

米国環境保護庁の内分泌かく乱物質スクリーニング計画に対する取り組み

住友化学株式会社
生物環境科学研究所

南 健 太
於 勢 佳 子
山 口 尊 史

Approach to Endocrine Disruptor Screening Program of Environmental Protection Agency

Sumitomo Chemical Co., Ltd.
Environmental Health Science Laboratory
Kenta MINAMI
Keiko OSE
Takafumi YAMAGUCHI

The existence of endocrine disrupting chemicals (EDCs) was suggested in the late 1990s, and concern about their effects on humans and wild animals has gathered a lot of public attention. This resulted in a worldwide reinforcement of regulations for EDCs, and the U. S. Environmental Protection Agency published their Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) and started an evaluation of EDCs.

In this article, we introduce our approach to and achievements in the evaluation of EDCs. In addition, we provide an overview of EDSP and the result of an EDSP assessment of Sumitomo Chemical's compound, Pyriproxyfen.

はじめに

化学品に対する安全性意識の高まりとともに、内分泌かく乱物質（Endocrine disrupting chemicals；ED物質）を適切に規制することは世界的に重要課題となっている。世界保健機関（WHO）は2002年に国際化学物質安全性計画（IPCS）を通じて「ED物質とは、生物個体の内分泌系の機能を変化させることによって、その個体またはその子孫の健康に有害な影響を及ぼす外因性物質またはその混合物である」と提唱¹⁾している。しかしながら、ED物質を適切に評価・分類し、管理・規制する定まった手順は未だない。

ED物質が世の注目を集めた発端としては、シーア・コルボーン博士らが1996年に出版した「Our Stolen Future（奪われし未来）」²⁾という著書を挙げることができる。同書では、ED物質は世界的な環境生物減少の要因であるとの仮説を提唱している。種々の調査データに基づき、ED物質は環境生物の繁殖性に影響を与えており、ヒトに対しても精子数の減少の懸念が示された。これら生殖能力の低下を示す報告の全てがED物質に関係していると証明されたわけではなく、現在も議論は継続されているが、同書のインパクトは非常に大きく、

日米欧を中心とした各国の規制当局がED物質の規制強化に乗り出すきっかけとなったと言える。

こうした状況下において米国議会は、ED物質の管理・規制対応を開始すべく1996年に食品品質保護法を可決した。米国環境保護庁（Environmental Protection Agency；EPA）は法案の可決を受けて、1998年に内分泌かく乱物質スクリーニング計画（Endocrine Disruptor Screening Program；EDSP）³⁾の概要を公表し、農薬・化学物質の調査を開始した。2009年、11種の試験法ガイドラインが発効されると同時に、EDSPによる農薬・化学物質の評価が開始されている。本稿では、EPAが主導するEDSPの詳細を紹介するとともに、当社のEDSPに対する取り組み事例として昆虫成長制御剤であるピリプロキシフェンの評価結果を紹介する。なお、2015年、EPAはピリプロキシフェンの評価について当社の判断に概ね同意し、追加評価は不要と判断した。

内分泌かく乱物質（ED物質）の評価および規制上の課題

WHOが提唱した定義にもあるように、ED物質は生体の内分泌系へ作用し、その個体や子孫に有害な影響

を及ぼすものである。一方、植物性エストロゲン（ダイゼイン、ゲニステインなど）といった自然界に存在する物質も内分泌系に作用することが知られている。したがって、ED物質を適切に管理・規制していく上では、科学的に妥当な手段により、その作用性と許容できる曝露量を明らかにすることが重要になると思われる。

ED作用に関連する代表的な内分泌系について紹介した後、ED物質評価の規制上の課題について以下に述べる。

1. 代表的な内分泌系とホルモン

代表的な内分泌器官として、生殖能力の獲得および維持に必要である性ホルモン（雌性；エストロゲン、雄性；アンドロゲン）を産生・分泌する卵巣や精巣といった性腺（Gonads）や、脳の発達および成長に必要である甲状腺ホルモンを産生・分泌する甲状腺（Thyroids）が挙げられる。また、性ホルモンや甲状腺ホルモンなどの産生・分泌は、脳の中核にある視床下部（Hypothalamus）や下垂体（Pituitary）によって調整される。したがって、視床下部-下垂体-性腺軸（HPG軸）および視床下部-下垂体-甲状腺軸（HPT軸）への影響を適切に評価することが重要となる。Fig. 1に代表的な内分泌系とホルモンを示した。

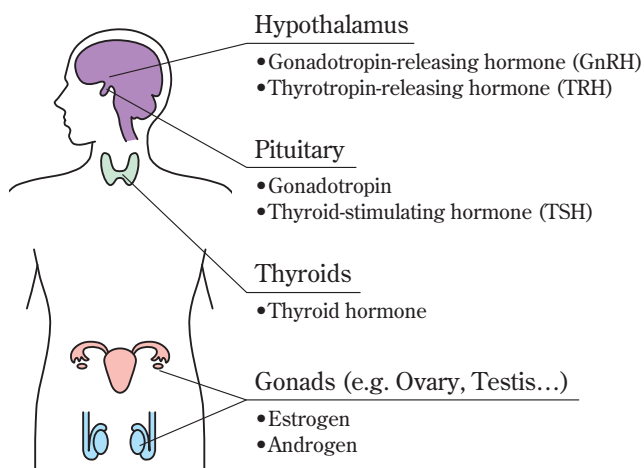


Fig. 1 Representative organs on endocrine system and typical hormones

経済協力開発機構（OECD）では1998年に重点活動項目として、内分泌かく乱作用を有する可能性のある化学物質をスクリーニング評価するため、試験法ガイドラインの改訂および新規作成を実施している。ED物質の標的としては、HPGおよびHPT軸への影響が重要視されている。それは、試験法の開発がエストロゲンおよびアンドロゲン作用、甲状腺への影響ならびにス

テロイドホルモン産生阻害に着目したものから進められたという事実からも読み取ることができる。

2. 規制上の課題

ED物質による内分泌系への毒性影響の評価手順については定まったものがない。長年にわたって世界中で議論が継続されているが、今なお統一見解として合意されたものはなく、専門家による判断に委ねられているのが実状である。したがって、各国の規制当局が、特定の化学物質の評価において異なる判断を下す例もある。

後述するように、米国におけるEDSPは世界に先駆けて体系的にED物質を評価し、規制する取り組みであり、各国の規制当局および産業界が進捗状況を注視している。

ED物質評価に向けた当社の取り組み

1. OECD試験法ガイドライン策定への参画

当社ではED物質への社会的関心が急速に高まった1990年代以降、ED物質の評価を目的とした技術開発に取り組んできた。当時、ED物質はヒトおよび環境生物の存続に対する脅威であるとの社会的不安を扇動する報道もあり、従来の安全性評価手法について見直しを進める機運が高まっていた。特に生殖（繁殖）能力への影響を中心とした懸念が広がっていたこともあり、生殖関連器官（性腺および副生殖器等）および性ホルモンへの影響を精査する技術の確立が世界的にも進められていた。

OECDでは1998年、優先的に有効性を確認すべき試験法ガイドラインとして子宮肥大試験（OECD TG 440）、Hershberger試験（OECD TG 441）および28日間反復投与毒性試験（OECD TG 407）の3種を選択した。続いて内分泌系への影響評価に関連する多くの試験法（培養細胞等を用いた試験管内（*in vitro*）試験、環境生物を用いた試験など）が整備された。そのような状況の中で当社は、OECD試験法ガイドライン策定に参画し、科学的根拠に基づいた意見を提言するとともに、国際検証試験を実施しデータを提供するなど試験法の確立に貢献してきた⁴⁾⁻⁶⁾。また、エストロゲン受容体（ER）転写活性化試験（OECD TG 455）の開発では、国家プロジェクトに参画し、多数の試行を繰り返した結果、当社が作製した組換え細胞が試験用標準細胞（hER α -HeLa-9903）として採用されるに至った。

2. 社内評価体制の整備

一般的な毒性試験において毒性上の懸念を網羅的に検討し、内分泌かく乱作用の懸念が払拭できない化学

物質については毒性メカニズムに踏み込んだ評価技術を用いて追加評価を実施している。例えば、構造類似性による予測、各種*in vitro*試験の実施、さらには短期間で評価できる生体を用いた試験 (*in vivo*試験) の実施等である。また、必要に応じて内分泌系への毒性影響の有無を長期間にわたって評価するラット繁殖試験などで最終確認している。環境生物に関しても必要に応じて魚類短期繁殖試験および両生類変態試験を実施できる体制を整えている。両生類については、生物飼育法から病理組織学的検査法まで種々の検討を実施することで評価系を確立し、社内での精緻な安全性評価の実施が可能である⁷⁾。加えて、報告例の少ない鳥類におけるアンドロゲン作用に対する簡易評価系として、ニホンウズラ胚を用いた試験を社内でも構築しており、社内評価に用いている⁸⁾。

内分泌かく乱物質スクリーニング計画 (EDSP)

EPAは1998年にEDSPの概要を公表し、農薬・化学物質の調査を開始した。ここでは、EDSPの概要について紹介するとともに、当社開発の昆虫成長制御剤であるピリプロキシフェンにおける対応およびEPAの評価結果について報告する。

1. EDSPの概要

1996年に米国議会において可決された食品品質保護法の要求事項に基づき、EPAは「検証された試験および科学的情報を用いて、特定の物質がヒトに対してエストロゲン系あるいは各内分泌系に影響を与える可能性を評価するスクリーニング計画」の策定に着手した。続いて諮問機関である「内分泌かく乱物質スクリーニング及びテスト諮問委員会 (EDSTAC)」が設立された。EDSTACは報告書⁹⁾においてスクリーニング試験によるポテンシャル評価 (Tier 1) および生活環を網羅した試験による有害影響の確認 (Tier 2) を目的とする2段階の試験設計を提案している。この方式ではTier 1においてED物質のポテンシャルがあると評価された場合に、必要に応じてTier 2試験の実施が要求されることになる (Fig. 2)。多くは既にOECDが試験法をガイドライン化したものであり、EDSP試験法ガイドラインとして発行されている。総合的に見ると、EDSPは生体内ホルモンの産生、動態、受容体との結合あるいは代謝等の作用機序を介して、これらの内分泌系への毒性影響を及ぼす化学物質の検出を目的としたスクリーニング計画であると言える。

2009年に公表された最初の評価対象となった67物質は農薬を中心とした化学物質 (List 1) であった。これらはED物質のポテンシャルの懸念の有無ではなく、ヒトへの曝露経路 (食品、飲料水、居住空間、職業曝

露) において複数の経路から曝露が想定されるものを中心に選抜された¹⁰⁾。Tier 1評価は、EPAから各物質の登録保持者に対して試験要求 (Test order) が発行されることで開始される。Test orderを受領した登録保持者は、Tier 1評価に向けて新規データの取得、既存データの活用あるいは複数の登録保持者によるコンソーシアムへの参加といった対応が選択可能である。Tier 1評価のために新規データを提出する場合には、Test order受領から2年以内での対応が必要となる。List 1の化学物質のTier 1試験結果については、既にEPAにおける解析が終了しており、2015年6月に評価結果が開示されている¹¹⁾。今後、List 2以降においても多数の化学物質がEDSPの対象となると見込まれる。

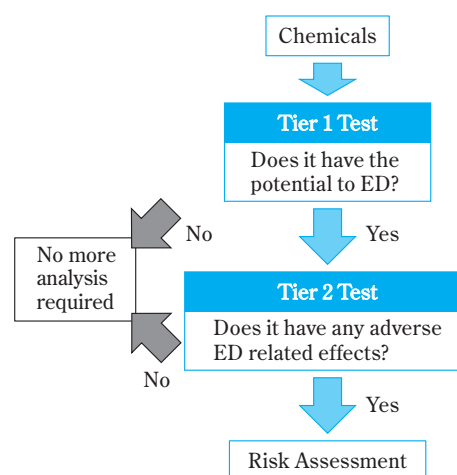


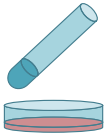





Fig. 2 Flow chart for EDSP evaluation (Tier 1 and Tier 2)

2. EDSP Tier 1試験

Tier 1にて挙げられている試験は、特定の内分泌系に作用する物質の検出を目的としている。EPAは、特定の内分泌系としてHPG軸、HPT軸およびステロイドホルモン産生に焦点を当てている。2009年にはTier 1試験として11種の試験法ガイドライン (Fig. 3) が発効された。Tier 1試験は、化学物質が細胞や受容体に及ぼす影響を試験管内で検出する*in vitro*試験と、個体レベルに及ぼす影響を検出する*in vivo*試験から構成されている。これらの試験について以下に概要を述べる。

(1) *in vitro*試験

①ER結合試験 (OPPTS TG 890.1250) およびアンドロゲン受容体 (AR) 結合試験 (OPPTS TG 890.1150)
エストロゲンやアンドロゲンは生体内においてそれぞれの受容体と結合することでホルモン作用を示す。これらの試験は化学物質と受容体の結合性を検出するものである。

	HPG axis		HPT axis
	Estrogen related	Androgen related	Thyroid hormone related
<i>in vitro</i> assay 	ER binding (890.1250*) ER transcriptional activation (890.1300*) Steroidogenesis (890.1550*) Aromatase (890.1200*)	AR binding (890.1150*) Steroidogenesis (890.1550*)	
<i>in vivo</i> assay	Uterotrophic (890.1600*) 	Hershberger (890.1400*) 	
	Pubertal male and female (890.1500*, 890.1450*) 		
	Fish short-term reproduction (890.1350*) 		Amphibian metamorphosis (890.1100*) 

HPG: Hypothalamus-Pituitary-Gonad
 HPT: Hypothalamus-Pituitary-Thyroid

*: Guideline No.

Fig. 3 Overview of the EDSP Tier 1 Tests

②ER転写活性化試験 (OPPTS TG 890.1300)

本試験では、化学物質がERと結合することによる転写活性化（エストロゲン作用）を評価する。当社が作成したER応答レポータープラスミドを安定的に導入したHeLa細胞（hERα-HeLa-9903）が採用されている。

③ステロイド産生試験 (OPPTS TG 890.1550)

本試験では、ヒト副腎由来培養細胞（H295R）を利用し、化学物質によるステロイド産生能に及ぼす影響を検出する。

④アロマトラーゼ試験 (OPPTS TG 890.1200)

アロマトラーゼ（CYP19）はステロイド産生系においてエストロゲン産生に寄与している。本試験では、化学物質によるアロマトラーゼ阻害活性を測定する。

(2) *in vivo*試験

①子宮肥大試験 (OPPTS TG 890.1600)

エストロゲン作用を有する化学物質の検出を目的とした試験である。本試験では、生体内に内在するエストロゲンの影響を除くために、卵巣を摘出したラット、あるいは未成熟ラットが用いられる。卵巣を摘出したラットでは、HPG軸が機能しないために生体内のエストロゲン量が低下し、子宮も委縮する。また、性周期開始前の未成熟ラットは子宮が未発達な状態である。

このように子宮が委縮あるいは未発達の動物にエストロゲン作用を有する化学物質を反復投与した場合、子宮は肥大する。本試験は、投与期間を3日間とし、子宮重量の変動を指標として評価する。

②Hershberger試験 (OPPTS TG 890.1400)

アンドロゲン作用および抗アンドロゲン作用を有する化学物質の検出を目的とした試験である。本試験では、生体内に内在するアンドロゲンの影響を除くために、精巣を摘出（去勢）したラットが用いられる。去勢ラットは、HPG軸が機能しないために生体内のアンドロゲン濃度が低下する。その結果、前立腺腹葉、精囊・凝固腺等といった副生殖器は、アンドロゲン濃度依存的に委縮する。副生殖器が委縮した動物にアンドロゲン作用を有する化学物質を反復投与した場合、副生殖器は肥大する。また、この動物に外因性のアンドロゲン前駆体（プロピオン酸テストステロン）を投与して副生殖器を肥大させた条件で、抗アンドロゲン作用のある物質を反復投与した場合、副生殖器は委縮する。本試験は、投与期間を10日間とし、副生殖器重量の変動を指標として評価する。

③雄；思春期試験 (OPPTS TG 890.1500)

未成熟の雄ラットに成熟期まで反復経口投与（31日間）し、性腺および甲状腺を中心に内分泌系への影響を網羅的に評価する試験である。検査項目としては、

生殖関連器官や甲状腺などの器官重量および病理組織学的検査の他、性分化（包皮分離）、血中のテストステロン（代表的なアンドロゲン）、甲状腺ホルモンおよび甲状腺刺激ホルモン測定がある。

④雌；思春期試験（OPPTS TG 890.1450）

未成熟の雌ラットに成熟期まで反復経口投与（21日間）し、性腺および甲状腺を中心に内分泌系への影響を網羅的に評価する試験である。検査項目としては、生殖関連器官や甲状腺などの器官重量および病理組織学的検査の他、性分化（陰開口）、性周期、血中の甲状腺ホルモンおよび甲状腺刺激ホルモン測定がある。

⑤魚類短期繁殖試験（OPPTS TG 890.1350）

魚類を用いて化学物質によるエストロゲン作用およびアンドロゲン作用、ならびに、抗エストロゲン作用の検出を目的とした試験である。本試験では、雌雄のファットヘッドミノール成魚を用いて曝露期間（21日間）中の産卵数および受精率、曝露終了時に生殖腺重量および血中ビテロゲン測定、二次性徴の観察の他、生殖腺病理組織学的検査を実施し、性ホルモン系への影響を評価する。なお、ビテロゲンは卵生の動物に特異的な卵黄前駆タンパク質でエストロゲン活性のバイオマーカーとして用いられている。

⑥両生類変態試験（OPPTS TG 890.1100）

両生類を用いて化学物質によるHPT軸への影響を評価する試験である。両生類の変態の進行は甲状腺ホルモンにより制御されており、変態時期は甲状腺ホルモンに高感受性である。アフリカツメガエルの幼生期に化学物質を曝露し、形態的特徴をもとにしたステージ分類¹²⁾、後肢長、鼻-排泄口長の測定に加えて、最も鋭敏な指標である甲状腺病理組織学的検査を実施する。Fig. 4は変態前期のアフリカツメガエルの甲状腺病理組織像である。HPT軸は哺乳類も両生類と同様に制御

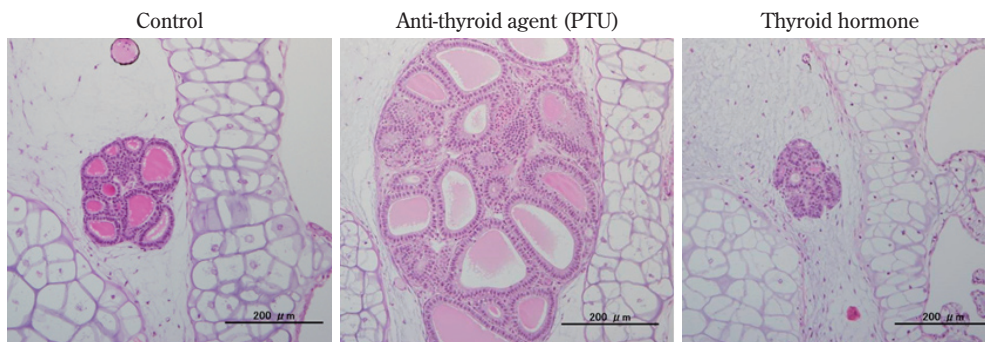
されていることから、両生類変態試験はヒトを含む脊椎動物全般についての甲状腺への影響を評価できる。

Tier 1試験の*in vitro*試験、ならびに、哺乳動物および環境生物を用いた*in vivo*試験は、互いに補完的な評価項目を有しており、単独の試験結果をもって、特定の内分泌系への影響の有無を評価することは適当ではない。特に、*in vitro*試験に関しては、特定の内分泌系に関する作用機序の情報を入手することができる一方、生体における化学物質の代謝、排泄およびその他の生理的条件による影響を反映していない。以上の理由から、Tier 1評価においては、既知の毒性情報を含めて全てのTier 1試験データを詳細に解析し、各試験の意義を踏まえた総合評価が必要となる。

Tier 1試験は、内分泌系に影響を及ぼす可能性のある物質を検出するポテンシャル評価が目的とされている。Tier 1試験の結果、内分泌系への影響の程度をさらに明確にする必要があると判断された場合には、Tier 2試験の実施が必要となる。Tier 2試験は確定試験として位置付けされており、複数の生物群（哺乳類、鳥類、両生類、魚類、無脊椎動物）を用いて内分泌関連影響の性質とその強さを評価する。哺乳類に関しては、既存のラット2世代繁殖試験（OECD TG 416）あるいはラット拡張1世代繁殖試験（OECD TG 443）で評価される。環境生物では、両生類（アフリカツメガエル）幼生を用いた成長、発達試験（OCSPP TG 890.2300）、メダカ拡張1世代繁殖試験（OCSPP TG 890.2200）および鳥類（日本ウズラ）2世代繁殖試験（OCSPP TG 890.2100）がガイドライン化され、アミエビ2世代試験のガイドライン制定も予定されている。

3. ピリプロキシフェンにおけるTier 1評価への取り組み

ピリプロキシフェンは、List 1の対象化学物質のひとつとして2009年にEDSP Tier 1のTest orderが発行



Anti-thyroid agent induced thyroid gland hypertrophy, follicular cell hypertrophy and hyperplasia (middle), Thyroid hormone induced thyroid gland atrophy and decreased follicular lumen area (right).

Fig. 4 Thyroid histopathology of African clawed frogs (tadpoles)

された。これに対して当社は2010年に既存の各種毒性試験結果および文献報告を詳細に解析して取りまとめた「その他の学術的知見 (Other Scientific Relevant Information ; OSRI)」を提出し、Tier 1評価に十分な情報があるとして子宮肥大試験およびER転写活性化試験について免除申請が受理された。新規試験としてER結合試験、AR結合試験、ステロイド産生試験、アロマターゼ試験、Hershberger試験、雄および雌の思春期試験、魚類短期繁殖試験ならびに両生類変態試験を実施した。さらに、一部の試験結果に対する考察に有用と考えられる追加実施試験およびメダカフルライフサイクル試験を含む既存試験の結果からピリプロキシフェンはED物質ではないことを主張した総合考察をEPAに提出した。

EPAはこれらの情報をもとにTier 1評価を実施し、当社の主張は概ね受け入れられた。以下に各試験結果の概要および総合考察について示す。

(1) *in vitro*試験結果

①ER結合試験およびAR結合試験

本試験系におけるERおよびARへの結合性は認められなかった。

②ER転写活性化試験

既知の文献報告^{13), 14)}において弱いエストロゲン活性が認められた。しかしながら、*in vivo*試験における生体内での血中濃度を大きく上回る濃度での影響であった。

③ステロイド産生試験

H295R細胞に対して細胞毒性の認められない濃度において、テストステロン産生に影響は認められなかった。一方、エストラジオール産生のわずかな亢進が認められたため、エストロゲン産生誘導能を示唆する結果となった。しかしながら、後述する*in vivo*試験においてエストロゲン産生誘導に関連する影響は認められていない。

④アロマターゼ試験

本試験系において、アロマターゼ阻害活性は認められなかった。

(2) *in vivo*試験

①子宮肥大試験

試験法ガイドラインで規定された上限用量である1000 mg/kgにおいても、未成熟ラットの子宮重量に変動は認められず、エストロゲン作用を示唆する変化は検出されなかった。

②Hershberger試験

試験法ガイドラインで規定された上限用量である

1000 mg/kgを投与した結果、いずれの副生殖器の重量に変動は認められなかった。同様にテストステロン前駆体を投与した動物においても副生殖器の重量に変動は認められなかった。したがって、アンドロゲン作用および抗アンドロゲン作用を示唆する変化は検出されなかった。

③雄；思春期試験

未成熟のラット (投与開始時；23日齢) に500および1000 mg/kgの投与量で31日間強制経口投与した。その結果、血中テストステロン濃度の低値 (Fig. 5) および副生殖器の重量の低値が認められた。肝臓については、重量の変動および病理組織学的変化 (肝細胞肥大) が認められた。ピリプロキシフェンは肝臓の薬物代謝酵素を誘導することが報告されており¹⁵⁾、本試験において認められた肝臓影響も同様の変化に起因したものであると考えられた。本試験において認められた血中テストステロン濃度の低値はステロイド産生阻害のような直接的な影響ではなく、肝臓における代謝の亢進を介した二次的な変化である可能性が考えられた。その他、腎臓に対する影響として、血液生化学的検査値 (尿素窒素、クレアチニン)、重量の変動、病理組織学的変化が認められた。

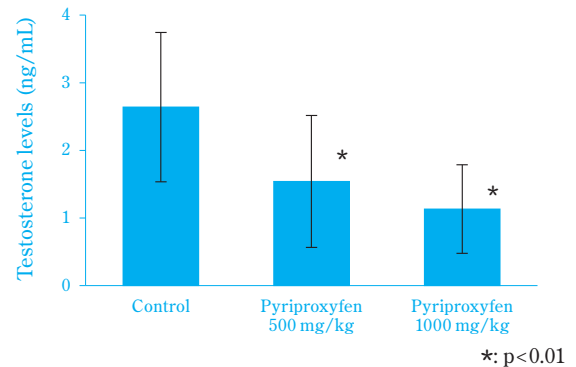


Fig. 5 Serum testosterone levels of the pyriproxyfen administrated male rats in the pubertal assay

甲状腺についても病理組織学的変化としてコロイド領域の縮小および濾胞上皮細胞の肥厚が認められた。ラットでは、肝臓の薬物代謝酵素 (UDP-グルクロン酸転移酵素 ; UGT) の誘導によって甲状腺ホルモンの代謝が亢進し、恒常性維持のために下垂体から甲状腺刺激ホルモン (TSH) が分泌されることが知られている¹⁶⁾。その結果、病理組織学的検査において上記の変化を認めることがある。すなわち、甲状腺への影響は、肝臓における薬物代謝酵素の亢進を介した二次的な変化であると考えられた。

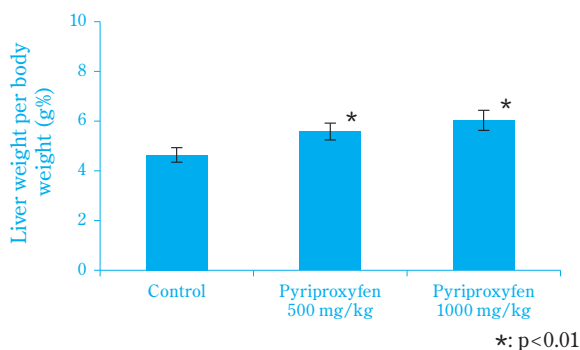


Fig. 6 Relative liver weight of the pyriproxyfen administrated male rats in the additional study

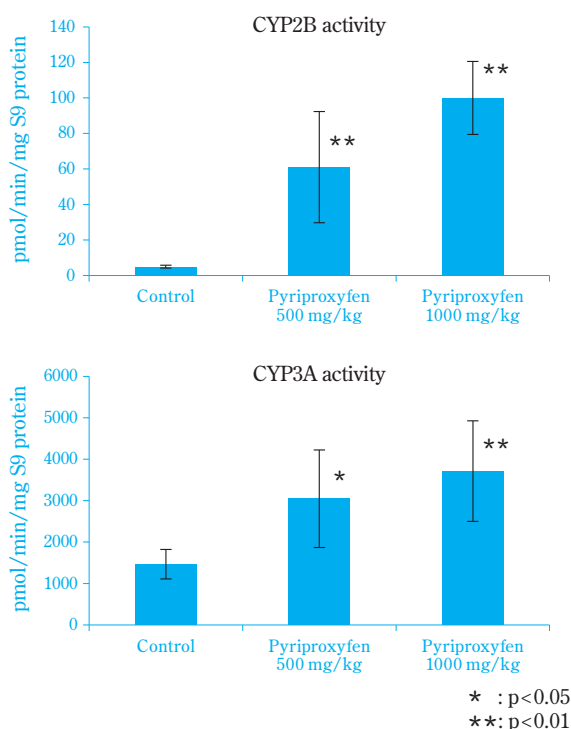


Fig. 7 Hepatic enzyme activities of the pyriproxyfen administrated male rats in the additional study

④雄；思春期試験 — 追加検討試験

雄の思春期試験で認められたテストステロンの低値について肝臓影響を介した二次的な変化であるという仮説を証明するために追加試験を実施した。追加試験では、ピリプロキシフェン投与による肝臓における薬物代謝酵素（CYP2B、CYP3A）の活性および精巣におけるテストステロン産生への影響を検討した。テストステロンはこれら肝臓の薬物代謝酵素によって代謝されることが報告されている¹⁷⁾⁻¹⁹⁾。肝臓では器官重量の高値（Fig. 6）に加え、薬物代謝酵素の誘導（Fig. 7）が認められ、精巣においてはテストステロン産生に重要な酵素（17β-HSD）の活性への影響はなかった（Fig. 8）。加えて、他のTier 1試験においてアンドロゲン系への影響が認められていないことから、ピリプロキシフェンによるテストステロンの低値は、内分泌系への直接影響によるものではなく、肝臓への影響による間接的な変化であると結論した（Fig. 9）。

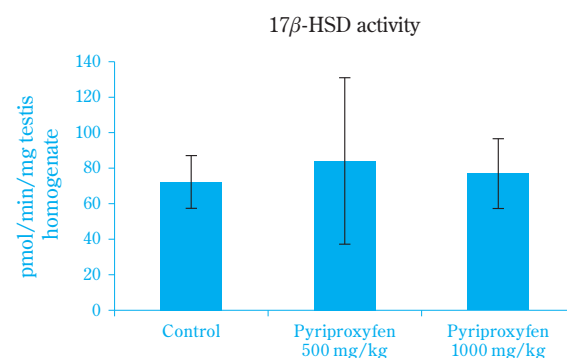


Fig. 8 Testicular enzyme activity of the pyriproxyfen administrated male rats in the additional study

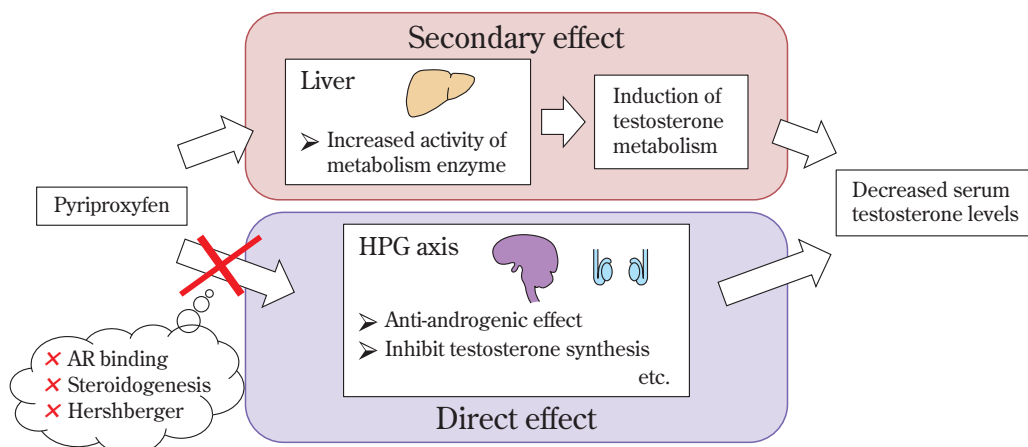


Fig. 9 Decreased serum testosterone levels caused *via* liver effect

⑤雌；思春期試験

未成熟のラット（投与開始時；22日齢）に500および1000 mg/kgの投与量で21日間強制経口投与した。雄の思春期試験と同様、腎臓および肝臓に対する影響を示唆する変化が認められた。また、下垂体および卵巣重量の低値が認められたが、これらは病理組織学的変化を伴わない軽微な変化であった。膣開口および性周期の検査において異常が認められなかったことから、卵巣機能への影響はないと考えられた。また、既知の各毒性試験において抗エストロゲン作用を示唆する影響、ラットを用いた2世代繁殖試験において繁殖機能への影響は認められていない。

甲状腺では、病理組織学的検査においてコロイド領域の縮小および濾胞上皮細胞の肥厚が認められた。雄の思春期試験の項目でも記述したように、甲状腺への影響は肝臓における薬物代謝酵素の亢進を介した二次的变化であると考えられた。

⑥魚類短期繁殖試験

水溶解度上限で短期的に致死毒性が見られなかったことから設定した水溶解度近傍の試験最高濃度区（設定300 µg/L）の雄において体重比生殖腺重量の高値および二次性徴の減少が認められたものの、重要評価項目である生殖腺病理、血中ビテロゲニンおよび繁殖性（産卵率および受精率）に加えて、性ホルモン濃度にも影響は認められなかった。

⑦メダカフルライフサイクル試験 — 既存データ

メダカ受精卵から繁殖期（孵化後約60-110日）を経て次世代成魚（孵化後60日）までの期間、被験物質を曝露し、魚類における繁殖影響の検討を目的とする試験である。最高濃度区（実測8.6 µg/L）において親世代および仔世代のいずれも主な評価項目（二次性徴を含む形態、繁殖や孵化、生殖腺病理、ビテロゲニン）に何ら影響は認められなかった。

⑧両生類変態試験

水溶解度上限で短期的に致死毒性が見られなかったことから設定した水溶解度近傍の試験最高濃度区（設定300 µg/L）において発達ステージ、後肢長および体重の低値が認められたものの、同濃度区では摂餌量の低値が観察され、また、最も敏感な指標である甲状腺病理に何ら影響は認められなかった。よって、ピリプロキシフェン曝露によるHPT軸への影響はないと結論した。

EDSPのTier 1試験として新規に実施した試験結果、雄思春期試験の追加検討試験結果および免除申請が認められた既存試験結果に文献情報を加え、ピリプロキ

シフェンの内分泌かく乱作用について総合的に考察した。*in vitro*試験や文献情報ではエストロゲン作用が、哺乳類では雄思春期試験でアンドロゲン系への影響が、魚短期繁殖試験では抗アンドロゲン作用が示唆された。*in vitro*試験で認められた変化は、生体内では起こり得ない極めて高い濃度で認められた変化であった。哺乳類については追加検討試験結果から肝臓における薬物代謝酵素誘導を介した間接的な変化と考えられ、これは各種毒性試験において低用量から肝臓に影響が認められることからもうかがえた。また、Tier 2試験に類似するメダカフルライフサイクル試験で何ら曝露影響が認められなかったことから、魚類における内分泌かく乱作用はないと考えられた。さらに、既存試験結果や文献情報なども踏まえてピリプロキシフェンはED物質ではないと判断し、Tier 2試験は不要と結論した。

2015年に公表されたEPAによる評価結果では概ね当社の見解が受け入れられ、哺乳類および環境生物ともTier 2試験は不要と判断された。

4. 他のList 1物質の評価状況

EDSPでList 1物質として選抜された67物質のうち、Tier 1評価を受けた52物質について、公開された評価結果を解析すると、エストロゲン、アンドロゲンおよび甲状腺ホルモン系に影響を及ぼす可能性を持つ物質は、それぞれ14、17および18物質であった。多くの物質は既存の各種毒性試験のデータも加えてリスク評価を実施しており、追加試験は要求されなかった。一方、哺乳類において雄性生殖関連影響を示唆した1物質、哺乳類において甲状腺ホルモン関連影響を示唆した4物質、環境生物において生殖関連影響を示唆した13物質および環境生物において甲状腺ホルモン関連影響を示唆した5物質については、追加試験やTier 2相当の試験実施が推奨されている。これらList 1物質のTier 1評価結果については、EDSPのHP上で公開されている¹¹⁾。

5. EDSPの今後の展開

EDSPの評価対象となる化学物質は、食品品質保護法の他、連邦食品医薬品化粧品法および飲料水安全法に基づいて管理・規制されている物質と考えられている。飲料水に含有される懸念のある化学物質も対象範囲となり、2011年の段階では約10000物質が評価対象になるだろうと想定されている²⁰⁾。List 1で評価対象となった67物質に対して、EPAはTest orderの発行（2009年）からTier 1評価結果の開示（2015年）までに約6年を費やした。今後とも同様の対応を進めると、全ての化学物質を評価することは実質的に不可能と見込まれる。そこでEPAはEDSPを効果的に進めるために、EDSP21²⁰⁾計画を打ち出している。この計画の中では既

知の各種毒性試験データ、コンピュータモデルを用いた毒性予測に加えて、*in vitro*試験のハイスループット (HTP) モデルを活用し、評価対象とする化学物質の優先順位付け、Tier 1評価のHTPモデルへの置き換えを目標としている (Fig. 10)。優先順位を設定するために、包括的生物活性曝露ランキング (Integrated Bioactivity Exposure Ranking ; IBER) という手法が提案されている。IBERでは、生物活性および曝露量の予測データを基にED物質である懸念の高い物質を選抜することが可能である。また、HTPモデルを活用することで、EDSP Tier 1における複数の試験が代替可能であることが報告されている²¹⁾。さらに、長期目標として、これらのHTPモデルによるEDSP Tier 1試験の完全な代替化を掲げており、実現すれば試験期間の短縮や費用の削減を期待することができるかもしれない。ただし、HTPモデルを構成する*in vitro*試験は、生体における化学物質の代謝、排泄およびその他の生理的条件の影響を反映していないため、完全な代替化にはより慎重な検討が必要である。

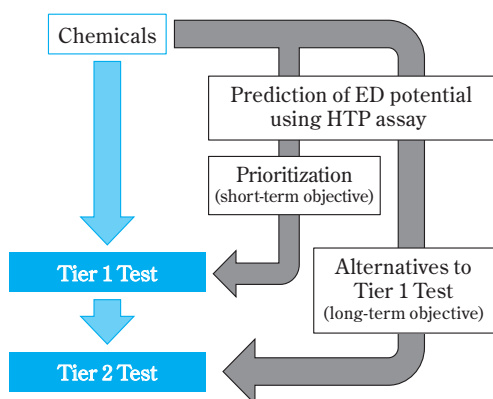


Fig. 10 Future scheme of the EDSP proposed in the EDSP21

おわりに

内分泌かく乱作用の懸念を有する化学物質の規制については、明確かつ統一された基準が未だに確立されていない状況である。一方で、EPAはEDSPという体系的なプログラムを施行し、ED物質の評価を開始した。さらに、全ての化学物質を評価する体制を実現するために、EDSP21といった新たな取り組みを進めていることは既に述べたとおりである。EUではED物質の定義や分類について未だ議論が進行中であり、今後の動向は流動的である²²⁾。日本においても環境省が主体となって調査研究や試験法開発が進められている²³⁾ものの、具体的な規制は確立されていない。各国の規制当局の協調した取り組みが期待される場所である。

ED物質による毒性影響の重点課題は、歴史的な背景および健康に対する影響の大きさから、現時点ではHPGおよびHPT軸に関連したものが多い。一方で、内分泌系は複雑なネットワークで構築されており、生体内では多くの内分泌器官やホルモンが機能している。したがって、今後のED物質による毒性影響の評価範囲はHPGやHPT軸にとどまらず、多様化していくことも予想される。多種類のホルモンを分泌する副腎をはじめとして、種々の内分泌系への毒性影響の評価手順の確立を視野に入れておく必要がある。当社では、OMICS解析手法を用いるなど新規評価手法の導入あるいは評価技術の精度向上に継続的に取り組んでいる。最新の科学技術を用いた試験法の開発および精緻な安全性評価体制の構築に向けて引き続き努めていきたい。

引用文献

- 1) WHO, “International Programme on Chemical Safety, Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors” (2002).
- 2) T. Colborn, D. Dumanoski and J. P. Myers, “Our Stolen Future”, Dutton/Penguin Books (1996).
- 3) U. S. Environmental Protection Agency, “Federal Register, Vol. 63, No. 248, Endocrine Disruptor Screening Program; Proposed Statement of Policy” (1998).
- 4) T. Yamada, O. Sunami, T. Kunimatsu, Y. Kamita, Y. Okuno, T. Seki, I. Nakatsuka and M. Matsuo, *Toxicology*, **162**, 103 (2001).
- 5) T. Yamada, T. Kunimatsu, K. Miyata, S. Yabushita, T. Sukata, S. Kawamura, T. Seki, Y. Okuno and N. Mikami, *Toxicol. Sci.*, **79**, 64 (2004).
- 6) T. Kunimatsu, T. Yamada, K. Miyata, S. Yabushita, T. Seki, Y. Okuno and M. Matsuo, *Toxicology*, **200**, 77 (2004).
- 7) 宮田 かおり, 於勢 佳子, 住友化学, **2012**, 51 (2012).
- 8) 内海 透, 宮本 貢, 片木 敏行, 住友化学, **2011-1**, 49 (2011).
- 9) U. S. Environmental Protection Agency, “Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report” (1998).
- 10) U. S. Environmental Protection Agency, “Federal Register, Vol. 74, No. 71, Final List of Initial Pesticide Active Ingredients and Pesticide Inert Ingredients to be Screened Under the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act” (2009).
- 11) U. S. Environmental Protection Agency, “Endocrine Disruptor Screening Program Tier 1 Screening Determinations and Associated Data Evaluation

- Records”, <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-program-tier-1-screening-determinations-and> (参照 2016/6/14).
- 12) P. D. Niewloop and J. Faber, “Normal Table of *Xenopus Laevis* (Daudin)”, Garland Publishing, Inc. New York & London (1994).
 - 13) M. Kojima, K. Fukunaga, M. Sasaki, M. Nakamura, M. Tsuji and T. Nishiyama, *Int. J. Environ. Health Res.*, **15** (4), 271 (2005).
 - 14) M. Manabe, S. Kanda, K. Fukunaga, A. Tsubura and T. Nishiyama, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **209**, 413 (2006).
 - 15) H. Yoshino, H. Kaneko, I. Nakatsuka and H. Yamada, *J. Agric. Food Chem.*, **44** (6), 1578 (1996).
 - 16) “Casarett and Doull’s Toxicology-The Basic Science of Poisons (8th Edition)”, C. D. Klaassen (Ed.), McGraw-Hill (2013).
 - 17) D. B. Peakall, *Environ. Health Perspect.*, **13**, 117 (1976).
 - 18) P. W. Harvey, K. C. Rush and A. Cockburn, “Endocrine and Hormonal Toxicology”, John Wiley & Sons Ltd. (2009).
 - 19) V. K. Turan, V. M. Mishin and P. E. Thomas, *Drug Metab. Dispos.*, **29** (6), 837 (2001).
 - 20) U. S. Environmental Protection Agency, “Endocrine Disruptor Screening Program for the 21st Century: (EDSP21 Work Plan)” (2011).
 - 21) P. Browne, R. S. Judson, W. M. Casey, N. C. Kleinstreuer and R. S. Thomas, *Environ. Sci. Technol.*, **49** (14), 8804 (2015).
 - 22) European Commission, “Roadmap: Defining criteria for identifying Endocrine Disruptors in the context of the implementation of the Plant Protection Product Regulation and Biocidal Products Regulation” (2014).
 - 23) 環境省, “化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応 -EXTEND 2010-” (2010).

PROFILE



南 健太
Kenta MINAMI
住友化学株式会社
生物環境科学研究所
研究員



山口 尊史
Takafumi YAMAGUCHI
住友化学株式会社
生物環境科学研究所
主席研究員



於勢 佳子
Keiko OSE
住友化学株式会社
生物環境科学研究所
主席研究員