ低下、ADHD、自閉症などの脳発達障害の発症に関与することが示唆されており、現在、動物実験における確認が実施されている。

① 行動試験の限界；

胎生期暴露に対し出生後の行動を評価することは、評価するまでの間に様々な因子加味される弱点がある。行動観察室の背景音、照度、時間などの環境条件も行動試験の結果に大きく影響を与える要因である。たとえば、自閉症に特徴的な「ものや行為への固執、言葉の遅れ、社会性の発達欠如」などを実験動物の行動観察のみから検出するには限界がある。自閉症の動物疾患モデルといわれている胎生期バルプロ酸暴露動物を用いて、常法のオープンフィールド試験を実施すると多動性を示すことが報告されている。また、放射状迷路試験、高架式十時迷路、Rich environmental conditions 下において、すくみ（恐怖）や新規性への順応能力が検討されているが、スクリーニング試験への導入には時間を要すると思われる。

従って、行動試験のみに依存しない評価方法、あるいは行動試験をサポートできる新たな評価法の開発が必要であると考えられる。

② 脳発達障害発現の臨界期の存在；

バルプロ酸やサリドマイド誘発性の自閉症例は、

母親が自分の妊娠を自覚する時期以前（催奇形性の臨界期前）の服用によって発現している。即ち、女性が妊娠を自覚する前後に自閉症発現の臨界期が存在する可能性がある。しかし、現行の発達神経毒性試験では、発生毒性学に基づいた化学物質の暴露期間に設定される連続投与となる。その結果、妊娠維持や出産に重点がおかれ投与用量が下がり、さらに複数の発生段階から発現する毒性を評価することから、ある臨界期に単回投与で十分検出できる脳発達障害を正しく評価していない可能性も考えられる。脳発達障害を検出するための試験では、これまでの発生毒性試験とは異なる投与期間を考える必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ema, M., Hara, H., Matsumoto, M., Hirose, A. and Kamata, E. (2005) Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. *Food Chem Toxicol.*, 43: 325-331.

Hasegawa R, Koizumi M, Hirose A (2004) Principles of risk assessment for determining the safety of chemicals: Recent assessment of residual solvents in drugs and di(2-ethylhexyl) phthalate. *Congenit Anom (Kyoto)*, 44(2), 51-59.

Hirose A, Hasegawa R, Nishikawa A, Takahashi M and Ema M (2004) Revision and establishment of Japanese drinking water quality guidelines for di(2-ethylhexyl) phthalate, toluene and vinyl chloride - differences from the latest WHO guideline drafts - *J. Toxicol. Sci.*, 29, 535-539.

高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞 (2004) OECD 化学物質対策の動向 (第5報) 国立医薬品食品

衛生研究所報告 122 : 37-42.

広瀬明彦, 江馬 眞 (2004) 生殖発生毒性を指標としたダイオキシンの耐容1日摂取量 (TDI) 算定の考え方について、国立医薬品食品衛生研究所報告 122 : 56-61

高橋美加・平田睦子・松本真理子・広瀬明彦・鎌田栄一・長谷川隆一・江馬 眞 (2004)、OECD 化学物質対策の動向 (第6報) ー第14回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2002年パリ)、化学生物総合管理学会誌 1 : 46-55.

2. 学会発表

Hirose A, Takagi A, Nishimura T, Kanno J, Ema M. "Review of reproductive and developmental toxicity induced by organotins in aquatic organisms and experimental animals." 24th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Berlin, September 6-10, 2004

広瀬明彦、鎌田栄一、高橋美加、江馬 眞 “有機スズの水生動物と実験動物における生殖発生毒性” 環境ホルモン学会第7回研究発表会, 名古屋, 12月14-15日, 2004.

H. 知的所有権の取得状況

なし

20. 国内外の子宮肥大試験に関するデータ整理とその問題点の把握および解決策の検討

分担研究者 永井 賢司 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所 部長

研究要旨

子宮肥大試験をガイドライン化する上で残された問題点の一つとして、estrogen antagonist への適用がある。OECD Validation Study においても、強力な pure antagonist である ZM189.154 を用いて実施したのみであり、弱い antagonist についての検証はなされていない。また、antagonist 評価をどの程度組み込むかは、本試験の群構成、試験規模（使用動物数）を決める上で重要である。そこで、本年度は子宮肥大試験における antagonist 評価に関連したデータを収集し、考察した。その他、ガイドライン化する上での留意点についても考察した。

A. 研究目的

子宮肥大試験については、すでに OECD Validation Study が終了し、用いられた 4 種類いずれの protocol も弱いエストロゲン様作用を検出することができ、その再現性、検出感度、試験機関間での再現性等、満足できる試験法であり、さらに動物種、飼育条件、溶媒等の諸条件の幅を許容しうる robust な方法であることが確認されている。本試験法をガイドラインとして実用段階とする上で最終的に残されている問題点を抽出し、その解決策を検討する。

B. 研究方法

子宮肥大試験については、これまで膨大な報告がなされているが、試験に用いる動物種、週齢、投与経路等、試験条件が様々である。しかし、OECD Validation Study で用いられた protocol はこれらの報告等を詳細に検討して作成されており、過去に実施された試験データは OECD Validation Study の protocol に十分反映されていると考えられる。平成 14 年および 15 年度の調査研究では、本 protocol を検証した phase 1 および phase 2 の validation の結果を中心に整理することにより、本試験法の問題点を抽出し、その解決策を検討した。本年度は、本法を実用化する上で残された問題点について Validation Study の後に得られたデータを中心に収集し、考察

することとした。

C-D. 研究結果、考察

OECD Validation Study では、4 種類の protocol (①幼若ラット, 3 日間経口投与, ②幼若ラット, 3 日間皮下投与, ③卵巣摘出成熟ラット, 3 日間皮下投与, ④卵巣摘出成熟ラット, 7 日間皮下投与) について、phase 1 では、強力なエストロゲン様作用を有する ethynyl estradiol (EE) および抗エストロゲン様物質である ZM189.154, phase 2 では、弱いエストロゲン様作用を有するとされる methoxychlor, bisphenol A, genistein, o,p'-DDT, nonylphenol および negative control として di-n-butyl phthalate, 陽性対照として EE を用いて実施された。いずれの protocol も弱いエストロゲン様作用を再現性良く検出することができ、実用上の幅を許容しうる robust な方法であることが確認できたが、同時に、飼料中の植物性エストロゲンの影響等、幾つかの注意すべき点あることも明らかになった (mini-monograph "The OECD Validation of the Uterotrophic Bioassay" 1,2,3,4,5)。これまで、この Validation の結果を中心に整理することにより、本試験法の問題点を抽出し (飼料中の植物性エストロゲンの影響, 動物種および系統, false positive および false negative, 用量設定等), その解決策を検討してきた。

本年度は、本法を実用化する上での残された問題点として、estrogen antagonist への適用を取り上げ、検討を加えた。OECD Validation Study においても antagonist については、強力な pure antagonist である ZM189.154 を用いて実施したのみであり、弱い antagonist についての検証はなされていない。また、EE による子宮重量の増加を estrogen agonist が抑制する可能性があり、estrone による子宮重量の増加を testosterone propionate, progesterone 等が抑制するとの報告もある⁶。また、実用的には、antagonist 評価をどの程度組み込むかが試験の群構成を決める上で重要であり、本試験法の in vivo スクリーニング試験という位置付けから、試験規模（使用動物数）をどのようにして最小限に抑えるかという点から考えても影響が大きい。そこで、本年度は子宮肥大試験における antagonist 評価について、Validation Study の後に得られたデータを中心に収集し、考察した。その他、今回収集したデータを基に、ガイドライン化する上での留意点をまとめた。

antagonist 評価

Yamasaki 等は、OECD Validation Study の protocol のうち、幼若ラット、3 日間皮下投与の protocol を用いて alkyl phenol, phenol 誘導体, benzophenone 誘導体, androgen 誘導体等の 55 化合物について子宮肥大試験を実施し、in vitro スクリーニング試験法である receptor-binding assay あるいは reporter gene assay との比較を行なっている^{7,8,9,10}。このうち 32 の化合物については、子宮肥大試験において agonist 活性の他、同時に EE を投与する antagonist 活性についても評価している。その結果、32 化合物中 20 の物質で EE による子宮重量の増加が抑制された。これらの化合物は、いずれも estrogen 活性が陽性であり、EE の estrogen 活性を抑制する用量も両者で概ね一致しており、用量依存性も認められた。しかしながら、中には 4,4'-biphenol

のように低、中用量で EE の estrogen 活性を抑制するが、最高用量では影響しないという例も見られた。

EE による子宮重量の増加が抑制されなかった化合物は、主に agonist 活性の弱いものであったが、中には 4-(1-Adamantyl)phenol のように強い estrogen 活性が認められるものもあった。なお、testosterone enanthate, methyltestosterone のアンドロジェン誘導体に estrogen agonist 活性が認められたが（但し、それぞれ 2 mg/kg, 10 mg/kg）、EE による子宮重量の増加を抑制しなかった（いずれも 40 mg/kg）。

In vitro 試験法との比較では、子宮肥大試験において agonist 活性が認められ、EE の estrogen 活性を抑制した 10 化合物について reporter gene assay (ER-alpha) を実施しているが、すべて agonist 活性が認められたのに対し、antagonist 活性が認められたのは、僅か 1 化合物であった。この結果は、antagonist 評価には、化学物質の代謝等も含めて評価が可能な in vivo 試験が必要であることを示している。

また、Ohta 等は、卵巣摘出マウス、7 日間の経口および皮下投与により、bisphenol 他、21 物質について agonist および antagonist 活性の評価を行なった¹¹。その結果、bisphenol A を含む 5 物質で agonist と antagonist の作用を示し、6 物質では antagonist 活性のみが認められた。なお、agonist 活性のみが認められた例はなかった。

以上の結果から、antagonist 活性の評価は、in vitro スクリーニング試験である reporter gene assay では困難であり、子宮肥大試験の中で実施することが必要であり、また、単一用量では antagonist 活性を見落とす可能性があり、agonist 活性評価と同様、複数群を設定する必要があると考えられる。

ガイドライン化する上での留意点

- ① 対照群の子宮重量と使用する飼料について
1) 項の antagonist 評価の中で取り上げた

Yamasaki 等および Ohta 等の報告では、1 群 6 例の動物を用いているが、溶媒対照群の平均子宮重量は幼若ラットで 24.6-48.4mg (n=55)、卵巣摘出マウスで 7.0-11.5mg (n=40) とそれぞれ 50 mg あるいは 15 mg 以下であった。飼料には、それぞれ MF (馴化期間中は CRF-1)、CE-2 を使っているが、OECD validation phase2 の中で測定した total genistein equivalent 値 (TGE, 子宮肥大試験での活性により DN および CM の GN との換算比を決め GN 量として標記) は、いずれの飼料もロット差が大きく、また、最大の TGE 値を示すロットは試験系に影響を与える可能性のある濃度 325-350 μ g/g diet に近い。しかしながら、今回の結果から、これらの TGE 含量の比較的高い飼料であっても、使用する試験機関が、数ロットにわたって使用した場合の子宮重量の背景データを揃えており、対照群の平均子宮重量が一定の範囲に入り、陽性対照の反応性が確認されれば、試験は成立すると判断しても良いと考えられる。但し、背景データの乏しい試験機関で実施する場合には、予め使用する飼料中の TGE 値を測定し、最終的には、対照群の子宮重量で試験の成立を確認することが必要と考えられる。なお、基準として、平均子宮重量が OVX-adult ラット、幼若ラット、OVX-adult マウスで、それぞれ 120 mg, 50 mg, 15mg 以上のデータは、試験系に何らかの問題があったとし、不採用とすべきと考えられる。

② 用量設定および群構成

予め *in vitro* 試験成績あるいは他の安全性試験成績が得られる場合には、用量設定試験の実施および用量設定はその成績を考慮すべきである。参考にすべきデータがない場合の用量設定試験では、1 群あたりの動物数を 3、公比約 5 で 3 群の規模での実施が適当と考えられる。経口投与試験であれば、最高用量を 1000 mg/kg、以下 200 および 40 mg/kg とする。測定項目としては、一般状態、体重の他、幼若動物を用いる場合には子宮重量も測定することが望ましい。

本試験の群構成については、antagonist についても agonist と同様に複数群設定する必要があるが、スクリーニング試験という位置付けから、試験規模 (使用動物数) は最小限に留めるべきである。したがって、被験物質については公比約 3 で、agonist, antagonist 用に各 3 用量設定し、これに溶媒対照群、antagonist 評価用対照群、陽性対照群各 1 群を加えた 9 群構成、1 群あたりの動物数は 6 が基本的な構成となる。

その他

2005 年 1 月末に EDTA 8 が開催される。この中で EDTA は子宮肥大試験の validation についての revised draft Peer Review Report (validation に関する未解決の問題も含む) について考察し、次のステップについて提言する予定とのことである。

E. 結論

本年度は子宮肥大試験における antagonist 評価に関連したデータを収集し、考察した。*in vitro* スクリーニング試験である reporter gene assay では antagonist 活性の評価は困難であり、子宮肥大試験の中で実施することが必要と考えられた。また、agonist 活性は認められずに antagonist 活性のみが認められる例や、低・中用量で認められた antagonist 活性が高用量では認められない例もあることから、単一用量では antagonist 活性を見落とす可能性があり、agonist 活性評価と同様、複数群を設定する必要があると考えられた。その他、ガイドライン化する上での留意点として、対照群の子宮重量と使用する飼料、用量設定ならびに群構成について纏めた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 幼若雌性ラットを用いた子宮肥大試験における遺伝子発現変化

片山誠一，岡村隆之，永井賢司
第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会
(p242, 2002 年)

2) 幼若雌性ラットの子宮におけるエストロジ
エン応答遺伝子の発現に及ぼすエチニルエス
トラジオールの影響

片山誠一，芦沢幸二，永井賢司
第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会
(p208, 2003 年)

3) 幼若雌性ラットの子宮におけるエストロジ
エン応答遺伝子の発現に及ぼす ethynyl
estradiol, genistein, methoxychlor および
ICI182, 780 の複合効果

片山誠一，芦沢幸二，永井賢司，山本由徳，
大保真由美，秋山賢之助，山下保志
第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会
(p303, 2004 年)

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

(参考文献)

- Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. 2001. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *in Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1. Environ Health Perspect 109:785-794
- Owens W and Koeter BWM. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: An Overview. Environ Health Perspect 111:1527-1529
- Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase 2: Dose-Response Studies. Environ Health Perspect 111:1530-1549
- Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase 2: Coded Single-Dose Studies. Environ Health Perspect 111:1550-1558
- Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase 2: Dietary Phytoestrogen Analyses. Environ Health Perspect 111:1559-1567
- Edgren RA and Calhoun. 1957. Estrogen Antagonism: Inhibition of Estrone-Induced Uterine Growth by Testosterone Propionate, Progesterone and 17-ethyl-19-nortestosterone. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94: 537-539
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Yakabe Y, Sawaki M, Imatanaka N, Takatsuki M. 2002. Comparison of reporter gene assay and Immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. Toxicology 170: 21-30
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Sawaki M, Imatanaka N, Shinoda K, Takatsuki M. 2003. Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. Toxicology 183: 93-115
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Yakabe Y, Sawaki M, Takatsuki M. 2003. Comparison of the reporter gene assay for ER-alpha antagonists with immature rat uterotrophic assay of 10 chemicals. Toxicol. Lett. 142: 119-131
- Yamasaki K, Noda S, Imatanaka N, Yakabe Y. 2004. Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. Toxicol. Lett. 146: 111-120
- Ohta R, Tazura Y, Miyahara T, Marumo H. 2005. The Mouse Uterotrophic Assay. 秦野研究所年報 (in press)

21. 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 所長

研究要旨 国内における Hershberger 試験に関しては、ガイドライン化の最終的な試験となる OECD Validation phase 3 が 3 機関（食品薬品安全センター、日本バイオアッセイセンター、化学物質評価研究機構）で実施されている。試験自体はすでに終了しており、今後は日本としてのデータの取りまとめ、OECD への提出の手順で進むものと考えられる。一方、海外での動向については今回試験開発の中心であるドイツでの情報収集を行った。欧州では 4 機関、そのうちドイツでは BASF と Bayer の 2 機関が Phase 3 に参加し、平成 16 年早々に試験を実施する予定である。Phase 3 の試験結果は次回の OECD の VMG 会議で議論される予定である。しかし、ガイドライン化の最大の問題は OECD における *in vivo* 試験の担当者が不在であることである。なお、平成 16 年度において当試験のガイドライン化に影響する論文は出されていない。

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。また、OECD ガイドライン化に寄与する。

B. 研究方法

国内では phase 3 の進捗状況について各機関（食品薬品安全センター、日本バイオアッセイセンター、化学物質評価研究機構）間で情報交換を行った。

海外の状況については、OECD の試験開発で中心的な役割を担っているドイツの企業等を訪問し、本試験の OECD ガイドライン化の動向、さらには試験自体の問題点を調査した。なお、調査は以下の点を中心に実施した。

1) Hershberger assay における Phase 3 への対応状況 (BASF, Bayer)

2) Phase 3 の幼若動物を使用する方法についての考え方 (BASF, Bayer)

3) 今後の OECD ガイドライン化への動き (BASF, Bayer)

4) Hershberger assay での甲状腺機能障害の検索検討への可能性 (Bayer, Universi. Berlin ; ただし Universi. Berlin は急用不在のため面会が出来なかった)

一方、公表化されている論文について文献調査を実施し、ガイドラインに関連するかどうかを中心に調査した。

C-D. 研究結果及び考察

① 日本における Validation phase 3 試験 : 3 機関共に添付資料 1 のプロトコ

ルに従い試験を実施し、試験は終了している。今後はこの結果をまとめ、OECDに提出する予定である。また、日本としてOECDに貢献していることを示すためにも公表する必要性があると考えられる。

②ドイツにおける調査結果は以下に記載する。

1) Hershberger assayにおけるPhase3への対応状況

欧州では4機関、その内ドイツでは2研究機関(BASF, Bayer)が参加している。試験自体は幼若ラット、去勢ラットを使用した試験ともに2004年後半、2005年の初めから開始する予定である。試験自体の遂行に問題はない。

2) Phase3の幼若動物を使用する方法についての考え方

Phase3は大きく2つに分けられる。

一つは従来OECDで進めていた去勢ラットを使用したHershberger assayによるvalidation試験である。

他は幼若ラットを使用したHershberger assay(改良Hershberger assay)の検討である。改良Hershberger assayは2003年のOECD VMGにおいて、Dr. Ashby(英国、Syngenta)から提案された。従来Hershberger assayは去勢ラットを使用していたが、改良型では幼若ラット(生後21-24日齢)を使用し、antagonistとしてTestosterone propionate (TP)を使用するのが要点である。2003年のOECD VMGでは改良型Hershberger assayを検討することを決定した。手順としては、すでにOECDで去勢ラットを使用したPhase1, 2を終了している方法に準じ、

TPの用量設定、FlutamideとTPの組み合わせ、agonist(trenbolone), antagonist(linuron, *p, p'*-DDE)を使用した用量試験、コード化した物質によるvalidation試験であり、結果を去勢ラットとの比較を実施する。

今回は改良Hershberger assayについて調査し、以下の情報を得た。

- ・この改良型は動物愛護の観点により検討された試験法である。

- ・提案の大きな理由は、去勢の面倒さにある。

- ・Phase3の成績をみなくては、なんとも言えない。

- ・英国はこれを推奨するだろう。

- ・米国はHershberger assay自体は有用な試験であると思っている。

また、日本としての意見を述べた。

- ・予算、さらには今までの経過から幼若ラットを使用したHershberger assayには参加しない。

- ・去勢ラットを使用したPhase3には日本から3機関(食品薬品安全センター、日本バイオアッセイセンター、化学物質評価研究機構)が参加している。今年度内に試験は終了し、そのデータについて公表する予定である。

3) 今後のOECDガイドライン化への動き

- ・次回のVMGは2005年の春以降であろうが、明らかな情報はない。

- ・2005年の春にはPhase3のデータが揃うか疑問である。そうなると、解析を含

め、早くて、2005年の秋、遅くて2006年の春でガイドライン化が具体化するのではないか。

・OECD事務局のVMG-animal担当者については検討されているが、具体的には決定されていない。

・特に問題なのはOECDでの担当者がいないことである（Bayerではno power OECDと表現していた）。

4) Hershberger assayでの甲状腺機能障害の検索検討への可能性

内分泌かく乱作用の一つである甲状腺機能障害を、Hershberger assayでも検出の可能性があるという説明を行った。これについてはすでに住友化学、化学物質評価研究機構（添付資料2）で報告している。以下の意見があった。

・Hershberger assayを甲状腺の機能障害について利用する方法については、驚く研究者ひともいたが、すでに論文で周知している人もいた。

・スクリーニングとしての可能性はあるとの意見があり、10日間の投与ということが可能性の一つのポイントである。

・今後は更なる甲状腺障害を引き起こす物質を使用した試験が必要との意見があった。

5) その他

・REACHの動き（BASF資料参照）；ヨーロッパではREACHの動きが活発化していた。Hershberger assay、Uterotrophic assay、enhanced TG407、さらには確定試験を含め、内分泌かく乱物質検出試験のみならず様々な試験を組み合わせ化学物質に対

する安全性の試験を見直すというものである。見直し作業は2006年に開始し、まずは既存物質に関し安全性を見直すというものである。これは法律下で行われるものである。欧州の各国はこの動きに注目している。

この法律が施行された場合、生産者側の安全性の確保義務が生じ、多大の経費が必要となる。ドイツでは約20%の中小企業が経営不振になるという予想である。また、試験法を含めOECDとのジョイントはないだろうということであった。

②文献調査：平成16年度に公表された論文、学会発表について調査した。OECDガイドライン化に関する論文はみられなかった。すでに16年度以前にPhase2についての一部の結果が公表されているため、少なくなったものと考えられる。今後、phase3の結果が出た後には、論文の公表もあるものと考えられる。

E. 結論

国内におけるHershberger試験に関しては、OECD Validation phase 3に3機関（食品薬品安全センター、日本バイオアッセイセンター、CERI）が参加し、すでに試験は終了している。今後はデータの取りまとめ、OECDへの提出の手順で進むものと考えられる。一方、海外での動向については今回試験開発の中心であるドイツでの情報収集を行った。ドイツではBASFとBayerの2機関がPhase3に参加し、平成16年早々に試験を実施する予定である。また、欧州では内分泌かく乱物質検出系の試験を含め、各毒性試

験を組み合わせ化学物質に対する安全性の試験を見直すという REACH が話題になっていた。平成 16 年度において当試験のガイドライン化に関する論文はみられなかった。

G. 研究発表

1. 発表論文

1) 雑誌

① Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Muroi T, Takakura S, Mitoma H, Sakamoto S, Nakai M, Yakabe Y. Comparison of the Hershberger Assay and Androgen Receptor Binding Assay of Twelve Chemicals. *Toxicology*, 195, 177-186, 2004

② 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.

③ Yamasaki K, Takeyoshi M, Yakabe Y, Sawaki M, Imatanaka M, Shinoda K and Takatsuki M. Immature Rat Uterotrophic Assay of 18 Chemicals and Hershberger Assay of 30 Chemicals. *Toxicology*, 183: 95-115, 2003.

2. 学会発表

① OECD validation of the Hershberger assay in Japan: Phase 2-Dose response of methyltestosterone, vinclozolin and *p,p'*-DDE, EUROTOX, 2003.

OECD Protocol and Guidance for the SURGICAL CASTRATE
PERIPUBERTAL MALE Rodent Hershberger BIOAssay

**Model Protocol and Guidance for Phase-3
of the OECD Work to Validate the Rodent Hershberger Bioassay**

INTRODUCTION

1. The overall aim of the validation program is to demonstrate that the Hershberger bioassay is a reliable and reproducible bioassay that can be considered as the basis for an OECD Test Guideline. This document provides the essential requirements for Phase-3 of the OECD program on the validation of the rodent Hershberger bioassay using the surgically castrated pubertal male. Detailed laboratory protocols for the OECD validation program are to be built on the requirements, recommendations, and options contained in this document.

2. The precursor of the rodent Hershberger bioassay was first developed in the 1930s and included various tissues of the male reproductive tract (1) (2) (3), including the ventral prostate, the seminal vesicles with coagulating glands, the Cowper's glands, the glans penis, and preputial glands. The measurement of the levator ani and bulbocavernosus muscles were subsequently investigated in the 1940s (3) (4). After publication of work with an extensive number of compounds by Hershberger *et. al.* in 1953 (5), the procedure has been commonly referred to as the Hershberger bioassay.

3. The Hershberger bioassay is an *in vivo* short-term assay similar in concept to the rodent uterotrophic bioassay. Both procedures measure changes in specific tissues that normally respond to endogenous hormones. The bioassay conditions are designed to achieve low endogenous hormone levels and employ target tissues that are highly responsive to administration of exogenous hormones. The focus of the Hershberger bioassay is on the detection of compounds that may interfere with endogenous male sex hormones. This includes other androgens, androgen antagonists and 5 α -reductase inhibitors. The objective in phase-3 of the validation of the surgical castrate is to assess the bioassay's reliability and relevance of the assay using coded substances and negative compounds.

4. The Hershberger and uterotrophic bioassays are both being validated by OECD as potential short-term screens. The information generated by these bioassays can be used to build on that already available, e.g. from relevant *in vitro* screens to narrow the field of

chemicals that may need longer-term animal testing. This current protocol is based on the standardisation and optimisation work performed under OECD auspices in Phase-1 and Phase-2 of the Hershberger validation.

PREVIOUS VALIDATION WORK

5. The OECD program on the Hershberger assay has previously demonstrated the response and the reliability of measuring male sex accessory glands and tissues, i.e., ventral prostate (VP), seminal vesicles with coagulating glands (SVCG), the levator ani and bulbocavernosus muscles (LABC), the Cowper's (or bulbourethral) glands (COWS), and glans penis (GP). Test substances used in Phase-1 and Phase-2 included testosterone propionate (TP) (CAS No. 57-85-2), Flutamide (FLU) (CAS No: 1311-84-7), trenbolone (TREN) (CASRN 10161-33-8), Vinclozolin (VIN) (CASRN 50471-44-8), Procymidone (PRO) (CASRN 32809-16-8), linuron (LIN) (CASRN 330-55-2), *p,p'*-DDE (DDE) (CASRN 72-55-9), Finasteride (FIN) (CASRN 98319-26-7). The assay was robust and reproducible across laboratories in the presence of several variations, e.g., strain of rat, diet, and modest variations in the age of castration. The protocol was successful in detecting increases in the weights of the accessory sex organs and tissues in response to androgens and detecting decreases due antiandrogens. There was good agreement among laboratories with regard to the dose responses obtained (6)(7).

INITIAL CONSIDERATIONS AND PRINCIPLE OF THE ASSAY

6. The rodent Hershberger assay is based on changes in the weights of androgen-responsive male sex accessory tissues in peripubertal, surgically castrated male rats. Accessory sex tissues and glands depend upon androgen stimulation to gain and maintain weight during and after puberty. If endogenous sources of androgen (the testes) are removed, the biological activity of exogenous substances can be assayed by the increase (agonist response) in the weights of these sex accessory tissues or by blocking (antagonist response) the activity of administered androgens and by preventing an increase in the weights of these sex accessory tissues. The rodent Hershberger assay then evaluates the ability of a chemical to show biological activities consistent with the agonism or antagonism of androgens (e.g., testosterone and dihydrotestosterone).

7. The surgical castrate protocol uses male rats approaching sexual maturity (peripuberty). The animals are castrated by removing both testes and epididymes (orchidoepididymectomy). In most laboratory strains, such as the Sprague Dawley, Long Evans, or Wistar rats, peripuberty is expected to take place at approximately 6 weeks of age, within an expected age range of 5-7 weeks. Peripuberty is marked by prepuce separation

from the glans penis. Prepuce separation is necessary so that the GP can be properly dissected and accurately weighed. At the peripubertal stage of sexual development, the GP and other androgen-dependent sex accessory tissues are sensitive to androgens, having both androgen receptors and appropriate steroidogenic enzymes. The advantage of using this age of rodent is that the sex accessory tissues have a high sensitivity and small relative weight, which minimises variation in responses between individual animals. In addition, castration removes the ability to produce and to secrete testosterone (T), breaking the hypothalamic-pituitary-gonadal feedback loop and providing for regression of tissue weights to a lower baseline. As a result, serum T levels are severely reduced (some synthesis may occur in the adrenals).

Primary objectives of Phase-3 of the validation program are to demonstrate:

The reliability of the Hershberger bioassay to respond to and to identify coded positive and negative substances.

The relative effectiveness of the different sex accessory tissues and glands in the assay.

The reproducibility of the bioassay over time by comparing appropriate data to that generated in Phase-1 and Phase-2.

Continue the investigation of the value of the five accessory tissues and glands

9. The test substances will be coded and administered to groups of six animals ($n = 6$) for 10 consecutive days. The animals will then be necropsied approximately 24 hours later on the 11th day. After dissection, the weights of the designated sex accessory tissues will be measured.

10. In addition to the sex accessory tissues, daily body weights, including at necropsy, are mandatory measures to allow precise dose administration, to provide information on the general health and well being of the animals, and so that body weight can be used as a statistical covariable. The liver, adrenal and kidney weights are optional measurements that may provide supplementary information about the systemic toxicity, target organs and other effects of the test substance.

Androgen agonists

11. Biological activity consistent with androgen agonists is tested by administering a test substance to immature castrated rats for 10 consecutive days. The positive control for the tissue responses is TP. The vehicle is the negative control. The weights of the sex accessory tissues of the test chemical groups are compared to the vehicle group for a statistically significant increase in weight.

Androgen antagonists

12. Biological activity consistent with androgen antagonists and 5-alpha reductase inhibitors is tested by administering the test substance to immature castrated rats for 10 consecutive days together with a reference androgen agonist, TP. Administration of TP alone is the negative control. FLU is coadministered with TP to another group as a positive control. The weights of the sex accessory tissues after co-administration of the test chemical and the reference androgen TP together are compared with the weights of tissues of the reference androgen TP alone for a statistically significant decrease in weight.

DESCRIPTION OF METHOD/PREPARATIONS FOR THE TEST

Animal Species and Strain

13. This protocol allows laboratories to select the strain of rat to be used in the validation of the assay. The selection should be the strain used historically by the participating laboratory, but should not include strains like the Fisher 344 rat. The Fisher 344 rat has a different timing of sexual development compared to other more commonly used strains such as Sprague Dawley or Wistar strains. Where the screening assay may be preliminary to a repeated dose oral study, a reproductive and developmental study, or a long-term study, preferably animals from the same strain and source should be used in all studies. If a laboratory is planning to use an unusual rat strain, or one unique to their own facility, they should determine whether the sexual development criteria noted under the section, *INITIAL CONSIDERATIONS AND PRINCIPLE OF THE ASSAY*, are met.

Castration

14. After an initial acclimatisation period to ensure that the animals are health and thriving, the animals are castrated under anesthesia by placing an incision in the scrotum and removing both testes and epididymes with ligation of blood vessels and seminal ducts. After confirming that no bleeding is occurring, the scrotum should be closed with suture or autoclips. If castrated animals are purchased from an animal supplier, the age of animals and stage of sexual maturity should be assured by the supplier. The time between castration and initiation of dosing will be counted as part of the acclimatisation period. Animals should be castrated on pnd 42 or shortly thereafter, not before, based upon when the animals are expected to achieve full preputial separation by the first day of test substance administration.

Acclimatisation after castration

15. Healthy young animals should be acclimatised to the laboratory conditions for a

minimum of 7 days following castration. Animals will be observed daily, and any animals with evidence of disease or physical abnormalities will be removed. The treatment with initiation of dosing (on study) may commence as early as pnd 49 days of age, but preferably not later than pnd 60. This flexibility allows a laboratory to schedule the experimental work efficiently, and for different strains and sources of animals to achieve full preputial separation.

Housing and feeding conditions

16. Temperature in the experimental animal room should be 22 °C ($\pm 3^\circ$). The relative humidity should be 50 to 60%, but should not exceed limits of 30 to 70% except during room cleaning. Lighting should be artificial, the photoperiod being 12 hours light, 12 hours dark.

17. Laboratories participating in the validation should use the laboratory diet normally used in their chemical testing work. In previous phases, no effects or variability were observed that were attributable to the diet. The diet used will be recorded and a sample of the laboratory diet will be retained for possible future analysis. Both diet and drinking water will be supplied *ad libitum*.

18. Animals should be caged in groups of no more than 3 similarly treated rats per cage, giving a minimum of 2 cages of 3 rats/cage per treatment group. Three animals or less per cage will avoid crowding and associated stress with animals of this age that may interfere with the hormonal control of the development of the sex accessory tissue. Individual housing of animals is permitted. Cages should be thoroughly cleaned to remove possible contaminants and arranged in such a way that possible effects due to cage placement are minimised.

19. Each animal will be identified individually (e.g., ear mark or tag). The method of identification will be recorded.

Body Weight and the selection of animals for the study

20. Increasing differences in body weight may be a source of variability in the weight of tissues of interest within and among groups of animals. Variations in body weight should be both experimentally and statistically controlled, and the statistical analysis should be done both with and without body weight as a covariate. As toxicity may also impact the body weight, the body weight on the first day of administration can be used as the covariate in those cases where significant reductions in body weights has occurred.

21. Experimental control of body weight is accomplished in two steps. The first step involves selection of animals with relatively small variation in body weight for the study cohort from the larger population of animals that have been supplied. Unusually small or large animals should be avoided and should not placed in the study cohort. A reasonable

level of body weight variation within the study cohort should be tolerated. Here, $\pm 20\%$ of the mean body weight for the cohort population is judged to be reasonable (e.g. $175\text{g} \pm 35\text{g}$). The second step involves the assignment of animals to different treatment groups ($n = 6$) by a randomised complete block approach. Under this approach animals are randomly assigned to treatment groups so that each group has the same mean and standard deviation in weight at the beginning of the study. The procedure used for block randomization should be recorded.

Non-routine health and safety requirements

22. The test substances are possible reproductive and developmental toxicants and, therefore, appropriate precautions should be taken to protect personnel during the validation work, e.g. necessary training, labeling and storage procedures, and protective handling procedures during dose preparation and dose administration.

23. Appropriate precautions such as wearing protective gloves, protective clothing and eye protection will be taken when handling the animals, diets, cages, and wastes (e.g. remaining test solutions, faeces, and carcasses). Waste disposal will be in accordance with good practice and existing regulations applicable to a given laboratory.

PROCEDURE – HERSHBERGER VALIDATION PHASE-3

24. The following procedure is based on the previous validation work in Phase-1 and Phase-2.

Reference substances, vehicle, and route of administration

25. The reference androgen agonist will be TP. The reference androgen antagonist will be FLU.

26. All participating laboratories should use a vehicle, such as stripped corn oil, that is not easily disposed to potential microbial degradation of the vehicle or the reference and test substances. If the dosing samples are not made daily, care should be taken to preserve and to avoid contamination and spoilage of the samples.

27. The selected route of administration for the reference and coded test substances in Phase-3 are:

Testosterone propionate subcutaneous injection

Flutamide per os (oral gavage)

All coded test substances per os (oral gavage)

Test substances in Phase-3 of the Hershberger validation

28. The test substances for Phase-3 with the exception of TP and FLU will be supplied coded to each laboratory. There will be a set of four coded samples for the agonist studies and six coded samples for the antagonist studies. Each sample will be administered to a group of animals (i.e., it will not be used for a dose series, but administered as a single specified dose). A minimum of four laboratories will conduct each study.

Test groups in Phase-3 of the Hershberger validation

29. 6 animals of the same age and cohort will be used for the vehicle, TP, any other control group, and each coded treatment group.

30. In one set of studies, the response of the sex accessory tissues and glands to coded agonist samples will be studied. This work will involve four coded test groups having prepared doses of the test substances and one vehicle control group. The doses of positive agonist test substances will be the same as one or more of the doses used in Phase-2 to assess assay reproducibility. The negative test substances will be used to assess the bioassay's false positive rate with agonists. Laboratories may voluntarily choose to include a positive control of the using same TP dose that used by the laboratory in Phase-2 (0.2 mg/kg/d TP was used in seven laboratories and 0.4 mg/kg/d TP was used by nine other laboratories).

31. In a second set of studies, the response of the sex accessory tissues and glands to coded antagonist samples will be studied. This work will involve six coded test groups having prepared doses of the test substances with the coadministration of a selected dose of the reference agonist TP to each group. The reference TP doses will be the same as that used by the laboratory in Phase-2 (0.2 mg/kg/d TP was used in seven laboratories and 0.4 mg/kg/d TP was used by nine other laboratories). The doses of positive test antagonist substances will be the same as one or more of the doses used in Phase-2 to assess assay reproducibility. The negative test substances will be used to assess the bioassay's false positive rate with antagonists. Laboratories may voluntarily choose to include a vehicle control and a positive control of the same TP dose coadministered with 3 mg/kg/d FLU.

Doses in Phase-3 of the Hershberger validation

32. All participating laboratories will use the same dose levels in order to support comparisons of the assays reproducibility with previous and current work. The following table provides the requirements and includes both mandatory and possible voluntary groups.