

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)

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 *uterotropic* 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行し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行していきたいと思う。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 $\mu$ g/kgでは大きな差はなかったが、30 $\mu$ g/kgでは影響があった。E2は1 $\mu$ g/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 $\mu$ g/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、投与期間に限られる。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 $\mu$ g/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うな事なのか？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 $\mu$ g/kg群の子宮重量はどのように変化するか。

永井：0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群は3日間投与では増加傾向にはあるが、5日間にする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 Cfi: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  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。子宮重量は、経口投与では、3 および 7 日間投与の 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群で増加が見られた。皮下投与では 3 日間投与の 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群、7 日間投与の 0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の群で増加が見られた。

DES は同様に immature Cfi: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  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群にのみ増加が見られた。

青山：膣開口があった場合スメアは採っていたのか。スメ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：スメアはみていない。EE2 0.06  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群で 1/6 匹に膣開口がみられた。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：卵巢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。

卵巢摘出 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、卵巢摘出ラットでは、0.001mg/kg(1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 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の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ね。

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いけない。

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いけない。

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：すでに体重増が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ものである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事に御意見は？

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。