



Title	簡便な（抗）アンドロゲン作用検出短期in vivo試験法の開発研究
Author(s)	国松, 武史
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46053
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	くにまつ たけし 国 松 武 史
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 19639 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	簡便な (抗) アンドロゲン作用検出短期 <i>in vivo</i> 試験法の開発研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 西 原 力 (副査) 教 授 田 中 慶 一 教 授 那 須 正 夫 教 授 宮 本 和 久

論 文 内 容 の 要 旨

内分泌系はヒトを含む生物における発生過程および細胞分化の制御、ホメオスタシスの維持等に深く関与する生物存続のための重要な生体システムの 1 つである。近年、内分泌攪乱物質問題として環境中に放出された合成化学物質の中に、生体がつもつホルモンと類似の作用を有するものが存在し、これにより野生生物やヒトの内分泌系が攪乱されているとの懸念が指摘されている。

化学物質の内分泌攪乱作用の有無を判断する内分泌攪乱化学物質検出法の開発研究は、本分野の研究課題の中でも非常に重要であり、現在、EPA (米国) と OECD の主導の下、開発研究が進行中である。開発研究終了後、これらの試験は国際標準法として世界中で汎用され、均一な評価が行われるべきであること、また膨大な数の化学物質が検討対象となることを考慮すると、短期インビボ試験は、検出感度とともに、試験系が簡便であることが求められる。簡便性には換作のし易さとともに、試験に要する時間の短縮やコストの低下も含まれる。私は主にアンドロゲン受容体を介した作用物質の検出に用いられる Hershberger 試験法について、OECD の開発プロジェクトに参加しながら、OECD 提案法 (従来法) の問題点を検討し、その検討過程で得られた知見を元に、より高感度で簡便な方法を作成した。

Hershberger 試験法は、アンドロゲン作用により重量が変動する内分泌系の臓器 (前立腺 (腹葉、背側葉)、精囊、尿道球腺等) の重量を指標に評価するため、臓器の摘出、分離、トリミング操作に不備やばらつきがあれば当然感度の低下につながる。特に重量測定対象臓器の中に内容液を含む精囊や尿道球腺が存在し、分離とトリミング時の内容液の漏出により重量が変動する懸念がある。そこで、精囊および尿道球腺からの内容液の漏出による重量変動の懸念の解決策として、蛋白変性作用を有するホルマリンに注目し、ホルマリン固定後に臓器を分離することを考案し、内容液漏出の懸念を解決した。固定による臓器重量への影響の検討として、固定前後の副生殖生殖器重量の相関性を検討したところ、いずれの臓器においても、ほぼ 1 に近い高い相関性がえられることが判明した。また、この固定換作により、前立腺 (腹葉および背側葉) の分離が容易になるとともに、検出感度が向上した (固定法)。すなわち、分離とトリミング操作は熟練の技術と多くの時間が必要であったが、ホルマリン固定後に分離することで、分離操作が簡便になり、熟練の技術が不要になり、再現性が向上した。さらに、成長の安定した成熟動物を用いて固定後に臓器重量を測定することにより、5 日間の投与で *p,p'*-DDE の 100 mg/kg の抗アンドロゲン作用が検出できることを示した (固定成熟動物法)。固定成熟動物法を用いて、既存の内分泌攪乱作用物質を検討したところ、本方法を用いて既存データと同じ結果がえられることが判明した。これらの試験条件の改良により、5 日間の投与で抗アンドロゲン作

用を簡便により高感度に検出できることを示したのは私がはじめてであり、その成果は、OECD の会議を通じて参加国の理解を得て、特に固定法については将来ガイドライン化される際にオプションとして採用されることが内定している。

一方、あらゆる内分泌攪乱物質に適応可能な正常ラットを用いた試験法の 1 つであり、本来化学物質の亜急性毒性試験ガイドラインを改訂した、OECD 改訂 407 ガイドライン案について、フルタマイドを用いて検討した。その結果、フルタマイド投与に起因する内分泌系の変化として、10 mg/kg 群において前立腺重量の低下が認められ、検査項目の中では、副生殖器の重量測定がもっとも鋭敏であった。100 mg/kg の投与量で認められた抗アンドロゲン作用を示す変化は 5 例/群/性と 10 例/群/性の解析結果のいずれにおいても同一であったため、改訂 407 案においては 5 例/群/性の動物数で抗アンドロゲン作用が検出可能であることを示した。ラボ間の再現性がある試験系であることも明らかとなった。これらのことから改訂 407 案が、抗アンドロゲン作用物質検出に有用であることが判明した。また、改訂 407 案においても Hershberger 法の改良法として開発した固定法が再現性の向上に寄与することを示した。改訂 407 案は高コストの試験案になっていることから、鋭敏に抗アンドロゲン作用を検出した内分泌放器の重量測定のみを追加し、精子検査およびホルモン判定を削減することで、感度の低下を招くことなく、簡便な試験案になることを示した。この検査項目の削減により約 25% のコスト削減が可能と計算された。これらの知見も OECD に提案し、将来ガイドライン化される際に取り入れられることが期待される。

低用量のフルタマイドを用いて雄の各種短期インビボ試験案の感度比較を行った。その結果、精巣を摘出したラットを用いる Hershberger 試験がこれらの試験の中でもっとも鋭敏であった。正常ラットを用いる 3 つの試験、改訂 407 案、20 日間思春期雄ラット試験、15 日間性成熟雄ラット試験においては、改訂 407 案が鋭敏であった。これらから、事前に *in vitro* の実験結果等により、アンドロゲン受容体に対する作用が疑われる場合は Hershberger 試験で評価すべきであり、事前に内分泌攪乱作用に関する情報がない場合は改訂 407 案で検討し、内分泌攪乱作用を評価すべきであると提案できる。

論文審査の結果の要旨

内分泌かく乱 (ED) 物質問題の緊急課題の一つは莫大な数の化学物質のうちから ED 作用を示す物質を選定することである。そのためには、先ず簡便なスクリーニング試験を開発し、国際的に統一するべきである。国松君は、OECD の開発プロジェクトに参加し、イン・ビボ試験法、特に (抗) アンドロゲン活性試験法について検討した。その結果、ハーシュバーガー試験にホルマリン固定法を採用し、成熟ラットを用いることにより、感度・精度・経費等が改良できること、また改訂 OECD407 ガイドラインでは生殖系臓器重量の変化が最も鋭敏で簡便な指標となり、ホルマリン固定法が有効であることを示した。さらにこれらを含めたイン・ビボ試験法による ED 物質スクリーニング戦略を提案した。これらは OECD の委員会でも高い評価を受け、今後の試験法確定時に導入すること、あるいはオプションとして記載することが内定している。

以上の成果は、ED 問題の解決に対して大きく貢献するものであり、社会的に高く評価されるものであることは言うまでもなく、毒性試験法の開発研究において学術的に、特にレギュラとリーサイエンスの観点から、貴重な知見を与えるものであり、博士 (薬学) 学位論文として充分価値あるものと認められる。