

内分泌攪乱物質スクリーニングプログラムにおける 試験方法の妥当性確認の現状

ジェームス P. カリヤ
米国環境保護庁

皆さんこんにちは。本日、内分泌攪乱物質スクリーニングプログラムの米国における状況についてお話しできる機会を与えて頂き、環境省にお礼を申し上げます。このような国際会議において私どもの情報を皆さんにお伝えできるとをありがたく思います。

我々が行っているアッセイ妥当性確認試験の現在の進捗状態についてお話しする前に、我々が採用している妥当性確認の過程の概要をお話しし、アッセイの将来の利用のされ方について理解していただきたいと思えます。

我々は最初に、我々の妥当性確認の対象となる候補アッセイに関する文献を総覧します。次に、このような「妥当性確認前段階（Prevalidation）の作業をいくつか行います。これによって、アッセイを標準化、最適化し、アッセイの感度を可能な限り高めます。続いて、施設間の妥当性確認の過程を通じて、複数の試験施設が同じ化合物に対して同じ結果を出せることを確認します。性能に関する基準の確立もできます。この過程を経ることで、異なる情報源から得たデータの信頼性が判定できるようになります。既知の陽性物質を試験することで、アッセイの適切性が確立されます。我々のこうした試験を、専門家検討委員会にかけて、我々が行ってきた作業を第三者の科学者が承認できるようにします。

妥当性検討のこうした過程は、米国の『動物実験代替手法の妥当性に関する省庁間合同委員会（ICCVAM）』が開発したものです。この委員会についてはこの後の演者がもっと詳しく論じています。

内分泌攪乱物質スクリーニングプログラムを構築する際に、USEPA は独立した諮問委員会に助言を求めました。諮問委員会は、スクリーニングプログラムには次のような2つの段階で構築するように示唆しました。

1. 第1段階アッセイは、その化学物質が内分泌系と相互作用できるかどうかの判定に役立つもの（特にエストロゲン系、アンドロゲン系、甲状腺ホルモン系において。現時点ではそれ以外の内分泌系は除外）
2. 第2段階アッセイは、その相互作用を確認し、リスク評価に利用できる情報、すなわち用量反応の情報や、内分泌系への作用の有害性に関する情報などが得られるもの

諮問委員会が示唆したアッセイは次のようなものがありました。

第1段階：エストロゲン・アンドロゲン受容体への結合・転写活性アッセイ、子宮増殖アッセイ、ハッシュバーガーアッセイ、雌の春機発動アッセイ、カエル変態アッセイ、魚類生殖スクリーニング、ステロイド産生アッセイ、さらに、第1段階の一部のアッセイの代替になりうるアッセイとして、雄春機発動アッセイ、アロマターゼアッセイ、成体雄アッセイを、第2段階として、内分泌系のエンドポイントを加えた哺乳類2世代生殖毒性アッセイ、鳥類2世代アッセイ、両生類長期アッセイ、無脊椎動物長期アッセイ、魚類長期アッセイ。諮問委員会は、胎内期から授乳期までの曝露を組み込んだ第1段階アッセイを開発することも推奨しました。我々は、これらのアッセイ各々の妥当性確認の作業を行っているところです。これは、これらのアッセイの全部が最終的なスクリーニングプログラムに含まれることになるという意味ではありませんが、各アッセイの妥当性を確認することで、使用にもっとも適したアッセイの組み合わせを選び出すことが可能になります。

各アッセイに関する文献の総覧はすでに終了しており、これらのアッセイのほとんどにおいて、妥当性確認前段階に我々は進んでいます。では、それぞれのアッセイに対して我々が行っている妥当性確認の作業についてお話ししますが、子宮増殖アッセイとハッシュバーガーアッセイについては、すでにクーター博士からお話しがありましたので、割愛いたします。

エストロゲン受容体結合アッセイ

我々は、このアッセイのパラメータを最適化するための施設内試験をつい最近始めたところです。このアッセイは、すでに最適化がほとんど達成されていましたが、ICCVAM が招集した専門家委員会の助言に従って、若干の修正を加えることにしました。特に、遊離型エストラジールの分離について炭を用いた方法とハイドロキシアパタイトを用いた方法とを比較しています。また、タンパク質の分解を防ぐ目的でのプロテアーゼ阻害薬の利用についても調べています。さらに、放射線ラベルしたエストラジールの濃度の最適化の作業も行っています。我々は、このような最適化の作業は非常に時間がかかるものとは考えていません。

その次には、施設間の妥当性確認の作業に移行することになっています。予定では、5ヶ所の施設を用いることにしています。その多くは GLP 基準を満たしている施設ですが、この種の試験に関する GLP 基準適格の認証を受けていない施設も2つ含まれます。

サイトゾルの標本作成は、受容体結合アッセイを行う中でも比較的難しいステップですので、ほかのステップとは分けています。こうすることで、この特定のステップに関する施設間の標準化の難しさを、アッセイの他のステップと切りはなして検討することができます。

この施設間の比較の際には、一定範囲の結合親和性について試験を行うことになっています。その後、多数の化学物質を用いて、このアッセイを試験することになります。さまざまな結合力と化学構造を有する化学物質をおそらくは 20~30 種類くらいを用い、最終的に標準化されたエストロゲン受容体結合アッセイが調べたい化学物質に対して確実に感度を有するようにもっていきます。

最後の移行性試験は、文書化されたプロトコールを、そのアッセイに慣れていない施設が確実に順守できるようにするためのものです。こうした施設はおおむね、受容体系を用いたアッセイの経験がまったく無いわけではないのですが、エストロゲン受容体結合アッセイそれ自体には馴染みがないと思われます。

アンドロゲン受容体結合アッセイ

アンドロゲン受容体結合アッセイの妥当性確認は、エストロゲン受容体結合アッセイに若干遅れをとっています。我々は昨年、アンドロゲン受容体結合アッセイが実施可能であることを初めて実際に示しましたが、現在それを繰り返し確認しているところです。我々が用いようとしていたラット前立腺のサイトゾルは、受容体供給源としては最適ではないと考えられることを、専門家委員会の勧告に基づいて我々は認識しました。そこで我々は、その他の（遺伝子組み替え）供給源を実験する予定です。しかしながら、米国にはヒト遺伝子組み替えアンドロゲン受容体に関する特許上の問題がありますので、それらをこのスクリーニングプログラムのアッセイに含めることはおそらく不可能でしょう。

春機発動アッセイ

春機発動アッセイは、第1段階アッセイ群のリストの中で有望性のあるアッセイとして挙げられるものであり、我々はこのアッセイの妥当性確認がうまくいくことを期待しています。このアッセイは、内分泌攪乱に伴う種々のエンドポイントを試験するために EPA が開発したものです。特定のメカニズムによるエンドポイントに限ったものでなく、アピカルなアッセイです。

我々は、EPA 以外、研究施設以外の施設でこのプロトコールを正確に実施することが可能であることを示すために、契約施設において試験を行いました。この試験は、様々な化学物質の高濃度単回投与で行いました。現在は、低濃度のメトキシクロル、ビクロゾリン、フェノバルビタールを用いて、このプロトコールの感度について調べているところです。

また、別の試験において広範囲の化学物質についても調べています。雌の春機発動では、アトラジン、プロピルチオウラシル、ケトコナゾール、フェナリモル、メトキシクロル、ビスフェノール A へのアッセイの反応性について調べているところです。雄の春機発動では、アトラジン、プロピルチオウラシル、ビクロゾリン、リスロン、p,p'-DDE、ケトコナゾール、メトキシクロル、フェノバルビタールについて調べています。また我々は、エストロゲン様やアンドロゲン様物質および甲状腺ホルモン攪乱物質など、複数の異なる様式の内分泌攪乱現象に対応することを目指してきました。考えられるすべての作用様式、

特に甲状腺ホルモン系に完全に対応できているわけではありませんが、内分泌系攪乱には様々な様式が存在しており、それらすべてに対応することは不可能です。

カエル変態アッセイ

我々は現在、甲状腺ホルモン系への干渉をスクリーニングするためのカエル変態試験を開発しているところです。この件は、数年前に諮問委員会から我々に対して勧告がありました。「内分泌攪乱物質のスクリーニングと試験に関する諮問委員会 (EDSTAC)」が勧告したプロトコールは、感度がそれほど高くないことが判明しましたので、現在は、諮問委員会の勧告による方法ではなく、変態初期を用いた別のプロトコールの開発を目指しているところです。この前変態期アッセイの詳細は、我々のウェブサイトに掲載されています（ウェブサイトのアドレスは、この論文の末尾に記載）。我々が勧告を受けた時期よりも早い生育段階の方がその後の段階よりも感度が高いことを示したデータのまとめを、ジョー・ティートグ博士が「内分泌攪乱物質試験方法の妥当性確認小委員会」に対して発表しました。

魚類生殖スクリーニング

第1段階で用いるための魚類生殖スクリーニングの開発も行っています。この中では4種類の試験を行っています。ビテロゲニン測定法の比較、ビテロゲニンアッセイの種間比較、期間の異なる魚類生殖スクリーニング（21日間プロトコールと14日間プロトコール）の比較、アトラジン、ビスフェノールA、ジブチルフタル酸、p,p'-DDE、過塩素酸化合物、塩化カドミウムなど複数化学物質を用いた fathead minnow アッセイの評価の4種類です。

ステロイド産生アッセイ

ステロイド産生アッセイの開発も行っています。これは、第1段階アッセイ群のその他のものよりも、標準化や最適化がやや立ち遅れています。現在は、細切れにした精巢で発現するステロイド産生を測定していますが、動物個体から採取した組織を使わずともステロイド産生を調べることができる培養細胞株がすでに存在します。EPAは、このような細胞ベースのアッセイの開発を指向していますが、それが我々の内分泌攪乱物質スクリーニングプログラムそのものにうまく適合するとは限りません。

アロマトーゼアッセイ

我々が妥当性確認を行っているもう一つの *in vitro* アッセイが、アロマトーゼ活性のアッセイです。アロマトーゼ活性は、雄の春機発動アッセイではあまりうまく対応できないので、それに組み合わせて使う別のアッセイが必要になります。現時点では、使用するアロマトーゼの供給源として何を使うのかが確定していません。諮問委員会が勧告したのはヒト胎盤のアロマトーゼを用いることでしたが、ヒトの組織を用いることには困難さ（例えば、ヒト胎盤の入手の難しさ、ヒト組織に伴う疾患の懸念など）があるために、あまり魅力的な選択肢ではありません。現在我々は、ウシもしくはブタの胎盤がアロマトーゼの供給源として使えるかどうかを調べているところです[注：ウシとブタの胎盤は入手が困難な上に、アロマトーゼが少量しか取れないので、この方針は破棄された]。また、ヒトの遺伝子組み替えアロマトーゼについても検討しているところです。

その他に、アロマトーゼのプロトコールにおけるパラメータを最適化するための試験も別個に行っています。

さらに、いろいろな化学物質を用いてアロマトーゼアッセイの反応性を試験しています。

成体雄アッセイ

その次に我々が考えているアッセイは、成体雄アッセイです。これは最終的には、雄における内分泌攪乱現象をもっとも高い感度で検出するものとして、雄春機発動アッセイ、ハーシュバガーアッセイ、OECD 407 アッセイ（28日間反復投与アッセイ）に匹敵するものになる予定です。このアッセイの開発はEPA外で行われましたが、プロトコール自体は利用可能です。多数の化学物質に対応した試験方法が複

数、開発者によって公表されています。いくつかの化学物質については、この発表された試験方法以外の方法でも試験する必要があると我々は感じており、そうすればこれらのアッセイと、春機発動、ハーシュバーガー、407 などのアッセイとの間でもっと優れた比較ができるようになると考えています。予定では、リヌロン、メトキシクロル、アトラジン、トレンボロン、過塩素酸化合物、フェナリモル、ジブチルフタル酸を調べることにしています。現時点では、リヌロンとメトキシクロルについてのみしか予算がついていませんが、近い将来にはその他の物質についても予算が得られるものと期待しています。

哺乳類 2 世代生殖毒性アッセイ

哺乳類 2 世代生殖毒性アッセイでは、甲状腺ホルモン関係のエンドポイントについてのプロピルチオウラシルを用いた試験が完了しました。昨年に完了し、予備データを我々のウェブサイトに掲載しています。この試験に基づいた我々の結論によれば、2 世代生殖アッセイのエンドポイントとして T4、TSH、甲状腺重量、組織病理がおそらく加えられることになるでしょうが、T3 は加えられないでしょう。

また、動物を生後 21 日、生後 90 日、またはそれ以上の成熟をさせた場合に、F1 世代に及ぼされるその他の影響を観察できるかどうかを、別個の試験で検討していましたが、これも完了しました。2 世代試験では通常、（繁殖用つがいを一対残して）多数の個体を生後 21 日すなわち離乳期に殺処分します。問題は、胎児期に起きた作用が、生後 21 日までには顕在化しない可能性があることです。現在我々は、そうした作用の検出が可能かどうかを調べる試験を実施しているところです。もしそれが可能ならば、哺乳類 2 世代試験に適切な改変を加えることになるでしょう。

鳥類 2 世代アッセイ

現在、鳥類 2 世代試験に関連する試験を 3 種類実施しています。1 つ目が、ニホンウズラとコリンウズラとの感度の差に関する種間比較です。取扱いはニホンウズラのほうが容易です。ウズラを用いたアッセイは、短期間ですむ他にもいろいろ長所があります。この試験でデータが得られれば、この 2 種のウズラを賢く選択できるようになります。

2 つ目が投与試験です。これは、投与を開始する前に動物を性成熟させておくべきなのか、それとも、性成熟に達する前に投与を開始すべきなのかを調べる試験です。この両方ともにそれぞれ長所がありますが、どちらの投与方法をより感度が高いかを示すデータが必要です。

また、F1 世代への処置を、その一生を通じて行うべきかどうかという問題もあります。この問題は、投与試験の中で検討されています。投与試験は、予定では 2003 年 1 月に開始され、2004 年中に終了することになっています。

最後のものとして、卵注入試験を行っています。これは、この曝露方法によって、鳥類 2 世代試験における範囲決定に有用なデータが得られるかどうかを検討する試験です。投与試験と胚子アッセイ試験は、鳥類 2 世代試験をどのように行うかの決定に役立てるための特定試験です。

その他の試験

EPA はその他に、定量的構造活性相関に関する作業と、高速大量処理プレスクリーニングに関する作業を行っています。これは、内分泌攪乱物質スクリーニングプログラムではなく、研究開発局の手によって実行されています（内分泌攪乱物質スクリーニングプログラムの中では、我々は、2 種類の QSAR 法に関する妥当性確認試験を終了しています。その情報は近々公にできると思われれます）。

EPA は、春機発動アッセイに関する給餌制限試験を行いました。これは、動物への給餌量を減らして、春機発動アッセイにおける生殖エンドポイント、特に雄の包皮開裂と雌の腔開口にどのような影響があるかを調べるものです。結論としては、体重増加量が 10 から 12% くらいまで減少する程度では、春機発動アッセイにおける生殖エンドポイントに影響はまったく無いというものでした。このデータも近々公開できると思います。

低用量作用に関する我々の立場について、我々のウェブサイトに掲載しています。ぜひアクセスしてください (<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/>)。このサイトでは、内分泌攪乱物質スクリーニングプログ

ラムのあらゆる側面の情報とデータをできるだけたくさん掲載することを目指しています。何か疑問がありましたら、ウェブサイトをご覧ください。