

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
研究協力者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室 室長
研究協力者 桑形麻樹子 食品薬品安全センター秦野研究所毒性部 研究員

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。本年度は、enhanced-TG-407 における現状の試験法の問題点について、2 回にわたって実施されたバリデーションテストの結果報告をもとに調査を行った。

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や enhanced Test Guideline 407 により、スクリーニングとしての効率化を高めることなどにより、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

今年度は、5th Meeting of the Validation Management Group for Mammalian Testing (4-5 April 2006) で検討される予定の Phase 2 validation をとりまとめたレポートについて、このプロジェクトで得られた成果の要点の整理と今後に向けた方策についての考察を行った。

(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. 研究結果

1. 背景

28 日反復毒性試験 (TG-407) は OECD によって 1981 年に施行され、1995 年に見直しされ

ている。もともと TG-407 は一般状態の変化、感覚器官あるいは神経系への影響、血液および血液生化学検査、剖検所見、器官重量、主要な器官・組織の病理組織学検査からなる試験である。一般的な毒性の評価はできるが、ある特定の機序(作用)を検出するための試験デザインではない。内分泌作用それ自身は毒性のエンドポイントとされていないが、これは古典的な生殖発生毒性を起こす機序となる。自然界や産業界からの環境化学物質は環境中レベルで内分泌機能に作用するかもしれないことや、野生動物やヒトの生殖発生、あるいは他の組織に影響を及ぼすことが懸念されはじめたことから、TG-407 にこうした影響を検出できるエンドポイントを組み込むことになったのである。

2. Phase-1 ; 第 1 回バリデーション

Phase-1 は 1999 年の夏に行われた。ドイツの研究所が先導となり、full enhanced-TG407 のプロトコールを作成した。さらに日本と韓国から 5 つの研究所がボランティアとして参加し、flutamide (FLU), ethynylestradiol (EE), propyl-thiourea (PTU), methoxychlor, tamoxifen (TAM), methyltestosterone (MT) を用いて試験を実施した。1999 年 12 月、ドイツの Wuppertal で代表会議が開催され、phase-1 の結果について検討した。EDTA (endocrine disrupters testing and assessment) および

VMG (validation management group)の賛同の基にプロトコルを改良し phase-2 を行うことが決定した。

Phase-1 には、以下の観察項目が含まれていた。

- 1) 器官重量測定；副腎、卵巣、精巣（左右別に測定）、精巣上体、精嚢腺（凝固腺を含む）、前立腺（腹側葉と背側葉に分けて測定）、子宮、甲状腺
- 2) 病理組織検査；下垂体、膣、片側の精巣上体、精嚢腺（凝固腺を含む）、乳腺
- 3) 血清ホルモン濃度；LH、FSH、prolactin、testosterone、17beta estradiol、corticosterone、T3、T4、TSH
- 4) 精子検査；精子数、形態、運動能
- 5) 性周期；膣スメアによる性周期の観察（少なくとも2周期を観察）

Phase-1 の結果を基に、以下の点について検討された。

- 1) 病理組織学検査；病理組織学検査が最も感受性が高く、ホルモン作用を検出するのによいエンドポイントであった。即ち、ホルモン濃度（活性）、器官重量、性周期に影響が認められていない用量で病理所見が観察されている。
- 2) 精子検査；精子形態観察以外、精子数および精子運動能検査の有用性は低いと合意された。精子運動能と精子形態観察は最も時間と費用がかかる項目であった。精巣の病理組織検査は精子検査よりも検出力は高かったことから、精巣の病理組織検査を実施する場合に精子検査は必要ないと考えられた。しかし、詳細な成熟精子の形態観察については病理組織検査では限界があることから、引き続き enhanced TG-407 では精子形態観察が導入されている。
- 3) FOB（詳細な一般状態観察）；FOB の実施時期や FOB 対象用の動物の確保は、試験を扱いにくくする要素であり、論理的に難しいことが論じられた。FOB の実施時期は、膣スメア観察による性周期観察後に開始し、発情休止期にメスを解剖するまで実施することとした。

4) ホルモン測定；少数施設が in-house にてホルモン測定を実施した。しかし、同群内での動物間での値のばらつきが大きかった。サンプリングのタイミングが施設間あるいは試験内においても異なっていることから、ストレスやサーカディアンリズムへの影響が指摘された。統計学的にも検出されず、感受性の低いエンドポイントであった。甲状腺ホルモン以外の他のホルモン測定は phase-2 では推奨されなかった。ホルモン測定はしばしば外注となり費用がかさむタスクである。

5) 性周期；膣スメア採取は時間を要する項目である。TG-407 では比較的若い週齢の動物を使用することから、性周期は落ち着いていないかもしれない。また、病理組織学所見と膣スメアによる性周期のステージングが一致しない例が多数あった。しかし、phase-2 においても、性周期観察は導入された。

6) 新鮮標本／固定標本における器官重量測定、および副生殖器の採取；下垂体と甲状腺については、組織が小さいために採取の際のトリミングが困難であることから、固定後に重量を測定することとした。雄の副生殖器については固定後に重量を測定する必要はないとされた。FLU の結果では、分割しなかった副生殖器全部の重量測定は感受性のあるパラメータのようであった（後に、分割し、それぞれの器官の重量を測定している）。複数の機序がそれぞれの器官特異的に作用しているかもしれないことも考慮に入れて、Phase-2 では雄の副生殖器はそれぞれ分割して（前立腺を腹側葉と背側葉に分割）器官重量を測定することが導入された。

7) 甲状腺の採取；甲状腺のトリミングは外側の層を傷つける可能性が高い。片側を重量測定に反対側を病理組織観察へ使用することにした。

8) 動物数；施設間内の変動および検出力をあげるためにいくつかの施設は各群片性5匹以上の群設定で実施した。Phase-2 では各群片性5匹ずつのサブグループを2つ設定し、サブグループごとに統計学的検討を実施後、2つのサブグループをあわせて各群片性10匹のグループ

として、再度、検定を実施することにした。

9) 用量；一般的にTG-407の試験では子宮 in vivo 試験やハーシュバガー試験のように特別な動物（幼弱動物、生殖器摘出動物）を用いない。したがって、高用量にはTG-407で使用する動物（無処置で若い成熟動物）で反応が検出できる用量を設定することとした。

10) 費用；enhanced-TG407を実施するには通常のTG-407の2倍は費用がかかる。ホルモン測定が外注になることが多いこと、精子運動能と精子形態検査に費用と労力がかかることがその要因である。適切な精子検査を実施するために解剖時には通常と比較して2～3人の追加人員が必要となり、雄の1日の可能な解剖匹数は20匹程度と作業効率の制限が発生する。

3. Phase-2；第2回バリデーション

Phase-2ではフランス、ドイツ、日本、韓国、スイス、イギリス、アメリカの7カ国から13施設が参加した。リードをとった研究施設はドイツのバイエルAGである。10化合物において2つの施設で同じ化合物、同じ用量で実施した。即ち、10化合物、計20本の試験がphase-2で実施された。また、被験物質の管理は1箇所で行い、同ロット、同容器を用いるなど、被験物質自体によるバイアスを最小限にした。被験物質の情報は開示し、情報が足りない場合はペアーを組んだいずれかの施設で用量設定試験を実施し本実験における用量を設定した。各参加施設は現行の28日反復投与試験でそれぞれの施設で使用しているラットの系統、餌、巢材、媒体などを使った。また、FOBなどの観察項目の実施が試験を実施する上で何らかの障害になるかどうかを判断するために、full enhanced TG407試験を行った。ほとんど全ての参加施設がGLP下で実施し、最終報告書が各施設から提出されこのレポートが作成されている。

3-1. Phase-2の目的

Phase-2の目的は、内分泌調節を介しておこると考えられる毒性に対するTG-407の検出力

を増強させるために、現行と強化したエンドポイントと観察項目を評価することであった。

1) 現行の各群5匹から各群10匹に増やすことによる検出力の増強

2) 現行と追加されたホルモン感受性の器官重量、雌雄の生殖器の重量（精巣、精巣上部、前立腺、前立腺腹葉、前立腺背側葉、凝固腺を含む精嚢腺、卵巣、子宮、下垂体、甲状腺）の評価

3) 現行と追加されたホルモン感受性の病理組織学検査（精巣、精巣上部、前立腺腹葉および背側葉、凝固腺を含む精嚢腺、卵巣、子宮、下垂体、甲状腺、乳腺）の評価

4) 精巣上部尾部における精子数および形態の評価

5) 血中甲状腺ホルモン（T3, T4, TSH）の評価

6) 膣スメアによる性周期の観察により、ある特定の性周期で雌動物の解剖日の設定をすることによりエストロゲン作用による子宮、卵巣重量、病理組織評価への影響を最小限にする。

7) なお、群構成は4群に設定する。

対照、無影響量（低用量群）、中程度の影響量（中間用量群）、最大耐性用量（最高用量群）

3-2. Phase-2において使用された被験物質10化合物

エストロゲン様物質；Ethinyl oestradiol (EE), genistein (GN), nonylphenol (NP)

抗エストロゲン様物質；Tamoxifen (TAM)

アロマトーゼインヒビター；CGS 13820B

アンドロゲン様物質；Methyl testosterone (MT)

抗アンドロゲン様物質；Flutamide (FLU),

p, p'-DDE

甲状腺毒性物質；Propylthiourea (PTU), 1-thyroxine (THY)

4. Phase-2の結果

Enhanced TG407のデータと結果は2つのラボ間で一致し再現性があった。即ち、Enhanced TG 407は内分泌かく乱作用を検出できたといえる。

4-1. 作用の強い(抗)エストロゲン様物質(EE, TAM, CGS)あるいは(抗)アンドロゲニック様物質(MT, FLU)を用いた試験

標的器官における被験物質の作用は本試験法において検出された。また、各群片性5匹の群構成においても双方のラボで検出できている。

EE, TAM, CGS, MT, FLUの標的器官および各群片性5匹の群構成においても双方のラボで検出できている。被験物質の影響は器官重量、雌雄の生殖器官の病理組織検査において検出されている。器官重量および下垂体の病理組織検査において変化が観察されたが、下垂体重量の変化は変動差が大きく、被験物質の機序に基づいた影響とはしばしば一致しなかった。

精子数と形態は多くの被験物質で悲感受性であった。精子数や形態に影響が検出されたのは最高用量群か、あるいは器官重量や病理組織学検査においても影響が認められている。

4-2. ポテンシャルの弱いエストロゲニック様物質(GN, NP)あるいは抗アンドロゲニック様物質(DDE)を用いた試験

GN, NPを用いた試験ではこれらの被験物質の影響を検出できたエンドポイントは限られており、DDEはいずれのラボにおいても被験物質の影響は検出されなかった。

GNを用いた1つの試験では統計学的に有意な子宮重量の増加が観察されている。2つのラボともに性周期の乱れを示唆するような結果が熟練者による病理組織所見のみで観察されている。これらの変化は最高用量である1000 mg/kg/dayで観察されている。雌の生殖器官における病理組織所見は僅かな変化であり、通常観察されないような組織像(発情期に観察される細胞、あるいは組織反応とは異なる)が観察されたことから、GNのような弱いエストロゲニック作用の検出は、より注意を払った観察が必要である。

NPについては本試験法では被験物質による

影響は検出できなかった。死亡あるいは一般状態の変化が観察された用量で、あまり明確とはいえない子宮の病理組織所見と雄の副生殖器の比体重値の減少が認められている。EE, GNで観察されたような雌生殖器官への影響は、NPの一方の試験で低い頻度で検出されているのかもしれないが、もう一方の試験の高用量では確認されていない。いずれにしても、不確かな結果であると判断された。

DDEは雄の生殖器系において、抗アンドロゲニックな影響は検出できていない。2つのラボともにSprague-Dawleyラットを使用したがLong Evansラットよりも抗アンドロゲニック作用に対して感受性が低いようである。

4-3. 甲状腺へ影響を示す被験物質(PTU, THY, MT, DDE)を用いた試験

今回のバリデーションにより、PTU, THYを用いたenhanced TG407において2つのラボともに片性5匹ずつの群構成で甲状腺への影響は検出できた。MT, DDEによる甲状腺への作用も双方のラボで検出できている。MT投与により雌雄ともに濾胞の腫大および血中T4とTSHの増加が誘導された。DDE投与により甲状腺濾胞の腫大やホルモンレベルの変化は、肝臓の腫大や病理組織学変化に続き、同じ用量群で雌雄ともに2施設で同様に観察された。甲状腺への影響は、肝臓における酵素誘導により血中甲状腺ホルモンが除去されることにより、下垂体からの刺激によってTSH分泌の促進が起こっているのかもしれない。このように、TG407における甲状腺機能への影響の検出能力は高く、古典的なポテンシャルの高い物質のみならず、間接的な機序において発現する甲状腺機能への影響を検出することができる。甲状腺の病理組織学的検査はもっとも信頼性があり感受性の高いエンドポイントであった。甲状腺の重量測定は信頼性があるエンドポイントであったが、病理組織検査と比較すると感受性は時にして低い。血中のT3, T4, TSHレベルは常に感受性が高いものではなかった。しかし、ストレスを最小限にし

たサンプリング法およびアッセイ法が標準化していないことが、測定値幅を広くし、検出力を減少させていると考えられる。

甲状腺重量と病理組織所見の結果から、enhanced TG-407 は甲状腺機能への影響を十分に検出し得ると結論できた。重量測定はやや感度が低い、病理組織学検査の結果と不一致にはならない。甲状腺のトリミングは熟練者により固定後に実施するとよいと考えられた。

5. 考察

5-1. 現行の TG-407 における干渉要因

Enhanced TG-407 プロトコールの実施は各施設において不可能なものではなかった。問題なく、各施設は FOB の実施、運動量の測定を行っている。雌の解剖日を性周期でそろえることにより、投与回数が 28 回をこえること、それに起因して解剖が週末にまで及ぶことはあった。

5-2. 全身毒性あるいは器官毒性に対する enhanced TG-407 の再現性および信頼性

今回の試験の結果から、TG-407 を用いて全身毒性あるいは標的器官における毒性を検出するといった点において、再現性および信頼性がある試験法であるといえる。体重測定については各被験物質において双方のラボで再現性があった。血液学および血液性化学検査においては、2つの試験において統計学的に同じ結果が得られる、あるいは、1つの試験において統計学的に有意差のある結果が得られ、もう1つの試験において統計学的に有意差は認められなかったが同様な傾向が観察されるといった結果が得られている。器官重量（肝臓、腎臓、副腎）では再現性、信頼性のあるデータが得られている。病理組織学検査においても再現性は得られている。投与時期が長くなることにより、enhanced タイプの試験における LOEL はより低く得られる可能性が示唆された。

5-3. Enhanced TG-407 の毒性学的な再現性

今回得られた結果と他の毒性試験を比較す

ると、ほとんどの場合は同等あるいは類似した内分泌作用による影響が認められている。

5-4. Enhanced TG407 におけるデータの変動性

エンドポイントの感受性に最も影響する因子は CV (coefficient of variation 変動係数) で表示されるデータの分散性である。CV が小さければ統計学的に影響を検出することが可能となるが、大きければ検出はできない。以下に各臓器重量における CV 値をしめす。臓器が小さくなればなるほど、あるいは臓器が液体用物質で満たされているような場合は CV 値も大きくなる。

肝臓、精巣重量；CV；8-11

副腎；CV=12-14

下垂体；CV=18-19

甲状腺；CV=20-21

前立腺腹葉；CV=24

弱い作用の検出時には、施設間における技術の違いによる因子も関与する。

5-5. 検出力、群構成、動物数

内分泌作用を検出するために、群数の増加あるいは各群の動物数の有用性について、各群片性 5 匹ずつのサブグループとサブグループを結合させた各群片性 10 匹との評価を比較し検討した。検出力は陽性反応を検出できる確率を統計学的に評価した。検出力は変化の程度、CV の幅、観察項目数などのパラメータによって決定された。これらの結果から、動物数は内分泌作用の効力の強い被験物質においては各群片性 5 匹ずつでも検出ができたが、効力が弱いものに関しては各群片性 10 匹ずつが必要となると結論付けられた。また、検出力はエンドポイントが異なれば変動するものであることを認識することが重要である。検出力は、特異的なエンドポイントの種類、その CV、化学物質により誘発される変化の程度に依存する。さらに動物数を 2 倍に増加させても、検出力は 80% (あるいはそれより少ない) 程度にしかあがらない。また、CV は施設の技術の改良および能力によ

り変わる。さらには病理組織学検査の標準化、所見の定義、所見名もまた考慮されなければならない。これらのことは動物数を増やすことよりも先に検討されることであるかもしれない。

最終的には各群の動物数を増やすか増やさないかは、とても複雑な事象である。まず、2倍の動物を使うという動物愛護に反してまでも検出力を上げるために動物数を増やすことに意義があるかということの判断である。次に、被験物質のプロファイリングの位置によって試験方法が異なってくる。各群5匹は効力の高い物質には適切である。このようなケースではほかの必要な試験を考慮すると各群10匹にするメリットはほとんどない。また、TG-407は生産量の低い化学物質に対して実施するメリットはない。このような場合は、動物実験の役割と被験物質の構造活性相関や *in vitro* のような試験法も考慮に入れて動物数を10匹にするこの意義を考える必要がある。

5-6. Enhanced TG-407における信頼性の高いエンドポイント

Phase-2バリデーションの結果から、enhanced-TG-407は内分泌かく乱作用を検出するガイドラインとして有用であった。雌雄の生殖器官の組織重量および病理組織学検査、雌雄の乳腺の病理組織学検査は明確に(抗)エストロゲニックあるいは(抗)アンドロゲニック作用を検出した。下垂体重量と内分泌作用の影響に一致は認められなかったが、病理所見には他臓器における影響を支持する結果がしばしば得られている。しかしながら、下垂体の病理組織、副腎重量および病理所見には内分泌かく乱作用をそれ自身で検出することはなかった。甲状腺重量はあまり感受性がよくないが、病理組織学検査は実施すべきである。甲状腺のトリミングは固定後に熟練した技術者によって実施するのが好ましい。

5-7. 信頼性の低いエンドポイント

Phase-2の結果から、精子関連のエンドポ

イントは内分泌かく乱作用を検出できなかった。他の観察項目で影響が認められている用量で精子検査関連の影響が検出された。CV値は大きく、施設内における信頼ある手法の確立が必要であることを示している。

5-8. 他の推奨ポイント

T4とTSHはオプションとして有用なエンドポイントとなるかもしれない。甲状腺への影響が病理所見などから示唆された場合は、保管してある血清からT4、TSHを測定することにより、さらなる甲状腺への影響を検出する結果が得られるであろう。

T4測定のCVは適度(modest)であり、施設間におけるCVは20-21であった。しかし、TSHのCVは測定値の約2倍ばらつく。T3は感受性があまりよくないことから、TG-407のような最初のスクリーニング試験においては推奨されるエンドポイントではない。

雌雄生殖器官および乳腺の病理組織学検査は有効である。しかし、内分泌かく乱物質のこれらの組織に対する形態学的変化は典型的な変化ではない。

雄生殖器官においては、軽度な萎縮あるいは腫大、またはライディッチ細胞といった特殊な標的細胞に変化はおこる。雌では、性周期に伴い変化する項目が影響をうける。子宮、卵巣、子宮頸部、膣における性周期による変動範囲外の変化であるかを判断する観察となる。

病理学担当者は他の情報(他の影響と考えられる臓器の変化や*in vitro*の変化、器官重量の結果)を得て、観察をするべきである。

Enhanced TG-407は性成熟を向かえた若く無処置の成熟動物を用いるため、ある程度化学物質に対して適応性をもち、被験物質の影響を代償することも可能である。また、雌の生殖系の器官重量(卵巣、子宮)はよりバイアスが広くなり、CVも増大する。TG-407で使用する週齢のラットでは甲状腺への影響がヒトと比較してとても感受性が強い。下垂体からの甲状腺刺激を観察するために下垂体の観察も必要である。

このようにTG-407は甲状腺毒性を検出するには妥当な試験であるが、この感受性については論議の余地がある。

膣スミアによる性周期観察や特定の性周期の時期に実施するメスの解剖が、結果の評価に必須であるかは明らかではない。解剖時の性周期をあわせることで数日は雌の投与日数が延び、一部の雌動物には約15%投与量が増加する。スミア採取とその判定のみならず、数日にわたってしまう解剖に労力が加わる。さらに解剖時の子宮や卵巣重量の結果は評価を絶対的に左右するような決定的なエンドポイントではない。内分泌かく乱作用により認められる重量の変化は性周期による変化以上に重篤な変化として観察されるものである。しかしゲニスタインに認められたような微妙な変化の場合は性周期を合わせて評価することが必要となってくる。

このような雌生殖器官の注意深いステージングはTG-407では取り入れられていないし、enhanced TG-407においても実施されなかった。現時点ではTG-407の試験で弱いエストロゲン様物質の信頼できる評価するために性周期を一致させメスの生殖器の病理学検査を実施することは最も期待のできるエンドポイントであるが、特殊な化学物質でパイロット試験を実施することに時間をかけるほうに価値があるかもしれない。費用や動物の使用のことを考えると、大規模な試験では、このような可能性のある試験による陽性結果を待つべきである。

こうした論議の中にはTG407試験においての病理組織担当者の能力（微妙な変化を見逃さない鏡検レベル）についても疑問があがる。雌雄の生殖器官に発現する病理組織学変化は、正常な変化範囲内ではないかと思わせるような微妙な変化である。こうした組織における病理組織学検査に際してのガイダンスの改良とあわせて、化学物質の特徴や他の試験（項目）の結果情報（被験物質の構造、in vitro や in vivo 試験の結果から内分泌機能への影響の可能性の有無、ある特定の組織の器官重量の結果）を病理組織検査担当者には知らせるといった改良も必

要である。

6. 結論

内分泌かく乱作用を検出できる有効なエンドポイントとして、以下の項目が enhanced TG-407 のガイドラインに取り入れられることとなった。

- 1) 雄生殖器（精巣、精巣上体、前立腺腹葉、背腹葉、精嚢腺（凝固線を含む））の器官重量（絶対値）および相対重量
- 2) 雌生殖器（卵巣、子宮）の器官重量および相対重量
- 3) 下垂体の病理組織検査
- 4) 甲状腺の重量および病理組織学検査（重量測定は採取時のアーティファクトによる影響が大きいので付加的な推奨）
- 5) 雌雄生殖器の病理組織学検査（子宮頸部、膣、性周期における評価）
- 6) 雌雄の乳腺組織の病理組織学検査
- 7) もし被験物質が甲状腺毒性をもつあるいは病理所見において甲状腺への影響が観察された場合は、解剖時におけるサンプリング、分析法に関する問題が解決されていれば、保管してある血液を用いてT4濃度およびTSH活性の検査を実施することが適切であろう。

各群の動物数を片性5匹から10匹に増やすかどうかは、さらなる検討が必要となる。特に感受性や検出力の強化は、試験全体の優先度といった背景の中で評価されなければならない。評価する化学物質の生産量の違いやヒトへの暴露レベルの違いも考慮されるべきである。最終的な決断には、技術の向上や上述したような雌生殖器官の性周期によるステージ分けといった可能性や訓練、技術の改良によって、現在のエンドポイントの検出力をあげるための代替法もまた考慮されるであろう。

D. 考察

1999年に実施された第一回バリデーション試験の結果に基づき enhanced TG-407 のプロ

トコールは改良され、2000～2001年に実施された7カ国13施設が参加した大規模な第2回バリデーション試験の結果報告書が作成された。この報告書をもとに、2006年4月にWashington DCで開催される5th meeting of the validation management group for mammalian testingにおいて、enhancedTG-407の各観察項目についての検討が行われるはずである。

E. 研究発表

論文発表

Hamamura M, Hirose A, Kamata E, Katoku K, Kuwasaki E, Oshikata T, Nakahara Y, Ema M, Hasegawa R. Semi-quantitative immunohistochemical analysis of male rat-specific alpha(2u)-globulin accumulation for chemical toxicity evaluation. *J Toxicol Sci.*, 31: 35-47, 2006.

Ema M, Kimura E, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Reproductive and developmental toxicity screening test of basic rubber accelerator, 1,3-di-o-tolylguanidine, in rats. *Reprod Toxicol* (in press)

Hayashi M, Kamata E, Hirose A, Takahashi M, Morita T, Ema M. In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals. *Mutat. Res.*, 588:129-135, 2005

Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Evaluation of Developmental Toxicity of Ultraviolet Absorber 2-(3',5'-Di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in Rat. *Drug Chem Toxicol* (in press)

Ema M, Hirose A. Reproductive and developmental toxicity of organotin compounds. Golub MS, Ed. *Metals, Fertility, and Reproductive Toxicity*, CRC Press, Boca Raton, 2006, pp. 23-64.

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

学会発表

Ema M, Kimura E, Hirose A, Kamata E.

Reproductive and developmental toxicity screening test of 1,3-di-o-tolylguanidine in rats. *EUROTOX 2005*.

江馬 眞、福西克弘、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、紫外線吸収剤2-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazoleのラットにおける発生毒性、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005.

江馬 眞、原 洋明、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、ブタノールのラットにおける発生毒性の検討、第45回日本先天異常学会学術集会、2005.

Hirose A, Aisaki K, Hara H, Takahashi M, Igarashi K, Kanno J, Ema M. DNA Micro-Array Analysis of Gene Expressions in Mice Uterus Exposed with Dibutyltin Chloride during Implantation. The 25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2005). Toronto, Canada, Aug, 2005.

Hirose A, Kanno J, Tokunaga H, Nakazawa K, Honma M, Inoue T. Initial investigation on the assessment of nanomaterial safety by the Japanese MHLW. 2nd International Symposium on Nanotechnology and Occupational Health, Minneapolis, USA, Oct. 2005.

F. 健康危惧情報

無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(該当なし)

2. 実用新案登録

(該当なし)

3. その他

(該当なし)

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及び解決策の検討

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 毒性第2研究部 部長

研究要旨 子宮肥大試験の OECD Validation Study を review することを目的として設置された peer review panel (PRP) の報告¹⁾では、各委員の意見に大きな相違があり、コンセンサスを得るに至っていない。本年度は、PRP 報告で問題とされた中で特に重要と考えられる以下の5点について検討を加えた。①negative control に関する情報、②代謝活性化される化合物に関する情報、③estrogen antagonist 評価への有用性、④用量設定および群構成、⑤positive, negative の判断基準。

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、投与経路等の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。これまで、本 protocol を検証した phase 1 および phase 2 の Validation の結果ならびに Validation Study の後に得られた本 protocol に準じて実施された試験データを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てきた。本年度は、PRP 報告で問題とされた中で特に重要と考えられる点について検討を加えた。

C. 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 な方法であることを確認できたが、同時に、飼料中の植物性エストロジェンの影響等、幾つかの注意すべき点があることも明らかになった (mini-monograph “The OECD Validation of the Uterotrophic Bioassay”^{2,3,4,5,6})。

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、その解決策を検討してきた。なお、estrogen antagonist については、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ることから、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、考察してきた。本年度は、PRP 報告で問題とされた中で特に重要

と考えられる以下の 5 点について検討を加えた。

①negative control に関する情報、②代謝活性化される化合物に関する情報、③estrogen antagonist 評価への有用性、④用量設定および群構成、⑤positive, negative の判断基準

1) negative control に関する情報

PRP で問題とされたのは、Validation Study で用いられた negative control が dibutylphthalate の 1 化合物のみであった点である。そこで、negative control となりうる化学物質の候補として、最近実施された子宮肥大試験^{7,8,9,10,11} で陰性であった化合物 phthalate (diethyl phthalate, di-n-hexyl phthalate, di-n-amyl phthalate, di-n-propyl phthalate, diallylterephthalate, dicyclohexyl phthalate), adipate (di-2-ethylhexyl adipate), n-alkylphenol (4-n-nonylphenol, 4-n-octylphenol), n-butylbenzene, hematoxylin, octachlorostyrene を選び、in vitro スクリーニング試験成績 (receptor-binding assay^{8,10,12,13}, reporter gene assay^{7,10,13}, yeast two-hybrid assay¹⁴) と比較した。また、報告例のあるものに関しては、生殖発生毒性試験成績について、Validation phase 2 で用いられた methoxychlor, genistein, o,p'-DDT, nonylphenol の LOEL において最も良く観察される指標である膈開口早期化^{15,16,17,18}の有無を確認した。

子宮肥大試験では、estrogen receptor (ER) との結合親和性の 17β -estradiol (E2) との相対比 (%) (relative binding affinity (RBA)) に関して、logRBA が -3 以上である場合に陽性になると考えられることから、in vitro スクリーニング試験のうち、receptor-binding assay については、RBA が 0.001 以下であるかどうかを ER 結合性の判断基準とした (但し、IC₅₀ (E2 による 50%阻害相当濃度) での評価では 10^{-4} M を基準)。また、組換え培養細胞を用いる reporter gene assay では PC50 (10^{-9} M E2 活性の 50%に対応する濃度)、yeast two-hybrid assay では REC10 (10^{-7} M E2 活性の 10%に対応する濃度) を基に ER を介する転写活性の有無を評価した。

その結果、RBA が di-n-amylphthalate で 0.0017, dicyclohexyl phthalate で 0.0011, 4-n-nonylphenol で 0.0032, REC10 が di-n-propylphthalate で 10^{-3} M と非常に弱い結合または転写活性が認められた。それ以外、receptor-binding assay では RBA が 0.001 以下または結合性を示さず、reporter gene assay および yeast two-hybrid assay では転写活性化が認められなかった。

生殖発生毒性試験では、diethyl phthalate, dicyclohexyl phthalate, di-2-ethylhexyl adipate, n-butylbenzene の実施例^{19,20}について確認したが、膈開口の早期化はみられなかった。

以上、今回、調査した子宮肥大試験で陰性であった化合物は、ER への結合性および転写活性は認められないか、あっても非常に弱いものであった。また、生殖発生毒性試験において estrogen 様活性の良い指標となる膈開口の早期化は認められなかった。したがって、これらの化合物の子宮肥大試験における成績は、negative control の追加情報となり得ると考えられた。

2) 代謝活性化される化合物に関する情報

代謝活性化される化合物として、benzophenone (BP) を取り上げ、BP およびその代謝物である p-hydroxy 体 (p-HBP) および benzhydrol (BH) の in vitro スクリーニング試験および子宮肥大試験成績^{9,13,14,20,21}について評価した。

Receptor-binding assay においては、p-HBP のみが ER 結合性を示し、BP および BH は ER 結合性を示さなかった。組換え培養細胞を用いる reporter gene assay でも、p-HBP は ER を介する転写活性化を示すが、BP は転写活性化を示さず、yeast two-hybrid assay においても、BP は ER を介する転写活性化を示さなかった。

子宮肥大試験において、BP, p-HBP, BH を幼若動物に 3 日間、皮下投与した場合には、in vitro スクリーニング試験の結果と同様、p-HBP のみで子宮重量増加が認められた。卵巣摘出 (OVX) ラットに 3 日間、経

口投与した場合には BP でも子宮重量増加が認められており、methoxychlor と同様、代謝活性化される化合物については、経口投与の方が検出力の高いことが示された。なお、OVX ラット（8 週齢）に 7 日間皮下投与した場合にも軽度な子宮重量の増加が認められており、代謝活性化される化合物の検出力には、動物の週齢、投与期間が影響する可能性が考えられた。

3) estrogen antagonist 評価への有用性

Yamasaki 等は、OECD Validation protocol のうち幼若ラット、3 日間皮下投与の protocol を用いて子宮肥大試験を実施している^{8,23,24}。32 化合物について 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た結果、20 化合物で 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 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ている。しかしながら、低および中用量で EE 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。

In vitro 試験法との比較では、子宮肥大試験において 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²⁴。すべての化合物で agonist 活性が認められたのに対し、antagonist 活性の認められたのは、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た評価が可能な 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 21 化合物について agonist および antagonist 活性の評価を行った²⁵。その結果、5 化合物で agonist と antagonist の作用を示し、6 化合物では antagonist 活性のみが認められたが、agonist 活性のみが認められた例はなかった。この結果は、子宮肥大試験では、agonist 活性に加えて antagonist 活性を評価することが必要であることを示している。

4) 用量設定および群構成

毒性試験情報が得られない時には、用量設定試験が必要であり、1 群あたりの動物数 3、公比約 5 の 3 群構成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 とし、一般状態の観察、体重測定を行う。

本試験の群構成については、3) estrogen antagonist 評価への有用性の項で述べたように antagonist についても agonist と同様に複数群設定する必要がある。しかしながら、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 用量を設定し、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と考えられる（PRP の中でも 1 群あたりの動物数は 6 が妥当と考えられている）。

5) positive, negative の判断基準

OECD Validation Study の phase 2 において、ブラインドで実施した単一用量試験の中で陰性対照として dibutylphthalate (DBP) が使用された 36 試験のうち 3 試験で明らかな false positive が見られた（約 8%）。また、2 試験では DBP 投与群の子宮重量が有意に低下していた。実際の試験実施にあたっては、false positive や false negative が起こりえると考えられることから、陽性・陰性のボーダーラインにあって評価の難しいデータの取り扱いについて予め考えておく必要がある。

一つの対応策として、膣の角質化、子宮内膜の病理組織学的検査の追加が考えられる。しかしながら、前者は感度の点で問題があり、後者については、方法の標準化およびバリデータがなされていないという問題がある。

したがって、子宮肥大試験単独で評価の難しいデータを解釈することは適当ではない。段階的かつ階層的な評価系の一環としての本試験の位置付けを考慮するならば、構造活性相

関, *in vitro* 試験成績等と合わせた総合的な評価を行なうべきであると考えられる。

なお, 判断の前提として, 信頼性の高い試験成績が得られていることであり, そのためには, 対照群の平均子宮重量を試験成績の採用する要件とすべきであると考えられる。OVX-adult ラット, 幼若ラット, OVX-adult マウスで, それぞれ 120 mg, 50 mg, 20 mg 以上のデータは, 試験系に何らかの問題があったとし, 不採用とすることが考えられる。また, 実施機関では, エストロジェン様作用物質を用いたバリデーションを実施し, 当該試験施設での試験系に問題のないことを確認しておく必要がある。

(参考文献)

1. Draft Peer-Review Report for the Uterotrophic Bioassay. Task force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) of the Test Guidelines Programme. OECD, ENV/JM/TG/EDTA (2004) 1, 05 January 2005.
2. 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
3. Owens W and Koeter BWM. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: An Overview. *Environ Health Perspect* 111:1527-1529
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. CERI. 2001.平成 11 年度新エネルギー・産業技術総合開発機構委託業務化学物質の内分泌攪乱効果に関する評価及び試験法の開発報告書
10. CERI. 2002.平成 13 年度経済産業省環境対応技術開発等委託調査研究, 環境ホルモン効果に関する評価・試験法開発報告書
11. Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Takatsuki M. 2002. Uterotrophic and Hershberger assays for *n*-butylbenzene in rats. *Arch. Toxicol.* 75: 703-706
12. Blair R, Fang H, Branham W, Hass B, Dial S, Moland C, Tong W, Shi L, Perkins R, Sheehan D. 2000. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and zenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol. Sci.* 54: 138-153
13. CERI. 2001.平成 12 年度経済産業省環境対応技術開発等委託調査研究, 環境ホルモン効果に関する評価・試験法開発報告書

14. Nishihara T, Nishikawa J, Kanayama T, Dakeyama F, Saito K, Imagawa M, Takatori S, Kitagawa Y, Hori S, Utsumi H. 2000. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.* 46: 282-298
15. Chapin R, Harris M, Davis B, Ward S, Wilson R, Mauney M, Lockhart A, Smialowicz R, Moser V, Burka L, Collins B. 1997. The effects of perinatal/juvenile methoxychlor exposure on adult rat nervous, immune, and reproductive system function. *Fund. Appl. Toxicol.* 40: 138-157
16. Casanova M, You L, Gaido K, Archibeque-Engle S, Janszen D, Heck H. 1999. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors α and β *in vitro*. *Toxicol. Sci.* 51: 236-244
17. Wrenn T, Wood J, Fries G, Bitman J. 1970. Tests of estrogenicity in rats fed low levels of *o,p'*-DDT. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 5: 61-66
18. Chapin R, Dulaney J, Wang Y, Lanning L, Davis B, Collins B, Mintz N, Wolfe G. 1999. The effects of 4-nonylphenol in rats: A multigeneration reproduction study. *Toxicol. Sci.* 52: 80-91
19. CERL. 2003.平成 14 年度経済産業省環境対応技術開発等委託調査研究, 環境ホルモン効果に関する評価・試験法開発報告書
20. Dalgaard M, Hass U, Vinggaard A, Jarfelt K, Lam H, Sorensen I, Sommer H, Ladefoged O. 2003. Di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) induced development toxicity but antiandrogenic effects in pre- and postnatally exposed Wistar rats. *Reprod. Toxicol.* 17:163-170
21. Nakagawa Y, Tayama K. 2001. Estrogenic potency of benzophenone and its metabolites in juvenile female rats. *Arch. Toxicol.* 75: 74-79
22. Nakagawa Y, Tayama K. 2002. Benzophenone-induced estrogenic potency in ovariectomized rats. *Arch. Toxicol.* 76: 727-731
23. Yamasaki K, Takeyoshi M, Sawasaki 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
24. Yamasaki K, Takeyoshi M, Yakabe Y, Sawasaki 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
25. Ohta R, Tazura Y, Miyahara T, Marumo H. 2005. The Mouse Uterotrophic Assay. 秦野研究所年報

E. 結論

本年度は、PRP 報告で問題とされた中で特に重要と考えられる点について検討を加えた。negative control に関しては、最近実施された子宮肥大試験で陰性であった化合物を *in vitro* スクリーニング試験成績と比較し、報告例のあるものに関しては、生殖発生毒性試験成績について確認した。子宮肥大試験で陰性であった化合物は、ER への結合性および転写活性は認められないか、あっても非常に弱いものであった。また、生殖発生毒性試験において estrogen 様活性の良い指標となる膈開口の延長は認められなかったことから、子宮肥大試験における negative control となり得ると考えられた。代謝活性化される化合物に関しては、benzophenone を取り上げ、評価した。その他、estrogen antagonist 評価への有用性、用量設定、positive, negative の判断基準についてまとめた。

F. 健康危惧情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Katayama S, Ashizawa K, Fukuhara T, Tsuzuki Y, Tatemoto H, Nakada N, Nagai K

Differential expression patterns of Wnt and β -catenin/TCF-target genes in the uterus of immature female rats exposed to 17α -ethynyl estradiol

投稿中

2) Katayama S, Ashizawa K, Fukuhara T, Hiroyasu M, Tsuzuki M, Tatemoto H, Nakada T, Nagai K

17α -ethynyl estradiol downregulates the mRNA expressions of Indian hedgehog, Desert hedgehog, patched 1, Gli1, and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II genes in the uterus of immature female rats

投稿中

2. 学会発表

1) 幼若雌性ラットの子宮におけるエストロゲ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, 芹沢幸二, 永井賢司

第30回日本トキシコロジー学会学術年會
要旨集 (p208, 2003年)

2) 幼若雌性ラットの子宮におけるエストロゲ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, 芹沢幸二, 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會
(p303, 2004年)

H. 知的所有権の出願・登録状況

無し

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 日田事業所 所長

研究要旨 Hershberger 試験ガイドライン化のための最終的な試験である Validation phase 3 試験を国内 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) で実施した。各機関のデータはすでに OECD に送付されている。日本の結果としては、各機関における計測した器官の反応性に本質的な差はなく、再現性は良好であった。なお、ガイドライン化の貢献を目的として、日本で実施した phase 3 のデータを国際学会で発表し、雑誌への投稿を行った。一方、海外における phase 3 試験自体も終了していると思われるが、それに関する情報はなく、次回の OECD の VMG 会議の開催予定の連絡もない。なお、各国で実施した phase 1 (2000~2001 年に試験実施) のまとめの論文化が進行しているもようである。

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

国内で日本の各機関 (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) で実施した phase 3 の結果をまとめ本試験法の問題点を抽出した。日本でのデータについては学会発表、雑誌への公表を行った。また、OECD の動向について調査した。一方では、本試験法に関する文献調査を実施し、本試験の情報を収集した。

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 OECD プロトコールに従い試験を実施した。各機関からの結果についてはそれぞれ OECD に提出された。また、日本としての OECD ガイドライン化の貢献を目的として、日本における Validation phase 3 の結果をまとめ、2005 年の 42nd Congress of The European

Societies of Toxicology にて発表した (添付資料 1)。また、結果を Toxicology Letters に投稿し (添付資料 2; 本文)、2006 年月上旬に掲載される予定である。

結果の要約は以下に記載する。

- ・ OECD プロトコールに従い、日本の 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 Validation phase 3 を実施した。

- ・ コードされた試験物質として、androgen 作用検出系では 4 物質、anti-androgen 作用検出系では 7 物質を使用した。

- ・ anti-androgen 作用を検出する試験系では testosterone propionate 0.2 mg/kg/day を同時に皮下投与した。

- ・ 3 機関において、androgen 作用検出系、anti-androgen 作用検出系共に計測した 5 器官 (ventral prostate、seminal vesicles with coagulating glands、levator ani and bulbocavernosus muscle complex、Cowper's glands、glans penis) は本質的に同様な反応を示し、false negative、false positive は認められなかった。

- ・ 日本の 3 機関における結果は、本試験法の

有用性を示すものであり、OECD ガイドライン化に寄与すると考えられた。

・なお、試験終了後、OECD からコード物質に関する情報があった。すなわち、androgen 作用検出系では nonylphenol、trenbolone、anti-androgen 作用検出系では dinitrophenol、*p, p'*-DDE、linurone が使用された。

②OECD 動向について

- ・ 次回の VMG-mammalian の開催時期についての明らかな情報はない。2006 年 4 月との情報があるが不確実である。
- ・ 2005 年内には phase 3 の試験は終了していると考えられる。しかし、現時点では phase 1 の論文が進行している状況であり（試験実施は 2000~2001 年）、そうなると、早くとも 2007 年以降のガイドライン化の可能性も出てくる。

③文献調査：平成 17 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。なお、上記でも記述したが現時点で phase 1 の論文が検討されている。

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）が参加した。結果は、2005 年度の 42nd Congress of The European Societies of Toxicology にて発表し、論文としても 2006 年度初旬に掲載予定である。一方、OECD の動きについて、現時点では明確な VMG 会議の予定はない。本試験法のガイドライン化に関する論文については、平成 17 年度にはなく、OECD で行った phase 1 の論文が進行している。

F. 健康危惧情報

無し

G. 研究発表

1. 発表論文

- ① Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Muroi T, Takakura S, Mitoma H, Sakamoto S, Nakai M, Yakabe Y. OECD validation of the Hershberger assay in Japan: Phase 3- blind study using coded chemicals. *Toxicol. Lett.*, 2006 (in press)
- ② Noda S, Muroi T, Takakura S, Sakamoto F, Takatsuki M, Yamasaki K, Tateyama S, Yamaguchi, R. Ability of the Hershberger assay protocol to detect thyroid function modulators. *Arch. Toxicol.*, 79, 267-235, 2005.
- ③ 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.
- ④ 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.
- ⑤ 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: blind study using coded chemicals, EUROTOX, 2005.
- ② OECD validation of the Hershberger assay in Japan: Phase 2-Dose response of methyltestosterone, vinclozolin and *p,p'*-DDE, EUROTOX, 2003.

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

無し

OECD validation of the Hershberger assay in Japan: blind study using coded chemicals

K. Yamasaki¹, R. Ohta² and H. Okuda³

¹ Chemicals Evaluation and Research Institute, Oita, Japan, ² Food Drug Safety Center, Kanagawa, Japan, ³ Japan Bioassay Research Center, Kanagawa, Japan

The OECD is developing new guidelines for the screening and testing of potential endocrine disrupters. The Hershberger assay was selected for validation based on the need for an in vivo screening method to detect androgen agonists or antagonists. The assay measures the response of five sex accessory organs to the test chemical in castrated juvenile male rats. Phase 1 of the Hershberger validation program, which demonstrated the feasibility of the assay, has been successfully completed with a single androgen agonist and a single androgen antagonist used as reference substances. Phase 2 of the validation program utilized a range of additional androgen agonists and antagonists; the results of this Phase will be present at the next OECD meeting. Phase 3, the final stage of the validation program, has also been performed, using coded androgen agonists and antagonists. Three Japanese laboratories contributed to the Phase 3 validation studies of the Hershberger assay using coded chemicals. All chemicals were orally administered for 10 consecutive days. In the agonist version of the assay, all sex accessory organs consistently responded with significant changes in weight within a narrow window among the laboratories. In the antagonist version of the assay, 0.2 mg/kg/day of testosterone propionate was coadministered by subcutaneous injection, and the results showed that all sex accessory organ weights consistently responded within a narrow window among the laboratories. Therefore, the Japanese studies support the use of the Hershberger assay as a suitable screening assay for the detection of androgen agonistic and antagonistic effects.

OECD validation of the Hershberger assay in Japan: Phase 3- blind study using coded chemicals

Kanji Yamasaki¹, Ryo Ohta², Hirokazu Okuda³

¹ Chemicals Evaluation and Research Institute, Oita, Japan

² Food Drug Safety Center, Kanagawa, Japan

³ Japan Bioassay Research Center, Kanagawa, Japan

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, Cowper's glands, and the glans penis. The Phase 1 feasibility demonstration stage of the Hershberger validation program has been successfully completed with a single androgen agonist and a single antagonist as reference substances. The Phase 2 validation study was performed, employing a range of additional androgen agonists and antagonists. Recently, the Phase 3 validation study was conducted and performed in several international laboratories. Three Japanese laboratories have contributed to the blind study using coded materials of Phase 3 validation. Four coded test substances in the agonistic version and seven substances in the antagonistic version were orally administered by gavage for 10 consecutive days, respectively. In the antagonist version of the assay, 0.2 mg/kg/day of testosterone propionate was coadministered by subcutaneous injection. All five accessory sex reproductive organs and tissues consistently responded with statistically significant changes in weight within a narrow window in both versions. Therefore, the Japanese studies support the Hershberger assay as a reliable and reproducible screening assay for the detection of androgen agonistic and antagonistic effects.

1. Introduction

Certain reproductive and developmental toxicants may have the potential to interfere with normal sexual differentiation and development in animals and humans by modulating or interfering with the endocrine system (McLachlan 1993; McLachlan and Korach 1995). The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) has initiated an activity to revise existing guidelines and develop new screening and testing guidelines to aid in the identification and assessment of such toxicants (OECD 1998, 2000, 2002).

One proposed assay, referred to as the Hershberger assay, uses the androgen sensitivity of several accessory sex organs and tissues of the male reproductive tract. The assay was originally developed in the 1930s by Korenchevsky and coworkers, and a number of accessory sex organs and tissues were shown to be useful by these and other investigators including the ventral prostate (Deanesly and Parkes 1936; Dingemans et al. 1935; Korenchevsky 1932; Korenchevsky et al. 1932, 1933a,b), the seminal vesicles and coagulating glands (Deanesly and Parkes 1936; Dingemans et al. 1935; Korenchevsky 1932; Korenchevsky et al. 1932, 1933a,b), the preputial glands (Bülbring and Burn 1935; Korenchevsky 1932; Korenchevsky et al. 1932, 1933a,b), Cowper's glands (Wainman and Shipounoff 1941), and the glans penis (Bülbring and Burn 1935; Dingemans et al. 1935; Korenchevsky 1932; Korenchevsky et al. 1932, 1933a,b). In the 1940s, it was

discovered that the levator ani and bulbocavernosus muscles also responded to androgens, but in a differential way from the other tissues (Wainman and Shipounoff 1941; Eisenberg et al. 1949; Eisenberg and Gordan 1950). The basis for this differential sensitivity is the presence of 5 α -reductase in most accessory tissues of the male reproductive tract, but its absence in the muscle complex (Di Salle et al. 1994). The capabilities of the assay were demonstrated in 1954 by Hershberger et al. when they analyzed the response of the ventral prostate, seminal vesicles and coagulating glands, and the levator ani without the bulbocavernosus muscle to a number of active chemicals, including estrogens and progesterones (Hershberger et al. 1953).

In the 1970s and 1980s, with the discovery of the androgen receptor and the first compounds such as cyproterone acetate that were antagonists of the receptor, the assay was modified to address antagonistic activity. Briefly, a set dose of a reference agonist was coadministered to several groups of animals to whom a set of doses of the purported antagonist was also administered. This modified system was successfully used by several investigators for assaying androgen antagonists (Peets et al. 1973; Raynaud et al. 1980, 1984; Wakeling et al. 1981).

Therefore, based upon the recommendation of scientific workshops, both the US Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) (US EPA 1998) and the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment Group (EDTA) of the OECD (OECD 2000) have proposed this assay as a Tier-1 screen to identify possible reproductive and developmental toxicants acting through androgen agonist and antagonist mechanisms.

The OECD Phase 1 validation program for the Hershberger assay was completed in 2001. In this phase, a standardized protocol using the ventral prostate, the seminal vesicles with coagulating glands, the levator ani and bulbocavernosus muscle complex, Cowper's glands, and the glans penis was successfully tested against a reference androgen compound, testosterone propionate, and a reference antagonist, flutamide (OECD 2002). The OECD proposed a Phase 2 validation program using additional androgen agonistic and antagonists as the next step to validate the assay, but the final results of Phase 2 studies were not opened by the OECD.

Recently, the OECD conducted a Phase 3 validation program as a final blind study using coded agonistic and antagonistic chemicals (OECD 2003). In Phase 3, the coded test substances were to be used to investigate the reliability of the assay, including a demonstration of the protocol's transferability among laboratories and the reproducibility of the protocol's results. Three Japanese laboratories participated in the Phase 3 validation study using four coded agonistic test substances and seven antagonistic substances. The participation of the laboratories in the OECD Phase 3 validation study was performed as part of a national validation program in Japan.

2. Materials and Methods

2.1. Laboratories.

The three participating Japanese laboratories were: the Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI); the Food Drug Safety Center; and the Japan Bioassay Research Center. Each laboratory performed the study in compliance with the principles of Good Laboratory Practice guidelines.

2.2. Test substance

All coded test substances except for testosterone propionate (TP) were sent to each laboratory from a centralized chemical repository at TNO, Zeist, the Netherlands. TP and corn oil as vehicles were prepared in each laboratory. The coded substances A, B, L and E were used in the agonistic version, and F, G, I, C, K, D and H were used in the antagonistic version. We did not received any information regarding with the coded substances before all tests were started.