

学術意見書

内分泌攪乱物質の危険性評価に関する学術意見書：

内分泌攪乱物質の同定の科学的基準および同物質による健康と環境への影響評価の既存手法の妥当性¹

EFSA 学術委員会^{2,3}

欧州食品安全機関(EFSA)

(イタリア、パルマ)

抄録

欧州食品安全機関の学術委員会(SC)は欧州委員会(EC)の要請に基づき、内分泌活性物質(endocrine active substance, EAS)と内分泌攪乱物質(endocrine disruptor, ED)の試験と評価に関する既存の情報を展望した。この作業は内分泌学・リスク評価・毒物学の専門家とEU 諸機関(EMA, ECHA, EEA)のオブザーバーから成るワーキンググループが実施した。ED を作用機序の異なる他の物質群から区別するため、ED を(1)無傷動物または(下位)集団に対する有害作用、(2)内分泌活性、および(3)両者の間の妥当な因果関係の存在によって定義することが結論された。有害作用に関する科学的基準は一般的には定義されていないので、内分泌攪乱効果に対する特定の基準を定めることはできず、したがって評価のためには、個別の場合ごとに、EAS への曝露後の分子、個体、ないし(下位)集団レベルでの(生態)毒性学的意味の専門家による判断が必要である。EAS の影響評価のための標準化された試験方法は、哺乳類および魚類のエストロゲン、アンドロゲン、甲状腺およびステロイド産生モダリティに関しては妥当な組み合わせが存在する(あるいは間もなく利用可能になる)が、鳥類および両生類については利用できる試験方法が少ないと判断される。現在の試験方法およびそれ以外の内分泌モダリティまたは種に関する問題点を検討した。ED の危険性の特徴づけには、臨界作用、重篤度、(不)可逆性、作用強度の検討が含まれる。リスク管理に関する意思決定のために、リスクおよび懸念の程度を提供するには、既存の情報を最大限に活用してリスク評価(危険性と曝露のデータまたは予測を考慮する)を行う必要がある。懸念の程度を決定するのはリスク評価だけではなく、リスク管理によって設定される防護に関する目標も関与する。

©European Food Safety Authority, 2013

キーワード

内分泌活性物質(EAS)、内分泌攪乱物質(ED)、危険性評価、試験方法、(生態)毒性学的リスク評価、有害作用

書誌情報：EFSA Scientific Committee; Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment. EFSA Journal 2013;11(3):3132. [84 pp.]

doi: 10.2903/j.efsa.2013.3132

オンライン公開：www.efsa.europa.eu/efsajournal

要約

欧州食品安全機関(EFSA)の学術委員会(SC)は、欧州委員会(EU)の要請に基づき、内分泌攪乱物質(ED)の危険性評価に関する学術的意見書の提出を求められた。具体的には、(1) ED と、作用機序の異なる他の物質群とを区別する学術的基準についての助言、(2) 生理的調節と内分泌活性物質(EAS)への曝露によるヒトおよび生態系への悪影響とを区別する基準についての助言、および(3)既存の試験方法の展望と、EASに媒介される諸現象の同定と特徴づけのためのそれらの適切性の検討が要請された。

SCによるEASの定義は「内分泌系の1つ以上の要素と相互作用する、またはこれに干渉して生物学的効果を現す特性を持つ物質」であって、必ずしも有害作用を示すものに限定されない。すなわちSCは、内分泌活性をそれ自体で(生態)毒性を持つ危険物としてでなく、有害作用の可能性をも含む種々の作用機序の集合体として捉えている。EDについては、SCはWO/IPCS 2002の定義を支持し、ある物質をEDと判定するには、内分泌活性と、無傷な生物個体または(下位)集団に出現した有害作用との間の生物学的に妥当な因果関係の適切な証拠が存在することが必要と考える。

有害性の評価は内分泌に関連した効果に限られるものではない。有害性の評価の科学的基準はまだ一般的には定義されていない。生化学的レベルおよび分子レベルでの一時的な、一貫しない、また僅かな変動は一般的には適応的(すなわち有害でない)と考えられるが、必ず適応的であるとは言えない。細胞・器官または(下位)集団レベルの変化は、病変あるいはin vivoでの機能障害、更には発達時期の変化を生ずるとき有害と考えられるのである。したがってEDに固有の具体的基準を見出すことは困難であり、物質の内分泌攪乱性を評価するには、専門家による証拠の重みを考慮した判断が必要とされる。

OECDの概念フレームワーク(Conceptual Framework, CF)によって、データ源、OECDテストガイドライン、化学物質がEASないしEDであるか否かの判定方法として利用可能なもの・開発中のもの・提案されているものなどを知ることができる。内分泌活性に関する

情報は既存の情報、リードアクロス、*in silico* ツール、*in vitro* および *in vivo* スクリーニング試験 (CF のレベル 1, 2, 3)、またはその他の機構研究から得られる。ある EAS を ED と見なすためには、有害作用の同定が必須である。そのためには最終エンドポイントを含む試験方法 (CF のレベル 4, 5) と、最終エンドポイントに関する情報を含む既存情報、リードアクロス、その他の *in vivo* (生態) 毒性試験を併用することができる。したがって、ある物質が ED であるか否かを決定するのに必要なすべての (機構と最終エンドポイント双方の) 情報がただ 1 つの試験から得られることは原理的にも考えにくい。

本意見書の勧告を考慮しつつまとめると、エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺またはステロイド産生(EATS)モダリティの標準化された試験方法として、哺乳類と魚類についてはほぼ完全な組み合わせが存在するが、鳥類や両生類に対しては適用できる試験はより少ない。EATS 以外の経路ないしモダリティの障害を生ずるダウンストリーム効果は、或る種の標準的な脊椎動物による試験で検出されることもあるが、哺乳類、魚類その他の脊椎動物に関係する非 EATS モダリティの標準化された機構的試験はまだ存在しないことに注意しなければならない。無脊椎動物に関しては内分泌の知識が不十分で、OECD の試験に標準化された機構的試験が欠けているのは主としてこのためである。最後に、OECD では内分泌試験の開発に際して爬虫類や棘皮動物などの大きな分類群を考慮していない。試験済みの分類群から未試験分類群へのリードアクロスが可能になるかどうかは現時点では不明である。

スクリーニング法および試験法、特にヒトまたは環境への有害作用に関連する可能性のある非 EATS モダリティに関する方法の開発を更に進める必要があることが認められた。

SC は物質の試験 (EAC であるか他の作用機序を持つ物質であるかを問わず) に関する下記のような一般的問題を検討した。

- 器官や組織がその発達中の重要な時点で或る物質に曝露されると不可逆的な変化を被ることがある。OECD CF の試験法には、子宮内発達中の重要な時点での曝露に対応するものもあるが、現行の哺乳類試験法では胎児期または思春期の曝露によって誘起されるが発現が更に遅れるような効果には対応できない可能性があることが注意される。魚類のライフサイクル試験によれば、すべての曝露時期がカバーされるので、ライフサイクルの全段階にわたって発達中の曝露の影響を検出できる可能性がある。
- 複数の EAS への曝露によって、毒性も複合化する可能性があることが認められる。複数の物質への複合曝露による複合毒性は EFSA の別個の活動の主題とする。
- 内分泌活性、内分泌攪乱、あるいはその他のエンドポイント/作用機序に関連する (生態) 毒性に関して、低濃度効果や非単調の曝露量・効果曲線 (non-monotonic dose response curve, NMDRC) の存在ないし関連性については学界においても意見の一致

を見ていないことを認識した。

SC は、生物学的閾値、有害作用の基準、複数物質への複合曝露、NMDRC などの問題をより広い視野から解明するためのフォローアップ研究を勧告する。また内分泌攪乱性の同定と評価のためのデータが得られるような試験戦略を更に開発する必要があることを強調したい。一例として OECD は数種の魚類に対する試験概要を作成している。

SC ではまた ED の有害性を特徴づける際に考慮すべき事項をもいくつか検討した。有害性の特徴づけ（たとえば健康/生態毒性学に基づく指針値）は、作用機序の如何に関わらず、最小の健康/生態毒性学に基づく指針値を与えるような効果に基づくべきものと SC は考える。そのような指針値によって、より大きい曝露量で内分泌系によって媒介される影響に対しても保護が可能となる。ED の有害性の特徴づけに重篤度、(不)可逆性、作用強度を用いることについては、内分泌攪乱物質の懸念の程度についての情報を与えるためにはこれらの要素を、曝露の程度、持続時間およびタイミングとの関連で評価すべきものと考えられる。懸念の程度はリスク評価のみによって決定されるものではなく、リスク管理によって設定される防護に関する目標も関与する。

結論として、天然・合成の別を問わず ED は、内分泌活性・影響の有害性・内分泌活性と有害作用の妥当な関連性の 3つの基準によって同定することができる。SC の見解では、哺乳類と魚類に対する EATS 物質の主要な危険性を同定し特徴づけるためには妥当な試験方法の組み合わせが利用可能である（または間もなく可能になる）が、鳥類・両生類に適用できる試験法は少ない。またこれらの方法は原則として、(1)特定の局面（たとえば感受性の臨界期での曝露の以後の生活段階へのフォローアップ）を取り上げ、かつ(2)利用可能なすべての情報を重みづけして利用するならば、ED の安全な曝露量ないし濃度を確立するために有効であるはずである。哺乳類、魚類などの脊椎動物に関しては、EATS 以外のモダリティに対する標準化された機構的試験法がまだ存在しないことも注目される。OECD の試験群には無脊椎動物に関する機構的試験法が含まれていない。最後に、OECD による内分泌試験法開発においては、一連の主要分類群（たとえば爬虫類、棘皮動物）がまだ考慮されていない。

更に、リスク管理上の意思決定のためにリスクと懸念の程度の情報を提供することについては、リスク評価（有害性と曝露のデータまたは予測を考慮した）が既存情報の最良の利用法であると SC は考える。したがって ED も健康と環境への影響が懸念される他の物質の大部分と同様に扱う、すなわち危険性評価のみならずリスク管理をも行うことができる。

目次

抄録.....	1
要約.....	2
欧州委員会による背景.....	7
欧州委員会による委任事項.....	7
委任事項の明確化.....	8
方法.....	8
評価.....	10
1. はじめに.....	10
1.1. 本意見書の対象範囲.....	11
1.2. EU の法規における内分泌攪乱物質関連条項の概観.....	12
2. 定義および用語.....	12
3. 内分泌攪乱物質の同定の基準.....	17
3.1. 有害性および内分泌攪乱と内分泌調節との区別の基準.....	18
3.2. 内分泌活性.....	20
3.3. 内分泌活性と有害性の因果関係.....	20
4. 内分泌活性物質に媒介される効果の同定および特徴づけのための試験方法の利用可能性と妥当性.....	21
4.1. 内分泌活性物質の試験方法に関する OECD ガイダンスの背景.....	22
4.2. OECD 概念フレームワーク改訂版レベル 1：既存データおよび試験によらない情報.....	24
4.2.1. ヒトまたは野生動物の内分泌活性物質への曝露の危険性の特徴づけに疫学情報、野外および実験動物情報を利用する際の留意点.....	25
4.2.2. 物質の内分泌活性のスクリーニングのための計算毒物学および試験によらない方法.....	25
4.3. 利用可能な試験方法の内分泌モダリティおよび分類群ごとの概観.....	31
4.3.1. 攪乱に敏感な内分泌モダリティとそれらに対する試験方法.....	32
4.3.2. 現在攪乱への感受性が知られておらず標準化された試験方法が利用できない非 EATS 内分泌モダリティ.....	34
4.3.3. 利用可能な試験方法の組み合わせに対するその他の一般的制限.....	36
4.4. 哺乳類に対して利用可能な国際的に標準化された試験方法.....	38
4.5. 水生生物に対して利用可能な国際的に標準化された試験方法.....	41
4.6. 鳥類に対して利用可能な国際的に標準化された試験方法.....	44
4.7. 利用可能な国際的に標準化された試験方法の妥当性に関する考察.....	44
4.7.1. 内分泌活性および攪乱に固有の事項.....	44

4.7.2. 内分泌活性および攪乱に固有でない事項.....	45
4.8. 試験戦略.....	49
5. 内分泌攪乱物質の危険性の特徴づけの要素.....	50
5.1 臨界作用.....	50
5.2. 重篤度/（不）可逆性/作用強度.....	51
結論.....	52
勧告.....	56
文献.....	56
付録.....	71
A. 現状、最近の報告・活動の概要.....	71
A.1 欧州委員会(EC) ¹⁷	71
A.2 欧州環境庁(EEA).....	73
A.3 欧州議会(EP).....	74
A.4 欧州食品安全機関(EFSA).....	75
A.5 米国 NIEHS/NIH・欧州共同研究センターIHCP.....	76
A.6 世界保健機構および国連環境プログラム.....	77
A.7 EU 加盟国.....	78
A.8 利害関係者の活動.....	80
B. 欧州法規における内分泌攪乱物質に関する条項の概観.....	83
C. OECD のガイダンス、試験ガイドラインおよび進行中の活動の概要.....	85
C.1 2012年8月版 OECD ガイダンス.....	85
C.2 OECD で進行中の活動.....	92
D. 疫学情報、野外情報、(生態) 毒性学情報.....	97
D.1 ヒトの内分泌活性物質への曝露の危険性の特徴づけのための疫学情報の利用.....	97
D.2 野生動物の内分泌活性物質への曝露の危険性の特徴づけのための野外情報の利用.....	99
D.3 ヒトまたは野生動物の内分泌活性物質への曝露の危険性の特徴づけのための <i>in vitro</i> 試験または動物実験の利用.....	100
用語集.....	101
略語.....	105
脚注.....	107

欧州委員会による背景

内分泌系はヒトのホメオスタシスを維持する上で重要な役割を果たしており、外因的刺激の影響を受けることがしばしばある。内分泌系と相互作用する物質は、天然物も合成物も含めてかなりの数が知られている。これら外因性物質と内分泌系との相互作用が無傷の生物またはその子孫あるいは（下位）集団の健康に有害作用を及ぼすならば、その物質を内分泌攪乱物質(endocrine disruptor, ED)と呼ぶ⁴。

これらの物質を適用対象に含む EU の法規の範囲（植物保護製品、殺生物剤、医薬、化粧品、化学品など）が広範なことから、欧州委員会(EC)は 1993 年に「内分泌攪乱物質に関する域内戦略」案を発表した⁵。欧州議会は 1998 年に EC に対して、内分泌攪乱に対する多数の研究上および規制上の問題を検討するよう要請した。

コミュニティ戦略によれば、「内分泌攪乱における役割に応じた優先度評価を要する物質のリスト（ED 優先度リスト）を作成し、既存の法規制で対処できる物質、知識の欠けている点、および特別措置の対象となる消費者用途を特定すること」が必要である。2000 年には、査読を経た学術文献の独立審査、および EC の毒性・生態毒性および環境に関する学術委員会との協力によって、合成化学物質 553 種、ホルモン 9 種を含む候補物質リストが公表され、併せて内分泌攪乱におけるそれら物質の役割を評価するための行動が要請された。コミュニティ戦略の最終的な長期目標は、ヒト・野生動物あるいは環境に悪影響を持つ物質を管理するための「立法」である。

内分泌攪乱問題への対処の必要性が認識されたことから、EU の多くの法規にこの問題に関する条項が盛り込まれることになった。例としては REACH、食品・飼料法、植物保護製品規制、殺生物剤規制、化粧品規制、水域管理フレームワーク指令(Water Framework Directive)などがある。現在では EU 内でも国際的にも、内分泌攪乱物質の同定とリスク評価のアプローチに関する合意が焦点となっている。

欧州委員会による委任事項

上記の背景に基づき、EFSA は下記の問題に関する EC への助言を要請された。

- 1) ED とその他の異なった作用機序を持つ化学物質を区別するために、どのような科学的基準を使用すればよいか。これに対する回答では、低曝露量効果（非単調曝露量応答を含む）、感受性の臨界期、閾値効果などを検討しなければならない。
- 2) 内分泌活性物質への曝露によりヒトおよび生態系に現れる生理的調節（適応応答）と有害作用とを区別するために、どのような科学的基準を使用すればよいか。
- 3) 内分泌活性物質に媒介される効果の同定と特徴づけのために、既存の毒性試験法は適切であるか（ヒトと生態系の両者を考慮する必要がある）。

本意見書の作成にあたり、EFSA は利用可能な最新の学術情報を考慮することを求められた。その中には最終報告書「内分泌攪乱物質の評価の現状」(Kortenkamp et al., 2011)が含まれる。

また一貫性を保つ必要上、意見書作成に際しては他の学術諮問機関(欧州医薬品庁(European Medicines Agency, EMA)、欧州化学機関(European Chemical Agency, ECHA)、欧州環境機関(European Environment Agency, EEA)、ECの学術委員会(SCCS, SCHER, SCENIHR)など)の参画を求める必要があった。

ECはこの諮問に対するEFSAの最終意見書を2013年3月までに提出することを求めた。

委任事項の明確化

EFSAとECの間で問題設定の明確化を協議した結果、本意見書ではEC委任事項に含まれる下記3つの問題に関して利用可能な情報を評価することで合意した。

- i) EDの同定にどのような科学的基準を用いるか
- ii) 有害作用とは何か、有害作用と生理的調節をどのように区別するか
- iii) 既存の毒性試験方法で内分泌活性物質の影響を十分にカバーできるか。意見書は「内分泌攪乱物質」に関する欧州およびその他の関係機関からの既存の情報、現在得られている知見、研究活動に基づくこととした。

方法

意見書起草のためのワーキンググループの設置

EFSAは自己の標準処理手順(Standard Operating Procedure)に詳細に規定されているワーキンググループの設置・更新・閉鎖の手順に従った。ここにはたとえば委員長の選任、必要とされる専門分野の範囲の決定、EFSA内部で、あるいはEFSA専門家データベースから、適切な背景を持つ人物を探す方法などについて規定されている。今回の課題に適合する専門分野として、内分泌学(一般、ヒト、環境)、リスク評価および毒物学(一般、ヒト、環境)が考えられ、また(OECDの)試験方法に関する最新の知識を持つ専門家も必要であった。

ECからの委任事項にあるとおり、一貫性を保つために他の学術諮問機関にも接触した結果、上記の各専門分野に該当する専門家や、ECの学術委員会に属する諮問委員会(SCCS, SCHER, SCENIHR)・EMA・EPAの参加者も個人の資格でワーキンググループに参加することとなった。更にEC環境総局(Directorate-General for Environment)が組織するED戦略の見直しに関与している健康・消費者問題総局(Directorate-General for Health and Consumers)、共同研究センター(Joint Research Centre)、EMA、EEA、ECHAの代表者

もオブザーバーとして招請した。

これに加えて、EFSA の学術委員会は OECD、WHO など内分泌活性物質を扱っている国際組織に参画している専門家とも連絡し、ワーキンググループの第 4 回会合には意見陳述者を招いて WHO/UNEP による内分泌攪乱物質研究の現状の暫定的国際評価に関して講演と討論の機会を設けた。

専門家をワーキンググループメンバー、オブザーバーまたは専門家の選任に関する理事会決定⁶に従い、候補とした専門家全員について利益相反のないことを確認した上で、ワーキンググループへの個人資格での参加、オブザーバー参加あるいは意見陳述者としての招請を決定した。ワーキンググループのメンバー表、およびメンバーによる利害関係の申告は EFSA のウェブサイト⁷に掲載されている。

情報源

意見書の作成の第一歩は、内分泌活性物質に関する活動を行っている各国内、欧州または国際的機関から発表されている主要な記録文書を収集することであった。また EFSA の各国拠点を通じて内分泌攪乱物質に関する各国のポジションペーパーや概説を収集した。SC では EC の要請に従い、様々な専門家やフォーラムの見解を（論争的なものも含めて）検討した。SC は、本意見書において取り上げた諸問題に関するそれらの情報価値に対して感謝の意を表す。

EFSA は内分泌活性物質ないし内分泌攪乱物質に関する体系的な文献展望は行っていないが、本意見書のために検討した情報の概要は付録 A に掲載した。

収集した情報の評価に用いた方法とアプローチ

SC およびワーキンググループは、EC の提起した問題に取り組むために収集したすべての情報に、一般的な評価原則を適用した。この原則は EFSA の行うリスク評価の科学的側面の透明性に関する SC ガイダンス文書 (Guidance Document of the Scientific Committee) 2009 年版 (EFSA, 2009a) に記載されている。

評価

1. はじめに

人間活動によって環境中に放出される物質の多くは、ヒトや動物の身体において代謝や機能を制御する内分泌系またはホルモン系と相互作用する可能性がある。このような内分泌活性物質(EAS)は、合成医薬品、農薬、工業用化合物など様々な化学物質、消費者製品、工業の副産物、汚染物（ある種の金属を含む）などに存在する。しかしながら、食品や飼料として消費される植物にも多数の天然 EAS が含まれることにも注意しなければならない。また食品や飼料を汚染する可能性のある菌類の二次的代謝産物も内分泌類似の性質を示すことが知られている。天然の EAS の例としては大豆中のエストロゲン様化合物（ゲニステイン、ダイゼイン）、穀類に含まれるかび毒（ゼアラレノンなど）、キャベツに含まれるヨウ素吸収を阻害する可能性のあるゴイトロゲン類（グルコシネート）、甘草に含まれる鉱質コルチコイド系を攪乱する可能性のあるグリチルリチンなどが挙げられる。

「内分泌攪乱物質」(ED)なる用語が初めて餅られたのは、1991年に米国ウィスコンシン州で開催されたウィングスプレッド会議においてであり、健康に有害な可能性のある EAS を指していた(Colborn and Corlie, 1992)。今日一般に広く受け入れられている定義は WHO/IPCS によるもので(WHO/IPCS, 2002)、詳細は後述する。

上記のウィングスプレッド会議の「化学物質により誘導される性的発達の変調：野生動物とヒトとの結びつき」に関する宣言によれば、ED に関する社会的関心は当初は野生動物の生殖毒性・発達毒性の観察に関連していた。生殖能力の減退、奇形、性的および行動的発達障害などが観察された。また妊娠中の女性が合成エストロゲン（ジエチルスチルベストロール(DES)など）を服用したことによる子供の生殖器癌にも関心が向けられた。種により化合物によって効果に変動はあるが、同会議の宣言では合成あるいは天然 ED への曝露から生ずる主な問題として、(1) 胚、胎児あるいは周産期の動物に対する影響が成体と異なる可能性があること、(2) 曝露された親でなく子孫に影響が出ることが多いこと、(3) 発達途上の生体において曝露の時期がその後の影響とその性質に対して決定的に重要であること、(4) 決定的な曝露が胎児発達中に起こったとしても、影響の明らかな発現は成熟期に至って初めて見られる場合があること、の4点を挙げている (Bern et al., 1992)。最近になっていくつかの文献 (Kortenkamp et al., 2011; EEA, 2012; WHO/UNEP, 2013)がヒト、野生動物、動物モデルにおける内分泌攪乱の証拠を詳細に分析している。最新情報の詳細についてはこれらの論文を参照されたい。

ただし注意すべきは、生殖・発達に関わる上記のような問題は ED に固有のものではなく、また内分泌系自体もそれらの問題を遥かに超える広がりを持つことである。更に内分泌系はヒトでも動物でも多くの信号伝達系を含んでおり、多数のホルモンまたは信号伝達因子

が関係している。これらの因子は、アミノ酸誘導体、小型神経ペプチド、大型タンパク質、ステロイドホルモン、ビタミン誘導体の5つに大別される(Jameson, 2010)。またホルモンと同様の作用を持つペプチド成長因子も多く存在する。このため最近では、代謝調節や神経発達のホルモンの側面も内分泌系の一部として扱われるようになっている。

内分泌系に関係する作用機序で有害作用を及ぼす物質は EFSA の活動の様々な部門の対象となる。EFSA の横断的タスクフォースが 2010 年に発表したテクニカルレポートで現状を解明し、学術上およびコミュニケーション上の諸問題に対する勧告を行った(EFSA, 2010)。この報告書では「内分泌活性物質」の語で何らかの形で内分泌系に干渉する可能性のあるすべての物質を指しており、必ずしも有害作用を示さない物質も含めている。

1.1. 本意見書の対象範囲

標準的なリスク評価手順は、危険性の特定、危険性の特徴づけ、曝露評価、リスクの特徴づけの4つの段階から成り、第4段階は先行する3つの段階の統合化である(EC, 2000; WHO/IPCS, 20009)。ED に関する欧州委員会(EC)の今回の委託では物質の潜在的危険性(すなわち物質固有の性質)に関する問題が提起されている。したがって本意見書はリスク評価の最初の2段階、すなわち EAS に媒介される危険性の同定と特徴づけを中心とする。

或る種の天然または合成外因性物質が動物の内分泌系の機能に干渉し得ることについては相当数の科学的証拠が存在する(EFSA, 2010)。植物ホルモンも十分に特徴づけがなされており、天然または合成化学物質が植物ホルモン機能と相互作用する例もあるであろうが、本意見書の範囲は野生動物およびヒトの健康に対する ED の影響であり、植物のホルモン系との相互作用は対象としない。

委任事項の第1点・第2点は第3章「内分泌攪乱物質の同定の基準」で、第3点は第4章「内分泌活性物質に媒介される効果の同定および特徴づけのための試験方法の利用可能性と妥当性」でそれぞれ取り扱う。ED の試験戦略を展開することは本意見書の目的ではない。

意見書作成のための時間が限られているため、当初の要請に含まれていた ED 関係の概念のうち、下記については簡単な取り扱いにとどめざるを得なかった。

- 閾値については、3.1 項で内分泌攪乱と内分泌調節を区別する基準を論じる際に考慮した。
- 低曝露量効果、非単調曝露量応答曲線、感受性の臨界期、複数の物質への複合的曝露は第4章で試験方法の妥当性を論ずる際に簡単に触れている。
- 臨界作用、重篤度・(不)可逆性・作用強度の考慮は危険性の特徴づけの一部として扱う(第5章「内分泌攪乱物質の危険性の特徴づけの要素」を参照)。

1.2. EU の法規における内分泌攪乱物質関連条項の概観

EC から提供された背景情報には、内分泌攪乱に特化した条項を含む各種法令が多く言及されている。これらの概要を付録 8 に掲載した。内分泌活性物質が広く利用されていることから、関連法令の概観は EFSA の権限範囲（食品・飼料のリスク評価）を超え、医薬、化粧品、工業用化学品、殺生物剤などの分野に亘っている。「ゼロトレランス」「無視できる曝露レベル」「懸念の程度」など提案されている種々の概念はリスク管理に関係しているものであり、本意見書の範囲外である。

植物保護製品に関する規則(EC) No. 1107/2009 には、活性成分・セーフナー・共力剤を「曝露が（中略）無視できない程度であっても、ヒトまたは標的以外の生物に有害な内分泌攪乱性を持たないと考えられるならば」認可することが定められている。この文言から、EU では内分泌攪乱性を示す植物保護物質の規制において危険性に基づくアプローチが採られていることがわかる。規則(EC) No. 528/2012 では殺生物剤について同様のアプローチが示されている。米国と日本ではこれと異なって、すべての EAS についてリスク評価を実施する、すなわち危険性と曝露を共に考慮することとなっている。

2. 定義および用語

内分泌系に媒介される効果を記述するために、相互に関連する様々な用語が使用されている。それらの用語は各々利害関係者の視点を反映している一方、科学的解釈には幅がある。たとえば今回の委任事項においても、i)では「内分泌攪乱物質」、ii)と iii)では「内分泌活性物質」の語が用いられている。この章ではこのような用語の意味を明確にし相互の関係を明らかにする。

内分泌系

内分泌系は代謝と身体機能を調節する。詳細な説明は WHO/IPCS (WHO/IPCS, 2002; WHO, 2012)および米国 EPA のウェブサイト⁸で見ることができる。内分泌系は相互関連的システムとして、生体のほとんどすべての細胞・器官・機能に影響を及ぼす。代謝、成長・発達、細胞機能、心的状態など様々な生命機能が受胎時から成体を経て老齢に至るまで、内分泌系により多数の化学的メッセンジャーを介して調節されている。脳・神経系の発達、生殖系の発達と機能、血糖値レベルの制御などもこれに含まれる。このような機能を果たすために、内分泌系は様々なサイクルと負饋還ループを用いて、ほとんどすべてのホルモンの分泌を調節する。化学メッセンジャーの分泌のサイクルは数時間から数ヶ月にわたっており、生理学的調節を行いホメオスタシスを維持している。ホルモンが受容体に結合すると、受容体はホルモンの指令を実行して細胞内に存在する蛋白質を変質させ、あるいは遺伝子の発現を変更する。この両作用とも全身にわたる反応を引き起こすことがあ

る。内分泌系疾患または障害は、システムの構成要素の少なくとも一つが正常に働かない状態である。たとえばホルモンの放出量が過剰または不足であるとき、あるいは結合部位に十分な数の受容体がないときにはホルモン不均衡が起こることがある。

内分泌活性、内分泌活性物質

EFSAは内分泌活性物質に関する報告書(EFSA, 2010)においてEASを次のように定義している。

「直接的または間接的に内分泌系と相互作用し、その結果として内分泌系、標的器官および組織に影響を及ぼす化学物質」

このような相互作用の例として最もよく知られ、また最もよく特徴づけられているものは、物質とホルモン受容体（たとえばエストロゲン受容体(ER)）との結合であろう。そのような物質は受容体のリガンド結合部位との関係次第で作動的にも拮抗的にも（あるいは両様に）働く。物質が内分泌活性を現す相互作用の対象としては他にも、(i)ホルモン・受容体複合体の活性化の効果を媒介する過程に関与する細胞因子、(ii)ホルモン合成に必要な物質の細胞への取り込み、(iii)ホルモン合成または代謝・排出に関与する酵素、(iv)内分泌組織からのホルモン分泌、(v)血漿または細胞内の輸送または捕捉タンパク質とホルモンとの結合、(vi)内分泌機能の調節に関わる神経機能または神経・内分泌系信号伝達過程などがある。

EFSAによるEASの定義に従えば、内分泌活性を示す、すなわち内分泌系の少なくとも一つの要素と相互作用し得る物質はすべて内分泌活性物質に分類されることになる。天然ホルモン（エストラジオール-17 β 、テストステロンなど）も合成アナログホルモン（17 α -エチニルエストラジオール、トレンボロンなど）もこの定義によればEASであるが、すべてのEASが天然ホルモンまたはそのアナログであるわけではないことに注意が必要である。また内分泌系の定義の範囲によってもEASとされる物質の種類が変わる。これは内分泌系への理解が深まることによる変化である。

内分泌系による生理的調節

委任事項に言う「生理的調節」とは内分泌系による生理的調節であるとSCは理解する。従って本意見書では以後「内分泌調節」の語を用いる。

内分泌攪乱物質の現状評価 (State of the Art Assessment of Endocrine Disrupters, SAAED) に関する最終報告書に記されているように、ホメオスタシスの機能は内分泌系に典型的なフィードバック機構によっており、適応的である (Kortenkamp et al., 2011)。このフィードバック系における調節機能は、内分泌活性を持つ外因性物質(EAS)への曝露によって刺激される可能性がある。この調節とその効果が一時的で、かつ曝露された生体の内分泌系のホメオスタシス機能の範囲内にあるならば、この物質の影響は内分泌調節であり、

したがって有害作用ではないと考えられる（次項参照）。

内分泌攪乱および内分泌攪乱物質

SAAED には、毒性を理由とする化学物質の規制は「問題となる影響（ここでは内分泌攪乱）の科学的に健全な定義を見出さない限り進展し得ない」ことが指摘されている（Kortenkamp et al., 2011）。このことから ED を定義する様々の試みがなされ、屢々引用されている。

1996 年に米国 EPA はあるワークショップにおいて ED について次の定義を提案した（Kavlock et al., 1996）。

「ED とは、ホメオスタシスの維持・生殖・発達または行動を統御する体内の天然ホルモンの合成、分泌、輸送、結合、作用または排出に干渉する外因性物質である」

EPA は内分泌攪乱物質を作用機序から定義した最初の機関であるが、この定義は補償的ないしホメオスタシス的变化（上記の内分泌調節）と健康に悪影響を及ぼす効果との適切な区別を行っていない点で曖昧である（次項の有害作用に関する記述を参照）。

次に示す内分泌攪乱物質の「Weybridge 定義」（EC, 1997）では有害作用を明示している。

「ED とは、内分泌機能の変化を通じて無傷生物またはその子孫の健康に有害作用を及ぼす外因性物質である」

WHO/IPCS の定義（WHO/IPCS, 2002）も同様である。

「内分泌攪乱物質とは、内分泌系の機能に変化を生じさせることによって、無傷生物、その子孫、または（下位）集団の健康に有害作用を及ぼす外因性物質または混合物である」

WHO/IPCS の定義は 2 つの点で Weybridge 定義と異なっている。すなわち 1) 「を通じて」（secondary to）に代えて「によって」（consequently）を用いたこと。これは ED の同定・特徴づけ、すなわち内分泌活性と健康への有害作用との因果関係を示す科学的基準と試験方法に大きな意義を付与したものと解釈されている。2) 「（下位）集団」を追加したこと。これによって定義が生態毒性に対してより直接的に適用できるものと考えられる（次項参照）。SAAED 最終報告書に示されている調査によれば、EU 加盟国の大部分は WHO/IPCS の定義を承認しており、SAAED においてもこの定義が詳細に論じられている（Kortenkamp et al., 2011）。

米国内分泌学会（Endocrine Society）は最近、内分泌攪乱物質と公衆保健の原則についての声明を発表し（Zoeller et al., 2012）、その中で ED について別の定義を提案した。

「ED とは、ホルモン作用の何らかの局面に干渉する外因性化学物質またはその混合物である」

この定義は EPA の定義(Kavlock et al., 1996)を単純化したものである。Zoeller et al. (2012)の強調するところでは、危険性の同定によって、リスクとなる可能性のある化学物質に対するヒトおよび野生動物の感受性を把握することは重要ではあるが、化学物質がホルモン作用に干渉する能力（すなわち危険性）はそれ自体で有害作用の予想のための信頼できる指標であるという。彼らの考えでは、内分泌活性と有害作用の発現との関係の不確実さは曝露の量・持続時間・時期に関係し(Zoeller et al., 2012)、危険性と曝露とを共に考慮するリスク評価で取り扱われるべきものである。SC としては、*in vitro* または *in vivo* 試験で内分泌活性が陽性であることが示唆されたとしても、それが直ちに無傷動物に有害作用が現れることを意味するものではないことを強調したい。Zoeller らの考える ED は EFSA の定義する EAS に等しいことになり、SC としてはそのような定義には同意できない。しかし ED の管理のための危険性に基づくアプローチに伴う不確実性をリスク評価アプローチで、すなわち *in vivo* で確認された危険性と曝露量とを考慮して扱うべきであるとの示唆には同意する（5章参照）。

化学物質の内分泌攪乱性評価のための標準化されたテストガイドラインに関するガイダンス文書(OECD Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption) (OECD, 2012a)には、次のような「内分泌攪乱性の可能性のある物質」(possible endocrine disruptor)の操作的な定義が含まれている。

「内分泌系の機能を変化させる力はあるが、その変化の結果としての無傷動物に対する有害作用に関する情報が不確実な化学物質を意味する」

「内分泌攪乱の可能性のある物質」という用語とその定義は、疑いのある内分泌活性の確認または検討（すなわち危険性の同定と危険性の特徴づけの区別）のために概念フレームワーク(OECD, 2012a)で試験されている物質に一意的に適用できるように、「潜在的な内分泌攪乱性物質」(potential endocrine disruptor)と区別して意図的に用いられたものである。

WHO/IPCS (WHO/IPCS, 2002)は「潜在的な内分泌攪乱物質」を次のように定義している。

「潜在的な内分泌攪乱物質とは、無傷生物、その子孫または（下位）集団において内分泌攪乱を生ずることが予想される性質を持つ外因性物質または混合物である」

そのような性質は、曝露された生体の内分泌系の諸要素と相互作用する内在的な性質（たとえば *in vitro* 試験で見出されるような）を現すと考えられ、したがって「潜在的な内分泌攪乱物質」は EAS と同義と見なすことができよう。つまり潜在的な内分泌攪乱物質とは、無傷生物での（すなわち *in vivo* での）有害作用の発現に不確実性のある物質ということになる。

SC としては、「内分泌攪乱の可能性のある物質」も「潜在的な内分泌攪乱物質」も、既に

EFSA (EFSA, 2010)に示唆されているとおり、意味的には EAS の定義に重なるものと考えられる。本意見書では以後これらの用語に相当するものとして EAS の語を用いる。

有害性

米国 EPA の定義(Kavlock et al., 1996)および米国内分泌学会による簡略化された定義では、ED を作用機序のみによって定義しており、その点では EAS の定義と同様である（上述を参照）。これに対して Weybridge 定義および WHO/IPCS の定義では、作用機序と効果の有害性との両者によって ED が定義されている。

WHO/IPCS (2009)は有害性を次のように定義している。

「生体、個体群または（下位）集団の生理・成長・発達・生殖または寿命の変化であって、機能障害、追加的ストレスの補償能力の障害、その他の影響に対する感受性の増大をもたらすもの」

この定義の後半にある「機能障害、追加的ストレスの補償能力の障害、その他の影響に対する感受性の増大」は文脈依存的である、すなわちここで言及される能力の減退は生物の特定集団の標本についてのものである。この場合生物はその環境（実験室、マイクロコスムまたはメソコスム、野生）に生理的に反応している。したがってこの定義では、有害性を危険性のみから仮定あるいは確認することはできない。全米科学アカデミーの学術研究会議(NRC)が EPA に提出した 21 世紀の毒性試験に関する報告書(NRC, 2007)にもこのことが反映している。

「生物学的擾乱の結果はその大きさ（曝露量に関係）、時期、持続時間、およびホストの感受性に依存する。したがって低曝露量では多くの生物体はそのホメオスタシス限界内で正常に活動するが、曝露量が増大すると明らかな生物学的応答が現れる。それは適応によってうまく処理されることもあるが、感受性の高い人は応答する。擾乱が更に強いのか、あるいは持続するとシステムの適応能力を超え、組織の損傷や健康への有害な影響が出現する」

有害性が無傷生物または（下位）集団の EAS（危険物としての）への曝露の結果であるか否かは、危険性と生物学的応答（効果）との関係、生体ないし(下位)集団の状態（別のストレス）、危険物への曝露の程度によって決定される。このような情報の一部は危険性の特徴づけによって得ることができる。

定義に関して上に述べたように、WHO/IPCS の定義は「（下位）集団」を加えた点で Weybridge 定義と異なる。これによってこの定義は化学物質の環境的危険性とリスクの評価により直接的に適用できると考えられる。環境に関しては、有害性は防護の想定目標との関わりで考察されることになる。この目標は一般には個体数の安定性と解される（すな

わち個体への影響は、集団に影響しないと考えられるならば許容される)。注意すべきは、内分泌攪乱の定義を生態毒性に関する規制に適用しようとするとき、有害性（集団）と内分泌的作用機序（個体）をどの生物組織レベルで決定するかが問題になり得ることである。したがって EAS が環境 ED と認定されるのは、野生動物⁹の集団が影響を受けることが実証されるか、あるいは妥当に推論される場合のみである。このための証拠としては、成長、発達、生殖などのエンドポイントの実験室的または野外データを用いることができる。それらのデータを集団モデルその他の予測手法により外挿して、集団サイズでの生物学的に有意な効果または安定性を知ることができる。

● EFSA の使用する定義についての結論

EFSA 学術委員会は、WHO/IPCS (2002)による ED の定義（EC が委任事項の背景に用いたのと同じ定義）および WHO/IPCS (2009)による有害性の定義を本意見書における実用的定義として用いるのが適当と判断する。

EU の法規に含まれる保護目標に対応して、ヒトの健康については個人レベル、野生動物については（下位）集団レベルで有害作用を把握すべきである。

EAS とは、直接的または間接的に内分泌系と相互作用する力があり、その結果として内分泌系とその標的器官および組織に影響を及ぼす物質である。ただし *in vivo* において最終エンドポイントで測定される有害作用を生ずる可能性の有無については不確実性がある。EAS が惹き起こす生物学的変化が生体のホメオスタシス能力の範囲内にあるか、代謝によって解毒されるため、無傷生物に有害作用が現れない場合もあるが、ホメオスタシス系が擾乱を受ければ全身レベルで有害作用が発現する。後者の場合の EAS は ED と呼ぶことができる。

3. 内分泌攪乱物質の同定の基準

この章では委任事項の最初の 2 つ、すなわち 1)ED の同定にどのような科学的基準を用いるべきか、2)有害作用とは何であり、内分泌調節とどのように区別されるかを扱う。

本意見書では EFSA 学術委員会の決定に従って WHO/IPCS による ED の定義（2 章参照）を実用的定義として採用し、ED を、i)無傷生物ないし（下位）集団における有害作用の存在、ii)内分泌活性の存在、iii)内分泌活性と有害作用との間の妥当と考えられる、または実証された因果関係、の 3 つの基準によって定義する。

この章では内分泌攪乱に固有の問題のみを取り上げる。生理的調節（内分泌調節）と有害性との区別は ED に固有の問題ではなく、より広い文脈で考察しなければならないことを

強調しておく（勧告の章を参照）。

3.1. 有害性および内分泌攪乱と内分泌調節との区別の基準

第2章で述べたように、SCは有害性の定義としてWHO/IPCSの2009年の提案を採用する。

「生体、個体群または（下位）集団の生理・成長・発達・生殖または寿命の変化であって、機能障害、追加的ストレスの補償能力の障害、その他の影響に対する感受性の増大をもたらすもの」

これは有害作用の一般的定義であり、内分泌系に固有のものではない。

本意見書のために合意されたEDの定義（2章参照）の含意するところでは、有害作用は無傷動物に観察されなければならない（たとえば *in vitro* システムや去勢または卵巣剔除を受けた実験動物での観察は有効でない）。環境との関連では、生体毒物学的な危険性評価の焦点は標的以外の集団であることを改めて述べておかなければならない。したがって実験動物で観察された有害作用が集団にとって意味があることを確認することが重要である。このため、環境中の1つまたはそれ以上の種の生殖、成長・発達、罹病率、生存率に現れる有害作用に特に注意を払うべきである。これらは集団の個体補充と安定性に最も影響が大きいと考えられる因子だからである。

SAAEDに記されているとおり、内分泌系の本質的な特徴である補償的フィードバック機構によって、内分泌系の様々な擾乱に対抗するホメオスタシスが可能になっている。内分泌活性を持つ外因性物質に曝露されると、その刺激によってこのフィードバック系による調節が起こり得る。調節が一時的であるか、あるいはその生体の内分泌系のホメオスタシス能力の範囲内であれば、物質の効果は「内分泌調節」と考えられる。しかし誘発された変化をホメオスタシスの範囲内で補償しきれなければ（たとえば発達途上の臨界期における何らかの内分泌モダリティ/軸/経路において、または高曝露量に対して）、有害性の閾値を超え、観察される変化は有害と見なされる。成体において単に適応的な効果を及ぼすのみの一時的な内分泌調節も、ホメオスタシス機能の十分発達していない時期には恒久的な障害の原因になり得ることに注意しなければならない(WHO, 2012)。

要約すれば、内分泌系への影響は、一時的であるはずの生理的状态が正常以下または以上の応答を誘発する場合あるいは残留する場合に有害となるわけである。内分泌攪乱効果の解釈においては、栄養状態が影響することにも注意する必要がある。甲状腺障害は個体内のヨウ素の状態に大きく左右されることはよく知られている。

「有害作用の閾値」を超える点が定義されていない状態では、ある効果が内分泌調節であるのか内分泌系への有害作用であるのかを区別する具体的な基準を立てることが困難である点については、SCはKortenkamp et al. (2011)と同意見である。このような変化の毒物学的意味については個々の場合ごとに専門家の判断を仰ぐ必要がある。一般に、生化学的・分子的レベルでの一時的で一貫性のない小規模の変動は適応的であり（すなわち有害でない）、細胞・器官・生体レベルでの持続的で一貫した恒久的変化が *in vivo* での病理や機能障害、あるいは発達時期の変化を結果する場合には有害と考えることができる。

内分泌調節が有害作用に変わる点は、応答の絶対値として定めることはできず、対照またはバックグラウンドとの比較によって相対的に定めなければならない。したがって、ある物質を ED と認めるには有害性が前提である以上、内分泌調節と有害作用との間の生物学的閾値を決定する必要があると SC は考える。この閾値を超える時点を一般的に定めることは現状では困難であるので、個々の場合について専門家の判断によって決定しなければならないであろう。

大部分の毒性発現過程について、ある閾値以下では生物学的に有意な効果は現れないと一般に仮定されている(Dybing et al., 2002; WHO/IPCS, 2009)。曝露の閾値の存在は、実験的手段によっては確証も排除もできない。なぜならば効果を測定するためのどのような方法にも検出限界があるため、閾値が存在するとしても明瞭に知ることができないからである(Kortenkamp et al., 2011)。しかしながらホメオスタシスおよび細胞保護機構が存在し、標的細胞にも冗長性があることから、毒物学的に有意な効果が生ずるためには、物質と敏感な部位との相互作用、あるいはそのような部位の占有が一定限度以上に達することが必要と考えられる(Dybing et al., 2002)。相互作用がこの臨界値(閾値)以下であれば、体外物質への曝露による擾乱はホメオスタシス機能で処理されてしまい、構造や機能の変化は観察されない。しかし発達のある時期にはホメオスタシス機能が減退し、生体の感受性が高まるので、同じ曝露にも影響されることになる。

特異性：内分泌系と無関係な毒性による内分泌系への影響

明らかな毒性物質によって生ずる有害作用は、化学的刺激に対する非特異的・全身的な応答を示すことが多い(たとえば動態的過程を飽和させること、防御・修復機構に打ち勝つこと、ストレス反応を惹き起こすことによる)。毒性が全身に影響すれば、内分泌系もその影響を受ける可能性が高い。刺激あるいはストレスに抗してホメオスタシスを維持することが内分泌系の主たる機能であることを考えれば、これは当然である。したがって SC としては、内分泌系に関連する有害作用であっても、明らかな毒性物質によって内分泌系以外の作用機序を通じて惹き起こされた場合は、内分泌系によって媒介される作用機序には含めないものと結論する。

3.2. 内分泌活性

2章で述べたように「内分泌活性」とは、内分泌系の少なくとも一つの要素と相互作用あるいは干渉し得る物質固有の性質を意味し、「内分泌活性物質」とは、内分泌系と相互作用し得る、ただし必ずしも有害作用を示すとは限らない物質を意味する。したがってSCは内分泌活性を、(生態)毒性の危険性自体としてでなく、有害作用を示す可能性のある種々の作用機序の集合と考える。

内分泌活性に関する情報は、既存の情報、リードアクロス、*in silico* ツール、現行のOECD概念フレームワーク¹⁰(OECD, 2012a)の*in vitro* および*in vivo* スクリーニング試験(レベル1, 2, 3)、その他の機構的研究から得ることができる。これら機構的研究の価値は個別に評価しなければならない。

3.3. 内分泌活性と有害性の因果関係

ある物質がEDであると結論するためには、無傷生物の観察で認められた、誘起された内分泌擾乱ないし活性と有害作用との間に生物学的に妥当な因果関係があることの適切な証拠が必要である。内分泌活性ないし作用機序を示すのに必要な証拠のレベルと、有害性を示すのに必要な証拠のレベルとの間に差がないことを強調したい。

その他の(生態)毒物学的危険性と同様、内分泌系に媒介される有害作用も、各種法規制への適合のために行われている標準的な毒性試験によって検出することができる。特に内分泌系に媒介される毒性は、反復曝露、生殖および発達毒性、発癌性の試験で検出できる場合があるが、観察された有害作用と内分泌活性との因果関係が生物学的に妥当であるかどうかを決定するためには、機構的研究など内分泌活性の可能性に焦点を当てた研究を追加する必要もあろう。EASへの複合曝露に関してこれらの試験の適切性を検討した報告書が最近発表されている(EEA, 2012; WHO/UNEP, 2013)(4.7.2.2項をも参照)。

有害作用を生ずる内分泌系への作用機序の重要な過程すべてを示すことは非常に手間のかかる仕事であり、必要とはされないが、観察される内分泌活性と内分泌系に媒介される有害作用との因果関係(の可能性)を説明する論理的かつ妥当な推論が存在することが重要である。ここに言う「妥当性(plausibility)」には専門家の判断が含まれる。Bradford Hill¹⁰は事象と結果(たとえば曝露と健康被害)の因果関係の適切な証拠のための最小限の判断基準を示している(Bradford Hill, 1965)。その中には生物学的妥当性、知見の無矛盾性、特異性、予見可能性、一貫性、曝露量・応答関係と時間的前後関係の一致、不確実性の特徴づけが含まれる。

内分泌活性または有害作用を実証するための試験方法は、必ずしも標準化されている必要はないと SC は考える。危険性評価では、ロバストネスが証明されているならばどのようなデータでも利用できる。この個別データの評価では次の諸項目に関する判断が必要である。1) 使用した方法またはモデルの有効性 (すなわち、方法またはモデルに十分な予測能力があるか)、2) 各要素の信頼性を総合した、情報の適切性 (すなわち、方法またはモデルの適用方法が正しいか)、3) 有意性 (すなわち、方法またはモデルが所期の目的に適合しているか)。

証拠の重みづけ

有害性と内分泌活性に関して得られるすべての情報 (in silico, in vitro, in vivo データ、観察研究を含む) を、証拠の重みづけ(weight-of-evidence approach)によって考慮すべきである。証拠の重みづけをどのように扱うべきかの指針は WHO (たとえば Boobis et al., 2006; Boobis et al., 2008) や SCENIHR(2012)によって提示されている。有害作用と内分泌活性の証拠は、順次ではなく同時並行的に評価しなければならない。

ヒトの健康に関しては、毒性研究に取り上げられる有害作用がヒトに関係することが当然の前提となっているが、健全な科学的データにより無関係が示されてこの前提が覆されることもある。利用できる証拠および生物学的妥当性を分析するために WHO/IPCS human relevance framework (Boobis et al., 2008 など) のような構造化されたフレームワークを利用することが提案されており、これによってロバストで透明性のある結論を導くことができる。

SC の前回の意見書(EFSA Scientific Committee, 2011)で論じたように「証拠が無いことは無いことの証拠ではない」から、効果 (内分泌系関連の効果も含めて) の存在しないことを証明することは不可能であり、試験結果が陰性であることを理由に内分泌活性を排除することはできない。したがって、ある物質が ED であるか否かについて結論を下すためには、上記のような各種のデータを考慮した証拠の重みづけが必要である。適切なデータを得るためには試験戦略が必要であることを強調したい (4.8 項を参照)。

4. 内分泌活性物質に媒介される効果の同定および特徴づけのための試験方法の利用可能性と妥当性

この章では委任事項の第 3 点、すなわち内分泌活性物質の影響は既存の毒性試験方法で適切にカバーできるか否かを検討する。そのために内分泌活性の検出に有用な既存の方法を概観する (ヒトの健康と環境を共に考慮する)。これを機構的情報(mechanistic information)と名付ける。

更に、SC の支持する ED の定義には有害性の基準も含まれているので、ここでは内分泌系に媒介される有害作用の同定と特徴づけに有用な現存の方法をも概観する。標準的な毒性試験には内分泌系に敏感なエンドポイントが各種含まれている。これら最終エンドポイントの試験は、内分泌系に関連する可能性のある *in vivo* の有害性の同定と特徴づけを行うために設計されている。

この章では、EAS に媒介される効果の同定と特徴づけのための既存の（国際的に）標準化または検証¹¹された試験方法、および SAAED による分析と勧告(Kortenkamp et al., 2011) を評価するための出発点として OECD 概念フレームワーク(CF)改訂版(OECD, 2012a)を利用し、OECD および米国 EPA のウェブサイト¹²に掲載されているヒトの健康および環境に関連する試験方法を検討する。その他の関連する指針についても、特に検証済みの試験方法、テストガイドライン(TG)、および OECD 作業計画に含まれる試験プロジェクトを取り上げる（付録 C をも参照）。

この検討の間に、現行の国際的に検証された試験方法と、十分に標準化されて検証に近い状態にあるプロトコルとの間に齟齬がある可能性が報告された。規制目的で国際的に標準化されたものではないが研究目的に広く使用されている試験方法もあるが、この章ではそれらは扱わない。

4.1. 内分泌活性物質の試験方法に関する OECD ガイダンスの背景

OECD は 1998 年に ED のスクリーニングおよび試験のための既存の方法の見直しと新しい方法の開発を、優先プログラムとして開始した。それ以降、可能性のある試験法のいくつかは TG に発展し、また開発中の方法もある。これらは内分泌攪乱の試験および評価に関する OECD の改訂版 CF(OECD, 2012a)に集約されており、化学物質の内分泌攪乱性の評価に利用できる方法として OECD の TG、標準化された既存の試験方法、開発中または提案されている方法の一覧表と指針を見ることができる。OECD ガイダンス文書(Guidance Document, GD) 150 には試験法の利用と解釈について、および情報の欠落部分の同定についての詳細な指針が掲載されている。

検証された TG はすべて OECD の全加盟国の承認を得ている（すなわち合意文書である）。このため SC はそれらの方法の適切性・有用性を認め、内分泌系に関連する他のエンドポイントに対応するための進行中の検証作業および TG 開発の努力に敬意を表する。

以下の各項の作成に当たっては、関連する OECD 詳細展望(DRP)として次のものをも参照した。すなわち DRP No 178 (内分泌攪乱物質の評価のための新しいエンドポイントと方法) (OECD, 2012b)、DRP No 97 (内分泌攪乱試験における代謝) (OECD, 2008)、DRP No 57

(甲状腺ホルモン攪乱試験) (OECD, 2006)、DRP No 135 (内分泌攪乱性環境物質のスクリーニング: 魚類におけるエストロゲンおよびアンドロゲン受容体結合およびトランス活性化試験) (OECD, 2010)である。これら DRP に含まれる勧告事項には、OECD の ED 関連専門家ワーキンググループや検証管理グループが現在準備中のものも多いが、最終論が出ていないため、それらの情報はまだ公開されていない。

OECD は 2009 年にデンマークにおいてワークショップ「内分泌攪乱物質の試験・評価・管理に関する OECD 加盟国の活動」(OECD Countries' Activities Regarding Testing, Assessment and Management of Endocrine Disruptors)を開催した。このワークショップでは OECD が更に推進すべき活動として特に下記を勧告した。

(i) 内分泌攪乱物質の評価に関するガイダンス文書の作成 (現在は OECD GD 150 として公表されている)。

(ii) 内分泌攪乱物質の試験と評価に関する概念フレームワーク 2002 年版の改訂。

内分泌攪乱物質の試験・評価タスクフォース顧問団(Endocrine Disruptors Testing and Assessment Task Force Advisory Group, EDTA-AG)は、国際的な多数の専門家のグループによる共著として化学物質の内分泌攪乱性の標準テストガイドラインに関する GD (GD 150, OECD, 2012a)を作成し、OECD 加盟国の承認を受けた。この資料は、特定の化学物質が ED であるか否かの判定の信頼性を増すために、CF の上位レベルの試験法としてどれが必要とされるかを、下位レベルのツールを利用して決定する方法の指針である。EDTA-AG は CF 改訂版の作成にあたって 3 つの事例によりデータ解釈経路の価値を示している(OECD, 2012c)。

改訂版 CF は GD 150 に含まれており、データ解釈指針には CF に示されている試験法のうち 27 種 (脊椎動物、無脊椎動物の *in vitro* 試験を含む) が取り上げられている。また現在検証または予備検証段階にある方法も付録に記述されている。この GD は、経験の蓄積や新しい試験方法の検証ないし開発による TG としての承認を考慮して定期的に改訂されることになっている。

(iii) 既存のテストガイドライン(内分泌攪乱物質に関する OECD の活動情報(2012)を参照)に含まれないエンドポイントに関する DRP の作成。現在は下記として公表されている。

OECD Detailed Review Paper No 178. The State of the Science on Novel *In vitro* and *In vivo* Screening and Testing Methods and Endpoints for Evaluating Endocrine Disruptors (OECD, 2012b).

OECD 概念フレームワーク改訂版の概要

CF では複雑多様な情報を 5 つのレベルに分けて扱っている。レベル 1 は既存情報および試験以外の情報であり、試験・評価の最初の段階での必要性に対応する。レベル 2 は *in vitro* の内分泌系機構または作用機序の試験方法から選択されている。レベル 3 は *in vivo* の内分泌系機構のスクリーニング法から選択されている。レベル 4 は内分泌系に関連する最終エンドポイントを含む（有害作用の）試験、レベル 6 は生涯の更に広い部分にわたる、より包括的なデータである。

レベル 2 および 3 の機構的研究によって内分泌活性が明らかにされることは、ある物質を EAS と見なすために不可欠であるが、個々の物質を ED と判定するためには不十分なことが多い。レベル 2 および 3 の試験の結果は、特定のエンドポイントに関わる以後の試験（レベル 4、5 のような）の優先順位づけに利用でき、後者によって EAS が ED であると見なされる前提となる有害作用が同定される。GD は証拠の重みづけ(WoE)、優先順位の設定、有害転帰経路(AOP) による ED のデータの評価の必要性に応えるものである(NRC, 2007; Ankley et al., 2010; OECD, 2012e)。ある物質が ED であるか否かの決定に必要な情報をただ 1 つの試験方法から得ることは原理的に期待できない。なぜならそのためには、物質が内分泌系とどのように相互作用するかを示す機構的情報と、その相互作用の結果として現れる可能性のある有害作用を記述する最終的な情報が共に必要だからである。複数の試験の結果を組み合わせることで WoP が増大し AOP が解明される。OECD CF (OECD, 2012a) に詳述されているように、既存の情報の性質や規制のための試験・評価の必要性によっては、すべてのレベルを通過することもあり得る。各物質の評価も、既存情報すべてを考慮しながら個別に行うべきである。In vivo での各種有害作用のスペクトルで特徴づけられる応答のパターンが、既知の（既存情報（レベル 1）から知られる）内分泌活性に起因することが明らかな場合もあり、たとえば抗アンドロゲン性物質に曝露された雄ラットに停留率丸や外陰部奇形などが認められる(Foster, 2005)場合、有害作用は内分泌障害に起因すると推定されるが、内分泌活性は推論されたのであって、実証されたとは言えない。

付録 C に CF リストの抜粋が、4.4~4.6 項に CF に含まれる哺乳類・水生生物・鳥類に対する各レベルの試験法の詳細がそれぞれ掲載されている。各試験法についてその長所・短所が対応するテストガイドラインに記載・検討されており、直接参照することができる。

4.2. OECD 概念フレームワーク改訂版レベル 1：既存データおよび試験によらない情報

OECD GD (OECD, 2012a)によれば、「内分泌攪乱のスクリーニングまたは試験で得られたデータを評価する前に、その物質に関する既存のすべての情報を整理しなければならない。」したがって CF のレベル 1 は、物理化学的性質（分子量、反応性、揮発性、生分解性など）、疫学および野外研究を含むすべての既存情報、標準的または非標準的試験から得られる（生態）毒性データ、リードアクロス、化学的分離、（定量的）構造活性相関((Q)SAR)その他の

in silico での予測、吸収・分布・代謝・排泄(ADME)モデルによる予測などから成っている。

4.2.1. ヒトまたは野生動物の内分泌活性物質への曝露の危険性の特徴づけに疫学情報、野外および実験動物情報を利用する際の留意点

環境 EAS に関連して妥当な因果関係を評価するための疫学的研究の設計と解釈には、まず考慮しなければならない重要な留意点がある。それは次のような交絡因子である。1) 環境 EAS は種類が多く、かつ遍在していること、2) ヒトは複数の物質に低レベルで常時曝露されていること、3) 栄養状態その他の生活環境要因が関係する可能性があること。ヒトへの EAS の影響を評価する研究においては、特定の EAS への曝露の正確な評価（利用できる適当なバイオマーカーによる）と、関連する発達上の重要な時期の同定と共に行うことが主な問題である。更にヒトの生殖エンドポイントの特徴として、集団が不均一であるため自然変動の幅が大きく、疫学的研究での評価には困難がある。

野外データの場合、一般に ED と非 ED に対する影響の推定には大きな差がない。しかし ED の影響が集団レベルで見られるか否かを明確にしたい場合に、野外データが利用できれば有用な場合がある。そのようなデータがないときは、成長・生殖などのエンドポイントに関する実験室データから集団への影響への外挿が信頼できるものでなければならない。母集団モデリングが利用できれば理想的であるが、必須ではない。ある種の影響、特に個体の行動への影響は（下位）集団レベルの観察では容易に知り得ないことに注意が必要である。

ヒトおよび野生動物での内分泌攪乱の影響を解明する上で、動物実験は大きな寄与を果たしているが、ヒトや野生動物には適用できないような高レベルの曝露を用いた研究も少なくない。規制の目的には、ロバストな曝露量・応答曲線を得るため十分な数の曝露レベルを維持する必要があるが、ヒトや野生動物に関連させ得るレベルでの動物実験が更に多く行われることが望ましい。

ヒトや野生動物の健康に対する EAS の影響にまつわる不確実性、および非臨床的データからの外挿の限界を考えると、上記のような研究を実施することは、方法論的構成・質または曝露量（濃度）の選択など固有の限界はあっても、大規模集団への EAS の影響評価のために不可欠である。付録 D にそのような研究の詳細を述べ、研究の実施と解釈についての重要な問題を検討する。

4.2.2. 物質の内分泌活性のスクリーニングのための計算毒物学および試験によらない方法

4.2.2.1. 背景

化学毒性の通常の試験には実験動物の使用が必要である。SC および植物保護製品およびその残留物に関するパネル(Panel on Plant Protection Products and their Residues)は前回の意見書(EFSA, 2009b; EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues, 2012a)において、食品・飼料のリスク評価や、優先順位決定のためのスクリーニングとその後の試験において実験動物の使用を減らすことが重要であるとの認識を明らかにした。計算(in silico)毒物学によれば、内分泌活性に関連する毒物学的エンドポイントについての化学物質の高速スクリーニングのために、動物を用いず生物学的・化学的性質に基づく試験が可能である。ED 試験に関する OECD の CF では、この方法はレベル 1 に属する。

In silico 試験法、動物を用いない試験法としては、分子モデリングツール、構造活性相関(SAR)とそれに基づく物理化学的リードアクロスおよび化学的分類、(定量的)構造活性相関((Q)SAR)などの予測的統計モデル、データベース、エキスパートシステムなどがある。

これらのツールには無料で利用できるものも市販品もあるが、ここでは主に無料で提供されているデータとツールを扱う。市販ツール (Topkat, Leadscope, Derek, Meteor, Hazard Expert など) についての情報は引用文献で見ることができる。これらのツールは、現時点での法規制においては殆ど認められていないことに注意しなければならないが、スクリーニング用として、あるいは総合的な試験戦略の立案のために有用である。ツールの品質・信頼性・使いやすさの改善や統合化の努力が欧州内でも国際的にも推進されている。

以下の諸項では各種ツールと適用されるエンドポイントを概観する。

4.2.2.2. In silico の三次元分子モデリング

タンパク質結晶中の受容体と酵素リガンドの結合のシミュレーション、または受容体のホモロジーモデリングに基づく in silico の三次元分子モデリングツールは既に過去数十年にわたって医薬品研究開発に使用された実績があり、薬学文献に多くの例が発表されている。賦活・失活の様相を明らかにし、機構の解明によってリガンドの結合活性を予測するには分子力学が有効である。これら三次元計算ツールによって高度の正確さが実現でき、EAS の危険性評価においても過去 10 年にわたって利用されている (Jacobs et al., 2003; Jacobs, 2004; Akahori et al., 2005; D'Urso et al., 2005; Vedani et al., 2012 など)。

4.2.2.3. 化学的分類とリードアクロス

OECD の定義によれば、「化学的分類(chemical category)とは、主に構造の類似性により、物理化学的性質、ヒトの健康または環境毒性に関連する性質、環境中の運命が類似していると予想される化学物質のグループである」 (OECD, 2007a, 2009a)。実際的には、ある物質 (ソース物質) のエンドポイント情報から、何らかの点で「類似している」(通常は構造

の類似性または作用機序の同一を根拠として)と考えられる他の物質 (ターゲット物質) の同じエンドポイントを予測する。しかしこの場合注意すべき制約が少なくなく、たとえば構造的に類似した分子の生物活性が異なる場合もある (Van Drie, 2003)。

無料で公開されている OECD (Q)SAR Toolbox (4.2.2.5 項をも参照) は、高品質のデータベース群を利用して、構造あるいは作用が類似している物質をグループ化するためのプラットフォームである。ここでのスクリーニング戦略は、ターゲット物質からの構造警告 (たとえば ER 結合ポテンシャル) を用いてデータベースをグループ化し検索することである (OECD, 2007a, 2009a)。

4.2.2.4. 予測的(Q)SAR モデル

SAR は物質の化学構造 (または構造に関連した性質) と生物活性 (または目標とする性質) との関係を見出すことを目的とするアプローチである。(Q)SAR は (定量的) 構造活性相関に基づくアルゴリズムを用いたシステムである。この方法では一群の化合物の物理化学的性質を用いて生物活性を数学的に記述する。生物活性 (毒性を含む) は、分子・組織・標的器官・生体系・全身のいずれのレベルでも発現し得る。構造、作用機序またはその両者が密接な関連を持つ (すなわち適用対象の狭い) 物質からモデルを生成させる局所的な (Q)SAR は通常ロバストネスが高いが、より多様な物質をティーチングに使用するグローバル(Q)SAR は、適用範囲は広いが一般に予測力のロバストネスは劣る。信頼性が高くかつロバストな(Q)SAR モデルの開発に関する原則が OECD で合意されている (OECD, 2004)。要約すると、モデルは規制上の特定のエンドポイントに適用でき、透明性のある方法論に従って開発され、外部データベース (モデル生成に用いたのとは別のデータベース) を用いてロバストネスと予測能力を厳密に検証したものでなければならない。また個々のモデルの「適用範囲」を明確に定義することが必要である。

完全に検証された(Q)SAR モデルは一般に、未試験の化学物質の毒性の推定に、モデルの予測範囲内であれば高い信頼性を示す (正確度 70%以上)。予測範囲外の物質の評価には限界がある。複数の(Q)SAR モデルによる評価と、構造警告モデルや類似分子からのリードアクロスなど他の情報とを組み合わせた WoE アプローチによれば、ツールの有効性が向上し、in silico 評価全体の信頼性を高めることができる。

EAS に関して現在利用できる(Q)SAR モデルの概説として、Benfenati et al. (2005)、Lo Piparo and Worth (2010)、Castello and Worth (2011)があり、また農薬代謝産物の毒物学的意義に関する EFSA 意見書の作成の一助として外部委託された調査 (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues, 2012a)もある。

内分泌攪乱の機構としては ER 結合が最も広範囲に研究されており、EAS に関連する最初のロバストな(Q)SAR モデルもこの用途のためのものであった。デンマーク国立食品研究所 (Danish National Food Institute) は環境化学物質に有効な ER およびアンドロゲン受容体 (AR) のモデル (Jensen et al., 2008; Vinggaard et al., 2008) とプレグナン X 受容体のモデル (Dybdahl et al., 2012) を発表している。ステロイドホルモン受容体 (AR、グルココルチコイド受容体 (GR)、PXR、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR)- γ 、プロゲステロン受容体、甲状腺ホルモン受容体 (TR) など) や細胞質芳香族炭化水素受容体 (AhR) に有効な、三次元モデリングツールと (Q)SAR を組み合わせた 3D (Q)SAR のようなモデルもある (Jacobs, 2004; Vedani et al., 2012)。その他の内分泌モダリティ、たとえばレチノイド X 受容体やエストラジオールスルホトランスフェラーゼに対するモデルも発表されているが、検証されたもの、あるいは一般的に利用できるような広い適用範囲を持つものは少ない。内分泌系に干渉する可能性のある化学物質は極めて多様であるから、単一の (Q)SAR を多くの EAS に利用しようとするのは非現実的な試みである (Jacobs et al., 2008; OECD, 2008)。発達毒性や生殖毒性などのより複雑なエンドポイントに対する (Q)SAR モデルは、それ自体としては信頼性に欠けるが (Maslankiewicz et al., 2005; Lo Piparo and Worth, 2010; JRC, 2011; Worth et al., 2011; EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues, 2012a)、他の *in silico* モデルやツールと組み合わせて適切に利用すれば WoE の一要素となり得る。

4.2.2.5. データベースおよび無料ソフトウェア・プラットフォーム

EAS に関するデータベースとしては、米国 FDA の Endocrine Disruptor Knowledge Base (EDKB)、Endocrine Active Substances Information System (EASIS)、米国 EPA の Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Universe of Chemicals が利用できる。EU では既存の DG Environment データベースの更新版として Endocrine Active Substances Information System (EASIS)¹³ が開発中である。

無料ソフトウェア・プラットフォーム

EAS の *in silico* スクリーニングに利用できるソフトウェア・プラットフォームとしては、OECD (Q)SAR Toolbox が重要である。これは化学物質の危険性評価に必要な (生態) 毒性データの欠落を埋めるために開発されたもので、物理化学データと (生態) 毒性の実験データのデータベース、様々な質の (Q)SAR モデル、(Q)SAR モデリングツールおよびエキスパートシステムから成っている。種々の毒性エンドポイントに対する多くのデータベースが含まれているが、内分泌関連固有のデータベースは OASIS ER Binding Database のみである。ここには 1460 種の化合物の ER 結合親和性のデータが収録されている。生成されるデータはすべて 17- β -エストラジオールを陽性対照とする相対値である。

Toolbox に含まれている(Q)SAR モデルの一つ MultiCASE RBA (Q)SAR は、313 種の物質の構造および ER 結合データから成るトレーニング用集合の階層的統計解析を行うものである。トレーニング用データセットは不活性物質、弱い ER 結合剤、強い ER 結合剤を含んでおり、かつ各種の化学物質を代表しているが、主に農薬とホルモン類似物質であって、工業用化学品や規制の対象になる食品成分については代表的とは言えない。出力はモデルの適用範囲内の物質についての ER への結合親和力の予測相対値である。適用範囲が限られているが、予測の正確度は約 84%と報告されている(Klopman and Chakravarti, 2003)。Mombelli (2012)は、OECD (Q)SAR Application Toolbox の ER 結合親和力のプロファイリング (OECD CF のレベル 1) への応用を評価した論文で、OECD CF のレベル 2 の試験法 (たとえばエストロゲン活性の検出のための、安定的トランスフェクションによる転写活性化試験 (TA 試験)、TG 455, 457) に比べて ER プロファイラーの予測能力は低いが、それでもなお ER プロファイラー、更に一般的には結合親和力の(Q)SAR モデルは化学物質の分類あるいは実験的試験のための優先順位設定のためには有用であると述べている。また総合的な生殖毒性試験の戦略の第一歩としても重要な役割を果たすことができる。その他の論点については Benfenati et al. (2005)および Roncaglioni and Benfenati (2008)の総説を参照されたい。

最近の構成概念である有害転帰経路(Adverse Outcome Pathway, AOP)は、分子レベルの初期事象と規制上の決定に関わる最終的な有害事象とを結びつけるもので(Ankley et al., 2010; OECD, 2012e)、OECD はこれを *in vivo* 試験から得られた知見と、分子的スクリーニングおよびオミクス試験、コンピュータによる予測手法その他の情報源とを統合する方法として推進している。完成し合意が得られた AOP は OECD (Q)SAR Toolbox にも取り入れられるはずで、OECD 加盟国は内分泌関連のものも含めそのような AOP の開発を提案し着手することができる。

Toolbox には *in vitro* での ER 結合に基づくデンマーク EPA の Relative ERBA (Q)SAR も含まれている。このモデルから得られた結果はデンマーク EPA が規制のための化学品評価の支援のために開発した(Q)SAR データベースに基づいており、約 70 種のモデルで約 166,000 種の有機化合物の様々なエンドポイントを予測している。Virtual Toxlab も無料プラットフォーム OpenVirtual Toxlab を提供している(Vedani et al., 2012)。

4.2.2.6. 計算機モデルに基づくエキスパートシステム

エキスパートシステムは種々の *in silico* アプローチを組み合わせて、化学物質の構造から生物活性を予測する計算ツールである。この語を「専門家 (エキスパート) による判断」と混同してはならない。透明性が高くデータが豊富な一例として米国 EPA の ER エキスパート

ートシステムが挙げられる。2009年にEPAの殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法科学顧問委員会(Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act Scientific Advisory Panel, FIFRA SAP)は「食品用不活性成分および抗菌性農薬のエストロゲン受容体(ER)結合親和力を予測するための効果ベースのエキスパートシステム：内分泌攪乱物質のスクリーン具の優先順位付けへの応用」の使用についての外部評価を実施した(U.S. EPASAP, 2009a, 2009b)。このエキスパートシステムは化学物質のスクリーニングおよび試験の優先順位付けを支援するために設計されたものである。

OECDは、ニジマスのER(rtER)への結合に基づく決定ベースのSAR警告システムを検討し(OECD, 2009b)、ヒトおよびラットのER- α とよく一致するとしている。このrtERエキスパートシステムはOASISの開発したER結合警告システムと共にOECD(Q)SAR Toolboxに採用されている。

米国EPAは1万種以上の化学物質を対象とする内分泌攪乱物質スクリーニング計画(Endocrine Disruptor Screening Program, EDSP)を進めており、その作業計画ではin silicoアプローチを優先している(U.S. EPA-SAP, 2011)。この目的のためのin silico手法の検証のためOECDの検証原則(OECD, 2004)に基づくガイドラインが最近策定された(U.S. EPA, 2012a, 2012b)。FIFRA SAPは2013年初頭以降、計算毒物学ツールを用いてEDSPの対象物質の優先順位付けに関連する諸問題を検討しており、最終報告は2013年5月に公表が予定されている。

関連するツールとしては他にも、化学物質リスク評価における生理学に基づく薬物動態(PBPK)モデル(Andersen, 2003; Blaauboer, 2003; Bouvier d'Yvoire et al., 2007; Clewell and Clewell, 2008; Adler et al., 2011)、曝露量・応答モデリング法(Burman and Wiklund, 2011; Plan et al., 2012など)があるが、研究の現在の指向性は、PBPKモデリングに関しては、内分泌関連の生殖毒性・発達毒性のエンドポイントのための代替的計算ツールの開発には必ずしも適合していないようである(Punt et al., 2011)。両モデリング法とも、現在までのところ化学物質のリスク評価(内分泌活性物質のスクリーニングを含む)よりも医薬品研究や臨床的開発への応用が遥かに多いが、今後の開発、特にin vitroまたはin silicoの試験で得られたデータを生物学的に有意義なフレームワークに統合しin vivo条件へ外挿するためには、依然として極めて重要な計算手法である(Adler et al., 2011)。

4.2.2.7. 要約

内分泌系に干渉する可能性のある化学物質は極めて多様であり、標的となり得る分子も多いため、EASのために単一の(Q)SARの確立を目標とすることは非現実的である。しかし受容体(ER, AR, PXR, PPAR, GR, AhRなど)に媒介される相互作用に対してin silico手法を逐次的・段階的に適用する(信頼性の高い適切なエキスパートシステムまたは(Q)SAR

モデルを組み合わせて使用する) ことは、内分泌関連のモダリティに対する毒性を予測する上で WoE アプローチに役立つ可能性がある。スクリーニングおよび以後の試験の優先順位付けのためにも *in silico* 手法が有効である。

これら計算ツールを検討するに際しては、化学的データおよび生物学的エンドポイントのデータの質、データクリーニングに関する配慮、ディスクリプタや統計手法の適切な選択と利用に十分な注意を払う必要がある。(Q)SAR モデル、エキスパートシステム、分類ツールの利用や結果の解釈においては、信頼性や適用可能範囲がそれぞれ異なるため、専門的な知識が必要となる。また構造の類似した分子が異なる生物活性を持つことがあるなど、様々な制約要因を常に念頭に置かなければならない。

全般的に見て、AR や ER への結合と活性化のような分子レベルの初期事象については、これらのツールの信頼性は比較的高いが、*in vivo* 組織、標的器官、あるいは全身レベルの内分泌毒性(生殖毒性、発達毒性など)に対しては、*in vitro* あるいは *in vivo* 試験に比べて信頼性が劣り、適用範囲も限られている。今後の作業に関して言えば、PBPK および曝露量・応答モデリングなどのツールをも併用して物質の内分泌活性のスクリーニングと評価を行うことが望ましい。

4.3. 利用可能な試験方法の内分泌モダリティおよび分類群ごとの概観

この項では、EAS/ED の同定と特徴づけに利用できる OECD CF の試験方法を概観する。攪乱を受けやすいことが知られている(または考えられる)内分泌モダリティごとに情報を提示する。哺乳類・水生生物・鳥類に適用できる試験法の詳細については、それぞれ 4.4, 4.5, 4.6 項に記述する。内分泌モダリティおよび分類群によっては、国際的に標準化(検証)された試験法に機構的または最終的な試験がまだ開発されていない。これはたとえば、優先順位付けでヒトまたは環境への関連性が薄いと判断されたため、あるいは OECD 加盟各国内での、そのような開発のためのリソースや需要の状況などによるものであろう。これを考えて、今後の開発が必要と認められる分野についても以下に記述する。

表 1 にはいくつかの内分泌モダリティ(または軸、経路)が示されている。これらは完全なリストではなく(DRP 178, OECD, 2012b)、またそれらがすべて内分泌攪乱物質の影響を実際に受けるかどうかはまだ確実ではない。表にはまた *in vivo* 試験が実施されている(または提案されている)主な分類群、および *in vitro* 試験も含まれ、それら分類群および内分泌モダリティ(軸、経路)の各々について、機構的(M)または最終的(A)な試験が利用できるか否かが表示されている。

異なる分類群への試験方法の適用可能性については、哺乳類に比べて他の分類群に関する

知見は乏しいが、内分泌系には脊椎動物の進化の過程を通じてよく保存されているものが多いことには注目してよい。実際、エストロゲン受容体などでは種間に良い対応が見られる。しかしすべての受容体について対応があるわけではなく、またホルモン調節による下流効果は種によって大きく異なる。これを考慮して表 1 には種々の分類群（哺乳類を含む）の内分泌について得られている知識のレベルをも示した。

4.3.1. 攪乱に敏感な内分泌モダリティとそれらに対する試験方法

内分泌攪乱に関する知識の大部分は、脊椎動物のエストロゲン、アンドロゲンおよび甲状腺ホルモンと相互作用する、またはステロイド産生に影響する（すなわちいわゆる EATS モダリティに干渉する）物質について得られたものである。そのような物質は、リガンド結合部位との相互作用（内因性アゴニスト（知られていれば）を模倣することによる）、ホルモン作用のブロック（拮抗作用）、内因性リガンド（ホルモン）合成・輸送・代謝への干渉などの作用を持つ可能性もある。これらの作用のうちでも、エストロゲンとその模倣物質による、いわゆる「雌性化」作用が最も多く研究され、魚類から哺乳類までのすべての綱で観察されている。ヒトの健康への内分泌攪乱物質の影響も報告されている（ジエチルスチルベストロール、グリチルリチン酸など）。また昆虫や甲殻類のエクジステロイドや幼若ホルモンの模倣あるいは拮抗物質もかなりよく知られており、特定の種を標的とする様々な殺虫剤は、節足動物に対してこの種の作用を持つように設計されたものである。更に、有機錫化合物が軟体動物の雌を雄性化する場合があることも知られている。これはレチノイド信号経路への干渉によるものと考えられるが、ステロイド産生との干渉（アロマターゼ阻害）の可能性もある。最後に、脊椎動物の性ステロイドが軟体動物に有害作用を及ぼす可能性があるが、その作用機序は十分解明されていない。

哺乳類による *in vitro* EA(T)S 試験

現在利用できる、または間もなく利用可能になる見込みの、国際的に標準化された *in vitro* 試験で可能なのは、エストロゲン、アンドロゲンまたはステロイド産生活性の検出のみである（表 1 参照）。またこれらの試験では代謝を扱うことができないことにも注意が必要である。すなわち母分子の生物学的賦活または失活を制御する全身レベルの代謝経路は、現行の *in vitro* 試験法では評価できないのである。ただし OECD は *in vitro* 試験に代謝評価部分を追加することを推奨している (Jacobs et al., 2008; OECD, 2008)。

甲状腺ホルモン軸に影響する物質に関しては、甲状腺関連の最終エンドポイントおよび甲状腺関連の *in vivo* バイオマーカーの情報が得られる試験法は存在するが、標準化された *in vitro* の機構的スクリーンはまだ欠けたままである。試験法としては既に十分開発されたものが存在するので（たとえば TR 結合試験、ヨウ素吸収、甲状腺ペルオキシダーゼ阻害、後方線ホルモン (TH) 輸送タンパク質置換）、OECD はこれを今後の開発課題としている (DRP

57, OECD, 2006 を参照)。

他の脊椎動物による in vitro EA(T)S 試験

この種の試験は、将来テストガイドラインが追加されればその対象となる可能性があるが、現行の OECD 業務計画(OECD, 2012d)には含まれていないので、直ちには実現しないであろう。ただし「環境中の内分泌攪乱物質のスクリーニングに関する DRP：魚類におけるエストロゲンおよびアンドロゲン受容体結合とトランス活性化試験の利用」(DRP 135, OECD, 2010 を参照)が存在する。

脊椎動物による in vivo EATS 試験

標準化された in vivo 試験については、大部分の EATS モダリティおよびその最終的効果は、哺乳類、魚類、および（範囲はより狭いが）両生類による機構的または最終的試験によって検出することができる。爬虫類についてはこれらモダリティに関する標準化された試験法は存在せず、また鳥類については最終的試験法のみ存在する。

このように現段階ではなお EATS モダリティに対して感度を有する、魚類・鳥類・両生類による機構的および最終的試験法の検証を進める必要がある。ただし魚類を用いる原稿の試験法でも、エストロゲン、アンドロゲン、ステロイド産生についてはかなり有効な危険性評価が可能である。

無脊椎動物による in vivo 試験

無脊椎動物に関しては標準化された機構試験はないが、開発中の軟体動物による最終的生殖試験は脊椎動物の EATS モダリティの一部であるステロイド類に対してもある程度の感度を持ち、昆虫（恐らくは甲殻類も）による同様の試験はエクジステロイドおよび幼若ホルモン模倣物質に敏感である。しかしこれらの試験は、特定の有害作用に関連する内分泌作用の具体的な判定に用いることはできない。

水生生物および鳥類による検証済みまたは未検証 in vitro および in vivo EA(T)S 試験の概要

標準化された試験法を全体として見た場合、エストロゲン・アンドロゲン・ステロイド産生モダリティにより作用する物質の機構的および最終的効果を評価できる、比較的完備した試験の組み合わせが存在するのは、魚類に対してのみである。換言すれば、現時点で EAS の生態毒性試験で或る程度包括的に評価できるのは魚類に対する危険性のみであり、したがって対象物質もそれに応じて限定される（魚類についても、機構的エンドポイントを含むライフサイクル試験として国際的に検証されたものはない）。甲状腺への影響に関する検証済みの機構的スクリーン（最終的エンドポイントは限られている）としてはカエルに関

するものが唯一であり、両生類に対する長期的な最終的危険を測定することは不可能である。

水生生物による EAS 試験法の開発は現在までのところほぼ脊椎動物の EATS モダリティに関するものに限定されているが、野生の水生脊椎動物の EATS モダリティを介して作用する EAS については、魚類と両生類に対する試験の組み合わせにより、*in vivo* の機構的試験および最終的試験のための検証済みの方法が 3 年以内に規制目的に利用できるようになる見込みである。鳥類による多世代試験も同じ期間内に国際的標準化がなされる予定である。両生類のライフサイクル試験については現時点では開発の見通しはほとんどない。

4.3.2. 現在攪乱への感受性が知られておらず標準化された試験方法が利用できない非 EATS 内分泌モダリティ

その他の内分泌モダリティについては、「内分泌攪乱物質の評価のための新規な *in vitro* および *in vivo* スクリーニングおよび試験法ならびにエンドポイントの研究状況」に関する DRP (DRP 178, OECD, 2012b) に記述されている。OECD DRP 178 に記されているように、脊椎動物の他の内分泌モダリティ (視床下部-下垂体-副腎皮質(HPA)軸、成長ホルモン軸、レチノイド経路、ビタミン D 経路、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR)信号経路、膵臓信号伝達、腎臓信号伝達など) も内分泌攪乱を受けることがある (表 1 参照)。標準化された脊椎動物の最終的試験法には、これらの経路の下流効果を検出できる可能性のあるものもある。たとえば膵臓の内分泌機能障害の証拠が脊椎動物の最終的試験で見出されることがある (ランゲルハンス島などの委縮が OECD TG 408 における組織病理学検査で見出される、血糖値の変化が臨床化学検査で認められるなど)。しかしこれらの作用機序を (上記の分類群において) 同定できる標準化された機構試験法はまだ存在していない。ただし DRP にも述べられているように、これらのモダリティに敏感なエンドポイントを既存の脊椎動物の *in vivo* 最終的試験に追加することは可能であり、また *in vitro* スクリーニングを開発ないし標準化することも考えられる。

知識の欠けているいま一つの分野は、無脊椎動物の多数のペプチドホルモン経路との干渉である。ここでも、そのような干渉の下流効果が昆虫または甲殻類の最終的生殖またはライフサイクル試験で見出されることがあり得るが、これらのモダリティに関する標準化された機構的試験法は存在しない。更に無脊椎動物の他の門 (棘皮動物、紐形動物など) の多くは標準化された試験の対象になっていない。ただし OECD は環形動物、ダニ類、トビムシ類の最終的生殖試験法を公表している。

エピゲノムと内分泌攪乱 : エピジェネティック調節は臨界期の発達過程の基礎であり、成体の表現型の決定に関与している。発達中の臨界期における環境的刺激への曝露による表

現型の変化は、影響を受けた組織のエピジェネティック・プログラムの変化によって媒介される。DRP 178 (OECD, 2012b)の付録で、臨界期における内分泌系の信号伝達における化学的に誘導されたエピジェネティック調節の役割の評価と、スクリーニング・試験プログラムにおいてそのような攪乱を評価するために考えられる方法の検討が行われ、OECDテストガイドラインの開発は時期尚早としても、この分野の研究の急速な進歩には注目が必要と結論されている。

哺乳類（ヒト健康）関係の（未）検証 *in vitro* および *in vivo* 非 EATS 試験

検証済みの哺乳類の最終的試験には、EATS 以外の内分泌モダリティに感度を持つものもあり得る（たとえば異なる軸や信号伝達経路を含むことによって）。そのような内分泌モダリティに対する検証済みの *in vitro* または *in vivo* 試験はまだ開発されていないが、進行中のものはある(OECD, 2012b)。短期的には、上記モダリティに敏感な最終エンドポイントを既存ガイドラインによる哺乳類毒性試験に追加することが示唆されている(OECD, 2012b)。

環境関係の（未）検証 *in vitro* および *in vivo* 非 EATS 試験

魚類を用いる検証済み最終的試験には、他の内分泌モダリティに対して感度を持つものもあり得るが、まだ実証されてはおらず、また機構的データを与えるものでもない。節足動物による検証済み最終的試験もエクジステロイドと幼若ホルモンの攪乱に敏感であると考えられるが、同じく機構的情報は得られない。しかし(4.5.1 項に述べる)いくつかの試験法は今後3年以内に国際的検証が完了し、非 EATS 機構的試験法の欠如を埋めるものと期待される。既に検証済みの試験法と同じく、検証中のものも EATS モダリティの少なくとも1つに焦点を当てたものであるが、脊椎動物と節足動物のどちらを用いるかによって、それ以外の既知のモダリティの何らかの最終的効果が検知される可能性はある。

水生生物の非 EATS モダリティ

これらの非 EATS モダリティの多くは詳細に記述されており(OECD, 2012b)、そのいくつかについては未検証ながら機構的試験方法が存在するが、その大部分は *in vivo* でなく *in vitro* 試験である。すなわち水生生物のテストガイドラインにおける主な知識の欠落は、脊椎動物の非 EATS モダリティの *in vivo* での機構的試験に関わるものである。水生脊椎動物について、コルチコステロイド軸、成長ホルモン軸、ビタミン D 信号伝達、レチノイド信号伝達、PPAR 経路などの非 EATS モダリティに対応する *in vitro* または *in vivo* の機構的試験法を開発することには潜在的な需要がある。しかしそれを実現するには、化学物質への野生動物の曝露によって、これらモダリティが損傷を受けるとすればどのモダリティであるかを決定するための研究が必要である。いずれかのモダリティが現実に攪乱されることが結論されれば、既存の *in vivo* 試験法のあるものについて応答性を検討し場合によっては改善する必要が生ずるかも知れない。

水生無脊椎動物の非 EATS モダリティ

水生生物のテストガイドラインの今ひとつの欠落は、無脊椎動物のすべてのモダリティに対する *in vivo* の機構的試験である。この種の試験の開発が遅れている理由の一つは、無脊椎動物の多くの門について内分泌系が十分解明されていないことである。これらを用いる *in vitro* または *in vivo* の機構的試験の開発のためには、無脊椎動物のいくつかの門（軟体動物など）の内分泌系に関する基礎的知識の向上が前提となる。節足動物のエクジステロイドおよび幼若ホルモン攪乱物質に関しては、現在の知識でも機構的試験法の開発は可能であると思われる。

4.3.3. 利用可能な試験方法の組み合わせに対するその他の一般的制限

臨界期 – 全ライフサイクル

哺乳類に関しては、ED の同定（今後開発すべき領域を含め）に利用できる現行の試験法の限界は、受胎から老齢に至る全ライフサイクルに亘る、あるいは発達期の曝露と老齢に至るまでのフォローアップを包含する単一の試験が欠けていることである。

動物モデルの限界

現行の試験方法の重要な弱点として、ED の関与が疑われるヒトの内分泌障害（乳腺腫瘍などのホルモン性の癌、子宮内膜症、代謝症候群、生殖老化など）に関して或る種の動物モデルが持つ限界が指摘されている (Kortenkamp et al., 2011)。

ただし、この限界は DRP 178 (OECD, 2012b) で論じられており、そこでの考察は OECD レベルで構想されたものである。

内分泌に敏感なエンドポイントの中には、既存の国際的に標準化された試験法では捉えられないものもあり得るけれども、必ずしもそのために ED が検知できないわけではない。内分泌系は多数の信号伝達経路を持ちクロストークのある複雑なものであるから、ED は多面的な応答によって様々な効果を生じ、そのうちのあるものが適当な試験法で検出される可能性は小さくない。

表 1: 内分泌モダリティ/軸/経路に関する知識の程度と、EAS の同定または特徴づけに利用できる国際的に標準化された機構的(M)および最終的(A)試験法。A? = 未検証だが最終的感度を持つ可能性がある、n/a = 該当せず、HPA = 視床下部-下垂体-副腎皮質軸、PPAR = ペルオキシゾーム増殖応答性受容体の信号伝達経路。表右側の内分泌系の HPA 軸以下については、現実的な曝露量による攪乱に対する感度は十分知られていないことに注意。主として OECD (OECD, 2012a, 2012b, 2012f) による。

	動物分類群の内分泌系の知識	内分泌モダリティ/軸/経路と ED の同定または特徴づけに利用できる国際的に標準化された試験法												
		エストロゲン	アンドロゲン	甲状腺	ステロイド産生	エケジステロイド	幼若ホルモン	HPA 軸	成長ホルモン軸	レチノイド経路	ビタミンD経路	PPAR 経路	臓器信号伝達系な	その他 (無脊椎動物の神経ペプチド、脊椎動物の膀胱および腎臓)
1) 個体群 in vitro	n/a	M	M	M?	M									
2) 脊椎動物 in vivo														
哺乳類	良好～極めて良	M/A	M/A	M/A	M/A			A?	A?	A?	A?	A?	A?	A?
鳥類	中程度～良好	A	A	A?	A?					A?				A?
爬虫類	不足～中程度													A?
両生類	中程度～良好	A?	A?	M/A	A?			A?		A?		A?		A?
魚類	中程度～良好	M/A	M/A	A?	M/A			A?	A?	A?		A?		A?
3) 無脊椎動物 in vivo														
昆虫類	不足～中程度					A	A							A?
甲殻類	不足～中程度					A	A							A?
軟体動物	不足	A	A		A					A				A?
棘皮動物	不足													
その他の門	無～不足													

4.4. 哺乳類に対して利用可能な国際的に標準化された試験方法

OECD の改訂版 CF リストには、レベル 2 に *in vitro* の（哺乳類および非哺乳類の）機構的スクリーニング 5 種、レベル 3 に *in vivo* スクリーニング 2 種、レベル 4 に *in vivo* 試験 11 種、レベル 5 に *in vivo* 試験 2 種が含まれている。CF の全リストは付録 C に示されている。

レベル 2 の機構的 *in vitro* スクリーニングには、エストロゲン受容体(ER)、アンドロゲン受容体(AR)、ステロイド産生(S)干渉に媒介されるモダリティに対する（OECD または米国 EPA による）検証済みの試験法が含まれる。これらは ER US EPA OPPTS 890.1250 (U.S. EPA, 2011a) および AR US EPA OPPTS 890.1150 (U.S. EPA, 2011b) 結合試験、ER トランス活性化試験(OECD TG 455)、ステロイド産生試験(OECD TG 456)、アロマターゼ US EPA OPPTS 890.1200 試験(U.S. EPA, 2011c)である。レベル 2 にはまた ER 作動物質および拮抗物質試験(OECD TG 457)および甲状腺ホルモン媒介モダリティ (TR 結合試験、ヨウ素吸収、甲状腺ペルオキシダーゼ阻害、TH 輸送タンパク質解離) の試験が含まれるが、これらに対しては検証済みの方法はまだ利用できない。AR トランス活性化試験も未検証であるが、現在検証が進行中である。

レベル 3 の *in vivo* スクリーニング試験には検証済みの方法 2 種が含まれ、一方はエストロゲン作動物質/拮抗物質に敏感であり（齧歯類の子宮肥大試験、OECD TG 440）、他方はアンドロゲン作動物質/拮抗物質に敏感である（齧歯類の Hershberger 試験、OECD TG 441）。

レベル 4 の *in vivo* 試験は本質的にはガイドラインによる哺乳類の毒性試験であって、内分泌攪乱に敏感な最終エンドポイントを含むものである。中にはその他の内分泌系バイオマーカー（甲状腺ホルモン、性ステロイドホルモンのレベルなど）を含むものもある。レベル 4 の試験は次のとおりである。強化 28 日試験(OECD TG 407)、90 日試験(OECD TG 408)、単世代生殖毒性試験(OECD TG 415)、雄成熟期試験(US EPA OPPTS 890.1500, (U.S. EPA, 2011d))、雌成熟期試験(US EPA OPPTS 890.1450 (U.S. EPA, 2011e))、無傷雄成体内分泌スクリーニング試験（ガイドラインなし）、出生前発達毒性試験(OECD TG 414)、慢性毒性および発癌性試験(OECD TG 451-3)、強化生殖スクリーニング試験(OECD TG 421)、強化 28 日/生殖複合スクリーニング試験(OECD TG 422)、発達神経毒性試験(OECD TG 426)。これらの試験は主として EATS モダリティの少なくとも 1 つに反応するが、その他のモダリティ（コルチコステロイド軸、成長ホルモン軸、ビタミン D 信号伝達、レチノイド信号伝達、膵臓系、PPAR 経路(DRP 178 (OECD, 2012b)参照)、その他の内分泌腺または組織)にも感度を持つことがある。たとえば反復曝露毒性試験(OECD TG 407, 408, 451-3)において、副腎の組織病理検査から、コルチコステロイド軸を含む内分泌系に関連するエンドポイントについてのデータが得られ、あるいは生殖毒性試験(OECD TG 414, 415, 421, 422, 426)において、成長の評価から成長ホルモン軸およびレチノイド信号伝達経路に関係する最終エンドポイントの情報が得られる可能性がある。

レベル5の *in vivo* 試験には検証済みの生殖毒性試験2種、延長単世代試験(OECD TG 443)、二世世代試験(OECD TG 416)が含まれる。これらは内分泌系に関連する最終エンドポイント（主に EATS モダリティに媒介されるが、その他コルチコステロイド軸、成長ホルモン軸、ビタミン D 信号伝達、レチノイド信号伝達、PPAR 経路、その他の内分泌腺または組織などに関連するモダリティも含む）に関するより包括的なデータを、より長期間にわたって提供するものであるが、一般に老齢期は対象外である。

表2に OECD 改訂版 CF のレベル3~5の哺乳類による *in vivo* 毒性スクリーニングおよび試験法と、各種内分泌モダリティに対するそれらの応答性（既知または可能性のあるもの）を示す。

表 2 : OECD CF の哺乳類による in vivo 毒性スクリーニングおよび試験法と、各種内分泌モダリティ/軸/経路（一部抜粋）に対するそれらの応答性（既知または可能性のあるもの）。各試験法に対して CF でのレベルを示す。レベル 3 は内分泌活性の同定に適し、レベル 4, 5 は危険性の同定と特徴づけに適する。M : 機構的情報が得られるスクリーニング、A : 最終的な情報が得られるスクリーニング、P : 応答性と考えられるが十分な評価に至っていない最終エンドポイント。

内分泌モダリティ/軸/経路	試験法														
	子宮肥大試験 (OECD 440) (レベル 3)	Hershberger 試験 (OECD 441) (レベル 3)	強化 28 日試験 (OECD 407) (レベル 4)	90 日試験 (OECD 408) (レベル 4)	単世代試験 (OECD 415) (レベル 4)	雄成熟期試験 (US EPA OPPTS 890.1500) (レベル 4)	雌成熟期試験 (US EPA OPPTS 890.1450) (レベル 4)	無傷雄成体試験 (TGなし) (レベル 4)	出生前発達毒性試験 (OECD 414) (レベル 4)	慢性毒性・発癌性試験 (OECD 451-3) (レベル 4)	強化生殖スクリーニング試験 (OECD 421) (レベル 4)	強化 28 日/生殖スクリーニング複合試験 (OECD 422) (レベル 4)	発達神経毒性試験 (OECD 426) (レベル 4)	延長単世代試験 (OECD 443) (レベル 5)	二世代試験 (OECD 416) (レベル 5)
エストロゲン	M		A	A	A		A		A	A	A	A	A	A	A
抗エストロゲン	M		A	A	A		A		A	A	A	A	A	A	A
アンドロゲン	M	M	A	A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A
抗アンドロゲン		M	A	A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A
甲状腺		M		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
抗甲状腺		M		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
ステロイド産生			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
HPA/コルチコステロイド軸			P	P	P				P	P	P	P	P	P	P
成長ホルモン軸			P	P	P				P	P	P	P	P	P	P
ビタミン D 信号伝達			P	P	P				P	P	P	P	P	P	P
レチノイド信号伝達			P	P	P				P	P	P	P	P	P	P
PPAR 経路			P	P	P				P	P	P	P	P	P	P
OECD, 2012b に含まれない その他の可能性ある内分泌 モダリティ			P	P	P				P	P	P	P	P	P	P

4.5. 水生生物に対して利用可能な国際的に標準化された試験方法

CFにはレベル3の水生生物に対する生態毒性試験5種、レベル4の水生生物試験12種、レベル5の水生生物試験7種が掲載されている。この中には開発の初期段階にあるものも含まれている。EDに対して感度を持つ水生生物のin vivo試験を表3に示す。9種は国内または国際的に検証されている。検証済み試験法には、本質的に機構的なスクリーニング(OECD TG 230; OECD GD 140 (OECD, 2009c))、機構的および最終的エンドポイントを共に含むもの(OECD TG 229; OECD TG 231; OECD TG 234)、現状では最終エンドポイントのみを含むもの(US EPA OPPTS 850.1500 (U.S. EPA, 2004), OECD TG 218/219; OECD TG 211; OECD TG 233)がある。機構的情報を与える試験法はすべて脊椎動物(魚類または両生類)を用いるものであり、(抗)エストロゲン、(抗)アンドロゲン、(抗)甲状腺、ステロイド産生のいずれか(EATS)モダリティに対して応答する。これに対して、US EPA OPPTS 800.1500の魚類ライフサイクル毒性試験(U. S. EPA, 2000)においては、考えられる他のモダリティ(コルチコステロイド軸、成長ホルモン軸、ビタミンD信号伝達、レチノイド信号伝達、PPAR経路(DRP 178, OECD, 2012bを参照)など)は成長、生殖、発達などのエンドポイントに影響すると考えられる。しかしこの試験は現状では機構移管する情報を与えず、またこれらのモダリティを考慮した検証はなされていない。またこれらのモダリティの効果が現実的な曝露レベルで現れるかどうかは未知であるから、この領域での試験を開発するのは時期尚早であろう。最後に、ミジンコの生殖およびユスリカのライフサイクル試験が節足動物に特異的に作用するEDに対して感度を持つ可能性があるが、これらも機構的情報を与えるものではない。

多くの水生生物試験の結果の解釈に関する詳細な指針がOECD Fish Toxicity Framework (OECD, 2012g)に示されている(付録Cの簡単な解説をも参照)。

或る種のEDに敏感と思われるが表3で番号を与えられていない水生動物の生態毒性試験9種は現在OECDで開発または検証が進められているものである。その一つであるアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)胚甲状腺信号伝達試験は、アフリカツメガエルのトランスジェニック幼生を用いて、甲状腺に作用する物質に関する機構的スクリーニングを行うもので、診断結果が3日間で得られる(OECD TG 231より遥かに速い)。いま一つの検証中の両生類試験である幼生両生類成長発達試験は、アフリカツメガエルを幼生から性的成熟期に至るまで曝露するもので、EATSモダリティに関する機構的および最終的な情報を与えることが期待されるが、エンドポイントとして生殖を含んでいないため、全ライフサイクル試験と見なすことはできない。

検証中の試験法にはより高度な2種類の魚類試験もある。第1の魚類生殖・部分ライフサイクル試験は、基本的にはOECD TG 229にTG 234を続けたもので、魚(ファットヘッドミノー(*Pimephales promelas*))、ゼブラダニオ(*Danio rerio*)などが可能である)を、P0世代の生殖からP1世代の性分化までにわたって曝露する。第2のメダカ多世代試験

(MMGT)はミナミメダカ(*Oryzias latipes*)を P0 世代の生殖から P2 世代の性的成熟まで曝露する。両試験とも機構的および最終エンドポイントを含んでいる。検証プログラムの一つの焦点はMMGTが単世代試験に比べて或る種の ED に対する感度が高いかどうかを確認することである。結果が否定的であれば、CF のレベル 5 に要求される高度の情報を得るためには US EPA OPPTS 850.1500 魚類ライフサイクル毒性試験(U.S. EPA, 2004)に機構的エンドポイントを追加したバージョンで十分であろう。

OECD で検証が進められている無脊椎動物による最終的試験として、腹足類 (コモチカワツボ(*Potamopyrgus antipodarum*)およびヨーロッパモノアラガイ(*Lymnaea stagnalis*)) による部分および全ライフサイクル試験、*Amphiascus tenuiremis* を用いるカイアシ類生殖・発達試験、*Americamysis bahia* を用いるアミニ世代試験、オオミジンコ(*Daphnia magna*)多世代試験がある。軟体動物は脊椎動物のいくつかの EATS モダリティおよびレチノイド信号伝達の攪乱 (有機錫化合物など) に対する感度を持つと考えられ、節足動物は得 k にエクジステロイドおよび幼若ホルモン攪乱物質に敏感であると期待される。

表 3 ; OECD CF 所載の水生物による in vivo 生態毒性スクリーニングおよび試験法と、各種内分泌モダリティ/軸/経路（一部抜粋）に対するそれらの応答性（既知または可能性のあるもの）。各試験法に対して CF でのレベルを示す。レベル 3 は内分泌活性の同定に適し、レベル 4, 5 は危険性の同定と特徴づけに適する。M : 機構的情報が得られるスクリーニング、A : 最終的情報が得られるスクリーニングまたは試験、P : 応答性と考えられるが十分な評価に至っていない最終エンドポイント。

内分泌モダリティ/軸/経路	脊椎動物による試験										無脊椎動物による試験									
	魚類短期生殖試験 (TG 229) (レベル 3)	魚類 21 日試験 (TG 230) (レベル 3)	雄性化雌トゲウオ・スクリーニング (GD 140) (レベル 3)	両生類変態試験 (TG 231) (レベル 3)	ツメガエル胚甲状腺信号伝達試験 (レベル 3 予定)	魚類的発達試験 (TG 234) (レベル 4)	両生類幼生成長・発達試験 (レベル 4)	魚類生殖・部分フラインク試験 (レベル 4)	魚類生殖・部分フラインク試験 (レベル 4)	魚類生殖・部分フラインク試験 (レベル 4)	メダカ多世代試験 (レベル 5)	魚類フラインク毒性試験 (US EPA OPPTS 850.1500) (レベル 5)	軟体動物部分フラインク毒性試験 (レベル 4)	ユスリカ毒性試験 (TG 218/219) (レベル 4)	ミジンコ生殖試験 (TG 211) (レベル 4)	アミニ世代毒性試験 (レベル 5)	カイアシ類生殖・発達試験 (レベル 5)	ユスリカ・フラインク毒性試験 (TG 233) (レベル 5)	軟体動物フラインク毒性試験 (レベル 5)	ミジンコ多世代試験 (レベル 5)
エストロゲン	M/A	M				M/A	M/A	M/A	A	M/A	P								P	
抗エストロゲン	M/A	M				M/A	M/A	M/A	A	M/A	P								P	
アンドロゲン	M/A	M	M			M/A	M/A	M/A	A	M/A	P								P	
抗アンドロゲン	M/A	M	M			M/A	M/A	M/A	A	M/A	P								P	
甲状腺				M/A	M		M/A	P	P	P										
抗甲状腺				M/A	M		M/A	P	P	P										
ステロイド産生	M/A	M				M/A	M/A	M/A	A	M/A	P									P
HPA/コルチコステロイド軸							P	P	P	P										
成長ホルモン軸							P	P	P	P										
ビタミン D 信号伝達							P	P	P	P										
レチノイド信号伝達							P	P	P	P	P									P
PPAR 経路							P	P	P	P										
エピジェネティック効果										P					P					P
エクジステロイド系												A	P	A	A	A	A			A
幼若ホルモン系												A	P	A	A	A	A			A

4.6. 鳥類に対して利用可能な国際的に標準化された試験方法

50 年以上前に或る種の農薬の内分泌攪乱効果が懸念されるきっかけとなったのは肉食性鳥類への影響、特に卵殻の薄化であったが、現在でも特に内分泌攪乱物質の鳥類への危険性を評価する方法として国際的な標準化や合意を経て最終的に決定されたものは存在しない。テストガイドライン作成作業が現在進行中である(OECD, 2005b)。

ウズラ(*Cortunix japonica*)を用いる鳥類二世世代試験は 4 週齢の P0 の成鳥の繁殖から 2 週齢の雛までの 21 週にわたり、したがって 1 世代全体を含んでいるので、EATS 活性を持つ物質の大部分に反応するものと期待される。この試験は OECD の 2012 年度事業計画に取り入れられており、またこの試験の EATS に影響されるエンドポイントのいくつかは最終的試験(TG 206)にも採用されている。

OECD TG 206 は第一義的には、生殖毒性の疑われる化学物質に対する最終的試験として考案されたものであるが、試験期間は産卵前の成鳥から 14 日齢の仔までであるからライフサイクル試験ではない。また曝露は成鳥に対してのみ(餌を通じて)行われ、性的発達への影響を検出することはできない。エンドポイントはすべて発達、成長または生殖の最終的尺度である。ED の影響を受ける可能性のある主なエンドポイントは産卵数、生存率、孵化率などである。

鳥類の試験の詳細は、鳥類二世世代毒性試験の DRP にも掲載されている(OECD, 2007b)。

上記諸試験の結果の解釈について、詳細な指針が GD150 (OECD, 2012a)にあり、付録 C には解釈結果の表が掲載されている。簡単に言えば、上記 2 種の試験の結果と他の *in vivo* および *in vitro* の情報とを組み合わせれば、ある化合物が内分泌活性を示す可能性があるか否かを評価するツールとなる。

4.7. 利用可能な国際的に標準化された試験方法の妥当性に関する考察

4.7.1. 内分泌活性および攪乱に固有の事項

対象モダリティおよび種の範囲の広さという点での試験法の妥当性については 4.3 項で論じた。結論として、ED に対して感度を持つ *in vitro* および *in vivo* 機構試験および *in vivo* 最終的試験の開発と標準化は、OECD の過去 10 年間にわたる作業により著しく進展した。しかし標準化された試験法(内分泌活性および内分泌系に対する危険性の同定または特徴づけのための)の十分な組み合わせが利用できる(または間もなく利用可能となる)のは哺乳類と魚類の EATS モダリティに対してのみであり、鳥類や両生類に利用できる試験法は少ない。非 EATS 経路ないしモダリティの攪乱の下流効果は、標準化された脊椎動物の最終的試験法のいずれかで検出できる場合もあるが、哺乳類・魚類その他の脊椎動物に関連する非 EATS モダリティに関しては、標準化された機構的試験法は(まだ)利用できないことに注意が必要である。OECD の試験法には無脊椎動物に関する機構的試験が欠けて

いるのが目立つが、これは主として無脊椎動物の内分泌系が十分解明されていないためである。最後に、爬虫類や棘皮動物など、主要な分類群で OECD の内分泌試験法開発で考慮されていないものがある。これらに対して他の分類群の試験結果からのリードアクロスが可能であるか否かは現時点では不明である。

4.7.2. 内分泌活性および攪乱に固有でない事項

妥当性に関して考慮すべき今ひとつの事項は、物質の効果（内分泌活性または攪乱に限らず）の試験に際しての一般的事項である。これについて以下に検討する。

4.7.2.1. 感受性の臨界期

ここでは、利用できる試験法が EAS への感受性の臨界期の曝露を適切にカバーしているか否かを検討する。この臨界期の問題は EAS に限らずすべての発達毒性物質に関係する。

器官や組織が正常に発達するための種々の要因の中でもホルモンは特に重要であり、発達途上の重要な点での攪乱は器官あるいは組織に不可逆的な変化を生ずる可能性がある。

哺乳類では、発達の臨界期が受胎時、妊娠中、乳児期、幼児期、思春期に見出されている。哺乳類（ヒトを含む）における内分泌系に媒介される影響および曝露時期の包括的な展望が SAAED の付録 I (Kortenkamp et al., 2011) および WHO が最近発表した、内分泌攪乱物質が小児の健康に及ぼす可能性のある発達初期の影響に関する報告書(WHO, 2012)に掲載されている。

魚類その他の脊椎動物においても、発達の重要な時期での曝露によって全寿命にわたる障害または疾病が生ずることがある。

野生動物では感受性の臨界期における曝露の例が多くあり、不可逆的な影響が生じている場合もある。たとえば魚類が或る種のアンドロゲン、エストロゲンまたはステロイド産生攪乱物質に早期に曝露されると性が恒久的に変化する。具体例として、ゼブラダニオの胚や稚魚がエストロゲン（ 17α -エチニルエストラジオールなど）に曝露されると、性分化開始後の表現型に雌が多くなることもある(Andersen et al., 2003)。あるいはトゲウオの雄が幼若期にエストロゲンに曝露されると、表現型としての性は不変であるが、成魚に至るまで清浄な水で飼育しても性行動に異常が見られ、営巣数・抱卵数が正常な雄よりも低下する(Maunders et al., 2007)。

感受性の臨界期における曝露の作用強度に関して *in vivo* 試験が必要なことは広く認められている。この試験は、有害性を判定できるような敏感な生活段階において、十分に敏感で毒性学的に有意義なエンドポイントを包含するものでなければならない。重要な影響を見逃さないためには、既知の臨界期を対象とし、すべての生活段階にわたってエンドポイントを評価するように試験を計画する必要がある。内分泌攪乱物質の試験・評価のための

OECD CF の中では、レベル 4 およびレベル 5 の試験の中に子宮内およびその後の生活段階の発達の臨界期をカバーしているものがある。一方、魚類のライフサイクル試験や多世代試験は重要な曝露時期をすべてカバーしており、短期間の曝露についても、長期的影響をライフサイクル全体にわたって知ることができると期待される。

しかし胚または思春期の発達期間に生じ、その後の段階で発現するエンドポイント、たとえば或る種の癌（乳癌、前立腺癌、精巣癌、卵巣癌、子宮内膜癌）や生殖老化への影響が現在の哺乳類試験ではカバーされていないという結論が最近の総説に見られる(EFSA, 2010; Kortenkamp et al., 2011; EEA, 2012; OECD, 2012b)。4.3.3 項をも参照されたい。

4.7.2.2. 複数物質への複合曝露

共通の標的に作用する複数の物質への複合曝露の毒性評価において、毒性作用の予測に曝露量加算の概念が用いられることがある。これは曝露されたすべての物質が、各々の作用強度および濃度に応じて共通の効果に寄与すると仮定する考え方である。

SC は、2 種以上の EAS への曝露（混合物への曝露、または複数の物質にほぼ同時に曝露など）において毒性作用が複合して現れる可能性があることを認識している。個々には観察できるほどの作用を示さない曝露量であっても、複合的曝露により加算的效果が現れることがあり、「正確なリスク評価が困難または不可能」になる(WHO/UNEP, 2013)。受容体レベルでの相互作用に関する情報を *in vitro* 試験で得ることは可能と考えられるが、物質の毒性動態は様々であるため、無傷生体が同一カテゴリーに属する（類似の機構で作用機序に関与する）複数の物質に曝露された場合の複合効果は、*in vitro* 試験のみからでは十分な予測はできない。

現在開発されている試験は単一物質を対象とするものである。複数物質への複合曝露を取り上げる以前に、まず標準的な単一物質についての試験法を開発して適切な曝露量・応答データ（まず EATS モダリティ、ついで他のモダリティに対して）を得ることが先決であると考えられる。

以上の考察は EAS に限られるものではなく、他の機構あるいは作用機序を持つ物質についても同様にあてはまる。複数物質への複合曝露は複雑であるから、EAS の危険性やリスクの評価についてここでは取り上げることができない。この問題については下記の文献（近刊を含む）を参照されたい。

- ヒトの健康に対する農薬の累積的・協働的リスク評価の既存の方法の評価および適切な場合には新しいアプローチの探索に関する EFSA 植物保護製品およびその残留物に関するパネル(PPR パネル)の意見書(EPSCA, 2008)
- 食物経路でのトリアゾール系農薬への曝露のヒト健康への累積的影響を評価する方法を試験するための同農薬のリスク評価に関する PPR パネルの意見書(EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues, 2009)

- 植物保護製品のハチ類 (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. および独居性ハチ類) に対するリスク評価法開発の科学的背景に関する EFSA 学術委員会の意見書第 6 章。累積的・協働的效果を考慮する方法を論じている (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues, 2012b およびそこに引用された文献)
- ヒトの複数物質への複合曝露のリスク評価のために各国内および国際的機関で開発された方法論、フレームワークおよび関連用語を概観した EFSA 学術報告書 (2013 年内に公表予定)。
- 毒性プロファイルに基づいて累積的評価群に追加すべき農薬の特定に関する EFSA PPR パネルの学術意見書 (2013 年内に公表予定)。

4.7.2.3. 低曝露量効果と非単調曝露量・応答曲線

規制のための *in vivo* 毒性および生態毒性試験、たとえば慢性・亜慢性・生殖/発達試験では、通常 1 点の高曝露量と数点 (多くは 2~4 点) の低曝露量で 50~100 倍の範囲をカバーする。物質の毒性の全容を知るため、高曝露量は許容最大限付近、すなわち生体に亜致死的效果 (哺乳類の体重減少など) を生じさせる曝露量に近く選ばなければならない。たとえば農薬関係では、最低曝露量を有害作用が生じないと考えられるレベルに設定するのが一般的である。危険性の特徴づけにおいて、閾値効果に対する通常のアプローチではこの無毒性量 (No-Observed-Adverse-Effect-Level, NOAEL) ないし無毒性濃度 (No-Observed-Effect¹⁴-Concentration, NOEC) 以下では有害作用が検出されないとし、これを基準点 (出発点ともいう) としてヒトまたは生態毒性リスク評価の健康に基づく指針値を導く。

EAS または ED に関する学術文献では、曝露量・応答曲線の形状について 2 つの観点に関して論戦が続いており、上記の仮定に影響を及ぼす可能性がある。

- 低曝露量 (無毒性量あるいは現在の健康に基づく指針値よりも (遥かに) 低い曝露量、たとえば許容 1 日摂取量 (Tolerable Daily Intake, TID) または容認 1 日摂取量 (Acceptable Daily Intake, ADI)) の影響については過去 10 年以上にわたって論議されている (Melnick et al., 2002; EFSA, 2010)。
- EAS については、曝露量・応答曲線が単調であるとは仮定できず、むしろ非単調であることが予想されるという説が提起されている。通常の応答曲線では有害性が常に曝露量と共に増加するのに対して、この非単調曝露量・応答曲線 (NMDRC) では、曝露量の変化に従って曲線の方向が変わる (Vandenberg et al., 2012)。

低曝露量効果および NMDRC の報告の大部分は齧歯類で観察されたものであり、したがってヒトの健康に関係づけられるが、軟体動物や魚類の研究によって環境生物にも同様の効果が見られることが示唆されている (Jobling et al., 2004 など)。

低曝露量効果と NMDRC は同義語ではないが、両語が同義に使われている場合も多く、かなりの混乱が生じている。

従来の *in vivo* 試験は曝露量・応答曲線が単調であることを仮定しており、また NOAEL/NOAEC より著しく低い曝露量を通常対象としていないので、或る種の ED に認められる低曝露量効果の検出や曝露量・応答曲線の形状の特徴づけには適切でないことが主張されている (Vandenberg et al., 2012)。低曝露量の効果は高曝露量の効果から予測できないので、内分泌攪乱の可能性のある物質の試験においては曝露量の範囲を低曝露量まで拡大することが推奨されている。

これに対して、低曝露量効果や NMDRC の存在を否定する意見もある。この問題は主として生殖との関連で激しい論争的となってきた。既に 2000 年に低曝露量効果の問題が米国 NTP の総説に取り上げられており (U.S. NTP, 2001; Melnick et al., 2002)、これらの知見に再現性がなく、また毒性学的意味が不確実であることが指摘されている (EFSA, 2010)。EFSA のこの報告書(2010)には NMDDRC の意義に疑いを挟む論文・総説がいくつか引用されている (Kitchin and Drane, 2005; Mushak, 2007; Chapin et al., 2008; Mayo and Spanos, 2008)。このような状況では、誤った結果を除くために、低曝露量効果または NMDRC を示すと思われる知見の再現性を評価すべきであるとしなければならない。Rhomberg and Goodman (2012)は、Vandenberg et al. (2012)の議論の基礎となった例が他の研究者によって疑問視されており、立論の健全な証拠とはなり得ないと述べている。

2012 年 6 月に開催された、毒性およびリスク評価における低曝露量応答に関する EFSA 学術コロキウム (EFSA, 2012)において、低曝露量効果および NMDRC の存在に関する十分な科学的証拠があるか否かについての討論が行われた。これらの知見を妥当で信頼できるとする参加者もあったが、参加者全員の合意は得られなかった¹⁵。NMDRC を報告している研究のデータの品質とロバストネスを、他の研究と同じく評価すべきであるとの発言、既存の論文の低曝露量効果および NMDRC に関する知見の信頼性の批判的評価を行う提案、それらが現行の危険性・リスク評価や試験戦略に及ぼす影響の評価の提案などがあった (EFSA, 2012)。

2012 年 9 月 11~13 日ベルリンにおいて、米国 NIH と共同研究センターの健康・消費者保護研究所との共催で、内分泌活性物質の低曝露量効果および非単調曝露量・応答曲線に関するワークショップが開催された。このワークショップは内分泌活性化学物質における低曝露量効果および非単調曝露量・応答曲線の証拠を検討し、現在までの観察が化学物質の内分泌攪乱性の試験方法を再検討するのに十分であるか、またヒトの健康に対するリスクをどのように管理すべきかを確認することが目標であった。参加者の大部分が同意したことは、非単調曝露量・応答曲線が実際に見られること、物質によっては或る曝露量範囲で非単調の応答が予想されること、しかしこれがいわゆる「低曝露量」で生ずるかどうかは別問題であることである。「低曝露量」という語が現在状況によって異なる意味で使われているため、これに定義を与えることが有用であること、また内分泌攪乱の文脈で有害と認められる効果の種類を実際的に評価する必要があることが示唆された。

更に最近では、WHO/UNEP の内分泌攪乱物質の科学の現状に関する報告書 2012 年版で低曝露量効果と NMDRC が考慮されている(WHO/UNEP, 2013)。

「低曝露量」仮説の主張するところは、外因性化学物質がホルモン作用に対して極めて特異的に相互作用する場合があります、有害作用を否定するには従来の毒性エンドポイントでは不十分であること、また曝露量に対する応答が非線形であり、非単調である可能性もあることである」(Vandenberg et al., 2012)。”

また同報告書は NMDRC について次のように述べている。

「ED は *in vitro* 試験においても *in vivo* 試験においても、非線形の曝露量・応答特性を示す。この応答は極めて複雑であり、曝露量・応答曲線は屢々非単調である。その原因と考えられる機構は多数あり、内因性ホルモンのレベルが変動するため、閾値を仮定することができない」

以上、最近のコロキウム、ワークショップ、WHO/UNEP の学術報告書を概観すると、内分泌攪乱その他のエンドポイントまたは作用機序に関連する(生態)毒性低曝露量効果および NMDRC の存在ないし意義については専門家の中で議論がなされてはいるが、まだ合意は達成されていないと考えられる。それぞれの語の定義について合意し、リスク評価(すなわち有害作用に関わる曝露量・応答関係の評価)と試験戦略に影響があるか、あるとすればどの程度かについて実際的な考慮を行うためには更に研究が必要である。

以上のことから、曝露量・応答関係を完全に定義するために現行の試験法が適切か否かについて SC が結論を下すことはできない。一方、規制目的の(生態)毒性学における現行の曝露量・応答解析を常時改訂しなければならないと結論するにも既知の情報は不十分である。とはいえ、個別の場合において異常な知見が得られた場合には、第 2 期試験として拡張された曝露量・応答解析を行うことは可能であろう。

低曝露量効果および NMDRC は内分泌活性に限られるものではないので、この問題をより広い文脈において追跡することは有意義であることを付記したい。

4.8. 試験戦略

4.1 項に述べたとおり、1 種類の試験だけでは或る物質が ED であるか否かを結論することは原則として不可能であり、得られるすべての情報(*in silico*, *in vitro*, *in vivo* のデータ、観察実験の結果)を考慮しなければならない。したがって内分泌攪乱性の同定と評価に適したデータを得るためには試験戦略の開発を更に進める必要がある。一例として、OECD ワークショップで 2010 年に開発された魚類の試験戦略を以下に述べる。ここでは 4.2.2 項および 4.5 項で述べた試験のいくつかが利用されている。

の詳細およびデシジョンツリーを参照) から、リスクの特徴づけに必要なすべてのデータを取得するための戦略の概要を知ることができる。これによって内分泌関連とその他の毒性を共に考慮した、EU 全域に適用される試験戦略を開発する基礎が得られる。ただし開発・検証の現段階で設計が可能なのは EATS 関連の作用機序を持つ ED に敏感な試験戦略のみであることに留意しなければならない。それ以外の作用機序に敏感な試験法は、そのようなモダリティの生態学的重要性の評価と、適切な *in vitro* および *in vivo* スクリーニング試験法の検証が終了するまでは実用化できない。更に、この一般的魚毒試験戦略はデータ集約的であり、データが乏しい物質に適用できないことは明らかである。

5. 内分泌攪乱物質の危険性の特徴づけの要素

或る種の物質 (植物保護製品の活性成分など) に関する EU の規制には、内分泌攪乱の可能性に対応して、危険性に基づくアプローチが採り入れられている (1.2 項参照)。ある物質が ED であるか否かの判定基準については 3 章で論じた。危険性の同定は危険性評価の第一歩にすぎず、続いて特徴づけが必要であるから、ED の特徴づけにおいて臨界作用、重篤度、(不) 可逆性、作用強度を考慮する科学的根拠の有無を検討した。

REACH 規制 (付録 B 参照) では、内分泌攪乱性物質を「極めて強く懸念される物質 (SVHC)」であるとして、候補物質リストに収録した後に認可条件を適用することを定めている。REACH の第 57(f) 条に従って ED を SVHC と認めるには、問題の物質が内分泌攪乱作用を持つこと、ヒトの健康あるいは環境に対して重大な影響を与える可能性の科学的証拠が存在することが要求され、これによって第 57(a~e) 条に規定されている他の物質 (発癌性・変異原性・生殖毒性 (CMR) カテゴリー 1A および 1B、残留性・生体蓄積性・毒性 (PBT)、高度に残留性かつ高度に生体蓄積性 (vPvB)) と同等の懸念レベルとなる。

5.1 臨界作用

危険性の特徴づけにおいては通常、質的に異なったいくつかの有害作用が見出される。それらは体重減少、器官への毒性 (肝臓毒性、神経毒性) など異なったエンドポイントに現れ、ほとんどの場合曝露量あるいは濃度の異なったレベルにおいて出現する。リスク評価において、危険性の特徴づけの段階 (たとえば健康または生態系に対する毒性に基づく指針値の決定) は、曝露量/濃度・応答関係の評価であり、それによって有害作用の現れる曝露量/濃度が (不確実性を考慮しつつ) 決定される。作用因 (化学物質など) への曝露量/濃度を次第に増加させたとき、最も敏感な種に最も低い曝露量/濃度で現れる最初の有害作用またはその前兆であることが知られている事象を「臨界作用 (critical effect)」と称する。どのような効果が最低の参照点で現れるか、すなわち何が臨界作用であるかを決定するためには、曝露量/濃度・応答モデルが必要な場合がある。SC としては、危険性の特徴づけは、健康・生態毒性学に基づく最低の指針値を規定する効果に基づくべきものとする。

ECETOC (2011) は、規制の目的で化学物質を ED であると認定するのに「臨界作用」の概念を利用することを提案し、内分泌系に媒介される有害作用が臨界作用の 10 倍以内の範囲

で現れるならば、その物質を ED と見なすという原則を示した。しかし内分泌系に媒介される有害作用を臨界作用の一定の範囲内に出現させる物質のみを ED とすることには SC としては同意できない。ED の合意された定義および判定基準によれば、内分泌系に関連する作用機序をもって有害作用を生じ得る物質は、臨界作用に関わりなくすべて ED である。ECETOC の提案は ED の危険性評価の範囲を超えて科学・政治・リスク管理の境界に関わるものであり、したがって EFSA の権限範囲には属さない。

5.2. 重篤度/（不）可逆性/作用強度

重篤度と（不）可逆性

重篤度は有害作用の程度または質を記述するのに用いられ、或る種のエンドポイント（たとえば発達障害、癌）の典型的な発現と結び付けられる。

（不）可逆性を考慮することは重篤度の判定に有用であろう。ただし不可逆的でなくとも重症とされる効果もあり得る。可逆性とは、毒性物質への曝露が停止された後、個体または集団の回復が起こり得ることである。物質への曝露が毒性学的リスク¹⁶を意味するか否かを知るためには、曝露の程度とタイミングに関連して重篤度と（不）可逆性を評価すべきものと SC は考える。

作用強度

一般的用語としての作用強度は、化学物質によって惹き起こされる生物学的または生化学的効果と、その効果を達成するのに必要な曝露量または濃度との関係を示す語と考えてよく、したがって物質がその影響を惹き起こす活性ないし強度の尺度であり、上に述べた危険性の特徴づけにおける曝露量・応答関係に関する考察の一部をなす。作用強度は通常特定の文脈の中で、たとえば同一の効果を生ずる物質の比較において考慮される。たとえばホルモンを模倣する ED は天然の内因性ホルモンと比較することも考えるべきである。1つの *in vitro* 試験で得られた潜在的特徴の値は無傷動物で観察される曝露量・応答関係と一致しないこともある。ED の判定基準は無傷動物における内分泌系の機能変化と有害作用とを結びつけるものであるから、本意見書における作用強度は *in vivo* での有害作用に関連する作用強度である。

in vivo での特定のエンドポイントに対する作用強度は曝露の程度（曝露量）のみならず曝露の持続時間とタイミングにも依存する。したがって ED に対する作用強度を定める際には、発達の臨界期（種々の生活段階を含む試験）と曝露の持続時間を考慮に入れる必要がある。SC としては、ある ED が（予め定めた）懸念レベルに達したか否かを評価する場合、作用強度のみを用いるのではなく、現実の、または予想される曝露を考慮すべきものと考えられる。

ED と判定された物質を懸念レベルに基づいて規制する場合、この懸念レベルが到達されているか否かはリスク評価によってのみ決定し得ると SC は考える。その際実際の、または予

想される曝露を考慮に入れ、証拠全体を組み合わせる形でリスクを特徴づけなければならない。

ED と判定された物質の規制を更に推し進めるために懸念レベルを定める際、危険性の特徴づけによる条件のみを用いるか、リスク評価を用いるかの問題は本意見書の範囲を超えるものであり、リスク管理によって意思決定されるべきことである。

結論

内分泌攪乱物質および有害作用の定義

- 学術委員会(SC)は内分泌活性物質(EAS)を次のように定義する。
「内分泌系と間接的または直接的に相互作用し、その結果として内分泌系、標的器官、組織に影響を及ぼす化学物質」(EFSA, 2010)
- EAS と判定される物質の範囲は、内分泌系の理解が進むにつれて変化することを指摘しておく。
- SC は、以下に示す WHO/IPCS 2002 による内分泌攪乱物質(ED)の定義および WHO/IPCS 2009 による有害作用の定義を ED 同定の判定基準とすることを結論する。
 - 「内分泌攪乱物質とは、内分泌系の機能を変化させ、その結果として無傷生物またはその子孫あるいは(下位)集団の健康に有害作用を及ぼす外因性の化学物質または混合物である」(WHO/IPCS, 2002).
 - 「有害作用とは、生物、個体群または(下位)集団の形態、生理、成長、発達、生殖、または寿命の変化であって、機能の減退、ストレスに対する補償能力の減退、または他の影響への感受性の増大を結果するものである」(WHO/IPCS, 2009)

内分泌攪乱物質の判定基準

- ED は次の 3 つの基準によって定義される。i)無傷動物またはその(下位)集団における有害作用の存在、ii)内分泌活性の存在、iii)内分泌活性と有害作用の間の妥当な因果関係。
 - 有害性の評価は内分泌関連の有害作用に特有の問題ではない。有害性の評価のための科学的な判定基準はまだ一般的には定義されていない。生化学的あるいは分子レベルの一時的・不規則な小規模の変動は、常にではないが適応的なものと考えられ、有害作用とはみなされない。細胞、器官、生体、あるいは(下位)集団レベルの *in vivo* での病理や機能障害、あるいは発達時期の変化を惹き起こす変化は有害と考えられる。したがって ED に固有の有害性の基準を考えることは難しく、そのような変化の(生態)毒性学的意味の評価や、内分泌調節と有害作用との境界がいつ超えられたかの判断は、専門家が個別の場合ごとに行わなければならない。
 - 内分泌系に関連した効果であっても、内分泌系以外の作用機序で生じた著しい毒性作用に続発したものは、真の内分泌攪乱効果と見なすべきではない。
 - 内分泌活性に関する情報は、既存情報、リードアクロス、*in silico* ツール、現行の

OECD 概念フレームワーク(CF)の *in vitro* および *in vivo* 試験 (レベル 1, 2, 3)、またはその他の機構的試験から得ることができる。これら機構的研究は証拠の重みづけによって評価する必要がある。

- EAS が ED と見なされるための前提条件の一つは有害作用の同定である。このためには最終的エンドポイントを含む試験法 (CF のレベル 4, 5) と既存情報、リードアクロス、および最終的エンドポイントの情報を含むその他の *in vivo* の(生態)毒性試験を利用することができる。
- 無傷生体、その子孫または(下位)集団に誘起される内分泌活性と有害作用との間には、生物学的に妥当な因果関係の証拠がなければならない。そのような証拠は OECD CF またはその他の試験から取得し、証拠の重みづけ(WoE)によって評価しなければならない。

内分泌活性物質に媒介される効果の同定と特徴づけのための試験法の利用可能性と妥当性
哺乳類および非哺乳類の各種内分泌モダリティに対する試験方法の妥当性を検討した。これらの多くは OECD プログラムの枠内で開発され、(国際的に)標準化(および検証)されたものである。主として学術的研究に用いられる試験法は特に取り上げていない。

- 計算毒性学および試験以外の方法: In silico 試験法を信頼性ある適切なエキスパートシステムあるいは(定量的)構造活性相関モデルと組み合わせて段階的に利用し、WoE アプローチを適用することは、内分泌活性の予測に有用である。概略を述べれば、分子レベルの初期事象のエンドポイント(たとえばエストロゲン受容体(ER)・アンドロゲン受容体(AR)などへの結合と活性化)についてはこれらツールの品質と信頼性は比較的優れている。しかし *in vivo* での内分泌関連毒性(生殖毒性、発達毒性など)の予測に関しては適用範囲が限られ、信頼性も劣る。
- In vitro でのエストロゲン、アンドロゲン、甲状腺またはステロイド産生(EATS)試験: 現在利用できる、または間もなく利用可能になる、哺乳類を用いる国際的に標準化された *in vitro* 試験で検出できるのは、エストロゲン、アンドロゲンまたはステロイド産生への活性のみである。甲状腺ホルモン軸に作用する物質については、甲状腺に関連する最終エンドポイントの情報が得られる試験法は存在し、また甲状腺関連の *in vivo* バイオマーカーも利用できるが、甲状腺に關係する *in vitro* の機構的スクリーニング法はまだ存在しない。OECD レベルでは甲状腺関係の開発が進行中である。将来更にテストガイドラインが追加されれば、他の脊椎動物に対する *in vitro* の EA(T)S 系試験も含まれる可能性がある。
- 脊椎動物による in vivo の EATS 試験: 標準化された機構的または最終的な *in vitro* 試験に関しては、EATS モダリティの大部分とその予期される最終的効果が検出できるのは哺乳類と魚類の試験のみである(両生類もある程度は可能)。爬虫類についてはこれらのモダリティに関する標準化された試験法はなく、鳥類については最終的試験のみ存在する。
- 脊椎動物による非 EATS 試験: 標準化された哺乳類の最終的試験の中には、EATS 以

外のモダリティ（他の軸や信号伝達経路を含むものなど）に対しても感度を持つものがあるが、これらのモダリティに対する国際的に標準化された *in vitro* および *in vivo* の機構的スクリーニング法はまだ開発されていない（開発は進行中である）。環境については、魚類のエストロゲン、アンドロゲンまたはステロイド産生モダリティの最終的試験には他の脊椎動物の内分泌モダリティに対しても感度を持つものがあるようである。

- **無脊椎動物の EATS および非 EATS 試験**：標準化された節足動物の最終的試験はエクジステロイドおよび幼若ホルモン攪乱に対して感度を持つが、機構的情報は得られない。無脊椎動物についてはモダリティの如何を問わず、標準化された機構的試験法は存在しないが、現在開発中の軟体動物による最終的生殖試験は或る種の脊椎動物ステロイドに対して感度を持つ。これらの最終的試験はいずれも、特定の有害作用に関係づけられる内分泌活性の確実な診断を与えるものではない。

原則として、ある物質が ED であるかどうかの判定に必要な情報が 1 種の試験のみで得られるとは考えにくい。なぜなら、物質がどのように内分泌系と相互作用するかを示す機構的情報と、その相互作用によって惹き起こされる有害作用を記述する最終的な情報との両方が必要とされるからである。

利用できる国際的に標準化された試験法の適切性

全体的に見れば（ただし後述の勧告を考慮して）、EAS の影響を試験するための標準化された試験方法の組み合わせとして、哺乳類と魚類の EATS モダリティに対しては一応満足できる組み合わせが存在する。鳥類および両生類に利用できる試験法の数はこれより少ない。非 EATS モダリティないし経路による攪乱の下流効果は、脊椎動物の標準化された最終的試験で検知される場合もあるが、哺乳類、魚類およびその他の脊椎動物の非 EATS モダリティに対しては標準化された機構的試験法はまだ利用できないことに注意しなければならない。無脊椎動物に関する機構的試験法は OECD の試験法の組み合わせの中には存在しないが、これは主として無脊椎動物の内分泌系が十分解明されていないためである。最後に、OECD の内分泌試験法開発においては爬虫類、棘皮動物など主要な分類群が考慮されていない。未試験の分類群に対して他の分類群からのリードアクロスが可能であるか否かは現在のところ知られていない。

SC は物質の試験に関する下記の事項を簡単に検討した。これらは EAS に固有の事柄ではなく、他の作用機序を示す物質にも適用されることに注意されたい。

- **感受性の臨界期**：感受性の臨界期における曝露から考えられる影響を評価するには、敏感な時期を包括する *in vivo* の試験が必要である。OECD CF の試験法の中には、子宮内での発達の臨界期をカバーしているものもあるが、胎児期または思春期の曝露によって誘起されるが後の生活段階に至って発現するような効果は、現行の哺乳類の試験では検出できない可能性がある。魚類のライフサイクル試験には重要な曝露時期がすべて含まれており、発達期の曝露がライフサイクル全体に及ぼす長期的影響を研究

できるものと期待される。

- 複数の物質への複合曝露：複数の EAS への曝露によって複合的な毒性作用が発現する場合があると考えられる。EFSA は複合曝露に起因する混合毒性の問題を別途取り上げる予定である。
- 低曝露量効果と非単調曝露量・応答曲線(NMDRC)：内分泌攪乱またはその他のエンドポイントないし作用機序に関連する（生態）毒性学の分野では、低曝露量効果や NMDRC の存在または意義については、学会の合意は存在しないと考えられる。

内分泌攪乱物質の危険性の特徴づけの諸要素

危険性の特徴づけに際して考慮される、臨界作用、重篤度、（不）可逆性、作用強度などの要因を、ED と判定された物質の懸念レベルの定義に含める根拠の有無については 5 章で検討した。

- 臨界作用：SC の見解として、危険性の特徴づけ（たとえば健康または生態毒性に基づく指針値）は、作用機序の如何に関わらず健康または生態毒性に基づく最小の指針値を基礎としなければならない。そのような指針値は、より高い曝露量で生ずる内分泌系に媒介される影響に対する保護にも有効である。
- 重篤度、（不）可逆性、作用強度：EAS の懸念レベルを示す場合、ぼくろのタイミングと持続期間に関連して重篤度・（不）可逆性・作用強度を評価すべきものと SC は考える。懸念レベルはリスク評価だけで決まるものではなく、リスク管理者の設定した保護目標をも考慮しなければならない。

結論として、内分泌攪乱物質は天然・合成を問わず、内分泌活性、効果の有害性、内分泌活性と有害作用との間の妥当な因果関係の 3 つの基準によって同定される。SC の判断するところでは、EATS 物質の主な危険性の同定と特徴づけのために、哺乳類に対しては一応満足できる試験法の組み合わせが現在利用できる（または近い将来利用可能になる）が、鳥類や両生類については利用できる試験の数がこれより少ない。これらの評価方法は、(1)いくつかの観点（たとえば感受性の臨界期の曝露からその後の生活段階に至る追跡）が取り上げられ、(2) WoE アプローチによって他のすべての情報と共に用いられるならば、ED の安全な曝露量または濃度を確定するために利用できるはずである。また非 EATS モダリティに対する標準化された機構的試験は、哺乳類や魚類についても、その他の脊椎動物についてもまだ存在しないことに注意すべきである。無脊椎動物については、OECD の試験法には機構的試験法は存在しない。また OECD の内分泌関連の試験法の開発計画では、爬虫類や棘皮動物などの主要分類群がまだ考慮されていない。

更に、リスク管理上の意思決定のためにリスクおよび懸念レベルを表示する場合、リスク評価（危険性と曝露データまたは予測を考慮して）によって既存情報を最もよく利用できると SC は考える。これによって ED は、ヒトの健康と環境への影響が懸念される他の物質と同様に、危険性評価だけでなくリスク評価の対象として扱うことができる。

勧告

内分泌活性物質に固有の勧告

- 試験方法に関して、下記の事項が更に開発を必要とするものと認められた。
 - OECD CF のレベル 1 において、物質の内分泌攪乱性のスクリーニングないし評価に寄与できる方法として、生理学に基づく薬物動態および曝露・応答関係のモデリングなどのツールをも考慮すべきである。
 - EAS の効果の標準化された試験法の組み合わせは、哺乳類と魚類の EATS モダリティに対しては十分包括的であるが、鳥類、両生類あるいはその他の分類群に適用できる方法は少ない。
 - 哺乳類に関しては、受胎から老齢までの全ライフサイクルにわたる曝露を含む単一の研究、あるいは発達期の曝露とその後老齢に至るまでの追跡を含む研究が欠けている。
 - ED の関与が疑われるヒトの内分泌障害に関連する予測モデルの改良。
- 非 EATS 経路・モダリティの障害の下流効果は、標準化された哺乳類の最終的試験で検出される場合もあるが、哺乳類、魚類またはその他の脊椎動物の非 EATS モダリティに関する機構的試験法は（まだ）存在しない。標準化された試験法を新たに開発するコストを考えると、今後の試験法開発においては風船順位付けのために、実際の（ヒトおよび環境における）非 EATS モダリティの内分泌攪乱の意味について更に情報が必要である。したがって非 EATS モダリティに影響する可能性のある物質への曝露がヒトあるいは環境に現れる有害作用と関係するかどうかについて更なる研究が望まれる。
- 内分泌攪乱性の同定と評価のために適切なデータが得られるような試験戦略の必要性も強調すべきことである。一例として OECD により各種魚類の試験方法の概要が開発されている。

内分泌活性物質に限定されない一般的勧告

下記については ED との関連で言及したが、より広い文脈で、かつより詳細なフォローアップ活動を勧告する。

- 有害作用と生理学的調節・ホメオスタシスの応答との生物学的閾値および判断基準
- 複数物質への複合曝露
- 非単調曝露量・応答曲線

文献

Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, van Benthem J, Zuang V, Andersen KE, Angers-Loustau A, Aptula A, Bal-Price A, Benfenati E, Bernauer U, Bessems J, Bois FY, Boobis A, Brandon E, Bremer S, Broschard T, Casati S, Coecke S, Corvi R, Cronin M, Daston G, Dekant W, Felter S, Grignard E, Gundert-Remy U, Heinonen T, Kimber I, EFSA Journal 2013;11(3):3132

Kleinjans J, Komulainen H, Kreiling R, Kreysa J, Leite SB, Loizou G, Maxwell G, Mazzatorta P, Munn S, Pfuhler S, Phrakonkham P, Piersma A, Poth A, Prieto P, Repetto G, Rogiers V, Schoeters G, Schwarz M, Serafimova R, Tahti H, Testai E, van Delft J, van Loveren H, Vinken M, Worth A and Zaldivar JM, 2011. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology*, 85, 367-485.

Akahori Y, Nakai M, Yakabe Y, Takatsuki M, Mizutani M, Matsuo M and Shimohigashi Y, 2005. Two-step models to predict binding affinity of chemicals to the human estrogen receptor alpha by three-dimensional quantitative structure-activity relationships (3D-QSARs) using receptor-ligand docking simulation. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 16, 323-337.

Allen Y, Scott AP, Matthiessen P, Haworth S, Thain JE and Feist S, 1999. Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 1791-1800.

Andersen L, Holbech H, Gessbo A, Norrgren L and Petersen G, 2003. Effects of exposure to 17 alphaethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134, 365-374. Andersen ME, 2003. Toxicokinetic modeling and its applications in chemical risk assessment. *Toxicology Letters*, 138, 9-27.

Ankley GT, Bennett RS, Erickson RJ, Hoff DJ, Hornung MW, Johnson RD, Mount DR, Nichols JW, Russom CL, Schmieder PK, Serrrano JA, Tietge JE and Villeneuve DL, 2010. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, 730-741.

Bars R, Broeckaert F, Fegert I, Gross M, Hallmark N, Kedwards T, Lewis D, O'Hagan S, Panter GH, Weltje L, Weyers A, Wheeler JR and Galay-Burgos M, 2011. Science based guidance for the assessment of endocrine disrupting properties of chemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 59, 37-46.

Benfenati E, Roncaglioni A, Boriani E, Porcelli C, Spreafico M and Lo Piparo E, 2005. Validation of selected, non-commercial (Q)SAR models for Estrogen Receptor and Androgen Receptor binding. Final report of JRC contract CCR.IHCP.C430414.X0. 96 pp. Available from:

http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/predictive_toxicology/information-sources/qsar-doc

Bern HA, Mills KT, Hatch DL, Ostrander PL and Iguchi T, 1992. Altered mammary responsiveness to estradiol and progesterone in mice exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Cancer Letters*, 63, 1171-124.

Blaauboer BJ, 2003. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*, 31, 277-281.

Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D and Farland W, 2006. IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 781-792.

Boobis AR, Doe JE, Heinrich-Hirsch B, Meek M, Munn S, Ruchirawat M, Schlatter J, Seed J and Vickers C, 2008. IPCS framework for analyzing the relevance of a noncancer mode of action for humans. *Critical Reviews in Toxicology*, 38, 87-96.

Bouvier d'Yvoire M, Prieto P, Blaauboer BJ, Bois FY, Boobis A, Brochot C, Coecke S, Freidig A, Gundert-Remy U, Hartung T, Jacobs MN, Lave T, Leahy DE, Lennernas H, Loizou GD, Meek B, Pease C, Rowland M, Spendiff M, Yang J and Zeilmaker M, 2007. Physiologically-based Kinetic Modelling (PBK Modelling): meeting the 3Rs agenda. The report and recommendations of ECVAM Workshop 63. *Alternatives to Laboratory Animals*, 35, 661-671. Bradford Hill A, 1965. The Environment and Disease: Association or Causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 58, 295-300.

Burman CF and Wiklund SJ, 2011. Modelling and simulation in the pharmaceutical industry -some reflections. *Pharmaceutical Statistics*, 10, 508-516. Castello P and Worth A, 2011. Information sources and databases on Endocrine Active Substances. JRC Technical Notes CT 31854. 28 pp. Available from: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/foodcons-prod/endocrine_disrupters/eas_database/info-sources-databases-endocrine-active-substances.

Chapin RE, Adams J, Boekelheide K, Gray LE, Hayward SW, Lees PS, McIntyre BS, Portier KM, Schnorr TM, Selevan SG, Vandenberg JG and Woskie SR, 2008. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. Birth defects research. Part B, *Developmental and Reproductive Toxicology*, 83, 157-395. CHEM Trust 2011a. CHEM Trust's Contribution to the Ongoing Debate on Criteria for EDCs. 38 pp. Available from: [http://www.chemtrust.org/documents/CHEM%20Trust%20Position%20on%20EDC%](http://www.chemtrust.org/documents/CHEM%20Trust%20Position%20on%20EDC%20)
[EFSA Journal 2013;11\(3\):3132](#)

CHEM Trust 2011b. A CHEM Trust and HEAL Briefing: Challenges and solutions in the regulation of chemicals with endocrine disrupting properties. 8 pp. Available from: <http://www.chemtrust.org.uk/documents/Criteria%20Briefing%20CT&HEAL%20FINAL.pdf>.

Clewell RA and Clewell HJ, 3rd, 2008. Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment. *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP, 50, 129-143.

Colborn T and Corlie C, 1992. *Advances in Modern Environmental Toxicology, Volume XXI, Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection.* Princeton Scientific Publishing Co. Inc., New Jersey, USA, 403 pp. D'Ursi P, Salvi E, Fossa P, Milanesi L and Rovida E, 2005. Modelling the interaction of steroid receptors with endocrine disrupting chemicals. *BMC Bioinformatics*, 6 Suppl 4, S10.

Dybdahl M, Nikolov NG, Wedebye EB, Jonsdottir SO and Niemela JR, 2012. QSAR model for human pregnane X receptor (PXR) binding: screening of environmental chemicals and correlations with genotoxicity, endocrine disruption and teratogenicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 262, 301-309.

Dybing E, Doe J, Groten J, Kleiner J, O'Brien J, Renwick AG, Schlatter J, Steinberg P, Tritscher A, Walker R and Younes M, 2002. Hazard characterisation of chemicals in food and diet. dose response, mechanisms and extrapolation issues. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 237-282.

EC (European Commission), 1997. *Proceedings of the European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife.* Weybridge, UK. 58 pp. Available from http://ec.europa.eu/environment/chemicals/pdf/workshop_report.pdf. EC (European Commission), 1999. *Community Strategy for Endocrine Disrupters -a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife.* Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:1999:0706:FIN:EN:PDF>.

EC (European Commission), 2000. *First report on the harmonisation of risk assessment procedures -Part 1 : The Report of the Scientific Steering Committee's Working Group on Harmonisation of Risk Assessment Procedures in the Scientific Committees advising* EFSA Journal 2013;11(3):3132

the European Commission in the area of human and environmental health. Part 2 : Appendices. 26-27 October 2000. Scientific Steering Committee, Health and Consumer Safety Directorate. Available from: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out82_en.html.

ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals), 2009. Guidance on Identifying Endocrine Disrupting Effects. Technical Report No 106, 133 pp. ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals), 2011. Risk Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. Workshop Report No 21, 32 pp. EEA (European Environment Agency), 2012. The Impacts of Endocrine Disrupters on Wildlife, People and their Environments .The Weybridge+15 (1996.2011) Report. Technical Report No 2/2012. 116 pp.

EFSA (European Food Safety Authority), 2008. Opinion of the Scientific Panel on Plant Protection products and their Residues to evaluate the suitability of existing methodologies and, if appropriate, the identification of new approaches to assess cumulative and synergistic risks from pesticides to human health with a view to set MRLs for those pesticides in the frame of Regulation (EC) 396/2005. The EFSA Journal, 704, 1-84.

EFSA (European Food Safety Authority), 2009a. Guidance of the Scientific Committee on Transparency in the Scientific Aspects of Risk Assessments carried out by EFSA. Part 2: General Principles. The EFSA Journal, 1051, 1-22. EFSA (European Food Safety Authority), 2009b. Existing approaches incorporating replacement, reduction and refinement of animal testing: applicability in food and feed risk assessment. The EFSA Journal, 1052, 1-77.

EFSA (European Food Safety Authority), 2010. Scientific Report of the Endocrine Active Substances Task Force. EFSA Journal, 8(11):1932, 59 pp. EFSA (European Food Safety Authority), 2012. EFSA Scientific Colloquium XVII: Low-doseresponse in toxicology and risk assessment. 64 pp. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/353e.pdf>.

EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR), 2009. Scientific Opinion on Risk Assessment for a Selected Group of Pesticides from the Triazole Group to Test Possible Methodologies to Assess Cumulative Effects from Exposure through Food from these Pesticides on Human Health. EFSA Journal, 7(9):1167, 104 pp.

EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR), 2012a. Scientific
EFSA Journal 2013;11(3):3132

Opinion on Evaluation of the Toxicological Relevance of Pesticide Metabolites for Dietary Risk Assessment. EFSA Journal, 10(7):2799, 187 pp.

EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR), 2012b. Scientific Opinion on the science behind the development of a risk assessment of Plant Protection Products on bees. (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). EFSA Journal, 10(5):2668, 275 pp. EFSA Scientific Committee, 2011. Statistical Significance and Biological Relevance. EFSA Journal, 9(9):2372, 17 pp.

Foster PM, 2005. Mode of action: impaired fetal leydig cell function -effects on male reproductive development produced by certain phthalate esters. Critical Reviews in Toxicology, 35, 713-719.

Gehring U, Casas M, Brunekreef B, Bergstrom A, Bonde JP, Botton J, Chevrier C, Cordier S, Heinrich J, Hohmann C, Keil T, Sunyer J, Tischer CG, Toft G, Wickman M, Vrijheid M and Nieuwenhuijsen M, 2013. Environmental exposure assessment in European birth cohorts: results from the ENRIECO project. Environmental Health, 12, 8.

Hartung T, Bremer S, Casati S, Coecke S, Corvi R, Fortaner S, Gribaldo L, Halder M, Hoffmann S, Roi AJ, Prieto P, Sabbioni E, Scott L, Worth A and Zuang V, 2004. A modular approach to the ECVAM principles on test validity. Alternatives to Laboratory Animals, 32, 467-472. Jacobs MN, 2004. In silico tools to aid risk assessment of endocrine disrupting chemicals. Toxicology, 205, 43-53.

Jacobs MN, Dickins M and Lewis DF, 2003. Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptorbeta (hER), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor (hER) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR) ligand binding domain from the human PPAR crystal structure. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 84, 117-132.

Jacobs MN, Janssens W, Bernauer U, Brandon E, Coecke S, Combes R, Edwards P, Freidig A, Freyberger A, Kolanczyk R, Mc Ardle C, Mekenyan O, Schmieder P, Schrader T, Takeyoshi M and van der Burg B, 2008. The use of metabolising systems for in vitro testing of endocrine disruptors. Current Drug Metabolism, 9, 796-826.

Jameson JL, 2010. Harrison.s Endocrinology, 2nd edition. Mc Graw-Hill, New York, EFSA Journal 2013;11(3):3132

USA, 560 pp.

Japanese Ministry of the Environment 2005. MOE.s Perspectives on endocrine disrupting effects of substances-ExTEND 2005. 36 pp. Available from: http://www.env.go.jp/en/chemi/ed/extend2005_full.pdf.

Jensen GE, Niemela JR, Wedebye EB and Nikolov NG, 2008. QSAR models for reproductive toxicity and endocrine disruption in regulatory use-a preliminary investigation. SAR and QSAR in Environmental Research, 19, 631-641.

Jobling S, Casey D, Rogers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner AP and Tyler CR, 2004. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. Aquatic Toxicology, 66, 207-222.

JRC (Joint Research Center), 2011. Applicability of (Q)SAR analysis in the evaluation of developmental and neurotoxicity effects for the assessment of the toxicological relevance of metabolites and degradates of pesticide active substances for dietary risk assessment. External Scientific Report. EFSA (European Food Safety Authority). Available from: www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/169e.htm.

Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T and Tilson HA, 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. Environmental Health Perspectives, 104 Suppl 4, 715-740.

Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM and Flick RW, 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104, 8897-8901.
Kitchin KT and Drane JW, 2005. A critique of the use of hormesis in risk assessment. Human & Experimental Toxicology, 24, 249-253.

Klopman G and Chakravarti SK, 2003. Structure.activity relationship study of a diverse set of estrogen receptor ligands (I) using MultiCASE expert system. Chemosphere, 51, 445-459. Kortenkamp A, Backhaus T and Faust M, 2009. State of the Art Report on Mixture Toxicity. Final Report of EU Project Contract 070307/2007/485103/ETU/D.1. 391 pp. Available from: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/pdf/report_Mixture%20toxicity.pdf.

Kortenkamp A, Martin O, Faust M, Evans R, McKinlay R, Orton F and Rosivatz E, 2011. State-of-the-Art Assessment of Endocrine Disruptors. Final Report of EU Project Contract 070307/2009/550687/SER/D3. 135 pp. Available from: http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/4_SOTA%20EDC%20Final%20Report%20V3%206%20Feb%2012.pdf.

Lo Piparo E and Worth A, 2010. Review of QSAR Models and Software Tools for Predicting Developmental and Reproductive Toxicity. JRC Scientific and Technical Reports EUR 24522 EN. 32 pp.

Main KM, Skakkebaek NE, Virtanen HE and Toppari J, 2010. Genital anomalies in boys and the environment. Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism, 24, 279-289.

Martina CA, Weiss B and Swan SH, 2012. Lifestyle behaviors associated with exposures to endocrine disruptors. Neurotoxicology, 33, 1427-1433.

Maslankiewicz L, Hulzebos EM, Vermeire TG, Muller JJA and Piersma AH, 2005. Can chemical structure predict reproductive toxicity? RIVM Report No. 601200005, 76 pp.
Matthiessen P and Gibbs PE, 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin mediated endocrine disruption in mollusks. Environmental Toxicology and Chemistry, 17, 37-43.

Maunder RJ, Matthiessen P, Sumpter JP and Pottinger TG, 2007. Impaired reproduction in three-spined sticklebacks exposed to ethinyl estradiol as juveniles. Biology of Reproduction, 77, 9991006.

Mayo D and Spanos A, 2008. Risks to health and risks to science: the need for a responsible "bioevidential" scrutiny. Human and Experimental Toxicology, 27, 621-625.

Melnick R, Lucier G, Wolfe M, Hall R, Stancel G, Prins G, Gallo M, Reuhl K, Ho SM, Brown T, Moore J, Leakey J, Haseman J and Kohn M, 2002. Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. Environmental Health Perspectives, 110, 427-431.

Mombelli E, 2012. Evaluation of the OECD (Q)SAR Application Toolbox for the profiling of estrogen receptor binding affinities. SAR and QSAR in Environmental Research, 23, 37-57.

Mushak P, 2007. Hormesis and its place in nonmonotonic dose-response relationships: some scientific reality checks. *Environmental Health Perspectives*, 115, 500-506.

Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN and Heindel JJ, 2008. Effects of endocrine disruptors on obesity. *International Journal of Andrology*, 31, 201-208.

NRC (National Research Council), 2007. *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*. The National Academies Press, Washington, D.C., USA. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 1992. *OECD Guideline for Testing of Chemicals: Test No 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test*.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 1998. *OECD Guideline for Testing of Chemicals: Test No 409: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents*.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2004. *OECD Principles for the Validation, for Regulatory Purposes, of (Quantitative) Structure-Activity Relationship Models*. 2 pp. Available from: <http://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/37849783.pdf>.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2005a. *Series on Testing and Assessment: No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*. ENV/JM/MONO(2005)14, 96 pp.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2005b. *OECD Guideline for Testing of Chemicals: proposal for a new test guideline, Avian Two-generation Toxicity Test in the Japanese Quail*. Draft, Available from: http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvac/2gen_guide_gd_draft1.pdf.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2006. *Series on Testing and Assessment: No 57: Detailed Review Paper: Thyroid Hormone Disruption Assays*.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2007a. *Series on Testing and Assessment: No 80: Guidance on Grouping of Chemicals*. ENV/JM/MONO(2007)28, 99 pp.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2007b. *OECD EFSA Journal* 2013;11(3):3132

Guideline for Testing of Chemicals: Test No 74: Detailed Review Paper for Avian Two-generation Toxicity Testing. ENV/JM/MONO(2007)21, 167 pp.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2008. OECD Guideline for Testing of Chemicals: Test No 97: Detailed Review Paper on the Use of Metabolising Systems for In Vitro Testing of Endocrine Disruptors. ENV/JM/MONO(2008)24, 95 pp.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2009a. Series on Testing and Assessment: No 102: The Guidance Document for Using the OECD (Q)SAR Application Toolbox to Develop Chemical Categories According to the OECD Guidance on Grouping Chemicals. ENV/JM/MONO(2009)5, 118 pp.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2009b. Series on Testing and Assessment: No 111: Report of the Expert Consultation to Evaluate an Estrogen Receptor Binding Affinity Model for Hazard Identification. ENV/JM/MONO(2009)33, 119 pp.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2009c. OECD Guidance Document No 140: The 21-Day Androgenised Female Stickleback Endocrine Screening Assay.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2010. Series on Testing and Assessment: No 135: Detailed Review Paper on Environmental Endocrine Disruptor Screening: The Use of Estrogen and Androgen Receptor Binding and Transactivation Assays in Fish. ENV/JM/MONO(2010)34, 64 pp.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2012a. Series on Testing and Assessment: No 150: Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. ENV/JM/MONO(2012)22, 524 pp.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2012b. Series on Testing and Assessment: No 178: Detailed Review Paper on the State of the Science on Novel In vitro and In vivo Screening and Testing Methods and Endpoints for Evaluating Endocrine Disruptors. ENV/JM/MONO(2012)23, 213 pp.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2012c. Series on Testing and Assessment: No 181: Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption: Case Studies Using Example

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2012d. Work Plan for the Test Guidelines Programme (TGP). 24 pp. Available from: <http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/August%20Work%20plan%20for%20the%20Test%20guidelines%20programme%20June%202013.pdf>.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2012e. Draft Proposal for a template and guidance on developing and assessing the completeness of Adverse Outcome Pathways. 17 pp. Available from: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/49963554.pdf>.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2012f. Information on OECD Work Related to Endocrine Disrupters. 8 pp. Available from: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testingofchemicals/50067203.pdf>.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2012g. Series on Testing and Assessment: No 171: Fish Toxicity Testing Framework. ENV/JM/MONO(2012)16, 174 pp.

PAN Europe, 2011. PAN Europe position paper on criteria for endocrine disrupting pesticides. 8 pp. Available from: <http://www.pan-europe.info/News/PR/110525.html>.

Plan EL, Maloney A, Mentre F, Karlsson MO and Bertrand J, 2012. Performance comparison of various maximum likelihood nonlinear mixed-effects estimation methods for dose-response models. *The AAPS Journal*, 14, 420-432.

Punt A, Schiffelers MJ, Jean Horbach G, van de Sandt JJ, Groothuis GM, Rietjens IM and Blaauboer BJ, 2011. Evaluation of research activities and research needs to increase the impact and applicability of alternative testing strategies in risk assessment practice. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 61, 105-114.

Rhomberg LR and Goodman JE, 2012. Low-dose effects and nonmonotonic dose-responses of endocrine disrupting chemicals: has the case been made? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 64, 130-133.

Roncaglioni A and Benfenati E, 2008. In silico-aided prediction of biological properties of chemicals: oestrogen receptor-mediated effects. *Chemical Society Reviews*, 37, 441-450.

SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), 2012. Memorandum on the use of the scientific literature for human health risk assessment purposes .weighing of evidence and expression of uncertainty. 46 pp. Available from: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_s_001.pdf.

SCHER/SCENIHR/SCCS (Scientific Committee on Health and Environmental Risks/Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks/Scientific Committee on Consumer Safety), 2011. Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. 50 pp. Available from: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/environmental_risks/docs/scher_o_155.pdf.

Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, Mao CS, Redmon JB, Ternand CL and Sullivan S, 2005. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environmental Health Perspectives*, 113, 1056-1061.

Toppari J, 2008. Environmental endocrine disruptors. *Sexual Development*, 2, 260-267. U.S. EPA-SAP (U.S. Environmental Protection Agency-FIFRA Scientific Advisory Panel), 2009a. An Effects-based Expert System to Predict Estrogen Receptor Binding Affinity for Food Use Inert Ingredients and Antimicrobial Pesticides: Application in a Prioritization Scheme for Endocrine Disruptor Screening, Meeting Minutes. EPA-HQ-OPP-2009-0322, 70 pp.

U.S. EPA-SAP (U.S. Environmental Protection Agency-FIFRA Scientific Advisory Panel), 2009b. An Effects-based Expert System to Predict Estrogen Receptor Binding Affinity for Food Use Inert Ingredients and Antimicrobial Pesticides: Application in a Prioritization Scheme for Endocrine Disruptor Screening, Meeting Materials. Available from: <http://www.regulations.gov/#!docketDetail;D=EPA-HQ-OPP-2009-0322>.

U.S. EPA-SAP (U.S. Environmental Protection Agency-FIFRA Scientific Advisory Panel), 2011. Integrated Approaches to Testing and Assessment Strategies: Use of New Computational and Molecular Tools. FIFRA SAP. Final FIFRA SAP IATA Meeting Report May 2011. EPA-HQOPP-2011-0284-0054, 81 pp.

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2004. Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1500 Fish Life Cycle Toxicity.

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2011a. Standard Evaluation EFSA Journal 2013;11(3):3132

Procedure OCSPP 890.1250: Estrogen Receptor Binding Assay Using Rat Uterine Cytosol (ER-RUC). 12 pp.

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2011b. Standard Evaluation Procedure OCSPP 890.1150: Androgen Receptor Binding Assay (Rat Ventral Prostate Cytosol). 12 pp.

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2011c. Standard Evaluation Procedure OCSPP 890.1200: Aromatase Assay (Human Recombinant). 11 pp.

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2011d. Standard Evaluation Procedure OCSPP 890.1500: Pubertal Development and Thyroid Function in Intact Juvenile/Peripubertal Male Rats Assay. 19 pp.

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2011e. Standard Evaluation Procedure OCSPP 890.1450: Pubertal Development and Thyroid Function in Intact Juvenile/Peripubertal Female Rats Assay. 19 pp.

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2012a. Endocrine Disruptor Screening Program: Universe of Chemicals and General Validation Principles. November 2012. 17 pp. Available from: http://www.epa.gov/endo/pubs/edsp_chemical_universe_and_general_validations_white_paper_11_12.pdf.

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2012b. Endocrine Disruptor Screening Program: Universe of Chemicals. November 2012. 177 pp. Available from: http://www.epa.gov/endo/pubs/edsp_chemical_universe_list_11_12.pdf.

U.S. FDA (U.S. Food and Drug Administration), online. Endocrine Disruptor Knowledge Base (EDKB). Available from: <http://www.fda.gov/scienceresearch/bioinformaticstools/endocrinedisruptorknowledgebase/default.htm>.

U.S. NTP (U.S. National Toxicology Programme), 2001. National Toxicology Program's Report of the Endocrine Disruptors Low-Dose Peer Review. Available from <http://ntpserver.niehs.nih.gov/htdocs/liason/LowDoseWebPage.html>.

Van Drie JH, 2003. Pharmacophore Discovery. In: Computational Medicinal Chemistry for Drug Discovery. Eds Bultnick P, De Winter H, Langenaeker W, Tollenare JP. CRC EFSA Journal 2013;11(3):3132

Press, New York, USA, 1196 pp.

Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT and Myers JP, 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews*, 33, 378-455.

Vedani A, Dobler M and Smiesko M, 2012. VirtualToxLab -a platform for estimating the toxic potential of drugs, chemicals and natural products. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261, 142-153.

Vinggaard AM, Niemela J, Wedebye EB and Jensen GE, 2008. Screening of 397 chemicals and development of a quantitative structure-activity relationship model for androgen receptor antagonism. *Chemical Research in Toxicology*, 21, 813-823.

Vrijheid M, Casas M, Bergstrom A, Carmichael A, Cordier S, Eggesbo M, Eller E, Fantini MP, Fernandez MF, Fernandez-Somoano A, Gehring U, Grazuleviciene R, Hohmann C, Karvonen AM, Keil T, Kogevinas M, Koppen G, Kramer U, Kuehni CE, Magnus P, Majewska R, Andersen AM, Patelarou E, Petersen MS, Pierik FH, Polanska K, Porta D, Richiardi L, Santos AC, Slama R, Sram RJ, Thijs C, Tischer C, Toft G, Trnovec T, Vandentorren S, Vrijkotte TG, Wilhelm M, Wright J and Nieuwenhuijsen M, 2012. European birth cohorts for environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, 120, 29-37.

WHO (World Health Organization), 2012. Endocrine disrupters and child health: Possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health. 84 pp. Available from: http://www.who.int/ceh/publications/endocrine_disrupters_child/en/index.html.

WHO/IPCS (World Health Organization/International Programme on Chemical Safety), 2002. Global Assessment of the State-of-the-science of Endocrine Disruptors. WHO/PCS/EDC/02.2, 180 pp.

WHO/IPCS (World Health Organization/International Programme on Chemical Safety), 2009. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. Environmental Health Criteria 240. 689 pp. Available from: <http://www.who.int/foodsafety/chem/principles/en/index1.html>.

WHO/UNEP (World Health Organization/United Nations Environment Programme), EFSA Journal 2013;11(3):3132

2013. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals -2012. 296 pp. Available from:

http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/hormone_disrupting_20130219/en/index.html

Worth A, Fuart-Gatnik M, Lapenna S and Serafimova R, 2011. Applicability of QSAR analysis in the evaluation of developmental and neurotoxicity effects for the assessment of the toxicological relevance of metabolites and degradates of pesticide active substances for dietary risk assessment. EFSA External Scientific Report. EFSA (European Food Safety Authority).174 pp. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/de/supporting/doc/169e.pdf>.

Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, Woodruff TJ and Vom Saal FS, 2012. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*, 153, 4097-4110.

付録

A. 現状、最近の報告・活動の概要

内分泌活性物質(EAS)に関する EFSA テクニカルレポート(EFSA, 2010)には 2010 年までの欧州域内および国際的な EAS 関係の活動が概観されている。この項では 2010~2013 年の間の活動を追加する。

A.1 欧州委員会(EC)¹⁷

1999 年 3 月、毒性・生体毒性・環境に関する学術委員会(Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment)は「ヒトおよび野生動物の健康に対する内分泌攪乱物質の影響、特に野生動物と環境毒性の試験方法について」を発表した (EC, 1999)。同報告書ではこれを野生動物に関して全世界的に問題となり得る事柄としている。

これを背景として、EC は 1999 年 12 月に「内分泌攪乱物質に関する域内戦略」を採択した(EC, 1999)¹⁸。その目的は内分泌攪乱の問題とその原因および帰結を確認し、問題に迅速かつ効果的に対処するため、予防原則に基づく適切な政策的行動を見出すことによって社会的懸念を軽減することである。その主要な要素として次の 4 点が挙げられている。

- 研究継続の必要性
- 国際協力の必要性
- 公衆とのコミュニケーションの必要性
- 政策的行動の必要性

これに基づいて短期・中期・長期の行動が勧告されており、その中には物質の内分泌攪乱における役割評価の優先順位の設定、この問題に関する国際協力の推進が含まれている。

研究継続の必要性

EC は 1994 年の第 4 期フレームワークプログラム(FP)開始以来、FP5, FP6 を経て現行の FP7¹⁹ に至るまで、内分泌攪乱に関する研究に資金を供給している。内分泌攪乱物質(ED)の同定・リスク評価、食物連鎖中の汚染物としての化学物質に関する教育・情報などに焦点を当てた研究として 80 以上のプロジェクトが開始されている²⁰。内分泌攪乱物質の評価の現状報告(SAAED) (Kortenkamp et al., 2011)の付録 1、9.1 項には、下記諸項目に関連する EU のプロジェクトの最近の状況が概観されている。

- 試験法の開発・検証
- ED の機構に関する新知見
- 各種試験法の比較と相関
- 新たな内分泌活性物質の同定
- 曝露評価に関連するデータ
- ヒトにおける条件発生データ
- 野生生物への影響に関する野外研究

国際協力の必要性

ECはOECDのテストガイドラインプログラムの調整に関するワーキンググループ (WNT) およびその下部機関である内分泌攪乱物質の試験・評価に関する諮問委員会(EDTA AG)に参加した。この活動の結果として、化学物質の内分泌攪乱性の標準化テストガイドラインに関するガイダンス文書(OECD, 2012a)が発行された。

ECは約10年前に、内分泌攪乱物質研究の国際評価の総合報告の刊行に資金を提供した。この報告書はIPCSにより2002年に公表された(WHO/IPCS, 2002)。最近国連環境計画(WHO/UNEP)とWHOにより、10年間の成果を反映したこの報告書の改訂版が発行されたが、これにもECが参画している(WHO/UNEP, 2013)。

政策的行動の必要性

環境総局は2009年に、

- i) EDの同定のための科学的基準
- ii) EDに関する域内戦略の見直しまたは改訂

の基礎とする目的で、内分泌攪乱物質の評価の現状調査を委託した。

受託先は2012年1月末に調査を完了し、報告書(Kortenkamp et al., 2011)は環境総局のウェブサイトで公開された。

同報告書は2002年以後の学術の進歩を要約し、EUの主な化学物質規制(植物保護製品規制(EC) No 1107/2009、殺生物剤規制(EC) No 528/2012、化学品規制(EC) No 1907/2006など)における内分泌攪乱物質の取り扱いを概観しており、EDの評価に関して下記のように多岐にわたる結論と勧告を記している。

- WHO/IPCSによる内分泌攪乱物質の定義は、ヒトの健康と生態毒性学的危険性・リスクの両者の評価に適切なものとして一般に受容されている。
- EDの同定のための国際的に合意・検証された試験方法(OECD)は一般に有用と認められているが、これらの方法で検知できるのは、既知の内分泌攪乱効果のスペクトルの一部にすぎず、野生動物に影響する可能性のある化学物質の同定にはまだ知識が不足している。
- 広範囲の内分泌攪乱効果に対して、合意・検証された試験法が存在していない。したがってヒト・野生動物いずれに対しても、有害作用が見逃されているなどの不確実性が大きい。より良い試験法が利用できるようになるまでは、危険性やリスクの同定には疫学的アプローチを併用する必要がある。
- EUの主要な化学物質規制において規定されている情報および試験は、国際的に合意・検証された試験法で測定できる内分泌攪乱効果の全体をカバーするものではない。現在利用できる試験法のうち、感度と適切性が最も高く、臨界期の感受性の高い時期をカバーする方法が実施されていない。

- EU加盟国およびその他の機関によるED規制の各種提案には、共通性や一致点もあるが、CLP規制(EU) No 1272/2008から導かれた、世印材的影響に基づくカットオフ値に基づいてEDを扱う提案に関しては論争が続いている。
- 規制を目的とするEDの定義は、有害作用と内分泌関連の作用機序との基準に基づかなければならない。有害作用を示さず内分泌関連の作用機序も持たない物質を排除しつつ段階的に進めるデシジョンツリー方式が開発されている。妥当な証拠がないときは関連あるものと見なさなければならない。
- 規制上の最終決定は、物質の毒性プロファイルを証拠の重みづけ(WoE)手法で考慮すべきものであるが、その手法はまだ開発されていない。このWoEアプローチでは作用強度のほか、効果の重篤度や特異性、不可逆性などの要因も考慮しなければならない。作用強度に基づいた厳密なカットオフ値を最終的な決定基準とすることは推奨できない。
- データが不足している場合にデータの提供を促す手順が示唆されている。知識の不足はなお著しく、研究開発プロジェクトを通じて増進に努めなければならない。

ECは2012年6月11～12日に「内分泌攪乱物質：科学と政策における現在の問題点」と題する会議を開催し、ヒトの健康および環境に対するEDの影響、リスク、EDの同定、政策目標に関する研究発表と討論がなされた。

この会議の成果は、上記のKortenkampらの報告と共に、内分泌攪乱物質に関する現在の戦略の総合報告に反映される予定であり、またECが提案する予定の、内分泌攪乱性を持つ物質の同定の基準(2013年末予定)にも知見が取り入れられることになっている。これらの作業のため、EC環境総局は加盟国およびEC組織から成る臨時諮問会議(2010年夏)および内分泌攪乱物質に関する専門家委員会(2011年11月)を組織した。諮問会議の目的は下記のとおりである。

- EDに関する情報の交換
- EDに関する科学と化学品政策の統合
- ED規制の各国別状況の検討
- この分野のEUの政策の策定についてのECへの方向付けの提供

専門家委員会には下記が諮問された。

- EDに関する詳細な学術的・技術的情報の交換
- 学術的・技術的問題に関する顧問会議の支援

専門家委員会が作成する報告書には、ED関連の基礎用語の定義と説明、EDの同定・特徴づけ・分類に関する提案、物質をEDと判定するためのWoE手法の考察、規制のためのED評価方法の提案が含まれる予定である。本意見書作成時点では報告書はまだ完成していない。

A.2 欧州環境庁(EEA)

1996年のEDに関するWeybridge会議(EC, 1997)は欧米の規制当局者がEDの問題について
EFSA Journal 2013;11(3):3132

て包括的な討論を行った初めての機会であった。議論の中心となったのはエストロゲン性化合物であり、特に受容体に媒介される効果に焦点が当てられた。

これ以降 EU は内分泌攪乱物質とその効果の研究に多額の資金（2011 年までに 1 億 5000 万ユーロ）を拠出し、WHO と OECD が様々な取り組みを行っている。過去 10 年間の研究の進展によって範囲が著しく拡大し、他のホルモン系（甲状腺など）に影響する ED、新たな作用機序を示す ED（内因性ホルモン産生または代謝阻害剤など）、生殖系以外の標的組織（脳、心臓血管系など）も対象に含められている。フィンランド学士院・EC 研究総局・EEA が 2006 年に開催した Weybridge+10 ワークショップでは、このような広範な研究の影響を評価し、ヒトおよび野生動物の健康への影響、生物学的作用の機構、モデル・曝露・リスク・政策のオプションの将来目標を設定することを目的とした。

Weybridge+15 (1996-2011) 報告書 (EEA, 2012) は過去 15 年間の研究から得られた主要な結論、問題点、勧告 (Weybridge+10 会議の全体会議で討論された) を概観し、主要な結論として、内分泌攪乱は現実の問題であり、全世界的にヒトにも野生動物にも影響する可能性があるが、より広範囲の内分泌疾患および障害の原因としての化学物質の役割について更に多くの知識が必要であると述べている。内分泌攪乱の作用機序を検知または予測するスクリーニング試験や技術 (オミックスなど) は存在するが、分野によってはまだ不適切であり、どのような ED がヒトや野生動物に影響する可能性が高いか (最も広く分布し作用強度が強いのはどれか) について更に知識が必要である。ED の低曝露量効果は高曝露量の試験結果からは予測できない場合が多いことを示唆するかなりの証拠が存在する。この低曝露量効果は毒性学の従来のパラダイムに反するものであるため大きく注目されることになったが、「低曝露量」という用語が多義的であるための混乱もある。ED については U 字形・逆 U 字形などの非単調曝露量・応答曲線が報告されており、ED の化学リスクの評価において単調性を仮定することの妥当性に疑義が提出されている。

A.3 欧州議会(EP)

EP で環境、公衆衛生、食品安全を担当する経済・科学政策委員会は 2012 年 9 月 18 日ブリュッセルで「内分泌攪乱物質とその健康影響」に関するワークショップを開催した。このワークショップは上記委員会の自主的活動の一環として、ED の健康影響への理解を深め、EU レベルで行われている政策論議のために情報を提供することを目的としていた。その成果は、上述した EC およびその他の EU 機関の ED 関連の作業と共に、公衆の健康の内分泌攪乱物質からの保護に関する EP 決議 21 への動議を含む報告書の起草に活用された。この決議は EC に対して、市販化学物質に関する試験と情報の要件を含む包括的な基準をできるだけ早期に提案し、EU の法規制において内分泌攪乱性を持つと見なされる物質を明確化できるようにすることを求め、また規制上の危険性のクラスとして「内分泌攪乱物質」を導入することを推奨し、更に ED の判定基準が現在および将来の規制すべてに均一に適用され、かつ内分泌攪乱性物質の同定のための適切な試験条件を関連するすべての EU 法規制に導入することの保証を EC に要求している。この報告書草案は 2013 年 1 月 23 日の ENVI

委員会で、一連の修正（150ヶ所以上）の上、採択された。同報告書は特に、小児・青少年・妊婦などの危険性の高いグループの保護のための早期の対策を求めている。2013年3月12日には欧州議会本会議において、ENVI報告書に基づく最終討論が行われ、2013年3月14日付で報告書が採択された。

A.4 欧州食品安全機関(EFSA)

内分泌活性物質タスクフォースの学術報告書

EASの現状を明らかにし、学術的問題およびコミュニケーション問題に関する勧告を行う、EFSA横断的なタスクフォースによる技術報告書が2010年11月30日に発表された(EFSA, 2010)。SC内部およびEFSA諮問フォーラム内の議論により、EFSA内で統一されたEASへのアプローチが要請された。特定の問題に加えて新たな規制によっても、EU諸機関・加盟国・国際活動に関するフォローアップによって評価方法の分散や重複作業を防ぐことが必要となった。EFSAに対しては、ECの主導で進行中の作業への寄与が提案された。問題が複雑であるため、一般に受容されるリスク評価の方法を開発することが重要な課題とされた。このためタスクフォースは、EFSAが食品中のEASへの複合曝露の統一的リスク評価方法の開発を継続することを勧告した。EFSAは共通戦略の開発のために、この問題に関してEC、その他のEU諸機関、加盟国の所轄機関、との対話を継続し、またリスクコミュニケーションに関する顧問グループの専門家および加盟国のコミュニケーション専門家と協力して、メディアや利害関係者の動向を監視・分析し、EASの全体あるいは個々の物質についてのコミュニケーションを図らなければならない。

低曝露量効果に関するコロキウム

EFSAは2012年6月14日パルマにおいて、毒性学およびリスク評価における低曝露量応答に関する第17回科学コロキウムを開催し、低曝露量仮説に関する討論を行った。

2日間の会議で各国の専門家100人が低レベルの化学物質の健康影響（低曝露量仮説）、およびこの問題が提起する現在および将来の食品・飼料のリスク評価に対する影響について意見交換と討論を行った。参加者は21ヶ国（EU加盟国12、加盟候補国4、日本、ノルウェー、ロシア、スイス、米国）のリスク評価・リスク管理の専門家、研究者、その他利害関係者で、その中には毒性学、内分泌学、生化学分野の学界・産業界の著名研究者や公衆衛生当局者が含まれ、欧州の規制当局・EC・共同研究センター(JRC)・新興及び新規に同定される健康リスクに関する科学委員会(SCENIHR)・欧州化学機関(ECHA)・米国FDAの担当者も参加した。

コロキウムでは1990年代以降注目を浴びるようになった、科学上の重大な岐路となる可能性のある問題、すなわち或る種の化学物質（多くはEASまたはEDとされる物質）の低曝露量における影響の研究の増加が取り上げられた。低曝露量仮説によれば、これらの物質の有害作用は低曝露量で現れる可能性があるが、それより高い曝露量すべてで現れるとは限らない。すなわち曝露量が高いほど影響が現れやすいとする古典的な（単調な）曝露量・

応答曲線に従わず、たとえば U 字形曲線（影響が低曝露量と高曝露量で現れるが中間では現れない）に従うと考えられる。このような曲線は非単調曝露量・応答曲線(NMDRC)と呼ばれる。こうした知見は化学リスク評価の現在の概念への挑戦となるものである。

現時点では、低曝露量仮説の妥当性について科学的合意は達成されていない。最近ではこの仮説を支持する新しい研究が多数あると主張されている。それらの知見の意義と、食品・飼料中の化学物質のリスクの評価への影響とがこの会議の主要な論題となった。

議論の現況を要約する導入セッションの後、参加者は 4 グループに分かれ、それぞれ効果の本質と有害性の評価、曝露量・応答関係、NMDRC の証拠、リスク評価への影響をテーマとして討論を行った。EAS の影響、試験方法および試験戦略、生体の応答を予測するモデリング技術などの関連テーマも議論の中で取り上げられた。

EFSA の学術コロキウム の 目的は、各国各分野の専門家に主要な問題についての自由な学術的討論の場を提供することであり、意見交換の機会が十分得られるように運営されている。コロキウムでの講演と要約報告が EFSA のウェブサイトに掲載されている²²。

A.5 米国 NIEHS/NIH・欧州共同研究センターIHCP

2012 年 9 月 11~13 日、ベルリンにおいて米国環境衛生科学研究所(NIEHS)/NIH と共同研究センターの健康・消費者保護研究粗(IHCP)の共催により、ワークショップ「内分泌活性物質の低曝露量効果および非線形曝露量・応答曲線：科学から実践へ」が開催された。これは EC の環境総局が JRCHCP との密接な協力のもとに 2012 年 6 月に開催した内分泌攪乱物質に関する EU 会議のフォローアップとして行われたものである。

このワークショップの目的は、内分泌活性物質に関する低曝露量効果と非単調曝露量・応答曲線の証拠を概観し、現在までの知見が化学物質の内分泌攪乱性の試験法を再検討するのに十分であるか、ヒトの健康へのリスクをどのように管理するかを明確にすることであった。

参加者の大部分が同意したことは、非単調曝露量・応答曲線が実際に見られること、物質によっては或る曝露量範囲で非単調の応答が予想されること、しかしこれがいわゆる「低曝露量」で生ずるかどうかは別問題であることである。「低曝露量」という語が現在状況によって異なる意味で使われているため、これに定義を与えることが有用であること、また内分泌攪乱の文脈で有害と認められる効果の種類を実際的に評価する必要があることが示唆された。低曝露量効果および非単調曝露・応答関係の検出に関して現行のテストガイドラインをどのように拡張し評価するかについても論じられた。

勧告事項としては、内分泌活性の研究発表における必要最低限の情報に関するガイダンスを作成すること、実験研究における生データを共有する仕組みを考案すること、非単調曝露量・応答関係の知見を蓄積するナレッジベースを整備することが挙げられた。

このワークショップの報告書は現在準備中である。

A.6 世界保健機構および国連環境プログラム

国連環境プログラム(WHO/UNEP)と世界保健機構(WHO)は2013年2月19日に「内分泌攪乱物質の科学の現状」に関する総説の2012年版を発表した(WHO/UNEP, 2013)。この報告書はIPCSが10年前に公表した「内分泌攪乱物質の科学の現状評価」(WHO/IPCS, 2002)を補完するもので、EDへの曝露と影響に関する科学的知識の現状を世界レベルで概観し、主な問題点を提示している。

EDへの懸念が高まっているのは次の3つの証拠群のためである。

- ヒトの内分泌関連障害の発症率が高まっており、たとえば国によっては青年男子の多く(最大40%)に精子品質の劣化が見られ、生殖能力が低下している。
- 内分泌攪乱物質に曝露された野生動物の内分泌関連の影響の調査によれば、成長と生殖に悪影響が認められる。
- 内分泌攪乱物質と動物実験での疾患に関連が認められる。

ホルモン受容体・ホルモン合成またはホルモンの転換に干渉する疑いのある化学物質は800種近くあり、同時に複数の受容体と相互作用する物質も知られている。ヒトにおいても野生動物においても、化学物質への曝露が内分泌障害に寄与することは多くの実験的研究により支持されている。報告書の著者らは、*in vitro*試験でも*in vivo*試験でもEDは種々の機構により非単調曝露量・応答曲線を示す可能性があると考えている。

ヒトにおいても野生動物においても、EDへの曝露に最も敏感な時期は発達初期をはじめとする臨界期である。発達への影響は成体への影響よりも低い曝露量で現れ、多くの場合不可逆的で、後の時期になって初めて認められることもある。したがって内分泌攪乱の試験は潜在的な効果を評価するため、発達期を含み、かつ生涯を通じてのフォローアップを行うことが必須である。

世界のヒトと野生動物の集団は複数のEDに同時に曝露されている。しかしこれら物質のうち、無傷動物の内分泌系に対する明らかな影響を検出できる方法で試験されたものはごく一部にすぎず、内分泌攪乱の可能性のある物質の真のリスクはデータ不足のため不確実なままである。したがってEDの疾病リスクは著しく過小評価されているおそれがある。

報告書の著者らは、発達期の曝露を抑制し発病を防ぐために、EDがいつどのように作用するかの情報を更に得る必要があることを強調している。研究の計画、結果の解釈に際しては内分泌攪乱が毒性の特殊な形態であることを念頭に置かなければならない。

- ヒトおよび野生動物が曝露される混合化学物質の効果の解明を進める必要がある。
- 攪乱を受ける内分泌系の特性を考慮に入れることが必要である。内分泌攪乱はエスト

ロゲン・アンドロゲン・甲状腺経路に限られるものではなく、内分泌系の理解を深めなければならない。

- 試験プロトコルには全寿命を通じての臨界期、低曝露量効果、NMDRC などの局面をカバーするものであることが必要である。

ED の同定のための国際的に合意・検証された試験方法で検知できるのは、既知の内分泌攪乱効果のスペクトルの一部にすぎず、ヒト・野生動物いずれに対しても、有害作用が見逃されている不確実性が大きい。著者らはすべてのレベルの情報（*in vitro* の機構的データからヒトに関する疫学データまで）を考慮するのに役立つ **WoE** アプローチの開発を推奨している。また化学物質への曝露と有害な結果とを結びつける証拠の強さを評価するための透明性の高い方法論の必要も強調されている。

報告書は ED への曝露を減少させる必要を強調している。曝露軽減のための政府の措置は、限られてはいるが個別の事案では有効なことが実証されている（たとえば鉛、クロロピリホス、トリブチル錫、PCB、或る種の POP の禁止または使用制限）。このような措置はヒトと野生動物の障害発生頻度の低減に寄与している。

ED への理解は過去 10 年間に顕著な進歩を見せたものの、不確実性や知識不足はなお無視できない重要性を持っている。ヒトや野生動物に現在見られる健康状態の悪化における ED の役割を規定するために総合的な国際協力が必要であることを著者らは繰り返し主張している。

A.7 EU 加盟国

2011 年 5 月、デンマーク環境省環境保護局は ED の判定基準の確立および規制オプションに関するポジションペーパーを発表した²³。この文書はヒトおよび環境に対して内分泌攪乱性を持つ物質の同定に関する科学的基準の提案を含み、ED の定義、特異性、証拠のレベルなど、ED の基準の策定に関連する種々の問題点を論じている。基準には ED (グループ 1)、ED の疑いのある物質 (グループ 2a)、ED である可能性の高い物質 (グループ 2b) の 3 つのグループが含まれ、各グループに関連する証拠が OECD の試験方法 (OECD CF を含む) に基づいて説明され、基準の使用法はいくつかの理論的例により説明されている。更に REACH 第 57(f)条および新しい植物保護製品 (PPP) 規制との関連において、これらの基準を規制の目的に使用することが考慮されている。グループ 1 の ED は REACH 第 57(f)条の SVHC および PPP 規制の ED 物質と見なすことが提案されているが、ED の疑いあるいは可能性のあるもの (グループ 2a, 2b) については、ED (グループ 1) に含めるか否かの決定には更にデータが必要である。

2011 年 5 月に英国安全衛生庁の化学物質規制委員会 (CRD) とドイツのリスク評価研究所が共同で、ヒトの健康に対する脅威との関連で ED の法的定義に関するポジションペーパー

を発表した²⁴。この文書は、外因性物質または混合物が内分泌系の機能を変化させることによって無傷動物、その子孫あるいは（下位）集団に有害作用を及ぼすならば、規制の必要性の高いEDと見なすことを提案している。更に、i)有害作用は、ヒトの曝露に関連のある経路で物質を投与した、適切な品質の毒性研究1件以上において見られるものであること、ii)問題となる毒性作用と内分泌攪乱との間に作用機序ないし機構による妥当な因果関係があること、iii)実験動物に見られる効果がヒトの健康に関連すること、iv)内分泌攪乱関係の実験において、動物に顕著な有害作用が現れる曝露量が「特定標的器官への毒性－反復曝露(STOT-RE)」分類のカテゴリー1が適用される指針値以下であることが要求される。

2012年3月にフランス食品環境労働衛生安全庁(ANSES)はフランス食糧局、保健局、安全局、競争・消費者保護・不正行為防止局、労働局の要請に応じて、欧州の内分泌攪乱戦略の改訂のための科学的・技術的支援に関する意見書を発表した²⁵。この文書では内分泌および潜在的EDについてのWHO/IPCS(2002)の定義を使用することを提案している。REACHや殺生物剤規制・PPP規制に適用できるようなEDの同定の科学的基準についてのANSESの提案は、デンマーク当局の提案(内分泌攪乱物質を確認されたものと潜在的なものに分け、後者を更に2つのグループに分ける)に基づき、それに英独両国の協同提案である、植物保護製品のみ適用される限界値を付け加えている。哺乳類に10 mg/kg/日以下の曝露量で有害な内分泌攪乱効果を惹き起こす物質はカテゴリー1に分類され、したがって法規制により認可されない。この値は意思決定を容易にするために導入されたもので、物質および混合物の分類・表示・包装に関する規制(EC) No 1272/2008に基づく(STOT-RE 1効果)。

2012年5月にデンマークの内分泌攪乱センターは、NGOであるChemSecが高度に懸念される物質を挙げた「即時代替」(Substitute It Now, SIN)リスト2.0に含まれる22種の物質の評価を行った²⁶。これらの物質はEDの基準に関するデンマークの提案(上述)に基づき、上記の英独共同発表の文書における作用強度によるカットオフ基準の提案に従って選択された。デンマーク基準による評価はSINリストの評価とほぼ同じ結果となり、22種中15種がED(カテゴリー1)と判定され、残り7種中6種がEDの疑いがあるもの(カテゴリー2a)に分類された。更に作用強度によるカットオフ基準を適用して、上記15種のED(カテゴリー1)のうち4種が高度に懸念される物質と判定された。

2013年2月にスウェーデン化学品局はEDの閾値レベルを決定する可能性について、内分泌攪乱に関する文献15件の検討に基づくポジションペーパーを発表し、内分泌系での作用機序と有害作用との間に妥当な関連性が証明されればEDと判定すること、現在利用できる標準化された試験法がEATSホルモン系に限られることを結論した。

具体的には、REACH規制(EC) No 1907/2006の第60(3)条の規定の対象範囲を拡大してEDを含めるべきか、またEDをCMR物質と同じく閾値を定め得ない物質と見なすべきかを検討している。文献展望の結果、EDの閾値については賛否両論があった。著者らは、無

閾値モデルの採否は、問題とするエンドポイントと作用機序に関する知識とに基づいて決定すべきことを結論し、「したがって無閾値の仮定が有効とも疑問とも見られ得ることは、EDについても遺伝毒性発癌物質と同様である」と述べている。また著者らはロバストで信頼性の高い、保護の目的に十分な ED の閾値を得ることは近い将来には不可能と考え、ED を REACH 規制第 60(3)条の対象に含めるべきとしている。

A.8 利害関係者の活動

PAN Europe

PAN Europe は 2011 年 5 月発表の内分泌攪乱性農薬の基準に関するポジションペーパー (PAN Europe, 2011)において、他の毒性効果も含めて内分泌系への影響が観察されるならば物質を内分泌攪乱性を持つものと見なすことを提唱した。この場合作用機序が知られていることは要求されない。内分泌攪乱性を持つ物質を同定するには、すべてのホルモン系を研究し、低曝露量試験を行うことが必要であり、したがって曝露時期を考慮して実験動物には発達期を通じて物質を給餌すべきである。ED には非線形の曝露量・応答関係の例が報告されているから、閾値の概念は適用すべきではない。

必要とされるのは内分泌攪乱性の認定の証拠のみであるため、ED の各種定義は論じられていない。PAN Europe は、リスク評価でなく危険性評価に基づくアプローチを提唱している。

試験済みの物質の危険性の評価のためには、詳細な文献調査が必要であり、その際に独立機関のデータを優先すべきである。物質の試験に関しては、PAN Europe は独立の内分泌攪乱研究者が開発中の最新のプロトコルを推奨する。

試験結果の解釈については、動物で観察された効果は原則としてヒトに関連あるものと見るべきである。内分泌攪乱性を持つ物質の有害作用について疑いがあるときは、予防原則を適用し、更に試験の評価が進むまでは流通を禁止すべきである。

CHEM Trust

CHEM Trust は 2011 年 9 月「内分泌攪乱性化合物に関する論議への寄与」(CHEM Trust, 2011a)を発表した。この文書は WWF の欧州政策局の資料に基づいている。2012 年 4 月には CHEM Trust と HEAL が共著資料「内分泌攪乱性化学物質の規制における問題点と解決策」(CHEM Trust, 2011b)を発表し、ED の評価・同定に際して下記の原則を考慮することを推奨している。

ED の定義に関して CHEM Trust は、WHO/IPCS の定義(WHO/IPCS, 2002)を有用な作業原則と認めつつも、物質が内分泌系を攪乱した「結果として健康に有害な作用を及ぼす」ことの証明を求めるのは過大な要求であると考えている。CHEM Trust は作用機序の確認に困難があることを強調し、有害作用は要求するが「結果として」の語句を除いたデンマ

ーク内分泌攪乱センターの定義を選択した。

この定義に基づけば ED の同定の基準は、物質が(i)内分泌攪乱性を持つか (内分泌攪乱性の発現機構の詳細な知見は要求されない)、(ii)有害作用を (実験システムにおいて) 惹き起こす可能性があるかである。有害作用の基準について CHEM Trust は、規制には「可能性の高い重大な効果」(probable serious effects)および「有害作用を及ぼす可能性のある」(may cause adverse effects)という表現があることから、有害作用が無理なく予測できることが必要としている。化学物質が ED であるか否かの判定基準に作用強度の閾値を含めるべきではない。

CHEM Trust は ED の同定に一層適合するように化学物質の試験要件を改善する必要性を強調している。現行の OECD 試験法には限界があり、危険性評価においては OECD 以外の方法にも相応の重みを持たせるべきである。また不要な試験を避けるため、in vitro 情報を証拠として活用すべきである。

CHEM Trust は、非線形曝露量・応答曲線、低線量効果 (閾値の存在しない可能性を含め) などの性質も承認している。

リスク管理については CHEM Trust は、内分泌攪乱性が「リード効果」でなくても、それが認められれば直ちに規制の対象とすることを推奨している。或る種の内分泌攪乱性物質を作用強度の閾値を根拠に厳格な規制から外すことは、規制の目的である健康の保護の達成を妨げるおそれがあり、行うべきではない。

ECETOC

ED の評価・同定に関する ECETOC の立場は下記の Weybridge 定義に基づいている。

「ED とは、内分泌機能の変化を通じて無傷生物またはその子孫の健康に有害作用を及ぼす外因性物質である」(EC, 1997)

しかしながら Bars et al. (2011)が指摘するように、WHO/IPCS (2002)、EC (1999)、日本環境省(2005)の各定義も、効果の有害性という要素を共通に含んでいる点で重要である。このため ED の同定に対する ECETOC のアプローチでは、内分泌活性の機構と、規制目的に関連する最終エンドポイントに対する明らかな影響の両者を示すことが重要とされている (ECETOC, 2009)。したがって生態毒性試験の場合は、最終的な効果は集団に関連したもの (たとえば生存率あるいは生殖への影響) でなければならない。ECETOC は (生態) 毒性データ (特定対象についての in vitro および in vivo 試験、補助的試験、複数のエンドポイントに対する最終的試験を含む) の範囲の評価に WoE 手法を用いることを推奨している。

規制のための全生体に対する試験と作用機序に関する情報とを組み合わせた試験戦略が提案されており、試験は下記のように分類されている。

- 特定作用機序を標的とする *in vitro* スクリーニング
 - ER/AR 結合試験、ER 安定導入転写活性(STTA)試験、アロマトーゼ活性試験、ステロイド産生活性に関する H295R スクリーニング
- 1つ以上の ED 活性を標的とする *in vivo* の機構的試験
 - 哺乳類
 - ◇ 子宮肥大試験(OECD TG 440)、Hershberger 試験(OECD TG 441)
 - 生態毒性
 - ◇ 魚類 21 日スクリーニング試験(OECD TG 230)
 - ◇ 魚類短期生殖試験(OECD TG 229)
 - ◇ 両生類変態試験(OECD TG 231)
- 有害作用を示し以後のリスク評価に利用できる複数のエンドポイントを含む *in vivo* の最終的および支援試験
 - 哺乳類
 - ◇ US EPA 思春期雄/雌ラット試験(US EPA, 2011d, 2011e)
 - ◇ 強化 28 日反復経口毒性試験 (OECD TG 407)
 - ◇ 亜慢性試験(OECD TG 408, TG 409) (OECD, 1998)
 - ◇ 出生前発達毒性試験(OECD TG 414)、慢性/発癌性試験(OECD TG 451, 452, 453)
 - ◇ 齧歯類単世代試験(OECD TG 415 および拡張版)
 - ◇ 齧歯類二世世代試験(OECD TG 416)
 - 生態毒性
 - ◇ 魚類性的発達試験(OECD TG 234)
 - ◇ 修正魚類全サイクル試験、たとえば US EPA OPPTS 850.1500 (U.S. EPA, 2004) の修正
 - ◇ 鳥類および両生類部分または全ライフサイクル試験 (開発中)

これらの試験の結果を評価するためのデシジョンマトリックスが開発されている (ECETOC, 2009)。これは最終的試験または支援試験の結果 (有害作用を示す) と、*in vitro* または *in vivo* の機構的試験の結果とを組み合わせるもので、前者による「内分泌毒性を示唆する有害作用」と、「内分泌毒性を示唆する内分泌活性」の証拠の両方が得られた場合のみ「Weybridge 定義による ED の十分な証拠」があると考えられる。内分泌系に関連する作用機序の十分な証拠がない場合、ヒトには関連があるものと見なす。哺乳類についての試験に関連するデータをヒトの健康および野生動物 (魚類と両生類または鳥類と哺乳類) への関連で評価するため、一連の補助的デシジョンツリーが用意されている。ある物質に対して Weybridge 定義による ED の十分な証拠があると結論された場合には、更に次の毒性プロファイルを考慮する。

- 効果は特異的であるか (すなわち、効果を全身毒性の間接的な効果と見なし得るか)。内分泌系に媒介される効果のリード毒性対特異性の概念を考慮する必要がある。リード効果と内分泌系に媒介された効果との妥当な分離の程度は個別の場合ごとに評価し

なければならないが、目安として 10 倍の係数、すなわち分離比が 10 倍以上なら当該物質は ED の懸念があるとは見なされず、10 倍以下なら ED の懸念があるとするのが提唱されている。生態毒性評価においては、陸上環境に比べて水生環境では種の多様性が大きいと、最小のリード効果と内分泌媒介効果との分離比は更に大きくとる必要がある。

- ED の作用機序はヒトの健康または環境中の種に関連するか（曝露が無視できない場合。規制(EC) No 1107/2009 第 3.8.2 項の警告を反映）。
- ED の作用強度はどの程度か。作用強度の概念は、リスク評価に代えるには不十分とされているが、懸念の大きい物質と小さいものを区別するには役立つ。作用強度の評価あるいは考えられるカットオフ基準で検知できない ED 性を持つ物質も EAS であり、標準的なリスク評価を行う必要がある。ECETOC はヒトの健康との関係を考える際の基準として、1)曝露量/濃度、2)曝露の持続時間（弱い ED の影響が現れるには長時間の曝露が必要であると仮定）、3)内分泌効果の種類と強度、4)家狂される種の数（異なる種の間、また種または生態毒性モデルとヒト健康モデルとの間のリードアクロスの可能性を考慮）、の 4 つを提案している。環境影響に関する ED の「作用強度」の評価については、ヒトの健康に関するのと同じ基準を用い、「他の分類群に対する内分泌効果の特異性」（たとえば魚類での ED 活性の作用強度を藻類での非 ED 効果と比較する）を追加することを提案している。

B. 欧州法規における内分泌攪乱物質に関する条項の概観

化学物質の登録・評価・認可・制限に関する規制 (EC) No 1907/2006 (REACH)

内分泌攪乱性を持つ物質は高度に懸念される物質(SVHC)に指定され、EU の REACH 規制 (EC) No 1907/2006 の認可手続きの対象となる。

REACH 規制第 57 条によって、所定の性質を持つ物質、すなわち CLP 規制における発癌性・変異原性または生殖毒性(CMR)のカテゴリ 1A または 1B に分類される物質²⁷、PBT 物質、REACH 規制付録 XIII に定義される vPvB 物質、およびヒトの健康または環境に対して重大な影響を及ぼす可能性の科学的証拠があり上記化合物と同レベルの懸念が持たれる物質は SVHC に分類される。ED はこの後者の第 57(f)条物質に含まれる可能性があるが、判定は個別に行わなければならない。SVHC の認可に対しては REACH 付録 XIV に示された条件が適用される。

ある物質が SVHC と認定された後に認可を得ようとするときは、製造者・輸入者または最終使用者は所定期日以降、除外用途を除き事前の認可なく当該物質を販売または使用することができない。認可条件には重量制限は含まれていない。当該物質は、その使用から生ずるリスクが適切に管理されていること、あるいは代替できる他の物質または技術がなく仕様による社会経済的利益がリスクを上回ることが証明されれば認可される。

が提案する予定の内分泌攪乱性物質の同定基準に合わせて改訂される（提案は 2013 年末に公表予定である）。

植物保護製品の市販に関する規制 (EC) No 1107/2009

規制(EC) No 1107/2009 によれば、ヒトあるいは標的以外の生物に有害である可能性のある内分泌攪乱性を持つと認められた物質は、使用条件における曝露が無視できるものでない限り認可されない。第 4(7)条に、例外が認められる条件および状況のほか、リスク軽減対策や EC への通報についての規定がある。更に EC は遅くとも 2013 年 12 月 14 日までに、内分泌攪乱性の判定のための科学的基準に関する提案を示さなければならない（規制(EC) No 1107/2009 付録 II、3.6.5 項）。

ただしこの基準が採用されるまでは、規制(EC) No 1272/2008（CLP 規制）によって発癌性カテゴリー2 または生殖毒性カテゴリー2 に分類される物質は、内分泌攪乱性を持つと見なされる。

更に CLP 規制によって生殖毒性カテゴリー2 に分類され（または分類する必要がある）、かつ内分泌器官に対して毒性作用を持つ物質は、内分泌攪乱性を持つと見なすことができる。

殺生物剤製品の販売および仕様に関する規制(EU) No 528/2012

殺生物剤製品は、内分泌攪乱性を持つ場合は認可されない。判定は REACH 規制第 57(f)条に示された基準に従う。ただしヒトおよび環境に対するリスクが無視できる物質、健康上の重大なリスクに対処するために必要な物質、または不認可がヒトおよび環境に対するリスクに比べて不均衡な悪影響を及ぼすと考えられる物質に対しては、認可は拒絶されない。

内分泌攪乱性の判定のための科学的基準は遅くとも 2013 年 12 月 13 日までに採択しなければならない。それまでの間内分泌攪乱物質は、規制(EC) No 1272/2008 の規程により下記のいずれかに分類される物質と見なす。

- 発癌性カテゴリー2 および生殖毒性カテゴリー2
- 生殖毒性カテゴリー2 および内分泌器官への毒性
- 規制(EC) No 1907/2006 第 57(f)条および第 59(1)条により内分泌攪乱性を持つと判定された物質

化粧品に関する規制(EC) No 1223/2009

化粧品に関する規制(EC) 1223/2009 では現在のところ内分泌攪乱性物質に対する制限は存在しない。内分泌攪乱性物質の同定に関する EC の、あるいは国際的に合意された基準が利用可能になったとき、または遅くとも 2015 年 1 月 11 日までに、内分泌攪乱性物質に関して当規制を見直す必要がある。

水質フレームワーク指令(WFD)は、地表水の良好な化学的状態を維持し地下水の汚染を防止するための環境的目標を設定するものである。

加盟国は 2015 年までに国レベルで各水域の汚染物質を同定し、水質基準を定め、排出規制を確立し、基準を達成することが要求される。主な汚染物質は指令の付録 VIII に例示されており、「発癌性、変異原性、または水生環境内の、もしくは水生環境を介してステロイド産生・工場制・生殖その他の内分泌関連機能に影響する可能性のある性質を有する物質および調剤」が一つの特定のカテゴリーをなしている（付録 VIII、グループ 4）。

EC レベルでは、WFD により汚染物質による地表水の汚染に対する戦略が定められる（第 16 条）。この戦略には EC レベルで特に懸念される物質の同定が含まれる。2001 年に最初の 33 物質が収録され²⁸、そのうち 21 種は内分泌攪乱性物質の候補であって、BKH Consulting Engineers 社（オランダ、デルフト）の報告書(2000～2003)に内分泌攪乱性またはその可能性の証拠が見出される。この最初のリストは環境品質基準に関する指令 2008/105/EC (ESQD)（優先物質指令とも呼ばれる）の付録 II によって置き換えられた²⁹。EC は WFD および EQSD の要求に従って、優先物質に関して WFD と EQSD とを改正する指令案を提出した。この提案³⁰には優先物質の改訂リストおよび規制の機能を改善するための規程が含まれている。これらの物質の ED 性には直接言及されていないが、このグループへの物質ないし物質群の分類に際しては内分泌攪乱性も重要な基準になると思われる。

C. OECD のガイダンス、試験ガイドラインおよび進行中の活動の概要

EAS に関する OECD の作業は、環境衛生および安全性試験評価プログラムのワーキンググループによって行われている。この作業は EDTA6 の監督下の特別活動であり WNT に属する。作業の管理には更に、哺乳類試験(VMG-Mamm)、生態毒性試験(VMG-eco)、動物以外の試験(VMG-NA)の 3 つの検証管理グループの専門家が参画し 3R を推進している。2002 年には内分泌攪乱試験・評価タスクフォース(EDTA-TF)が設置され、内分泌攪乱性化学物質の試験および評価のための概念フレームワーク(CF)（すなわちエストロゲン、アンドロゲン、甲状腺に媒介される作用機序のスクリーニングおよび試験を含むツールボックス）を採用した。「内分泌攪乱物質に関する OECD の活動に関する情報」を含む概説が OECD, 2012f に示されている。

C.1 2012 年 8 月版 OECD ガイダンス

2012 年 8 月の OECD ガイダンス文書は、化学物質の内分泌攪乱性の評価のための標準化テストガイドラインに関する、拘束力のない指針で、EDTA6 の主要な成果である内分泌各 k 欄物質の試験と評価のための CF の改訂版を含んでいる(OECD, 2012a)。この改訂版 CF は EATS ED に対して考えられるスクリーニング、試験、データ源を、レベル 1（望ましい非試験情報）、レベル 2（いくつかの内分泌機構/経路のデータが得られる *in vitro* 試験）、レベル 3（いくつかの内分泌機構/経路のデータが得られる *in vivo* 試験）、レベル 4（内分泌

関連エンドポイントに対する有害作用のデータが得られる *in vivo* 試験)、レベル 5 (生物のライフサイクルの大部分にわたって、内分泌関連エンドポイントに対する有害作用の一層網羅的なデータが得られる *in vivo* 試験) に分類して列挙したものである。レベル 3~5 では哺乳類と非哺乳類に対する試験が 2 つの欄に分けて示されており、既存の OECD テストガイドライン(TG)と、OECD が開発・検証中の TG の両者に含まれるものを網羅している。下記の抜粋 (OECD GD 150 より、OECD, 2012a, pp.385-387) を参照されたい。

試験戦略

CF は ED の試験に、時系列的な試験プログラムではなくツールキットとして、かつ特定の方法で得られる情報が機構的なものか、最終的なもの (したがって有害作用に関係するもの) か、あるいはその両者であるかを定義することで対応することを企図したものである。したがって CF は試験戦略であることを意図せず、曝露量の評価を含んでいない。

一方 OECD は 2010 年に国際的な専門家ワークショップを開催し、魚毒性測定のための現行および準備中の OECD テストガイドラインを概観するとともに、特に内分泌攪乱性物質に敏感で、化学試験における動物の使用量を最小限に抑えた新しい魚類試験を含む総合的試験戦略を開発した。この試験戦略は OECD 加盟国の審査と承認を経て公表された(OECD, 2012g)。

ここに提案された一般的な試験戦略を図 1 に示す。このフローチャートを用いるときは OECD, 2012g に含まれている説明文を参照することが必要であるが、ED に関係する主な点を以下簡単に記す。基本的な考え方は、ある点から先の進み方を決めるのに WoE アプローチを使用することである。戦略の第一歩は広範なデータの収集と問題設定の段階であり、ここには一連の物理化学的情報、運命に関する情報、(Q)SAR による毒性予測、他の物質および他の生物 (哺乳類を含む) からのリードアクロス、既存の *in vitro* または *in vivo* の毒性データの考慮 (内分泌攪乱の可能性に関する情報を含む) が含まれる。

最初のデータ収集、リードアクロス、*in vitro* スクリーニングによって、内分泌攪乱を疑わせる何らかの情報が得られたかどうかをまず考えなければならない。もし ED の疑いがなければ標準的な手順に従い、魚類初期生活段階(ELS)試験 OECD TG 210 (OECD, 1992) または類似の試験の要否を検討する。それ以外の場合は、既存データの強さに従って種々の ED スクリーニングまたは試験法を考慮する。疑いが弱ければ OECD TG 229 または 230 の *in vivo* 魚類スクリーニング、中程度であれば魚類性的発達試験(FSDT) (OECD TG 234) または魚類部分ライフサイクル生殖試験を行う。疑いが強ければ通常は魚類全寿命(FFLC)試験または多世代(MG)試験に進む。In vivo スクリーニング、FSDT または部分ライフサイクル生殖試験の結果から内分泌攪乱の徴候が見出されたならば、FFLC または MG 試験に進む。反対に ED に敏感なスクリーニングで懸念材料がなければ ELS 試験を行い、状況によっては更に FFLC 試験を行う。

結果の解釈

OECD ガイダンス文書には、陽性または陰性の結果と既存データの組み合わせのすべての可能性のシナリオと、それらの解釈方法が示されている。各試験について 16 の仮説的シナリオが用意されており、それらは既存の *in vitro* および *in vivo* 試験から極めて豊富な陽性、陰性または曖昧なデータが利用できる状況から、既存データがほとんど、または全く利用できない例までにわたっている。シナリオの半数は試験の結果が陽性の（すなわち有意義な応答が得られた）場合、残る半数は結果が陰性の場合である。機構的情報と最終的情報（たとえば TG 229 のピテロゲニンおよび繁殖率データ）の両方が得られる試験は更に、これらのデータの組み合わせの異なるものに細分されている。いずれの場合も解釈上の助言は既存データの WoE 手法による評価に基づいている。

鳥類に関する試験結果の解釈指針例：

既存の *in vitro* および *in vivo* 情報（4.2.3 項の情報を参照）および OECD TG 206 と ATGT（4.2.4 項参照）の結果と共に、鳥類に対する内分泌攪乱物質の潜在的危険性を表 4 に示す（OECD GD 150 (OECD, 2012a)より抜粋）。

GD にはまた、試料物質に関する不確実性を低減する必要があると考えられた場合に次に行うべき試験の段階についての助言も示されている。ただし GD は危険性の包括的な試験方法を示すことを意図したものではないことに注意が必要である。

OECD はこのガイダンスを改訂して EDS に感度を持つ他のスクリーニングや試験を追加することになっており、3 つの事例研究(OECD, 2012c)も、陰性物質について更に検討することが望ましいとはいえ、特に問題は生じていない。

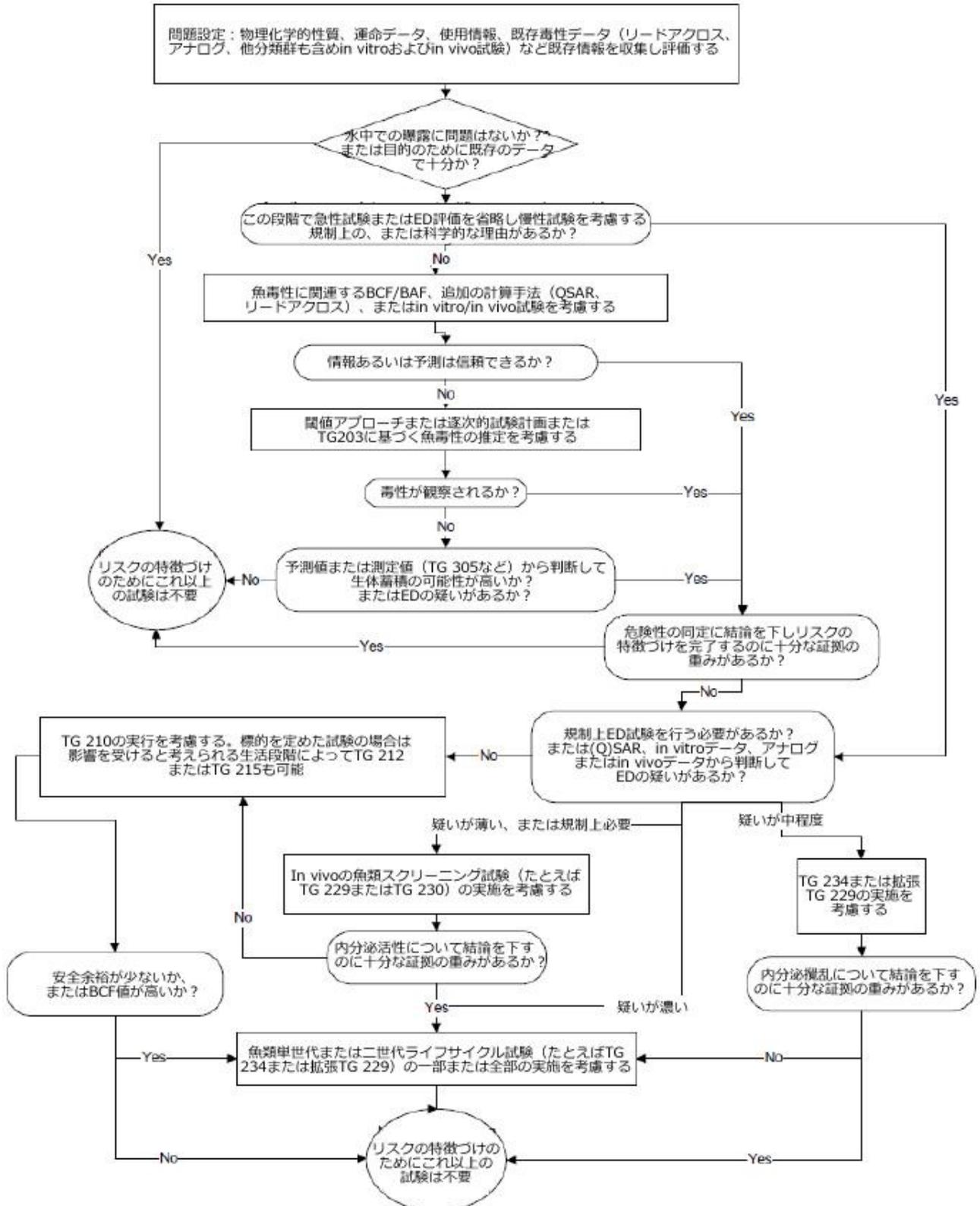


図 1：一般的魚類試験の戦略。OECD (2012g) Fish Toxicity Testing Framework. Series on Testing and Assessment no. 171, ENV/JM/MONO (2012) 16.

<http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO%282012%2916&doclanguage=en>

表 4 : TG 206 または ATGT、in vitro および in vivo 試験の結果から導かれる結論の例。+ は陽性、- は陰性の既存データ、Eq/0 は既存データが曖昧または存在しないことを示す。

シ ナ リ オ	結果				暫定的結論	
	in vitro の機 構 的 デ ー タ	in vivo の懸 念 さ れ る 影 響	TG 206	AT GT	TG 206 による	ATGT による
A	+	+	+	+	おそらく ED	有害作用の証拠強
B	+	-	+	+	おそらく ED	有害作用の証拠強
C	+	Eq/0	+	+	おそらく ED	有害作用の証拠強
D	-	+	+	+	ED の可能性あり	証拠中～強
E	-	-	+	+	ED の可能性なし	証拠中～強
F	-	Eq/0	+	+	ED の可能性なし	証拠中～強
G	Eq/0	+	+	+	ED の可能性あり	証拠中～強
H	Eq/0	-	+	+	ED の可能性あり	証拠中～強
I	Eq/0	Eq/0	+	+	ED の可能性あり	証拠中～強
J	+	+	-	-	おそらく鳥類の ED ではない	おそらく鳥類の ED ではない
K	+	-	-	-	おそらく鳥類の ED ではない	おそらく鳥類の ED ではない
L	+	Eq/0	-	-	おそらく鳥類の ED ではない	おそらく鳥類の ED ではない
M	-	+	-	-	おそらく鳥類の ED ではない	おそらく鳥類の ED ではない
N	-	-	-	-	おそらく鳥類の ED ではない	おそらく鳥類の ED ではない
O	-	Eq/0	-	-	おそらく鳥類の ED ではない	おそらく鳥類の ED ではない
P	Eq/0	+	-	-	おそらく鳥類の ED ではない	おそらく鳥類の ED ではない
Q	Eq/0	-	-	-	おそらく鳥類の ED ではない	おそらく鳥類の ED ではない
R	Eq/0	Eq/0	-	-	おそらく鳥類の ED ではない	おそらく鳥類の ED ではない

CF リスト抜粋

内分泌攪乱物質の試験および評価のための概念フレームワーク。OECD (2012a) Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption. Series on Testing and Assessment no. 150, ENV/JM/MONO(2012)22 より許可を得て複製

<http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282012%2922&doclanguage=en> (OECD, 2012a), pp. 385-387

この概念フレームワークは化学物質の内分泌攪乱性の評価に利用できる標準化された試験方法、および開発中の、ないし提案された試験方法を列挙している。概念フレームワークは内分泌攪乱物質の評価のための情報を得るために利用できる試験法への案内を目的とするものであり、試験戦略を意図したものではない。また曝露の評価方法も含まれていないが、試験の継続の可否を決定するときはこれを考慮する必要がある。各試験方法の使用および解釈の詳細は GD 150 (すなわちこの GD) に示されている。

哺乳類および非哺乳類の毒性学

レベル 1: 既存データおよび試験によらない情報

- 物理化学的性質、たとえば分子量、反応性、揮発性、生分解性
- 標準化されているか否かを問わず、実験から得られたすべての利用可能な（生態）毒性データ
- リードアクロス、化学分類、QSAR、その他の *in silico* の予測、ADME モデルの予測

レベル 2: いくつかの内分泌機構/経路のデータが得られる *in vitro* 試験（哺乳類・非哺乳類を含む）

- エストロゲンまたはアンドロゲン受容体との結合親和力
- エストロゲン受容体のトランス活性化(OECD TG 455)³¹
- アンドロゲンまたは甲状腺トランス活性化（TG が利用可能な場合）
- *In vitro* でのステロイド産生(OECD TG 456)
- MCF-7 細胞増殖試験（ER 作用薬/拮抗物質）
- 場合に応じてその他の試験

レベル 3: いくつかの内分泌機構/経路のデータが得られる *in vivo* 試験[1]

レベル 3 の哺乳類毒性試験

- 子宮肥大試験(OECD TG 440)
- Hershberger 試験(OECD TG 441)

レベル 3 の非哺乳類毒性試験

- ツメガエル胚甲状腺信号伝達試験（TG が利用可能な場合）
- 両生類変態試験
- 魚類生殖スクリーニング試験(OECD TG 299)
- 魚類スクリーニング試験(OECD TG 230)
- 雄性化雌トゲウオスクリーニング(GD 140)

レベル 4: 内分泌関連エンドポイントへの有害作用のデータが得られる *in vivo* 試験[2]

レベル 4 の哺乳類毒性試験

- 反復曝露 28 日試験(OECD TG 407)
- 反復曝露 90 日試験(OECD TG 408)
- 単世代生殖毒性試験(OECD TG 415)
- 雄思春期試験（GD 150、C4.3 項参照）[3]
- 雌思春期試験（GD 150、C4.4 項参照）[3]
- 無傷雄成体内分泌系スクリーニング試験（GD 150、付録 2.5 参照）
- 出生前発達毒性試験(OECD TG 414)
- 慢性毒性および発癌性試験(OECD TG 451-3)
- 生殖スクリーニング試験（OECD TG 421、強化された場合）
- 複合 28 日/生殖スクリーニング試験（OECD TG 422、強化された場合）
- 発達神経毒性試験(OECD TG 426)

レベル 4 の非哺乳類毒性試験

- 魚類性的発達試験（OECD TG 234 草案）
- 魚類部分ライフサイクル生殖試験（TG が利用可能な場合）

- 両生類幼生成長・発達試験 (TG が利用可能な場合)
- 鳥類生殖試験(OECD TG 206)
- 軟体動物部分ライフサイクル試験 (TG が利用可能な場合)
- ユスリカ毒性試験(TG 218-219)[4]
- ミジンコ生殖試験 (雄誘引を含む) (OECD TG 211) [4]
- ミミズ生殖試験(OECD TG 222, 2004) [4]
- ヒメミミズ生殖試験(OECD TG 220, 2004) [4]
- 処理底質中オヨギミミズ毒性試験(OECD TG 225, 2007) [4]
- 捕食性ダニ土壌中生殖試験(OECD TG 226, 2008) [4]
- トビムシ土壌中生殖試験(TG OECD 232, 2009) [4]

レベル 5 : 生物のライフサイクルの大部分にわたって、内分泌関連エンドポイントに対する有害作用の一層網羅的なデータが得られる in vivo 試験[2]

レベル 5 の哺乳類毒性試験

- 拡張単世代生殖毒性試験(OECD TG 443)[5]
- 二世世代生殖毒性試験 (OECD TG 416 最新版)

レベル 5 の非哺乳類毒性試験

- 魚類ライフサイクル毒性試験 (TG が利用可能な場合)
- メダカ多世代試験(MMGT) (TG が利用可能な場合)
- 鳥類二世世代生殖毒性試験 (TG が利用可能な場合)
- アミ類ライフサイクル毒性試験 (TG が利用可能な場合) [4]
- カイアシ類生殖・発達試験 (TG が利用可能な場合) [4]
- 底質中ユスリカライフサイクル毒性試験(OECD TG 233)[4]
- 軟体動物全ライフサイクル試験 (TG が利用可能な場合) [4]
- ミジンコ多世代試験 (TG が利用可能な場合) [4]

[1] 試験によっては有害作用の証拠が得られることがある。

[2] 効果は複数の機構に敏感な場合があり、ED 以外の機構に起因する場合もある。

[3] 使用したガイドライン/プロトコルによっては、物質がホルモン系と相互作用したことが必ずしもその物質の使用がヒトまたは生態系に有害作用を生ずることを意味しない場合がある。

[4] 現在のところ利用できる無脊椎動物の試験は、内分泌攪乱にも ED 以外にも応答する最終エンドポイントのみを含んでいる。レベル 4 の試験は部分的ライフサイクル試験、レベル 5 の試験は全ライフサイクルまたは複数のライフサイクルを含む試験である。

[5] 新しい EOGRT 試験(OECD TG 443)は、2001 年採用の二世世代試験(OECD TG 416)に含まれない幼若および成熟 F1 の多数のエンドポイントを評価することができ、内分泌各 k 欄の検出にはこの方が適している。

OECD 概念フレームワーク改訂版への注

注 1 : 開始、終了はすべてのレベルで可能であり、既存情報と試験・評価の必要性によって決まる。

注2：各化学物質の評価は、すべての利用可能な情報を考慮しつつ個別に行うべきである。
注3：フレームワークは現在のところ、すべてを包含するものではない。レベル2, 3, 4, 5には、利用可能な試験も検証中の試験も含まれている。後者は暫定的に収録したものである。

C.2 OECD で進行中の活動

OECD CFに含まれる試験の内分泌系との関連性を改善するため、展望・ガイダンス・検証の各レベルでこれまで国際協力が大規模に行われてきた。たとえばCF レベル2の *in vitro* 試験（エストロゲン・アンドロゲン受容体、ステロイド産生）の開発、代謝を考慮する方法の改善のほか、TGについても内分泌関連エンドポイント情報の処理・収集の改善に向けての検討がなされた。ヒトの健康に対する危険性の評価についての一例はTG 407で、内分泌系に媒介されるいくつかのエンドポイント（精巣・副腎・前立腺の重量、副性器・子宮・副腎・甲状腺・膣の組織病理など）を追加して検証が繰り返され、他の毒性効果との関連が検討された。得られるデータが乏しい、あるいはEDの検出のための強い証拠が得られないパラメータ（卵巣・子宮・甲状腺の重量、膣スミア・雄の乳腺・下垂体の組織病理、T3, T4, TSHの循環レベルなど）は選択任意とすることが提案されている。二世代試験でカバーされない、生殖または発達に関する（免疫、神経毒性をも含む）エンドポイントに特化した試験法として、「モジュール的トリガー」に基づく拡張単世代生殖試験(TG 443)が設計された。これは特に雌雄の相互作用、雌と胎児、雌と仔、性的成熟後までのF1世代などを要する生殖エンドポイントを対象としている。内分泌系に関連するエンドポイントとしては肛門性器間距離、雄の仔における乳頭・乳輪の存在などがある。

非哺乳類の内分泌系に関連する毒性試験のTGおよびガイダンスとしては、両生類変態試験(TG 231)、魚類スクリーニング試験(TG 230)、魚類短期生殖試験(TG 229)、雄性化雌トゲウオスクリーニング(OECD GD 140)、魚類性的発達試験(TG 234)などがある。

より適切なTGの作成作業は今後も継続される。下記のOECDで現在進行中の作業はEASに関連するものである。

VMG-NAはステロイド産生に関するTG 456を発表し（すでにCFに採用されている）、更にTG開発支援のための関連作業として、AOP、HTS、代謝、種差、新エンドポイント、臨時QSARグループなどの活動を行っている。

OECDはテストガイドライン作業計画(OECD, 2012d)に、物質の内部攪乱性のスクリーニングないし試験法に関係する下記のプロジェクトを記載している。

健康影響および内分泌攪乱に関するもの：

プロジェクト 4.31：EDTA 活性 — 新TG：ヒト組み換えエストロゲン受容体 α 結合試験 (hrERA、プロトコル2件)。主導：米国、EC、ドイツ、日本。現状と主

な経過：VMG-NA(2007)で検証計画を討議、検証（完了）をVMG-NA 会議(2010)で発表、2011 年データ解析および編集を完了。活動継続中。

プロジェクト 4.33：EDTA 活性 – 新 TG：安定導入転写活性(STTA)、化学物質のアンドロゲン活性および抗アンドロゲン活性の検出試験。 主導：日本。現状と主な経過：2010 年検証報告草案および TG 草案を事務局に提出、2010 年 12 月検証報告草案を VMG-NA に提出、2011 年 2 月ピアレビュー報告公表、2011 年 WNT 会合にてピアレビュー報告草案（ピアレビューのフォローアップに関する WNT ステートメント草案と共に）承認、VMG-NA 会合にて検証を追加すべき物質を検討。活動継続中。

プロジェクト 4.34：EDTA 活性 – 新 TG：安定導入転写活性(STTA)、化学物質の抗エストロゲン活性の検出試験。 主導：日本。現状と主な経過：2012 年第 2 四半期に検証データ収集を予定。活動継続中。

プロジェクト 4.47: EDTA 活性 – エストロゲン受容体作動物質および拮抗物質検出のための MCF-7 細胞増殖試験の TG。 主導：米国。現状と主な経過：初回コメントラウンド以前に VMG-NA より付加価値・範囲・内分泌攪乱物質試験計画中の位置づけに関する情報を提供の予定、2011 年 1 月検証試験完了、2012 年 3 月末に検証報告書発表予定、ピアレビュー実施・テストガイドライン作成の可否は米国が決定の予定。

プロジェクト 4.48：EDTA 活性 – チンパンジー組み換えアンドロゲン受容体結合試験の TG。 主導：米国。現状と主な経過：初回コメントラウンド以前に VMG-NA より付加価値・範囲・内分泌攪乱物質試験計画中の位置づけに関する情報を提供の予定、予備検証実施中、完了後に予備検証報告書発表予定。それ以後継続の予定なし。

****プロジェクト 4.55：米国/カナダの内部誘因の GD (GD 117)および拡張単世代生殖毒性試験の TG を支援する GD (GD151 草案)。** 主導：事務局。現状と主な経過：拡張単世代生殖毒性試験の支援のための GD の予備的草案を TG 草案と並行して作成、2011 年 WNT 会合にて内部誘因に関する GD 草案承認、No. 117 として公表、2011 年 9 月 GD 151 草案に関する WNT のコメント要請、2012 年 1 月 25～26 日アーリントン（バージニア州）で開催の専門家会議で GD 151 草案の検討、2012 年 4 月 GD 草案改訂版への WNT コメント、2013 年 WNT 会合にて承認の見込み。

注：拡張単世代生殖毒性試験 TG 443 および GD 151 に関するこの作業の目的は、他の毒性試験ではカバーされない生活段階の評価、および出生前・出生後の化学曝露の結果生ずる可能性のある、たとえば生殖、神経系発達、免疫系発達などへ

の影響を試験することであり、2001年に採用された二世世代試験(OECD TG 416)に含まれない幼若および成熟 F1 の内分泌関係エンドポイントの評価を行う。

****プロジェクト 4.64：エストロゲン性および抗エストロゲン性物質検出のための MELN 細胞を用いる転写試験。** 主導：欧州委員会。現状と主な経過：In vitro トランス活性化試験（プロトコル 2 件：手動試験法、高スループット試験法）、検証中、TG 455 および TG 457 に組み込み予定(BG1Luc ER TA)。

内分泌攪乱効果を含む可能性のある生体系への効果に関するもの：

プロジェクト 2.1：EDTA 活性：カイアシ類生殖・発達試験のための新 TG。 主導：スウェーデン。現状と主な経過：予備検証完了、2005年11月3～4日専門家会議、2005年11月詳細リングテスト計画改訂版回覧、2005年11月～2006年央リングテスト、報告書案を無脊椎動物専門家グループおよび VMG-eco に提出、2007年追加実験（および報告書作成、統計解析）完了、2007年検証報告書（第1段階）発表、リングテスト再実施につき専門家グループが合意。スウェーデンと米国により検証計画作成、2011年 WNT 会合により検証報告書（第2段階）承認。米国の主導により複数の実験室による追加試験、結果を VMG-eco 会合(2011年11月)にて検討、カイアシ類とアミ類との比較。2012年第2四半期に実験終了予定、2012年第3四半期総合概要報告発表予定。活動継続中。

プロジェクト 2-4：新 TG – 鳥類二世世代毒性試験。 主導：米国。現状と主な経過：1999年最初の TG 草案、DRP 承認（プロジェクト 2.5 完了）後に鳥類曝露試験の実施を検討することを決定、2005年4月専門家グループに種間比較実験を回覧、2005年12月鳥類曝露試験(2005年7月)および TG 草案改訂版(2005年11月)を VMG-eco 会合で発表、TG 草案改訂版は実証実験プロトコルの作成に利用、2010年第3四半期末までに実証実験報告書を発表の予定、2012年末に事後研究および組織病理完了見込み、2013年検証報告書発表予定。

プロジェクト 2.12：EDTA 活性：メダカライフサイクル/多世代試験(MMT)の TG。 主導：米国、ドイツ、日本。現状と主要な経過：2005～2006年日米共同でメダカ FLC/二世世代試験、ドイツでも並行プロジェクト実施、2007年物質 2～3 種について入手可能な種々の結果を比較した報告書を作成、2007年9月統計的問題の展望を魚類試験法策定グループと VMG-eco に回覧、2008年1月統計的問題の展望報告書改訂版を VMG-eco 会合に提出、次の段階で日米により TG 作成予定、2009年 WNT 会合に日米より提出の改訂版 SPSF 承認、2009年12月 VMG-eco および 2010年6月魚類専門家グループ会合でアプローチに関する論議と最適行動計画の提案、2011年2月9～10日日本で開催の魚類試験法策定グループ会合にて日米で合意したメダカ 27 週多世代試験を発表、2011年11月 VMG-eco 会合にて進捗報告、2012年12月パリにて開催の VMG-eco に討議用データ提供の予定。

プロジェクト 2:13 : EDTA 活性 : アミライフサイクル毒性試験の新 TG。 主導 : 米国。現状と主な経過:2004 年最初の TG 提案、2005 年 7 月米国で予備検証完了、2005 年 11 月 3~4 日無脊椎動物専門家グループ第 2 回会合で問題点を討議、2005 年 12 月 VMG-eco で進捗報告、予備的リングテスト結果を公表。検証継続必要、最適化、他加盟国の関心次第では米国内で試験法開発の可能性。事務局より WNT に対し米国以外の国がプロジェクトに関心を持つか否かを質問し、興味を持つ国がなければプロジェクトを付属文書 1 に移すことを示唆、ドイツが関心を表明。検証結果によっては SPSF を改訂し他パートナーの参加を求める。検証作業終了 (この時点でカイアシ類生殖・発達試験 (プロジェクト 2.1) とアミ試験の比較研究が必要になる可能性)、カイアシとアミの比較検討、追加作業の結果は VMG-eco 会合 (2011 年 11 月) で検討予定、2012 年第 2 四半期実験終了予定、2012 年第 3 四半期末に総合概要報告書発表予定。

プロジェクト 2.31 : EDTA 活性 - 両生類幼生成長発達試験の TG。 主導 : 米国、日本。現状と主要経過 : 2011 年 11 月 VGM-eco 会合で報告、2012 年第 2 四半期検証終了予定、2012 年末検証報告書発表予定。

プロジェクト 2.36 : EDTA 活性 - 新 TG : 軟体動物生殖試験。 主導 : ドイツ、英国、フランス、デンマーク。現状と主な経過 : 主導国にて毎年会合、VMG-eco 監督下で予備検証およびリングテスト、2011 年・2012 年の VMG-eco 会合にてコモチカワツボとヨーロッパモノアラガイを用いた予備検証を報告、2014 年末までに WNT のコメントラウンド用に TG 草案初稿を作成予定。

プロジェクト 2.39 : EDTA 活性 - 新 TG : ツメガエル胚甲状腺信号伝達試験。 主導 : フランス。現状と主な経過 : 2011 年 6 月 1 日付書面にて認可、2011 年各種実証実験の結果の要約書完成、2011 年 11 月 VMG-eco 会合にて検討、2012 年 6 月総合的検証計画書 (詳細プロトコルを含む) を VMG-eco および参加実験室に配布、2012 年複数実験室での試行。活動継続中。

****プロジェクト 2.7 : 魚類胚毒性試験の新 TG。** 主導 : ドイツ。現状と主な経過 : 2006 年 9 月 1 日までに最初の TG 草案と包括的背景説明書をコメントのため WNT に送付、寄せられたコメントの検討のため専門家グループを組織、2007 年 1 月 29 日専門家グループの最初の電話会議 (検証へ進むことを決定)、続いて 2 回の会議を開催、2007 年 10 月 9~11 日ベルリンにて専門家会議、性能の問題を検討、2008 年 3 月パリ L'Oreal 社にて OECD FET に関するセッションを含む ILSI/HESI 主催の会議、2008 年 WNT 20 会合で進捗報告、2008 年 5 月 14~15 日ベルリンにて専門家グループ会議、2009 年 5 月に開始された検証実験の監督のため検証管理グループ設立、2011 年検証報告 (第 1 段階) WNT 会合にて承認の

上公表、2010年10月検証（第2段階）開始（物質13種、実験室8ヶ所追加）、2012年2月16～17日ベルリンにて専門家会議、2012年4月第2段階の検証報告書を承認のためWNTに提出、WNTの承認後公表のための機密解除のため合同会議に提出、2012年9月14日までにTG草案第2稿をコメントのためWNTに送付。

OECD (2012) WORK PLAN FOR THE TEST GUIDELINES PROGRAMME (TGP)

<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/August%20Work%20plan%20for%20the%20Test%20guidelines%20programme%20June%202013.pdf> より改変。

** = 「内分泌攪乱物質に関連する OECD の活動に関する情報」（OECD, 2012f）の総括表2に掲載されていないプロジェクト

D. 疫学情報、野外情報、(生態) 毒性学情報

この付録では OECD CF の上位レベルの規制目的の試験に先立ってレベル 1 の OECD GD 150 (OECD, 2012a)に情報を提供できる試験を解説する。

D.1 ヒトの内分泌活性物質への曝露の危険性の特徴づけのための疫学情報の利用

EAS への曝露と有害作用の可能性は主としてヒトに関係するものであるから (たとえば発達初期への影響(WHO, 2012))、疫学的研究によって非臨床的試験を補完することは論理的かつ必要なことであり、ヒトにおける内分泌攪乱リスクの本質と程度をよりよく理解する上で有効と考えられる。

しかしながら疫学研究は本質的に観察研究であるため、様々な選択の偏りが入り込むという一般的難点があり、方法論的にも困難がある。より具体的に言えば、疫学研究で EAS 曝露と種々の有害作用との因果関係を見出そうとする場合、1)環境中の EAS は多数あり、かつ遍在的であること、2) ヒトは一般に低レベルの複数の物質に曝露されていること、3) ライフスタイル関係など他の環境条件が働いている可能性があること、を考慮しなければならない(Main et al., 2010; Martina et al., 2012)。

ヒトに対する EAS の影響を評価しようとする研究では、曝露量の精密な推定と共に、特定の EAS または複数の EAS への複合曝露に対する重要な発達段階を知ることが解決すべき主な課題となる。

適切な曝露測定的设计

周産期は発達における重要な段階であり、EAS 曝露によって不可逆的な影響を被る可能性があることから、この時期の EAS 曝露については多くの研究がなされている。この場合、病状が現れた時点での曝露は問題でなく、評価すべきは受胎時あるいは周産期における親の曝露量である。両親の曝露について正確なデータを得ることはほとんど不可能であるから、生命の初期段階における曝露と成人後の健康影響との間に因果関係を確立することは困難である。

尿などによる 1 回の曝露量測定では曝露のスナップショットが得られるが、遍在していてかつ人体に蓄積されない物質 (フタル酸エステルなど) への長期的曝露の指標として用いることはできない。また全曝露量が複数のごく少量の EAS への反復曝露の総和である場合もあり得る。

各種 EAS への曝露を定量的に扱うことを企図した研究のいくつかは、おそらくこのような問題のために曝露と有害作用とを関係づけることに成功しなかった (たとえば Swan et al., 2005)。

現在 EAS 曝露に帰せられている健康影響には、多数の要因が関与し一般集団中での有病率が高いものが少なくない（肥満、糖尿病、乳癌、前立腺癌、受精率低下、先天性奇形など）。このため EAS への曝露によるリスクの増大を検出するには、極めて広範な交絡因子（食餌、運動、喫煙、社会的地位等々）をコントロールする必要を考慮して、非常に大きな標本を用いたコホート研究によらなければならない。Vrijheid et al., 2012 や Gehring et al., 2013 はそのような研究の例である。栄養・食品摂取に近年大きな変化が見られることも考慮に入れる必要がある。

ヒトに関する研究での適切な試験群と対照群の設定の問題

陰性対照、すなわち EAS その他の物質に曝露されていない、あるいは曝露されたことのない被験者を見出すことは多くの場合不可能である。ヒトにおいて EAS への曝露の結果生じた効果として実証されたものがないのは、曝露レベルが低いこと、また環境からの複合曝露の考慮が困難であることが原因と考えられる。

職業的に曝露を受ける労働者は、特定の物質への曝露量が環境からの曝露量より著しく高いので、ヒトに対する EAS の影響を評価する上で興味ある被験者群である。しかし多くの物質が遍在的であるため、対照群を見出すことが方法論上の重要な問題となる。バイオモニタリングデータが不正確であると分類の誤りを生ずる（実際には曝露されている被験者を曝露されていないものとする）おそれがあり、ひいては試験群と対照群との差を見落とすことにもつながる。実際、適切なバイオモニタリングデータが欠けていることが、因果関係を見出す上での大きな制約となっている。

このような問題点とは別に、大集団の調査と疫学研究の組み合わせは、ヒト集団における内分泌攪乱の有害作用を同定するために依然として重要なアプローチであると考えられる。疫学で観察された関連の因果性のレベルを客観的に評価する基準は Bradford Hill (1965) にまとめられており、一貫性、関連の強さ、曝露量・応答関係、時間的順序、特異性、反復の際の一貫性、予測能力、生物学的妥当性（非臨床的研究からの証拠を含む）、整合性などが挙げられている。

EAS がヒトの健康に及ぼす影響に関わる不確実性や非臨床的データからの外挿の制約を考慮すると、疫学調査は内在する問題点にも関わらず、依然として大集団に対する EAS の影響評価の重要な要素であると考えてよいであろう。

感受性の臨界期（4.7.2 項を参照）および複数の EAS の相乗作用による累積的效果（4.7.3 項を参照）の解明が進むにつれて、EAS の影響に対する懸念も強まることになった。知識レベルの向上によって、ヒトの健康に対する EAS の影響はもはや無視できないものとなり、リスク評価において考慮すべき要因となっている（EEA, 2012）。

D.2 野生動物の内分泌活性物質への曝露の危険性の特徴づけのための野外情報の利用

脊椎動物・無脊椎動物を問わず多くの種が EAS に敏感であることが実験室的研究によって示されており、内分泌攪乱が野生動物界に大きく広がっている強い証拠が多くの種において見出されている。いくつかの野生動物種（標的でない種）では、雌雄両性の生殖器発育不全や甲状腺ホルモン障害と ED への曝露との関係が十分な説得力をもって示されている。しかし因果関係の立証は容易ではない(EEA, 2012)。たとえば野生淡水魚・海水魚に内分泌攪乱が見られることは多くの研究で示されているが（たとえば Allen et al, 1999）、世界的に両生類の個体数が減少している事実と、それへの内分泌攪乱の寄与との因果関係は依然として不確実である(EEA, 2012)。

ED と非 ED の影響評価には原理的には大きな差はないが、ED の有害作用が集団レベルでの影響を持つ可能性があることを確認する必要性を考えると、利用できる限りにおいて野外データを用いることには価値があると思われる。そのようなデータがない場合、規制を行うためには、発達や生殖などのエンドポイントに関する実験室的データを集団への影響へと外挿することが確実にできなければならない（そのための唯一ではないが理想的な手段が集団モデリングである）。或る種の効果、特に個体の行動に対する効果が、集団または下位集団レベルでの観察では必ずしも容易に認められないことは周知である。

野外情報には野外実験とモニタリングデータの 2 つの種類がある。野外実験とは、処理された人工池（メソコスム）、ケージまたは特定調査区域で動物集団を研究する方法である（Kidd et al., 2007 など）。この方法は、反復実験が可能であり、また問題の物質への一定量の曝露を行う点で、実験室的研究を野外に拡張したものであり、処理と有害作用とを確実に結びつけるデータを集団レベルで得ることができる。EAS/ED の場合、集団レベルで観察された影響と内分泌活性との関連の更なる証拠として、曝露された生体の曝露バイオマーカーまたは作用機序（たとえば雄の魚のエストロゲンへの応答としてのビテロゲニン誘導）を測定することが望ましい。メソコスム、ケージまたは調査区域による実験の主な欠点はコストおよび結果の評価の複雑さである。これに対して、動物行動の或る側面、特に自然環境で最もよく表出されるような側面の研究には実験室よりも野外が適している。

野外モニタリングは集団レベルでの影響（個体数減少など）を確認するには最も強力な方法であろう。歴史的にも、DDT、PCB、水銀などの化学物質の環境的危険性と野生動物への悪影響を示すのに野外モニタリングが利用されてきた。野外モニタリングは通常環境および食物連鎖の化学モニタリングと併用され、結果の評価には相関分析や多変量解析が使用される。このようなデータはヒトに関する疫学情報に比すべきもので、観測された効果が問題の物質に起因する可能性を WoE 手法で決定するには Bradford Hill の基準(Bradford Hill, 1965)を適用する必要がある。野外で得られた証拠から構築された仮説の確認のためには、最終的には実験室あるいはメソコスムに戻って反復実験を行う必要がある場合もある。野外モニタリングの実例としては、トリブチル錫含有防汚塗料のケース(Matthiessen and EFSA Journal 2013;11(3):3132

Gibbs, 1998)が挙げられる。ED が実際に集団レベルの有害作用を及ぼすことを野外研究が確認できるとしても、この方法には実際的な困難がつきまとう可能性があることにも注意しなければならない。生殖障害などの試験エンドポイントが野外における集団レベルの障害を惹き起こす可能性についての判断は、野外データや集団モデリングのない状況で下さねばならないことが多い。そのような場合には規制または評価の専門家の判断に頼らざるを得ない。たとえば集団において影響が現れる生殖障害（またはその他のエンドポイント変化）がどの程度であるかが重要な問題となる。換言すれば、（たとえば）繁殖力に対する単に統計的に有意な効果を提示するだけでは不十分であり、効果が集団に対して生物学的な意義を持ち得る程度の大きさであることが必要である (EFSA Scientific Committee, 2011)。

D.3 ヒトまたは野生動物の内分泌活性物質への曝露の危険性の特徴づけのための *in vitro* 試験または動物実験の利用

細胞系または分離した受容体を用いた *in vitro* 研究は多数存在する。情報が蓄積されるにつれて、内分泌攪乱に関連する健康影響の予測に各種 *in vitro* 試験が有用であることがますます明らかになってきた。米国 EPA の ToxCast プログラムでは、内分泌活性による物質のスクリーニングを高スループットシステム (HTS) で行うために、受容体試験や酵素試験を用いている (U.S. EPA, 2012b)。OECD ガイダンス文書 150 (OECD, 2012a) には、物質の内分泌攪乱性を評価するための *in vitro* スクリーニング法および試験法（レベル 2）が多数列挙され、それらの適用範囲や限界が論じられている。

内分泌攪乱によるヒトおよび野生動物の健康影響を解明する上で動物実験は大きな寄与をなしてきた。この分野では生殖関係の障害が依然として主要な研究対象であるが（たとえば或る種のアンドロゲン性または抗アンドロゲン性 ED によって、実験動物の雄の生殖管に各種の発達異常が誘起され (Toppari, 2008)、それは DES に曝露されたヒトでの観察結果を反映している）、神経発達および甲状腺ホルモンに媒介される障害も研究されている。早期の発達への影響に関する WHO の報告書 (WHO, 2012) には、医薬や工業用化学品によって実験動物に誘起される内分泌攪乱関連の効果が 100 例以上挙げられている。このような情報が、化学物質が内分泌攪乱を惹き起こし有害作用を及ぼすことの証拠であることは疑いない。そのような効果が動物モデルで明瞭に示されているのであるから、ヒトも曝露量次第ではリスクに曝されていることは明らかである。こうした動物実験は一般に学術論文として発表され（すなわち法規制の枠組みで行われたものではない）、またヒトに対しては必ずしも有意義とは言えないような高曝露量が用いられていることも多い。規制の目的のためには、曝露量・応答曲線の全体を考慮しつつ、ヒトの曝露に対して有意義な曝露量での実験を行う必要がある。

ED の有害作用を実証するための要求条件は、ED 試験のための OECD 概念フレームワークに含まれる、保護目的に対応する最終エンドポイント（たとえば生態毒性試験において集団に関連する）に対する影響を示し得る高レベル（レベル 4 および 5）の *in vivo* 試験に

明らかである。これは短期的には動物実験に対して厳しい条件であるが、*in silico*, *in vitro* または *ex vivo* 試験のデータから *in vivo* での有害作用へのロバストな外挿法が存在しない以上、避けて通ることはできない。

結論として、物質が ED として作用するか否かの判定に際しては実験的・機構的研究が今後とも最も重要な情報源であり、ヒトや野生動物の健康に影響する物質についても推定できる可能性がある。ある物質が *in vitro* 試験において内分泌系の受容体に結合した後、受容体と標的をつなぐ細胞間伝達システムに干渉し、あるいは標的細胞に内分泌に関係する応答を誘起するならば、内分泌活性が強く示唆されるものと解釈される。適当な動物モデルによって内分泌系に関連する有害作用が更に示されるならば、この物質は ED であると判定しなければならない。

用語集

有害作用 Adverse effects

生体、個体群、または（下位）集団の形態、生理、成長、発達、生殖または寿命の変化であって、機能障害、ストレス補償能力の障害、あるいはその他の影響への感受性増大を生ずるもの。

IPCS

アンドロゲン Androgens

男性生殖器の発達を促進するステロイドホルモン。男女両性の性機能にも寄与する。

Endocrine Society

最終エンドポイント Apical endpoints

内分泌系のみ反応（ビテロゲニン誘導など内分泌系に依存する生理的变化を含む）でなく、生体全体としての応答（生殖能力、成長など）を記述し、生物学的適応度に関連を持つと考えられる *in vivo* 試験の結果。最終的な応答には内分泌系の変化によるものも、そうでないものもある（たとえば生殖能力は ED によっても非 ED によっても影響される可能性がある）。

OECD

臨界作用 Critical effect

作用因への曝露量を増加させたとき、最も敏感な種に最初に現れる有害作用またはその前兆。

EPA Glossary

曝露量・応答関係 Dose response relationship

生体系または（下位）集団に投与された、あるいは摂取または吸収された作用因の量と、

その影響によって惹き起こされた変化との関係。

IPCS

エキスパートシステム **Expert system**

専門家によって構築された規則のデータベース（4.2.2.6 項参照）。

EFSA

物質のグループ化とリードアクロス **Grouping of substances and read-across approach**

物理化学的・毒性学的・生態毒性学的性質が類似しているか、または規則的なパターンに従う物質群は 1 つのグループ、または「カテゴリー」に属すると見なすことができる。グループの概念を適用するには、物理化学的性質、ヒトへの健康影響、環境影響または環境風の運命がグループの標準物質のデータから内挿によって推定（リードアクロス）できなければならない。これが可能ならば、すべての物質をすべてのエンドポイントについて試験することは必要でなくなる。

JRC/IHCP

危険性 **Hazard**

生体、生態系または（下位）集団が曝露されたときに有害作用を及ぼす可能性のある、ある作用因または状況に固有の性質。

IPCS

危険性の特徴づけ **Hazard characterisation**

有害作用を及ぼす可能性のある作用因または状況に固有の性質の定性的および可能な限り定量的な記述。可能ならば曝露量・応答関係の評価およびそれに付随する不確実性を含めなければならない。危険性の特徴づけは危険性評価の第 2 段階であり、またリスク評価の 4 段階のうちの第 2 段階である。

IPCS

危険性の同定 **Hazard identification**

ある作用因が固有の性質として生体、個体群または（下位）集団に及ぼす有害作用の種類と本質の同定。危険性の同定は危険性評価の第 1 段階であり、またリスク評価の 4 段階のうちの第 1 段階である。

IPCS

ホルモン **Hormone**

ホルモンは内分泌腺で作られ、血流によって組織または器官に達する化学的伝達物質である。ホルモンは成長、代謝、性的機能、生殖、心的状態など様々のプロセスに影響する。

Endocrine Society

HTS

高スループットスクリーニング(**high-throughput screening, HTS**)は特に創薬に用いられる実験方法の一つであるが、生物学や化学にも関係する。HTS ではロボット技術、データ処理および制御ソフトウェア、液体取扱装置、高感度の検出器などを使用して数百万件の生化学的・遺伝学的または薬学的試験を高速で実行することができる。これにより特定の生体分子経路に対して調節活性のある化合物・抗体・遺伝子を迅速に同定できる。このような実験の結果は創薬において、また生物学における相互作用や特定の生化学過程の役割の理解において出発点となる。

JRC/IHCP

In silico 法 In silico methods

In silico は「コンピュータ上で、またはコンピュータ・シミュレーションにより実行される」ことを意味する。この語は生物学でそれぞれ生体内、生体外での実験を意味するラテン語 in vivo, in vitro に倣って 1989 年に造語された。

JRC/IHCP

無傷動物 Intact organism

In vitro システムに属さない、あるいは去勢や卵巣剔除を受けていない実験動物。

EPSA

In vitro 試験 In vitro assay

生きた動物全体を用いない試験。使用されるシステムとしては無処理の動物から得られた細胞株、細胞内標本などがある。

JRC/IHCP

In vivo 試験 In vivo assay

生きた動物全体を扱う試験。哺乳類試験では個体を、野生動物試験では動物集団を扱う。

JIRC/IHCP

(Endocrine) Modality (内分泌) モダリティ

モダリティとは内分泌系内における軸、経路、信号伝達過程、またはホルモン機構である。

EFSA

作用機序 Mode of Action

観察された効果に至る生物学的に妥当な主要事象の連鎖であって、ロバストな実験結果と機構的データに支持されるもの。作用機序は、主要な細胞学的・生化学的事象(すなわち測定可能であり、観察された効果を生ずるのに不可欠な事象)の論理的な記述である。

IPCS

無毒性量 No observed adverse effect level (NOAEL)

実験または観察により得られた、標的生物の形態、機能、成長、発達または寿命に、同じ種および系統の、同じ一定の制御された曝露を受けた正常な生物（対照）と区別し得るような影響を及ぼさない、最大の物質濃度または量。

IPCS

エストロゲン Oestrogens

主要な女性ホルモンとして働くステロイド化合物のグループ。雌性二次性徴の発達を促進し、月経周期を制御する。

Endocrine Society

(Q)SAR

化学物質の性質を分子構造から推定する方法。現行の実験法よりも少ない時間・コスト・実験動物で物質の危険性に関する情報が得られる可能性がある。

JRC/IHCP

リードアクロス Read-across

データの間隙を埋める手法の一つ。動詞としては、化学物質の特定の性質または効果（発癌性、生殖毒性など）に関する試験で得られたデータを未試験の類似化合物に適用することをいう。類似した化学物質をアナログ法（少数の物質に基づく）またはカテゴリー法（より多数の物質に基づく）でグループ化して評価するのに用いることが多い。アナログ法またはカテゴリー法では、すべての物質をすべてのエンドポイントについて試験する必要はない。

出典：EPA, Glossary of Terms, Methods of Toxicity Testing and Risk Assessment.

JRC/IHCP

リスク評価 Risk assessment

標的動物または（下位）集団に対するリスクを計算または推定すること。付随する不確実性の確認、特定作用因の特性や標的システムの特性を考慮した曝露の追跡を含む。リスク評価は危険性の同定、危険性の特性づけ（関連語：曝露量・応答評価）、曝露量評価、リスクの特徴づけの4段階から成る。リスク分析の第1段階である。

IPCS

リスク管理 Risk management

ある危険性に関して、関連するリスク評価情報に関わる政治的・社会的・経済的・技術的要因を考慮しつつ、その危険性に対する規制および規制以外の対策を策定・分析・比較し、適切な規制を選択・実施する意思決定の過程。リスク管理は、リスクの推定・排出および曝露の抑止、リスクの監視の3つの要素から成る。

IPCS

甲状腺ホルモン **Thyroid hormone**

甲状腺で作られる T3 (トリヨードチロニン) と T4 (チロキシン) を併せて甲状腺ホルモンと呼ぶ。T3 と T4 の細胞への影響は同一である。甲状腺ホルモンは心拍数、血圧、体温、体重に影響する。T3 と T4 はチログロブリンとして蓄積され、再び T3 と T4 に転換される。

National Cancer Institute dictionary

検証済み試験法 **Validated Assay**

検証実験が終了し、特定の目的への適合性 (正確度を含む) と信頼性が確立された試験法。検証済み試験法であっても、新たに提案された目的のためには正確度・信頼性が不十分と判断される場合があり得ることに注意が必要である(OECD, 2005a)。

OECD

証拠の重みづけ **Weight-of-evidence**

ある決定に関連があると考えられる証拠をすべて評価し重みづけする手法。

IPCS

野生動物 **Wild life**

標的でない種。規制されている製品の使用により駆除される野生生物 (すなわち標的種) を含まない。

EFSA

略語

A Apical (最終的な)

ADI Acceptable Daily Intake (容認 1 日摂取量)

ADME Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion (吸収・分布・代謝・排泄)

ANSES French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (フランス食品環境労働衛生安全庁)

AOP Adverse Outcome Pathway (有害転帰経路)

AR Androgen receptor (アンドロゲン受容体)

CF Conceptual Framework (概念フレームワーク)

CMR Carcinogenic, Mutagenic or toxic for Reproduction (発癌性、変異原性または生殖毒性)

DES Diethylstilbestrol (ジエチルスチルベストール)

DRP Detailed Review Paper (詳細総合報告)

EAS Endocrine active substance (内分泌活性物質)

EATS Oestrogen, androgen, thyroid or steroidogenic (エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺またはステロイド産生)

EC European Commission (欧州委員会)

ECETOC European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (欧州化学物質生態毒性および毒性センター)

ECHA European Chemical Agency (欧州化学機関)

ED Endocrine disruptor (内分泌攪乱物質)

EDTA Endocrine Disruptors Testing and Assessment (内分泌攪乱物質の試験と評価)

EDTA TF Endocrine Disruptors Testing and Assessment Task Force (内分泌攪乱物質試験・評価タスクフォース)

EEA European Environment Agency (欧州環境庁)

EMA European Medicines Agency (欧州医薬品庁)

ENVI Committee on the Environment, Public Health and Food Safety (European Parliament) (環境・公衆衛生・食品安全委員会) (欧州議会)

EP European Parliament (欧州議会)

EQSD Directive on Environmental Quality Standards (環境品質規格に関する指令)

ER Oestrogen receptor (エストロゲン受容体)

EU European Union (欧州連合)

FFLC Fish full life cycle (魚類全ライフサイクル)

FP Framework Programme (フレームワークプログラム)

GD Guidance document (ガイダンス文書)

HEAL Health and Environment Alliance, NGO (健康環境連合、NGO)

HPA Hypothalamus-pituitary-adrenocortical (視床下部・下垂体・副腎皮質)

HTS High Throughput Screening (高スループットスクリーニング)

IPCS International Programme on Chemical Safety (国際化学品安全プログラム)

JRC Joint Research Centre (共同研究センター)

M Mechanistic (機構的)

MCF-7 Michigan Cancer Foundation-7 (ミシガン州癌財団 7)

MG Multi-generation (多世代)

MMGT Medaka Multi-generation Test (メダカ多世代試験)

NMDRC Non-monotonic dose response curves (非単調曝露量・応答曲線)

NOAEL No Observed Adverse Effect Level (無毒性量)

NOEC No Observed Effect Concentration (無毒性濃度)

NRC National Research Council (米国学術研究会議)

NTP US National Toxicology Program (米国毒性学プログラム)

OECD Organisation for Economic Cooperation and Development (経済協力開発機構)

PAN Europe Pesticide Action Network Europe, NGO (欧州農薬行動ネットワーク、NGO)

PBT Persistent, Bioaccumulative and Toxic (残留性、生体蓄積性、毒性)

PPAR Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体)

PPP Plant Protection Products (植物保護製品)

(Q)SAR (Quantitative) Structure Activity Relationship ((定量的) 構造活性相関)

- RBA Relative binding affinity (相対的結合親和力)
- REACH Regulation on Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (化学物質登録評価許可規制)
- rtER rainbow trout oestrogen receptor (ニジマスエストロゲン受容体)
- SAAED State of the Art Assessment of Endocrine Disrupters (内分泌攪乱物質の現状評価)
- SAR Structure Activity Relationship (構造活性相関)
- SCCS Scientific Committee on Consumer Safety (消費者安全科学委員会)
- SCENIHR Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (新規の及び新たに特定された健康リスクに関する科学委員会)
- SCHER Scientific Committee on Health and Environmental Risks (健康および環境リスクに関する科学委員会)
- SPSF Special Programme for Food Security (食品安全特別プログラム)
- STOT-RE Specific Target Organ Toxicity-Repeated Exposure (特定標的器官への毒性一
反復曝露)
- STTA Stably Transfected Transcriptional Activation (安定導入転写活性)
- SVHC Substances of Very High Concern (高度に懸念される物質)
- TDI Tolerable Daily Intake (許容1日摂取量)
- TG test guidelines (テストガイドライン)
- TH Thyroid hormone (甲状腺ホルモン)
- ToR Terms of reference (委任事項)
- TR Thyroid receptor (甲状腺受容体)
- UNEP United Nations Environment Programme (国連環境プログラム)
- US EPA The United States Environmental Protection Agency (米国環境保護局)
- VMG-Mamm The OECD Validation Management Group for mammalian toxicity testing (哺乳類毒性試験のための OECD 検証管理グループ)
- VMG-eco The OECD Validation Management Group for ecotoxicology testing (生態毒性試験のための OECD 検証管理グループ)
- VMG-NA The OECD Validation Management Group on non-animal testing (非動物試験のための OECD 検証管理グループ)
- vPvB Very persistent and very bioaccumulative (高度残留性・高度生体蓄積性)
- WFD Water Framework Directive (水質フレームワーク指令)
- WHO World Health Organization (世界保健機構)
- WNT The OECD Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme (OECD テストガイドラインプログラム各国調整機関ワーキンググループ)
- WoE Weight-of-evidence (証拠の重みづけ)

脚注

¹ 欧州委員会の要請：諮問番号 EFSA-Q-2012-00760、2013年2月28日採択

² 学術委員会委員 : Jan Alexander, Diane Benford, Qasim Chaudhry, Anthony Hardy, Michael John Jeger, Robert Luttik, Ambroise Martin, Bernadette Ossendorp, Simon More, Alicja Mortensen, Birgit Noerrung, Joe Perry, Iona Pratt, John Sofos, Josef Schlatter, Kristen Sejrnsen. 連絡先 : scientific.committee@efsa.europa.eu

³ 謝辞 : 本成果物を準備した内分泌活性物質ワーキンググループ委員 Jan Alexander, Jacques Auger, Diane Benford, Susy Brescia, Gisela Degen, Anthony Hardy, Karen Ildico Hirsch-Ernst, Peter Hoet, Susanne Hougaard Bennekou, Robert Luttik, Peter Matthiessen, Wim Mennes, Peter Part, Daniel Pickford, Thomas Platzek, Josef Schlatter, Emanuela Testai, Theo Vermeire の各氏、欧州委員会および EU 諸機関の代表者 Gabriele Schoening, Niklas Andersson, Jean-Marc Vidal, Dorota Jarosinska, Sharon Munn, Daskaleros Panagiotis, Michael Walsh の各氏、意見陳述を行われた Susan Jobling, Trine Husøy 両氏、本資料の作成を支援された EFSA 職員 Bernard Bottex, Miriam Jacobs, Djien Liem, Reinhilde Schoonjans, Sarah Trattnig の各氏に謝意を表す。

⁴ 「内分泌攪乱物質とは、内分泌系の機能に変化を生じさせることによって、無傷生物、その子孫、または（下位）集団の健康に有害作用を及ぼす外因性物質または混合物である」 International Programme on Chemical Safety (IPCS). 2002. Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. WHO (World Health Organization), Geneva, Switzerland.

⁵

http://europa.eu/legislation_summaries/internal_market/single_market_for_goods/chemical_products/l21277_en.htm

⁶ Decision of the Executive Director concerning the selection of members of the Scientific Committee, Scientific Panels and external experts to assist EFSA with its scientific work (<http://www.efsa.europa.eu/en/keydocs/docs/expertselection.pdf> に掲載)

⁷ <http://www.efsa.europa.eu/en/sc/scwgs.htm> および <https://ess.efsa.europa.eu/doi/doiweb/wg/678310> を参照。

⁸ <http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/whatare.htm> を参照。

⁹ 「野生動物」という語はここでは標的以外の種のみを指し、規制された物質の適用により制御しようとする野生動物（すなわち標的となる種）を含まない。また本意見書における考察は他の動物集団（家畜、ペット等）には特に言及しないが、これらに対しても別の保護目標を考慮して同じ原則を適用することができる。

¹⁰

<http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/oecdconceptualframeworkforthetestingandassessmentofendocrinedisruptingchemicals.htm> を参照。

¹¹ 「国際的に標準化される」とは、検証され、OECD のテストガイドライン(TG)として使用することが承認され、データ相互受容(MAD)原則が適用されることを意味する。「検証」(validation)とは、試験法が所期の目的のために信頼性をもって利用でき、試験間・実験室間の比較に耐える信頼性ある結果が得られることを証明するための公的な手続きである (Hartung et al., 2004; OECD, 2005a)。検証されていない試験方法は直ちに無効とはされな

いが、実験室間の再現性などいくつかの要因に関して規制当局により信頼性がないと判断される可能性がある。

12 [http://www.oecd-ilibrary.org/content/package/chem_guide_pkg-en;
http://www.ehso.com/testmethodsdl.php](http://www.oecd-ilibrary.org/content/package/chem_guide_pkg-en;http://www.ehso.com/testmethodsdl.php)

13

http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/food-cons-prod/endocrine_disruptors/eas_data_base

14 生態毒性試験における NOEC は通常、哺乳類の試験における NOAEL と同様、有害作用が認められないにことをもって定義される。

15 ただし EFSA 学術コロキウム の 目的 は 科学的 探究 が まだ 完結 して いない 領域 で 様々な 見解 を 発表 する こと に ある 点 に 注意 され たい 。

16 リスク評価を行う範囲を示すパラメータを定めるため、リスク評価者とリスク管理者の間で問題設定のための討議が行われ、保護の目標の設定、有害作用の定義などが論題となる。これによってリスク評価者は、合意した保護の目標に関して、問題の物質の毒性学的リスクとその懸念レベルの特徴づけができるようになる。

17 付録 A1 の本文は EC の関連ウェブページから採ったものである。

18 http://ec.europa.eu/environment/endocrine/strategy/index_en.htm を参照。

19 http://cordis.europa.eu/fp7/home_en.html を参照。

20 http://ec.europa.eu/research/endocrine/index_en.html

21

http://www.europarl.europa.eu/meetdocs/2009_2014/documents/envi/pr/912/912390/912390en.pdf を参照。

22 <http://www.efsa.europa.eu/en/events/event/120614.htm>

23

http://www.mst.dk/English/Chemicals/endocrine_disruptors/danish_proposal_for_criteria_for_endocrine_disruptors_submitted_to_the_EU/ を参照。

24

http://www.bfr.bund.de/cm/343/regulatory_definition_of_an_endocrine_disrupter_in_relation_to_potential_threat_to_human_health.pdf を参照。

25 <http://www.anses.fr/Documents/DPR2012sa0033EN.pdf> を参照。

26

<http://www.mst.dk/NR/ronlyres/CDA4EB4F-1554-4754-A0F9-77D73BCA0228/0/SINreportandAnnex.pdf> を参照。

27 物質および混合物の分類・表示・放送に関する規制(EC) No 1272/2008

28 水質政策分野での優先物質リストを定め指令 2000/60/EC を改正する欧州議会および 2001 年 11 月 20 日委員会決議 No 2455/2001/EC

29

http://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/pri_substances.htm#dir_prior を参照。

(http://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/lib_pri_substances.htm#prop_2011_docs を参照)

³¹ OECD テストガイドライン 457:「エストロゲン受容体作動物質および拮抗物質の同定のための BG1Luc エストロゲン受容体トランス活性化試験法」2012年11月新規テストガイドライン追加