

OECD/EDTA 第1回VMG Non-Animal 会合報告書案¹ (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、この報告書及びその勧告をテイクノートし、加盟国の約束事項を反映し、適宜ガイダンスや提案を行うことが懇請される。

冒頭

- ・ EDTAタスクフォースの非動物試験バリデーション管理小委員会 (VMGNA)の第1回会合は、パリにおいて3月17、18日に開催された。
- ・ 国立医薬品食品衛生研究所の菅野先生が議長に選任された。

開会及び背景

- ・ EDTAタスクフォース第6回会合は、2002年6月24～25日に東京で開催され、動物を必要としない、比較的安価で迅速なスクリーニングと試験が至急に必要であることの重要性が認識された。そしてインビトロ試験および非動物試験のための第三のVMGの設置は、時宜を得たものとされた。
- ・ この第6回会合で改訂された、OECD内分泌かく乱化学物質試験評価概念枠組に従い、VMGNAの任務は、右枠組のレベル1 (既存情報に基づくソート及び優先順位付け) 及びレベル2 (解析データを提供するインビトロ試験) での作業に必要な事項を提供するものであることとされた。

第1回会合の目的

- ・ VMGNAの第1回会合の主たる目的は、OECD試験法ガイドラインまたはガイダンス文書として採用するとの観点から、既存の試験法を把握し、または新規の試験法を提案すること、ならびに、見込みのある試験法について必要なバリデーション等の作業を提案することであった。主たる5つの分野について個別に討議時間を設けた。

- ① 高速スクリーニングシステム (HTPS) : 受容体結合試験
- ② HTPS : アロマトラーゼ及びステロイド産生試験
- ③ HTPS : レポーター遺伝子転写活性 (TA) 試験
- ④ QSARSその他インシリコ手法
- ⑤ インビトロ細胞/組織試験

・ 各討議時間において、発表者は、次の事項を念頭において、各自の試験法の現状と今後の予定について説明を行うこととされた。

- ① 最も優先度が与えられるべきバリデーションが済んでいる試験法はあるか？
- ② バリデーション作業を必要とするもののプレバリデーションが済んでいる試験法はあるか？
- ③ バリデーション作業を検討する前に更に最適化とプレバリデーションが必要な有望な試験法は？
- ④ DRPの作成は必要であるか？
- ⑤ その他

提案された試験法の現状、DRP作成の必要性

受容体結合試験

- ・ 米国EPAは、ラットの子宮細胞およびラット前立腺細胞試験を活用した、エストロゲン受容体およびアンドロゲン受容体の結合試験のバリデーション計画について発表をした。試験プロトコルの最適化、選定された5試験所におけるパフォーマンス判断基準の策定、20~30物質を用いた感受性と特異性の確認を行うこととしている。右試験法の開発の後、ICCVAMとNICEATMの内分泌かく乱化学物質専門委員会の勧告に基づき、遺伝子組換え受容体結合試験の開発を行う予定との由。

1) ENV/JM/TG/EDTA/RD(2003)12の概要等を参照した。

- ・ 経済産業省は、ヒト、ラット、メダカ、ニジマス、マミチヨグ²およびコイの各エストロゲン α 受容体、ならびにヒト、メダカおよびコイのエストロゲン β 受容体についての結合試験を開発したことを発表した。ヒトのエストロゲン α 受容体への結合試験は948物質について実施済み。
- ・ 菅野先生からは、表面プラズモン共鳴（SPR）を用いた、アゴニスト、アンタゴニストまたは非結合物質の峻別を可能とする有望な手法について発表がなされた。問題点として、使用されている遺伝子組換え受容体の安定性を指摘した。さらに高度の親和性を有する物質は「飽和」を呈する傾向にあるものの、この試験法の目的が弱いアゴニスト／アンタゴニストの検出にあるため、さして問題とはならない旨の説明があった。
- ・ 会合は、将来の作業も勘案し、現時点において、VMGNAの作業計画からエストロゲン β 受容体を除外するべきではないと勧告した。日本およびオランダからエストロゲン受容体 β に係る作業について発表があり、オランダからは、遺伝子組換え甲状腺受容体 α/β 試験とチロキシン運搬タンパク結合試験の開発を行っている旨、発表があった。
- ・ ICAPOは、インビトロ甲状腺スクリーニング試験に係るDRP案を発表した。このDRPでは、ヒトのチロキシン結合グロブリン（TBG）を用いた血清タンパク結合試験、転写活性試験、甲状腺ホルモン合成を特異的に標的にしたFRTL-5細胞³を用いた試験などに触れている。右DRPではTBGとFRTL-5細胞を用いた試験を、プレバリデーション／バリデーションを行う有力候補としている。出席者からは、TBG試験が非特異的ではないかとの懸念が表明された。
- ・ 日本は、FRTL-5の変異株を含む4つの細胞ラインを有しており、甲状腺ホルモン産生阻害に対処しうること、エンドポイントはELISA法により定量されるチロキシンであることを発表した。

アロマトラーゼおよびステロイド産生

- ・ 米国EPAは、アロマトラーゼについてのDRP案を発表し、ヒト胎盤細胞アロマトラーゼ試験を第一のインビトロ試験として推奨した。現在、ヒト、ウシ、ブタの胎盤を用いて胎盤アロマトラーゼ試験のプロトコルの最適化作業を行っている。ヒト遺伝子組換えアロマトラーゼ試験と胎盤アロマトラーゼ試験のパフォーマ

² 米国大西洋岸に生息するメダカ目の淡水魚。

³ ラット培養甲状腺濾胞細胞

ンスを比較する研究が2003年5月を目標に実施される予定。ヒト遺伝子組換えアロマトラーゼ、さらに胎盤アロマトラーゼ試験についての試験所間バリデーション作業が行われる予定。

- ・ 経産省は、KGN細胞(ヒト卵巣腫瘍細胞)を用いた高速ELISA法により、アンドロステンジオンからエストロンへの変換を検出する試験法をについて発表を行った。試験法そのものは大塚製薬により実施されている。
- ・ 米国EPAは、EDSTACによる勧告によるものとして、物質のステロイド産生転換活性を評価する最も有望なスクリーニング試験法としてインビトロ精巣横断切片試験を推奨するDRP案を発表した。2003年5月を目標に、現在、定量法(テストステロンRIA、乳酸脱水酵素)および実験条件(培養のための媒体、温度、用量、環境等)に関して最適化研究を行っている由。約15物質について試験を実施し2003年秋までにデータが得られる見込み。試験所間のバリデーションも計画中。
- ・ 米国EPAは、細胞をベースとしたステロイド産生転換作用の検出のための試験法が最終目標であると考えている。そのため、コレステロールから17 β エストラジオールに至るステロイド産生経路を完全におさえる細胞ベースの試験法プロトコルの開発に研究費を出資した結果、ヒトの副腎皮質がん細胞ラインであるH295Rが最適であると考えられるに至り、現在このプロトコルの標準化作業が行われている。この試験法について全面的なバリデーション計画をたてており、試験法が完成次第、精巣横断切片試験にとってかわるものと考えられている。プレバリデーションとして15~20の物質について試験を行う予定で2003年中の終了を目指している。米国EPAはH295R細胞ラインに関するプレバリデーションデータ、標準作業書(SOP)、15~20物質の内訳を日本に情報提供することを申し出た。

レポーター遺伝子転写活性試験

- ・ 1999年からの厚労省と経産省の合同プロジェクトである、高速化されたレポーター遺伝子転写活性試験の開発について発表があった。これまでにヒトのエストロゲン受容体 α 、ヒトのアンドロゲン受容体およびラットのエストロゲン受容体 α の一時的発現システム試験法と、ヒトのエストロゲン受容体 α の安定細胞系(HeLa細胞がベース)が開発された。一時的発現のエストロゲン受容体 β および安定なヒトアンドロゲン受容体の開発は現在実施中。ヒトのエストロゲン受容体 α を導入した安定な細胞系によるレポーター遺伝子試験のバリデーション作業について次回会合において発表する由。
- ・ 厚労省からは、経産省との合同HTPSプロジェクトで得られたデータを用い

て、詳細試験につながる優先リストを作成する方針であることが発表された。

- ・ 厚労省と経産省からは、チャイニーズハムスター卵巣細胞から得られた細胞に遺伝子操作を加えてルシフェラーゼ（エストロゲン受容体 α/β 、アンドロゲン受容体、甲状腺受容体、及び甲状腺刺激ホルモン）が発現するようにされた、安定な細胞ラインが入手可能であり、有用と思われることを指摘した。
- ・ 環境省は、メダカのエストロゲン受容体 α/β に係る細胞ラインを作成し、現在この細胞を用いたレポーター遺伝子試験を開発中。
- ・ 米国EPAは、MDA-kb2細胞ラインを用いた、アンドロゲン受容体とともに糖質コルチコイド受容体をも発現する、アンドロゲン受容体転写活性試験を開発した。この細胞ラインは市販されている。17物質をバリデーション済み。現在米国国内の10の試験所がこの細胞ラインを用いて、試験法の安定性等を確認中。さらにT47Dヒト乳がん細胞ラインを用いた、エストロゲン受容体転写活性システムが開発中であり、とりあえずの作業結果が2003年12月までにまとまる。しかし予算上の事情から、これらの試験法のバリデーション作業が実施されるメドはついていない。
- ・ 会合では、どの試験法が有望であり将来において重要性を持つかについて、引き続きオープンに取り組んでいくことの重要性を確認した。また、将来において、今回会合において発表されなかったレポーター遺伝子転写活性試験法が将来必要になるかもしれないことを強調した。さらに、各種試験法の結果をよりよく判断できるよう、測定対象物質には弱いアゴニストを加えるべきことが提案された。

QSARS

- ・ 厚労省が、結合エネルギーの計算に5つのリガンド結合ポケット構造テンプレートを用いた、自動ドッキングモデル（ADAM）について発表を行った。このモデルでは、例えばCOMFAモデルにおけるような、学習データセットを必要としないことが強調された。すでにACD（Available Chemical Directory）の2万余の化合物について、バーチャルスクリーニングを実施し、約2000化合物をエストロゲン受容体結合候補物質としてリストアップした。膨大な擬陽性物質を選び出してしまうのではないかと心配は取り越し苦労であった。2000化合物のリストには、ステロイド骨格を有するものが含まれ、エストロゲン受容体結合物質としては知られていないような物質が多少含まれていた。このリストは、すでに、厚労省の内分泌かく乱化学物質試験法スキームに用いられているが、それが可能なのは、優先順位をつけるために用いているからであり、リストから陰性物質を取り除くために使用していない

からである。

- ・ 経産省からは、三次元QSARについて発表がなされ、これまで950物質についてスクリーニングがなされ、2004年には完成の見込みであるとされた。擬陽性率があまりにも高すぎるので、ドッキング計算を取り入れ、結合の弱い物質についての予測の正確性を高めようとしている。ハンガリーからは、エストロゲン受容体には6通りの立体構造が知られており、この点が考慮されていないために、いずれのモデルもあまりよくない結果に終わっていると指摘した。
- ・ 米国EPAは、CompuToxプログラムのバリデーションを行ってきたが、ポケットの立体構造の問題から、これは失敗に終わった。しかしながら、このデータをOECDのために、VMGNAのメンバーに開示する用意がある。予算上の都合により将来のQSARSに関する作業は困難であるとの由。
- ・ 会合において、QSARSについて呈された主たる問題点は、以下のとおり。
 - ① リガンドの小さな構造変化に対するドッキングモデルの感度と特異性。
 - ② どれだけの受容体を考慮に入れるべきか。
 - ③ 弱いアンタゴニストとアゴニストへのドッキングモデルの感度。
 - ④ わずかな受容体の結晶構造しか判明していないことを踏まえて、得られたデータの限界をどう取り扱うか。
 - ⑤ ポケットの立体構造変化にどう対処するか。
 - ⑥ 数十万もの化学物質をスクリーニングした際に生じる膨大な数の擬陽性をどう扱うべきか。
- ・ QSARSのバリデーションは、国際的に合意されたバリデーション手続きに則って行われるべきであるとの強い要請があった。3月31日～4月1日のQSARに関するOECD専門家グループの第1回会合の成果を受けて、小さなQSARタスクグループを設置すべきとの勧告がなされた。このタスクグループの主たる目的は、様々なモデルから得られるデータを把握し収集することであるとされた。タスクグループはECVAM、ICCVAM及び日本の各省から構成され、次期VMGNAの会合の前に設置されることとなった。QSARタスクグループのメンバーには、OECDのパスワード保護ウェブサイトにおいて、データが共有されることが提案された。日本は、秘密保持の上でデータを共有すると言明した。タスクグループは、QSAR専門家グループ

と密接に連携することとされた。

- ・ 会合は、QSAR専門家グループの成果を、内分泌かく乱化学物質のためのQSARモデルのバリデーションに取り入れることの重要性を指摘した。QSAR専門家グループ会合のホストであるECの合同研究センター(JRC)は、QSARのバリデーションは、一般論ではあるが、他のインビトロ試験と同様、独立したピアレビューを含む、厳格な手続きによるべきとした。QSAR専門家グループ会合の報告書は、全てのVMGNAメンバーに提供される。

インビトロ細胞/組織試験

- ・ 会合において、物質の代謝という複雑かつ困難な課題に対処すべきか何度も議論された。これは、大抵の細胞ベースの試験法において用いられる細胞ラインの代謝能が極めて限定的であることによる。オランダから提案のあったS9mixプロトコルは、最適化が困難であるとの認識が会合出席者の大部分を占めたが、結局一致した見解は得られなかった。事務局は、ICAPOに対し、代謝を考慮した試験法のDRP案を作成する意志があるのか、確認するよう依頼した。

一般討論

特許

- ・ 発表された試験法のいくつかにおいては、技術や物質が特許で保護されていることから、特許が問題となる可能性が指摘されたが、会合においては、かかる事項は、より高いレベルにおいて討議されるべき政策事項であるとして、詳細については討議されなかった。

バリデーション手法

- ・ ECVAM及びICCVAMの提案に基づき、OECDのバリデーションの判断基準と原則に従った手続きで、バリデーションがなされることについて同意された。米国EPAからは、新たな試験法がVMGNAに持ち込まれたときに考えられるシナリオとして次の4つを挙げた。
 - ① OECDが、VMGNAまたはVMGNAの下に置かれた専門家グループとともにプレバリデーションとバリデーションを調整し、OECD試験ガイドラインを作成することを目的として、技術的作業を主導する。

- ② リード国がプレバリデーションデータを作成し、VMGNAに持ち込む。OECDは、OECD試験ガイドラインを作成することを目的として、バリデーション作業を調整し主導する。
 - ③ リード国が、プレバリデーションとバリデーションの全てを実施し、OECDにそのデータを持ち込み、ガイドライン策定を検討する。
 - ④ OECDが、加盟国間の情報交換をとりもつものの、OECDガイドラインは策定されない。
- ・ 実際のバリデーションが行われる前に、徹底したプレバリデーションの重要性が確認された。会合では、上記シナリオのうち②および③が、新しい試験法のバリデーションを行う場合には現実的であり、好ましいものとされた。また、OECDの主たる役割は、各加盟国によりなされるバリデーション作業の調整であろうとされた。

GLP

- ・ いかなるバリデーション作業においても、GLPの適用は重要であるとの認識が一部の者から示された。他者は、かかるバリデーション作業の多くを行うのは、大学や政府の研究機関であることから、GLP原則の遵守は、実際的である限りにおいては好ましいとの考えを示した。ここでいうGLP原則とは、標準作業書の遵守、機器のキャリブレーション、及び手続の文書化といったことである。事務局からは、
 - ① GLPは、プロジェクト管理に対してではなく、試験所に適用されるもの。
 - ② 全ての試験所は、詳細な標準作業書を作成して活用し、詳細な記録の保存や報告といった、作業の十分な透明性を確保する。
 - ③ 品質管理の正式な監視、実地バリデーションを常に行う必要はない。
 - ④ バリデーションの主催者は、GLP試験所の数を最大化すべきであるが、上述したようなGLPをほぼ満たしていると思われる試験所も受け入れることができる。
 - ⑤ プレバリデーションや試験所間バリデーションをはじめとする全てのバリデーションは、GLPに基づくべきである。

- ・ 「GLP原則に基づき」との表現は、受入可能かもしれないが、インビトロ試験のバリデーションに完全なGLP適合試験所を追求することは避けたいとする出席者がいた。これについての同意は困難と判断された。
- ・ 大野先生から、GLPに関する問題は、以前にOECDの「GLPとインビトロ試験に関する会合（2003年3月4日）」にて討議され、「GLPへの完全な適合は厳格に要求されるものではないが、個別試験はGLP原則に従うべきである。」との合意がなされたことが紹介された。

約束事項と今後の予定

受容体結合試験

- ・ 米国EPAによるラット子宮細胞エストロゲン受容体結合試験のバリデーションは、1年以内に終了し、次回VMGNA会合にて発表される。EPAは、20～30物質の標準セットを他の希望する試験所に配布することができるとした。
- ・ 米国EPAによるラット前立腺アンドロゲン受容体試験のバリデーション作業は、端緒についてばかりであり、予定はたっていない。しかしながら、EPAは、ICCVAM/NICEATMの内分泌かく乱化学物質専門委員会の勧告を踏まえて、遺伝子組換えエストロゲン/アンドロゲン受容体への結合試験の開発を主導し調整を行うことに合意した。経産省は、既に遺伝子組換えエストロゲン受容体 α を用いた試験を実施しており、ECのディートリッヒ氏がバリデーションへの参加に関心を示した。会合においては、この作業は経験を有する試験所でなされるべきとの強い意向があった。
- ・ ICAPOは、甲状腺DRP案の改訂し、OECDのDRPとすることの可能性を調査することとされた。
- ・ CER1は、甲状腺ホルモン産生阻害に関する試験系としてFRTL-5細胞ラインを用いた系を試行し、結果を次回VMGNAに提供する。

アロマトラーゼおよびステロイド産生試験

- ・ 日本は、引き続きKGN細胞ラインを用いたアロマトラーゼ試験の開発を行う。他者から、H295R細胞とKGN細胞との同等性をみるため、測定対象化学物質のリストと、可能であれば実際に用いる化学物質サンプルを共有したいとの意向が示された。CER1の武吉氏がこの作業を調整する。

- ・ 米国EPAは、H295R細胞ラインを用いた完全なステロイド産生経路試験の開発を探求し、2004年1月までにプロトコルを最適化し、いくつかの物質について初期試験データを得る。結果はVMGNAに報告される。

レポーター遺伝子転写活性試験

- ・ CER Iの武吉氏が、レポーター遺伝子転写活性試験の開発に向けた将来の作業の調整のため、作業グループの設置を主導する。CER Iからは、既にプレバリデーションは終了しておりバリデーションに入りたい旨の希望が表明された。今後、CER Iは、標準物質を他の参加試験所に提供することの可能性について調査する。米国EPAは、標準物質リストの提供を申し出るとともに、希望する試験所に実際の標準物質を送付することを申し出た。厚労省は、エストロゲン受容体 α / β 試験のプレバリデーション/バリデーションの結果を次回VMGNA会合において提供する。
- ・ 経産省は、ヒトのエストロゲン受容体 α を導入した安定な細胞ラインを用いたレポーター遺伝子試験のバリデーション研究について発表を行う。
- ・ オランダは、様々な細胞ラインとの比較について検討に参加することを申し出た。またフランスは、細胞ベースの試験と、ヌードマウス発光試験とを比較をすることを希望した。

QSARS

- ・ ECVAM、ICCVAM、日本の各省で構成されるQSARタスクグループの設置が合意された。このタスクグループは、次回VMGNA会合の前に設置され、OECDのQSAR専門家グループによりアウトライン化されるQSARバリデーション原則を取り入れる。

インビトロ細胞/組織試験

- ・ 事務局は、ICAPOに対し、代謝に関するDRPを用意することを検討するよう要請した。しかしながら財政上の問題から、専門家からのインプットなしにはICAPOはDRP案を作成することができないとされ、VMGNAのメンバーに対し、支援が要請された。

結語

- ・ 会合報告書は第7回EDTAに提出され、各勧告について承認を得るものとされた。