OECD/OCDE

2009/09/07

試験ガイドライン No.441

ラットにおけるハーシュバーガー試験：
（抗）アンドロゲン様作用の短期スクリーニング試験

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。
本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。
This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2009), Test No. 441: Hershberger Bioassay in Rats: A Short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264076334-en.

©OECD(2009)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at

http://www.oecd.org/termsandconditions/

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

2009 年 9 月 7 日採択

経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン

ラットにおけるハーシュバーガー試験：（抗）アンドロゲン様作用の短期スクリーニング試験

はじめに

1. OECD は 1998 年に内分泌かく乱物質のスクリーニングと試験のため、既存ガイドラインの改訂と新規ガイドラインの作成という、最重要の活動を開始した(1)。その活動の一つが、ラットを用いたハーシュバーガー試験のガイドライン作成であった。本試験法は医薬品業界で数十年にわたって用いられた後、1962 年に初めて公式な専門委員会によってアンドロゲン様化学物質のスクリーニング用に標準化された(2)。このラットハーシュバーガー試験については、2001～2007 年に徹底的な有効性評価計画が実施され、その中で、概説的な参考資料の作成(23)、試験法の詳細を記した論文の編集(3)、解剖の手引きの作成(21)、ならびに本試験法の信頼性と再現性を示すための広範な試験機関内および試験機関間での検討が行われた。この有効性評価試験は、強い参照アンドロゲン 1 種（プロピオン酸テストステロン（TP））、強い合成アンドロゲン 2 種（酢酸トレンボロン、メチルテストステロン）、強い抗アンドロゲン作用を有する医薬品 1 種（フルタミド）、天然アンドロゲン（ジヒドロテストステロン（DHT））の強い合成阻害剤 1 種（フィナステリド）、弱い抗アンドロゲン作用を有する農薬数種（リニュロン、ビンクロゾリン、プロシミドン、p,p' DDE）、強い 5α 還元酵素阻害剤 1 種（フィナステリド）、および既知の陰性化学物質 2 種（ジニトロフェノール、ノニルフェノール）を用いて実施された(4)(5)(6)(7)(8)。この試験ガイドラインは、同試験法についての長年にわたる歴史的経験と、有効性評価計画中に得られた経験およびそこから生じた結果に基づくものである。

2. ハーシュバーガー試験は雄性生殖器の付属組織を用いた短期 *in vivo* スクリーニング試験である。この試験法は 1930 年代に始められ、1940 年代に修正されて雄性生殖器のアンドロゲン反応性の筋肉も含むようになった(2)(9-15)。1960 年代にはアンドロゲン様作用を有する可能性のある 700 を超える物質について標準化されたプロトコールによる評価が行われ(2)(14)、同年代にはアンドロゲン様物質と抗アンドロゲン物質の両方に対して本試験法を用いることは標準的な手法と考えられるようになった(2)(15)。現行の試験法は、去勢した思春期前後の雄ラットにおける 5 種類のアンドロゲン依存性組織の重量変化に基づくもので、化学物質がアンドロゲン活性剤、拮抗剤または 5α 還元酵素阻害剤としての生物活性を発揮する能力を評価する。本試験ガイドラインに含まれる 5 種類のアンドロゲン依存性標的組織は、腹側前立腺（VP）、精嚢（SV）（内容液と凝固腺を含む）、肛門挙筋・球海綿体筋（LABC）、カウパー腺（両側、COW）および陰茎亀頭（GP）である。去勢した思春期前後の雄ラットでは、この 5 種類の組織はいずれもアンドロゲンに反応して絶対重量の増加を示す。一方、強い参照アンドロゲン投与による重量増加刺激の存在下では、この同じ 5 種類の組織はいずれも抗アンドロゲン物質に反応して絶対重量の減少を示す。なお、ハーシュバーガー試験の主要モデル動物は外科的に去勢した思春期前後の雄で、同試験の有効性評価計画の第 1、2、3 段階ではこれについて有効性を確認した。

3. ハーシュバーガー試験は、アンドロゲン活性剤、アンドロゲン拮抗剤および 5α 還元酵素阻害剤のメカニズム的な *in vivo* スクリーニング試験として使用でき、その適用は「内分泌かく乱化学物質の試験と評価のための OECD の概念的枠組み」（補遺 2）の関連の中でみることができる。この概念的枠組みの中で、ハーシュバーガー試験は単一の内分泌メカニズム（（抗）アンドロゲン様作用）に関してのデータを提供する *in vivo* 試験としてレベル 3 に含まれている。同試験は、内分泌系に影響を与える可能性のある化学物質を特定するための *in vitro* および *in vivo* 試験の組合せに含めるように意図されており、最終的にはヒトの健康や環境に対する有害性とリスクの評

© OECD（2009 年）
出典が適切に示されている限り、本文書の非営利目的での個人的使用は自由であり、OECD による事前の承諾を必要としない。本文書を営利目的で使用する場合には、OECD の文書による許可を必要とする。

価を目指すものである。

4. 去勢手順に対する動物愛護上の懸念から、去勢を必要としないように、無傷の（去勢されていない）離乳直後の雄を刺激して用いる方法がハーシュバーガー試験の代替法として検討され、この刺激を与えた離乳児による試験法の有効性の確認が行われた(24)。しかし、その有効性評価試験では、離乳児を用いたハーシュバーガー試験は、試験した用量で弱い抗アンドロゲン物質によるアンドロゲン依存性器官重量への影響を必ずしも常には検出できないようであった。このため、この方法は本試験ガイドラインには含めなかった。ただし、その使用には動物愛護上の利点のみならず、その他の作用機序に関する情報が得られる可能性もあるため、ガイダンス文書 115 にはこれについて記載されている。

最初に考慮すべき事項および限界

5. アンドロゲン活性剤と拮抗剤はアンドロゲン受容体にリガンドとして作用し、受容体によって制御されている遺伝子の転写をそれぞれ活性化または阻害する。また、化学物質の中には、一部のアンドロゲン標的組織において、テストステロンからより強い天然アンドロゲンであるジヒドロテストステロンへの変換を阻害するものもある（5α 還元酵素阻害剤）。このような物質は生殖や発生に対する影響など有害な健康影響をもたらす可能性があるため、アンドロゲン活性剤や拮抗剤、また 5α 還元酵素阻害剤の可能性のある化学物質を速やかに評価することが規制上必要である。受容体との結合やレポーター遺伝子の転写活性化によって測定される *in vitro* におけるリガンドのアンドロゲン受容体に対する親和性は有用な情報であるが、有害性をもたらす唯一の決定因子ではない。その他の決定因子としては、体内に入ってからの代謝活性化や不活化、標的組織への分布、体内からの排出などが含まれる。したがって、ある化学物質が活性を有する可能性は、*in vivo* の関連条件および暴露下でスクリーニングする必要があるということになる。ただし、その物質の吸収 - 分布 - 代謝 - 排泄（ADME）に関する特性が分かっている場合には、*in vivo* での評価はそれほど必須ではない。アンドロゲン依存性組織、特に去勢した思春期前後の雄ラットのものは、アンドロゲンの刺激に対する反応として急速かつ顕著な成長を示す。また、げっ歯類、特にラットは有害性確認のための毒性試験で広く用いられている。このため、去勢した思春期前後のラットを用いる試験法と同試験法における 5 種類の標的組織は、アンドロゲン活性剤と拮抗剤および 5α 還元酵素阻害剤の *in vivo* スクリーニングに適しているといえる。

6. このガイドラインは OECD の有効性評価試験で用いられたプロトコールに基づくもので、このプロトコールについては試験機関内および試験機関間での検討によって信頼性と再現性が示されている(4)(5)(6)(7)(8)。また、このガイドラインにはアンドロゲン様物質と抗アンドロゲン物質の両方のための手順が記載されている。

7. OECD によるハーシュバーガー試験の有効性評価計画で抗アンドロゲン物質の検出に用いた TP の用量には各試験機関間でやや違いがあった（0.2 および 0.4 mg/kg/day、皮下投与）が、弱い、または強い抗アンドロゲン活性の検出能力に関してはこの 2 つのプロトコール間にほとんど差はなかった。ただし、当然のことながら、TP の用量が高すぎて弱いアンドロゲン受容体（AR）拮抗剤の作用を阻害するようであってはならないし、低すぎてアンドロゲン拮抗剤を同時投与しなくてもアンドロゲン依存性組織がほとんど成長反応を示さないようであってもならない。

8. 各アンドロゲン依存性組織の成長反応はすべてアンドロゲン作用によるとは限らず、アンドロゲン活性剤以外の化合物でも一部の組織重量を変化させうる。しかし、いくつかの組織で同時に成長反応がみられた場合には、アンドロゲン特異的メカニズムによるものであることがより強く裏付けられる。たとえば、高用量の強いエストロゲンによって精嚢重量は増加するが、本試験法で用いるその他のアンドロゲン依存性組織はそのような反応を示さない。一方、抗アンドロゲン作用を有する化学物質はアンドロゲン受容体拮抗剤または 5α 還元酵素阻害剤として作用する。このうち 5α 還元酵素阻害剤では、より強いジヒドロテストステロンへの変換が組織ごとに異なるため、みられる影響も一定せず、フィナステリドのように 5α 還元酵素を阻害する抗アンドロ

ゲン物質は、フルタミドなどの強い AR 拮抗剤に比べ、腹側前立腺に対して他の組織より顕著な影響を与える。組織反応におけるこの差は、AR を介した作用機序と 5α 還元酵素を介した作用機序との識別に用いることができる。また、アンドロゲン受容体は進化的に他のステロイドホルモンの受容体と関連しているため、他のホルモンを生理的レベルを超えるような高用量で投与すると、結合が起きて TP の成長促進作用に拮抗することがある(13)。さらに、ステロイド代謝の亢進とそれによる血清テストステロンの減少のためにアンドロゲン依存性組織の成長が抑制されることも起こりうる。このため、ハーシュバーガー試験における陽性結果は通常、*in vitro* 試験（AR およびエストロゲン受容体（ER）結合試験や対応する転写活性化試験など）または同様のアンドロゲン標的組織を調べるその他の *in vivo* 試験（雄の思春期試験、無傷の成熟雄動物を用いた 15 日間試験、28 日間または 90 日間反復投与試験など）から得られる科学的根拠の重要度（weight of evidence）に基づいて評価する。

9. 経験上、アンドロゲン様作用を有する生体異物は抗アンドロゲン作用を有する生体異物よりまれである。このため、ハーシュバーガー試験はほとんどの場合、抗アンドロゲン物質のスクリーニングに用いられることが予想される。それでもなお、ステロイドやステロイド様化学物質、また概念的枠組み（補遺 2）のレベル 1 または 2 の方法でアンドロゲン様作用の可能性を示す結果が得られた化学物質については、アンドロゲン様物質検出用の手順を用いてみることが推奨される。さらに、レベル 5 の試験でも（抗）アンドロゲンプロファイルに関連した有害作用が認められることがあり、その場合にはその物質が内分泌的な作用機序で働いているのかを確認する必要が出てくる。

10. 動物を用いるすべての手順は、動物管理に関する各国の基準に従うものとする。管理および取り扱いに関する以下の記載は最低限守るべき基準であり、各国の規制が優先される。動物の人道的な取り扱いに関するさらなるガイダンスが OECD から出されている(17)。

11. 実験動物を用いるすべてのバイオアッセイと同様、その試験を実施する必要性については注意深く考察する。実施の判断は原則として以下の二つの理由による。

- 高暴露の可能性があるか（概念的枠組みのレベル 1）、*in vitro* 試験で（抗）アンドロゲン様作用が示唆され（レベル 2）、そのような作用が *in vivo* で起きるかを調べる必要性がある。
- レベル 4 または 5 の *in vivo* 試験で（抗）アンドロゲン様作用と一致する影響がみられ、その影響が（抗）アンドロゲン様メカニズムによるものであったかを確認するなど、特定の作用機序について調べる必要性がある。

12. この試験ガイドラインの中で用いた定義を補遺 1 に示す。

試験の概要

13. ハーシュバーガー試験は、内因性のアンドロゲン産生がほとんどない雄を用いることでその感度を得ている。これは、雄を去勢し、去勢後、標的組織が退縮して重量が最小かつ均一な基準値になるまで適当な時間を置いたものを用いることで達成される。これによって、アンドロゲン様活性のスクリーニング時には、内因性循環アンドロゲンレベルは低く、視床下部 - 下垂体 - 性腺軸によるフィードバック機構を介した代償作用は働きにくく、さらに組織の反応性は最大、かつ開始時の組織重量の変動は最小となっている。また、抗アンドロゲン活性のスクリーニング時には、参照アンドロゲンによる組織の刺激で、より着実な組織重量増加が得られるようになっている。その結果、無傷の思春期の雄や成熟した雄を用いる他の試験では各用量群 15 匹の使用が考えられているのに対し、ハーシュバーガー試験では各群 6 匹の動物しか必要としない。

© OCDE（2009 年）

14. 思春期の雄ラットの去勢は承認された麻酔薬と無菌的手技を用いて適切な方法で行う。また、手術後の数日間は鎮痛剤を投与して術後の苦痛を取り除く。去勢すると弱いアンドロゲン様物質や抗アンドロゲン物質に対する試験の検出精度が上がるが、これは、投与されたアンドロゲン様物質や抗アンドロゲン物質の影響を減弱させるように働く、無傷の動物が有する代償性の内分泌フィードバック機構が排除されたり、血清テストステロンレベルにみられる大きな個体間のばらつきがなくなったりすることによる。すなわち、去勢することで、これら内分泌活性のスクリーニングに必要な動物数を削減できる。

15. アンドロゲン様活性のスクリーニングでは、被験物質を 10 日間毎日連続して強制経口投与するか、皮下（sc）投与する。被験物質は実験動物からなる少なくとも 2 投与群に投与し（1 群 1 用量）、最終投与の約 24 時間後に動物を剖検する。溶媒対照群と比較したとき、被験物質投与群の 2 種類以上の標的器官の重量の統計学的に有意な増加が認められれば、被験物質はアンドロゲン様活性陽性である（段落 60 参照）。5α 位が還元されないトレンボロンのようなアンドロゲン様物質は、TP と比べて LABC と GP により顕著な影響を与えるが、成長促進作用自体は全組織でみられる。

16. 抗アンドロゲン活性のスクリーニングでは、TP を毎日皮下投与（0.2 または 0.4 mg/kg/day）するとともに、被験物質を 10 日間毎日連続して強制経口投与するか、皮下投与する。有効性評価計画では、TP は 0.2 および 0.4 mg/kg/day とも抗アンドロゲン物質の検出に有効であったため、このいずれを用いてもよいことが確認された。したがって、試験で使用するときは 1 用量のみを選択する。被験物質は実験動物からなる少なくとも 3 投与群に段階的な用量で投与し（1 群 1 用量）、最終投与の約 24 時間後に動物を剖検する。TP 単独投与の対照群と比較したとき、被験物質＋TP 投与群の 2 種類以上の標的器官の重量に統計学的に有意な減少が認められれば、被験物質は抗アンドロゲン活性陽性である（段落 61 参照）。

試験方法

動物種および系統の選択

17. ハーシュバーガー試験では 1930 年代からラットが日常的に用いられてきた。ラットとマウスがともに同様の反応を示すことは生物学的に十分考えられるが、ラットモデルでの 70 年間の経験に基づき、ハーシュバーガー試験の動物種としてはラットを選択する。また、ハーシュバーガー試験のデータは長期多世代試験のための予備的なものとする場合もあることから、ラットを選択することにより、両試験で同じ種、系統および供給元の動物を使用することが可能になる。

18. このプロトコールでは、試験に用いるラットの系統を試験機関が選択できるようになっているが、その系統は原則として実施機関が従来用いてきた系統とする。一般的に用いられている実験用のラットの系統を使用してよいが、42 日齢をかなり超えてから性成熟に達する系統は用いない。これは、そのような雄を 42 日齢で去勢すると、陰茎亀頭の秤量（陰茎体から包皮が分離して初めて可能になる）ができなくなる可能性があるためである。したがって、Fisher 344 ラットに由来する系統は稀な場合を除いて使用しない。Fisher 344 ラットは、Sprague Dawley 系や Wistar 系などのより一般的に用いられる系統と比較して、性的発達の時期に違いがある(16)ため、このような系統を用いる場合には、試験機関はやや遅い日齢で去勢するとともに、用いた系統の感度を証明する必要がある。また、試験機関はラットの系統の選択理由を明確に述べるものとする。このスクリーニング試験を反復経口投与試験や生殖および発生毒性試験、または長期試験のための予備的なものとする場合には、すべての試験で同じ系統および供給元の動物を使用することが望ましい。

飼育および給餌条件

19. すべての手順は、実験動物の管理に関する各国のすべての基準に従うものとする。管理および取り扱いに関する以下の記載は最低限守るべき基準であり、より厳格な各国の規制がある場合にはそれが優先される。動物飼育室の温度は 22°C（約 ± 3°C の幅）とする。相対湿度は目標値を 50～60%とし、30%以上、70%を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。

20. 動物は若齢であり、またラットは社会的な動物であることから、個別飼育よりも群飼いが望ましい。1 ケージあたり 2～3 匹の動物の飼育であれば、混雑とそれによって生じるストレス（ホルモンによる副生殖組織の発達の制御に影響を与える可能性がある）を避けることができる。ケージは十分に洗浄して汚染物質を取り除き、位置による影響を最小限にするように考慮しながら配置する。なお、適切な大きさ（約 2000 cm^2）のケージを用いることで過密を防ぐことができる。

21. 各動物には人道的な方法で個体識別（耳のマーキング、耳標など）を施し、識別方法を記録する。

22. 実験動物用飼料と飲水を自由に摂取させる。ハーシュバーガー試験を実施する試験機関は、その機関で行う化学物質の試験で通常使用している実験動物用飼料を用いる。ハーシュバーガー試験の有効性評価試験では、飼料に起因する影響やばらつきは認められなかった。用いた実験動物用飼料は記録し、そのサンプルを将来の分析に備えて保存する。

アンドロゲン依存性器官重量の信頼性基準

23. 有効性評価試験では、体重減少が標的組織（本試験で秤量する組織）における重量増加の亢進や抑制に影響を与えることを示す所見は認められなかった。

24. 有効性評価計画で問題なく使用できた種々のラットの系統の中では、体重の重いラットの系統の方が軽い系統よりアンドロゲン依存性器官の重量が大きかった。このため、ハーシュバーガー試験の信頼性基準には、陽性および陰性対照として予測される器官重量の絶対値は含めていない。

25. 特定の組織の変動係数（CV）は統計検出力と逆の関係にあるため、ハーシュバーガー試験の信頼性基準は各組織の最大 CV 値に基づいて設定した（表 1）。これらの CV は OECD の有効性評価試験から得られたものである。結果が陰性であった場合、試験機関は対照群と高用量群の CV を調べ、信頼性基準の最大 CV 値を超えていないか確認すること。

26. 次の場合には再度試験を行う。1）対照群と高用量群の 10 個の CV 値のうち 3 個以上が、活性剤検出試験と拮抗剤検出試験について設定された表 1 の最大値を超えているとき、および 2）少なくとも 2 種類の標的組織でかろうじて統計学的に有意でない（p 値が 0.05 と 0.10 の間にある）結果が得られたとき。

表 1： OECD有効性評価試験の去勢モデルで標的副生殖組織について設定された最大許容CV値 [1]

[1] 各組織の CV の閾値は、活性剤または拮抗剤検出用の各モデルを用いて有効性の評価を行った際に得られたすべての実験のすべての平均についての CV 値のグラフ（最小値から最大値まで順に並べたもの）から求めた。すなわち、一連の CV のうち、次の CV までの増分が、それ以前の幾つかの CV 間の増分より明らかに大きい点（「不連続点」）を求め、それを CV の閾値とした。なお、拮抗剤検出

© OCDE（2009 年）

組織	抗アンドロゲン作用	アンドロゲン様作用
精嚢	40%	40%
腹側前立腺	40%	45%
LABC	20%	30%
カウパー腺	35%	55%
陰茎亀頭	17%	22%

手順

規制の遵守および試験機関の能力の証明

27. ハーシュバーガー試験では、試験の一部として同時陽性対照（プロピオン酸テストステロン、フルタミド）と同時陰性対照が置かれるため、子宮肥大試験（TG 440）とは異なり、試験開始前に試験機関の能力を証明する必要はない。

動物数および動物の状態

28. 各投与群および対照群とも最低 6 匹の動物を用いる。これはアンドロゲン様物質検出試験と抗アンドロゲン物質検出試験の両プロトコールともに適用される。

去勢

29. 動物入手後はまず数日間の馴化期間をおき、動物が健康で順調に成長していることを確認する。42 日齢（生後 42 日）より前に動物を去勢すると包皮分離がみられない可能性があるため、去勢は生後 42 日以降に行い、それ以前には行わない。去勢では、麻酔下で陰嚢を切開し、血管と精管を結紮して精巣と精巣上体の両方を摘出する。出血がないことを確認した後、陰嚢を縫合するか、オートクリップで留める。手術後の数日間は動物に鎮痛剤を投与して術後の苦痛を軽減する。動物供給業者から去勢動物を購入する場合には、供給元による動物の日齢と性成熟の段階の保証が必要である。

去勢後の馴化

30. 動物は飼育室環境への馴化を続け、標的組織の重量が減少するまで去勢後最低 7 日間を置く。その間毎日動物を観察し、疾病の徴候や身体的異常がみられた動物はすべて排除する。したがって、（試験の）投与開始で実際の投与期間が始まるのは早くて生後 49 日齢であるが、遅くとも生後 60 日を超えないこととする。また、剖検時の日齢は生後 70 日を超えないこととする。これらの幅は試験機関が実験の作業を効率よく計画できるようにするためのものである。

試験についてはこの解析法によって比較的信頼できる「不連続点」が認識できたが、活性剤検出試験の CV 曲線はより一定の増加を示したため、この方法による CV の閾値の決定はやや恣意的となった。

体重および各群への無作為割り付け

31. 各個体の体重の差は組織重量の群内および群間両方のばらつきの原因となり、組織重量のばらつきの増加は変動係数（CV）の増加と試験の統計検出力（試験の感度と呼ばれることもある）の低下をもたらす。このため、体重のばらつきは実験的方法と統計的方法の両方で制御する必要がある。

32. 実験的な制御法では、群内および群間の体重のばらつきが小さくなるようにする。このためにはまず、著しく小さい、または大きい動物は取り除いて試験対象集団には含めず、試験開始時の使用動物の体重のばらつきが平均体重の ± 20%を超えないようにする（去勢した思春期前後のラットでは 175 ± 35 g など）。次に、動物を体重分布に基づいて無作為に各群（対照群および投与群）に割り付け、各群の平均体重には他のいずれの群と比較しても有意差がないようにする。用いたブロック無作為化法は記録する。

33. 投与群の体重は毒性によって対照群より減少する可能性があるため、統計の共変量としては被験物質投与初日の体重を用い、剖検時の体重は用いない。

投与量

34. 被験物質が *in vivo* でアンドロゲン様作用を有するかを示すには、被験物質 2 用量群と陽性および溶媒（陰性）対照群（段落 3 参照）で通常は十分であり、したがって動物愛護のためにはこのデザインが望ましい。用量反応曲線を得たり、低用量に外挿したりすることを目的とする場合には、少なくとも 3 用量群が必要である。アンドロゲン様作用の特定以上の情報（強さの推定など）が必要な場合には、別の投与法を考慮する。一方、抗アンドロゲン物質検出試験では、被験物質を参照アンドロゲン活性剤とともに投与するが、異なる用量の被験物質を投与する最低 3 試験群と陽性および陰性対照群（段落 44 参照）を用いる。対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に取り扱う。被験物質の投与に溶媒を用いる場合には、投与群で用いられる最大量の溶媒を対照群に投与する。

35. いずれの用量も、被験物質や関連物質に関して入手可能な既存の毒性および（トキシコ）キネティクスデータを考慮して提案ならびに選択する。最高用量についてはまず LD_{50} や急性毒性情報を考慮して動物の死亡や重度の疼痛または苦痛を生じさせないようにし(17)(18)(19)(20)、次に亜慢性および慢性毒性試験の用量に関して入手可能な情報を考慮する。一般に、最高用量は最終体重の減少が対照群の体重の 10%を超えることのないようにし、1）10 日間連続投与しても動物が確実に生存し、顕著な毒性や苦痛を生じさせない最も高い用量（ただし、最大で 1000 mg/kg/day（段落 36 参照））か、2）（抗）アンドロゲン様作用を生じさせる用量のいずれか低いほうとする。スクリーニング試験であるため、用量間隔は大きくてもよい（3.2 倍の用量に相当する 0.5 対数単位や、さらに高い 1 対数単位など）。適当なデータがない場合には、用量設定試験（段落 37 参照）を行って用いる用量を決定してもよい。

限度用量

36. 本試験について記載された方法で試験を行った結果、限度用量である 1000 mg/kg 体重/day

© OCDE（2009 年）

とそれより低い 1 用量において生殖器官重量に統計学的に有意な変化がみられなかった場合には、それ以上の用量は不要と考えられ、ヒトの暴露量からより高い用量の必要性が示唆されない限り、限度用量が適用される。

用量設定に関する考察

37. 適切な用量群を設定するため、必要であれば、少数の動物を用いて予備的な用量設定試験を行ってもよい(急性毒性試験に関する OECD の修正ガイドライン(TG 420、TG 423、TG 425))。ハーシュバーガー試験の場合の目的は、段落 35 および 36 に述べたように、被験物質を 10 日間連続投与しても動物が確実に生存し、顕著な毒性や苦痛を生じさせない最も高い用量（ただし、最大は限度用量である 1000 mg/kg/day）を設定することである。この場合、毒性を示す徴候や動物の苦痛の定義として、OECD ガイダンス文書(17)が参考になるであろう。また、可能であれば、この用量設定試験において 10 日間の投与終了後、最終投与の約 24 時間後に標的組織を摘出し、秤量する。このデータもまた主試験の用量設定に役立つであろう。

参照物質および溶媒

38. 参照アンドロゲン活性剤はプロピオン酸テストステロン（TP、CAS No 57-82-5）とする。参照 TP の用量は 0.2 mg/kg 体重/day または 0.4 mg/kg 体重/day のいずれでもよい。参照アンドロゲン拮抗剤はフルタミド(FT、CAS No 1311-84-7)とする。参照 FT の用量は 3 mg/kg 体重/day とし、参照 TP と同時に投与する。

39. 可能な限り、まず水溶液／水性懸濁液の使用を考慮することが推奨される。しかし、多くのアンドロゲン性のリガンドやその代謝前駆体は疎水性の傾向があるため、最も一般的には油（コーン油、ピーナッツ油、ゴマ油、オリーブ油など）の溶液／懸濁液が用いられる。被験物質をごく少量の 95%エタノールまたは他の適当な溶剤に溶解し、試験用の溶媒で希釈して最終的な使用濃度にすることもできる。ただし、溶剤の毒性学的特徴が分かっている必要があり、溶剤単独の対照群を別に設けて試験を行う。被験物質が安定であると考えられる場合には、徐々に加熱しながら強い機械的処理を施して溶解を促すこともできる。溶媒中の被験物質の安定性を確認する。被験物質が試験期間中安定である場合には、最初に被験物質溶液の原液を調製し、汚染や腐敗に注意しながら必要な投与量の希釈液を毎日調製してもよい。

投与

40. TP は皮下投与、FT は強制経口投与とする。

41. 被験物質は強制経口投与または皮下投与する。投与経路を選択する際には、動物愛護に関する配慮と被験物質の物理的／化学的性質に関する考察が必要である。また、皮下投与によって陽性結果が出た場合は、大規模な長期試験を行う前に毒性学的観点、すなわち、その物質のヒトにおける暴露経路との関連性（口からの摂取のモデルとしては強制経口投与、吸入または経皮吸収のモデルとしては皮下投与など）や、既存の毒性学的情報と代謝や動態に関するデータ（たとえば、初回通過代謝を避ける必要性や、特定の経路における効率のよさ）などについて考慮する。

42. 動物には同じ方法および同じ経時的手順で 10 日間連続して約 24 時間間隔で投与する。体重を毎日測定し、その値に基づいて投与量を毎日調整する。各投与日の投与容量および投与時間を記録する。データについて意味のある解釈ができるように、段落 35 に示した最大用量を超えないように注意する。この点に関しては、特に体重減少、症状その他の所見を詳細に評価する。強

制経口投与する場合には、胃ゾンデまたは適切な挿管カニューレを用いる。1 回に投与可能な最大液量は供試動物の大きさによって異なる。投与容量は動物の管理に関する各国のガイドラインに従うが、5 mL/kg 体重を超えないようにする。ただし、水溶液については 10 mL/kg 体重まで投与してもよい。皮下投与する場合には、滅菌注射針（23 または 25 ゲージなど）とツベルクリン用注射筒を用いて、背側肩甲部または腰部もしくはその両方に投与する。投与部位の剃毛は任意とする。投与液の損失、投与部位からの漏れおよび不完全な投与をすべて記録する。ラット 1 匹あたりの 1 日の総投与容量は 0.5 mL/kg 体重を超えないようにする。

アンドロゲン活性剤検出時の特異的手順

43. アンドロゲン活性剤検出試験では、溶媒を陰性対照、TP 投与群を陽性対照とし、設定用量の被験物質を投与群に 10 日間連続して投与することで、アンドロゲン活性剤としての生物活性を検討する。この検討では被験物質投与群の 5 種類の副生殖組織の重量を溶媒対照群と比較し、統計学的に有意な重量の増加がないか調べる。

アンドロゲン拮抗剤および 5α 還元酵素阻害剤検出時の特異的手順

44. アンドロゲン拮抗剤および 5α 還元酵素阻害剤検出試験では、TP 投与群を陰性対照、参照用量の TP と FT の同時投与群を陽性対照とし、参照用量の TP と被験物質を 10 日間連続して投与することで、アンドロゲン拮抗剤や 5α 還元酵素阻害剤としての生物活性を検討する。この検討では TP＋被験物質投与群の 5 種類の副生殖組織の重量を参照 TP 単独投与群と比較し、統計学的に有意な重量の減少がないか調べる。

観察

一般状態の観察

45. 一般状態の観察を少なくとも 1 日 1 回、また、毒性徴候が認められた場合にはより頻繁に行う。観察は、投与後、予想される影響が最大になる期間を考慮しながら、毎日同じ時刻に行うことが望ましい。すべての動物について、生死と病気の有無に加え、行動、皮膚、被毛、眼および粘膜の変化、分泌物および排泄物の有無、ならびに自律神経系機能（流涙、立毛、瞳孔径、呼吸パターンの異常など）といった一般状態を観察する。

46. 死亡して発見された動物は取り除き、それ以上のデータ解析をせずに廃棄する。剖検前の動物の死亡はすべて記録し、明らかな死因が認められた場合はそれも記録する。瀕死動物は人道的方法で屠殺する。瀕死状態で安楽死させた動物はすべて記録し、明らかな病因が認められた場合はそれも記録する。

体重および摂餌量

47. すべての動物について 0.1 g 単位で毎日体重を測定する。測定は投与開始直前（群分け時）から始める。任意の測定として給餌器を秤量し、投与期間中のケージごとの摂餌量を求めてもよい。摂餌量の結果は g/rat（ラット）/day で表わす。

© OCDE（2009 年）

解剖および組織・器官重量の測定

48. 被験物質の最終投与の約 24 時間後にラットを安楽死させ、実施機関で通常行っている手順に従って放血した後、剖検する。用いた人道的屠殺方法を試験機関の報告書に記載する。

49. 用量群の下または上からの順序だった剖検はデータに影響を与えかねないため、これを避けるために理想としては各群の剖検順を無作為にする。剖検時の所見（病理学的変化／視認可能な病変）はすべて記録し、報告する。

50. 5 種類のアンドロゲン依存性組織（VP、SV、LABC、COW、GP）を秤量する。これらの組織を摘出し、周囲の余分な組織と脂肪を注意深く取り除いた後、新鮮（未固定の）重量を測定する。内容液の損失や乾燥は記録される重量の値を減少させ、大きな誤差とばらつきの原因になる可能性があるため、各組織はこれらが起きないように特に注意して取り扱う。また、一部の組織は非常に小さかったり、解剖が難しかったりすることがあり、これもばらつきの原因となる。このため、副生殖組織の解剖を行う担当者は、これらの組織の標準的な解剖手順に慣れていることが重要である。解剖方法の標準操作手順書（SOP）は OECD から得ることができる(21)。SOP の手引きに従って注意深く訓練することで、試験におけるばらつきの原因を最小限にできる。解剖者間における組織の処理方法の差を排除するため、理想的には、1 つの組織の解剖は同じ解剖者が責任をもって行う。これができない場合には、1 人の担当者が対照群の全組織を解剖し、別の担当者が投与群の解剖をするという方法ではなく、各解剖者が全投与群の特定の組織を解剖するというように剖検方法を工夫する。各副生殖組織は内容液を入れたまま 0.1 mg の単位まで秤量し、個体ごとにその重量を記録する。

51. 一部の組織は非常に小さかったり、解剖が難しかったりすることがあり、これもばらつきの原因となる。先に行った試験では、変動係数（CV）の幅は試験機関の熟練度によって異なるようで、少数例ながら、特定の試験機関内では VP や COW などの組織の絶対重量に大きな差が認められた。

52. 肝臓、腎臓（両側）および副腎（両側）の測定は任意である。これらの組織についても周囲の結合組織や脂肪は取り除く。肝臓は 0.1 g の単位まで、腎臓（両側）および副腎（両側）は 0.1 mg の単位まで重量を測定して記録する。肝臓、腎臓および副腎はアンドロゲンによって影響を受けるだけでなく、全身毒性の有用な指標にもなる。

53. 血清黄体ホルモン（LH）、卵胞刺激ホルモン（FSH）およびテストステロン（T）の測定は任意である。血清 T 濃度は、被験物質が肝臓におけるテストステロンの代謝を誘導して血清濃度を減少させたか知るのに有用である。T データがなければ、この被験物質の影響は抗アンドロゲン的なメカニズムによるもののようにみえる可能性がある。LH 濃度からは、その抗アンドロゲン物質が器官重量を減少させるのみならず、視床下部 - 下垂体機能にも影響を与える（この場合、長期試験で精巣腫瘍を誘発させる）かについての情報も得られる。また、FSH は精子形成に重要なホルモンである。さらに、血清 T4 および T3 も任意の測定項目で、甲状腺ホルモンの恒常性を乱す能力について有用な補足情報が得られる。ホルモン測定を行う場合には、剖検前にラットを麻酔し、心臓穿刺によって採血する。麻酔方法は、ホルモン測定に影響を与えないように注意して選択する。血清の分離方法、ラジオイムノアッセイ（RIA）その他の測定キットの入手先、測定手順および結果を記録する。LH 濃度は ng/mL（血清）の単位で、T も ng/mL（血清）の単位で報告する。

54. 組織の解剖方法を以下に示すが、これについては写真付の詳細な解剖の手引きが有効性評価計画の一環で補助資料として発行されている(21)。また、解剖のビデオも韓国食品医薬品安全庁のウェブサイトから入手可能である(22)。

- 動物の腹側面を上にして置き、包皮が陰茎亀頭から分離しているか確認する。分離していれば、包皮を下げて陰茎亀頭を摘出し、0.1 mg の単位まで秤量して重量を記録する。
- 腹部の皮膚と腹壁を切開し、内臓を露出させる。追加（任意）の器官を秤量する場合には、まず肝臓を摘出して 0.1 g の単位まで秤量し、胃と腸を摘出し、さらに腎臓（両側）と副腎（両側）を摘出して 0.1 mg の単位まで秤量する。この作業で膀胱が露出し、標的である雄の副生殖組織の解剖が始まる。
- VP の解剖では、まず正中に沿って結合組織を切断し、腹側の筋層から膀胱を分離する。膀胱を前方の精嚢（SV）側に除けて前立腺の左葉と右葉（脂肪層で覆われている）を露出させる。VP の右葉と左葉から注意深く脂肪を分離する。VP の右葉を静かに尿道からはがして切り離す。さらに、VP の右葉を保持したまま、VP の左葉を静かに尿道からはがして切り離す。0.1 mg の単位まで秤量して重量を記録する。
- 精嚢＋凝固腺（SVCG）の解剖では、まず膀胱を後方に除けて精管と SVCG の左右の葉を露出させる。SVCG の基部で精管が尿道に接続する部分を止血鉗子で挟んで内容液の漏れを防ぐ。SVCG を注意深く摘出し、止血鉗子で挟んだ状態で脂肪と付属組織を取り除き、秤量済みの秤量皿に載せる。その後、止血鉗子をはずし、0.1 mg の単位まで秤量して重量を記録する。
- 肛門挙筋＋球海綿体筋（LABC）の解剖では、まず対象の筋と陰茎基部を露出させる。LA 筋は結腸周囲を取り囲み、LA 筋の前部と BC 筋は尿道球に付着している。陰茎基部から肛門前端にかけての肛門周囲部分から皮膚と付属組織を取り除き、BC 筋を尿道球と他の組織からゆっくり切り離していく。結腸を切断すると LABC 全体を切り離して摘出することができる。LABC から脂肪と付属組織を取り除き、0.1 mg の単位まで秤量して重量を記録する。
- LABC を摘出すると、球形のカウパー腺（尿道球腺、COW）が尿道球基部のやや背側にみえてくる。内容液が漏れるのを防ぐため、薄い被膜に傷をつけないように注意深く取り出す必要がある。両側の COW を 0.1 mg の単位まで秤量して重量を記録する。
- 上記に加え、剖検および摘出中に腺から内容液が漏れた場合には、そのことを記録する。

55. 各化学物質の評価において、1 日に剖検できるとされる以上の動物を剖検する必要がある場合には、連続する 2 日にわたって段階的に試験を開始し、剖検と関連作業を 2 日間かけて段階的に行うことにしてもよい。このような段階的方法をとる場合には、1 日あたり各投与群の半分の動物を用いる。

56. 剖検後、動物の死体は適切な方法で廃棄する。

© OCDE（2009 年）

報告

データ

57. 動物の個体ごとのデータ（体重、副生殖組織重量、任意の測定項目、その他の反応や観察所見）と各群のデータ（実施した全測定項目の平均および標準偏差）を報告する。データは総括表にする。また、データでは、試験開始時動物数、試験中に死亡して発見されたり毒性徴候を示しているのが発見された動物数、および認められた毒性徴候の内容（発現時期、持続期間、程度を含む）を示す。

58. 最終報告書には以下を含む。

試験施設

- 施設の名称および所在地
- 試験責任者およびその他の担当者とその業務分担
- 試験開始日および終了日（それぞれ被験物質の投与初日および剖検最終日）

被験物質

- 供給元、ロット／バッチ番号、特定データ、純度、供給者の詳しい所在地、特性
- 物理的性質、また必要に応じて物理化学的特性
- 保管条件、希釈液調製の方法および頻度
- 安定性に関して得られたすべてのデータ
- 投与溶液／懸濁液に関するすべての分析データ

溶媒

- 溶媒の特性（特定データ、入手先、ロット番号）
- 溶媒選択の妥当性（水以外の場合）

供試動物および飼育方法

- 動物種／系統および選択理由
- 動物の供給元または入手先（詳しい所在地を含む）
- 入手した動物の数および日齢
- 飼育条件（温度、照明その他）
- 飼料（名称、種類、入手先、ロット番号、成分、分かっている場合には植物エストロゲン濃度）
- 床敷（名称、種類、入手先、成分）
- ケージ条件および１ケージあたりの動物数

試験条件

- 去勢時の日齢および去勢後の馴化期間
- 試験開始時の個体ごとの体重（0.1 g 単位）
- 無作為化方法、溶媒／参照物質／被験物質投与群への割り付けの記録、ケージへの割り付けの記録

- 試験期間中の各体重測定日における各群の平均体重および標準偏差
- 用量設定根拠
- 被験物質の投与経路および暴露経路選択根拠
- 抗アンドロゲン作用検出試験の場合には、TP 投与（用量および投与容量）
- 被験物質投与（用量および投与容量）
- 投与時間
- 剖検手順（放血および麻酔方法を含む）
- 血清検査をした場合には、方法の詳細を述べる。たとえば、RIA を用いたときは、RIA の手順、RIA キットの供給元、キットの使用期限、シンチレーション計測手順および標準化法を報告する。

結果

- 投与期間中の各動物の毎日の観察所見（以下を含む）
  - 体重（0.1 g 単位）
  - 症状（認められた場合）
  - 摂餌量の測定値または記録（実施した場合）
- 各動物の剖検データ（以下を含む）
  - 剖検日
  - 投与群
  - 個体識別番号（ID）
  - 解剖者
  - 剖検・解剖が行われた時刻
  - 動物の日齢
  - 剖検時の最終体重（統計学的に有意な増加や減少があれば記載）
  - 剖検時の放血・解剖順
  - 5 種類のアンドロゲン依存性標的組織の重量
    - 腹側前立腺（0.1 mg 単位）
    - 精嚢＋凝固腺（内容液を含む、両側、0.1 mg 単位）
    - 肛門挙筋＋球海綿体筋の複合体（0.1 mg 単位）
    - カウパー腺（新鮮重量、両側、0.1 mg 単位）
    - 陰茎亀頭（新鮮重量、0.1 mg 単位）
  - 追加の器官重量（測定した場合）
    - 肝臓（0.1 g 単位）
    - 腎臓（両側、0.1 mg 単位）
    - 副腎（両側、0.1 mg 単位）
  - 概評とコメント
- 血清ホルモンの分析結果（測定した場合）
    - 血清 LH（任意、ng/mL（血清））
    - 血清 T（任意、ng/mL（血清））
- 概評とコメント

データの集計

データは概要表にし、各群のサンプル数、平均値および平均の標準誤差または標準偏差を示す。さらに、剖検時の体重、投与開始から剖検までの体重変化、標的である副生殖組織の重量および追加秤量器官の重量（測定した場合）を記載する。

© OCDE（2009 年）

結果の考察

結果の解析

59. 剖検時の体重と器官重量については、必要であれば適切なデータ変換を行い、分散の均一性などの特性に関して統計学的に解析する。さらに、ANOVA 後に対比較（Dunnett の片側検定など）を行うなどの手法と統計学的有意差の基準（$p \leq 0.05$ など）を用いて投与群と対照群を比較し、統計学的に有意な群を明らかにする。なお、「相対器官」重量は、このデータ操作の根拠となる統計的仮説に妥当性がないため、算出しない。

60. アンドロゲン活性作用については、溶媒単独投与群を対照とする。被験物質の作用機序の特性によっては組織間で反応が相対的に異なる場合があり、たとえば、5α 位の還元を受けないトレンボロンは、LABC と GP に対して TP よりも顕著な影響を示す。しかし、5 種類のアンドロゲン依存性標的組織（VP、LABC、GP、CO、SVCG）の重量のうちいずれか 2 種類以上で統計学的に有意な増加（$p \leq 0.05$）が認められた場合は、アンドロゲン活性剤として陽性の結果と考えられる。また、このとき、標的組織はすべてある程度の成長促進を示しているはずである。なお、適切な多変量データ解析法を用いれば、全副生殖器（ASO）の反応をひとまとめにして評価することができる。この方法は、特に 1 種類の組織しか統計学的に有意な反応を示さなかった場合の解析力を向上させる。

61. アンドロゲン拮抗作用については、参照アンドロゲン（プロピオン酸テストステロン単独）投与群を対照とする。被験物質の作用機序の特性によっては組織間で反応が相対的に異なる場合があり、たとえば、フィナステリドなどの 5α 還元酵素阻害剤は、フルタミドなどの強力なアンドロゲン拮抗剤と比較して、他の組織より VP に対して顕著な影響を示す。しかし、TP 単独投与群と比較したとき、5 種類のアンドロゲン依存性標的組織（VP、LABC、GP、CO、SVCG）の重量のうちいずれか 2 種類以上で統計学的に有意な減少（$p \leq 0.05$）が認められた場合は、アンドロゲン拮抗剤として陽性の結果と考えられる。また、このとき、標的組織はすべてある程度の成長抑制を示しているはずである。なお、適切な多変量データ解析法を用いれば、ASO の反応をひとまとめにして評価することができる。この方法は、特に 1 種類の組織しか統計学的に有意な反応を示さなかった場合の解析力を向上させる。

62. データは概要表にし、各群の平均、平均の標準誤差（標準偏差でもよい）およびサンプル数を示す。また、個体ごとのデータ表も示す。対照データの個々の値、平均、SE（SD）および CV については、予測される背景値と一致しているといえるかを確認する。また、表 1（段落 25 および 26 参照）に示す各器官重量の CV 値を超える値が認められた場合には、データの記録や入力にミスがないか、またはその試験機関がアンドロゲン依存性組織の正しい解剖方法を習得しておらず、さらなる研修／訓練が必要であるのかを明らかにする。一般に CV（標準偏差を平均器官重量で除したもの）には試験機関間および試験間で再現性がある。なお、データとしては少なくとも腹側前立腺、精嚢、肛門挙筋＋球海綿体筋、カウパー腺、陰茎亀頭および肝臓の重量、体重、ならびに投与開始時から剖検までの体重変化を示す。体重の共分散を調整したデータを示してもいいが、これを調整前のデータと置き換えることはできない。また、いずれかの群で包皮が分離していなかった場合には、包皮分離の発生頻度を記録し、Fisher の直接法を用いて対照群と統計学的に比較する。

63. コンピューターの入力データを元のデータシートと照合して正確であるか確認するときは、生物学的にありえないような器官重量や、その投与群の平均から 3 標準偏差を超えてはずれている値がないか注意深く精査する。これらの値は記録ミスの可能性が高いため排除する必要がある場合もある。

64. 試験結果を OECD の CV 値（表 1）と比較することは、試験結果の妥当性について考える際の重要な一歩となることが多い。試験機関では溶媒対照群の背景データを保存する。また、陽性参照物質（TP や FT など）の反応に関する背景データも保存する。さらに、試験機関は既知の弱いアンドロゲン活性剤や拮抗剤に対する反応を定期的に試験して、それらのデータを保存してもよい。これらのデータを入手可能な OECD のデータと比較することで、その試験機関の方法が十分な統計学的精度と統計検出力を有していることを確認できる。

© OCDE（2009 年）

補遺 1

定義

アンドロゲン様作用とは、アンドロゲン依存性組織の成長に対するプラスの影響を示すのに用いる用語である。

抗アンドロゲン作用とは、哺乳動物において TP の作用を抑制する化学物質の性質をいう。

出生日とは、生後 0 日をいう。

用量とは、投与される被験物質の量をいう。ハーシュバーガー試験では用量は 1 日あたり、かつ試験動物の単位体重あたりの被験物質の重量（mg/kg 体重/day など）で表わす。

投与量とは、用量、投与頻度および投与期間からなる一般的な用語である。

瀕死とは、動物が死にかけている（死亡が近い）状態であることを示す用語である。

生後 X 日とは、出生日の X 日後をいう。

感度とは、その試験の検査対象となっている性質を有する化学物質を正しく特定する試験法の性能をいう。

特異度とは、その試験の検査対象となっている性質を有していない化学物質を正しく特定する試験法の性能をいう。

有効性評価とは、試験法の遂行上の必要条件と限界を明らかにし、その信頼性と特定の目的に対する関連性を示すために計画される科学的過程である。

補遺2

注：EDTA 特別専門委員会第 6 回会議の合意内容に基づいて試験ガイドライン計画事務局で作成した文書

内分泌かく乱化学物質の試験と評価のための OECD の概念的枠組み



VMG mamm：哺乳動物の試験法と評価に関する検証管理グループ

© OCDE（2009 年）

枠組みに関する注

注1：どのレベルから始めてどのレベルで終わってもよい。これは、有害性およびリスク評価の目的のためにその時点で必要とされている情報の性質による。

注2：レベル5において、環境毒性学は有害影響のメカニズムを示す評価項目と集団に対する障害の可能性を示す評価項目を含むものとする。

注3：一つの多面的モデルが幾つかの単一項目の試験を含んでいる場合、それら単一項目の試験はそのモデルで置き換えられる。

注4：各化学物質の評価は枠組みのレベルの役割を念頭に置きつつ、すべての入手可能な情報を考慮しながら個別に行う。

注5：現時点では、この枠組みを完全に包括的なものとは考えないこと。レベル3、4、5には、現在実施可能な試験と有効性評価が進行中の試験が含まれている。後者は仮に含まれているもので、開発と有効性評価の終了後に正式に枠組みに追加される。

注6：レベル5については、確定試験のみを含むとは考えないこと。このレベルに含まれる試験は、一般的な有害性およびリスク評価に貢献すると考えられる。

参考文献

(1) OECD. 1998. Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman RI. 1962. Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

(3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS. 2005. Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

(4) OECD. 2006. Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

(5) OECD. 2008. Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5α-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

(6) OECD. 2007. Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

(7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE. 2006. The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269.

(8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E. 2007. The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671-8.

(9) Korenchevsky V. 1932. The assay of testicular hormone preparations. Biochem J 26:413-422.

(10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R. 1932. The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J 26:1306-1314.

(11) Eisenberg E, Gordan GS. 1950. The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38-44.

(12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW. 1949. Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113-119.

(13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R. 1953. Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175-180.

(14) Hilgar AG, Vollmer EP. 1964. Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United

States Public Health Service.

(15) Dorfman RI. 1969. Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.

(16) Massaro EJ. 2002. Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p 38.

(17) OECD. 2000. Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(18) OECD. 1982. Organization for Economic Co-operation and Development - Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(19) OECD. 2001. Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals 425.

(20) OECD. 2001. Guidance document on acute oral toxicity . Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(21) Supplemental materials for Owens et al. 2006. The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf.

(22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html .

(23) OECD 2008. Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No90. ENV/JM/MONO(2008)17.

(24) OECD 2008. Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

© ECD（2009 年）