

OECD/EDTA 第4回 VMG Mammalian 会合報告書案<sup>1</sup> (概要仮訳)

平成15年5月13日  
厚生労働省  
化学物質安全対策室

**今後求められるアクション**

EDTA 及び WNT は、以下の事項を行うことが懇請される。

- ① 子宮肥大、ハーシュバーガー及び改訂407のバリデーション・プログラムの進捗状況をテイクノートすること、
- ② 子宮肥大、ハーシュバーガー及び改訂407に関する、VMG-Mammalian による決定及び勧告について、レビューをし、討議し、承認すること、
- ③ 内分泌かく乱に関連した、試験計画、評価、及び試験結果を加盟各国が共有するための OECD ウェブサイトと手続きについて、進捗状況をノートすること、
- ④ 甲状腺ホルモンかく乱のスクリーニングに関連した、哺乳類及び生態毒性の分野における様々なアッセイの開発に関する討議結果をノートすること、及び
- ⑤ 適切な場合には、勧告を行い、更なるアクションをとること。

**子宮肥大試験**

- ・ 第二相バリデーション報告書を全会一致で承認した。
- ・ 試験の妥当性と信頼性を検証するための実験作業や統計解析は、もう必要ないことを確認した。
- ・ 以上の承認事項と関連文書を EDTA に提出し承認を得るよう勧告した。
- ・ ピアレビュー委員会の手続を承認し、EDTA において検討するよう勧告した。
- ・ マウスによる場合の妥当性について、日本からエチニルエストラジオールについてのラットとマウスの比較データが提出され、特に弱いアゴニストについての試験所内及び試験所間の再現性について議論され、結果、日本による実験作業は全ての面をカバーしているとの点で合意がなされた。日本に対し、全体のデータを、ピアレビュー手続きに付しうるようパッケージとしてとりまとめるよう指示がなされた。

<sup>1</sup>) ENV/JM/TG/EDTA/RD(2003)11 をもとに作成。

**ハーシュバーガー試験**

- ・ 子宮肥大試験と同様、背景精査文書（BRD）を作成することとされ、その骨子を承認した。BRD 作成にあたり米国から資金提供が表明された。著名な生殖発生毒性学者であるアール・グレイとシェリー・タイルが BRD の初期著者となる見込み。
- ・ 日本において実施された第二相バリデーション結果が、リードラボである CERI 山崎氏より発表された。
- ・ 日本以外の9の試験所にて実施中の第二相バリデーションの進捗が報告され、残るデータを5月末までに提出することとされた。
- ・ さらに3つの分野（①再現性を示すか否か確認するため無作為割付による試験を行うこと、②陰性物質を用いて期待された擬陽性の率を呈するかを確認すること、③去勢を行わない、思春期前の離乳したての雄を用いた試験を行うこと）の実施が勧告された。
- ・ 前期③に関し、ジョン・アシュビー氏が離乳したての雄を用いた第一相及び第二相のデータを発表し、去勢された雄のデータと同等であることが確認された。
- ・ 対象組織の削減について討議されたが、第三相においても5つの臓器全てを維持していくこととされた。
- ・ 以上、第三相に係る勧告をEDTAに付することとされた。

**改訂407試験**

- ・ 13試験所において10物質について実施された第二相バリデーション結果の全てが報告された。死亡率及び体重、血液及び臨床上の測定と観察項目、臓器及び組織の絶対重量及び相対重量、甲状腺ホルモン分析、ならびに精子数と奇形データといったパラメータ/エンドポイントについて、報告書がとりまとめられた。
- ・ 欧州の化学工業会より、細胞病理学的知見を精査するためのリソースがOECD事務局に提供された。5月24日（EDTA7の直後）に小会合を開催し、データのグルーピングと報告書様式についての提案を行う予定。

## 甲状腺スクリーニング

- ・ 哺乳類のアッセイと生態アッセイがともに甲状腺毒性をスクリーンしようとしていることが取り上げられ、①既存のデータのレビューを行い作業の重複を避けること、②試験開発者はなるべく同一の化学物質について作業を行い結果を比較できるように努め、既知の甲状腺作用をカバーしうる試験系によることを推奨した。
- ・ 甲状腺スクリーニングを開発する取組みについて、VMG-Mammalian に情報提供すべきこととされた。
- ・ 米国が、本国での承認を受けてとの前提で、開発中の甲状腺アッセイに関する詳細精査文書（DRP）の起草を申し出た。このDRPは、in vitro、in vivo とあらゆるアッセイが盛り込まれ、相互比較ができるよう配慮される見込み。

## 作業の共有化

- ・ 東京でのEDTA6において、各国の作業成果に係る情報の共有のためにウェブサイトを開設することが同意されたことを受け、事務局よりウェブサイトのデモンストレーションが行われ、VMG-Mammalian から承認を受けた。
- ・ このウェブサイトに掲載されるべき文書についての公式なクライテリアは存在しないことから、事務局より、各国が掲載文書を提出するにあたってのテンプレートを冒頭頁に用意したことが発表された。
- ・ 類似の活動がECにおいてもなされていることから事務局がECにあたることとされた。

## その他

- ・ （従来の生殖発生毒性試験系よりも）乳幼児期の暴露期間を延長することにより、思春期における事象と生殖に係る成長について補足的データを提供するものと思われる。
- ・ さらに観察期間を延長することにより、雌雄双方において、性的老化といった点にも対応しうることが期待される。
- ・ スイス及び米国は、類似または関連の論議ないし実験が行われているとした。例えば米国では、二世代生殖発生毒性試験での動物数を増やし21日齢後も継続することにより抗アンドロゲン作用の感受性に関する懸念に対処しようとしている。
- ・ 会合では、新たな生殖発生毒性試験の開発と検証について、次期EDTAにおいて討議されるべきであることについて合意した。）

（了）

## 内分泌かく乱化学物質の拡張試験スキーム

## はじめに

厚生労働省では、内分泌かく乱性を検討する必要がある数万種の対象化合物について、ホルモン活性に焦点を置いたスクリーニング手法の開発と確立を進め、もって、詳細試験に資する優先リストの作成を進めると同時に、詳細試験の開発を併行して行うこととした。

## 拡張試験スキーム (図1)

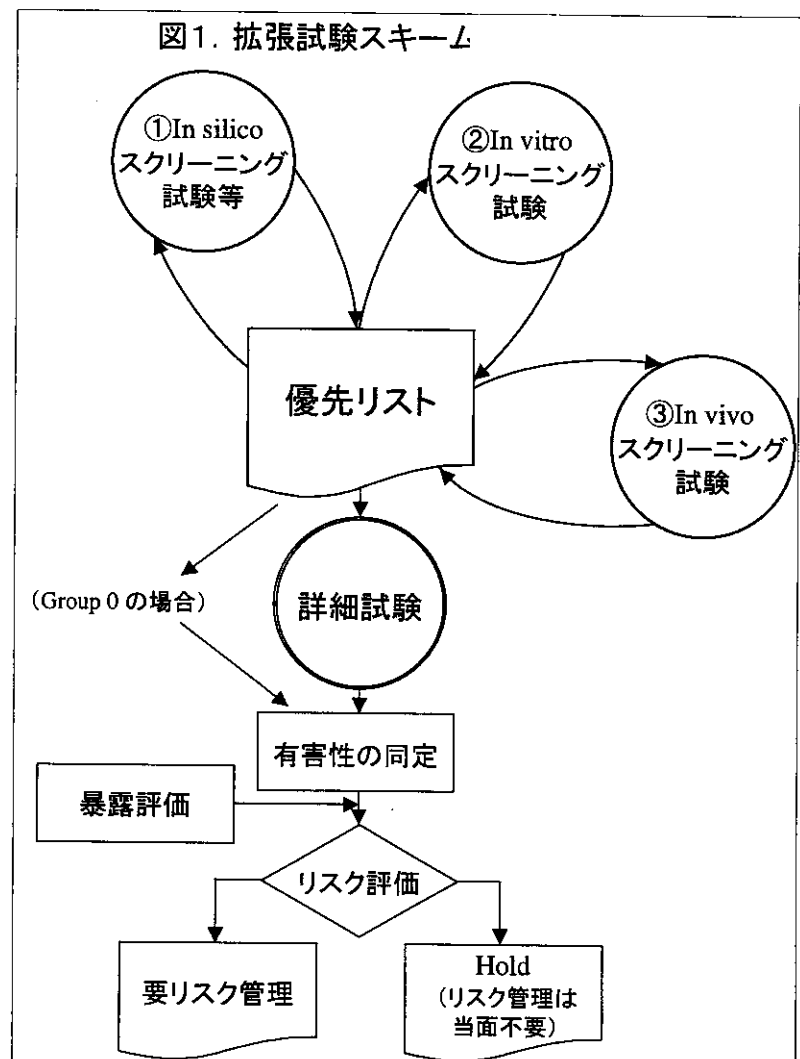
## スクリーニング試験

① 第一の「受容体分子への結合性」を検討するスクリーニング試験法には、*in silico*による3次元構造活性相関 (SAR) 手法を置く。

② 次の、「ホルモン受容体依存性蛋白合成誘導」を検討するスクリーニング試験法には、ヒト由来培養細胞を用いたレポーター遺伝子試験法を置く。

③ さらに、上記の①*in silico*及び②*in vitro*の系において認定されたホルモン活性が実際の生体内において発揮されるか否かを検討する*in vivo*スクリーニング系には、エストロゲン様作用を発揮する化合物に関する試験系として子宮肥大試験、アンドロゲン様物質に関する試験系としてハーシュバーガー試験を置く。

これらのスクリーニング手法を階層的に適応することにより、数万種類の検討対象化学物質のホルモン活性を順次調べることが可能で、その結果を基に、詳細試験に資すべき物質の優先リストが提供される。



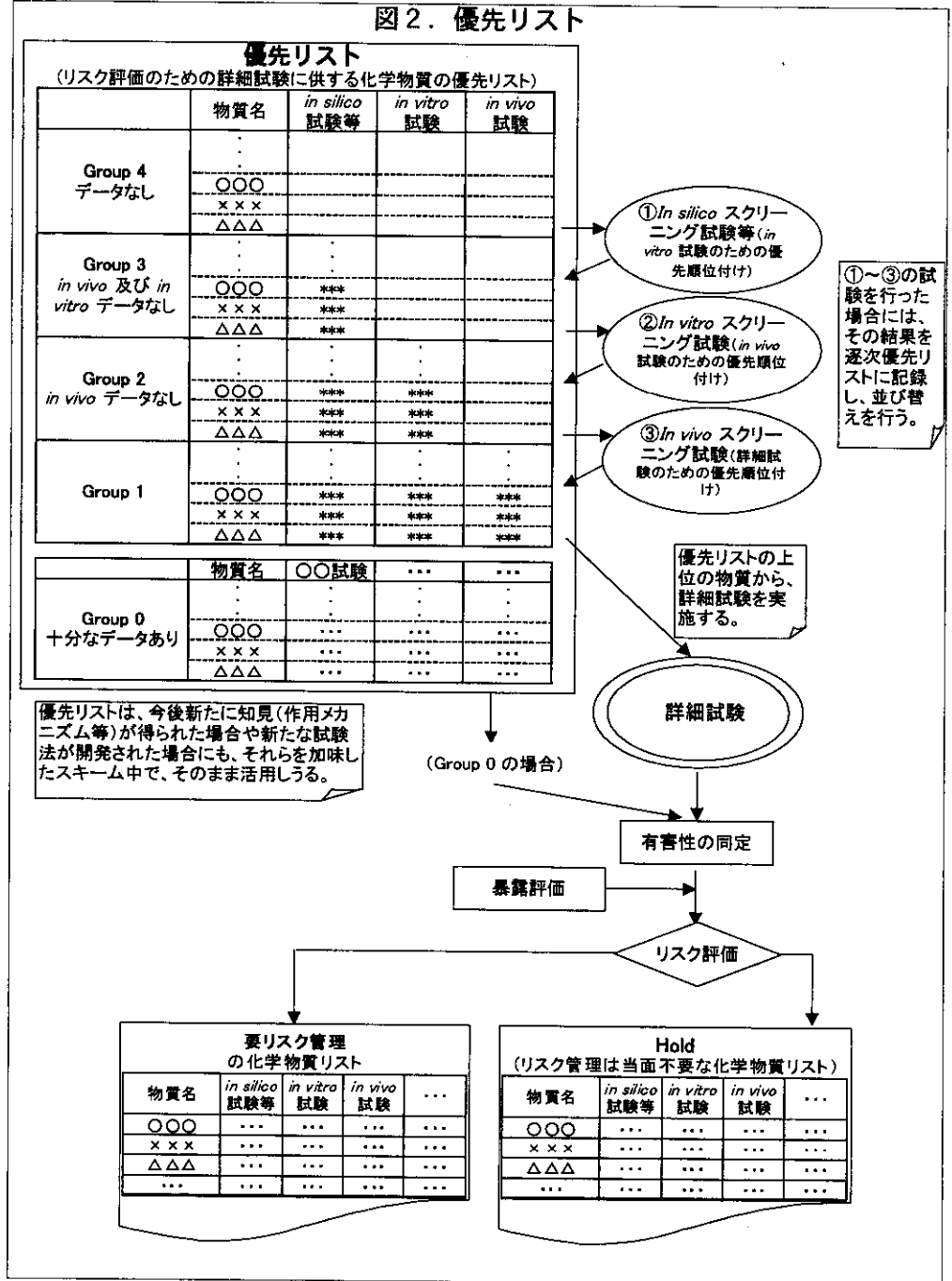
「優先リスト」(リスク評価のための詳細試験に供する化学物質の優先リスト)

優先リスト内(図2)では、新しい情報やスクリーニング試験結果が得られた化合物が、逐次順位再評価を受け、それに見合った位置へ移動(ホルモン活性が強い結果が得られると上位に移動し、弱い結果が得られれば、下位に移動)されることにより時間とともに、その内部構造が成熟していく。

優先リスト上位の化合物から逐次、詳細試験を行い、有害性評価、暴露評価を経て、リスク評価を行い、「要リスク管理」物質および「リスク管理は当面不要」物質にふり分けられ、後者については新たな科学的知見により再評価が必要となるまで、暫定的にholdされる。

例外として、農薬等、多世代試験などの大型詳細試験がすでに実施されている物質については、そのデータが内分泌かく乱性の評価に十分であると考えられた場合について、直ちに有害性評価、暴露評価、リスク評価へと進むことができる。

詳細試験



詳細試験に関しては、従来の多世代繁殖毒性試験の限界を認識し、その改良を含む、試験法開発を 2005 年を目標に進めている。その中には、従前の肉眼・組織形態所見のほか、遺伝子発現情報を駆使する手法も取り入れる試みがなされている。

(了)

## 「げっ歯類一生涯試験」について

**1 考え方**

内分泌かく乱化学物質による生体影響の検討は、従来、生殖毒性にその焦点が置かれてきた。しかし、低用量問題や遅発影響の検討が進むにつれ、内分泌かく乱化学物質の有害作用は、個体の発生、成長、成熟、老化に関わる広範なものであることが示唆されることとなった。この様な背景からは、従来の多世代試験に代表される生殖毒性試験の改良を進める立場を発展的に解消し、さらに拡大して、上記の生物個体の一生涯を対象とした、毒性試験という立場から内分泌かく乱化学物質の毒性評価を進める立場を提案するに至った。この様な立場に立つ利点は、

- ① 受精前後から死に至るまでの期間をカバーすることを念頭に置いた上で、 unnecessaryな部分を切り取る作業を行うことで、漏れのないプロトコルを作成する。
- ② 生殖毒性に捕らわれず、神経系、内分泌生殖系その他、免疫系、それら個々および相互連携の発達と老化など、あらゆるものを考慮した上で、必要十分な実質実験プロトコルを開発する、という点が上げられる。

**2 プロトコル案（概要）**

本プロトコルは、概念整理の段階であるが、概要として以下のような点が提案される。

- ① 実験期間は最長で受精前（交配前）から死までの単一世代とし、一生涯を概念的にカバーする、
- ② 従来の生殖毒性試験およびその改良試験において実施されている検査項目の実施（取舍選択はあり得る）；（リッターサイズ（同腹仔数規模）、性比、肛門生殖突起間距離、身体発育、繁殖能力、乳頭遺残、膣開口、包皮分離、性周期モニター、精子数、等）
- ③ 神経学的検索（行動異常など）を、初期（環境省の改良一世代試験で採用されている17週まで）に加えて、26週以降を目安とした神経学的検索、記憶や学習の能力に関する検討（老化の観点から）（Cf. Ref I）
- ④ 幼若、成熟および老齢期における免疫能の測定（液性免疫、細胞性免疫）（Cf. Ref II）

- ⑤ げっ歯類における生殖内分泌系の老化現象としての常時発情 (persistent estrus) 等の現象の早期発来がモニターできる期間 (離乳後数カ月) は必要(Cf. Ref III)
- ⑥ その他、前立腺形成阻害・過形成、等を考慮する可能性あり

### 3 確定試験として提案されている各般の試験系との相違点

上記の概要に示すごとく、①検討対象を生殖能や生殖器形成・発達などの生殖器系への影響のみに限定しないこと、②ある特定の発達時期に限定せず、広く成熟、老化の過程までを考慮すること、という点が強調される。

- (1) IUL 試験: **Rodent in utero through Lactation Assay** とは、経胎盤暴露 (胎生6日前後) から離乳 (生後20前後) まで、被検物質を投与し、生殖毒性関連の所見 (着床痕などを含む)、F1については、胎生期のミューラー管、ウォルフ管などの形成、生殖器発達、乳頭遺残、膈開口などの性成熟指標、血清中のT3, T4, TSH, 17 $\beta$ -エストラジオール、テストステロン等のホルモン測定などを、経時的に追う(Cf. RefIV)。
- (2) 思春期アッセイ: 米国環境保護庁 (EPA) において検討されている無処置げっ歯類動物を用いた内分泌かく乱化学物質有害性検討試験であり、エストロゲン系、アンドロゲン系、甲状腺ホルモン系等に関連する検査項目を挙げている。成熟動物を用いたOECDのTG407との比較が時としてなされる。現在のところ、どちらも陽性対象物質に対する応答性を含め、ホルモン影響が観測されにくいとされる。米国EPAでは、以下の3試験をスクリーニング法の代替法として検討している。
- ・ **Rodent 20-day Pubertal Male Assay with Thyroid**
  - ・ **Placental aromatase**
  - ・ **Rodent in utero through Lactation Assay**
- (3) TG415/416の改訂: 内分泌かく乱化学物質問題が大きく取り上げられる前に、多世代繁殖試験の改訂がOECDで行われた。それが最終的に採択される時期にちょうど、内分泌かく乱化学物質問題が表面化した。これを考慮すると、採択が著しく遅れるため、その時点での合意内容に従って採択されたという経緯がある。したがって、現行の新TG415/416は特段の配慮が内分泌かく乱化学物質問題に対してなされているわけではない。その為に、農林水産省では更に新TG415/416に手を加えて、内分泌かく乱化学物質問題に対応すべく検討を進めている。

#### 4 OECD、各国の反応

さる4月15日、パリのOECD本部で開かれた、OECD哺乳綱動物バリデーション運営委員会 (VMG-mammalian) において、別紙により、げっ歯類一生涯試験プロトコールの発表がなされた。各国等からの次のようなコメントがあった。

- ・**免疫毒性学的意義**： 免疫毒性学的に、胎生・新生児期に曝露された影響が免疫系に異常をきたすことがあることが知られるようになってきている。観察期間の延長によってこれが調べられる。従ってたいへん意義のある試験トライアルだと思う（蘭）
- ・**プロトコールへの質問**： 投与期間が鍵だと思うが、どのくらいに設定するのか？ 交配期間はどのくらいに設定するのか？ どんな化学物質で進めようとしているのか？ 他の国のグループが共同で行う際の参考のために発表して欲しい（OECD事務局）
- ・**二世世代試験との関係**： 二世世代試験に較べて短いのはよい（丁）。二世世代試験と較べて予想される結果の違いなど実験結果を挙げて示して欲しい。二世世代の一部に同様の設定を試みており、重大な関心がある（米）

OECD事務局作成の議事概要 (ENV/JM/TG/EDTA/RD(2003)11: 25-apr-2003) において、次のようにまとめられている。

- （従来の生殖発生毒性試験系よりも）乳幼児期の曝露期間を延長することにより、思春期における事象と生殖に係る成長について補足的データを提供するものと思われる。
- さらに観察期間を延長することにより、雌雄双方において、性的老化といった点にも対応しうることが期待される。
- スイス及び米国は、類似または関連の論議ないし実験が行われているとした。例えば米国では、二世世代生殖発生毒性試験での動物数を増やし21日齢後も継続することにより抗アンドロゲン作用の感受性に関する懸念に対処しようとしている。
- 会合では、新たな生殖発生毒性試験の開発と検証について、次期EDTAにおいて討議されるべきであることについて合意した。）



(別紙)

OECD/VMG-Mammalian 資料

Proposal of a conceptual protocol of “One life-span assay of rodents” for endocrine disruptor testing

Jun Kanno, MD, PhD, Cellular and Molecular Toxicology Division, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan.

This conceptual protocol has first been proposed to “The EDC researchers meeting of Joint METI/MHLW EDC researchers with observers from MAFF and MOE, and adopted by MHLW EDC Research Group “Imai-Group II (2002-2004)” entitled “Study on establishment of test methods for identification of endocrine disruption by chemical substances” grant No.H13-SEIKATSU-012 by MHLW, Japan, Project Leader: Kiyoshi Imai, PhD, Food and Drug Safety Center, Kanagawa / Anpyo Center, Shizuoka, Japan

MHLW has been developing a screening/testing strategy for endocrine disrupting chemicals, which consists of screening methods such as *in silico* virtual screening (Docking Model SAR), *Hela*-based reporter gene assay, and uterotrophic assay to generate a prioritized chemical lists for the next “testing” stage for identification of potency and extent of adverse effects caused by endocrine disruption.

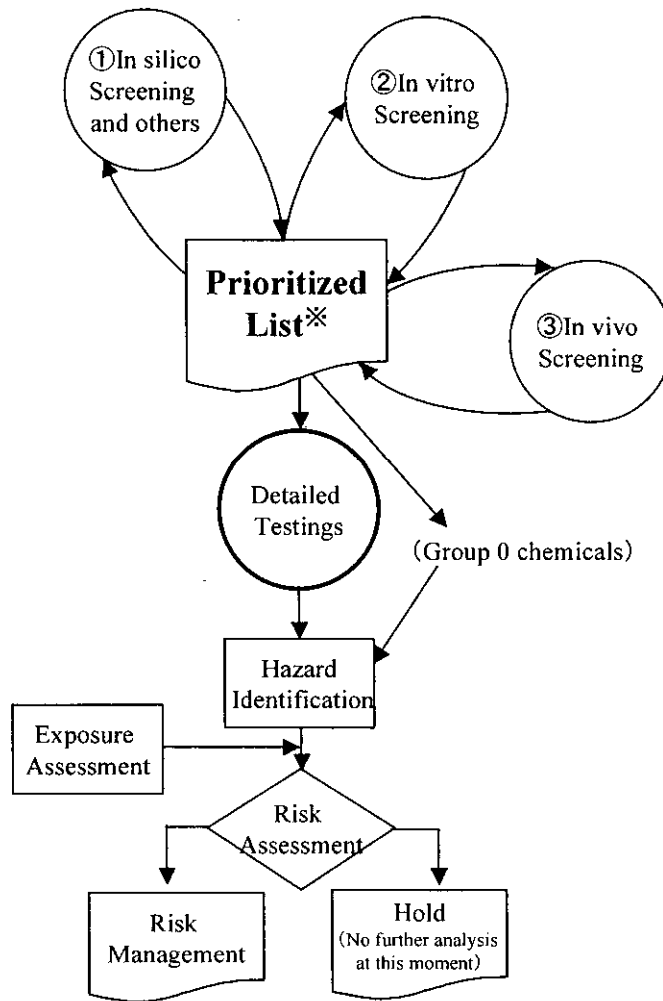
It has been shown that multi-generation studies are relatively less sensitive to known estrogens such as DES and 17beta-estradiol. On the other hand, the so-called “low-dose effects” of hormonally active chemicals are very likely to exist according to the recent studies on behaviors, sex organ functions and other non-reprotox endpoints including ageing-related phenotypes. To assess endocrine-disrupting effects of relatively “weaker” hormonally active chemicals compared to typical intrinsic hormones, it is very important to consider proper incorporation of the study protocols and endpoints of newly developed or attempted experiments, of which data showing possible low-dose effects and irreversible adverse effects monitored at relatively later periods of life even the exposure to such chemicals being confined to *in utero*, perinatal or prepubertal periods of life.

These recent accumulation of knowledge prompted us to consider a conceptual protocol of “One life-span assay of rodents”. This conceptual protocol covers a life span of one generation from “before mating (conception)” to “senescence”. We are now gathering information on any newly tested protocols for detection of either “low-dose effects” or “early exposure-late effect” including examples such as “perinatal exposure-behavior alteration” and “ perinatal exposure-premature onset of persistent estrus in rats”, etc.

The presumptive final picture of the One-life-span-assay protocol would cover much shorter period than one whole life span of rodents. Exposure period could be perinatal and the monitoring periods would be not only around puberty but also mid-adulthood and/or early senescence. Endpoints will cover not only reproductive endpoints but also those of neural system, immune system, and especially of functional endpoints including acceleration of senescence-related phenotypes.

In order to effectively monitor functional endpoints, basic studies on transcription data accumulation using DNA microarray has been performed under MHLW EDC Research Projects Imai-Group I (1999-2001), Imai-Group II (2002-2004), and Inoue-Group I (1999-2001) and Inoue-Group II (2002-2004).

## Extended Scheme for ED screening and testing (MHLW)



• Test Results of ①~③ are recorded to the Prioritized List, and the positions of the Chemicals in the List are re-evaluated and re-assigned to proper priority Groups.

• Detailed Test will be performed for the top Group Chemicals of the Prioritized List (except for Group 0 chemicals with sufficient data for risk assessment).

• This Prioritized List will continuously incorporate adequate data including those generated by newly developed screening methods and mechanistic studies, thus retaining adaptability to the future revision of the scheme.

\*: Others include background information from literatures  
 \*\*: Positivity/Negativity can be substituted by measured values including IC50, EC50, etc.

※ Priority List of Chemicals to Submit to Detailed Testing for Risk Assessment (the Prioritized List)

Priority Groups	Compound Name	<i>In silico</i> Screening and others*	<i>In vitro</i> Screening	<i>In vivo</i> Screening
Group 0 (Sufficient data for Risk Assessment)	○○○ ...	*** ...	*** ...	*** ...
Group 1 ( <i>In vivo</i> - Positive)	○○○ ...	*** ...	Positive** ...	Positive ...
Group 2 ( <i>In vivo</i> - Negative)	○○○ ...	*** ...	Positive ...	Negative ...
Group 3 ( <i>In vitro</i> - Positive)	○○○ ...	*** ...	Positive ...	
Group 4 ( <i>In vitro</i> - Negative)	○○○ ...	*** ...	Negative ...	
Group 5 (No <i>In vitro</i> and <i>In vivo</i> data)	○○○ ...	*** ...		
Group 6 (No available data)	○○○ ...			

## 参照文献

## I. 神経学的所見に関する参考文献

1. Markowska AL, Savonenko AV. Effectiveness of estrogen replacement in restoration of cognitive function after long-term estrogen withdrawal in aging rats. *J Neurosci.* 2002 Dec 15;22(24):10985-95.
2. Gibbs RB. Long-term treatment with estrogen and progesterone enhances acquisition of a spatial memory task by ovariectomized aged rats. *Neurobiol Aging.* 2000 Jan-Feb;21(1):107-16.
3. Korol DL, Kolo LL. Estrogen-induced changes in place and response learning in young adult female rats. *Behav Neurosci.* 2002 Jun;116(3):411-20.
4. Voytko ML. The effects of long-term ovariectomy and estrogen replacement therapy on learning and memory in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Behav Neurosci.* 2000 Dec;114(6):1078-87.
5. Lacreuse A, Wilson ME, Herndon JG. Estradiol, but not raloxifene, improves aspects of spatial working memory in aged ovariectomized rhesus monkeys. *Neurobiol Aging.* 2002 Jul-Aug;23(4):589-600.
6. Markowska AL. Life-long diet restriction failed to retard cognitive aging in Fischer-344 rats. *Neurobiol Aging.* 1999 Mar-Apr;20(2):177-89.
7. Packard MG, Kohlmaier JR, Alexander GM. Posttraining intrahippocampal estradiol injections enhance spatial memory in male rats: interaction with cholinergic systems. *Behav Neurosci.* 1996 Jun;110(3):626-32.
8. Luine VN, Richards ST, Wu VY, Beck KD. Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm Behav.* 1998 Oct;34(2):149-62.

## II. 免疫系に関する参考文献

9. Utsuyama M, Kanno J, Inoue T, Hirokawa K. Age/sex dependent and non-monotonous dose-response effect of diethylstilbestrol on the immune functions in mice. *Toxicol Lett.* 2002 Sep 5;135(1-2):145-53.

10. Calemine JB, Gogal RM Jr, Lengi A, Sponenberg P, Ahmed SA. Immunomodulation by diethylstilbestrol is dose and gender related: effects on thymocyte apoptosis and mitogen-induced proliferation. *Toxicology*. 2002 Sep 2;178(2):101-18.
11. Forsberg JG. Estrogen effects on lymphoid tissue in neonatal and adult female mice. *Acta Anat (Basel)*. 1995;153(1):20-30.
12. Smith BJ, Holladay SD. Immune alterations in geriatric mice dosed subacutely with diethylstilbestrol (DES). *J Appl Toxicol*. 1997 Sep-Oct;17(5):265-71.
13. Sakazaki H, Ueno H, Nakamuro K. Estrogen receptor alpha in mouse splenic lymphocytes: possible involvement in immunity. *Toxicol Lett*. 2002 Jul 21;133(2-3):221-9.
14. Gould KA, Shull JD, Gorski J. DES action in the thymus: inhibition of cell proliferation and genetic variation. *Mol Cell Endocrinol*. 2000 Dec 22;170(1-2):31-9.
15. Forsberg JG. The different responses of the female mouse thymus to estrogen after treatment of neonatal, prepubertal, and adult animals. *Acta Anat (Basel)*. 1996;157(4):275-90.

### Ⅲ. 内分泌系の老化現象に関する参考文献

16. Katsuda S, Yoshida M, Watanabe G, Taya K, Maekawa A. Irreversible effects of neonatal exposure to p-tert-octylphenol on the reproductive tract in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000 Jun 15;165(3):217-26
17. Yoshida M, Katsuda S, Tanimoto T, Asai S, Nakae D, Kurokawa Y, Taya K, Maekawa A. Induction of different types of uterine adenocarcinomas in Donryu rats due to neonatal exposure to high-dose p-tert-octylphenol for different periods. *Carcinogenesis* 2002 Oct;23(10):1745-50

### Ⅳ. I U L

18. Thuett KA, Roots EH, Mitchell LP, Gentles BA, Anderson T, Kendall RJ, Smith EE. Effects of in utero and lactational ammonium perchlorate exposure on thyroid gland histology and thyroid and sex hormones in developing deer mice (*Peromyscus maniculatus*) through postnatal day 21. *J Toxicol Environ Health A*. 2002 Dec 27;65(24):2119-30.
19. Salisbury TB, Marcinkiewicz JL. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran reduces growth and disrupts reproductive parameters in female rats. *Biol Reprod*. 2002 Jun;66(6):1621-6.