

Table 3-1
Effect of ICI 182,780 on the mean body weight (g) in Hershberger assay of norgestrel for androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Administration period (day)										Final
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ICI 0 & NG 0	232.9 ± 8.5 (6)	238.8 ± 8.2 (6)	246.3 ± 9.5 (6)	250.4 ± 10.0 (6)	255.7 ± 11.8 (6)	261.6 ± 11.5 (6)	268.1 ± 13.2 (6)	273.9 ± 13.0 (6)	281.2 ± 12.9 (6)	287.4 ± 13.1 (6)	292.2 ± 14.7 (6)
ICI 0 & NG 30	233.0 ± 5.8 (6)	238.9 ± 6.3 (6)	244.7 ± 6.1 (6)	249.5 ± 6.3 (6)	253.7 ± 7.2 (6)	259.6 ± 6.4 (6)	265.4 ± 8.0 (6)	271.8 ± 6.9 (6)	278.1 ± 7.2 (6)	282.2 ± 8.7 (6)	288.7 ± 9.8 (6)
ICI 0 & NG 100	233.3 ± 5.0 (6)	240.8 ± 6.5 (6)	244.9 ± 7.9 (6)	247.2 ± 9.9 (6)	254.9 ± 11.9 (6)	260.8 ± 14.3 (6)	267.9 ± 14.3 (6)	273.1 ± 17.4 (6)	280.1 ± 19.0 (6)	286.7 ± 22.0 (6)	291.4 ± 24.7 (6)
ICI 3 & NG 0	236.5 ± 6.7 (6)	240.8 ± 5.8 (6)	247.5 ± 7.5 (6)	253.0 ± 7.8 (6)	259.2 ± 7.2 (6)	265.5 ± 8.8 (6)	271.9 ± 9.9 (6)	277.1 ± 9.2 (6)	284.4 ± 10.7 (6)	290.5 ± 11.1 (6)	295.4 ± 12.9 (6)
ICI 3 & NG 30	233.4 ± 8.1 (6)	237.1 ± 6.3 (6)	243.5 ± 7.9 (6)	249.2 ± 7.9 (6)	254.8 ± 7.2 (6)	260.7 ± 8.7 (6)	267.0 ± 9.1 (6)	271.8 ± 9.9 (6)	278.7 ± 11.1 (6)	283.6 ± 10.3 (6)	288.6 ± 10.9 (6)
ICI 3 & NG 100	233.4 ± 4.9 (6)	237.6 ± 3.8 (6)	243.6 ± 4.0 (6)	249.7 ± 4.9 (6)	255.3 ± 4.8 (6)	258.8 ± 5.8 (6)	265.6 ± 5.5 (6)	270.9 ± 4.1 (6)	276.3 ± 3.8 (6)	281.8 ± 4.3 (6)	287.3 ± 4.5 (6)

Table 3-2
Effect of ICI 182,780 on the mean food intake (g) in Hershberger assay of norgestrel for androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Administration period (day)										
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11
ICI 0 & NG 0	22.6 ± 2.3 (6)	21.3 ± 1.8 (6)	21.9 ± 2.5 (6)	21.2 ± 2.6 (6)	22.2 ± 2.1 (6)	21.0 ± 1.6 (6)	21.2 ± 2.6 (6)	21.4 ± 1.8 (6)	21.8 ± 2.1 (6)	21.3 ± 1.8 (6)	20.8 ± 2.6 (6)
ICI 0 & NG 30	23.5 ± 1.0 (6)	21.8 ± 1.3 (6)	20.6 ± 1.3 (6)	20.9 ± 2.0 (6)	20.6 ± 1.6 (6)	20.7 ± 2.0 (6)	20.4 ± 2.1 (6)	20.7 ± 1.0 (6)	21.3 ± 1.6 (6)	19.4 ± 1.9 (6)	19.9 ± 2.0 (6)
ICI 0 & NG 100	22.7 ± 1.1 (6)	21.1 ± 2.4 (6)	19.3 ± 2.5 (6)	18.0 ± 2.8 (6)	21.2 ± 2.4 (6)	19.9 ± 3.4 (6)	19.9 ± 2.3 (6)	20.5 ± 3.7 (6)	21.6 ± 3.1 (6)	21.0 ± 5.9 (6)	20.0 ± 4.2 (6)
ICI 3 & NG 0	25.6 ± 0.9 (6)	22.9 ± 1.5 (6)	23.2 ± 1.8 (6)	22.9 ± 3.0 (6)	23.1 ± 1.5 (6)	22.4 ± 3.4 (6)	22.5 ± 2.8 (6)	21.8 ± 3.0 (6)	21.9 ± 2.6 (6)	22.1 ± 2.2 (6)	20.3 ± 1.9 (6)
ICI 3 & NG 30	23.8 ± 3.3 (6)	21.3 ± 1.3 (6)	20.2 ± 2.7 (6)	22.0 ± 1.7 (6)	22.2 ± 1.8 (6)	21.4 ± 2.0 (6)	21.3 ± 1.9 (6)	21.0 ± 2.5 (6)	22.1 ± 2.7 (6)	20.8 ± 2.0 (6)	20.1 ± 2.3 (6)
ICI 3 & NG 100	23.6 ± 1.6 (6)	19.9 ## ± 1.0 (6)	21.1 ± 1.7 (6)	22.3 ± 1.6 (6)	22.0 ± 1.4 (6)	19.7 ± 4.1 (6)	20.9 ± 2.7 (6)	20.8 ± 1.7 (6)	21.7 ± 2.5 (6)	20.4 ± 1.5 (6)	20.8 ± 1.7 (6)

ICI, ICI 182,780

NG, norgestrel

Value, mean ± S.D.; (), number of animals measured

##, significantly different from ICI 3 mg/kg & NG 0 mg/kg group (##, p<0.01)

Table 3-3
Effect of ICI on the absolute organ weight in Hershberger assay of norgestrel for androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg)	Levator ani & BC muscle (mg)	Glans penis (mg)	Cowper's gl. (mg)	Liver (mg)
ICI 0 & NG 0	292.2 ± 14.7 (6)	18.4 ± 3.5 (6)	38.5 ± 8.3 (6)	220.5 ± 33.8 (6)	44.1 ± 1.7 (6)	9.4 ± 3.3 (6)	12953.1 ± 1023.9 (6)
ICI 0 & NG 30	288.7 ± 9.8 (6)	37.9 ± 5.0 (6)	57.7 ± 6.1 (6)	232.7 ± 27.8 (6)	47.7 ± 1.6 (6)	10.6 ± 1.2 (6)	14465.2 ± 1404.9 (6)
ICI 0 & NG 100	291.4 ± 24.7 (6)	75.2 ** ± 33.7 (6)	133.3 ** ± 53.7 (6)	380.0 ** ± 88.1 (6)	54.8 ** ± 5.5 (6)	16.0 * ± 5.3 (6)	15274.2 ± 2433.8 (6)
ICI 3 & NG 0	295.4 ± 12.9 (6)	25.2 ± 4.6 (6)	34.9 ± 6.0 (6)	204.4 ± 14.7 (6)	40.0 ± 4.6 (6)	9.7 ± 2.8 (6)	12693.8 ± 730.8 (6)
ICI 3 & NG 30	288.6 ± 10.9 (6)	34.1 ± 3.9 (6)	56.4 # ± 16.2 (6)	250.6 ± 26.1 (6)	45.7 ± 5.3 (6)	10.6 ± 3.2 (6)	12654.9 ± 1228.7 (6)
ICI 3 & NG 100	287.3 ± 4.5 (6)	59.9 ## ± 17.9 (6)	79.7 ## ± 15.6 (6)	325.1 ## ± 64.3 (6)	49.3 # ± 5.2 (6)	13.6 ± 4.4 (6)	13192.4 ± 1716.6 (6)

Table 3-4
Effect of ICI on the relative organ weight in Hershberger assay of norgestrel for androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg/g)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg/g)	Levator ani & BC muscle (mg/g)	Glans penis (mg/g)	Cowper's gl. (mg/g)	Liver (mg/g)
ICI 0 & NG 0	292.2 ± 14.7 (6)	0.063 ± 0.013 (6)	0.133 ± 0.032 (6)	0.753 ± 0.100 (6)	0.151 ± 0.008 (6)	0.032 ± 0.012 (6)	44.315 ± 2.250 (6)
ICI 0 & NG 30	288.7 ± 9.8 (6)	0.131 ± 0.019 (6)	0.200 ± 0.022 (6)	0.806 ± 0.084 (6)	0.165 ± 0.008 (6)	0.037 ± 0.005 (6)	50.252 ± 6.402 (6)
ICI 0 & NG 100	291.4 ± 24.7 (6)	0.260 ** ± 0.117 (6)	0.463 ** ± 0.193 (6)	1.307 ** ± 0.290 (6)	0.189 ** ± 0.024 (6)	0.056 ± 0.020 (6)	52.170 * ± 4.736 (6)
ICI 3 & NG 0	295.4 ± 12.9 (6)	0.086 ± 0.017 (6)	0.118 ± 0.020 (6)	0.692 ± 0.030 (6)	0.135 ± 0.016 (6)	0.033 ± 0.008 (6)	42.956 ± 0.888 (6)
ICI 3 & NG 30	288.6 ± 10.9 (6)	0.118 ± 0.016 (6)	0.197 # ± 0.060 (6)	0.870 ± 0.106 (6)	0.159 ± 0.019 (6)	0.037 ± 0.012 (6)	43.832 ± 3.749 (6)
ICI 3 & NG 100	287.3 ± 4.5 (6)	0.209 ## ± 0.064 (6)	0.277 ## ± 0.052 (6)	1.131 ## ± 0.224 (6)	0.172 ## ± 0.019 (6)	0.047 ± 0.016 (6)	45.898 ± 5.725 (6)

ICI, ICI 182,780

NG, norgestrel

BC muscle, bulbocavernous muscle

Value, mean ± S.D.; (), number of animals measured

*; **, significantly different from ICI 0 mg/kg & NG 0 mg/kg group (*, p<0.05; **, p<0.01)

#; ##, significantly different from ICI 3 mg/kg & NG 0 mg/kg group (#, p<0.05; ##, p<0.01)

Table 4-1
Mean body weight (g) in Hershberger assay of ethynylestradiol for androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Administration period (day)										Final
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
EE 0	222.1 ± 17.9 (6)	228.9 ± 19.2 (6)	235.6 ± 20.2 (6)	241.1 ± 21.1 (6)	244.3 ± 22.6 (6)	249.8 ± 24.3 (6)	257.2 ± 25.4 (6)	261.6 ± 25.6 (6)	268.6 ± 28.0 (6)	274.0 ± 28.0 (6)	278.4 ± 29.4 (6)
EE 0.1	220.5 ± 14.2 (6)	223.7 ± 15.6 (6)	228.2 ± 16.5 (6)	228.5 ± 13.5 (6)	232.0 ± 15.0 (6)	236.8 ± 16.3 (6)	241.2 ± 17.9 (6)	246.2 ± 19.1 (6)	252.2 ± 18.5 (6)	258.6 ± 19.2 (6)	262.0 ± 20.8 (6)
EE 1	217.5 ± 5.5 (6)	219.4 ± 3.7 (6)	219.2 ± 4.4 (6)	217.6 ± 4.9 (6)	218.3 ± 5.5 (6)	219.1 ± 7.6 (6)	219.7 ± 7.1 (6)	221.4 ** ± 7.4 (6)	223.0 ** ± 9.0 (6)	226.7 ** ± 10.8 (6)	227.0 ** ± 11.5 (6)
EE 10	216.1 ± 8.2 (6)	215.7 ± 9.2 (6)	213.4 * ± 8.8 (6)	209.9 ** ± 8.3 (6)	205.4 ** ± 7.7 (6)	205.0 ** ± 7.6 (6)	203.1 ** ± 6.9 (6)	202.3 ** ± 8.8 (6)	201.4 ** ± 8.4 (6)	198.5 ** ± 11.5 (6)	196.3 ** ± 12.0 (6)
EE 30	216.6 ± 6.5 (6)	216.6 ± 6.2 (6)	213.4 * ± 5.2 (6)	207.8 ** ± 6.4 (6)	204.8 ** ± 7.9 (6)	200.1 ** ± 9.9 (6)	198.3 ** ± 13.5 (6)	197.0 ** ± 16.4 (6)	194.3 ** ± 18.6 (6)	193.4 ** ± 22.9 (6)	193.8 ** ± 20.6 (6)

Table 4-2
Mean food intake (g) in Hershberger assay of ethynylestradiol for androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Administration period (day)										
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11
EE 0	21.9 ± 2.1 (6)	22.2 ± 2.6 (6)	20.4 ± 2.4 (6)	21.5 ± 3.1 (6)	21.1 ± 2.9 (6)	19.9 ± 2.9 (6)	21.7 ± 2.7 (6)	20.0 ± 1.4 (6)	21.1 ± 3.6 (6)	20.8 ± 2.1 (6)	20.1 ± 2.0 (6)
EE 0.1	21.9 ± 1.4 (6)	16.9 * ± 2.6 (6)	17.9 ± 2.9 (6)	15.5 ** ± 1.7 (6)	17.6 ± 1.6 (6)	16.7 ± 2.8 (6)	17.3 ** ± 2.8 (6)	17.7 ± 2.0 (6)	19.2 ± 2.4 (6)	19.3 ± 1.6 (6)	18.3 ± 1.4 (6)
EE 1	21.2 ± 1.4 (6)	16.3 ** ± 2.0 (6)	13.3 ** ± 1.1 (6)	12.8 ** ± 1.5 (6)	13.5 ± 0.6 (6)	11.6 ** ± 2.1 (6)	11.6 ** ± 1.3 (6)	12.4 ** ± 1.4 (6)	13.4 ** ± 1.5 (6)	14.3 ** ± 2.5 (6)	13.6 ** ± 1.9 (6)
EE 10	21.7 ± 2.1 (6)	14.2 ** ± 3.6 (6)	11.9 ** ± 1.5 (6)	10.8 ** ± 1.4 (6)	10.1 ** ± 1.1 (6)	10.3 ** ± 1.4 (6)	10.0 ** ± 1.6 (6)	11.3 ** ± 2.6 (6)	10.9 ** ± 1.5 (6)	9.7 ** ± 3.0 (6)	10.2 ** ± 1.9 (6)
EE 30	22.2 ± 1.7 (6)	14.5 ** ± 3.9 (6)	10.7 ** ± 1.6 (6)	8.9 ** ± 2.7 (6)	8.9 ** ± 2.5 (6)	8.4 ** ± 0.9 (6)	8.5 ** ± 2.7 (6)	9.5 ** ± 3.2 (6)	8.5 ** ± 3.8 (6)	8.8 ** ± 4.6 (6)	12.0 ** ± 2.5 (6)

ICI, ICI 182,780

EE, ethynylestradiol

Value, mean ± S.D.; (), number of animals measured

*, **, significantly different from EE 0 mg/kg group (*, p<0.05; **, p<0.01)

Table 4-3

Absolute organ weight in Hershberger assay of ethynylestradiol for androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg)	Levator ani & BC muscle (mg)	Glans penis (mg)	Cowper's gl. (mg)	Liver (mg)
EE 0	278.4 ± 29.4 (6)	22.8 ± 5.4 (6)	36.1 ± 9.2 (6)	224.1 ± 40.1 (6)	42.8 ± 6.4 (6)	9.5 ± 3.3 (6)	10897.9 ± 1638.0 (6)
EE 0.1	262.0 ± 20.8 (6)	22.0 ± 3.4 (6)	36.3 ± 8.0 (6)	203.7 ± 21.9 (6)	40.3 ± 3.5 (6)	6.8 ± 1.7 (6)	11756.3 ± 1013.1 (6)
EE 1	227.0 ** ± 11.5 (6)	19.1 ± 3.1 (6)	38.4 ± 2.3 (6)	168.0 ** ± 19.5 (6)	40.1 ± 1.0 (6)	8.5 ± 2.3 (6)	11505.6 ± 653.7 (6)
EE 10	196.3 ** ± 12.0 (6)	20.5 ± 5.0 (6)	42.6 ± 7.7 (6)	166.0 ** ± 24.2 (6)	41.1 ± 3.7 (6)	8.7 ± 2.2 (6)	11417.4 ± 1166.4 (6)
EE 30	193.8 ** ± 20.6 (6)	22.7 ± 4.6 (6)	49.7 * ± 11.6 (6)	171.9 * ± 34.8 (6)	39.2 ± 6.3 (6)	8.4 ± 2.0 (6)	12837.6 ± 2254.3 (6)

Table 4-4

Relative organ weight in Hershberger assay of ethynylestradiol for androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg/g)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg/g)	Levator ani & BC muscle (mg/g)	Glans penis (mg/g)	Cowper's gl. (mg/g)	Liver (mg/g)
EE 0	278.4 ± 29.4 (6)	0.082 ± 0.019 (6)	0.129 ± 0.029 (6)	0.801 ± 0.082 (6)	0.154 ± 0.019 (6)	0.034 ± 0.010 (6)	39.021 ± 2.148 (6)
EE 0.1	262.0 ± 20.8 (6)	0.085 ± 0.015 (6)	0.138 ± 0.028 (6)	0.779 ± 0.089 (6)	0.155 ± 0.020 (6)	0.026 ± 0.007 (6)	44.863 ± 1.583 (6)
EE 1	227.0 ** ± 11.5 (6)	0.084 ± 0.014 (6)	0.170 ± 0.014 (6)	0.740 ± 0.081 (6)	0.177 ± 0.008 (6)	0.037 ± 0.009 (6)	50.678 ± 1.095 (6)
EE 10	196.3 ** ± 12.0 (6)	0.104 ± 0.023 (6)	0.217 ** ± 0.037 (6)	0.845 ± 0.102 (6)	0.209 ** ± 0.014 (6)	0.044 ± 0.009 (6)	58.143 ** ± 4.046 (6)
EE 30	193.8 ** ± 20.6 (6)	0.118 * ± 0.025 (6)	0.256 ** ± 0.047 (6)	0.891 ± 0.171 (6)	0.205 ± 0.048 (6)	0.043 ± 0.008 (6)	65.902 ** ± 6.027 (6)

EE, ethynylestradiol

BC muscle, bulbocavernous muscle

Value, mean ± S.D.; (), number of animals measured

*, **, significantly different from EE 0 mg/kg group (*, p<0.05; **, p<0.01)

【 OECD 対応試験実施・調査研究 】

17. 子宮肥大及び Hershberger 試験

分担研究者 小野 宏

研究協力者 代田真理子、太田亮、宮原敬、大向英夫、又吉健、丸茂秀樹

財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所 研究顧問

研究要旨

卵巣摘出動物を用いる子宮肥大試験では、試験開始前の膣スメア観察が重要であることを示した。餌に含まれる植物エストロゲンは、マウス子宮肥大試験の結果に弱い影響を及ぼす可能性が示唆されたが、検出感度には影響しない程度の変化であると判断された。抗エストロゲン作用の陽性対照に使用される Tamoxifen (TMX) については、幼若ラットより卵巣摘出マウスの方がより明確に抗エストロゲン作用を検出した。

A. 研究目的

A-1 卵巣摘出動物を用いる子宮肥大試験では、試験開始前に膣スメア観察を行い、卵巣摘出の確認を行っているが、今回は、その妥当性について検証した。

A-2 餌に含まれる植物エストロゲンが、マウス子宮肥大試験の結果に及ぼす影響について検討した。

A-3 抗エストロゲン作用の陽性対照に用いられる TMX について、卵巣摘出マウスおよび幼若ラットを用いて、その反応性の違いを検討した。

供した動物の子宮重量と比較した。

B-2 汎用飼料 (CE-2) または植物エストロゲン含量を低減させた飼料 (PLD) を与えた卵巣摘出マウスに、Ethinylestradiol (EE) あるいは EE と TMX を併用投与し、7 日間の投与終了翌日に子宮重量を測定した。

B-3 TMX を卵巣摘出マウスには 7 日間、幼若ラットには 3 日間反復皮下投与し、子宮重量を測定して、抗エストロゲン作用の程度を比較した。また、幼若ラットについては TMX のエストロゲン作用についても調べた。

B. 研究方法

B-1 試験開始前の膣スメア観察で、発情期像あるいは発情前期像を呈し、試験系から除外した卵巣摘出マウスについて子宮重量を測定し、試験に

C. 研究結果

C-1 試験開始前の膣スメア観察で、発情期像あるいは発情前期像を呈した個体は、剖検時の肉眼的観察で卵巣の残存は確認されなかった。それ

ら個体の子宮重量は、同時期に実施した子宮肥大試験の溶媒対照群の子宮重量より明らかに高値を示し、その値は 0.2 µg/kg の EE を皮下投与した陽性対照群の値に匹敵するものもあった (Fig. 1)。

C-2 投与期間中の体重推移には、CE-2 群と PLD 群の間で明らかな差はみられなかった。CE-2 群の子宮重量は、いずれの用量においても PLD 群に比べて高値を示し、標準偏差が大きくなる傾向にあった (Fig. 2)。しかしながら、EE のエストロゲン作用および TMX の抗エストロゲン作用の検出感度に対しては、CE-2 群と PLD 群の明らかな差は認められなかった。

C-3 TMX の抗エストロゲン作用を卵巣摘出マウスと幼若ラット間で比較した結果、卵巣摘出マウスの方がより明確に抗エストロゲン作用を検出したが、いずれも用量依存性の乏しい変化であった (Fig. 3)。幼若ラットについては、TMX のエストロゲン作用についても調べた結果、0.3 mg/kg の用量から明らかな子宮肥大反応がみられ (Fig. 4A)、その値は、抗エストロゲン作用を調べた際の子宮重量に近似していた。その他、卵巣重量の低下が 1 mg/kg 群のみでみられた (Fig. 4B)。

D-E. 考察・結論

D-1 卵巣摘出動物では、試験開始前に膣スメアの観察を実施しているが、今回の結果から膣スメア観察が正確な試験の遂行にとって重要であることが示された。

D-2 汎用飼料 (CE-2) 群の子宮重量は、植物エストロゲン含量を低減させた飼料 (PLD) 群に比べて高値を示し、標準偏差が大きくなる傾向にあったが、EE や TMX による子宮重量増加あるいは抑制作用の検出感度に対して明らかな差は認められなかった。幼若ラットを用いた子宮肥大試験でも、Yamasaki ら (2002) が飼料中の植物エストロゲン量は子宮重量に影響しないと報告しているが、今回の結果から卵巣摘出マウスにおいては、子宮重量に弱い影響を及ぼすものの、検出感度には影響しない程度の変化であると考えられる。

D-3 TMX は、子宮において抗エストロゲン作用とともにエストロゲン作用を示すことが確認された。また、幼若ラットを用いる場合は、卵巣や視床下部-下垂体軸にも TMX が作用している可能性が示唆された。したかつて、TMX を抗エストロゲン作用の陽性対照物質として用いる場合には、併用投与する EE の量を高めに設定することと、幼若ラットの場合は、子宮以外の変化にも注意を払うことが必要と考えられた。

F. 健康危惧情報

無し

G. 研究発表

1) 論文発表

Shirota, M., Saito, Y., Imai, K., Horiuchi, S., Yoshimura, S., Sato, M., Nagao, T., Ono, H., Kato, M.: Influence of di-(2-ethylhexyl)phthalate on fetal testicular development by oral administration to pregnant rats. Journal of Toxicological Sciences, (2005) 30, pp.175-194.

Ono, H., Saito, Y., Imai, K., Kato, M.: Subcellular distribution of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rat testis. Journal of Toxicological Sciences, (2004) 29: 113-124

Watanabe, C., Kuwagata, M., Yoshimura, S., Azegami, J., Kojima, K., Ono, H., Nagao, T.: An improved technique for repeated gavage administration to rat neonates. Congenital Anomalies, (2003) 43: 177-179

2) 学会発表

太田 亮、宮原 敬、又吉 健、大向英夫、小野 宏：新生児期の低用量 DES 暴露が及ぼす加齢雌ラットの生殖系への長期的影響。日本内分泌攪乱化学物質学会第9回研究発表会。2006年11月（東京）

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

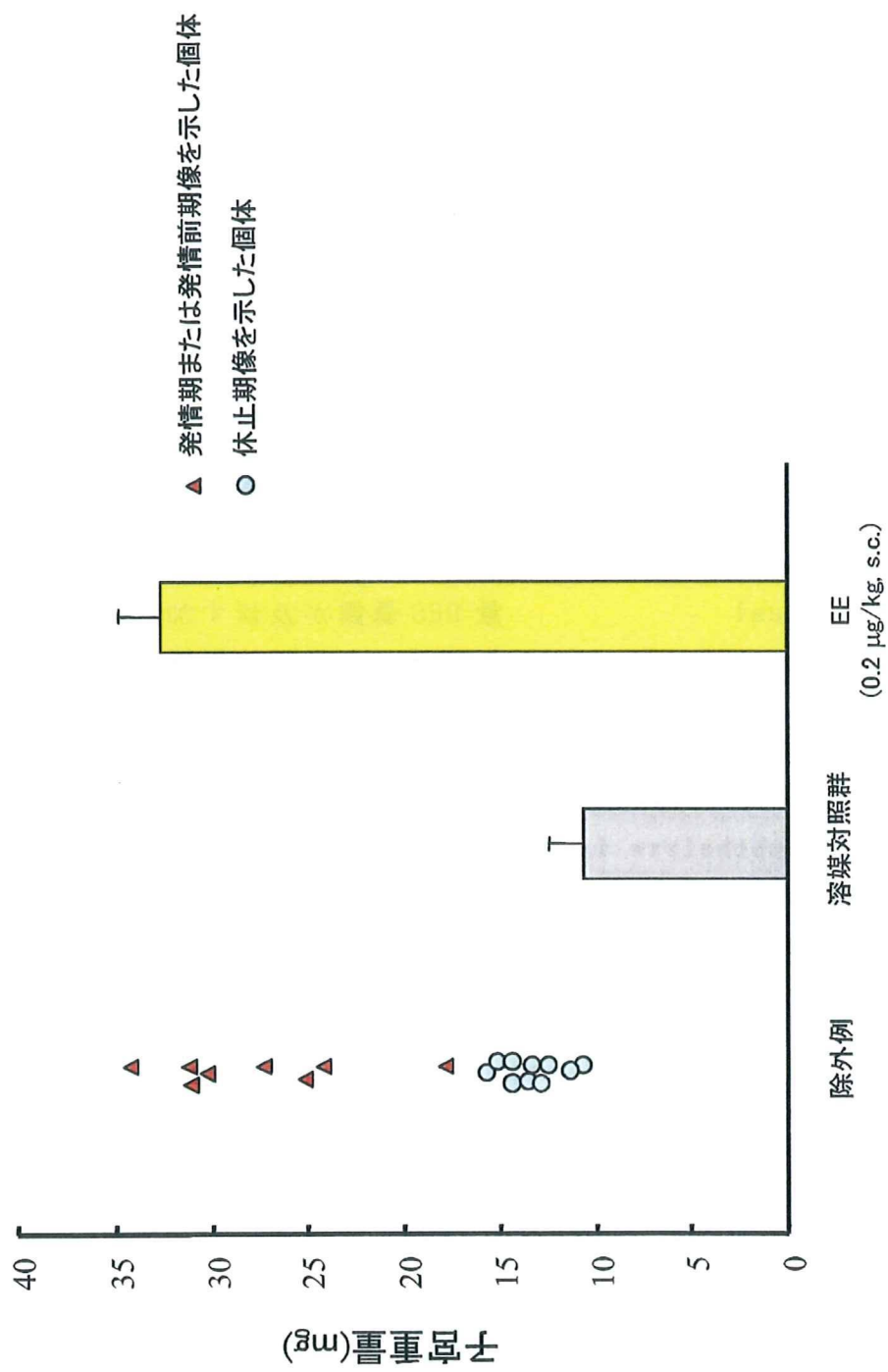


Fig. 1 Uterine weight of mice showing estrus or pro-estrus during quarantine period

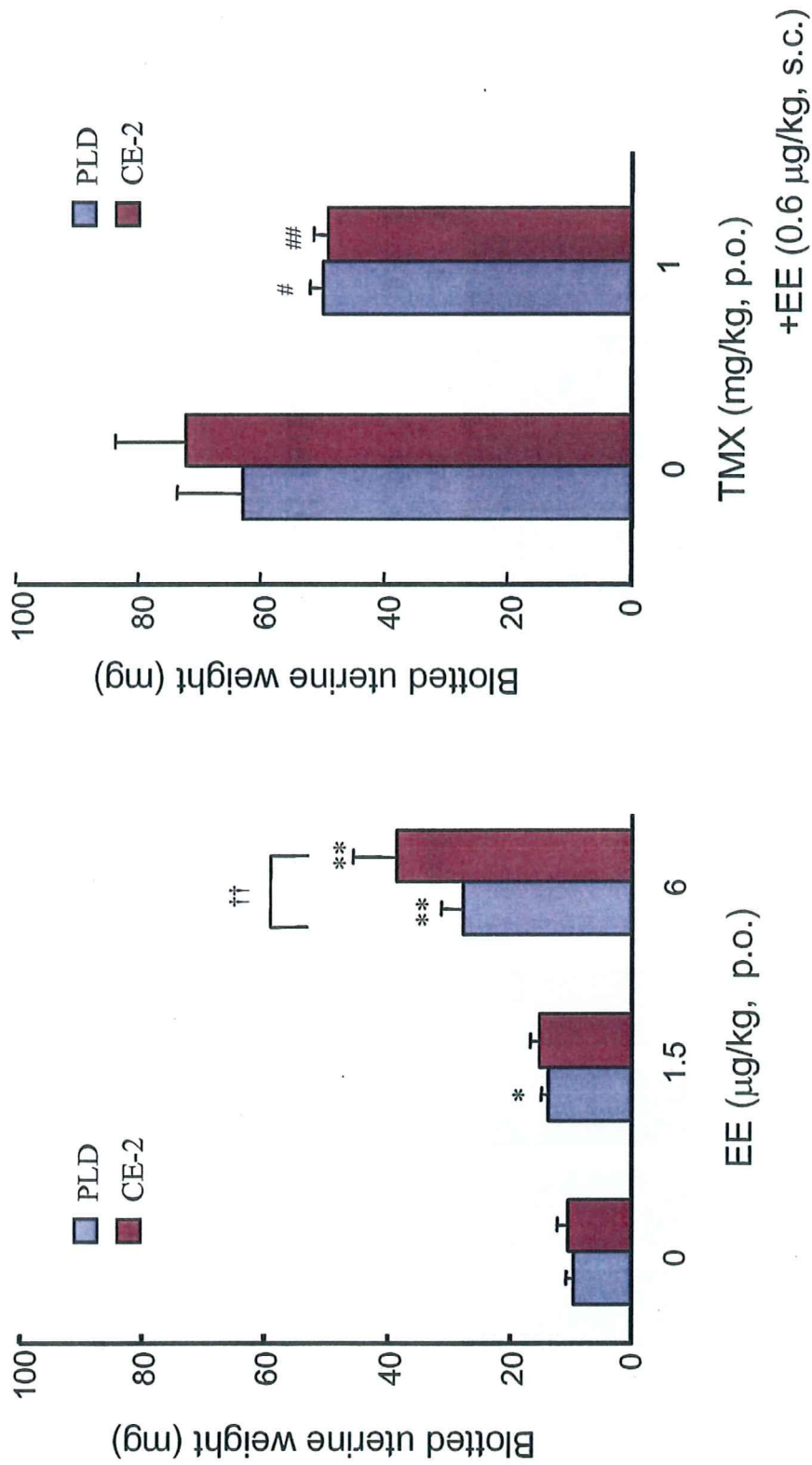


Fig. 2 Effect of phytoestrogen in diet on mouse uterotrophic assay

Values are mean \pm S.D.

*, ** Significantly different from the respective 0 μ g/kg EE group ($p < 0.05$, $p < 0.01$)

†† Significantly different between the PLD and CE-2 group ($p < 0.01$)

#, ## Significantly different from the 0.6 μ g/kg EE group ($p < 0.05$, $p < 0.01$)

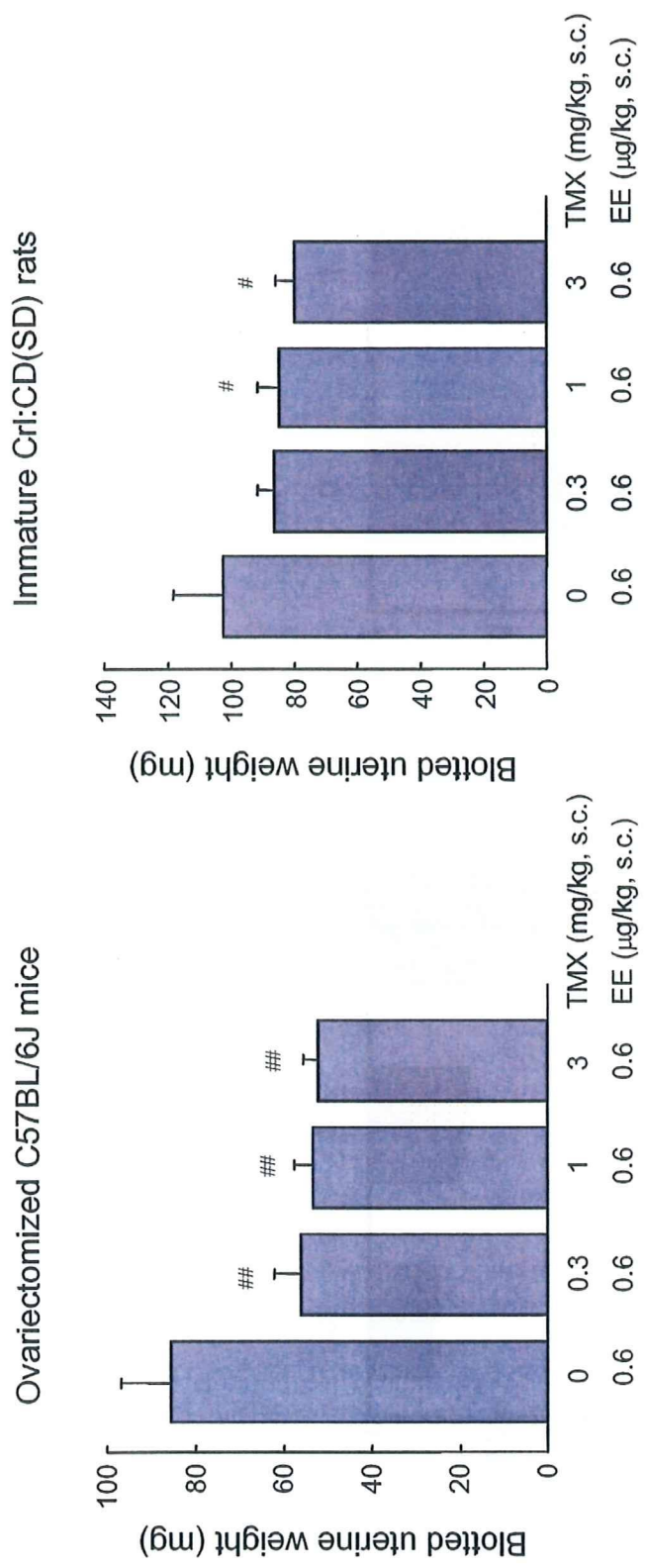


Fig. 3 Comparison of antiestrogenic activity of tamoxifen (TMX) between ovariectomized mice and immature rats

Values are mean ± S.D.
 #, ## Significantly different from the 0.6 μg/kg EE group (p < 0.05, p < 0.01)

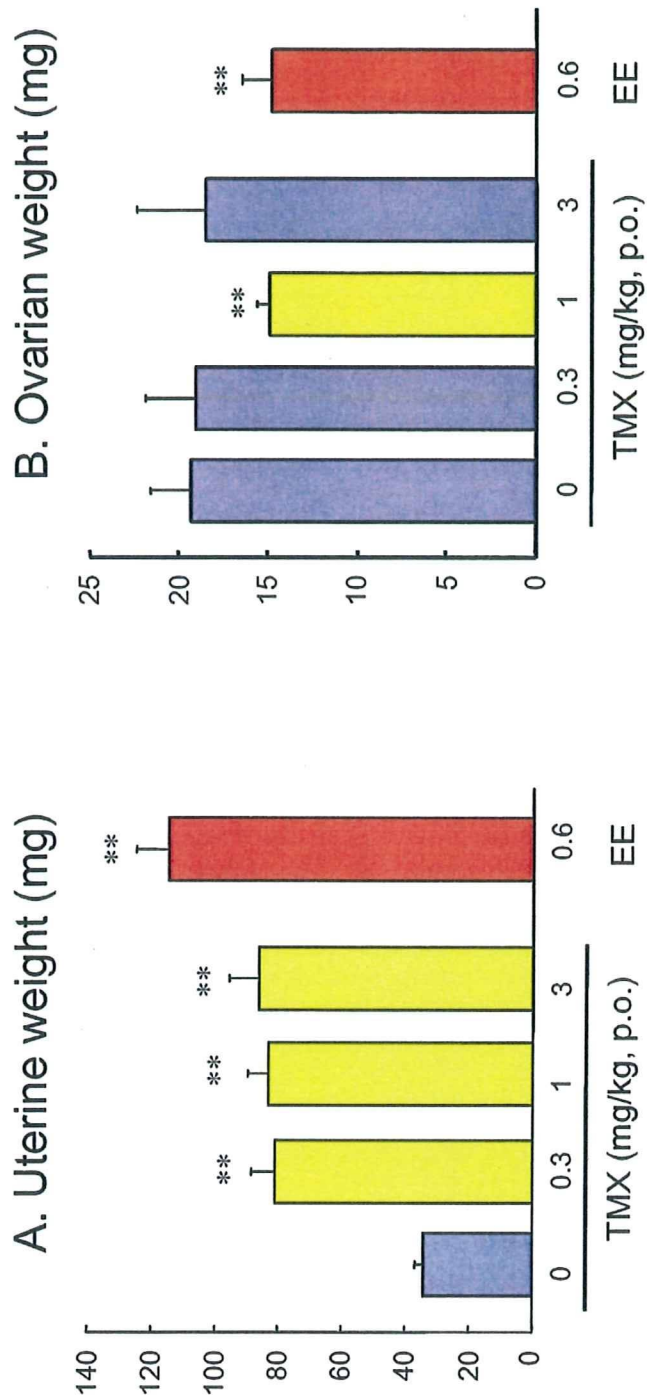


Fig. 4 Estrogenic activity of tamoxifen (TMX) in immature rats

EE, ethynylestradiol ($\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.)

Values are mean \pm S.D.

** Significantly different from the 0 mg/kg group ($p < 0.01$)

分担研究者 井上 達

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター センター長

研究要旨

この分担研究では、経済開発協力機構 OECD と世界保健機構 WHO で進められている試験法の開発や基礎研究の推進の課題と、本邦における内分泌かく乱化学物質(EDCs)問題に関する調査・研究とが、スムーズな国際相互協調の下で推進せられるよう、当研究班を通じて必要な情報収集と、本邦からの独自の情報の発信や提案を行うことを目的としている。ウェイブリッジ会議(「ヒトの健康と野生生物への内分泌かく乱化学物質問題のインパクトに関する欧州ワークショップ」, 1996)以降、これまで OECD と WHO は、WHO が EDC の定義の取り決め、リサーチ・インベントリの集約、およびグローバル・アセスメントの出版を、また OECD が試験法の開発を進めることで、相互に協調して活動を行ってきた。当研究班の平成 16 年(2006)以来 3 年間の研究は、本年度(2006~2007)がウェイブリッジ会議以降 10 年に当たるので、以上の研究活動の到達点と今後の課題を明らかにするための節目の年となった。ここではその一環として開催された欧州会議(EU)によるヘルシンキでのウェイブリッジ記念ワークショップと米国国立環境保健衛生研究所(ノースカロライナ)におけるビスフェノールAに関するワークショップでの論点を中心に諸国際組織や主立った研究団体における諸研究・諸活動の状況を整理した。

A. 研究目的

本分担研究の目的は、諸国際組織における現段階での研究・活動の到達点を整理し、今後の課題を明らかにすることにある。

経済開発協力機構 OECD と世界保健機構 WHO における内分泌かく乱化学物質問題での協調関係は、欧州委員会が「ヒトの健康と野生生物への EDCs 問題のインパクトに関する欧州ワークショップ」(い

わゆるウェイブリッジ会議, 1996)を主催した際、WHO はその定義の取りまとめ、リサーチ・インベントリの集約、ならびにグローバル・アセスメントの出版を進めることとし、他方、OECD が試験法の開発を進めることを申し合わせた。前者は、2002 年のグローバル・アセスメントの出版をもって一区切りをなし、後者については、本邦をリード国とした試験法、子宮腫大反応法のバリデーションが最終段

階に達しつつあるほか、ハーシュバーク一法、試験管内試験法、さらには環境生物試験法の開発研究がそれぞれ進展している。本分担研究では、諸国際組織における現段階での研究・活動の到達点を整理し、今後の課題を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

平成 18 年度中に開催された経済開発協力機構 OECD と欧州会議 EU や米国環境防護庁 EPA 等における諸会議を中心に、そこで報告された資料を整理した。

特に 11 月 9-10 日にヘルシンキで開催されたフィンランド科学アカデミーによる EU のウェイブリッジ+10 ワークショップと同じく 11 月 27~29 日に開催されたビスフェノールAのヒト、試験管内、インビボ、発がん性、および環境影響にわたる NIEHS による横断的ワークショップは当年度における歴史的な会議であったと考えられ重要な資料として銘記されるべきものと考えられた。尚、本報告は、化学物質の生体影響に関する基礎研究成果をトランスレーショナルに社会に対して公表してゆく上でも貢献するものと期待する。

C, D. 結果と考察

欧州委員会(EC)、世界保健機構化学用品安全計画 WHO/IPCS (当年度においてはトキシコジェノミクスを用いた内分泌かく乱関連物質の評価法に関する検討が進み、

2007 年 5 月下旬に OECD と連携してワークショップを進める計画が進行したことを除いて特記すべき記録はなかった。)、経済開発協力機構 OECD (環境・健康・安全性部門)などを中心に報告されている EDCS 研究活動の現状をまとめた。概略は以下の通り。

1. 欧州委員会(EC) :

欧州連合の EDCS 関連の研究体制については、平成 17 年度報告に全般的な概要をまとめた。

すでに述べたとおり欧州委員会はフィンランドアカデミーと協力しのもとに、ウェイブリッジ+10 ワークショップ—内分泌かく乱化学物質のインパクトなどワークショップ—を開催した。(11 月 8、9、10 日)。このワークショップでは 1996 年 12 月のウェイブリッジ会議におけるまとめの資料に即して欧州を中心に圏外からも 10 名ほどのこの領域の専門研究者を招待して the state of science を検討したもので近くその詳細なまとめが公表される予定となっている。

討議はヒト健康影響、野生動物に対する影響、メカニズムと実験動物モデル、および曝露とリスクに関するそれぞれの検討をこの 10 年間の出版報告を基礎にまとめた。その概略は以下のようにまとめられる。

1. ヒト影響についてはグローバル・アセスメント (2002 年) ですでにまとめられているように「成体に対する曝露は、

正常の恒常性機構によって相殺されるので何ら有意で検出可能な効果を引き起こさないかも知れない。しかし、胎生期や新生児期のような成長期あるいは性の成熟期における曝露などは、機能の恒久的な変化や刺激／抑制のシグナルへの感受性の変化を引き起こすかもしれない」との規定を確認した。

2. 低用量作用の存否、混合効果等については生体作用機構の性質、類似性などによって物質と物質の組合せによる違いはあるものの疑いのない低用量作用と少なくとも相加性の混合効果が複数の研究機関から報告、確認されており、したがって高用量における生体影響から外挿した低用量作用は見直しを余儀なくされることになる。

3. 現在まで一部の可塑剤を除いてヒトへの明らかな一般的曝露影響は認められておらず、その要因としてはヒトへの曝露経路への内分泌かく乱物質の混入が基本的に遮断されていることに基づくものとの考え方がありひきつづき十分な警戒がもとめられる。4. 発達期の胎児、新生児、二次性徴期のヒトについての危惧とその蓋然性に関する認識は実験的裏づけをもって根拠をなしとしない。5. 環境生物特に水棲生物での影響については持続的曝露環境下であり汚染環境の受容体が避けられないこれらの水棲生物に対する対応は独自に検討される必要がある。6. 更に内分泌学の基礎については諸臓器における受容体の分布や遺伝子発

現の結果から神経との関係での行動はもとより肝臓、脂肪織等に対する認識が深まり内分泌かく乱の概念が拡張した。尚、ワークショップでは、当分担研究者が本邦から唯一招待出席者として招聘され、本邦における内分泌かく乱研究の現時点での到達点についてデータを交えて発表した。

2. 世界保健機構化学品安全計画 WHO/IPCS の活動 :

これまでの WHO/IPCS における活動については平成 17 年度報告にその経過をまとめた。WHO/IPCS において、編纂したグローバル・アセスメントにおける EDCS に対する認識は以下のとおりである。その後の WHO/IPCS の活動は子供の健康問題 (Children's Issue) と融合する形で検討が進められている。成体に対する曝露は、正常の恒常性機構によって相殺されるので何ら有意で検出可能な効果を引き起こさないかも知れない。しかし、胎生期や新生児期のような成長期あるいは性の成熟期における曝露などは、機能の恒久的な変化や刺激／抑制のシグナルへの感受性の変化を引き起こすかもしれない。

3. 経済開発協力機構 OECD(環境・健康・安全性部門) :

試験法評価委員会 (EDTA Task Force) の設地 : OECD は、ウェイブリッジ会議における試験法の開発の申合せに沿って内

分泌かく乱に関する試験法の開発については、特別のガイドライン作成プログラムを組んできた。すなわち専門家によるEDCSの試験法評価委員会(EDTA Task Force)を設置し、EDCSに関連するすべての作業を監督する事としたほか、このEDTAの下に1999、2000、2001と相次いで、哺乳綱(VMG-mammalian)、環境生物(VMG-eco)、非動物試験(VMG-Non-Animal)の3つのバリデーション運営委員会(VMG)をそれぞれ設置した。

今回特記すべきことは哺乳類動物を用いた試験法開発にバリデーションを担当してきたVMG-mammalian(Validation Management Group)で、子宮腫大反応試験でのピアレビューが終了しガイドライン案の作成最終段階に達し1月17-18両日スロベニア共和国においてこのための討議を進めたことにある。そこではアゴニスト、アンタゴニスト対照物質試験の実施頻度をはじめ細部に立ち入った最終的な詰め討議が行われた。

VMG-ecoや、VMG-NA等のグループ討議についてもそれぞれ進展している。

4. 欧州代替法試験バリデーション委員会(ECVAM) :

ECVAM ED タスクフォース (座長 Daniel Dietrich、他、産官学より9名の専門家で構成; 事務局: Thomas Hartung 他)は: ①OECD EDの子宮腫大反応試験へのピア・レビュー報告、②ハーシュバガー試験結果へのコメント対応などを行

ってきたが2007年度のWC6世界動物実験代替法会議の東京における主催と相俟ってより密接な連携のコーディネーションをわが国が司る運びとなっている。

5. 米国環境衛生科学研究所(NIEHS):

NIEHSは本年度11月ビスフェノールAの影響についてヒト、試験管内、インビボ、発がん性、および環境影響の各分野にわたって横断的な集中討議を行った。ここでの討議内容はいまだ公表されていないがビスフェノールAの生体影響メカニズムや潜在的発がん蓋然性などについて突っ込んだ討論が行われており公表され次第本研究班へのフィードバックを行う。なおこの会議における低用量レベルでの実験結果との整合性など曝露レベルの問題点も指摘されておりこれらについても後ほどよく分析する必要がある。

E. 結論

内分泌かく乱化学物質問題は、1) 化学物質がヒトを含む哺乳綱動物の内分泌系に影響を与える可能性への疑問(メカニズム)、2) 動物実験で影響の見られない低用量での影響への疑問(低用量特異性)、3) 実環境中での曝露実態への疑問(曝露評価)が当初から投げかけられていた疑問であった。グローバル・アセスメントの編纂過程で1500件を超える報告を検討する中で明らかになったことは、世界の事例の中では、これらのいずれかの条件が崩れた時に、ヒトを含む様々な生物に内分泌かく乱現象が現実

に起こっているという事実であった。他方、野生生物における曝露状況とヒトにおける曝露経路は異なりヒトにおける内分泌かく乱化学の蓋然性は限定的であることも明らかになってきた。

ウェイブリッジ会議以降 10 年を迎えた本研究の最終段階にあたり必要なことからはフィンランドにおける欧州委員会の「ワークショップや NIEHS におけるビスフェノール A に関するワークショップで明らかになった認識の到達点に即してヒト影響メカニズム研究、適切な試験法の開発、などの諸点から OECD や WHO における連携のもとで引続き国際協力を進めてゆくことである。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著

Corvi R, Ahr HJ, Albertini S, Blakey DH, Clerici L, Coecke S, Douglas GR, Gribaldo L, Groten J P, Haase B, Hamernik K, Hartung T, Inoue T, Indans I, Maurici D, Orphanides G, Rembges D, Sansone SA, Snape JR, Toda E, Tong W,

van Delft JH, Weis B, Schechtman LM. (2006). Meeting report: Validation of toxicogenomics-based test systems: ECVAM-ICCVAM/NICEATM considerations for regulatory use. *Environ Health Perspect* 114, 420-9.

2. 学会発表

井上 達：教育講演 EL2 新しい視点から見たトキシコロジー：発生・成長・老化. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2006.7.4) [名古屋, (The Journal of Toxicological Sciences, 31 suppl., S16; 2006)] Inoue T. Educational Lecture EL2 Prospect of future Toxicology: Development, maturation and senescence. The 33rd Annual Meeting for The Japanese Society of Toxicology (2006.7.4) [Nagoya, The Journal of Toxicological Sciences, 31 suppl., S16; 2006]

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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 山崎 寛治

財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所 所長

研究要旨

OECDでレベル3として検討されている改良TG407の適用について検討した。現在まで OECD ガイドライン化を目的とした試験については Phase 1、2 が実施され、終了している。最終段階である Phase 2 の結果が 2006 年の第 5 回 Validation Management Group of Mammalian Testing (VMG) で公表された。会議では一部の弱いエストロゲン物質、あるいはアンドロゲン物質で作用が検出されなかったことから、内分泌作用を検出するスクリーニング試験としては不十分であるとの意見が出された。しかし、改良 TG407 が一般毒性試験であること、Phase 1、2 において強いエストロゲン物質、アンドロゲン物質、甲状腺作用物質の影響が検出されていることなどを考慮し、VMG としては現行の OECD ガイドラインである TG407 を改良 TG407 に変える方向で考えるとの結論になった。現在、Phase 1、2 の成績をもとにしたピアレビューが進行中であり、次回の VMG 会議でその結果が公表される予定である。

A. 研究目的

OECD では化学物質の内分泌かく乱物質の検出するスクリーニング試験法の一つとして、従来の OECD TG407 に内分泌作用を検出する可能性のある検査項目を加えた改良 TG407 を開発している。現在まで、Validation Phase 1、2 の試験が終了している。日本はいずれの Validation 試験にも参加している。今年度の目的は、最終段階である Phase 2 の結果を中心に検証し、本試験法の適応について検証する。

B. 研究方法

日本が積極的に参加してきた Validation の結果をもとに、さらに公表されている結果を加えながら総合的に解析し、本試験の適応について検討する。また、内部データを公表し有用性についても検討する。

C-D. 研究結果及び考察

1. OECD の動向

2006 年 4 月に第 5 回 Validation Management

Group of Mammalian Testing (VMG) 会議が開催され、Phase 2 のデータが公表された。また、2007 年 1 月の第 6 回 VMG 会議においても状況が報告された。Phase 2 の試験方法としては、OECD の改良 TG407 プロトコルに従い 10 物質 (estrogen 物質: ethinyl estradiol, genistein, nonylphenol、anti-estrogen 物質: tamoxifen、androgen 物質: methyl testosterone、anti-androgen 物質: flutamide、*p, p'*-DDE、aromatase inhibitor: CGS 13820B、thyroid toxicant: propylthiouracil、l-thyroxin) の試験が実施された。なお、試験施設間の相関性をみる目的で、同じ物質を 2 試験機関で実施した。その結果、10 物質の内、7 物質については内分泌かく乱作用が検出されたが、genistein、nonylphenol、*p, p'*-DDE の 3 物質については明らかな内分泌作用は検出されなかった (ただし、*p, p'*-DDE については試験を実施した 2 機関のうち 1 機関で検出されている)。そこで、本試験法が内分泌かく乱物質を検出する試験法として適切か議論となり、本試験法は他のレベル 3 である子宮肥大試験、Hershberger 試

験とは異なり、内分泌かく乱作用のスクリーニング試験としては適切ではないとの結論がなされた。しかし、本試験法は一般状態から血液、血液生化学検査、さらに病理検査を行う一般毒性試験であること、改良 TG407 のもとになる TG407 が広く使用されていること、さらに Phase 2 では thyroid toxicant を含め強い estrogen、androgen 作用物質の影響がとらえられていること、さらに本試験は何らかの情報を得るには有用であるということなどから最終的に VMG では現行の OECD ガイドラインである TG407 に変えて改良 407 をガイドライン化しようとの方向性が決定した。現在、Phase 1、2 の結果をもとにピアレビューが進行中であり、次回の VMG で報告される予定である。

上記のように Phase 2 の結果については様々の問題点がみられる。日本の各機関も Phase 2 の試験に参加したが、やはり内分泌かく乱作用を検出するスクリーニング試験（レベル 3）としては検出感度からして不十分と考えられる。また、in vitro 試験、子宮肥大試験、Hershberger 試験で内分泌かく乱作用がみられ、本試験で検出されなかった場合をどうするのかも問題として残る。改良 TG407 で内分泌かく乱作用がみられなかったため、レベル 4、5 の試験の必要性はなく、内分泌かく乱作用が否定されるということにはならない。現行の OECD TG407 を改良 TG407 に変更しようという方向性になったが、今後ガイドライン変更までの過程には様々の議論が必要と思われる。

2. 文献調査

平成 18 年度に公表された論文について調査した。その結果、以下の論文が公表されていた。

- ① Shin et al. Repeated 28-day oral toxicity study of ketoconazole in rats based on the draft protocol for the “Enhanced OECD Test Guideline No. 407” to detect endocrine effects. Arch. Toxicol. 80, 797-803, 2006.
- ② Shin et al. OECD validation of the rodent

Hershberger assay using three reference chemicals; 17 α -methyltestosterone, procymidone, and p,p'-DDE. Arch. Toxicol. 2007 (in press)

③ Gelbke et al. The enhancement of the subacute repeat dose toxicity test OECD TG 407 for the detection of endocrine active chemicals: comparison with toxicity tests of longer duration. Arch. Toxicol. 2007 (in press) ①、②の論文は韓国の OECD のガイドライン化に参加した研究機関が公表したもので、一部には Validation の結果が含まれている。両論文とも OECD の開発している改良 TG407 は内分泌かく乱作用の検出には有用としている。一方、③の論文も OECD で実施した validation 結果と過去の長期の試験データとの比較であるが、改良 TG407 の有用性について明確な結論は記載していない。

3. 学会発表

ガイドライン化を考慮し内部データとして所有していた di(2-ethylhexyl)adipate、diethylphthalate を使用した改良 TG407 の試験結果を、43rd Congress of The European Societies of Toxicology で発表し（別添資料）、さらに論文として公表した（発表論文参照）。これら両物質はプラスチック製剤に広く使用され、内分泌かく乱作用を疑わせる変化が報告されている。今回、OECD validation プロトコルに従い、両物質とも 0、40、200、1000 mg/kg/day を投与した。その結果、di(2-ethylhexyl)adipate では性周期の乱れ、卵巣への組織学的変化がみられたが、diethylphthalate では異常は観察されなかった。

E. 結論

国内の研究機関が参加した Phase 2 の成績が VMG で公表された。結果としては、一部の弱いエストロゲン物質、あるいはアンドロゲン物質で作用が検出されず、スクリーニング試験として適切かという議論になり、内分泌作

用を検出するスクリーニング試験としては不十分であるとの意見があった。しかし、最終的に VMG では改良 TG407 が一般状態から血液、血液生化学検査、さらに病理検査を行う一般毒性試験であること、強いエストロゲン物質、アンドロゲン物質、甲状腺作用物質の影響が検出されているなどから、現行の OECD TG407 を改良 TG407 に変更する方向でいこうとの結論になった。現在、Phase 1、2 の成績をもとにしたピアレビューが進行中であり、次回の VMG 会議でその結果が公表される予定である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 発表論文

1) 雑誌

① Miyata K, Shiraishi S, Houshuyama S, Imatanaka N, Umamo T, Minobe Y, Yamasaki K. Subacute oral toxicity study of di(2-ethylhexyl)adipate based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test

Guideline no. 407". Arch. Toxicol. 80, 181 – 186. 2006.

② Shiraishi K, Miyata K, Houshuyama S, Imatanaka N, Umamo T, Minobe Y, Yamasaki K. Subacute oral toxicity study of diethylphthalate based on the draft protocol for "Enhanced OECD Test Guideline no. 407". Arch. Toxicol. 80, 10-16. 2006.

2). 学会発表

① Yamasaki K, Shiraishi S, Miyata K, Houshuyama S. Subacute oral toxicity study of di(2-ethylhexyl)adipate and diethylphthalate based on the draft protocol for "Enhanced OECD Test Guideline no. 407". EUROTOX, 2006.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

無し

添付資料

Subacute oral toxicity study of di(2-ethylhexyl)adipate and diethylphthalate based on the draft protocol for "Enhanced OECD Test Guideline no. 407"

K. Yamasaki, K. Shiraishi, K. Miyata, S. Houshuyama
Hita Laboratory, Chemicals Evaluation and Research Institute, Oita, Japan,

The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) has proposed the use of uterotrophic assay, the Hershberger assay, and enhanced OECD test guideline no. 407 (enhanced TG 407) as in vivo screening tests to detect endocrine properties. The enhanced TG 407 for various chemicals has recently been performed in several laboratories, and its usefulness as an in vivo screening test to detect endocrine-mediated effects has been confirmed. Di(2-ethylhexyl)adipate is widely used as a plasticizer in an extensive array of products, and it also has been detected in ready-to-eat baby food. A prolonged gestation period in the dams and an increase in postnatal deaths among their offspring have been reported when rats were given di(2-ethylhexyl)adipate from pregnancy day 7 to weaning day 17, and urethral deformity and skeletal abnormalities have also been reported in the offspring of rats given di(2-ethylhexyl)adipate on pregnancy days 1-22. On the other hand, diethylphthalate is also used as a plasticizer, in a wide variety of products, but a number of phthalates and their metabolites are suspected of having endocrine disrupting effects. Diethylphthalate has been reported to have binding affinity for hepatic estrogen receptors, and phthalic acid di-n-amy ester has been reported to have an androgenic antagonistic effect in the Hershberger assay. Therefore, we performed a 28-day repeated-dose toxicity study of di(2-ethylhexyl)adipate and diethylphthalate based on the draft protocol of the "Enhanced OECD Test Guideline 407" to investigate whether these compounds have endocrine-mediated properties according to this assay. Di(2-ethylhexyl)adipate and diethylphthalate were orally administered to SD rats at doses of 0, 40, 200 and 1000 mg/kg/day for at least 28 days. Disturbance of the estrous cycle and increased ovarian follicle atresia were detected in the 1000 mg/kg group given di(2-ethylhexyl)adipate, while no endocrine-mediated effects were detected based on any of parameters examined in rats given diethylphthalate.