



**International Symposium on Environmental Endocrine Disrupters 2001**

*Saturday, December 15 - Monday, December 17, 2001*

**セッション 2**  
2001年12月16日(日)

**Session 2**  
Sunday, December 16, 2001

スクリーニング・試験法

---

**Screening and Testing Methodology**

## 内分泌攪乱化学物質の試験と評価に関する グローバルストラテジーに向けた国際的イニシアチブ

ハーマン B. W. M. クーター

OECD

OECDの加盟国と国際産業界からの要望を受け、OECDは1997年に「内分泌攪乱化学物質の試験と評価に関する特別活動 (Special Activity on Endocrine Disrupters Testing and Assessment)」を開始した。この活動の目的は、規制に用いる試験ガイドラインおよび、試験と評価のストラテジーにおいて、試験の重複を避け、試験動物などの資源の節約ができるように、国際的な認知とハーモナイゼーションを確立することである。

「内分泌攪乱化学物質の試験と評価に関するワーキンググループ (EDTA)」および、それに属する哺乳類試験と環境毒性試験に関する2つの「有効性評価管理グループ (VMG-mammalianとVMG-eco)」によって、複数の総合的な試験有効性評価プロジェクトが開始され、そのうちのいくつかは、現在、順調に進行中ないしは完了間近である。また、試験ガイドラインの414と416が更新され、2001年1月に評議会に承認された。エストロゲン様作用の評価における子宮増殖アッセイの有効性評価プロジェクトは完了間近であり、2001年3月に開かれたVMG-mammalianの第3回会議において、このアッセイ法に関してのそれ以上の実験作業は必要ないとの合意がなされた。試験ガイドライン407を拡張するために新たに加えられたパラメータの有効性評価の第2段階は、2001年末には完了する予定であり、アンドロゲン作用の評価に用いるHershbergerアッセイの有効性評価の第1段階では、有望な結果が得られている。内分泌攪乱化学物質の有害性の解明に用いるもう1つのヒト健康試験ガイドライン (発生神経毒性に関する試験ガイドライン426) も、完成間近である。

環境毒性試験の分野では、2つの専門家諮問会議が設けられ、現時点で存在する魚類の生殖毒性試験についての協議と順位付け、および公式な有効性評価の対象になり得るスクリーニング試験法について勧告を行なった。2001年3月のVMG-ecoの第1回会議では、技術的問題が議論され、この有効性評価に関して作業計画が承認された。また、VMG-ecoは、鳥類の生殖毒性試験に関する専門家諮問会議の結論についても議論し、内分泌攪乱化学物質の有害性解明に適した鳥類試験の開発に向けた次の段階の勧告も行なった。

この進行中の共同作業が実を結び、内分泌攪乱化学物質と目される物質の試験と評価の方法が具現化した暁には、そうした方法を利用した次の段階が開始されることになる。2001年6月にOECD加盟国は、試験と評価の作業 (の少なくとも一部分) を国際的に分業して行なうための仕組みを実現化することが望ましいと考えた。その理由は、以下の通りである。

- ・現在使用されており、評価対象にする必要のある化学物質は、莫大な種類がある。
- ・内分泌攪乱化学物質の同定と評価は可能な限り迅速に行わなければならないという、大きな時間的制約がある。
- ・スクリーニングや、適切な場合に行なわれる総合的な有害性評価に必要な試験方法の数は、かなり多い。

・こうした作業に必要な資源が明らかに不足している。

国際的な共同作業が極めて有用になる分野の一つとして、化学物質の分類がある。そのため、化学物質の内分泌攪乱能力に対する批判的な評価に、規制上の関心が持たれるようになってきた。OECD加盟の各国・各地域が、関心の対象となる化学物質群を明確にしたならば、今度は、そうした化学物質群を他の国と共有することになる。そうした情報交換を有効に働かせるためには、化学物質の分類の根拠について基準が存在していることが不可欠である。また、スクリーニング／試験の詳細なスケジュールといった、行動計画に関する情報も大変有用であると考えられる。試験と評価の重複を避けるために、すべての化学物質分類の共同データベースの構築が、計画される活動の基準と更新とを併せて、進められている。

試験方法の開発と有効性評価に関するOECDの活動においては、共同作業が何よりも重要である。既に述べたような現行の活動の他にも、日本と米国で行なわれている定量的構造活性相関 (QSAR) および高処理スクリーニング系 (HTPS) 開発に関する現行の作業が、他の国でも同様に有益なプレスクリーニング手段になるということで加盟国の意見が一致している。また、受容体が関与した作用以外のメカニズムを対象にしたスクリーニング試験の開発と、哺乳類2世代繁殖試験や鳥類魚類の生殖試験などのより確定的な試験方法に関する作業に対しても、そうした活動を現在実行している国以外の国家からも関心が寄せられることが少なくない。こうした情報をOECDの全加盟国で共有するための計画が進行している。

より確定的な試験、特に多世代生殖毒性試験は哺乳類、鳥類、さらには魚類であっても経費がかかるものなので、そうした試験は全て、国際的に協調して行なうべきである。この協調には、合意が得られたものとして、i) 早期の通知 (そうすれば、その試験の実施を考えている他の国家は、試験を始めなくてよくなる)、ii) 国際的に合意されたプロトコルの使用、iii) 結果の共有の準備、などがある。OECDは現在、加盟国間でデータの共有が容易にできる方法を開発しつつあるところである。

国際的な評価法に向けて作業中の加盟国には、しぶしぶ行なっているような部分がある。他の国際的評価プログラムの経験によれば、こうした作業は長く緩慢な歩みになるものである。加盟国は、評価法についての合意を構築するよりも、評価法の共有に基づいたやり方のほうがやりやすいとの感想を持っている。評価の共通理解を促進するためには、評価報告に含める要素群について合意を達成することを第1の目的にしなければならない。それぞれの所見 (魚類の組織病理、ホルモン濃度への影響など) の解釈を中心に扱ったガイダンス文書を作成することが、有用な道具になるものと考えられる。しかし、内分泌攪乱物質の評価報告を全て共有することは、きちんと構築された国際協調がなければ達成不可能である。それゆえに、OECDの内分泌攪乱物質に関する特別活動においては、そうした構築を行なうことが現時点では高い優先順位を持つ。

## エストロゲン様化学物質のスクリーニングと試験の枠組みの国際的標準化

ジェームズ W. オーウェンズ

プロクターアンドギャンブル社

様々な国際的ワークショップでは、エストロゲン様化学物質のハザードの同定と特性評価を行うための段階的なスクリーニングと試験の枠組みを設計し、その妥当性を検討することが推奨されている。枠組みの目的は、第一に、流通している数多くの化学物質を系統的にふるいにかけて、スクリーニングを要する一群のサブセットにまとめることである。このサブセットをもとに、スクリーニング法を用いて明らかなエストロゲン様特性を有する化学物質を同定し、生殖および発生に対する有害作用に関する試験の必要性を判断する。試験結果と曝露評価から得られたハザードの特性により、リスクアセスメントが可能になり、さらに必要に応じてそれらのリスク管理も可能になる。

こうしたワークショップは、以上の目標を達成するために、一連の試験法が段階的に配列されたスクリーニングと試験の枠組みを提案している。この枠組みの理論的ベースとなっているのは、エストロゲンレセプターにリガンドが結合することにより開始されるエストロゲン作用機序が存在し、エストロゲンターゲット遺伝子の転写を制御し、その結果、エストロゲンを介した有害作用が現れるということである。

第1段階では、利用可能な毒性データを再検討し、基本的な構造活性相関を利用して、ある化合物が有するエストロゲンレセプターへの結合親和性を評価する。第2段階では、化学物質がエストロゲンレセプターに結合する能力、または、化学物質がエストロゲン媒介性の遺伝子転写を開始させる能力に基づいて、複数の候補の中から *in vitro* スクリーンの1つを採用する。第3段階では、*in vitro* スクリーンの1つ、例えば子宮肥大性分析を採用し、子宮など化合物に対する感受性が高いエストロゲン標的臓器の成長を誘発させる化合物の能力を、強化したり変調したりする薬物動態など、無傷動物の生物学的関連を加える。最終段階は、伝統的な亜慢性毒性試験と生殖および発生に関する最終的な多世代バイオアッセイで構成され、必要に応じてエストロゲン感受性が高いエンドポイントを採用してこれらの試験の質を高める。各段階で用いる方法は標準化し、妥当性を検討し、国際的標準化を図る必要がある。既に、子宮肥大性バイオアッセイの妥当性検査はOECDの支援下で完成に近づいている。国内の各種規制当局の管理下で、様々な構造活性モデルおよび他の試験方法に関する研究が進められている。

最終的には、こうした様々な試験は、理論的ではなく機能的で国際的に合意された枠組みに構築されなければならない。この国際的な枠組みは、構築するだけでなく、妥当性を検討する必要があり、最も重要なのは、標準化することである。さもなければ、多くの場合は重要なリソースが試験方法に別して重複して生成されることとなり、矛盾が生じる場合もある。また、スクリーニングと試験の標準化は容易な作業ではないため、この大規模な基準作成を計画し、周知させ、実施し、その情報を共有するには、国際的な意見の一致と合意が必要である。

本プレゼンテーションでは、提案されている枠組みを概説し、個々のスクリーンと試験の開発、標準化、および妥当性検討の状況について手短かに解説する。また、国際的規模で複数の試験方法、特に構造活性相関と *in vitro* スクリーンの妥当性検討および比較を行う必要性を示す。こうした検討・比較なし

には、化学物質の異なるリストと異なる優先性が出現することとなり、協力的な基準作成のプログラムではなく競合と矛盾が生じることになる。

本プレゼンテーションは、それぞれの段階と方法の双方には明確に定義された役割と法的な目的が必要であり、その目的が試験方法の開発、標準化、および妥当性検討の指針となることを示す。さらに、試験方法の科学的根拠と能力は目的と一貫するものでなければならない。段階的な方法の究極の利点は、単純な方法を用いて迅速かつ体系的に大規模な化学物質の領域を一群の作業可能なサブセットにまとめることが可能なことである。また、より複雑であるが、多くの情報を提供できる方法は、数を減少したサブセットに対して経済的に採用されうる。リスクとはハザードと曝露とのコンビネーションであることを認識し、曝露の試算により、効力に関するデータのバランスをとることが重要である。従って、各段階における優先順位付けの判断は、最も高い潜在的リスクを呈する化合物を現実的な方法で明らかにするよう設計されていなければならない。データを共有し、幅広い意見の一致を得るための国際的なシステムが必要である。つまり、我々は試験方法を開発して妥当性を検討するという任務だけでなく、最も効果的な方法で情報を生成して全ての人々が共有することを可能にする標準化された方法でスクリーニングと試験の方法を採用するという任務も果たさなければならないのである。

## 水生環境における内分泌攪乱現象の試験戦略

ダニエル B. ピックフォード、トーマス H. ハッチンソン  
アストラゼネカ社

魚類などの水生生物種における内分泌攪乱（ED）の野外調査は、野生生物における内分泌攪乱現象を検出する試験法を開発する世界的な努力に寄与してきた。生態学的リスク評価においては、両生類、魚類、水生無脊椎動物に関して、メカニズムに関するデータと曝露特性とを組み合わせた段階的なアプローチに裏打ちされた、有効な試験法が必要とされる。しかし、（水生）下等脊椎動物や無脊椎動物のホルモン系の機能や制御は哺乳類とは生理学的に顕著に異なるために、哺乳類で得られた内分泌攪乱のデータを水生生物種に外挿できる可能性は大きくないと考えられる。現在OECDでは、内分泌攪乱リスク評価には段階的アプローチを採用することを考えている。その中には、魚類の14日間スクリーニングアツセイ（第1段階）、魚類の発生・生殖試験（共に第2段階）、魚類の全ライフサイクル試験（第3段階）が組み込まれる。（抗）エストロゲン類の検出では卵黄前駆タンパク質のビテログニンが曝露の理想的な生物マーカーであり、（抗）アンドロゲン類やアロマトラーゼ抑制物質などに関して同様の機能を持つ生物マーカーが探し求められている。第2、第3の高い段階では、アピカルなエンドポイント（発達、授乳行動、繁殖能力など）を用いた影響評価と、性腺の組織病理を行なう。両生類の試験については、両生類の変態後の試験の開発の中で、甲状腺活性物質に感受性のある試験が国内外で必要になってきている。甲状腺ホルモンの恒常性を変化させる可能性のあるメカニズムは多様なものがあるので、こうした試験群を作用メカニズムに即したものにするためには、アピカルなパラメータ（幼生の成長など）の他にも生化学的・分子的なエンドポイントも必要になると考えられる。さらには、生態学的に適切な生物種における作用の特性をより詳しく解明するためには、ライフサイクルの一部もしくは全体にわたる高次段階の試験が必要になることもある。これら高次段階の試験の有効性検証においては、健康への有害作用（生殖障害など）を予測する生物マーカーの価値を最大に高めるために、生化学的およびアピカルなエンドポイントの感度を比較する必要がある。この先公表されるOECDの魚類・両生類試験ガイドラインを内分泌攪乱化学物質に特化したものにするには、分子内分泌学の最新知識に基づいたメカニズムエンドポイントを含めることを、さらに考慮する必要がある。野生生物種における内分泌攪乱化学物質のスクリーニングに対してメカニズムに基づいたアプローチを採用することは、通常の試験動物から野生生物への外挿の可能性の拡大につながるものと考えられる。

## 鳥類におけるスクリーニング法の開発の現状と今後の展望

和田 勝

東京医科歯科大学

少しばかり個人的な経緯から話を始めたい。私は鳥を使った内分泌学の研究をしてきたが、そのためであろうか1999年5月にドイツのライプチヒで開かれた「第1回鳥類内分泌毒性専門家会議」に参加することとなった。この会議はOECDの事務局が招集したもので、鳥を使った試験法ガイドライン206の改訂作業を行なうことが主な目的で、改訂に加えてこの専門家会議で内分泌攪乱化学物質の試験法の策定を行なうことも目的に加えられていた。既存のこの会議を利用しようとしたものと思われる。206の改訂は急性毒性試験で、使用する種としてコリンウズラを使うかウズラを使うかが、大きな議論の対象であった。そのほかにも、エンドポイントをどうするか、どのようなデザインで行なうと統計的な解析力が増すかということなどが議論された。

2日の会議の最後になって、内分泌攪乱に関してはじめて議論された。ここでもいろいろな意見が出されたが、ウズラを使って二世世代試験法でいくことが方針となった。どのようなデザインで、どのようなエンドポイントを使うかなど、多くの問題点が残されたが、EPAの人がたたき台を作って配布することになった。こうして鳥を使った内分泌攪乱試験法の策定作業が始まったのである。

その年の12月に草案が配布され、その後いろいろな意見が集められ、それをもって2000年11月にアメリカテネシー州のナッシュビルで第2回の会議が開かれた。会議のタイトルは「第2回OECD鳥類における内分泌攪乱化学物質試験法に関する専門家会議」となっていた。したがって、ここで議論されたのは草案をたたき台として、どのような試験法をつくるかであった。多くの問題点が指摘され議論された。主なものは、どのような実験デザインとするべきか、暴露をいつから始めるか、暴露する期間をどうするか（親だけなのか、第一代の場合いつから始めるかなど）、用量の問題（親と子を同じ用量にするか、変える必要があるのかなど）、エンドポイントは何にするか、などである。また一世代試験との関係についても触れられたが、いずれも複雑に絡み合った問題なので明確な結論は得られなかった。

そこでサブグループを2つ作って、それぞれ草案の更なる改訂と、試験法評価のための予備試験法の提案を行なうことにし、次の会議を2001年11月にアメリカのボルチモアで行なうことを決めて散会した。その後、試験法評価のための予備試験法の提案が配布され、2001年2月に電話会議が開かれ、一部の委員は5月にマドリッドで開かれたSETACヨーロッパ大会の時に集まって議論したが、その後は大きな進展はしていない。したがって現状では、内分泌攪乱化学物質試験法の策定はまだその途上にあるということになる。内分泌攪乱化学物質の影響を正しく評価するための試験法を開発するために、基礎的研究を含めて多くの研究が必要である。

これと平行して、日本では鳥類内分泌研究者が試験法開発のための基礎的研究と、スクリーニングあるいはテストングに使える方法を開発する応用的研究が環境省のプロジェクトとして行なわれた。スクリーニング法に関しては、ビテロジェニン測定法の開発に着手し、開発に成功した。また血中VLDLは雄ではごく低濃度だが、産卵中の雌では高濃度になる。これを利用して、雄にエストラジオールを投与すると用量依存性にVLDLが増加することを確かめ、血中VLDL測定によってもエストロジェン様活性を測

定できることを確認した。現在、これらの方法を使って、内分泌攪乱化学物質と疑われる物質のエストロジェン作用を評価するスクリーニング実験を行なっている。

今後、二世世代試験法の策定作業の過程で、これらの方法の有効性をアピールし、基礎的研究の成果を反映させ、策定作業に寄与していく必要があると考える。



## 日本における両生類の内分泌攪乱試験研究の現状

内山 実

富山大学

今回の講演では、内分泌攪乱作用が疑われている化学物質についての両生類における試験方法についての日本における開発研究の現状を報告する。近年、地球上各地の様々な環境に生息している両生類個体群が数を減らしており、絶滅の危機に瀕している種や既に姿を消してしまった種さえ報告されている。両生類の生活史は、産卵後の初期発生、幼生期には水棲であり、その後には多くの種が陸棲になる。したがって、環境変化や環境中に混入した化学物質の影響を受けやすい生態的地位を占めていると考えられる。日本には多くの種類のカエル生息しており、これまでに発生や内分泌に関する多くの研究が報告されてきている。しかしながら、両生類を用いての内分泌攪乱物質に関する研究は、日本においては漸く緒についたばかりである。

1998年以来、OECDは内分泌攪乱作用に係わるスクリーニング・試験法の開発を進めており、これまでに魚類、鳥類に関する専門家会合が行われてきた。両生類に関しては、2001年4月にフランス、パリで第一回両生類専門家会合が開催された。この会議では、両生類をもちいて内分泌攪乱物質の試験を行う目的について、①脊椎動物の視床下部-甲状腺軸に影響を与える可能性のある化学物質を特定すること②両生類にとって悪影響のエンドポイントを評価することの2点が合意された。日本ではこれを受けて、2001年9月に第1回内分泌攪乱作用に関する両生類のスクリーニング・試験法開発評価検討会が環境省において開かれた。検討会において、2001年度は内分泌攪乱作用に関する両生類のスクリーニング・試験法開発の第1段階として、ドイツのカエル変態アッセイ (XEMA) プロトコルを基本として、日本在来種 (ツチガエル) およびアフリカツメガエルを用いたアッセイ法の開発を開始した。これについての進捗状況と両生類における奇形の発現と精巣卵の出現などこれまでに得られてきた報告を紹介し、内分泌攪乱物質の試験動物としての両生類の可能性について論議を加える。