

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6回 菅野班議事録

日時：平成11年01月27日(水) 午前10:00～12:30

場所：通商産業省別館833会議室

座長：井上 達

進行：菅野 純

事務：高月峰夫

出席者：16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)

内田康策(厚生省)

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)

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)

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)

米山隆浩(通産省)

(五十音順および敬称略)

井上：始めに内田課長から御挨拶を伺いたいと存じます。

内田課長：今回のこの uterotrophic の試験法を日本から発信出来るということは素晴らしいことだと思います。場の提供に関しては、最善を尽くすつもりです。

井上：御手元の資料は、先日2回の会議で discussion したものについて、各先生方が加藤先生にE-mailで送って下さったものを菅野先生も一緒にお手伝いして作成してくれたものです。

本日は、加藤先生がお見えでないので菅野先生にそのところを説明していただきたいと思えます。

菅野：御手元の資料は、最初の頁から 2 頁までが preface、3-7 頁が本文で、文中の算用数字のサフィックスがページの注釈で、ローマ数字が頁 8 以降にある文末脚注です。

では最初の summary of the preface から、The objectives of uterotrophic assay, both immature and/or mature with OVX is defined in the OECD framework in documents released from OECD office(Agenda Item 5 for Tokyo Meeting, especially its Purpose and Background, I.e. paragraph No.3)この paragraph No.3 はコピーしたものです。

井上：Agenda Item No.3 は我々の立場とは全く異なる identification を支援している。No.12 はエストロジェニックな活性をみているというように書いてある。全ての内分泌かく乱物質がこれらの試験をして分かるとはとんでもないと言っている。No.3 と No12 は矛盾する。

ここではそれを指摘します。

OECD は必ずしもテストメソッドで disruptor が分かるとは考えていない。Explanation of background は基本的には先日お話ししたことを示している。（井上先生が以下の文章を翻訳される）

OECD/EDTA has been seeking possible testing system, which enable endocrine disrupting chemicals in terms of their hazard identification. Among the documents globally assigned for possible methods identifying endocrine disruptors had released for collecting general comments, and, currently, three methods have been selected and discussed for global validation studies. The Uterotrophic Assay which is considered as suitable for the screening of chemicals which disrupt the sex hormone system in the OECD Detailed Review Paper on the appraisal of Test Methods for Sex Hormonal Disrupting Chemicals. The assay is also recommended by the US EDSTC.

Tokyo Meeting for the Validation Management meeting is supposed to finalize the protocol for second step to the tripartite validation studies.

However, there seems to be a bit of confusions in characterizing the method, i.e. aim of the methods. This may probably because of uncertainty in understanding of the following state of arts.

井上：方法については？資料の頁 3, 4, 5, 6 の頭までですね。

菅野：資料 3 頁の 2. の A とありますが、B の項目がないので A という記載は消して下さい。項目としては、INTRDUCTION, PURPOSE, SCOPE, RELEVANCE, APPLICATION AND LIMITO OF TEST と Definition と Experimental animals と Test Conditions があります。サブタイトルはイタリックで記載しています。頁 5 の表ですがこれを最終的にはプロトコールに追加すべきかどうかは検討中です。表の注釈 1 は子宮重量が 150%まで上昇するところをみると言う意味、こらはエストロゲンのアゴニストをみるための子宮重量増加分です。LOEL が

150%に当たると考えています。振り切れる量の positive control ではありません。この説明は、iii です。

iii)The positive control dosage of E2 should be high enough to be significantly detected and low enough to assure the sensitivity of the test system. To satisfy both issues the positive control level should be set close to lowest observed effect level(LOEL) in this test system. According to the experiences obtained in literature and/or experiment. The LOEL of E2 with clear statistical significance is commonly observed at the uterine weight of 150% of the concurrent untreated control.

川崎：有意差検定ででなければ棄却するということでしょうか。

菅野：そうです。動物数が足りないために有意差がでないときは、動物数を増やすなどの処置をする。N=6 ででるとはおもいますが。

永井：対照群に対して 50%の子宮重量の増加というのはかなり緩めの数字と思う。

菅野：エストロゲンを多量に投与して反応するというのではなく、対照群を 100%としたとき 150%位のところを positive にしよう言う試みです。もちろんある程度までエストロゲンの量を上げれば其処から先の子宮重量はプラトーに達すると考えられる。経験上では N=6 で 150%の子宮重量増加となる E2 は $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ です。正しく実験が行われていればこのこの量で 150%くらいの上昇となります。しかし、ラットの系が変われば値も変わるかもしれませんが、我々のデータはそれを持っていないのでSD以外の系については分かりません。

青山：注釈 2 は 200%としているが、気持ちとしては 200%よりも低いところを取りたい。

菅野：LOELがある程度保証されているところという点でこの様にしたのです。

川崎：150%と規定すると実験がやりにくくなるのではないのでしょうか。私としては有意差がでるということが大切なのであり、ですから有意差のところでよいのではないか。

永井：150%という数字で規定することは厳しいですね。

菅野：では約 150%とするということでは？

長尾：ここに数字が出てくると実験がやりにくい。

菅野：200%とともにこのところは本当は絡んでいるので、150%と 200%をペアで表現しないとまずいのでそのような数字が出てきたのです。

青山：相対的な表現をとったらどうでしょう。

川崎：子宮重量増加はストレインでどの程度の差があるのでしょうか。ストレインにより差がないのであればが chemical の量で決めははどうでしょう。

菅野：そのところは、わざと避けてきたのですが。

川崎：子宮重量増加というのはデリケートなのでシーズンなどによっても変わってくると思うので何%上昇というように数字を限定してしまふのはまずいのでは。

井上：上限は、子宮重量がプラトーに達しない量で、かつ上昇度有意にみられるが有意にみられる高い濃度、下限は、対照群からの増加が有意にみられかつ上限よりも十分に低い濃度とい

うように抽象化してみてもいいですか。

松尾：普通はエストロゲンを投与すると 400%くらいまで上昇してしまいますよね。アンタゴニストの場合は活性がコントロールできる。

菅野：子宮重量が 200%の上昇というのは、無反応量とプラトーに達する量の中間位になるように考えたのですが。2 用量の設定をするときには、まず最初に高い濃度を決めて、次に低い用量を決めるということでしょうか。Low dose は対照群に比し上昇がみられるが十分に上昇がみられる量よりは低い用量ということですね。

頁 5 の 17β -estradiol should be the positive control substance. Other estrogen may be served as positive control material with scientific rationale. は追加した文章です。

頁 5 の administration は administration of test chemicals に直して下さい。

次に頁 6 の Dose level について。もし in vitro で IC50 が分かっているときには、式としては、 $a \times [\text{IC50 of test chemical}] / [\text{IC50 of E2}] \times 100$ or 1000 からスタートし公比 10 で 3 つ 4 つと用量を下げる。IC50 が分かっていないときには MTD で皮下投与の場合は 100mg/kg を、経口投与の場合は 1000mg/kg を上限とする。

次に measurement of endpoints について。子宮重量の with and without uterin fluid という書き方は、OECD とは異なるが、両方測定するというを明記するために with と without とした。Body weight も OECD では should be となっていたが、一般毒性をみることは重要なので must be に入れた。Toxicity indicators の food consumption は山田先生は明記してこられたが、これはどうでしょうか。

川崎：飼料測定まで入れるのは実験する側としては大変ですし、体重も飼料摂取量も減少するような用量では実験しても意味がないわけで、その項目は入れなくとも差し支えないのではないのでしょうか。

菅野：では food consumption を must be から抜きます。

川崎：頁 6 の Measurement of endpoints についてですが、toxicity indicator そのものを must be measured として入れるのは難しいと思います。Toxicity indicator を clinical observation と名目を変更し、clinical observation の other として toxicity indicator は should be あるいは recommended としてはどうでしょうか。

菅野：頁 6 の The followings should be measure: HE stained histology of vagina and uterine の uterine を uterus に直して下さい。この HE の histology は should be を排除して、recommended へ格下げします。

頁 6 の 3 DATA AND REPORTING は新しく追加した項目です。

川崎：全体のことですが、頁 1 の PREFACE も introduction に入れるべきではないでしょうか。更に、頁 3 の method の INTRDUCTION, PURPOSE, SCOPE, RELAEVANCE, APPLICATION AND LIMITO OF TEST と DEFINITION も method の項目に入れるべきではないのでしょうか。OECD に合わせた型で入れないといけないのではないかな。

菅野：頁 4 の Housing and feeding condition の a) Ovariectomized method:

Overiectomized は新しく追加した項目です。卵巣摘出が完全になされたか否かの見極めないといけない。つまり、性周期 cycling が止まっているのがみれないといけない。EDSTAC を参考にした。屠殺前に卵巣摘出が完全になされているかいなか見極めるのに感度がよいのは vaginal smear みること。

高月：頁 4 と頁 6 に dose levels が両方に入っているので統一すること。

井上：頁 8、9 の文章はいらぬですね。では、次の問題に移ります。

羽深：川崎先生業界側としては何かありますか。

井上：問題は、プラクティカルにここで確認してもデータが一人歩きすれば同じことですね。

Uterotrophic assay で陽性となったものが、内分泌かく乱物質とどのように関わってくるのか。

ゆくゆくはバッテリー試験の方針を決めるときに重要なデータとなる。将来の assesment に重要なデータとなるでしょうがしかし、negative のものは理論問題として不明である。Negative については大丈夫という位置づけができると思うが。ある物質を投与して子宮重量が増加したということは、女性ホルモン系に何らかの作用をしたと考えられる。

羽深：子宮重量が増加したとき一般の人に説明するのにどのように説明したら良いのでしょうか？ホルモン系に作用するあるいはホルモン作用がある？どちらなのでしょう。

井上：uterotrophic assay で子宮重量が増加したことに対して、次のように合意しています。。

The uterotrophic assay may effectively identify those chemicals that bind to estrogen receptor. Taking recent discussion within OECD framework into consideration, it is, however, appropriate to understand that such chemicals should not be regarded as an endocrine disruptor based solely on the result of the method herein defined. Namely, the description appeared in the document that reads "the method is suitable to define endocrine disruptor" is actually implemented as the following clause.

しかし、これだけでは内分泌かく乱物質と見なすことは出来ないと表現しています。

また、レセプターメディエーターでないのに子宮重量が増加する物質に対しては個別に取り扱わないといけない。

DES など強いエストロゲン作用を有する物質に関してはなにも新しい試験系を考える必要はなく、従来の方法でいくらかでも検出できる。我々が頭を悩ませているのは弱い内分泌かく乱物質を引っ掛ける新しい試験系をみようとするものである。

エストロゲンレセプター、アンドロゲンレセプター、サイロイドホルモンレセプターをターゲットとした反応系はあるが、それらと内分泌かく乱物質は別問題であるといっている。この中に、内分泌かく乱物質が存在する可能性は高いが、Negative については内分泌かく乱物質を見落とす可能性は少ないと思う。

川崎：プロトコールで確認したいが、ナガティブの結果の評価をどうするのか。

高月：テストガイドラインとなったときにそのことについて書いてはいたがでしょうか。今は書かなくとも良いと思う。

川崎：フォールスポジティブを除外する手だてを入れておきたい。

菅野：頁 6 の dose level について説明する。

川崎：問題は MTD の定義をどのようにきめるのか？ Toxic でなくとも何かサインをきめて、例えば体重の増加が、10%落ちた用量が除外するとかというように、単純に決めても良いのではないか。

井上：In vitro のデータがない物質については、MTD でスタートするしか仕方ないのでしょうが、その毒性が、体重増加抑制のみとは考えられないわけでした。

川崎：MTD から換算した最高用量をどのようにしたら良いのかとの議論のみ残りますね。

井上：この場で決着を付けることは難しいですね。

菅野：では、この資料を編集記録が残る形で OECD から送られてきたものに revision としてインコーポレートします。OECD の Lesley Onyon へ出すデットラインは今週一杯です。

井上：今後の会議にのぞむにあたってあとは 4 省庁のものがありますね。

中山：Uterotrophic assay の技術者レベルの会議のことでしょうか。それは 2 月 3 日午後、環境、農水、通産、厚生 の 4 省庁の会議がありそこでの話し合いをもって、2 月 8 日からの OECD の会議に望みたい。2 月 12 日にラボの代表者が集まって技術的な話し合いをもつが、どのメンバーが出席するのかは未だ連絡が入っていない。

川崎：日本がリードラボという立場であるのですが、日本で開催されるので日本の研究者のみが沢山参加して、国外の参加者が少ないというのは問題ではないか。

中山：2 月 12 日の会議は説明会に近いものとなると思う。

井上：この背景には日本が補正予算の関係で先走らないといけない、国外の研究者が同時にスタート出来ないのは仕方がないと思う。レスリーオニオンにも説明する立場にあるが、彼女は 2 月 10 日には帰国してしまう。とすると誰が吸収体となるのか？ Uterotrophic assay は日本がリードカントリーということには間違いはない。5 月か 6 月に国際シンポジウムを日本でやってもかまわない。あとでついてくるバリデーションに手直しがあっても仕方がないことである。そうしないと国外のラボと整合性が成り立たないのではないか。データとして目鼻がついたところで国際シンポジウムを開催してみましようか。

川崎：国外のヒトを呼ばなくても良いとは思いますが、日本できちんとしたプロトコールを作ればすむことでは。

井上：OECD では日本がどのように進めているのか、また問題点を把握したいといっている。

中山：2 月 12 日の会議は国外のラボの参加者があるか否かは聞いていない。レスリーさんからの連絡も未だ入っていない。日本のラボが集まり、そこに OECD の人たちが見守るというように聞いています。

井上：オニオンさんに日本は uterotrophic assay をこのようにするのを OECD 関係者のみに聞いてもらうという位置づけだと伺っている。

羽深：2 月 12 日の会議は OECD の pre validation という位置づけでして欲しい。OECD の中でやっているということで日本が勝手に走っているという印象では困る。

井上：2 月 8, 9, 10 日に決定されることは OECD そのもののプロトコールとなる。2 月 12 日

に OECD のメンバーが同席することで 8、9、10 日に決定したある枠は越えられないが、12 日の会議でも対処できる面はある。

高月：サンプルの提案は出来るのか？

井上：提案されるサンプルは、Uterotrophic assay だけでないのでアシュビーの延長線上で考えないといけない。

羽深：物質を何にするかを含めて議論しないといけないのではないか。

井上：決定した物質について TNO にストック出来るかどうか。われわれは、TNO から購入することになる。

羽深：マネージメントコミッティで決めてもらわないといけない。でないと pre validation ができない。

井上：2月8、9、10日の会議で物質が決まると考えています。。

羽深：Chemical は 407 などを全部含めたものを提案するのか、それとも uterotrophic assay のみのものを提案するのか。

井上：誰がどの物質を試験するのも含めて国内ではすでに決まっています。後ほど関係者のかた資料を配付いたします。

(文責：松島、宮城)