

内分泌攪乱化学物質スクリーニングプログラムの実施に向けた進捗状況

ゲーリー E. ティム

米国 環境保護庁 (EPA)

丁寧なご紹介ありがとうございます。また、私を招いてくださった会議の主催者に感謝します。

少し時間が押しているようですので、導入部分の情報のいくつかは素早く省略したいと思います。内分泌攪乱化学物質スクリーニングプログラム (EDSP) に関しては簡単にいくつかの背景情報をお伝えしたいと思います。さらに詳細な情報は我々のウェブサイトで閲覧できますし、日本語でご覧になりたい方のために小林博士が EDSTAC レポートを日本語に翻訳されています。

本日は、主に、EDSP 向けの分析法の妥当性検査における我々の活動についてお話ししたいと思います。まず、現況報告を行い、次に雌雄の思春期発動に関するスクリーニングアッセイ、魚類のスクリーニングアッセイ、および我々が始めようとしている鳥類における用量研究 (Avian Dosing Study) についてお話しします。

米国の EDSP は、内分泌攪乱化学物質のためのスクリーニングプログラムとしては、私が知る限り、法律により要求されている唯一のプログラムです。1996 年の食品品質保護法は、EPA のスクリーニングが殺虫剤におけるヒトの健康に影響を及ぼす可能性のあるエストロゲン様作用の有無を調査することを要求しており、さらに、妥当性が検証された適切な試験系または他の科学的関連性のある情報を利用するように要求しています。我々はその法律に定められた非常に狭い範囲の任務を拡大し、飲用水中の汚染物質、他の内分泌作用、および他の化学物質を含めました。最新の科学に基づいたこのプログラムは、エストロゲン系だけではなくアンドロゲン系や甲状腺ホルモン系も含んでいます。その範囲も、ヒトの健康だけでなく生態系への影響まで拡大する予定です。

その枠組はかなり単純です。まず、数多くの化学物質を選び出し、次に、それらの化学物質を情報の有無に基づいて分類し、さらに、既存のデータのほかに QSAR や HTS を利用して優先順位を設定します。次に、ごくわずかなデータしかない化学物質を第 1 段階のスクリーニングにかけます。このスクリーニングの目的は、さらに試験を進めることが必要な物質を明らかにすることです。陽性であることが確認された化学物質は第 2 段階に進み、有害作用が確認され、ハザードアセスメントに利用可能な用量と反応の関係が明らかにされます。

妥当性検査のプロセスについては、前の講演者が既にお話しされていますので、これについては私は省略することにします。基本的に、この妥当性検査の目的は、実験手順を選び出して、法規制上のガイドラインとして用いることです。すなわち、それら分析法が、法規制上の目的で使用する場合に信頼性と適合性があるかどうかを判断するためのプロセスです。

現実的な意味で実際に妥当性検査基準を適用する方法は数多くあります。EPA が適用する必要のあるリソースを見ると、OECD が行ったようには我々には行えませんし、これらの研究を 20 もの研究室に実施させることはできません。3 つか 4 つの研究室でも、研究室間のばらつきを確認できる根拠が得られるものと考えています。

我々は、あるブロックに属する複数の化学物質をとって、そのブロックに対しすべての分析を行うのではなく、むしろ各分析法に特異的な化学物質を選択することになるでしょう。すなわち、ある一連の分析法の妥当性検査をするのではなく、個々の分析法の妥当性検査を行うこととなります。予備的妥当性検査のステップでは妥当性検査のステップのときよりも数多くの化学物質を使用しますが、それには 2 つの理由があります。第一に、予備的妥当性検査は少ない数の研究室が実施するため、それらの化学物質の検査が安価でできるからです。第二に、ある分析法が機能しないような場合は、数多くの研究室での検査に多くの資金を投じて結局は関連性も信頼性もないことが判明するよりも、妥当性検査プログラムのより早い段階でその分析法を除外したいためです。

一連の分析法の妥当性検査自体は、書類上の作業となります。すなわち、すべての分析法のすべてのデータを検討して、互いに協調して機能し、スクリーニングのための効率的な一連の分析法となるのはどの分析法かを判断します。

このスライドに示された点の色は、妥当性検査プロセス (詳細なレビュー論文、予備的妥当性検査、妥当性検査) における分析法の状態を示しています。ER/AR 結合分析法は、すべての 3 つの段階にあることが示され

ています。詳細なレビュー論文は、文献で何が分かっているかに焦点を置いており、予備的妥当性検査の段階で行うべき適切なこととは何かを判断するベースとなります。

予備的妥当性検査では、我々は最適化された譲渡可能なプロトコルを開発し、次に、そのプロトコルを複数の研究室に送り、昨日の講演で考察されたような妥当性検査の段階に入ります。EPA と ACC（米国化学工業協会）はいくつかのデータを収集しており、そのデータはこれら分析法の妥当性検査に利用されます。

しかし、ここでの妥当性検査は、実際に ICCVAM（代替法の妥当性に関する米国省庁間調整委員会）によって実施されています。同委員会は、ER 結合、AR 結合、ER レポーター遺伝子分析、および AR レポーター遺伝子分析に関する 4 つの異なる文書を作成中です。子宮肥大アッセイおよびハーシュバーガーアッセイは、ご存知の通り、OECD プログラムで行われており、ここでは取り上げません。

基礎となる分析法は、第 1 段階スクリーニングで考えると、雄の思春期発動に関するアッセイまたは雌の思春期発動に関するアッセイですが、それらの現状については後で少し説明することにします。

カエル変態アッセイについては、昨日取り上げられた通り、我々はカエル変態プロトコルのデモンストレーションを 1 回行っています。我々が選択した誘発投与の時期があまりにも遅かったために、自然な甲状腺サージが現れてしまい、少し困難がありました。この変態試験は抗甲状腺性物質を検出するための分析法とされていますので、もっと早い発達の時期に投与して試験する必要があるでしょう。また、尾吸収に代えて肢芽形成の時期を採用することも考えています。

魚類の生殖スクリーニングについては、後でお話します。

ステロイド産生およびアロマトーゼアッセイについては、現在、詳細なレビュー論文を書いているところです。それら論文は 3 月の新しい諮問委員会に先立って発表される予定で、その後、実験室での作業に進み、秋にはそれらの予備的妥当性検査を完了し、恐らく来年初頭には妥当性検査に進みたいと考えています。

哺乳動物 2 世代試験については、我々は PTU を用いた哺乳動物 2 世代試験の別の甲状腺エンドポイントを明らかにしました。また、現行の哺乳動物プロトコルの適切性を判断するために、1 世代試験を使用して、2 世代試験の観察期間を延長させる研究を開始しています。

ライフサイクルの初期の段階で少数の動物を用いた際は観察できない雄の生殖管への影響のいくつかを観察するために、出生仔をさらに長い期間にわたって飼育するよう観察期間を修正する必要があるかどうかを調査したいと考えています。思春期を通過した動物では、それらの組織の観察が容易だからです。

鳥類 2 世代試験については、我々は詳細なレビュー論文の作成を開始しており、ボブホホワイト種ウズラとニホンウズラを比較する予備的妥当性検査をいくつか行いました。

両生類慢性毒性に関しては、作業はまったく行っていません。

無脊椎動物慢性毒性については、2 世代プロトコルのデモンストレーションをアミ（エビに似た甲殻類）で行ってきました。我々は詳細なレビュー論文も作成し始めています。

魚類慢性毒性については、詳細なレビュー論文を作成中で、次の夏には完了するでしょう。

子宮内-授乳期アッセイは興味深い分析法で、第 1 段階スクリーニングに用いるには複雑過ぎるかも知れませんが、2 世代試験で得られる余分な情報が必要でない場合に 2 世代試験の代りに用いる試験としては非常に優れた分析法でしょう。

雌思春期発動に関するアッセイは、エストロゲン作用性物質および甲状腺作用性物質の検出、および LH、FSH、GnRH、および視床下部機能の変調の検出を行うよう設計されています。このプロトコルは各投与量毎に 15 匹の未成熟ラットを使用し、スクリーニングに使用する際は、2 つの投与量を使用することを予定しています。

これが概略図です。投与は 22 日目に開始し、思春期の特徴の 1 つである膣開口を調べ、膣開口後に毎日洗浄を実施します。これが思春期発動の特徴です。最終的に、43 日目に屠殺し、T4 と TSH を観察し、卵巣、子宮、肝臓、腎臓、脳下垂体、副腎などの臓器の重量を測定し、子宮と卵巣の組織検査をいくつか行います。

雄思春期発動に関するアッセイもエストロゲン/アンドロゲン作用を観察するよう設計されており、この場合、抗アンドロゲン性作用、甲状腺作用、ならびに、LH、FSH、GnRH、および視床下部の機能を観察します。雄の場合も、各投与量毎に 15 匹を使用し、2 つの投与量を使用します。

これは図式化した投与方法です。22 日目と 23 日目に、投与を開始し、雄の思春期発動の特徴である包皮分離をほぼ 37 日目に検出したら、剖検を行って、T4 と TSH を観察し、睾丸、精巣上体、腹面前立腺、精囊、凝固

腺、肛門挙筋、および球海綿体筋の重量を測定し、睾丸、精巣上体、甲状腺の組織検査を行います。カエル変態アッセイを一連の分析法に加えない場合は、思春期発動に関するアッセイが甲状腺を調査する唯一の分析になります。

完了した初回思春期発動に関するデモンストレーションの目的は、エストロゲン、アンドロゲン、および甲状腺の作用を阻害する物質の検出に関するこのプロトコルとエンドポイントの利用状況を調べ、研究室間のばらつきに関し、これらのプロトコルに安定性があるかどうかを調査し、系統間のばらつきの原因を調査し（我々は実際に 2 種類の系統を使用しています）、分析を成功裏に完了するために必要なプロトコル関連文献の量を調べることでした。

既に言及した通り、我々は SD とロング・エヴァンスの 2 系統のラットを使用しました。この場合、1 種類の高投与量のみを使用し、各群あたりわずか 6 匹だけという少ない動物数を用いました。我々が、研究室間のばらつきを判断できるように、2 ブロックデザインとしました。

これらがその研究結果です。投与量を書き込むのを忘れていて申し訳ありませんが、実際のところ MTD か、MTD に近い投与量でした。我々は、エチニルエストラジオールを ER アゴニストとして使用しましたが、ご覧の通り、膣開口と最初の発情現象の発現を早期化させています。組織病理検査でも徴候が見られました。ER アンタゴニストであると共に部分的なアゴニストでもあるタモキシフェンも膣開口を早期化しましたが、発情年齢は遅延させました。組織検査でもいくつかの影響が観察されました。

これらはかなり奇妙です。なぜ我々が TSH と T4 にいくつかの影響を観察しているのか分かりません。このことについて、皆さんの中にコメントできる方がいらっしゃるのではないのでしょうか。

PTU は、T4 の合成を抑制するよう設計されていますが、SD ラットでは、膣開口と発情年齢にも影響を及ぼしました。組織病理検査は予想した通りでした。TSH が増加し、T4 は抑制されました。

ケトコナゾールはステロイド合成を抑制する物質です。ケトコナゾールは、SD ラットのみで膣開口を遅延させ、発情年齢の遅延を導きました。組織病理検査でも作用を観察しました。ケトコナゾールは T4 濃度を低下させました。

ドーパミンアンタゴニストの一種であるピモジドは、膣開口を遅延させました。組織病理検査で影響を観察しました。ロング・エヴァンスでは、TSH の低下が見られました。ピモジドは、両方の系統で T4 を低下させました。

メトキシクロールは ER アゴニストです。メトキシクロールは膣開口と発情現象の年齢を早期化させました。組織病理検査で影響が観察され、ロング・エヴァンスラットの TSH の低下が見られました。

雄では、フルタミドをアンドロゲン受容体アンタゴニストとして使用しました。フルタミドは包皮分離を遅延させ、組織検査でも影響を確認しました。メチルテストステロンは、AR アゴニストとして選択しました。予想通り包皮分離を早期化し、組織検査でも影響を確認しました。PTU は T4 合成の抑制物質で、予想通り包皮分離を遅延させ、TSH/T4 への影響が見られました。

ステロイド合成の抑制物質であるケトコナゾールも、包皮分離を遅延させました。ドーパミンアンタゴニストであるピモジドは、包皮分離を遅延させ、組織病理学上の影響はロング・エヴァンスのみに観察しました。ジブチルフラレートは、受容体を介さず作用するアンチアンドロゲンで、この場合も、ロング・エヴァンスだけで包皮分離を遅延させました。この影響が、SD ではなく、ロング・エヴァンスだけで観察されるのは非常に興味深い点です。

思春期研究の結論は、プロトコルは成功であり、これらのプロトコルにより予想通りの内分泌を介した影響が雌雄双方で同定され、予備的妥当性検査が続く限り、予備的妥当性検査で注目する必要がある重要な問題が提示されたということです。第一の問題は系統差であり、プロトコルで動物系統を指定するべきかどうかという点です。ちょうど先週会合を行ったところですが、我々の諮問委員会は、SD ラットで進めても問題はなく、系統差があるのは当然であり、特定の系統を 1 つだけ選択するのは難しいということでした。いくらか利点があるでしょうが、同様に問題点もあります。

我々は、液体を内包している小さな組織の重量の平均におおきなばらつきがあることを実際に発見しており、このことは、大きなばらつきが見られる部分ではプロトコルを厳しくし、何らかのパフォーマンス基準を確立することが必要です。何を投与していたかを我々は分かっており、これらは十分に研究されている化合物です

が、この特定のスクリーニングセットで、分かっていない化合物を調べる際にどのように投与量を確定すべきかについて、我々は何らかの指針を示す必要があります。

体重の変動は思春期マーカーに影響を及ぼすことが知られていますので、偽陽性を排除するために、体重に関する研究を進める必要があるでしょう。我々は、雄ではピンクロズリンとフルタミド、雌ではメトキシクロールとエチニルエストラジオールの3種類の投与量を使用し、用量反応研究を実施する予定です。我々は2つの投与量を使用した化学配列研究を実施します。雌では8種の化学物質、雄では9種の化学物質を使用する予定です、それらは先週選択したばかりです。

次は魚類についてお話しします。OECDの研究グループは、魚類のスクリーニング研究について考察しており、既に複数の候補が考察されています。我々のダールズ研究室で研究を行ったのは生殖作用スクリーニングで、その際は42日間にわたる研究でした。我々は、順化期間を21日から14日に短縮してその研究を再度実施することを計画していますが、曝露期間を21日間としたこのプロトコルはそのまま使用します。

我々が聞いた苦情の1つは、そのスクリーニングがあまりにも長過ぎることでした。従って、順化期間を7日に、曝露期間を14日に短縮したスクリーニングも実施し、この場合にも有効性が確保されるかどうかを検討する予定です。そのスクリーニングを昨日発表された幼若期の魚類における分析法と比較する予定ですが、その際にはビテロゲニンが主要なマーカーの1つとなります。これは今回は1動物種だけで行う予定であり、我々はファットヘッドミノーを使用します。これらは使用する予定の化学物質です。メトキシクロール、ファドラゾール、フルタミド、メチルテストステロンです。この夏の初めには完了したいと考えています。

我々がやっているもう1つの環境試験—これは実際は第2段階試験ですが—鳥類における用量研究です。OECD鳥類研究グループが会合した際に、2世代研究の投与レジメンをどのように進めるかについて若干の意見の不一致がありました。従って、この目的は、その問題を考察することです。我々はニホンウズラを使用する予定です。我々は、親鳥の成熟に対する影響と経世代的影響の双方が見られる1種類または2種類の化学物質を使用します。我々はメアリー・アン・オットィンガーが考案したプロトコルまたはその変法を使用する計画で、この夏の終わりに完了する予定です。

ここは迅速にまとめます。これらは、設計した4種類の投与シナリオです。この方法は、1つのブロックをとり、性成熟期と産卵期に曝露させ、次にそのブロックを分け、F1世代まで曝露を継続します。2つ目のブロックについては、性成熟期には曝露させ、産卵期にのみ曝露させます。従って、これらのウズラはこの段階での内部対照群の役割を果たします。次に、そのブロックを分け、F1世代まで曝露を継続します。これにより4群を比較することができます。

実施の期限をお知らせして、私の話を終わりにします。私が本日ここで話したのは妥当性検査です。2003年末には完了させ、実際にスクリーニングを実施できるようになっていることを期待しております。米国では、スクリーニングの大半は規制対象とされる業界が実施します。第2段階の妥当性検査はもう少し長い期間がかかり、2005年までかかる予定です。優先順位設定システムも同時に研究を進めており、ウエイダ・トン氏の報告の通り、QSARが優先順位付けに用いられる予定です。ご清聴ありがとうございました。

質疑応答

武井：ありがとうございます。質問を1つ伺う時間があります。質問はございませんか？はい、どうぞ。

ピックフォード：アストラゼネカ社のドン・ピックフォードです。妥当性の再検討を行っておられる思春期発動に関するアッセイとカエル変態アッセイの甲状腺のエンドポイントに関してですが、カエル変態アッセイの妥当性検討のための思春期発動に関するアッセイであなたが使用された同一の分析法と同じ一連の化学物質群を使用される予定ですか？また、何れの試験法でも偽陰性や偽陽性が確認されなかったら、どのような戦略をとられる予定ですか？

カエル変態アッセイを続けますか、あるいは、すこし後戻りしてラットアッセイを使用されますか？

ティム：我々はこのシステムを甲状腺で検証するために、非常に強力な抑制物質である PTU の他にいくつかの異なる化学物質の使用を考慮する必要があると思います。過塩素酸塩が話題に上がっており、恐らく、かなり早期に使用することになると思います。実際、過塩素酸塩は思春期発動に関するアッセイで試験する次の化学物質グループになると思います。

現在のところ、カエル変態アッセイで予定している研究はありません。ドイツで研究が行われていると思います。そこで行われている研究について情報を得て、次に、カエル変態アッセイをさらに進めるかどうかを判断したいと思っています。

武井：どうもありがとうございます。

ティム：ありがとうございます。