

とき、経口と皮下投与の 2 通りの方法で出来るが、どこかの機関で 2 つのデータを出してきたとき、皮下では陽性で出るが、経口では陰性であるときどのように説明するのですか。

川崎：その物質にポテンシャルはあっても経口投与で吸収されないということもあり、経口投与では陰性になることもありますよね。

今井：実際にスクリーニングとして実施する以上、経口投与による吸収性が人とラットで同じであるという確定がないので、皮下投与でどの位陽性に出るのか把握しておく必要があるのでは。

井上：28 日間試験の方は、人と同じ経路での投与ということで経口投与で大丈夫と思うが、皮下投与では、先程の炎症に伴うサイトカインの問題などで、フォールスポジティブになる恐れが有る。

川崎：私も、皮下投与は、フォールスポジティブが出る可能性があると思います。 Uterotrophic assay およびハーシュバーガーの結果が陰性となれば 28 日間試験は実施しないと思う。

井上：EPA は HTPS の後に幾つくらい残ると言っているようですか。

高月：15000 のうちの 15%。1000 のオーダーになる。

青山：内分泌かく乱物質については、胎児期に投与するのが感度が良いと考えられているので当然 2 世代試験を実施するべきであるが、検体数が多すぎて出来ない。次ぎにくるのが 28 日間試験であるがこれもあまり数をこなせない。またそれもできないので 3 日間の uterotrophic assay にするがそれも感度の悪い経口投与を用いて陰性であったからその物質は安全であるというのは我々科学者として許されないでしょう。

菅野：皮下投与であれば dose response がかけるが、経口投与では書けなくなる可能性がある。

山本： in vitro のハイスループットで始まり、次ぎに uterotrophic assay の皮下投与でその物質のポテンシャルを見る。次ぎに、皮下投与で陽性と出たときには、同じく uterotrophic assay の経口投与でその吸収性、代謝、排泄を見る。次ぎに、28 日間試験で純粹の in vivo をみる。In vivo ではそこで白なら白としたいのか。ハイスループットの次ぎに来るものは何を見たいのか考えればおのずと答えが出てくるのではないのでしょうか。

永井：バリデーションであるならば皮下投与を実施し、情報を見るほうが良いのでは。そこで更に必要であるならば経口投与も付け加える。経口投与では、何も情報を得られない、陰性となる可能性もあるので。

川崎：経口投与は、1000mg/kg B.W.のリミットがあるが、皮下投与の場合はどのようにして投与量を決めるのですか。

井上：用量については、ハイスループットのデータを用いないといけない。バインディングアッセイで出てくる強さとの関連で、E2 の何分の一にするかとかといった方策で決定する。

青山：我々のところでは、DDT を投与したのですが、血中濃度が IC50 に達するまでの量を投与することになっている。

井上：目安はやはりバインディングアッセイの結果でしょうね。皮下投与の場合は、そのようにして決定することが出来るが、むしろ経口投与ではどのようにしたら良いのかが難しい。

皮下投与で陰性となったときには、経口投与はする必要がなく、そのまま行く。皮下投与で陽性となったときには、経口投与を実施してみる。経口投与では、陰性になることも有るでしょう。

川崎：皮下投与を実施し、次ぎに陽性の場合には経口投与も実施するという方法が OECD でインターナショナルにするには認められるのでしょうか。何故 2 通りも実施するのかといわれたいのでしょうか。

井上：すくなくともバリデーションとして経口と皮下投与の比較は見ておきたい。

羽深：皮下投与陽性で、経口投与陽性の時、28 日間試験へ持っていくとき、何故最初から経口にしなかったのかとの疑問がでてこないでしょうか。

井上：2 段重ねのバリデーションにしておきたいのみで、最終的には、2 通りの試験をするわけではなく、実際に実施してみたら経口のみで十分であるとの結果となるかもしれない。

次ぎに hersberger に移ります。

化検協：資料説明。

安科研：資料説明。

菅野：資料説明。

井上：生後 3 週間目のデータはとれるが、わざわざ小さな 3 週間目を使用することはないという結論ですね。

高月：去勢しないとデータはとれないのですか。

山崎：去勢しなくても大丈夫と思います。現在フタルマイトを投与していますが、まだ 1 点しか投与していないので確実には言えないのですが。

井上：それについては、用量反応データが必要ですね。では、407 について。

広瀬：資料説明。血中のホルモンを測定するとき、ストレスの問題が主な論点です。

山崎：動物の系についてですが、Fischer とドツリュウラットにアトラジンを投与したときに、dose response はないのでドツリュウラットに発情が継続しました。

青山：繁殖試験をやっている立場の人間としては、wistar ラット が良い。

広瀬：バックグランドデータが大きいので wistar が良い。

川崎：Wistar は亜種が多い。

青山：近交系はなかなか入手しにくいのではないのでしょうか。

井上：OECD にはどのように提案しましょうか。あまり深入りするのはいけませんか。

今井：性周期の同調性をみると Wistar は 95% 以上そろろう。

長尾：IGS 系でよいのでは。加齢の問題で wistar は良くない。

今井：床敷の問題で、床敷には植物エストロゲンが入っているのでこの問題を議論して欲しい。

川崎：餌の中のエストロゲンはどうなっているのでしょうか。

青山：注目している物質については、餌の中のその物質の濃度を測定する必要があるのでは。

今井：床敷の検出限界が高いですよ。

広瀬：OECD には diet と記載されているが、我々は、強制経口で実施した。もし diet で実施

した場合には、diet 中のエストロゲンも測定しないといけないし手間がかかる。

用量設定で OECD は公比 2~4 としているが 2~4 ではたして下の NOEL がとれるのか疑問です。もっと広く 5~6 などにとったほうが良いのでは。

井上：公比は気にしなくともその物質にあわせて公比決めても良いでしょう。高いところの dose は意味を持たないでしょうし、バリデーションを行う準備なので確実にでるところで公比を考えればよいでしょう。

広瀬：OECD は性周期を揃える記載しています。サイクルを揃えて屠殺し、その場合試験期間が 4 日間延びても仕方がないと記載しています。

ダイエストラスで揃える。

井上：OECD ではそのような細かなところまでは、まだ議論されていない。性周期も揃えたほうが良いのかバラバラでも仕方がないのかとの議論はされていないようです。お見合いさせると性周期がそろうという事も聞いていますが。

山田：我々のところはこれから試験を実施するので 1 セットは性周期を揃える群、あとの 1 セットはバラバラな群として比較してみたい。

山崎：揃えたくともズーと発情期が続くなど難しい問題がある。

広瀬：絶食はしない方針です。絶食により血清に影響があるのは血糖値位ですから。また絶食により性周期が変わるなどの問題もありますし。

山田：この試験は毒性も見るといことなので、本来の試験では絶食をするという事になるのではないのでしょうか。

青山：しかし、絶食が性周期に影響するということがあるので絶食は不可能でしょう。

広瀬：血液の採取は断頭が良いと考えています。プロラクチンが血液の採取によりかなり変動するので問題です。

永井：断頭はよいのですが、甲状腺を傷つける恐れがある。

山田：私のところで断頭とエーテル麻酔によるホルモンの差を検討したのですが、甲状腺関係の T3、T4 に差は見られませんでした。動物舎から動物を出して 1 時間以内ならばエーテル麻酔でもげたを履いているにしるエストロゲン等それほど大きな差は見られませんでした。

青山：プロラクチンは麻酔 1 分以内でしたら大丈夫というデータがありますのでわれわれは、ストップウォッチをもって麻酔しています。

井上：小委員会で 407 の物質の選定も決めて下さい。各先生方々に E メールで連絡してこれでよければエントリーして欲しいとか伝えて下さい。広瀬先生が選考するものを化検協が買ってください、他の外国へもエントリーしてほしい。

次に、2 世代の説明について。

菅野：2 世代試験は福島先生のところで実施している。ビスフェノール A、ゲニスタイン、ブチルベンゾフタレート、ノニフェノールなど。追加の分については、複合作用の検討を考慮しており、その場合は群数も多くなり 2 世代試験で実施するのは不可能。一世代と uterotrophic assay の組み合わせを考えています。この物質の選定も小委員会で行う。

！
次回の班会議は、平成10年12月25日（金）10-12時。
会議室の手配は田中さん（厚生省）に願ひする。

（文責：松島）

別添資料3

内分泌かく乱化学物質実験者レベル会合
(厚生省生活科学研究菅野班班会議を兼ねる)

第3回 菅野班議事録

日時：平成10年11月25日(水) 午前10:00~12:00

場所：中央合同庁舎5号館25階 共用第15会議室

座長：井上 達

進行：菅野 純

事務：高月峰夫

出席者：21名

青山博昭(財・残留農薬研究所)

池田年仁(厚生省)

井上 達(国立医薬品食品衛生研究所)

今井 清(財・食品薬品安全センター)

小野 敦(国立医薬品食品衛生研究所)

菅野 純(国立医薬品食品衛生研究所)

高月峰夫(財・化学品検査協会)

田中俊博(厚生省)

永井賢司(三菱化学安全科学研究所)

加藤正信(三菱化学安全科学研究所)

佐藤正邦(財・化学品検査協会)

長尾哲二(財・食品薬品安全センター)

羽深康雄(通産省)

広瀬雅雄(国立医薬品食品衛生研究所)

松島裕子(国立医薬品食品衛生研究所)

金子秀雄(住友化学工業株式会社)

奥野泰由(住友化学工業株式会社)

山本 史(厚生省)

米澤義堯(通商産業省)

大倉 (農薬検査所)

田中 利(農水)

(五十音順および敬称略)

本会議の目的：

11月12-13日のOECD会議結果に基づき、以下についての当班としての対応：

- (1) OECD/EDTA (11月12-13日) の報告
- (2) 試験法プロトコルの作成手順
Uterotrophic(NIHS：菅野他)
Harshberger(EPA：Penny Fenner-Crisp)
TG407, enhanced (NIHS⇔EU/BIAC)
- (3) HTPS 試験品目

注) 11月12-13日の会議終了後、運営委員会 (Koeter, Onyon, Heinrich-Hirsch, Kolossa-Gehring, Maciorowski, Fenner-Crisp, Inoue, Ashby, Gelbke) にて、大筋、下記の通り決定。これに基づいて、大旨、以下の段取りですすめることが決まっていますので、ご承知おき下さい。

- (1) Uterotrophic：プロトコルを菅野が作成する。Mature-OVX+、Immature-OVX-、それぞれに対して Mouse and Rat の4本のプロトコルを作成し、Lesley Onyon に Report し、原則としてこれによって、実験をスタートする。
- (2) Harshberger：Ashby の draft-protocol (当日配布) に対して、Comment を日本として送り直し (Ashby via Lesley)、確定してゆく。
- (3) TG407：広瀬班が実験をスタートさせている。ことに鑑みて、広瀬プロトコルを Lesley に送る (追って、Lesley より広瀬先生に依頼)。各国は可能な限り、プロトコルと化学物質のロットをこれに合わせるよう、1月までに会議を重ねる。

菅野：開会挨拶

井上：座長挨拶

ハイスループットとOECDの会議の内容に沿って会議を進めていきます。今回会議の目的は、一つ目はハイスループットの化学物質の選択、二つ目はプロトコル上気をつけることについて討議を行う。

羽深：ハイスループットにかける物質として環境庁で76物質しか決定していない。通産省としては、バリデーションという意味で米国と同一の75物質を対象として実施することを希望している。米国から75物質については年明けに浜田さんに連絡が入る予定である。更に、その他に75物質を追加する予定です。厚生省側と話し合って決定したいが、すでに350物質を検討するということが新聞に流れてしまっている。この物質の中には女性ホルモン α および β 、甲状腺ホルモン α および β 、男性ホルモンアンドロゲンおよびエストロゲンが含まれる。バリデーションという意味でゆとりが出来たら米国で追加される15000物質についても検討していきたい。あるいは、米国と分担という考え方もありますが。

高月：お手持ちのHTP試験候補物質の表を見ていただきますと入手可能か否かは表の右側に記載しています。今年度中には入手したい。

井上：物質の選定に関しては EPA に沿ったスキームにしたほうが面倒がないのでは？これに関して御意見を伺います。

高月：ハイスループットの試験に関しては多少の余禄が有りますので問題になっている物質を御提示いただければ実施できるかもしれません。

井上：ハイスループットの方式、どのような細胞を用いてどのようにアウトラインができたのか住友化学の金子先生の方から説明していただきます。

金子：資料説明。ハイスループットのための細胞ラインの同定に関して。レセプターとしてはエストロゲン α および β 、アンドロゲン α および β 、甲状腺ホルモン。細胞種はすべて HeLa 細胞にレセプター発現プラスミドを導入した。これらに関してはほぼ出来上がりつつある。MCF-7 は米国のものである予定であり、我々でもやっているが未だ旨く言っていない。MDA-MB-453 細胞に関しては入手が遅れている等。今後のスケジュールでは、12月に予定の個々の細胞の活性を測定するための automated screening システムの導入が遅れている。

羽深：試験にゆとりがあれば更に物質を加えるという話が出てきておりますが、EPA での追加が出てきたときすり合わせてみて、更にゆとりがあれば日本で問題となっている物質を加えるという提案ではどうでしょうか。75 物質のうち日科協からその物質を提出してもらえるのか現在問い合わせているところです。米国と細胞も交換してみたいという希望もありますが、OSI が細胞を出さないということも考えられますし、また日本も自由に細胞を出してしまっただけに良いのか、自分たちの財産を出していいのかとの懸念も有ります。米国も年内にハイスループットをかけるのは怪しくなっています。

12月には金額の規模がはっきりすると思います。

高月：まだ工業界と EPA の合意が得られていないという現状です。米国は現在 80 物質といっている。

井上：Uterotrophic assay, Hershberger assay 等を行うにあたり kg 単位の物質が必要となるわけですが、ここで Lot 差が問題になってきます。ハイスループットで実施した物質の Lot と同じくするために向こう何年間か OECD で多量の物質を押さえておこうと考えているようです。また、OECD に参加していない国でも OECD で実施した試験系を技術的に確立するために OECD にその物質の入手を依頼してきて試すということも考えられます。しかし、Lot 差がありそうな物質については、改めてハイスループットを流せばよいという意見もあります。わざわざ物質を何 kg も確保しておくよりは、異なる Lot の時はもう一度ハイスループットを流してもらったほうが良いでしょうね。

高月：OECD アウトラインの説明（手元の海外出張報告書に沿って）。

井上：OECD の次回の会合が 4 月 19-20 日ですので 3 月末までにある程度のスタートをかけておかないとまずいところがありますね。

スカイレイヤーとの関係で、OECD の次回会合が 4 月 19-20 日でそこで本決まりとなるので。スカイレイヤーは日本と米国は一度決定したことは絶対に変更出来ないが、ヨーロッパの方は柔軟性が有りますね。

広瀬班の 407 はもう実施しているので実際に使用している物質と Lot 番号を OECD のプログラムに協力するということで Lesley に報告して下さい。

お金に関しては、誰も仲介をせず業者に直接交渉ということではまずいので、TNO に仲介してもらえるように交渉している。TNO がキーステーションとなり、少なくとも 5 年間、いかなる人もその物質が欲しいと希望してきてた場合には、入手できるようにしようというスキームです。日本の fiscal year 問題を配慮しつつ、日本ですでに開始しているあるいは開始しつつあるプロトコルを尊重するという考えです。

Uterotrophic assay は日本がまとめる。この試験系に Mature を排除する理由はなく、両方のプロトコルを立てることにする。北欧では、スペース等の問題からマウスでの uterotrophic assay を希望しています。

菅野先生に uterotrophic assay のプロトコルの作成をお願いしています。Hershberger の件はジョン ラスピーさんがやりたそうだったのですが・・・この時点でまだラフドラフトと言っていますが、それを尊重して作るか、あるいは日本でもスタートしてしまうかの問題があります。米国は 407 を実施するのを嫌がっています。EPA は全部がスクリーニングとして考えているようで、全部をバッテリーしてから次の試験を考慮したいとっていますが、407 をスクリーニングとすることは経済的にも無理でしょう。407 はヨーロッパで実施してもらうことになっています。Hershberger は EPA に行くでしょうし、Hershberger のみの意見を徴収してどのような手順でどのようにするのか E-mail でワークショップをするトニーマシュロスキーに連絡して欲しい。ヨーロッパでは TG416 をスクリーニングとして実施することはないでしょう。

1 月 28, 29 日の会議までに hershberger には日本はこのようなプロトコルでスタートしたと報告できるようにして欲しい。

奥野：407 の件ですが、いろいろとプロトコルに変更が有るようですが、まだスタートしていないラボとしてはどのように取り組んでいったら良いのでしょうか。

井上：広瀬班はスタートしているので日本がこのまま 8 月のプロトコルでスタートしても仕方がないと考えています。12 月末までには意見をまとめて、それまでは 8 月のプロトコルのラインで実施し、どうしてもこの個所は何とかして欲しいということということであればインコーポレートすることはできます。

OECD に日本ではこのようなプロトコルで実施しているが、このプロトコルで良いか否かと送り付けても良いと思います。

高月：407 は厚生省の予算で実施するので繰り越しが可能です。4 月ぐらいでも大丈夫かもしれない。407 の繰り越しは、どの位の時期まで大丈夫なのでしょう。

OECD のプロトコルは 4 月後半に確定するので我々のプロトコルとずれる可能性がある。あくまでも年度内に日本のプロトコルで実施し、OECD に押し付けるのが良いのでしょうか。407 は 8 月のプロトコルで実施しているので多少意見をまとめていけると言う程度です。たしか、その時のプロトコルでは強制経口を混餌投与に変更しています。

井上：現時点では、混餌投与から強制に戻しました。Low dose のところも見ておかないと意味がないし、従来の 407 で見れるかとの疑問がありますので。EDs を念頭に置いたので混餌を強制に戻しましたが、既存の 407 をやったにすぎず、ホルモン関係のところでも丁寧に見るということを加えたに過ぎないのですが。レスリューオン？に時間がなかったのでこのようなプロトコールで実施したと報告すれば十分と思いますが。

可能なかぎり 407 は年度内に実施するように。407 は国内でも多少のずれが生ずるのは仕方がないと思う。

高月：OECD でも 407 は gavage の方向で固まってきています。

羽深：お金の方は 5400 万まで繰り越しても良い。

井上：uterotrophic assay のプロトコールと実験の進め方について。

菅野：immature マウスに関しては実用性はないのではないかと考えています。OVXmature ラットについて後ほどプロトコールを先生方にお配りしますので赤印を入れていただきたい。現在 uterotrophic assay を実施しているラボは、国立衛研 2 本、食薬 1 本、産農 1 本、化検協 1 本の計 5 本です。

井上：uterotrophic assay はどうするか。これも OECD とのすり合わせとの関係で、短期間で勝負がつくので 1 月スタートでも良い面も有りますが。菅野先生はレスリューオンにプロトコールを提出しないといけないし、そのフィードバックを待ってスタートしますか？

青山：1 月のコミッティをまち、2 月初旬から 3 月に assay をするのがぎりぎりの線ですね。

高月：mature でやるのか immature で実施するのか。

井上：OECD は immature が原則であるが、OVXmature ラットを落とす理由はない。Chemical がダブルれば、mature のみでも良いと思う。投与経路は皮下です。

青山：我々の研究所では mature および immature で実施してみたい。

井上：hershberger について。

青山：我々の研究所では、現在セットで実施している。EPA が主導権を握っているので 1 月のワークショップをもって決めたいと言っている。

永井：hershberger は週齢、投与期間、皮下投与あるいは経口投与などプロトコールが未だ決まっていない。

井上：1 月のワークショップに積極的に今までのプロトコールを提出する方向でやったほうが良いのでそれはプレバリデーションとなるでしょうね。

加藤：1 月のワークショップにプロポーズ出来るように努力することが目標ですね。

奥野：1 月のワークショップに間に合わせるにはもうスタートしないと間に合わないですね。

井上：407 を含めてどのような化学物質をどう使うか。もう一度化学物質を確認します。仮に 12 月 25 日をリザーブしていますが、参加したい機関の人は、もちろん参加可能ですが、例えば 407 小委員会、uterotrophic assay 小委員会を設けて話し合ったほうが良いのかな。委員会がダブルしている先生方もおいでなので、その場合は時間をずらさないといけないですね。小委員会を設けて今後の運営を進めていく方針でどうでしょうか。

羽深：その小委員会というのはどこに所属するのでしょうか。

井上：菅野班の小委員会ということで、菅野班は補正予算のためのハイスループットの班なのですが、OECD 関係の試験の会議をこの班で一緒にやっせまおうというスキームです。補正予算は、通産省および厚生省と一緒に出ている。菅野班の名前を借りて 2 省のいろいろな人が集まり、農水の人にも傍聴していただきハイスループットを中心として 407、uterotrophic assay および hershbergar の試験法を検討しようというスキームです。

羽深：OECD が絡むとすると環境庁にも入ってもらわないといけな。この班を OECD そのものにしてしまうのはまずい。

井上：菅野班では OECD をはずして、ハイスループットなど技術的な検討をする。今後の扱いとしては、枠組みは通産省と厚生省の endcrindisruptor の技術的な話し合いの場とする。407 の物質はすでに決まっているが、その他については物質の割り振りをどうしましょうか。

田中：小委員会等の日程および場所の調整を私が致します。

井上：プロトコールを固めていく手順と化学物質の選定をその小委員会にお任せします。

以上

(文責：松島)

内分泌かく乱化学物質実験者レベル会合
(厚生省生活科学研究菅野班班会議を兼ねる)

第4回 菅野班議事録

日時：平成11年01月20日(水) 午前10:00～12:30

場所：通商産業省別館共用第833会議室

座長：井上 達

進行：菅野 純

事務：高月峰夫

出席者：19名

青山博昭(財・残留農薬研究所)

井上 達(国立医薬品食品衛生研究所)

今井 清(財・食品薬品安全センター)

奥野泰由(住友化学工業株式会社)

加藤正信(三菱化学安全科学研究所)

川崎 一(日化協)

菅野 純(国立医薬品食品衛生研究所)

高月峰夫(財・化学品検査協会)

田中俊博(厚生省)

豊田和弘(国立医薬品食品衛生研究所)

永井賢司(三菱化学安全科学研究所)

中山真吾(厚生省生)

羽深康雄(通産省)

松尾昌季(住友化学工業株式会社)

松島裕子(国立医薬品食品衛生研究所)

宮城恵理(国立医薬品食品衛生研究所)

山崎寛治(財・化学品検査協会)

山田智也(住友化学工業株式会社)

米山隆浩(通産省)

(五十音順および敬称略)

本会議の目的：

井上：OECDの2月8日からの主に uterotrophic を中心とした会議に日本としてどのように

対応すべきか、本日の会議は、実験データに沿って議論していただきたい。この予算は、厚生省と通産省から補正予算で組まれていて、菅野班と合わせて実施している。

中山：2月8日～12日のOECDで行われる会議は、407、uterotrophic試験、Hershberger試験についてmanagement committeeを行う。2月8日にuterotrophic試験の専門家会議が開かれる。日本としては、どのようにしたら良いのかを専門家の観点から討議していただきたい。今日と明日の会議でプロトコルの原案を作成して欲しい。

井上：今日の会議についてどのように進めたら良いかお考えがあれば伺いたい。これまでのデータについても触れながらデータを中心に進めたいと思う。論点は、OVXラットとimmatureラットの比較および問題点。用量設定の問題。位置づけの問題。投与経路の問題などがある。

永井：我々の研究所では、OVXラットの方がimmatureラットよりも有用性があると結論した。投与経路は、P.Oに比しs.c.が良い。今までは、アゴニストについて議論されてきたが、これからはアンタゴニストについても議論したい。卵巣摘出をしてから投与開始までは、1週間で十分である。日本では、immatureは生後21日齢からの使用であるがチャールスリバーでは親付きで購入できるのでimmature系も実施することは可能。化学物質のポテンシャルを得るためには、s.c.がよいと思う。エチニールエストロジオールを投与したとき公比10で3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では大きな差はなかったが、30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では影響があった。E2は1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で検出可能であり、100倍以上の差が見られる。

OVXで3および5日間0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で有用性はないが、5日間では増加傾向がみられた。投与期間を延ばしていくことで有意差がでたので3日間ではなく、より長い期間投与することが望ましい。Immatureラットの問題点は、21日齢から3日間の投与では問題ないが、投与期間が限られる。解剖時期の問題では、最終投与後6時間あるいは24時間で解剖するが、どちらが有用であるかは分からない。(24時間でのデータしかない)しかし、6時間での解剖は現実的に厳しい。内分泌かく乱物質をはかるパラメーターとしてホルモン、レセプター、子宮重量、内膜上皮の丈の高さなどさまざまなものがあるが、内膜上皮の丈なども画像解析装置を用いて測定すると感度の良いパラメーターとなる。BrdU標識細胞を測定することも良いパラメーターである。しかし、BrdU標識細胞の定量にはかなり時間がかかり、これをバリデーションとして加えるには無理があるかもしれない。BrdU標識細胞は、E2 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でも対照群に比し、有意に増加した。プロゲステロンレセプターも良い指標となる。群構成は、公比10で実施し、卵巣摘出ラットは6匹、immatureラットは10匹が良いと思う。被験物質は、3群の構成が良い。

山崎：パラメーターとして子宮重量よりも病理組織の方が感度が良いということはどのようなことなのか？子宮重量だけで良いとは言えないのか。

永井：内膜上皮の丈やBrdU標識細胞率など子宮重量より感度の良いパラメーターとなり得る。

青山：プロゲステロンレセプターなども良い。

今井：E2を3日間投与では、0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の子宮重量はどのように変化するか。

永井：0.1 μg/kg 群は3日間投与では増加傾向にはあるが、5日間になると有意に増加する。

山崎：化学検査協会より資料について説明。

EE2をimmature Cfj:CD(SD)IGSラット(21日齢)に1群6匹で3あるいは7日間、経口あるいは皮下投与する。用量は、0、0.06 μg/kg、0.6 μg/kg、6 μg/kg。子宮重量は、経口投与では、3および7日間投与の6 μg/kg群で増加が見られた。皮下投与では3日間投与の6 μg/kg群、7日間投与の0.6 μg/kg以上の群で増加が見られた。

DESは同様にimmature Cfj:CD(SD)IGSラット(21日齢)に1群10匹で3あるいは7日間経口投与した。子宮重量は、3日間投与の1 μg/kg群にのみ増加が見られた。

青山：膈開口があった場合スミアは採っていたのか。スミアをみることにより排卵している可能性を見いだすことが出来る。

山崎：スミアはみていない。EE2 0.06 μg/kg群で1/6匹に膈開口がみられた。更に現在immatureラット21日齢に3日間、25日齢に3日間皮下投与で子宮重量の比較をしているが結果はまだでていない。

菅野：卵巣の重量に増加傾向はみられたか。

山崎：差はない。

山田：住友化学工業より資料について説明。

卵巣摘出7週齢ラットあるいはsham operationラットにE2を3日間腹腔内投与した。用量は0mg/kg, 0.0001mg/kg, 0.001mg/kg, 0.1mg/kg, 0.05mg/kg。

結果は、子宮の湿重量で子宮腔内の液込みで、卵巣摘出ラットでは、0.001mg/kg(1 μg/kg)以上の群で有意な増加が見られたが、sham operation群ではE2投与による影響は見られなかった。子宮腔内の液を抜いた重量と乾燥重量では、どちらも同じ傾向あるいは感度を示したので、わざわざ乾燥させなくとも液を抜いただけで測定には十分である。しかし、E2高用量群ほど子宮腔内液の含有量が増加し、ばらつきが大きくなる。

Sham operation群は、解剖時に性周期合わせていないのでばらつきが大きい。また、sham operation群は、E2投与によって子宮腔内の液は増加はみられなかった。

菅野：OHPにてデータ説明。

皮下投与と経口投与の感度差をパラベンゼンの文献を参考に説明する。Toxicol. Apple. Pharmacol. Vol.153, 12-19, 1998

E2の場合は、s.c.の方がP.Oよりも10倍感度が良く、パラベンゼンは、5倍感度が良い。動物はSDラットを用いている。

川崎：その文献では、毒性との関係の比較を行っているか。また、溶媒は何を用いているのか。

菅野：毒性に関することは調べる。

青山：文献ではパラベンゼン投与の溶媒はアラキソオイルを使用している。

井上：uterotrophic試験を日本ではスクリーニング assay とするのか assesment assay とするのか。OECDとしては提案では、スクリーニング試験と言っているが、それで良いのか、あるいはそのように決められるのか。

川崎：12月2日付けでOECDからメールが来ていたが、uterotrophic試験は、assay位置づけというよりハザード identification となっていた。スクリーニング assay で良いのだとすると s.c.投与が良いと思うが、ハザードとするとどうするのか？

井上：このハザード identification という言葉の出てきた経緯は、スクリーニング assay にするか assesment assay にするかを決めかねて出てきた。

加藤：良い悪いの判断は統計的な出力に向いているのか、いないのかでおこないたい。

高月：immature ラット、卵巣摘出 immature ラット、卵巣摘出成熟ラットなどがあるが、今後試験を大量に実施していかなくてはいけない。従って、どれを使うのが一番簡単なのかを考慮したほうが良い。エストロゲン作用が強いものについては、卵巣摘出成熟ラットも immature ラットも同じ。公比10で落としたほうが良いのか。

スクリーニングとするとより簡単でしかも悪いものを引っ掛ける方法を考えないといけない。

井上：まず s.c.から討議したい。皮下投与とした時間問題となるのは用量設定。

高月：一般の化学物質となると弱いエストロゲン作用であるのでかなり大量を投与しないといけない、その時 s.c.と P.O ではどちらが有用で、投与可能か。

井上：uterotrophic 試験は、レセプターにバインディングできた物質についてのみ調べるため、世間に出回っている全部の化学物質について検討するわけではない。IC50 はすでに、in vitro で調べられることから、これを基準に用量設定をしたら良いと思う。

加藤：最高用量の投与は、これくらい（例えば 1000mg/kg）と決めても良いのでは。

高月：急性毒性試験で用いているように固定用量法で用量を決めていっても良いのではないか。

松尾：IC50 という考え方は非常に面白い。

菅野：ゲニスタインあるいはビスフェノール A の IC50 を測定した。投与経路としては、s.c.の方が計算は簡単。経口投与となると吸収の面を考慮しなくてはならないので計算が面倒である。動物への毒性面では、cytotoxicity がみられる用量ということで判断できる。

井上：用量の低いものについても IC50 を用いれば、すでに in vitro 系で判断できる。従ってそれほど用量をふる必要はない。In vitro で影響のない用量を投与しても意味がないのが理由。従って、IC50 で必要十分と考える。

青山：トップを IC50 にして用量を下にふるということですよ。

川崎：井上先生的前提としては、in vivo と in vitro が同じであるということだが、生体に入ったときは代謝も絡んでくる。そんなにシンプルに考えてよいのか。in vivo と in vitro は異ると考える。IC50 をそのまま当てはめることには疑問がある。やはり従来の急性毒性試験のように考えないといけないのではないか。また、その場合、低い用量のところはどうするかが問題である。

井上：uterotrophic 試験は生きた試験管すぎない。低用量の問題を解決しないとイケない。OECD からクレームがついたときにきちんと対応できないとイケない。

高月：低用量をどうするのかは重要な問題だ。

井上：IC50 で低用量は設定できるが、やる必要があるのかないのかは別問題。レポーター gene

assay のデータはハイスループットで出てくる。s.c.の用量設定では、もし急性毒性から割り出すとすると何分の1位とするのか？

今井：すでに体重増か抑制が起こる用量で投与しても意味がない。アベラブルのデータがどこなのか。

川崎：体重などをパラメーターとして毒性症状のないところを用量として設定するのが良い。そのパラメーターを何にするのか見つけられない。

井上：バリデーションの方法を決めるにはどのようにするのかを決める。

高月：テストガイドラインを決めるには。

井上：試験する chemical はすでに決まっている。

高月：用量設定方法の決定は、一つは急性毒性試験から、もう一つは IC50 から。これらを同時に進行させて良い方法を提案していく。

松尾：最終的に日本はこのようにすると提示できないといけないわけで、理論構成がきちんとしていないといけない。

井上：高月先生に急性毒性方の場合の皮下投与での設定、経口投与での設定をまとめ欲しい。卵巣摘出が確実に行われたかどうかを山田さんのところがスミアを経時的にとり調べていたが、その方法を取り入れたい。乾燥重量についてはどのようにするか。

山田：乾燥重量についてのデータは、まだ E2 のみであり、十分とは言えない。ほかの化学物質がどのようなかということについては分からない。

井上：半分を乾燥重量で、あとの半分を固定すると言うように提示しましょうか。

今井：乾燥重量は、乾燥の条件でかなり異なった値となる恐れがある。

井上：では、乾燥重量は排除しましょうか。

山崎：文献で、乾燥重量と液を抜いた湿重量の比率にあまり差はないようなので乾燥重量は入れなくとも良いと考える。

井上：では、乾燥重量は測定しなくとも良いことにする。しかし、子宮内宮液が入っている状態と、抜いたときの状態の重量を必ず測定することとする。卵巣摘出ラットの投与観察期間は、1週間で充分か。それ以外は？

永井：3日間目と7日間とを併記するほうが良い。

井上：3日間および7日間をみる。

卵巣摘出ラットで投与終了後の解剖の時間は。

山田：卵巣摘出ラットの使用動物の週齢は？6週齢以降であればよいか？

加藤：それはあまり絞らずに young adult としては。

青山：700-800日齢のラットを用いて試験したが、反応は良かった。

井上：immature assay について25日齢から投与するということに御意見は？

永井：25日齢までの投与は大丈夫と思うが、それ以上を過ぎると対照群でも卵巣が働き始めデータとしては使えなくなると確信している。

加藤：ガイドラインを作ることから、安全なところを提示しないと行かない。従って、Immature

ラットに 28 日齢迄投与するのは不安定すぎるのではないか。

川崎：動物数はどうするか？ 卵巣摘出ラットは 6 匹、immature ラットは 10 匹で良いか？

加藤：CV で決めてはどうか。

井上：投与終了後から解剖までの時間で適切なものは？

川崎：投与終了後 6 時間目に解剖と言うのは実際にはきつい。

加藤：投与期間が短いときと、長いときでは異ってくるのでは。

井上：投与終了後から解剖までの時間で適切な時間は、現時点では、不明。よって fix しないこととする。

羽深：遅れてきたため議論されたのかもしれないが、日本は uterotrophic 試験はスクリーニングとして提案する方向なのか？ それとも幅を持った試験ということで提案するのか。

井上：OECD そのものがそれに関してははっきりしていない。

中山：論点が豊富ですので予備日を 1 月 27 日 10:00- 通産省別館 833 にとってあります。

内分泌かく乱化学物質実験者レベル会合
(厚生省生活科学研究菅野班班会議を兼ねる)

第5回菅野班議事録

日時：平成11年01月21日(木) 午前9:30~12:00

場所：通商産業省本館6階第一会議室

座長：井上 達

進行：菅野 純

事務：高月峰夫

出席者：22名

青山博昭(財・残留農薬研究所)

池田年仁(厚生省)

井上 達(国立医薬品食品衛生研究所)

今井 清(財・食品薬品安全センター)

内田課長(厚生省)

奥野泰由(住友化学工業株式会社)

菅野 純(国立医薬品食品衛生研究所)

高月峰夫(財・化学品検査協会)

田中俊博(厚生省)

加藤正信(三菱化学安全科学研究所)

川崎 一(日化協)

羽深康雄(通産省)

永井賢司(三菱化学安全科学研究所)

中山補佐(厚生省)

豊田和弘(国立医薬品食品衛生研究所)

松尾昌季(住友化学工業株式会社)

松島裕子(国立医薬品食品衛生研究所)

宮城恵理(国立医薬品食品衛生研究所)

山崎寛治(財・化学品検査協会)

山田智也(住友化学工業株式会社)

山本 史(厚生省)

米山隆浩(通産省)

(五十音順および敬称略)

羽深：プロトコールをどのように考えるのか昨日、厚生省と通産省とで話し合いを持った。日本としては、OECD に対し、uterotrophic assay はスクリーニング試験として提案したいと考えている。

池田：その物質が、内分泌かく乱物質であることを確かめるため、まず、スクリーニング試験が必要であると考えます。

井上：先生方は、この意見に対してどのように考えるのか。スクリーニング試験として提案したいという内容はどのようなことになるのか。

加藤：資料の p1 の 2-A に二省の方が言われた uterotrophic assay の目的を書いた。この試験により、ポテンシャルなエストロゲンの特徴をみること、ポテンシャルな毒性のモードをみることを目的とする。

In the assessment and screening of estrogenic characteristics of a substance, determination of uterotrophic activity is usually and initial step in vivo. It provide information on potential estrogenicity or anti-estrogenicity of the material in mammals including human. Data from uterotrophic assay may provide initial information on the mode of potential toxic action of a substance. Currently, two methods, namely, test in ovariectomized adult female and that in pre-pubertal juvenile female are examined. It is demonstrated that ovariectomized female rat reveals higher sensitivity and reproducibility than juvenile female.

井上：Endocrine disruptor (OECD) に関する考え方として、第一には OECD は内分泌かく乱物質の possible hazard identification を目的とした試験系の可能性を探っている。このため、可能なかぎり先を見越した guideline の基礎となるような validation を目指して pre validation ないしはこれまでの data の解釈を行って validation を見据えた protocol の作成に努力している。しかし、この protocol の取り扱いを巡って混乱がみられる。それは、次のことが前提になっているにも関わらず、不明確なことに起因している。内分泌かく乱物質の概念は、既存の事実であり、そのものは事実確認もされるが、明確な hazard の発生機構などが未知であること。従って、その Identification に必要な把握すべきポイントは、定まっておらず、更に、上記の現象を惹起する物質が、陽性を呈すると知られる試験が、陽性であってもそれだけで内分泌かく乱物質を同定することが出来ない状態にあること、そして、それは、いくつかの試験系の組み合わせでもって未だ判定には、どのような考え方で望めばよいのか、明らかではないこと、などである。しかし、事態は、手をこまねいていうわけにも行かないので、EDSTC や OECD でこれらのことに取り組む。環境で起きている内分泌かく乱物質が絡むいろいろな出来事、人に対する影響の方は、きちんと調べられていない。この試験では、このようにすればこのようなことが分かるが、現時点では、それ以上のことは言えないし、分かってもいない。ある試験で陽性になったからと言ってその物質がすぐに危険であるとして取り扱うべきかどうかは、別問題である。

川崎：井上先生のその考えには 100% agree する。

内田：OECD の会議では、2 世代試験が end point であると言っているように認識しているが、その 2 世代試験まで進んだらハザードあるいはリスクアセスメントとするのか？

青山：3 月の会議に出ていたので発言させていただくが、基本思想は本当に人に対してハザードが生ずるのかは分からない状態なので、仮にハザードがあったとしてもたった一つの試験で陽性となったからと言ってどうこういうことは出来ないだろう。

井上：416 はあくまでもラットから人へ外挿しようとするもので、他には方法がないが、ひとつのサジェスションではある。2 世代試験が良いとは限らない。基本的には、2 世代試験が end point とはみていない。もっとも NCTR などは 5 世代試験を目指しているが、長く試験すれば良いと言うものでもない。実際、内分泌かく乱物質がどのように identify 出来るのか未だ基本的に分かっていないのが実情だ。

菅野：私もそれに同感。例えば、ames テストで陽性となったものが二年間の発がん試験で陰性となるときもあるし、ames テストで陰性でも大丈夫とは言えない。同じことが、binding assay, uterotrophic assay, Hershberger assay でも言えるのでは。すなわち、それらの試験で陰性なので 2 世代試験はやらなくとも良いということは断言できないし、binding assay が陰性でも 2 世代試験で陽性とできるかもしれない。現在そのデータが非常に少ないので、縦並びのバッチスクリーニングは出来なくて、横並びにしか考えられない。

井上：不可知論ではないの？やはり 2 世代試験で陽性のデータがでることが大切なのではなく、また、2 世代試験で陽性にでたからといって内分泌かく乱物質であるとはいえない。

菅野：ラットで膀胱ガンがでる物質があるが、それでもその後いろいろと研究が進むとその物質が、ヒトの発がん物質であるとはいえないことが分かってきた。内分泌かく乱物質についても同じことが言えるのではないか。

内田：OECD の中ではこの問題を日本では議論しているということにして OECD に任せたいほうが無難なのではないか。この試験でこの結果が出たら何を考えないといけないとかの提案をしてはどうか。日本のポジションとしては、何だか分からないが研究だけはしているということでは許されないと思う。

井上：OECD が同じように考えてくれないと困るが。

高月：それとどの chemical がエストロゲン作用、抗エストロゲン作用、男性ホルモン作用があるのかどうかピックアップしていくのが我々が今現在できることではないか。その物質にエストロゲン作用があることが分かっても内分泌かく乱物質であるかどうかは、わからない。しかし、まずは、ピックアップすることが大切ではないか。

松尾：確かに、内分泌かく乱物質であるかいは分からないが、現時点では、今の知識で対処出来るようにすることが大切であり、OECD はだからこそいろいろな可能性のあるものを盛り込んでプロトコールを作成しようとしている。このプロトコールを作ることは、ものすごく長い時間かかり、今まで OECD がどのような経緯できたのか分かって欲しい。

今井：2 世代試験については陽性にできれば、人に対しては内分泌かく乱物質として疑わしい。Uterotrophic assay や Hershberger assay で陽性とでもそれは内分泌かく乱物質であるか

なかは良く分からないと言うような意味付けにしないといけないのではないか。

川崎：OECD にはそのようにあいまいな位置づけでやっていると提案したい。

井上：強い内分泌かく乱物質はすでに検出は可能であり、わかっているし、行政として対応可能であるが、内分泌かく乱物質問題は、もっと弱い物質がどうなのかということだ。

青山：20年以上、2世代試験をやってきた立場から発言させていただくと、2世代試験とは繁殖毒性試験であり、これが陽性にでたからと言って内分泌かく乱物質あるとはいえない。

松尾：OECD は多世代試験で決着を付けようとしているわけで、これは一種の逃げだが、日本で良い試験法があれば積極的に提案すべきだ。いずれ多世代試験はやめると思うが、いまは多世代試験しか手が無いのでは。

井上：強いエストロゲン作用のある物質はすぐに分かるが、弱い物質については、uterotrophic assay をするとこのようなことが分かるとしてもそれが内分泌かく乱物質につながることは分からないと現時点では言うしかない。

内田：それらは研究面。OECD は研究の問題ではなく、risk management につながるので着手し始めた。この問題は、研究レベルで行政は待って下さいとの印象を受けるがどうなのか。これでOECDを満足させることが出来るのか疑問だ。

山田：米国ではホルモン活性のある物質を内分泌かく乱物質ではなく、endocrine active compound という呼び方にしている。それらの物質は、endocrine potential をもっているのもその物質を見つけることはすなわち内分泌かく乱物質が其処から引っ掛かってくるだろうということ。内分泌かく乱物質という言葉自体米国ではすでにおかしいと言っている。

井上：我々としては、estrogen active compound は引っ掛かってくるがその方法で、その中から内分泌かく乱物質が引っ掛かってくるとは考えない。

川崎：今までの uterotrophic assay はホルモンの検出法でしかないことは理解して欲しい。内分泌かく乱物質を引っ掛けることはその方法では疑問である。

井上：プロトコールをまとめるには、今の議論の概念をはっきりさせないといけない。

内田：では、行政としては何をすべきなのか。

奥野：さきほどの菅野先生の意見で、発がん物質を例に上げ、内分泌かく乱物質について説明されたが、それとこれとは異なると思う。発がん物質はIARCでも分類しているように非常に分かりやすいが、内分泌かく乱物質は人に疫学的に証明された例がないので決められないのではないか。少なくとも人に対しては、どの様になるのか分からないので内分泌かく乱物質問題は行政的にもわからないのでは。

松尾：米国では、uterotrophic assay, Hershberger assay で陰性ならばそれ以上の試験はしなくとも良いという方針で行っている。

井上：行政はそのような運用の仕方を提案しようとするが、作る立場としては少し違ってくる。

羽深：OECD で決定されたことは日本の行政でも使っていく。この会議でもこれからその後行政で使われることを念頭において議論して欲しい。

山本：日本で作ったものを日本で採用しないという事態はどうか。最終的には行政として使わ