

Appendix 1

2006年8月1日付

化学品承認委員会（Chemical Approval Board, CAB）報告書の概要

CAB 委員名簿

Dr. Taisen Iguchi, Okazaki Institute for Integrative Bioscience, NIBB

Dr. William Kelce, Pozen Pharmaceuticals

Dr. Weida Tong, NCTR, US FDA

1996年、US Environmental Protection Agency (EPA)は、食品品質保護法 (Food Quality Protection Act: FQPA)により、内分泌かく乱物質スクリーニングプログラム(Endocrine Disruptor Screening Program: EDSP)の開発を義務付けられた。EDSP プログラムの一環として、EPA はエストロゲン受容体 (Estrogen Receptor: ER) と相互作用する化学物質のスクリーニングに ER 結合アッセイを使用することを提案した。EPA は2000年に、代替法の妥当性確認に関する ICCVAM に対し、ER 結合アッセイに関する文献をレビューし、公表された文献のデータに基づいてアッセイの妥当性を確認するよう依頼した。Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) は、多くの ER 結合アッセイが文献で報告されているが、ER 供給源 (組換え、組織、細胞株) は共通のものが使用されておらず、共通のプロトコールも使用されていないことから、どの ER 結合アッセイも検証するための情報が不十分であるとの結論に至った。ICCVAM は、2003年に「ラットまたはヒト組み換え ER (a および b サブタイプ) 結合アッセイが、試験方法の標準化、事前検証、および検証のための最優先事項である」と勧告した (ICCVAM, 2003)。

これを受けて、2003年3月に、米国 EPA は、Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)の非動物試験用バリデーション管理グループ (Validation Management Group for Non-Animal Tests: VMG-NA) が、組換え ER 結合アッセイの開発を主導し、調整することに合意した。この目的のために、2種類のヒト組み換え ER α タンパク質 (human recombinant (hr) ERa) と、2つの異なる結合試験のプロトコールが検証に用いられた。2種類の hrERa タンパク質は、Pan Vera hrERa (PV-ER ; バキュロウイルス発現全長 ERa 受容体) と CERI タンパク質 (CERI-ER; 大腸菌産生 ER リガンド結合ドメインに Glutathion S-Transferase (GST)融合タンパク質を連結したもの) である。2つのプロトコールは、CERI アッセイ (日本 CERI が開発) と Freyberger-Wilson Assay (FW) アッセイ (Alexius Freyberger 氏が開発し、Vickie Wilson と Alexius Freyberger の両者によって最適化) である。FW アッセイは PV-ER を使用し、CERI プロトコールは CERI-ER を使用した。

これらの hrER 結合アッセイの使用を検証するための国際的な取り組みが、OECD を通じて行われた。バリデーションのステップには、標準化されたプロトコールの開発、他の検査機関研究室へのプロトコールの技術移転性の検証、プロトコールが施設内および施設間で、同一化学物質について再現性のある結果を出すことの証明、および化学物質のアッセイの信頼性の検証が含まれる。プロトコールの標準化に次いで、プロトコールの移転性と適用性を検証す

るために、施設間の検証で使用する一連の化学物質のセットを決めることが必要である。OECD の hrER 結合アッセイ検証グループが、結合アッセイにおける過去の使用実績、結合強度、化学構造の多様性に基づいて一連の化学物質を提案した。ER に対する親和性が知られている化学物質を、構造的に多様であるが ER 結合試験履歴のない化学物質よりも優先的に選択した。既知および報告されている結合親和性値と一致する結合活性に基づいている。OECD の hrER バリデーショングループは、化学品承認委員会 (CAB) に対して、タスク I、II、III にノミネートされた化学物質をレビューし、修正を提案することを任務としている。

施設間試験は、両方のプロトコルとそれぞれの hrER タンパク質を用いて、3 段階のタスクで実施されることになった。施設間バリデーションに参加する施設には、FW アッセイと CERi アッセイの両方での経験がある 2 つの施設 (ヨーロッパ 1、日本 1) と、結合アッセイの経験はあるが FW アッセイや CERi アッセイを特別に実行したことがない 3 つの施設 (ヨーロッパ 1、米国 2) が含まれている。3 つのタスクについては、下記の通り。

タスク I：試験実施施設は、標準化学物質と陰性化学物質を使用してアッセイを実施する能力を実証する。タスク I の化学物質は、高結合親和性の標準物質 (17 β -Estradiol)、中程度結合親和性の標準物質 (Norethynodrel)、および陰性物質 (Dibutyl phthalate) である。これら 3 物質は、参加施設の試験の試験能力が基準を満たすことを検証するために、すべての試験参加研究室で評価する。17 β -Estradiol は内因性リガンドであり、Norethynodrel は、中等度のエストロゲン作用物質であり、Dibutyl phthalate は、2 つのアッセイプロトコルの両方で陰性である。これらの 3 つの基準物質は、内部コントロールとして、タスク II および III のすべての実験で試験した (すなわち、それぞれの実験で、またはアッセイ実施日毎に)。

タスク II：タスク 2 は、以前に FW アッセイと CERi アッセイで試験され、EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL ECVAM) でレビューした 12 の物質を用いて、施設内および施設間で再現性のある結果を得るための参加施設の能力を試験する。これらの化学物質は、化学物質をコード化することなく試験した。このタスクでの試験物質の総数は、9 種類の化学物質 (超強結合物質 DES, 17 β -Ethinylestradiol; 強結合物質 Meso-Hexestrol; 中結合物質 Genistein, Equal; 弱結合物質 Butyl paraben, n-butyl 4-hydrobezoate, Nonylphenol, o,p'-DDT; 非結合物質 Corticosterone) に 3 つの標準物質 (17 β -Estradiol, Norethynodrel, Dibutyl phthalate) を加えた 12 種類である。

タスク III：タスク 3 は、過去に他の結合アッセイプロトコル (ラット子宮サイトゾールまたは hrER のいずれか) で試験したことがあるが、まだ FW アッセイまたは CERi アッセイでは試験の経験がない施設の、9 物質を用いた試験で、施設内および施設間で再現性の高い実験結果を得るための参加施設の能力を調べるため、試験物質をコード化した。既知の結合親和性に対応した結合結果が得られると期待された。これらの化学物質は、期待される結

合親和性とその構造的多様性に基づいて選択された。リストには多数の弱結合物質や非結合の陰性の物質が含まれており、施設間での再現が最も困難である。

この提案に対して、CAB は、タスク I および II に指定された化学物質が適切であることに合意した。タスク I および II の化学物質はそれぞれのタスクで示した。

タスク III については、CAB は、特異度、感度、正確度の点でアッセイの性能をより良く評価するために、結合活性が弱い、または全くない化学物質に重きを置くことを提案した。具体的には、CAB は Estrone (強結合剤) を外し、Enterolactone と Benz(a)anthracene (弱結合剤) と Atrazine (非結合剤) を追加することを提案した。Enterolactone の追加は、化学物質リストの構造の多様性を高め、食品の腸内代謝物であるリグナンを追加することになる。Benz(a)anthracene は、既知の弱結合物質の追加であり、Atrazine は、ER を介さないエストロゲン活性化化合物の追加となる。このことは、ER 結合がエストロゲン活性化化合物の作用モードを区別するためのメカニズムツールとして使用できることを示すことになる。結果として、タスク III の化学物質は、標準の 3 物質に加えて、強結合物質 (Zearalenone, Tamoxifen)、弱結合物質 (5 α -Dihydrotestosterone, Bisphenol A, 4-n-Heptylphenol, Kepone (Chlordecone), Benz(a)anthracene, Enterolactone)、非結合 (陰性) 物質 (Progesterone, Octyltriethoxysilane, Atrazine) の 11 物質を試験物質として承認した。

CAB は、Equol (Apin 社より提供) がラセミ混合物であることを認め、承認した。天然の Equol は S(-)エナンチオマーであるが、両方のエナンチオマーは hrER に対して類似の結合親和性を有しており、そのため CAB はこれが被験物質選択上の障害になるとは考えていない。