

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2回菅野班議事録

日時：平成10年11月2日(月)午後1:00~5:00

場所：通産省別館902室

座長：井上 達

進行：菅野 純

事務：高月峰夫

出席者：24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)

今沢孝喜(国立医薬品食品衛生研究所)

梅村建夫(ボゾリサーチセンター)

江藤千純(財・化学品検査協会)

川崎 一(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)

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)

中井 誠(財・化学品検査協会)

長尾哲二(財・食品薬品安全センター)

中山 誠(厚生省)

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)

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)

米澤義堯(通商産業省)

米山隆浩(通産省)

菅野：開会挨拶

井上：座長挨拶

省庁から挨拶

羽深：OECD バリデーションのプロトコールについて日本からの指摘があれば積極的に日本からの案として検討したい。通産側としては、ハイスループットの操作を用いたデータを提出する。

山田：エストロゲン $\alpha$ レセプターについて検討しているが、MCF-7では2倍程度とあまり上昇せずこの試験系は適切ではないと考えられる。しかし、MCF-7には亜種もあるのでそちらでの検討を考えている。HeLa細胞でも検討を行っているが、のぞましい適切なクローンについては未だ検討中です。

羽深： $\alpha$ 、 $\beta$ など5種類について検討しているということですが、いつごろまでにデータが出てくるのか。

高月： $\alpha$ については11月中旬。残りも12月までにデータを出したい。現在は、HeLa細胞を中心に実施している。

山田：MCF7は2倍の上昇しか見られなかったので、アッセイには不十分と考える。HeLa細胞を用いた理由は、米国の場合 $\alpha$ および $\beta$ の両方をアッセイするというので検討しているが、 $\beta$ は弱いので、 $\alpha$ および $\beta$ を分けてアッセイしようという考えで、HeLa細胞に組み込んで試験しているが、現在目星が付きはじめた。

井上：今の御説明ですが、どこまでエクспレッション出来ているのか具体的に示していただかないと技術的には納得いかない。

羽深：前回の会議で、今回具体的なところを発表していただくことになっていたのですが、どうでしょうか。

井上：データとしてのものが具体的に示されないのでどう致しましょうか。HeLa細胞を用いたということは、方針転換ということ認めざるを得ないでしょう。Cell lineを変えたということで。

山田：MCF-7はこれは試験することに決まっているが、HeLa細胞については、ハイスループットの機械が12月に入ることになっているのでハイスループットを用いてセレクションすることになります。細胞に遺伝子を導入することはすでに出来ていますが、セレクションの方は、機械で行おうと思っているので。

井上；その場合、ラインは幾つ取れるのですか。何個しかけて、何ラインとれて、最終的に取れたのは何ラインで。エクспレッションはみていないにしても。

羽深：住友さんは、いま井上先生がおっしゃられた内容を12月25日の分科会で発表していただくのでその前に井上先生へペーパーで報告して下さい。

井上：活性は見ていないのですか。どのような形で増えているのかを報告していただきたい。ロボットで走らせて、セレクションをしていくということなのでそれについても報告していた

だきたい。

では、化学物質の選定ということについて話を進めます。

青山：エストロゲン作用のあるパラベンを入れたらどうでしょうか。

羽深：厚生省の方には未だお見せしていないのですが、通産省としての考え方は、米国 EPA 選定物質 75、CMA 選定予定物質 150 および構造活性相関を見るための物質をあわせて 350 物質選定する。これらの物質のサンプルは、日化協からの提供、市場から購入、米国から入手する事を考えている。米国とは、細胞交換も行い、物質もある程度ダブらせてその結果を比較検討してみたい。最終的には、in vitro での結果を in vivo に持って行って欲しいですね。もう少し、厚生省サイドと詰めていきたいが、日化協では、あつかえる物質であれば協力しようという姿勢です。入手には約 1 ヶ月くらいかかります。

通産資料の 3 頁目にありますように、通産省としては、10 年度補正は約 4.5 億円、これはプレスクリーニング試験法の開発とスクリーニング試験開発および OECD バリデーション試験の実施の予算です。2 次補正として 5 億円要求しています。これは in vivo のための予算で 15 ヶ月分です。

井上：厚生省サイドで何か御意見はありますか。

池田：リストの案が出ていないということであれば未だコメントすることは有りません。

井上：日本として物質の選定機序をどうしましょうか。

通産省から提案のあったリスト、衛研では関沢さんのリスト、EPA の 75 物質、CMA のサジェスションおよび化検協のリストがあります。ハイスループットが動くでしょうが、ハイスループットにかける物質にも順序が必要でしょうか？。タイムテーブルの問題もありますし。

高月：HTPS で 15000 づつ測定する手順は書いてあります。クライテリアとしてエストロゲン、アンドロゲンレセプターの方で、資料(Subject: Draft criteria for substances to be evaluated in the HTPS assay)に有りますように 7 つこれらを盛り込むかたちでやっていったほうが良いのではないのでしょうか。米国でやっている無機酸等は必要ないと思いますが。最終的には 270 位であるが、とても試験できそうもない物質もあるので現在セレクトしてリストを作成中です。150 物質のうち 75 を選択しています。これはオフィシャルにつかめています。EPA には 150 物質くらいあります。CMA のカテゴリーはこのリストを考えている。工業界の方であまり公にしたいくない、入れたくないという物質もありますのでそれらは調整しているところです。

井上：これらをどのように調整していきましょうか。12 月の初めまでに計画的にリストができればよいと思いますが。

羽深：本格的に試験が動くのは 1 月に入ってからなので、12 月にはリストを作っておきたい。最終的に決定するのは、厚生省サイドですけれども。

井上：この班の考え方としては、バリデーションのための試験として取るべきではないでしょうか。ハイスループットで出てきたデータは、一審判決さえ出ていないという考え方で。ハイスループットで出てきたデータは、たんなる証拠調べの予備データとして出すのが良いのか、あるいはいっさい公表しないのが良いのかはわかりかねますが。

青山：エストロゲンが必ず陽性にでる物質を第一候補として選定し、環境庁の 75 物質については、あまりこだわらなくとも良いのではないのでしょうか。パラベンは *in vivo* でも陽性に出ているので候補にしたい。

井上：12 月上旬には決める必要があるが、どのような手順が考えられるのでしょうか。

高月：化検協は、今月末までに考えたい。基本的には、将来、構造活性相関の比較に使える物質を選定したいと考えている。

井上：タイムテーブルはどうでしょうか。

高月：EPA のリストがいつ出てくるのかが問題です。ホームページにあるものは、正式なものではないのですよね。EPA のコアリストはあるが。

井上：ワーキンググループを作ってそこで検討してもらいましょう。ワーキンググループでは 12 月 25 日までに提案の準備をして欲しい。このワーキンググループはどうでしょうか。

羽深：高月先生、菅野先生、田中さん、私羽深の 4 人をコアにして、あとは化検協さん。

井上：HTPS についてはここまでにして、*uterotrophic assay* の *immature rat* 系、*OVX rat* 系、投与経路、試験系全体に対する位置づけについて御討議をお願いします。

菅野：*uterotrophic assay* を実施した機関は、衛研、安科研、食薬センターです。

永井：資料説明。*Immature* に比し、*OVX rat* のほうが感度が良い。3 日間投与よりも 5 日間の方が良い。

食薬：資料説明。

菅野：資料説明。*OVX* の方が数値的にも 3 倍くらい感度が良い。*Immature* はごく狭い 3~5 日くらいしか使えない系である。*Vaginal opening* と黄体の形成には、少しずれがあるようです。

井上：*immature* 系をどのように評価するか。あと投与経路について。ラットを生きた試験管としてとらえるのか、あるいは *in vivo* 系としてとらえるのかによって考え方が変わります。*Dose response* は *immature* 系でも 3 日間では大丈夫であるが、日が経つと *immature* 系では、できなくなるのですね。

永井：生後 28 日齢ではもう遅すぎます。*Immature* 系はとてもクリティカルである。18-20 日齢投与よりも 24-26 日齢投与の方が感度が良い。*BrdU* による RDS は感度が良い。

井上：*immature* 系は、ナローウインドウのところで実施しているデータということですね。*OVX* 系の方が 3 倍感度が良いが、3 日間の投与では、*OVX* の手間のいらぬ *immature* 系が良いということでしょうか。

*Histology* に関してはいかがでしょうか。

今井：*BrdU* に関しては、メリットは非常に高い。1 つのエンドポイントに加えるべきだと思える。*Immature* は *OVX* とコンパラティブなのでどちらでも良いと思う。

井上：*OVX* の方が、3 倍感度が良いので捨てがたいですね。日本としては、バリデーションをしたらある程度 *OVX* をするあるいは平行する方向で行ったらどうでしょうか。

山崎：DES の経口投与で、6 時間後の腸管と胃と血中の DES を測定したところ、腸管と胃内

の DES は振り切れるほど高かったのですが、血中にはほとんど行っていませんでした。これは DES が吸収されなかったためと考えられます。

井上：immature rat でも十分に検出可能。しかし、OVX は 3 倍感度が良い、長い期間投与可能、ウインドウが広いなど良い面がある。

永井：投与する日齢をどうするかという問題では、immature rat は 20 日齢以前の投与寄りも 20 日齢以降の投与感度が良い。しかし、25 日齢になるともう危ない。

菅野：エストロゲン投与による膣開口の反応は、子宮の反応よりも遅い。エストロゲン様物質の反応を見るのには、膣開口でみるよりも、子宮重量の方が感度が良い。

井上：そうですね。膣開口と子宮重量は別と考えるべきでしょう。経口と皮下投与の問題はどうでしょう。

永井：皮下投与に賛成します。経口は、吸収などの問題が出てきますし、皮下投与の方がその物質のポテンシャルを検出できる。次の F1 の問題も考えていかないといけない。

井上：皮下投与ということは、ラットを生きた試験管とする考え方です。

川崎：OECD は基本的には、経口投与です。一般の人が、ラットでの試験をテストチューブとして認識するかどうか、きちんと説明しないといけない。

井上：Immature 系を用いて投与したときは、一般の人は子供への暴露とかそのようなことを考えかねないので非生理的なすなわち生きた試験管的な方向へ持っていくとといけないが、そのような意味でも皮下投与の方が良いと思う。

永井：10 月 27 日付けでは、OECD は経口投与となっている。

菅野：経口と皮下投与では、感度に十倍ほどの差があることは、すでに明白です。試験管として実施するには、感度の良い皮下投与のほうが良いと思います。

羽深：その物質が *in vitro* では灰色でも *in vivo* で白黒を付けて欲しい。

川崎：皮下投与で実施したときに環境中のエストロゲンには、刺激性のあるものなど含まれているので、皮下に刺激を起こし、炎症性のサイトカインなどでエストロゲン様に反応がモデファイされる恐れがある。高次アッセイの時にまた経口投与になるならば同じことではないでしょうか。最初から皮下投与ではなく経口投与に持っていったほうが、二重手間を省けるのでは。

井上：ハイスループットでは、フォールスネガティブがよくでるのか良く分かっていないが、ハイスループットで陰性ならネガティブとするのが正しいと思う。しかし、次の過程の Uterotrophic assay をどのように位置づけるのか良いのでしょうか。Uterotrophic assay で陰性ならばどのように判断するのか。

高月：たとえばポリマーなど、環境エストロゲン様物質には溶けにくい物質がたくさん存在すると考えられますが、その場合皮下投与で大丈夫なのでしょうか。経口投与の方が良いのではないのでしょうか。

井上：そうですね。日本だけ皮下投与にするというわけには行かないでしょうね。

菅野：*in vivo* を実施した中で、一番高感度の方法で実施したとうスキームがよいのではないのでしょうか。*In vitro* はハイスループットしかないわけです。そのギャップと 407 をつなげる

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 HTTPS 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のでしょうか。

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 *hershberger* 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：去勢しなくとも大丈夫と思います。現在フタルマイド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に、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 *トソリュウラット* にアトラジン投与したときに、*dose response* はないのですが *トソリュウラット* 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しめますか。

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ね。

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。お見合いさせる性と性周期がそろお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のことなので、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ろ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に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えており、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やる。



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）にお願いします。

（文責：松島）