

別添資料1

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1回 菅野班 議事録

日時：平成10年9月22日（火）午前10：00～12：00

場所：通産省本館17階第4共用会議室

座長：井上 達

進行：菅野 純

事務：高月峰夫

出席者：22名

井上 達（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）

青山博昭（財・残留農薬研究所）

山崎寛治（財・化学品検査協会）

佐藤正邦（財・化学品検査協会）

矢可部芳州（財・化学品検査協会）

長尾哲二（財・食品薬品安全センター）

永井賢司（三菱化学安全科学研究所）

米澤義堯（通商産業省）

広瀬雅雄（国立医薬品食品衛生研究所）

三森国敏（国立医薬品食品衛生研究所）

中山 誠（厚生省）

斉藤幸一（住友化学工業株式）

山本雅也（国立医薬品食品衛生研究所）

小野 敦（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）

松島裕子（国立医薬品食品衛生研究所）

山本 史（厚生省）

羽深康雄（通産省）

田中俊博（通産省）

米山隆浩（通産省）

本会合の目的：第一の目的は、省庁の枠を越えた実権者レベル、特に人体影響に対する研究を行う立場にある方々の間での忌憚のない情報交換と科学的ディスカッションの場を提供すること。本会合の第二の目的は、日本国内での研究の重複の無いプロとコールの異同等を相互に認識することにより、調整が可能な場合は調整し、科学的に相補性の高いデータの蓄積が可能となるような方向性を見いだすこととしたい。

議題：

1. In vitro 試験・研究

HTPS, cell line, estrogen receptor 系について、androgen receptor 系について、thyroid hormone receptor 系について、米国 EPA/OSI トの対応について。

Chemical choice、350 化合物質の選定について厚生省予算。

2. In vivo 試験・研究

OECD issue, methodology,

Uterotrophic assay, Hershberger assay, 28day assay(407 enhanced), Two generation assay, Chemical choice

井上：内分泌かく乱物質がクローズアップされてきて補正予算が通り、通産省 6 億 5 千万で、通産省としては試験法の開発、暴露、〇〇を実施いたします。厚生省としては、ハイスループットを用いた試験ということでバリデーション、福島斑は二世世代試験、広瀬斑は 28 日間試験があります。更に、厚生省としてハイスループットを中心とした菅野斑があります。この菅野斑を利用して実験者の手技交換があるとよいと思っている。通産、厚生省も研究交流の場として利用して欲しい。

名簿上の四人は、ハイスループット菅野斑の班員で、下の方々は、技術的面でこの斑を越えて、協力研究員として入っています。このため目的は二重となっております。

通産省の化学物質対策室の羽深さんよりお話いただきます。

羽深：この会議はお客さんとして呼んでいただいているという立場でよいでしょうか。これからの問題としてバリデーションをどのようにしていくのか。日本が OECD に提案できるものができてくれることを望みます。通産省も厚生省と一緒にやれば良い試験法が出来るのではと期待しております。バリデーションとして物質の選択にどのように対処していくのかを考えなくてはならないと考えております。

生活衛生局食品化学課・中山：昨今、内分泌かく乱物質については世論的に人気があり、問い合わせ等非常に多くなってきております。HTPS を中心にやっていくということで、厚生省のみでなくいろいろな方の御意見を聞いてより素晴らしい物にして欲しいと望んでいます。

菅野：in vitro ではハイスループットを OECD の問題があるのでそれに絡めていけたら面白いであろうと考えています。高月先生に cell line のところから御説明いただきます。

高月：住友化学さんの方で cell line を作製していただき、それを用いて試験法の実施を試みるつもりです。日本での assay 系と致しましては、エストロゲンレセプター α および β のレポーター gene の assay 系を開発いたします。Cell line はエストロゲンに反応する細胞として、MCF-7、HeLa cell、アンドロジェンに反応する細胞は、MDA、HeLa cell、甲状腺ホルモンに反応する細胞は、HeLa cell を使い、これらに、それぞれのホルモン反応領域を組み込んだレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）のプラスミドを導入いたします。

住友化学工業・齊藤：安定株が出来そうです。化検協に 9 月末にハイスループットが入るので実際の化学物質を実施してみる予定です。米国でも数百万をハイスループットで検出している。12 月までに 150 物質を米国で検出する。日本でもその同じ物質を米国から入手して比較できればよいと考えています。

井上：物質の選定はまだこれからであり、産業界からより広い物質を選定して欲しいのと以来により、150 物質となりました。

住友化学工業・齊藤：MCF-7 はレセプターを発現しているが、 α が主で、 β は少量です。操作的には、レポーターのプラスミドを 1 つ入れるだけなので簡単です。米国と異なる点は、日本では、甲状腺ホルモンレセプター α および β の 2 種類もはかる試みがなされることです。レポーターはルシフェラーゼで行います。甲状腺ホルモンレセプターの α と β の違いは良く分かっていません。また、HeLa 細胞における甲状腺ホルモンレセプターの発現の有無はこれから検討する予定です。

井上：他に cell line に関する御質問はありませんでしょうか。

住友化学工業・齊藤：HeLa 細胞を用い、エストロゲンレセプター α に関して、リポフェクタミンを用い活性の高い細胞が得られるか否か検討しているところです。96 穴プレートを 500～1000 枚使います。 α に関しては活性が高い細胞が取れることが分かりました。ホルモン反応領域はヒト由来のものではなく、魚のビテロジェニンの反応領域をタンデムに組み込んだものを用いています。一方、MCF-7 細胞においては、活性にばらつきがあります。

井上：米国と交換したりするのはどのようにするのですか。

羽深：ネド？との調整が必要です。

井上：国立サイドの研究あるいは営業はどのようにするつもりでしょうか。

羽深：国の開発なのでお金は取りません。ですからコントラクトラボで使用するのは可能ですが、細胞の売買はだめです。

工技院資環研・米沢：MCF-7 をサーベイに使えるでしょうか。細胞の活性、安定性が悪いので使用時に供給してもらうのがよい。10 月初旬に〇〇が出来上がることになっている。10 月 5 日には講演会を予定している。

井上：物質の選択はどのように致しましょうか。

高月：まだどのものにするのかは決めていません。試験実施可能な物質を選択したいと考えております。

井上：350 物質についてアウトラインはあるのですか。

山本（通産省）：この班でプライオリティを決めていただきたいと思います。外部の人気も高いのでやっておく必要があると思いますが、何をするために 350 物質をかけるのかを考えていただきたい。EPA の 150 物質の選定に準えて日本も選択していただきたい。そのためトータルでどの位の物質になるのかもこれからの選定にかかってきます。今年度は、このような基準で選定したとはっきりとする能名もノにしていきたい。

羽深：このバリデーションをどのように位置づけるかですね。ハイスループット以外に *in vivo* もありますし、ハイスループットの結果をどのように評価していくのが良いのか。ハイスループットで引っ掛かったものは *in vivo* 試験に持って行って *in vivo* との関連づけでやってもらうと良いと考えています。日本では、引っ掛かると報道等で騒ぎになる可能性がある。

井上：ウィイブリッジ会議（英国）ではホルモンの産生、輸送、ホルモン作用のあらゆるところに影響のある物質を内分泌かく乱物質とするという事になりました。EPA を中心に煮詰めていく過程で、ホルモンの産生～排出はエンドクラインと **disruptor**

がどう違うかが米国で論争となりました。エンドポイントは、後世代に影響があるか否かということです。ハイスループットで黒と出たものがこれから内分泌かく乱物質として考えるという手始めのところでありまして、〇〇〇・・・。内分泌かく乱物質とは、かく乱の可能性のあるものは外し、確実にかく乱作用があるものをこれとする。

350 前後の物質を選定するにあたり、このようなカテゴリーで入れたらよいのではという何か御提案はありますでしょうか。

三森：消費者に問題であるのは難分解性で体に入ってくるものであると考えますと分解性が悪く、蓄積性の高いものはどの位あるのでしょうか。

山本（通産省）：PCB などいろいろな異性体がありますが、それを全部一まとめにして、PCB は 1 つと考えるというスキームで行きますと 9 つです。蓄積性なしは 23 物質ですが、トリブチルスズや PTP? は環境中で分解するのでそれを除くと 15 物質。

三森：化審法から考えてみるということも必要ではないでしょうか。

井上：試験法の開発がきちんと動くか否かということはある物質で見ておく必要があります。

高月：化審法で引っ掛かるものは、新規化学物質であり、トン単位で生産されているものは少ないのではないのでしょうか。疑いのある内分泌かく乱物質で濃縮性のあるものはほとんど無いのではないのでしょうか。

井上：ここでは化学物質の選定の取り扱いのみを決めたい。

羽深：日化協に考えてもらって、選定した物質をもらい受けることにしようと思う。ハイスループットと *in vivo* がセットでないと難しいと考えています。

井上：この物質を **positive control** に入れると面白いのでは、あるいは **negative control** に入れると面白いのではという物質はないのでしょうか。日本独自の現場から出てくるハイスループットで白、黒、灰色にできるものを選択して欲しい。

羽深：ハイスループットは 2 つで 1 セットです。

住友化学工業・齊藤：入るのは 11 月末～12 月になります。

化学品検査協会・矢可部：10 月末に入ります。11 月初旬にハイスループットが作動しているのを見れると思います。

井上：では *in vivo* に移ります。

菅野：別紙 2, OECD の 11 月の会議に向けてバリデーションを実施しようとしています。OECD で Uterotrophic および Hershberger を実施しようとしています。Uterotrophic における問題点は、卵巣摘出動物を用いるのかあるいは未成熟動物を用いるのか、ラットかマウスかということです。Hershberger の問題点は、何週齢のラットを用いるのか、カストレーション後すぐに投与するのかあるいは 1 週間待つのか、カストレーションで精巣上体も取るのかということですが、いまのところバラバラなプロトコールが走りそうであります。

井上：ということは試験法の確率ということですね。菅野先生は、11 月まで各研究機関で実施する Hershberger の試験を統一したほうが良いと考えているのでしょうか。でも現在は試験結果にしても模索中なのでいろいろな試験を実施してみてその結果を比べないとの試験法がいいのか分からないのではないのでしょうか。用量の設定をいろいろな機関でオーバーラップさせると比較しやすいのではないのでしょうか。

高月：Uterotrophic assay は低用量の DES を 7 日間投与しています。経口で DES 投与 3 日間では膣開口は起きないが、DES でも膣開口に 4 日間必要で、対照群は約 33 日で膣開口する。

青山：二世世代繁殖試験では SD rat(チャールスリバー、SLC)、27 日齢で control 群に膣開口は起きない、平均で 30 日齢で膣開口となる。antiestrogen の投与ではもっと膣開口が遅れる。我々の研究所では、エストロゲンを投与して膣開口が合った日に屠殺し、体重および子宮重量を測定しています。膣開口があった日が性成熟の日と考えています。

化検協・佐藤：クロミフェンは *angiestrogen* ですが、高用量では *estrogen* 作用を示し、5 日間の投与で膣開口があります。

永井：膣開口と子宮重量はわけて考えたほうが良いと思います。膣開口は特異性のあるものです。子宮重量は 3 日間の投与で十分であると思います。

井上：未成熟動物に対する考え方の違いについて

山崎：膣開口と子宮重量とはわけて考えないといけないのではないのでしょうか。組織の反応の方が先で、子宮重量が増加するよりも膣開口の方が遅いのではないかと考えます。

青山：*immature* を用いた assay では 18 日齢の動物に 3 日間投与というのがある。

山崎：膣開口をいつ見るのかで結果は異なってくると思います。朝、昼、夜で観察した時間帯でも異なる。夜に見過ごして、翌朝膣開口をチェックしたとすると 1 日ずれたことになります。

組織も同時に見た人がいないのでそこから始めないといけないのではないのでしょうか。

現在我々の研究所では、DES 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ できたので？追試をしています。公比 10 で、0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ○○・・・。

高月：OECD のプロトコールには膣開口もいれてある。

矢可部：我々の研究所では、OVX 動物でのデータがよくなかったので未成熟動物を用いた試験法に進みたいと考えています。物質の投与を 1 日 1 回にするのかあるいは 2 回が良いのか。投

与経路は経口あるいは皮下投与どちらにするのか。いろいろな問題があります。

菅野：Sensitivity の問題で知見のあるかたはいらっしゃいますか。

井上：量的な問題とクオリティの問題があるようですね。未成熟動物と卵巣摘出動物で sensitivity の有るほうが良い人がいる？。ラットの方はマウスに比してばらつきが有るとい人もいます。Hershberger についてはいかがですか。

菅野：我々の研究所ではテストステロンを何にするのか。メチルテストステロン、BHT、テストステロンあるいは何にするか迷っているところです。投与経路は皮下を考えています。

高月：uterotrophic assay の投与経路は経口にしたいと考えています。

菅野：Hershberger の試験で各研究機関の先生方は何週齢の動物を購入しカストレーションを何週齢で実施するのかをお聞きした。

永井：カストレーション後すぐに投与するのか、あるいはカストレーション後 1 週間位してから投与するのかいろいろな系を試すしかないのではないのでしょうか。私が考えていますのは、カストレーション後未成熟動物は 2 週間、成熟動物は 1 週間おいてから投与したほうが良いと考えています。

高月：21 日齢でカストレーションし、28 日齢で投与開始が良いと思う。

菅野：我々は投与期間は 3、5、7 日をみたいと考えている。ここは調整するかかなさそう。

永井：少なくとも各研究機関で投与物質は揃えたほうが良いのではないのでしょうか。

アンドロゲン系を確立してから。

山崎：positive control のデータを持つてるヒトはいらっしゃいますでしょうか。フルタミドを考えていますが。

菅野：二世代の方も青山さんから説明をお願いいたします。

青山：日本で農薬についてのガイドラインが出来ましてこのプロトコールに従いまして農薬の内分泌かく乱物質があります。メトキシクロール、パラバラ DPD?どの項目が引っ掛かってくるのか。今回我々は、メトキシクロールのラットにおける繁殖毒性試験を計画しておりますのでそのプロトコールを御紹介いたします。

菅野：28 日間試験に関して、広瀬先生から説明をお願いいたします。

広瀬：まだスタートしていません。OECD に準じて実施しようと考えております。一般には 3 用量ですが、ここにもう 1 用量追加したいと思っています。化学物質に関してはヒトへの暴露量に近いものを暴露していきたいと思えます。また、物質によっては用量設定が取れないものが出てくる可能性が有ります。低容量を試験に入れた理由は、マスコミが低容量で何か影響が出るのではないかと疑心しているので追加しました。28 日試験での化学物質は uterotrophic および hershberger に準じた物質を使用したいと考えています。フルタミド、エチルテストステロンなど。甲状腺の系は今回は 5 物質しか出来ないということで除外しました。投与経路は diet にしていきたいが in utero の関連で強制経口を採用したい。しかし、ラットへの強制経口投与はストレスがかかるのでホルモン系には大丈夫であろうかと思案しているところです。血中ホルモンの測定は、採決時にどれだけ動物が静止していたかで変動する。午前 8~10 の間に測定する

ようにプロトコールには書いてあるがはたして実現可能であるかも問題です。また、屠殺前に動物を一晩絶食させるのか否かもまだ確定されていないところです。

井上：407 のガイドラインではどのようになっているのでしょうか。

高月：407 についてはどの研究機関からも出てきてません。

広瀬：今回我々はこの試験で OECD に積極的に何かするつもりは有りません。407 は強制経口にする可能性が高いようですがそれがかまいません。

井上：次の会議の日程はどう致しましょうか。

山本（通産省）：データを付け合わせて他の省庁の方とも調整を取りたいので早いほうが良い。OECD 対応の話をするのは菅野斑だけ出よいのでしょうか。また、他のヒトにも集まってもらったほうが良いのでしょうか。

井上：OECD にブレーキをかけることは出来るのか。ブレーキをかけたとしても問題は OECD の全部の日程がずれてしまうことです。このままでは OECD は今回の斑会議で出たような細かなところまでの問題点は煮詰めていないのでわれわれがブレーキをかけないとこのままで OECD のプロトコールが通過してしまうでしょうね。

次回、第 2 回斑会議は 1998 年 11 月 2 日午後 1：30 からです。

以上

文責（松島・宮城）