

ENV/JM/MONO(2010)3
Unclassified

English - Or. English

Unclassified (未分類)

ENV/JM/MONO(2010)3

Organisation de Coopération et de Développement Économiques
Organisation for Economic Co-operation and Development
経済協力開発機構

18-Jan-2010

English - Or. English

環境局
化学品委員会及び化学品・農薬・バイオテクノロジー作業部会合同会合

OECD加盟国における内分泌かく乱化学物質の試験、評価及び管理に関する
ワークショップ報告

試験と評価に関するシリーズ
Number 118
パート2 (この文書はPDFフォーマットでのみ入手可能)

22-24 September 2009, Copenhagen, Denmark

JT03277138

Document complet disponible sur OLIS dans son format d'origine
OLIS (On-Line Information System) 上でそのオリジナルの書式で全文書入手可能

OECD 環境、健康、及び安全に関する

試験と評価の出版シリーズ

No.118

OECD 加盟国における内分泌かく乱化学物質の
試験、評価及び管理に関するワークショップ報告

付属書1-10

パートⅡ

IOMC

INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF CHEMICALS

A cooperative agreement among FAO, ILO, UNEP, UNIDO, UNITAR, WHO and OECD

環境局
経済協力開発機構
パリ 2010

出版済みの試験と評価シリーズ:

- No. 1, *Guidance Document for the development of OECD Guidelines for Testing of chemicals (1993; reformatted 1995, revised 2006 and 2009)*
- No. 2, *Detailed Review Paper on Biodegradability Testing (1995)*
- No. 3, *Guidance Document for Aquatic Effects Assessment (1995)*
- No. 4, *Report of the OECD Workshop on Environmental Hazard/Risk Assessment (1995)*
- No. 5, *Report of the SETAC/OECD Workshop on Avian Toxicity Testing (1996)*
- No. 6, *Report of the Final Ring-test of the Daphnia Magna Reproduction Test (1997)*
- No. 7, *Guidance Document on Direct Phototransformation of chemicals in Water (1997)*
- No. 8, *Report of the OECD Workshop on Sharing Information about New Industrial Chemicals Assessment (1997)*
- No. 9, *Guidance Document for the Conduct of Studies of Occupational Exposure to Pesticides during Agricultural Application (1997)*
- No. 10, *Report of the OECD Workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data (1998)*
- No. 11, *Detailed Review Paper on Aquatic Testing Methods for Pesticides and industrial Chemicals (1998)*
- No. 12, *Detailed Review Document on Classification Systems for Germ cell Mutagenicity in OECD Member Countries (1998)*
- No. 13, *Detailed Review Document on Classification Systems for Sensitising Substances in OECD Member Countries (1998)*
- No. 14, *Detailed Review Document on Classification Systems for Eye Irritation/Corrosion in OECD Member Countries (1998)*
- No. 15, *Detailed Review Document on Classification Systems for Reproductive Toxicity in OECD Member Countries (1998)*
- No. 16, *Detailed Review Document on Classification Systems for Skin Irritation/Corrosion in OECD Member Countries (1998)*
- No. 17, *Environmental Exposure Assessment Strategies for Existing Industrial Chemicals in OECD Member Countries (1999)*

No. 18, *Report of the OECD Workshop on Improving the Use of Monitoring Data in the Exposure Assessment of Industrial Chemicals (2000)*

No. 19, *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals used in Safety Evaluation (1999)*

No. 20, *Revised Draft Guidance Document for Neurotoxicity Testing (2004)*

No. 21, *Detailed Review Paper: Appraisal of Test Methods for sex Hormone Disrupting Chemicals (2000)*

No. 22, *Guidance Document for the Performance of Out-door Monolith Lysimeter Studies (2000)*

No. 23, *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (2000)*

No. 24, *Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (2001)*

No. 25, *Detailed Review Document on Hazard Classification System for Specifics Target Organ Systemic Toxicity Repeated Exposure in OECD Member Countries (2001)*

No. 26, *Revised Analysis of Responses Received from Member Countries to the Questionnaire on Regulatory Acute Toxicity Data Needs (2001)*

No. 27, *Guidance Document on the Use of the Harmonised System for the Classification of Chemicals Which are Hazardous for the Aquatic Environment (2001)*

No. 28, *Guidance Document for the conduct of Skin Absorption Studies (2004)*

No. 29, *Guidance Document on Transformation/Dissolution of Metals and Metal Compounds in Aqueous Media (2001)*

No. 30, *Detailed Review Document On Hazard Classification Systems for Mixtures (2001)*

No. 31, *Detailed Review Paper on Non-Genotoxic Carcinogens Detection: The Performance of In-vitro Cell Transformation Assays (2007)*

No. 32, *Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Repeat-Dose Toxicity Studies (2000)*

No. 33, *Harmonised Integrated Classification System for Human*

Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures (2001)

No. 34, *Guidance Document on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of New and Updated Internationally Acceptable Test Methods in Hazard Assessment (2005)*

No. 35, *Guidance Notes for analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies (2002)*

No. 36, *Report of the OECD/UNEP Workshop on the use of Multimedia Models for estimating overall Environmental Persistence and long range Transport in the context of PBTS/POPS Assessment (2002)*

No. 37, *Detailed Review Document on Classification Systems for Substances Which Pose an Aspiration Hazard (2002)*

No. 38, *Detailed Background Review of the Uterotrophic Assay Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and validate the Uterotrophic Assay (2003)*

No. 39, *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing (2009)*

No. 40, *Detailed Review Document on Classification in OECD Member Countries of Substances and Mixtures Which Cause Respiratory Tract Irritation and Corrosion (2003)*

No. 41, *Detailed Review Document on Classification in OECD Member Countries of Substances and Mixtures which in Contact with Water Release Toxic Gases (2003)*

No. 42, *Guidance Document on Reporting Summary Information on Environmental, Occupational and Consumer Exposure (2003)*

No. 43, *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment (2008)*

No. 44, *Description of selected Key Generic Terms Used in Chemical Hazard/Risk Assessment (2003)*

No. 45, *Guidance Document on the Use of Multimedia Models for Estimating Overall Environmental Persistence and Long-range Transport (2004)*

No. 46, *Detailed Review Paper on Amphibian Metamorphosis Assay for the Detection of Thyroid Active Substances (2004)*

No. 47, *Detailed Review Paper on Fish Screening Assays for the Detection of Endocrine Active Substances (2004)*

No. 48, *New Chemical Assessment Comparisons and Implications for Work Sharing (2004)*

No. 49, *Report from the Expert Group on (Quantitative) Structure–Activity Relationships [(Q)SARs] on the Principles for the Validation of (Q)SARs (2004)*

No. 50, *Report of the OECD/IPCS Workshop on Toxicogenomics (2005)*

No. 51, *Approaches to Exposure Assessment in OECD Member Countries: Report from the Policy Dialogue on Exposure Assessment in June 2005 (2006)*

No. 52, *Comparison of emission estimation methods used in Pollutant Release and Transfer Registers (PRTRs) and Emission Scenario Documents (ESDs): Case study of pulp and Paper and textile sectors (2006)*

No. 53, *Guidance Document on Simulated Freshwater Lentic Field Tests (Outdoor Microcosms and Mesocosms) (2006)*

No. 54, *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (2006)*

No. 55, *Detailed Review Paper on Aquatic Arthropods in Life Cycle Toxicity Tests with an Emphasis on Developmental, Reproductive and Endocrine Disruptive Effects (2006)*

No. 56, *Guidance Document on the Breakdown of Organic Matter in Litter Bags (2006)*

No. 57, *Detailed Review Paper on Thyroid Hormone Disruption Assays (2006)*

No. 58, *Reprot on the Regulatory Uses and Applications in OECD Member Countries of (Quantitative) Structure–Activity Relationship [(Q)SAR] Models in the Assessment of New and Existing Chemicals (2006)*

No. 59, *Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats (2006)*

No. 60, *Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances (Phase 1A) (2006)*

No. 61, *Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the Detection of Thyroid Active Substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol (2007)*

- No. 62, *Final OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase-1, Androgenic Response to Testosterone Propionate, and Anti-Androgenic Effects of Flutamide (2006)*
- No. 63, *Guidance Document on the Definition of Residue (2006, revised 2009)*
- No. 64, *Guidance Document on Overview of Residue Chemistry Studies (2006, revised 2009)*
- No. 65, *OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay – Phase 1 (2006)*
- No. 66, *OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2. Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories (2006)*
- No. 67, *Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents (2007)*
- No. 68, *Summary Report of the Uterotrophic Bioassay Peer Review Panel, including Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the follow up of this report (2006)*
- No. 69, *Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models (2007)*
- No. 70, *Report on the Preparation of GHS Implementation by the OECD Countries (2007)*
- No. 71, *Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay – Procedure to Test for Antioestrogenicity (2007)*
- No. 72, *Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods (2007)*
- No. 73, *Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol (2007)*
- No. 74, *Detailed Review Paper for Avian Two-generation Toxicity Testing (2007)*
- No. 75, *Guidance Document on the Honey Bee (Apis MelliferaL.) Brood test Under Semi-field Conditions (2007)*
- No. 76, *Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the Detection of Thyroid Active Substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol (2007)*

No. 77, *Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 - Multi-chemical Interlaboratory Study (2007)*

No. 78, *Final Report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances (2007)*

No. 79, *Validation Report of the Full Life-cycle Test with the Harpacticoid Copepods *Nitocra Spinipes* and *Amphiascus Tenuiremis* and the Calanoid Copepod *Acartia Tonsa* - Phase 1 (2007)*

No. 80, *Guidance on Grouping of Chemicals (2007)*

No. 81, *Summary Report of the Validation Peer Review for the Updated Test Guideline 407, and Agreement of the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the follow-up of this report (2007)*

No. 82, *Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology (2007)*

No. 83, *Summary Report of the Peer Review Panel on the Stably Transfected Transcriptional Activation Assay for Detecting Estrogenic Activity of Chemicals, and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report (2007)*

No. 84, *Report on the Workshop on the Application of the GHS Classification Criteria to HPV Chemicals, 5-6 July Bern Switzerland (2007)*

No. 85, *Report of the Validation Peer Review for the Hershberger Bioassay, and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report (2007)*

No. 86, *Report of the OECD Validation of the Rodent Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 α -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories (2008)*

No. 87, *Report of the Ring Test and Statistical Analysis of Performance of the Guidance on Transformation/Dissolution of Metals and Metal Compounds in Aqueous Media (Transformation/Dissolution Protocol) (2008)*

No. 88, *Workshop on Integrated Approaches to Testing and Assessment (2008)*

No. 89, *Retrospective Performance Assessment of the Test Guideline 426 on Developmental Neurotoxicity (2008)*

- No. 90, *Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay (2008)*
- No. 91, *Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay (Phase 3) (2008)*
- No. 92, *Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-Up of this Report (2008)*
- No. 93, *Report of the Validation of an Enhancement of OECD TG 211: Daphnia Magna Reproduction Test (2008)*
- No. 94, *Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report (2008)*
- No. 95, *Detailed Review Paper on Fish Life-Cycle Tests (2008)*
- No. 96, *Guidance Document on Magnitude of Pesticide Residues in Processed Commodities (2008)*
- No. 97, *Detailed Review Paper on the use of Metabolising Systems for In Vitro Testing of Endocrine Disruptors (2008)*
- No. 98, *Considerations Regarding Applicability of the Guidance on Transformation/Dissolution of Metals Compounds in Aqueous Media (Transformation/Dissolution Protocol) (2008)*
- No. 99, *Comparison between OECD Test Guidelines and ISO Standards in the Areas of Ecotoxicology and Health Effects (2008)*
- No. 100, *Report of the Second Survey on Available Omics Tools (2009)*
- No. 101, *Report on the Workshop on Structural Alerts for the OECD (Q)SAR Application Toolbox (2009)*
- No. 102, *Guidance Document for using the OECD (Q)SAR Application Toolbox to Develop Chemical Categories According to the OECD Guidance on Grouping of Chemicals (2009)*
- No. 103, *Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays (2009)*
- No. 104, *Performance Assessment: Comparison of 403 and CxT Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets (2009)*
- No. 105, *Report on Biostatistical Performance Assessment of the draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity (2009)*

No. 106, *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents*

No. 107, *Preservative treated wood to the environment for wood held in storage after treatment and for wooden commodities that are not cover and are not in contact with ground. (2009)*

No. 108, *Report of the validation of the Hershberger Bioassay (weanling model) (2009)*

No. 109, *Literature review on the 21-Day Fish Assay and the Fish Short-Term Reproduction Assay (2009)*

No. 110, *Report of the validation peer review for the weanling Hershberger Bioassay and agreement of the working of national coordinators of the test guidelines programme on the follow-up of this report (2009)*

No. 111, *Report of the Expert Consultation to Evaluate an Estrogen Receptor Binding Affinity Model for Hazard Identification (2009)*

No. 112, *The 2007 OECD List of High Production Volume Chemicals (2009)*

No. 115, *Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in Rats: A Short-term Screening Assay for (Anti) Androgenic Properties (2009)*

No. 118, *Workshop Report on OECD Countries Activities Regarding Testing, Assessment and Management of Endocrine Disrupters Part 1*

© OECD 2010

Applications for permission to reproduce or translate all or part of this material should be made to: Head of Publications Service, OECD, 2 rue André-Pascal, 75775 Paris Cedex 16, France

OECDについて

経済協力開発機構（OECD）は、北アメリカ、ヨーロッパ及びアジア太平洋地域の30の工業国と、欧州委員会の代表が、政策方針を調整し、整合させるために会合し、相互に懸念のある問題を議論し、国際問題に対応するために共同して働く政府間の組織である。OECDの仕事のほとんどは、加盟国代表から構成されている200を超える専門化した委員会とワーキンググループによって実行される。OECDの特別な資格を持ついくつかの国と、関与している国際機関からのオブザーバーが、多くのOECDのワークショップとその他のミーティングに出席している。委員会とワーキンググループは、フランスのバリに置かれ、理事会と各部門で構成されるOECD事務局によってサービスが提供される。

環境、健康、及び安全部門は10の異なるシリーズにおいて無料の文書を出版している：

試験と評価（Testing and Assessment）；

優良試験所基準とコンプライアンスの監視（Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring）；

農薬と殺生物剤（Pesticides and Biocides）；

リスク管理（Risk Management）；

バイオテクノロジーにおける規制監督の整合（Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology）；

新しい食物及び供給の安全性（Safety of Novel Foods and Feeds）；

化学事故（Chemical Accidents）；

環境汚染物質排出と移動登録（Pollutant Release and Transfer Registers）；

排出シナリオ文書（Emission Scenario Documents）；

製造されたナノマテリアルの安全性（the Safety of Manufactured Nanomaterials）。

環境、健康、及び安全のプログラムとEHS出版物についてのより多くの情報はOECDのワールドワイドウェブサイト(<http://www.oecd.org/ehs/>) 上で入手可能である。

この出版物はIOMCの一環として出版された。内容は必ずしも個々のIOMC参加組織の見解や方針を反映するものではない。

化学物質の適正管理のための国際機関間プログラム(IOMC)は、化学の安全の分野で国際的な協力を強め、統合を進めるために1992年の国連環境開発会議の勧告に従って1995年に設立された。参加組織はFAO、ILO、OECD、UNEP、国連工業開発機構、UNITAR、及びWHOである。世界銀行とUNDPはオブザーバーである。IOMCの目的は、人の健康と環境に関連して化学薬品の健全な管理を達成するために、共に又は個別に、参加組織によって実行された方針と活動の調整を促進することである。

この出版物は無料で電子的に入手可能です。

この出版物と多くの他の環境、健康、及び安全の出版物については、OECDの
ワールドワイドウェブサイト(www.oecd.org/ehs/)を参照してください。

又は、次が連絡先となります:

OECD Environment Directorate,
Environment, Health and Safety Division

2 rue André-Pascal
75775 Paris Cedex 16
France

Fax: (33-1) 44 30 61 80

E-mail: ehscont@oecd.org

はじめに

この文書には、試験(テスト)、評価(アセスメント)、及び管理についてのOECD加盟国活動についてのワークショップレポート(分科会報告)への付属書1-10が含まれる。付属書1-9は、各国/地域と利害関係団体の代表者からワークショップのために提供された、ケーススタディレポートの取組である。付属書10には、各国/地域と利害関係団体の代表者によるワークショップで実施されたプレゼンテーション(発表、提案)が含まれる。

更なる詳細についての連絡先:

Environment, Health and Safety Division

Environment Directorate

Organisation for Economic Co-Operation and Development

2, rue André Pascal

75775 Paris Cedex 16, France

Tel : 33-1-45-24-16-74

E.mail : env.edcontact@oecd.org

目 次

	ページ
付属書1 - デンマークにおける取組	16
付属書2 - 欧州委員会における取組	39
付属書3 - フランスにおける取組	66
付属書4 - ドイツにおける取組	70
付属書5 - 日本における取組	89
付属書6 - 韓国における取組	94
付属書7 - イギリスにおける取組	113
付属書8 - 米国における取組	117
付属書9 - BIAC (ビジネスと工業諮問委員会)における取組	154
付属書10 - ワークショップにおける各国/地域及び利害関係団体の 代表者によってなされたプレゼンテーション	192

付属書1
デンマークにおける取組

内分泌かく乱物質に関するOECDケーススタディドキュメント

デンマークの取組

1. 経緯

2008年5月、OECDからの手紙がTG(WNT)の国家コーディネータ作業部会、及び内分泌かく乱物質試験評価報告グループ(EDTA AG)に送られ、“OECD加盟国での内分泌かく乱物質評価に関する報告書”の作成につながる“ケーススタディ”ドキュメントの開発についての取組が要求された。

デンマークはこの書類により、異なる幾つかの政府プログラムの概観と、記載されている様々な行動計画の詳細を、可能な限りコンセプチュアルフレームワークのレベルに従って提供することにより、その取組を提出するものである。

2. イントロダクション

ここ15年間、デンマークにおいて内分泌かく乱物質について関心が高まっている。90年代初めに、いくつかの工業用化学薬品が本質的なエストロゲン化合物の作用をまねることができることが注目された。1993年デンマーク人の科学者、Niels Erik Skakkebaek はRichard Sharpeと協力して“エストロゲン仮説”を提唱し、増加するヒト男性の生殖系の異常が子宮内でのエストロゲン化合物の暴露に関係しており、これは工業用化学薬品の暴露の結果である[1]と論じている。その後数年の間に、いくつかの化学物質が数個の本質的なホルモン系と干渉し、内分泌システム全体に影響し得ることが判明し、これらの特性を持つ化学物質は内分泌かく乱物質と命名された。デンマークにおいては“エストロゲン仮説”が提唱されて以来、内分泌かく乱物質は政治課題となっている。内分泌かく乱物質問題に対するたゆまぬ政治的な視点は、研究支援を含むいくつかの政策的な支援に繋がっている。

3. 政府のプログラム

エストロゲン仮説の提唱の後の激しい公の議論へのフォローアップとして、デンマーク環境保護庁(DK EPA)は1995年に男性の生殖の異常及びエストロゲン作用を持つ環境化学物質に関する現在の知見をまとめた報告書を発表した[38]。

1996年、DK EPAは“エストロゲンホルモンのような作用を持つ化学物質”に関する状況をまとめた[14]。

1997-2000年、戦略的環境研究のためのデンマークの協議会は“ホルモン擬似物質”プログラムの下に8プロジェクトを支援した。

1996-2000年、エストロゲン物質研究センターが、デンマークの7つの省によって共同出資された戦略的環境研究プログラムの下に設立された。

人の健康と環境のための戦略(2003)

2003年、デンマーク政府は人の健康への否定的環境作用を防ぎかつ制限する目標と行動計画を設定するこの戦略を発表した。健康と環境のための省庁間ワーキンググループが形成され、10の対象分野が指摘された。1つの焦点は内分泌かく乱物質に関する努力を強化するべきというものであった[18]。

内分泌かく乱化学物質(EDC)に関する作業のためのデンマークの国家戦略

内分泌かく乱化学物質問題を管理するための科学的根拠を強化する作業に国家予算として特別な交付金
が提供された。2002年、EDCに関する作業のためのデンマークの国家戦略に関する最初のレポートが議会
に提示され、作業の現況が2003年、2004年、及び2007年に報告された[2]。活動は3面攻撃戦略に従って優
先順位を定められ、優先する活動は1999年以来の内分泌かく乱化学物質に対するEU戦略に沿っている。

3つの焦点分野は以下の通りである。

- 1) 知識構築と試験法の開発
- 2) 原因と影響の調査及び予防努力
- 3) 規制

リソースを最も効率的に使用するため、戦略はできるだけすべての活動を結合、調整して、その結果、相乗
効果を得るものである。この戦略の下でプロジェクトにかかわる科学者達は内分泌かく乱化学物質ネットワ
ークを組織して1年に二度、作業の進展をデンマークEPAに報告会を行う。異なる生物種(魚類、ネズミ、ハツ
カネズミ、及びヒト)における内分泌かく乱化学物質に関係する管理者、毒性学研究者、環境毒性学研究者、
内分泌学研究者、小児科医、疫学者相互での研究の進捗に関する非公式討議は、科学的観点と規制の観
点から非常に実り多いものとなった。これらのミーティングで野生生物とヒトにおける個々のEDCの暴露につ
いて可能性のある原因と影響に関する新しい証拠が討議されているだけでなく、OECD TGP及びEDTAに
おけるテストガイドラインの開発、EDCへの複合暴露の影響、EDCに関する暴露分析などの問題に関してか
なりの討議が行われる¹。

戦略的研究 2003-2005

デンマークの政府は2003年に内分泌かく乱物質の領域で強力な研究支援を開始した。この研究支援は
2003-2005年に、科学技術革新省によって運営される数々の研究計画を支援した。研究計画のテーマは：
乳がん、男性生殖器疾患と精液品質の低下、思春期分化のパターン、化学物質の影響、新生児の生殖器
の奇形、そして環境とヒトにおける内分泌かく乱物質の影響である¹。

農薬研究プログラム

農薬の管理のための確固たる科学的根拠を確保する目的で、農薬調査のための政府のプログラムはここ20
年間進行している。農薬の内分泌かく乱に関連するいくつかのプロジェクトがここ数年間にわたり実行されて
いる²。

北欧の協力、Nord-Utte

1994年、北欧閣僚会議の後援のもと北欧化学物質グループの下に、試験法開発のための北欧グループ
(Nord-Utte)が設立された。スウェーデン、ノルウェー、フィンランド、及びデンマークの環境保護団体からの
代表が作業に参加している。Nord-Utteは北欧諸国における化学物質試験に関する科学的及び規制上の
作業を統合することを目的としている。OECDテストガイドラインプログラムへの取組を超えて、Nord-Utteは
試験法の開発にかかわるネットワークミーティングと支援プロジェクトを構成している。グループの主な優先
事項の1つは内分泌かく乱物質検出のための試験法の開発である[17]¹。

EUの協力

内分泌かく乱物質に関するヨーロッパ戦略の短期的活動の1つは、内分泌かく乱におけるそれらの役割の更なる評価のための優先物質リストの確立である。DK EPAは、潜在的内分泌かく乱作用を有する物質のEU優先物質リストのための、新しいデータが利用可能であるときの物質の包含と除外を含む、ダイナミックな過程を確実にするための提案を準備した。提案は2003年10月に欧州連合関係者のミーティングで提示された。

内分泌かく乱物質のためのセンター

デンマーク内分泌かく乱物質センターは2008年の国家予算の折衝の結果として設置されている。センターはセンターの管理と研究プロジェクトのコーディネーションを要請するEUの申し出に従って2008年12月1日に開設された。センターは当局の予防作業に焦点を合わせながら、科学者と知識構築に係わる関連団体のネットワークとして形成され、正式なセンター管理のもとコペンハーゲン大学病院の成長生殖部門に置かれた。

4. 内分泌かく乱物質の試験と評価のためのOECDコンセプチュアルフレームワークに関連したデンマークの研究支援

化学物質規制上、内分泌かく乱物質の評価のための基準は適切な試験法の欠如のためまだ確立されていない。従って、国家戦略における焦点分野の1つは試験法の開発である。試験法が開発されるまで、内分泌かく乱物質はケースバイケースで特定されるため、この作業では予備的な徴候に基づいた決定が必要である。上記の戦略と活動は内分泌かく乱物質の識別と予防手段に関連した多くの行動計画とプロジェクトをもたらした。現在までは、これらの活動が主に知識構築に集中してきたが、有害な影響に関する更に多くの証拠が得られるに従って、作業は規制上の支援に転向しつつある。以下、これらの活動を国家戦略に沿って記述し、可能な限りOECDコンセプチュアルフレームワークにおける5つのレベルに従って説明する。

一般的な観点から、内分泌かく乱物質の試験と評価のためのOECDコンセプチュアルフレームワークは毒物学的な作用の試験に関して、環境毒性作用の試験とは異なった使用が可能であることを強調することが重要である。環境毒性試験の使用は生態系レベルにおける保護(すなわち、魚類集団の保護)を目的とするのに対して、毒物学的な試験はただ一つの種(ヒト)の保護を目的とするため、原則として、環境毒性作用の試験と毒物学的な作用の試験法は異なる保護目的との個別の関連で設計される。

レベル1 – 既存の情報に基づく区分けと優先度付与

知識構築と試験法の開発:

省庁間のネットワーク

2007年、内分泌かく乱物質に関する各省の作業を調整するために、関係省庁間の内分泌かく乱物質ネットワークが設立された。環境省は内分泌かく乱物質に関する国家戦略に責任があるため、ネットワークの1つの重要な任務はその知識と新しいデータが確実に伝えられ、当局間で共有され、そして適切な予防策が取られることを確実にし、更に即時の行動が必要な場合に備えて、省庁間の警告システムを設定することである。ネットワークは環境省、食料省、農業省、漁業省、保健省、雇用省、及び科学技術革新省から成る¹。

ワークショップ

この数年の間に、内分泌かく乱物質とそれらの影響に焦点を置く多くのワークショップが、環境・健康・予防各省の共催により開催された。2002年8月、睾丸がんに関する3日間の国際的なワークショップが開かれた。更に両省は“内分泌かく乱物質に関するコペンハーゲンワークショップ”と題する幾つかの3日間の国際会議に資金を供給した。2002年12月、第2回：“生殖の失敗と悪影響に関する混合暴露の考えられる役割”、2004年1月、第3回：“環境、生殖に関する健康、及び繁殖力”、2007年5月、第4回：“内分泌かく乱物質と民生用製品：人類への起こりえる影響”、第5回：“遍在する内分泌かく乱物質と起こりえる人間の健康への影響”を2009年5月に開催した。そして2006年12月に1日の国家的ワークショップ：“EDC遠い道のり”、2008年5月に国家のワークショップ：“内分泌かく乱に関する最近の研究について”、そして、2008年12月に内分泌かく乱物質に関する新しいデンマークのデータに焦点を合わせた半日のワークショップが開催された¹。

レソルシノールと4-ニトロトルエンの物質フローの分析

作業の第1段階における、内分泌かく乱物質の役割の更なる評価のためのEU優先物質リストの確立とその公表の後、リスト上の2つの物質すなわちレソルシノールと4-ニトロトルエンについて、消費者暴露に関するリスクがないか調査するために物質フロー分析が行われた。分析は可能な代替物質の調査と、環境と健康に対する影響の選別を含んでいた。4-ニトロトルエンについては消費者あるいは環境のいずれの暴露も認められなかった。レソルシノールに関しては、毛髪染色剤における使用に潜在的な問題が多いことがわかり、毛髪染色剤にこの物質を使用することについての今後の評価に対する情報として、報告は欧州委員会に提出された[4, 5]³。

農薬中の内分泌かく乱性を有する22の有効成分を、農薬以外の製品に使用することに関する調査

潜在的EDCに関するEU優先リスト確立作業の最初のステップの公表に対する他のフォローアップとして、農薬として使用され、かつ優先物質リストに含まれる22の有効成分が農薬以外の化学製品の中で使用されているか否かを調査した。デンマークにおいては農薬以外の化学製品にこれらの物質が広く使用されてはいなかった。これらの物質の他の用途への使用は既に規制されるか、又は成分として非常に少ない量で使用されていた[13]²。

原因と影響の調査及び予防努力:

淡水魚における内分泌かく乱の調査

2001年、デンマークの水路において淡水魚の内分泌かく乱が観測された[3]。これらの発見はその原因と範囲の調査を目的とする一連のプロジェクトの設立をもたらした[10]、[11]、[12]、[24]、[25]。これらの研究に基づいて、淡水魚に観測された内分泌かく乱は合成エストロゲン又はエストロゲン様物質ではなく、天然エストロゲンの暴露が原因である可能性が最も高いと結論づけられた。更に、デンマークの大部分の廃水は充分に処理され、環境に放出されるエストロゲンの量は重大性の少ないレベルまで減少していると結論づけられた。プロジェクトは、農場において下肥が肥料として使われるとき環境に放出されるエストロゲンの重要性を研究することを目的とする、より研究指向の活動に続いた⁴。

若いデンマーク人男性の精液の質の監視

若い健康なデンマーク人男性の精液の質の監視は1996年に開始され、2001年以来、プロジェクトはデンマークのEPAと保健省によって支援されている。調査は、コペンハーゲンに住む若いデンマーク人の精液の品質が、例えばフィンランドなど同様の国に比べると、比較的低いことが示された。研究活動は地理的な差異の理由にも焦点を合わせている¹。

民生用製品中の化学物質の調査

2001年以来、デンマークのEPAは消費者が民生用製品中の化学物質にさらされることについて調査している。調査は主におもちゃ、化粧品、宝石類、家具、家庭用化学品、及び趣味製品の中の化学物質を含んでいたが、医薬品、医療用具、食料、及び食物に接触している製品は含まれていない。主に感受性、発がん性、難分解性、生物濃縮性又は毒性ある化学物質に焦点が当てられたが、内分泌かく乱作用のある物質も調査された。内分泌かく乱物質への暴露の調査の例は：“PVC製品中のフタレート”、“民生用製品のTBTとDBT”、及び“2000年と2001年のデンマークにおけるPVCとフタル酸塩の使用”である。更に、2歳の幼児の化学物質への暴露の調査が進行中であり、結果は2009年に発表されるであろう。このプロジェクトは特に内分泌かく乱物質と感受性物質に焦点を合わせている³。

規制:

更なる評価のためのEU優先物質リストへの助言

デンマークのEPAはEU委員会に対し、EU優先物質リストに、内分泌かく乱の役割の更なる評価のため、パラベンを含むように要求し、引き続きリスト更新の重要性を指摘している。(数種類の化学物質の規制)

REACHへの貢献

REACHプロセスにおいてデンマークは最良の可能な方法で内分泌かく乱物質をREACH規制に含めるように働いた。REACHプロセスへの貢献の1つが、OECDコンセプチュアルフレームワークを、どのように内分泌かく乱物質の規制に使用可能にするかに関する北欧の討議紙であった。以下にレベル3として記す。最終的なREACHテキストでは、内分泌かく乱物質はケースバイケースの評価による認可手順で扱われている。これは、ある物質が悪影響をもたらす内分泌かく乱特性を持つと証明される場合、その物質を一般に禁止することができるが、安全な使用を文書化できれば、ある用途への使用は承認され得ることを意味している。(数種類の化学物質の規制)

望ましくない物質の国家リスト

1998年に、デンマークのEPAは望ましくない物質の勧告リストを発表した。それは当局が将来、使用を制限するか完全に禁止することに関心を示した26の物質を優先させた。このリストは、先を見越して、自発的に望ましくない物質を段階的に廃止することを望む会社への指導書として役立つ。リストは3回、最も新しくは2004年に更新された。2004年、EU優先物質リスト上の未だ規制の対象でないか、又は植物防疫製品[6]の認可システムに含まれていないカテゴリ1物質が、更なる評価のため、望ましくない物質の勧告リストに含まれた。2008年、EU優先物質リスト上のすべてのカテゴリ1物質が、2009年に改訂される予定の望ましくない物質のリストに含まれるであろうと発表された。(数種類の化学物質の規制)

内分泌かく乱化合物の国際規制

多数の内分泌かく乱化合物は一地域的にもグローバルにも一国際的な規制の対象である。例として、ある種の臭素化難燃剤(EU)、有機スズ化合物(EU、国際海事機関)、ノニルフェノールとノニルフェノールエトキシレート(EU)、及びPCB、DDT、ダイオキシン、フランのような永続性有機汚染物質(EUとストックホルムコンベンション)がある。これらの物質については、OECDコンセプチュアルフレームワークのいずれかの段階における情報を規制の根拠とみなすことはできない。その上、これらの規制は、化学物質の内分泌かく乱性以外の、固有の有害性によるものである。(いくつかの種類の化学物質の規制)

消費者に対する指導

考えるべきこと - 内分泌かく乱物質に関する事実

2002年、デンマーク食料管理局、デンマークEPA及び国家衛生局の協力で“Stof til eftertanke, fakta om hormonforstyrrende stoffer”(英語で: “Food for thought . facts about endocrine disrupting substances”、日本語で: “考えるべきこと - 内分泌かく乱物質に関する事実”、デンマーク語のみ存在)が発行された。この小冊子で、内分泌かく乱物質に関して、それがどのような影響を及ぼし、どのように、どこで我々がそれらにさらされ得るかを知ることができる。それは、すべてのデンマークの消費者を対象としているが特に妊婦と小さい子供を持つ親に焦点をあてている [7]。(主に既存の工業化学物質に関連する指導)

妊婦と乳母のための正しい化学 - 9つの良い習慣

2006年9月、環境省はキャンペーン“妊婦と乳母のための正しい化学 - 9つの良い習慣”を開始した。キャンペーンは母と乳児が化粧品、おもちゃ、及び乳児用製品の中の内分泌かく乱物質を含む化学物質にさらされる機会を減らす9つの簡単な方法を示している。キャンペーンは助産婦、医師、及び看護婦のネットワークによるネットワークキャンペーンであり、彼らは資料を配布し、妊婦や乳母、新しい両親との対話にそれを使用した。キャンペーンは大成功であった。評価は、対象グループの回答者の2/3がキャンペーンを知っており、これらの2/3は新しい知識を得たことを示している。キャンペーンを知っていた回答者の50パーセントが良く指導に従い、30-35%はキャンペーンの結果、彼らの習慣を変えた[8、9]。(主に既存の工業化学物質に関連する指導)

自発的合意

- 洗剤及び洗浄剤中のノニルフェノール-エトキシレートの代替品に関するデンマークEPAと商業組織SPT(石鹸、香水、及び技術的化学品)の間の1987年以来的自発的な合意。(既存の工業用化学物質のための自発的プログラム)
- 農薬組成中のエストロゲン様添加物の除外に関するデンマークのEPAと”Dansk Plantevarn”(デンマークの農薬製造者と輸入業者の組合)の間の1995年からの自発的な合意。(農薬のための自発的プログラム)

レベル2: 内分泌メカニズムに関するデータを提供するin vitro試験法

知識構築と試験法の開発:

内分泌かく乱作用に関するコンピューターモデル((Q)SARs)の開発

国立食糧研究所の(Q)SAR-グループはin vitro試験法における内分泌かく乱作用に関する3つのコンピューターモデル((Q)SARs)を開発した。

1) エストロゲン α 受容体結合(in vitro)。トレーニングセットはMETI(日本)からのデータを使用。595の化学物質に関するデータがトレーニングセットを構成する - およそ4万7000のEINECS物質の中のこのモデルの適用範囲は52%であった。((Q)SAR)モデルに対するクロスバリデーションの結果は、感度、特異性、及び調和度がそれぞれ77%、83%、87%であることを示した。実験方法としては、病原性大腸菌から生産されたヒトのエストロゲン受容体を使用された。参照ホルモンとしてのRIラベル付エストロゲンがヒトのエストロゲン受容体に結合するシステムに、化学物質が添加される。参照ホルモンの受容体結合の50%を抑制する化学物質濃度が測定されてIC₅₀と定義された。評価単位として、自然ホルモンのIC₅₀濃度を100にセットしたときの、化学物質と自然のホルモン(E2など)のIC₅₀値間のRBA(相対結合親和性)が使用された[41-43, 45]。

2) エストロゲンレポーター遺伝子(in vitro)。トレーニングセットはMETI(日本)から得られた。481の化学物質のデータがトレーニングセットを構成する - およそ4万7000のEINECS物質の中でこのモデルのドメインは61%であった。(Q)SAR-モデルに対するクロスバリデーションの結果は、感度、特異性、及び調和度がそれぞれ46%、95%、81%であることを示した。実験方法として、化学物質のエストロゲン作用は、取り入れられたMCF-7セルの中で合成エストロゲン2Eによって引き起こされた発光応答の増加として測定された。評価単位として、発光応答の増加が活性/非活性の交差点として使用された。この試験法はエストロゲン受容体結合と受容体のトランス活性化、及びそれに続くエストロゲン依存遺伝子発現に影響する化学物質を特定する[41-43, 45]。

3) アンドロゲン受容体拮抗作用(in vitro)。トレーニングセットは自己の実験的な試験データと文献からのデータを含んでいる。523の化学物質に関するデータがトレーニングセットを構成する - およそ4万7000のEINECS物質中でこのモデルの適用範囲は56%であった。(Q)SAR-モデルに対するクロスバリデーションの結果は、感度、特異性、及び調和度がそれぞれ64%、84%、76%であることを示した。実験方法として、化学物質のアンドロゲン受容体拮抗作用は、培養ハムスター卵巣(CHO)細胞を用いて、合成アンドロゲンR1881によって引き起こされた発光応答の抑制として測定された。評価単位として、活性/比活性の交点を発光応答の抑制値として使用した。活性は、アンドロゲン受容体結合による受容体転写活性による遺伝子発現の阻害を酵素反応によって視覚化して観察した[43-45]。

in vitroステロイド合成試験(H295R)のOECD検証試験への参加 (H295R)

いくつかの化合物が、直接ホルモン擬態として機能しないで、ステロイド・ホルモン生産か又は破壊を調節して、内分泌かく乱を引き起こす。H295R細胞系はヒトの女性に、プロゲステロン、アンドロゲン、エストロゲン、糖コルチコイド、及び鉱物コルチコイドを含む多くのステロイド・ホルモンの作り出す副腎皮質がんであり、重要なステロイド産生酵素(CYP11A、CYP11B、CYP17、CYP19、CYP21)の大部分を表現するものである。国立食糧研究所はステロイド合成に影響を及ぼす物質の検出を目的とするこの試験法の予備認証と認証の2ラウンドに参加した。結果は絶対ホルモンレベルが異なるかもしれないが、相対的な用量応答プロフィールは複数の実験室で試験されたすべてのモデル化合物において類似していることと、試験法が強、中、弱の誘導因子と、TとE2生成の阻害物質そして否定的応答を識別することができること、H295Rステロイド合成酵素はステロイド生成を変える潜在性のゆえ、化学物質の迅速、経済的、そして、費用効率がよいスクリーンであることを示した。かくして、この試験法に関する作業は“OECDテストガイドラインプログラム”において、この方法のテストガイドラインの開発と採用に向かって重要な幾つかの進歩を遂げた。このプロジェクトはデンマークのEPAと北欧の協力Nord-Uttelによって支援された [17]。

甲状腺受容体への影響を仕分けるin vitro試験法の開発(T-スクリーン試験法)

T-スクリーン試験法は国立食糧研究所で確立され、多くの化学物質が、ネズミ科GH3細胞の増殖への影響がないかどうか試験された。最近の経験はこの分析評価における陽性化学物質の識別の困難を示しており、この分析評価の今後の規制上の使用は限定的と思われる。

アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験法の開発(AR-試験法)

アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験法は、国立食糧研究所で確立され、抗アンドロゲン活性の検出に大きな成功を収めた。このin vitroの試験法で発見された潜在抗アンドロゲンの多くが、後にin vivoの抗アンドロゲンであることが示された¹。

in vitroの試験法に新陳代謝を含める方法の開発

国立食糧研究所は一般的に使用されるin vitro試験法の代謝能、及び外部代謝の細胞系試験法への組み入れに関する研究と開発を始めた¹。

規制:

内分泌かく乱特性を有する物質の規制のための根拠としての、内分泌かく乱物質の試験と評価のためのOECDコンセプチュアルフレームワーク

デンマークは、内分泌かく乱物質の規制に、どのようにOECDコンセプチュアルフレームワークが使用できるかを調査するこの北欧(Nord-Utte)プロジェクトを開始しリードした。OECDコンセプチュアルフレームワークの異なったレベルでの試験結果を使用することの是非と、どのように使用するか多くの提案とともに、内分泌かく乱作用を評価するために、どのように既存のテストガイドラインを強化するか多くの提案が提出された[15]。結果は2005年1月にEDTA8で提示された。OECDコンセプチュアルフレームワークのレベル2ないし5における試験結果をEUにおける規制の手段として使用するための具体的な提案は報告に示されているが、各レベルからの試験結果の規制上の使用に関する結論について、以下に各レベルごとに示す。

レベル2の試験の規制目的の使用に関する結論は以下の通りであった。すなわち“in vitro試験結果の陽性は、潜在的ED活性とin vivoのED作用の可能性を示す。in vitroのデータは更なるin vivo研究のデザインに有用なメカニズムに関するデータを提供することができる。in vitro試験は、試験の多くがヒトのホルモン受容体に基づくので、人体内の作用に相当する。従って、これらの受容体に結合する化学物質はin vivoの研究とヒトの生殖機能に影響をもたらす可能性がある。in vitro試験結果の陰性は、毒物を代謝的に活性化することができない、あるいは活性化する能力が不明であるなどの制約のために、また、EDC活性はin vitro試験システムで試験される以外のメカニズムを通して起こることがあるので、潜在的EDC活性を排除することはできない。EDC活性と生殖毒性作用の(Q)SARモデルは開発途上にあるが、現在は優先度設定とリスク評価への使用は未定である”。(数種類の化学物質の規制)

レベル3 – 単一の内分泌メカニズムと作用に関するデータを提供するin Vivo試験法

知識構築と試験法の開発:

– 子宮肥大試験法の開発への参加

子宮肥大試験法は内因性の雌性ホルモンのように振る舞う、又はこれと干渉する可能性を持っている化学物質の検出のためのin vivo試験法である。国立食糧研究所は1999-01(フェーズ1)に子宮肥大試験法の認証のための初期の作業に、2000-2(フェーズ2)に弱いエストロゲンと負の制御を用いることの認証、そして2003-7に作業の進捗とOECDテストガイドラインのドラフトについてのOECD討議に参加した。この作業はデンマークのEPAによって支援された¹。

ハーシュバーガー試験法開発への参加

2000-2001年、国立食糧研究所は、ハーシュバーガー試験法の認証の三つのすべての局面に参加した。そこでは2つの強力な化学物質すなわち、AR-アゴニストのプロピオン酸テストステロンとAR-アンタゴニストのフルタミドが試験された。2002-3年には、同研究所はフェーズ2に参加し、そこでは、数個の弱いアゴニストとアンタゴニストが試験された。2004-5年には、同研究所はOECD認証のフェーズ3に参加したが、目的はフェーズ1と2における結果との比較で結果の再現性と、陰性化合物の試験による特異性を調査し、大人の去勢されたネズミと未熟な雄ネズミを使用するハーシュバーガー試験法のデータを比較することであった。また、2000-2008年の間、同研究所の専門家は作業の進展、様々なバージョンの重層試験報告書及びOECDテストガイドライン案のOECD討議に参加した。この作業はデンマークのEPAによって支援された¹。

甲状腺への影響がある化学物質を検出する試験法

化学物質が視床下部-脳下垂体-甲状腺系(HPT-系)をかく乱させるか否かを試験するために、限られた数の選別試験法が利用可能である。EDSTACは、カエル変態試験法、成人男子試験法(抗アンドロゲン作用、フル甲状腺及び生殖ホルモンスクリーンを検出するため)を勧め、また日本のうずらをTH結合タンパク質に対する作用のin vivoのモデルとして提案した(石原他、2003)。これらの試験のいずれもまだガイドライン目的のために認証されていない。そしてただ1つ現在評価中である脊椎動物を用いた試験法は、すなわち、“カエル変態分化試験法”(Gray他、2002、EPA)しかないが、このOECD TGPでの試験法はヒトの健康には触れていない。2004年以来、国立食糧研究所は妊娠しているネズミのin vivoの甲状腺試験法の開発を行っている。主な指標は妊娠及び授乳期の雌親のタイロキシシン(T4)レベル、出生後13日目の子犬のT4、そして離乳前の子犬の成長と発達である。この作業の主な目的は、このモデルからのNOAELが後の生涯での発達期の神経毒症状と関連して十分な保護を与えるか否かを研究することである(更なる詳細はレベル5参照)。この作業はデンマークのEPAによって支援された¹。

魚類スクリーニング試験法重層試験への参加

2003年と2004年に、デンマークの実験室は魚類スクリーニング試験法の重層試験(FSA)に参加した。FSAは成魚(望ましくはゼブラフィッシュ、ファットヘッドヒメハヤ、及び日本のメダカ)を使用している。ビテロゲニンの誘導は試験の主要な指標である。従って、試験は主にエストロゲンモードの作用を持つ内分泌かく乱化学物質に対して敏感である。南デンマーク大学(SDU)とDHIは 様々な魚種とゼブラフィッシュの全身のプラズマにおけるビテロゲニン濃度の免疫化学的定量法の開発、そして様々な化学物質(すなわち、パラベン、アルキルフェノール、ビスフェノールA、化学UVフィルタ、天然及び合成エストロゲン)に対する用量応答関係の研究に貢献した。その上、異なる魚種における異なった暴露経路(水、食物、注射)を調査し、結果が発表された。SDUとDHIの両者が、提案された試験の実験的検証段階に活発にかかわっている。このプロジェクトはデンマークのEPAと北欧の協力Nord-Utteによって支援された[17]¹。

原因と影響の調査及び予防努力:

国立食糧研究所は5つの現在使用されている農薬(プロクロラズ、シマジン、デルタメトリン、トリベヌロンメチル、メチオカルブ)をハーシュバーガー試験法において単一の化学物質とし、あるいは混合物として調査した[46, 77, 81]。結果は、抗アンドロゲン作用を示し、混合物作用は相加的に見えた。この作業はデンマークのEPAによって支援された。プロクロラズに関する試験結果は、プロクロラズの使用を禁止するドキュメンテーションの一部として使用された。(農薬及び数種類の化学物質に適用されるべき政府プログラム)

規制:

－ 内分泌かく乱性を有する物質の規制のための基礎としてOECDコンセプチュアルフレームワークを使用する可能性に関する北欧プロジェクトについては、レベル2を参照のこと。レベル3の試験を規制目的に使用する件の結論は“レベル3における試験法は物質の潜在的内分泌腺かく乱活動のin vivo選別を提供する。カエル変態試験法を除いて、レベル3における試験法はin vivoでの化合物の力価に関する情報を提供する。その上、この試験法の結果はレベル5の生殖発達期の研究における悪影響の可能性を示す。現在のところ、ヒトへの作用と関連して、どの範囲までカエル変態試験法をスクリーニングに使用することができるかは不確定である。”というものであった。

レベル4－ 多重内分泌メカニズムと作用に関するデータを提供するIn vivo試験法

知識構築と試験法の開発:

EDCの特性に関する28日間研究の更新作業の活発なコメント(強化/更新されたTG407)

2005年以来、国立食糧研究所は28日間反復投与毒性試験(OECD TG 407)の改正に関連して、その認証の結果についてのOECD討議に参加している。その意図は内分泌かく乱化学物質の検出のためのこの試験法の感度を高めることであった。認証の結果は、改訂された試験法は強力なEDCのみ検出するが、弱いEDC、すなわち、発育中のみに作用を引き起こすものが検出されないことを示した。更に、甲状腺ホルモンへの強力な影響がある1つの化学物質だけが認証に含まれていた。その結果、国立食糧研究所は、強化/更新された試験法の感度には問題が多いことを認め、更なる開発をガイドラインに推薦するのをためらった。しかしながら、アップデートされた試験法が強力な抗アンドロゲンとエストロゲンを検出するように見えるので、改訂されたガイドラインの第一節に、この試験法における否定的結果は内分泌の影響を排除することができないことを明確に示すことを条件として、更なる開発は受け入れられるとした。2007-2008年の間、国立食糧研究所はOECD指針書で病理組織学的な影響について論評している。この作業はデンマークのEPAによって支援された。

胎児ステロイド合成と肛門性器間距離への影響を検出するための胎児発達期の毒性研究の促進 (OECD TG 414)

国立食糧研究所におけるプロジェクトの目的は、雄胎児におけるテストステロンレベルと肛門性器間距離(AGD)の評価の実現が、OECDテストガイドライン414“胎児発達期の毒性研究”における内分泌かく乱作用の研究に役に立つかどうかを調査することであった。2004-2006年には、14の異なった物質に暴露した雄胎児からのサンプルが分析された[47-50、54-55]。結果は、雄胎児におけるテストステロン統合と肛門性器間距離(AGD)の評価をTG 414研究計画に含めることが可能であることを示した。このプロジェクトはデンマークのEPAと北欧の協力Nord-Utteによって支援された[17]。

魚類の性的発達試験(FSDT)の開発と認証の先導

FSDTは魚類における性的な発達は正常な性ホルモンの作用を妨げる化学物質への暴露に非常に敏感であるという事実を利用している。これはFSDTをエストロゲン、アンドロゲン、抗エストロゲン、抗アンドロゲン、及びアロマトーゼ抑制性化学物質に対して非常に敏感にする。FSDT(以前に魚類の部分的一生涯試験と呼ばれた)は1992年に採択されたOECDガイドライン210の改訂版－内分泌かく乱物質の検出のための指標が追加された魚類早期ライフステージ毒性試験(第二性徴、ビテロゲニン(VTG)濃度、及び性比)(OECD、2005)である。この試験法の背景の主な考えは、魚類の性的な発達中の敏感な時間帯(the sensitive window)における内分泌かく乱物質の暴露が、それらが暴露されるホルモンの特性に基づいてVTG濃度と性的な発達を変えるということである。

デンマークが先導国であるFSDTは2003年にOECDテストガイドラインプログラムの作業計画に含まれていた。2005年秋から2006年早春までの間、可能な試験設計の徹底的な統計学的評価が実行された。結果は2006年にEDTA9に提示された。OECD fish drafting groupは、統計的な設計に合意し、試験法の実験的な検証を継続することに合意した。検証の最初のラウンドは、2007年夏まで行われて、首尾よく終了した。検証作業のフェーズ2は2008年に行われている。このプロジェクトはデンマークのEPAと北欧の協力Nord-Utてによって支援された[17]。

ミジンコ生殖発生試験法の開発への参加

現在、海洋の無脊椎動物は生態学的に重要な、大きな有機体グループであるが、その慢性作用の国際的に調和している(すなわち、OECD)試験法がない。これらの無脊椎動物は稚魚の食物として役立ち、一次生産者から生態系のより高いレベルへのエネルギー伝達を守るために保護される必要がある。従って、ぎょう脚類の繁殖と成長に関する試験法の開発は2005年に始められ、OECDテストガイドラインプログラムの作業計画に含まれている。2、3のデンマークの研究所が予備認証作業にかかわった。この作業はデンマークのEPAと北欧の協力 Nord-Utてによって支援された[17]。

トビムシ類の生殖に関するOECD TGの開発のための先導

トビムシ類は土、特に温帯土壌の中で重要であり、最も重要な節足動物のグループであると考えられる。既にトビムシ種の1つ、Folsomia candidaに関するISOテストガイドラインが存在している。この試験は、例えば、ヨーロッパと米国で、農業評価に使用中であり、ある場合には、工業用化学薬品を含む下水汚泥の農地での利用に関連する潜在的な問題の評価に使われている。このトビムシ試験は2つの試験種のオプションを含んでいる: 1つは無性生殖種ともう1つの有性生殖種である。また、それは動物の生殖能力をカバーし、節足動物性のホルモンシステムを調節する化合物によって引き起こされるかもしれない生殖器官への損傷の検出を可能にする。OECDトビムシ試験ガイドラインの草稿は、2004年に予備検証され、2005年にWNT-ミーティングでOECD TGPの作業計画のために受け入れられた。TG提案の草稿(重層試験報告書が付加されている)はまもなく、コメントを受けるためにOECD NCに配布される。このプロジェクトはデンマークのEPA、及び北欧の協力Nord-Utてによって支援された [17, 20]。

原因と作用の調査、及び予防努力:

in vitroにおける硝酸塩と亜硝酸塩の内分泌かく乱作用と、in vivoにおける硝酸塩の内分泌かく乱作用の調査(子宮内での暴露の後)

国立食糧研究所はステロイド統合試験法(H295R)における亜硝酸塩と硝酸塩のin vitro作用と、飲料水を通して硝酸塩に暴露された雌親からの雄ネズミ胎児における肛門性器間距離とテストステロン生産に対する影響を研究した(未発表)。このプロジェクトはデンマークのEPA3によって支援された³。

規制:

内分泌かく乱特性を有する物質の規制のための根拠として、OECDコンセプトフレームワークを使用する可能性に関する北欧プロジェクトについてはレベル2を参照のこと。レベル4試験を規制目的に使用する件についての結論は以下の通りであった。すなわち“レベル4における試験法は、思春期及び若い成人中の物質の潜在的内分泌かく乱作用の徹底的な評価を提供する。その上、レベル4は、レベル5で調査されるべき化合物の力価に関する情報を提供する。試験法に含まれる様々な指標に対する影響は、不利である、あるいはヒトに関連するメカニズムへの影響、例えば、ホルモンレベルの変化を表すと考えられる。従って、更なる研究結果が利用可能になるまで、ヒトのリスク評価で使用されるべきNO(A)EL/LO(A)ELを用意するためにこれらの試験法を使用することができる。無処置成熟雄を用いた試験とTG 407は、アロマトーゼ阻害物質及びステロイド合成に影響する化合物を検出するためには、成熟期雄試験に比べ有効であろう。一方、無処置の若齢成熟雄を用いるこれら2つの試験法は子宮肥大及びハーシュバーガー試験、そして、雌雄成熟期試験法に比べて、感度が低い。”

レベル5 -内分泌その他のメカニズムからの悪影響データを提供するIn vivo試験法

知識構築及び試験法の開発:

生殖毒性試験のための既存のOECDガイドラインの強化

国立食糧研究所は数年間、内分泌かく乱作用の検出に関して世代研究を促進するための提案を提供する目的で、多くのEDCとその影響を調査した。これらの助言は、OECDのEDTAミーティング及びOECD哺乳類VMGにおいて与えられている¹。

1世代研究を拡張するための作業への参加

国立食糧研究所は内分泌かく乱作用の検出に関する世代研究を促進する作業に参加している。これは進行中の拡張1世代研究のためのドラフトOECDテストガイドラインの開発を含む。女性の乳腺発達がEDCの作用の敏感な指標であるという指摘があり、従って拡張1世代研究のためのドラフトOECDテストガイドラインにこの作用の評価のためのブレースホルダを含むことが提案された¹。

発達中の甲状腺ホルモンへの影響と行動影響

国立食糧研究所は妊娠期と授乳期の甲状腺ホルモン(チロキシン、T4)への作用と、子孫の行動影響の間の関係を研究している。2005-2006年には、プロピルチオウラシルを調査し、結果は妊娠と授乳期のT4への影響は良好で、成人子孫の運動活動と学習作用に対する影響の十分に敏感な予測因子であることを示した[54]。2007-2008年には、マンゼブ(又はマンコゼブ)が研究された。マンゼブは、使用された用量において予期しえない著しい雌親の急性神経毒症状を起こした。その結果、甲状腺ホルモンへの影響と子孫の行動の間の関係に関する知識を、この研究に基づいて拡張することはできなかった。2008年には、UVフィルタメトキシけい皮酸塩オクチル(OMC)に関する研究が始められた。OMCは雌親と子孫の両方で甲状腺ホルモンへの著しい作用を引き起こし、睪丸と前立腺の重量及び男性子孫のテストステロンレベルを減少させた[52-53]。行動試験は進行中である。このプロジェクトはデンマークのEPAによって支援されている¹。

OECDテストガイドライン426の開発への参加 - 発達期の神経毒性調査

ある研究グループは、1993年頃から(労働衛生研究所において、また1999年以来、国立食糧研究所において)、発達期の神経毒性試験の方法を開発し、OECDテストガイドライン426-発育上の神経毒性試験[60-74]-の開発に参加した。このガイドラインは、ホルモンが脳の性的同種二形発育(性ホルモン)と脳の一般的発育(甲状腺ホルモン)を組織化するので、EDCに関連している。このプロジェクトはデンマークのEPAと、北欧の協力Nord-Utteその他によって支援された¹。

魚類の一生試験の開発への参加

1999年と2000年に、内分泌かく乱特性の検出のための魚類の2世代試験における試験種としてのゼブラフィッシュの潜在的有用性が調査された。結果は魚類の一生試験に関するOECD DRP(米国先導)の開発を支持した。このプロジェクトはデンマークのEPA、及び北欧の協力Nord-Utteによって支援された[17, 19]¹。

原因と影響の調査、及び予防努力:

類似的と非類似的に活動するEDCの混合作用

国立食糧研究所の研究者はEU戦略的研究枠組みのプログラムプロジェクトEDENに参加した。2003-2007年の間、研究所は単一の化学物質として、及び組み合わせにおける9つの抗アンドロゲンの性的な発達と

行動に対する作用を調査している。作用が類似もしくは非類似の抗アンドロゲン物質の混合物による二つの研究が実施されている[56-59]。

作業の目的は、混合作用が単一の化学物質のためのNOAELSにおいて起こるか否かを調査することと、そのような作用を用量加成性モデルを用いる単一の化学物質の用量応答研究に基づいて予測することができるか否かを評価することであった。2008年から、国立食糧研究所は低用量における環境面で関連している10ないし12のEDCの発達期暴露後の混合作用の研究を目的とする新しいEUプロジェクトCONTAMEDに参加している。このプロジェクトはデンマークのEPAとEUによって支援された¹。

内分泌かく乱性農薬、フタレート、その他の影響

国立食糧研究所は生殖系と脳の性的分化におけるいくつかの内分泌かく乱性農薬、フタレート、その他の化学物質（例えばノニルフェノール、ジ(2-エチルヘキシル) アジペート）の影響を調査した[56-59, 75-83]。

規制:

－ 内分泌かく乱性を有する物質の規制のための基礎としてOECDコンセプチュアルフレームワークを使用する可能性に関する北欧プロジェクトについては、レベル2を参照のこと。レベル5の試験を規制の目的に使用する件に関する結論は次の通りであった。すなわち“生殖毒性研究は悪影響データを提供して、ヒトへの影響の可能性を示すので、特にリスク評価に役立つ。生殖毒性研究で観測される作用は内分泌作用以外のメカニズムのためであるが、作用のパターン、例えば、減少した肛門性器間距離と男性の生殖器奇形は、内分泌腺の作用が関わっていることを示しているかもしれない。生殖毒性のためのOECDテストガイドラインのうち、発達段階のすべての易損期における暴露は二世代試験でのみ実施される。動物の離乳後に現れるようになる遅発影響は、若い成獣について特に生殖機能と発達の神経毒症状と関連して、一部カバーされている。しかし、潜在的に重要な遅発作用は評価されない。加齢の間に現れるようになる作用は、生殖毒性のためのいずれのガイドラインにも含まれていない。生殖毒性に関するEDCの影響の検出のためのOECDテストガイドラインの多くの強化が関連しているように見える。従って、生殖毒性調査に影響が現れないことは、現在のところ、検査で陰性と出た化学物質による影響の可能性を完全に排除することはできない。

添付

事例

以下の事例は、多くの場合、内分泌かく乱化合物に対する規制上のイニシアチブが、作用又は活動度だけではなく、暴露の考察によって影響を受けることを例証している。また、これらの事例は、通常、これらの物質の評価がコンセプチュアルフレームワークのいくつかのレベルからの非試験手段と試験手段によって得られる情報を含む、証拠の重さに基づくことを例証する。

以下のすべての事例の1つの重要な成果は、関連する既存のOECDテストガイドラインへの、新しい又は拡張する開発への貢献であった。

事例1: アゾール殺菌剤

国立食糧研究所は様々なin vitro試験法、ハーシュバーガー試験法、出生前及び出生後発達期の毒性研究における数個の一般的に使用されるアゾール殺菌剤(プロクラズ、テブコナゾール、プロピコナゾール及びエポキシコナゾール)の作用を調査した[48, 77, 81, 83]。調査はエポキシコナゾール、プロピコナゾール、及びテブコナゾールは、ER、AR、及びAhRとの相互作用に関して、イミダゾール殺菌剤プロクラズと同様の特性と、ステロイド・ホルモン統合への作用、及びテストステロンをエストロゲンに変換するアロマターゼ酵素の活性を有することを示した。3つのトリアゾール(テブコナゾール、プロピコナゾール及びエポキシコナゾール)はいくつかの試験法でプロクラズほど強力でないことが判明した。ステロイド統合への作用を調査するために、H295R試験法が確立された。この作業の副産物はOECD TGPにおける開発のための試験法の認証に参加したことであった。その上、甲状腺の受容体(TR)の結合と起動を検出するための生化学的定量法(T-スクリーン)が確立されて、プロクラズ、エポキシコナゾール、プロピコナゾール及びテブコナゾールが甲状腺ホルモンアゴニスト又はアンタゴニストとなる能力を調査することに使われた。TRとの説得力ある相互作用はプロクラズ又は、いずれのトリアゾール殺菌剤にも発見されなかった。

若い成長したネズミのin vivoにおけるプロクラズ、プロピコナゾール及びテブコナゾールの抗アンドロゲン作用は、ハーシュバーガー試験法を使用して研究された。プロピコナゾール又はテブコナゾールいずれのトリアゾール殺菌剤も、150mg/kg bw/日の用量におけるハーシュバーガー試験法で、なんらin vivoのアンドロゲン受容体遮断作用を持たなかった。これは50～150mg/kg bw/日の用量において、この試験法に抗アンドロゲン作用を引き起こしたプロクラズと対照的になっている。

プロクラズ、エポキシコナゾール、及びテブコナゾールの発達期の影響は妊娠と授乳期の暴露後のネズミ子孫で調査された。プロクラズ、エポキシコナゾール、及びテブコナゾールはともに長い妊娠期間をもたらした。この作用はたぶんこれらの殺菌剤によって引き起こされる母親の黄体ホルモンの血漿濃度に観測された著しい増加に関連する。テブコナゾールとエポキシコナゾールは高頻度の移植後損失を引き起こし、エポキシコナゾールは遅い、あるいは非常に遅い再吸収の著しい増加を引き起こした。プロクラズ及びテブコナゾールは男性胎児の睾丸のテストステロンレベルを減少させて、雄子犬の乳頭の数を増加させた、すなわち抗アンドロゲン作用である。

全体的に見て、結果はアゾール殺菌剤は一般に同様のin vitro動作プロファイルを持つが、in vivo動作プロファイルは異なるかもしれないことを示している。試験されたアゾール殺菌剤の共通点は、みな妊娠期間を増加させて、雌親の黄体ホルモンレベルを増加させたことである。プロクラズとテブコナゾールは雄子孫に抗アンドロゲン作用を引き起こした。in vitroステロイド・ホルモン統合への影響、ハーシュバーガー試験法における影響の欠如は(ステロイド統合への作用は、テストステロンを増補した去勢された雄ネズミを使用することによって省略された。)周産期の暴露後における生殖発達上の影響と合わせて、主な原因となるメカニズムの1つがステロイド・ホルモンの統合にかかわるキー酵素のかく乱であろうことを強く示している。

過去数年間、観賞植物の温室生産におけるアゾールの使用の調査が行われている。労働者はこのグループの化学物質に高度にさらされている。疫学的調査では、女性の温室労働者の血液中に、暴露していない女性と比較して高い異質のエストロゲン活動が示された[39]。また予備的な結果ではFunen島の女性温室労働者の息子達に、生殖機能の発達障害の増加が示された[40]。研究は数年前に実行され、調査された農薬の多くがもはや商業的に利用できない。しかしながら、アゾール殺菌剤が温室での使用のためにまだ承認されているので、動物実験において示されたアゾール殺菌剤の内分泌かく乱特性の見地からすると、これらの観測は不安である。結果として、現在、DK EPAがいくつかの活動を開始し、先ず第一に、温室使用を承認されたアゾール殺菌剤の、再加入時の暴露計算の新しい方式と追加のセーフティファクターの適用を含む新しいリスク評価が実行された。また、DK EPAは現在7-10歳の同じ子供達を含む追跡調査を支援している。

既存の情報と上記の研究の結果に基づき、温室におけるアゾール殺菌剤の取扱いに関するより厳しいガイドラインが確立された。

(政府プログラムと農薬の規制)

事例2: 混合作用/複合暴露

諸研究は、新生児少年の尿道下裂を含む雄生殖系における異常の発生がここ50年間増加していることを示しているが、ヒトの内分泌かく乱化学物質暴露の影響力は現在のところほとんど未知である。化学物質リスク評価は現在、単一の化合物の影響に関して無毒性量 (NOAEL)に基づいている。このアプローチを使用すると、単一の内分泌かく乱化合物は、悪い生殖作用への関心を引き起こすには低過ぎるレベルで人体組織に存在しているように見えるかもしれない。しかしながら、数個の抗アンドロゲン化学物質が混合物として子供を含むヒトに見つけられたので、国立食糧研究所は、広範な用量応答研究において、周産期の暴露後における雄性性分化を引き起こす抗アンドロゲン混合物の能力を調査した。

相似作用する抗アンドロゲン(三つのAR-アンタゴニスト、ビクロゾリン、フルタミド、及びプロシミドン)に関する最初の混合物研究では、連合作用はすべての指標について、本質的に用量付加的であった。それ自身では著しい作用を生まなかったそれぞれの化学物質の用量の組み合わせは、肛門性器間距離(AGD)、乳頭保持、精囊の重さと組織病理学、及び前立腺のPBP C3遺伝子発現に著しい混合物作用を引き起こして、PND 16に外部生殖器の著しい発育不全を引き起こした[56-57]。雄の外部性器の発育における主要なでき事は成熟期前、出生後日数16以後に起こる。その結果、尿道下裂と他の外部の性的な奇形の頻度は若い成熟雄ネズミについても記録された。もう一つの目的は雄の子犬に観察される抗アンドロゲン作用が、若い成熟雄動物の晩年に観察される外部の奇形(尿道下裂)の予兆であるかどうか調べることであった。ビクロゾリン 24.5mg/kg/日、フルタミド 0.77mg/kg/日、及びプロシミドン 14.1mg/kg/日の混合物は60%の雄の子孫に尿道下裂を引き起こしたが、一方、単一の化学物質への暴露後の頻度は未処理の対象と同様に見えた、すなわち、0%である[58]。

第2の混合物研究では、異なる行動をする4つの抗アンドロゲン、すなわち、ビクロゾリン(アンドロゲン受容体拮抗阻害体)、DEHP(テストステロン統合抑制剤)、フィナステリド(ステロイドタイプIIの5還元酵素の抑制剤)及びプロクロラズ(アンドロゲン受容体拮抗阻害を含む多重メカニズム)の作用に焦点を合わせた。PND 16におけるAGD、乳頭保持、及び生殖器重量は、個々の化学物質だけではまったく、あるいは僅かな影響しか生じないレベルの用量で、混合物グループにおいて明確に影響を受けた。連合作用は用量付加又は独立行動によって等しく良く予測された。更に、尿道下裂などの外部奇形が、単独では顕著な作用を引き起こさなかった化合物の混合物において非常に高い頻度で認められた。この混合物作用は用量付加又は独立行動に基づく予測より悪かった[59]。

結論として、in vivo研究は、より多くの抗アンドロゲンの複合暴露の連合作用は、多くの場合、用量付加モデルで予測可能であること、及び単一の化学物質に対するNOAEL以下の用量で著しい影響が起り得ることを示している。これらは単一の抗アンドロゲン単独でのNOAELに基づくリスク評価は、尿道下裂と他の意に添わない抗アンドロゲン作用のリスクを著しく過小評価するかもしれないことを明確に示しているため、ヒトと環境のためのリスク評価に関するこれらの発見の重要性は強調されるべきである。

この作業はEU EDEN-プロジェクト“内分泌かく乱物質：ヒト、水生野生生物、及び実験動物における、新しい指標、暴露、低用量作用と混合物作用を探る”の一部であり、財政上、欧州委員会とデンマークのEPAによって支援された。この作業のフォローアップとして、DK EPAは2009年1月に規制上の局面に焦点を置き、内分泌かく乱物質の組み合わせ作用に関する専門のワークショップを主催している。更に、様々なデンマークの科学者は、例えば、新しいEU集団プロジェクトにおいて、この分野で研究を続けており、これらもまた、デンマークのEPAと北欧閣僚会議によって支援されている。

2006年、内分泌かく乱物質の複合暴露後の未来の子供に対する影響に関する動物実験の示すものは、これらの物質に関する公共の認識の高まりと相まって、“妊婦と乳母の正しい化学：9つの良い習慣”と題する運動につながった。キャンペーンは母親と乳児が化粧品、玩具、及び乳幼児向け製品に使われる内分泌かく乱物質を含む化学品に暴露することを減らす9つの簡単な方法を指摘した。これらの指摘と認識のために、デンマークは2010年に開催される第5回WHO閣僚会議で、内分泌かく乱物質の複合作用を優先領域に含める作業に取り組んでいる。その上、新しいヨーロッパの農薬規制では、デンマークは、内分泌かく乱性を含むいくつかの特に危険な固有の性質を有する農薬の非包含に関する遮断基準の確立の受理を促進させた。

事例3: 淡水魚における内分泌かく乱

魚類における内分泌かく乱は1990年後半に、既にかなり良く調査され、原因のメカニズムは他の内分泌に関する作用とは対照的にかなりよく理解されていた。これが、1998年にゼブラフィッシュにおける化学物質の内分泌かく乱作用を検出するためのOECDテストガイドラインを開発する北欧の作業を確立するための基礎であった。当時から作業はデンマークのEPA、及び北欧の協力Nord-Uttelに支援され[17, 19]、OECDテストガイドラインの提案“魚類の性的発育の試験”(FSDT)の開発に至った。FSDTでは指標は雄魚のビテログニンと性比の変化である。後者の指標はリスク評価に直接関連しているが、前者は暴露に対する生物反応を示す。これらの内分泌に関連する影響は、デンマークの水流で暴露した野生魚の個体群に観測された。公開討議の後、これらの発見の原因と範囲の調査を目的とする一連のプロジェクトが始動した[3]。最初のプロジェクトはin vitroのエストロゲン活性の測定と影響を生ずる化学物質の測定に利用可能な方法論をレビューした[10, 11]。これら物質は汚水処理場から発生するかもしれないので、汚水処理場におけるエストロゲンの分解性の調査をするプロジェクトが実施された[12]。これらの初期のフォローアッププロジェクトに、廃出物と地上水におけるエストロゲン活性を監視する主要なプロジェクトが続いた[24, 25]。これらのすべてのプロジェクトで得られるデータに基づいて、淡水魚に観測された内分泌かく乱が、自然なエストロゲン(個体群の女性部分によって排泄される、あるいはさほど重要でない程度であるが下肥を撒く家畜によって、そして水路に流出する農業流雨水を通して下水に排出される)の暴露によって引き起こされた可能性が最も高く、合成のエストロゲンや他のエストロゲン活性を有する化学物質の暴露によって引き起こされたものではない、と結論づけられた。その上、デンマークの廃水の大部分は十分に処理されており、環境に放出されるエストロゲンの量は重大ではないと考えられるレベルまで減少していると結論づけられた。

これらプロジェクトに対して、農場で下肥が肥料として使用されるとき環境に放出されるエストロゲンの重要性を調査する、より研究指向の活動が続いた。これらの研究は、大雨の場合、エストロゲンが農場で下肥が施肥された後、最大7カ月後に農地からの排水中に滲出するであろうことを示した。研究は、集中的に養豚(妊娠している雌豚からのエストロゲンに富む下肥が使われた)を行う地域と、滲出が土壌孔けきを通じて選択的移送に影響されると認められた土壌を持つ地域の状態に注目した。結果は、以前に言及した調査におけるエストロゲンに関する発見を、受容者への廃水の放出を除外できる場合について説明できるであろう[86]。

事例4: フタレート

デンマークの環境における、フタレートの使用、消費者の暴露、及びフタレートの影響は1984年に初めてデンマークのEPAによって調査された。調査のためのバックグラウンドはDEHPが発がん性であり、他のフタレートは生殖に対して毒性があることの兆候であった。また、環境におけるフタレートが測定され、水生生物と堆積物の中に蓄積することが示された[37]。1993年、フタレートは廃棄物処理から出る問題の多い、新しい

グループの物質と指摘された。暴露と影響の両方に関心が寄せられた。特に、DEHPはいくつかの環境コンパートメントで観測されており、そして、これは調査されていなかったがヒトの暴露は想定された。BBPとDBPは乳がん細胞株における弱いエストロゲンであり、DEHPは生殖に毒性あり、動物研究で睾丸の損傷を引き起こすことが示された。また、DBPは生殖への毒性として評価された。その上、DEHPの発がん性が疑われ、DEP、BBP、DnOP、DINP、DIDPは環境に危険であるとして分類することが提案された。フタレートの調査は密接にPVCの使用に関する討議に関連づけられた[32]。

既存の物質のリスク評価のためのEU計画では、多くのフタレートがリスク評価(DEHP、DOP、DBP、DINP、DIDP、及びBBP)のために最優先した[27]。デンマークでは暴露と影響の疑いから起こる懸念のため、これらのリスク評価への参加、完成、及びフォローアップは、優先度の高い課題である。

1996年、デンマークのEPAはDEHPとその他のフタレートの人の健康への影響に関して、既存の文献に基づいた評価を行った[26]。また、環境の破壊とDEHPの影響についてレビューを行った[36]。その上、異なった目的に使用される様々なタイプの重合体から生じるDEHPの環境への放出の監視と推定を行った[84, 85]。フタレートの普及と広範囲な使用に係わる、人間の健康と環境への多くの影響(水生の環境中の慢性作用、減少している繁殖力、睾丸への毒性、in vitroでのエストロゲン作用と可能性ある抗アンドロゲン作用及び発がん性)の故、フタレートの使用を減らし段階的に撤廃するアクションプラン[30]が、PVCの使用を減少させるための戦略[31]と共に、1999年にデンマークにおいて発表された。アクションプランはデンマークにおけるフタレートの使用の90%を占めると推定されるソフトPVCでのフタレートの使用に焦点を合わせた。目標は10年間に多くの手段－禁止令、税、交付金、公共のグリーン調達、及びエコラベラーによりフタレートの使用を50%削減することであった。また、フタレートとその代替品の影響と拡散に関する倍旧の知識が最優先された。同時に、3歳までの子供のための玩具でのフタレートの使用は禁止された。次の数年間、フタレートの代替品に焦点を合わせる多くのプロジェクトがデンマークのEPAによって発表された。(建築用、フレキシブルPVC、印刷用インク、塗料とラッカー、接着剤、シリコン製品、ゴム、溶融金属の中のソフトPVCの代替品) [33, 34, 35]。

デンマークにおける民生用製品のフタレートの使用に関するいくつかの調査も実行された。例は“PVC製品中のフタレート”及び“2000年と2001年のPVCとフタレートのデンマークにおける使用”である。[28, 29]。2003年、アクションプランはフタレートの使用の状況に続いた[21]。当時、DEHPとDBPはEUにおいて生殖への毒性ありとして分類されており、状況は、その結果としてDEHPの以前の使用は減少したが、代替の物質として使用されるDINPの消費が増加したことを示した。また、EUではBBPとDIBPは生殖への毒性として分類された。2007年、調和されたEUの規制は、14歳までの子供のための玩具に6つのフタレートを使用することを禁止した(DEHP、DBP、BBP及び口に入れることができる場合、DINP、DIDP、及びDNOP)。デンマークは3歳までの子供用玩具にすべてのフタレートの禁止令を継続した[22]。国立食糧研究所は、長い間、内分泌活動と内分泌かく乱特性を示すいろいろなフタレート[47, 49, 50, 78, 80, 82]に関するいくつかの実証研究を行っている。

DK EPAは、これらの研究業績を既存の物質のリスク評価のためのEUプログラム及び、それに続く民生用製品でのフタレート使用の制限の、両方においてフタレートの生殖上の影響に関する資料として使用した。

また、これらの研究は肛門性器間距離と乳頭保持を、内分泌かく乱検出のための新しい指標として、TG 414及び1世代試験の改良において重要な情報となった。

参考文献

1. Sharpe, RM and Skakkebaek NE: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?, *Lancet* 341:1392-1395 (1993).
2. Homepage of the Danish EPA:
<http://www.mst.dk/Kemikalier/Fokus+paa+saerlige+stoffer/Hormonforstyrrende+stoffer/Dansk+strategi/>
3. Report from the Danish EPA: Feminisation of fish: The effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature, http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2002/87-7972-305-5/html/default_eng.htm.
4. Report from the Danish EPA: Substance Flow Analysis of Resorcinol, Environmental Project no. 942, 2004, http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2004/87-7614-345-7/html/default_eng.htm
5. Report from the Danish EPA: Substance Flow Analysis of 4-nitrotoluene, Environmental Project no. 941, 2004, http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2004/87-7614-343-0/html/default_eng.htm
6. Danish National List of Undesirable Substances 2004:
http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2004/87-7614-477-1/html/default_eng.htm
7. Booklet from the Danish EPA: Stof til eftertanke – fakta om hormonforstyrrende stoffer:
http://www.mst.dk/NR/ronlyres/8CC94298-DDC5-4D10-B147-0B043B7F1245/0/Fakta_om_pjece_til_net.pdf
8. Booklet from the Danish EPA: 9 good habits to pregnant and nursing mothers (Only in Danish: God kemi er ikke altid nok – 9 gode vaner til gravide og ammende om kemikalier i kosmetik, babyprodukter og legetøj):
<http://www.babykemi.dk/images/17X17web.pdf> English information sheet:
http://www.babykemi.dk/images/pdf_9%20gode_vaner_uk.pdf
9. Homepage: 9 good habits to pregnant and nursing mothers. English sub-page:
http://www.babykemi.dk/images/pdf_9%20gode_vaner_uk.pdf Homepage in Danish: www.babykemi.dk
10. Report from the Danish EPA: Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment. Working Report no. 43, 2003,
<http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2003/87-7972-922-3/pdf/87-7972-923-1.pdf>
11. Report from the Danish EPA: Evaluation of analytical chemical methods for detection of estrogens in the environment. Working Report no. 44, 2003,
<http://www2.mst.dk/udgiv/publications/2003/87-7972-968-1/pdf/87-7972-970-3.pdf>
12. Report from the Danish EPA: Degradation of Estrogens in Sewage Treatment Plants. Environmental Project no.899, 2004, http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2004/87-7614-168-3/html/default_eng.htm
13. Report from the Danish EPA. 22 hormonforstyrrende stivstoffer – kortlægning over anvendelse i andre produkter end plantebeskyttelsesmidler, environmental project no. 933, 2004,
<http://www2.mst.dk/Udgiv/publikationer/2004/87-7614-314-7/html/default.htm>
14. TemaNord rapport “Chemicals with estrogen-like effects”, TemaNord 1996:580
15. OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters as a basis for regulation of substances with endocrine disrupting properties”, TemaNord 2004:555,
<http://www.norden.org/pub/sk/showpub.asp?pubnr=2004:555>
16. Controlling Chemicals. The Danish Government’s action plan for improved chemicals-related measures for 2006-2009. http://www.mst.dk/NR/ronlyres/EE50A470-CAB7-4F7B-A546-84016A4F3056/0/kemi_handlingsplanendeligttotal140607maaleng.pdf
17. Nord-Utte homepage: www.nord-utte.org
18. Strategy for human health and the environment. Homepage of the Danish EPA:
<http://www.mst.dk/Tvaergaende+indsats/Miljoe+og+sundhed/Mere+om+miljoe+og+sundhed/>
19. Zebrafish for testing endocrine disrupting chemicals, TemaNord 2000:555 :
<http://www.norden.org/pub/sk/showpub.asp?pubnr=2000:555>
20. Background report on pre-validation of an OECD Springtail Test Guideline, environmental project no. 986, 2005: http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2005/87-7614-535-2/html/default_eng.htm

21. Status for phthalater 2003:
<http://www2.mst.dk/udgiv/publikationer/2003/87-7972-360-8/html/default.htm>
22. Faktaark om phthalater:
<http://www.mst.dk/Kemikalier/Regulering+og+regler/Faktaark+om+kemikalierereglerne/Ftalater.htm>
23. Regulation of PCPs:
<http://www.mst.dk/Kemikalier/Regulering+og+regler/Faktaark+om+kemikalierereglerne/Pentachlorphenol+%28PCP%29.htm>
24. Survey of Estrogenic Activity in the Danish Aquatic Environment, Part A, Environmental Project no.977, 2005: http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2005/87-7614-505-0/html/default_eng.htm
25. Survey of Estrogenic Activity in the Danish Aquatic Environment, Part B, Supplementary investigations, Environmental Project no.1077, 2006:
http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2006/87-7052-009-7/html/default_eng.htm
26. Toxicological evaluation and Limit values for DEHP and phthalates other than DEHP, Environmental Project no. 9, 1996,
<http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/1996/87-7810-638-9/pdf/87-7810-638-9.pdf>
27. ESIS: European Chemical Substances Information System.
<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/index.php?PGM=ora>
28. Phthalates in products with PVC, survey of chemicals in consumer products, no.1, 2002:
<http://www.mst.dk/Kemikalier/Fokus+paa+ny+viden/Kortlaegning+af+forbrugerprodukter/Rapporter4/02050804.htm>
29. Use of PVC and phthalates in Denmark year 2000 and 2001, survey of chemicals in consumer product, no. 35, 2003:
<http://www.mst.dk/Kemikalier/Fokus+paa+ny+viden/Kortlaegning+af+forbrugerprodukter/Rapporter2/02054600.htm>
30. Handlingsplan for at reducere og afvikle anvendelsen af phthalater i blød plast.
<http://www.mst.dk/NR/ronlyres/59B1C808-1A42-49C1-9964-E8F1496FA0EB/0/02030600.doc>
31. Strategi for PVC-området. Statusredegørelse og fremtidige initiativer, 1999.
<http://www.mst.dk/NR/ronlyres/9C434ED1-1697-40CD-8B20-F86F2057F68C/0/02030700.doc>
32. Massestrømsanalyse af phthalater, Miljøprojekt nr. 32, 1996.
33. Alternativer til blød PVC i byggebranchen, Miljøprojekt nr. 707, 2002:
<http://www.xn--miljestyrelsenb.dk/udgiv/publikationer/2002/87-7972-098-6/pdf/87-7972-182-6.pdf>
34. Environmental and Health Assessment of Alternatives to Phtalates and to flexible PVC, Environmental Project no. 590, 2001:
http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2001/87-7944-407-5/html/default_eng.htm
35. Kortlægning og vurdering af substitutionsmuligheder for phthalater i udvalgte produkter, Miljøprojekt 560, 2000: <http://www2.mst.dk/Udgiv/publikationer/2000/87-7944-242-0/html/default.htm>
36. Review of Environmental Fate and Effects of di(2-ethylhexyl)phthalate, Working Report no.54, 1996:
<http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/1996/87-7810-650-8/pdf/87-7810-650-8.pdf>
37. Brugen af ftalater I Danmark, Farlige Stoffer, Mljørapport, 1984:
<http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/1996/87-7810-650-8/pdf/87-7810-650-8.pdf>
38. Miljøprojekt, 290; Environmental project, 290, 1995 Male Reproductive Health and Environmental Chemicals with Estrogenic Effects
<http://www.mst.dk/Udgivelser/Publications/1995/04/87-7810-345-2.htm>
39. Andersen HR, Nielsen F, Nielsen JB, Kjaerstad MB, Baelum J, Grandjean P. Xeno-oestrogenic activity in serum as marker of occupational pesticide exposure. Occup Environ Med. 2007 64:708-714.
40. H.R. Andersen, I.M. Schmidt, P. Grandjean, T.K. Jensen, E. Budtz-Joergensen, M.B. Kjaerstad, J.Baelum, J.B. Nielsen, N.E, Skakkebaek and K.M. Main. Impaired Reproductive Development in Sons of Women Occupationally Exposed to Pesticides during Pregnancy. Env.Health.Perspec. 2008, online 22 January.

41. METI, Ministry of Economy, Trade and Industry, Japan. *Appendix 1 & 2. Data list of RBA values of human ER α receptor binding assay, RA and PC 50 values of human ER α reporter gene assay.* 6th Meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters to be held in Tokyo, Japan, 24 and 25 June, 2002, pp. 1-23 & 1-4.
42. The Danish (Q)SAR database with (Q)SAR predictions: [http://\(Q\)SAR.food.dtu.dk](http://(Q)SAR.food.dtu.dk) (National Food Institute, DTU) or [http://ecb\(Q\)SAR.jrc.it/](http://ecb(Q)SAR.jrc.it/) (European Chemicals Bureau)
43. J.R. Niemelä, E.B. Wedebye, N.G. Nikolov, and G.E. Jensen, *A battery of QSAR models. I. Human Health endpoints: A tool for toxicological prediction of chemical substances.* In preparation.
44. A.M. Vinggaard, J.R. Niemelä, E.B. Wedebye, and G.E. Jensen, *Screening of 397 chemicals and development of a QSAR model for androgen receptor antagonism.* Chem. Res. Toxicol. 21 (2008), pp.813-823.
45. G.E. Jensen, J.R. Niemelä, E.B. Wedebye, and N.G. Nikolov, *QSAR models for reproductive toxicity and endocrine disruption in regulatory use – a preliminary investigation*, submitted to “SAR and QSAR in Environmental research”.
46. Birkhøj M, Nellemann C, Jarfelt K, Jacobsen H, Andersen HR, Vinggaard AM. The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides. Toxicology and Applied Pharmacology 2004, 201, 10-20.
47. Borch J, Vinggaard AM, Hass U, Ladefoged O. Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. Reproductive Toxicology 2004, 18, 53-61.
48. Laier P, Metzдорff SB, Borch J, Hagen ML, Hass U, Christiansen S, Axelstad M, Kledal T, Dalgaard M, McKinnell C, Brokken L, and Vinggaard AM.(2006) *Mechanisms of action underlying the antiandrogenic effects of the fungicide prochloraz.* Toxicol.Appl.Pharmacol. 213; 160-171
- 49. Borch J, Axelstad M, Vinggaard AM, Dalgaard M (2006) Diisobutyl phthalate has comparable anti-androgenic effects to di-n-butyl phthalate in fetal rat testis, Toxicology Letter 163, 183-190**
- 50. Boberg J, Metzдорff S, Wortziger R, Axelstad M, Brokken L, Vinggaard AM, Dalgaard M, Nellemann C. (2008). Impact of diisobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. Toxicology 250(2-3):75-81.**
51. Axelstad M, Hansen PR, Boberg J, Bonnichsen M, Nellemann C, Lund SP, Hougaard KS, Hass U. (2008). Developmental neurotoxicity of propylthiouracil (PTU) in rats: relationship between transient hypothyroxinemia during development and long-lasting behavioural and functional changes. Toxicol Appl Pharmacol. 232(1):1-13.
52. Axelstad M*, Hansen PR, Christiansen S, Nellemann C, Kiersgaard MK, Hass U (2008) Effects of developmental exposure to the UV-filter OMC in rats. Poster presented at the Gordon Conference on Environmental Endocrine Disruptors, June 8-13 2008, Waterville Valley, NH, USA
53. Axelstad M*, Hansen PR, Christiansen S, Kiersgaard MK, Nellemann C, Hass U (2008) Effects of developmental exposure to the UV-filter OMC in rat offspring. Free communication at the 36th Annual Meeting of the European Teratology Society, 21-24 September 2008, Edinburgh, Scotland
54. Frederiksen H, Taxvig C, Hass U, Vinggaard AM, Nellemann C.(2008). Higher levels of ethyl paraben and butyl paraben in rat amniotic fluid than in maternal plasma after subcutaneous administration. Toxicol Sci. 2008 Aug 18. [Epub ahead of print]
55. Taxvig C, Vinggaard AM, Hass U, Axelstad M, Boberg J, Hansen PR, Frederiksen H, Nellemann C.(2008) Do Parabens Have The Ability To Interfere With Steroidogenesis? Toxicol Sci. 2008 Jul 22. [Epub ahead of print]
56. Hass U, Scholze M, Christiansen S, Dalgaard M, Vinggaard AM, Axelstad M, Metzдорff SB, Kortenkamp A (2007) Combined exposure to anti-androgens exacerbates disruption of sexual differentiation in the rat. Environ Health Perspect 115, 122-28.
57. Metzдорff SB, Dalgaard M, Christiansen S, Axelstad M, Hass U, Kiersgaard MK, Stolze M, Kortenkamp A, Vinggaard AM (2007) Dysgenesis and histological changes of genitals and perturbations of gene expression in male rats after in utero exposure to antiandrogen mixtures. Toxicol Sci 98, 87-98.

58. Christiansen S, Scholze M, Axelstad M, Boberg J, Kortenkamp A, Hass U.(2008) Combined exposure to anti-androgens causes markedly increased frequencies of hypospadias in the rat. *Int J Androl.* 31(2):241-8.
59. Christiansen S, Axelstad M, Scholze M, Kortenkamp A, Hansen PR* and Hass U. (2008) A Mixture of Dissimilarly Acting Anti-Androgens – a dangerous cocktail? Free communication at the 36th Annual Meeting of the European Teratology Society, 21-24 September 08, Edinburgh, Scotland
60. Hass U, Lund SP, Elsner J (1994). Effects of prenatal exposure to N-methylpyrrolidone on postnatal development and behavior in rats. *Neurotoxicology and Teratology* 16, 241-249.
61. Hass U, Lund SP, Simonsen L, Fries AS (1995). Effects of prenatal exposure to xylene on postnatal development and behavior in rats. *Neurotoxicology and Teratology* 17, 341-349.
62. Hass U, Hansen EV, Østergaard G (1995). Postnatal and Developmental Neurotoxicity Study – the need for an OECD Test Guideline. *TemaNord* 623:56-60.
63. Hass U (1996). Behavioural methods for assessing neurotoxic effects of organic solvents in animal models. *TemaNord* 531, 21-27.
64. Hass U, Lund SP, Simonsen L (1997). Long-lasting neurobehavioral effects of prenatal exposure to xylene in rats. *NeuroToxicology* 18, 547-552.
65. Hass U (1997). Developmental neurotoxicity study. *TemaNord* 524, 34-37.
66. Hass U (1997). The new OECD Test Guideline on developmental neurotoxicity study: Status and the potential for detection of behavioural effects of neuroendocrine disruptors. In: Umweltbundesamt (Ed.), *Effects of Endocrine Disruptors in the Environment on Neuronal Development and Behaviour – Current Knowledge, Assessment, Gaps-, Workshop*, ISSN 0722-186X
- 66a. Hass U, Hougaard KS, Lund S (1998). Inhalation exposure in developmental neurotoxicity testing. *TemaNord* 574, 40-43.
67. Christensen MM, Lund SP, Simonsen L, Hass U, Simonsen SE, Høy CE (1998). Dietary structured triacylglycerols containing docosahexaenoic acid given from birth affect visual and auditory performance and tissue fatty acid profiles of rats. *J Nutr* 128, 1011-1017.
68. Hougaard KS, Hass U, Lund SP, Simonsen L (1999). Effects of prenatal exposure to toluene on postnatal development and behavior in rats. *Neurotoxicol Teratol* 21, 241-250.
69. Hass U, Lund SP, Hougaard KS, Simonsen L (1999). Developmental neurotoxicity after toluene inhalation exposure in rats. *Neurotoxicol Teratol* 21, 349-357.
70. Hass U, Ladefoged O, Lam HR, Østergaard G, Lund SP, Simonsen L(2001). Behavioural effects in rats after prenatal exposure to dearomatized white spirit. *Pharmacol Toxicol* 89, 201-201.
71. Hass U (2003). Current status of developmental neurotoxicity: regulatory view. *Toxicol Lett* 140-141, 155-59.
72. Hass U (2006). The need for developmental neurotoxicity studies in risk assessment for developmental toxicity. *Reprod Toxicol* 22, 148-156.
73. Crofton KM, Foss JA, Hass U, Jensen K, Levin ED, Parker SP (2008) Undertaking Positive Control Studies as Part of Developmental Neurotoxicity Testing. A Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints. *Neurotox Teratol* 30, 266-87 (Jun 2007 Epub ahead of print).
74. Makris SL, Raffaele K, Allen S, Bowers Wj, Hass U, Alleva E, Calamandrei G, Sheets L, Amcoff P, Delrue N, Crofton KM (2008) A retrospective performance assessment of the developmental neurotoxicity study in support of OECD test guideline 426. *Env Health Perspect* Aug 12 (Epub ahead of print)
75. Hossaini A, Dalgaard M, Vinggaard AM, Frandsen M, Larsen J-J. In utero reproductive study in rats exposed to nonylphenol. *Reproductive Toxicology* 2001, 15, 537-543.
76. Dalgaard M, Pilegaard K, Ladefoged O. In utero exposure to diethylstilbestrol or 4-n-nonylphenol in rats: Number of Sertoli cells, diameter and length of seminiferous tubules estimated by stereological methods. *Pharmacology and Toxicology* 2002, 90, 59-65.
77. Vinggaard AM, Nellemann C, Dalgaard M, Jorgensen EB, Andersen HR. Antiandrogenic effects in vitro and in vivo of the fungicide prochloraz. *Toxicology Science* 2002, 69, 344-53.
78. Wellejus A, Dalgaard M, Loft S. Oxidative DNA damage in male Wistar rats exposed to di-n-butyl phthalate. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 2002, 65, 813-24.

79. Dalgaard M, Hass U, Vinggaard AM, Jarfelt K, Lam HR, Sørensen IK, Sommer HM, Ladefoged O. Di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) induced developmental toxicity but not antiandrogenic effects in preand postnatally exposed Wistar rats. *Reproductive Toxicology* 2003, 17, 163–70.
80. Borch J, Vinggaard AM, Hass U, Ladefoged O. Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. *Reproductive Toxicology* 2004, 18, 53–61.
81. Vinggaard A.M., Christiansen S., Laier P., Poulsen M.E., Breinholt, V., Jarfelt K., Jacobsen H., Dalgaard M., Nellemann C., and Hass U. *Perinatal exposure to the fungicide prochloraz feminizes the male rat offspring*. *Toxicol.Sci.*, 85(2), 886–897, 2005.
82. Jarfelt K, Dalgaard M, Hass U, Borch J, Jacobsen H, Ladefoged O (2005). Antiandrogenic effects in male rats perinatally exposed to a mixture of Di(2-ethylhexyl) phthalate and Di(2-ethylhexyl) adipate. *Reprod Toxicol* 19, 505–515.
83. Taxvig C , Hass U, Axelstad M, Dalgaard M, Borch J, Andersen HR, Vinggaard AM (2007) Endocrine disrupting activities *in vivo* of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicol Sci.* 2007 Dec;100(2):464–73
84. Vikelsøe J, Thomsen M, Johansen E, Carlsen L and Rastogi SC (1998) Sources of phthalates and nonylphenols in municipal waste water. A study in a local environment. NERI Technical Report No.225. http://www2.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_fagrappporter/rapporter/FR225.pdf
85. European Union Risk Assessment Report, bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), European Chemicals Bureau, Volume 80.
86. Kjør J, Olsen P, Bach K, Barlebo HC, Ingerslev F, Hansen M, and Halling Sørensen B, (2007) Leaching of Estrogenic Hormones from Manure-Treated Structured Soils. *Environ. Sci. Technol.*, 41 (11), 3911–3917

付属書2
欧州委員会における取組

委員会スタッフの作業ドキュメント

**“内分泌かく乱物質に関する共同体戦略”の実現について
—人間と野生生物のホルモン系を妨げると疑われるさまざまな物質—
(COM (1999) 706)、(COM (2001) 262)、(SEC (2004) 1372)**

概要

1999年12月(COM(1999)706)、協議会と欧州議会への伝達委員会による“内分泌かく乱物質に関する共同体戦略”の採択に続いて、協議会は、委員会が定期的に作業の進展に関して報告するように勧告した。最初の経過報告書は2001年6月に採択された。2001-2003年の間の戦略の実現を要約した2番目の経過報告書は2004年10月に採択された(SEC(2004)1372)。本書は2004-2006年の期間の戦略の実現に関する3番目の経過報告書であり、更なる調査の対象となる物質の優先順序付け、研究の刺激、試験法の合意、あるいは法律の適応に関する活動の進展について説明している。

“内分泌かく乱物質に関する共同体戦略”は短期、中期、そして、長期の活動を含んでいる。短、中期の活動は、試験法、指導研究と監視活動の順位付け、そして消費者の使用と生態系暴露の具体的なケースを特定するために、“候補物質”に関する科学的データを集めることに視点をおいている。

長期の活動は、政策と共同体立法のレビューと可能な適応に焦点を当てている。“内分泌かく乱”はそれ自体が毒物学的な指標ではなく、人間と生態系に不利な結果をもたらすかもしれない、異なった種において様々なタイプの影響を生じる多くの活動メカニズムの1クラスであることを考慮すれば、主な短期活動は更なる内分泌かく乱影響の評価のための優先物質リスト確立である。この優先順位付けの作業は2000年に開始された。およそ600の化学物質(“候補”)が、選択、評価され、準備段階の優先リストが確立された。この作業は2006年末に終了した。

更なる評価のための準備段階の優先物質リストは、物質のネガティブリストではなく、それらの物質の内分泌かく乱の影響に関する詳しいデータを集め、その後の評価を行うための基礎を提供するものである。リストは段階的手法で仕上げられた。2000年と2006年の間に、委員会は物質の識別と評価に関する3つの研究を契約した。過去6年間に合計575の物質の内分泌かく乱作用が調査された。

優先順位付けに関して、このうち320の物質がED作用の形跡又は潜在的形跡を示すことが判ったが、一方、合計109の物質がED作用に関するデータ又は科学的な証拠が不十分なため、優先リストに残らなかった。その過程で147の物質が、重複記入又は混合物である、又は妥当性が疑わしいとして、評価から除かれている。内分泌かく乱の証拠又は潜在的証拠を有する物質の法的な状況の評価の結果は、それらの大部分が必ずしも内分泌かく乱に関連のない理由で既に禁止又は制限されるか、既存の共同体立法の下に採り上げられていることが判明した。

中期活動に関して、委員会及び加盟諸国はOECD - 内分泌かく乱試験法と査定タスクフォース(EDTA)に継続参加している。そのタスクフォースは1998年に内分泌かく乱物質のための合意された試験法を開発するという目標のために設立された。

最新の見積りではいくつかの環境と人間の健康効果のための合意された試験法が2007年に成立する予定である。更に、中期研究開発目標に触れれば、内分泌かく乱物質は、第5期(FP5-1998-2001)と第6期(FP6-2002-2006) EU研究フレームワークプログラムで扱われており、また、研究・技術開発及びデモンストレーション活動のためのヨーロッパ共同体の第7期フレームワークプログラム(FP7-2007-2013)でも扱われる。長期活動に関しては、2004年以來の関連する発展は、2006年12月18日に正式に採用された化学物質の登録、評価、認可及び制限(REACH)に関する規則の採用と、水(政策)枠組み指令の下、優先物質のための

環境基準を設定する指令の提案(2006)、あるいは植物防疫製品に関する指令91/414/ECを改訂するための規則の提案(2006)であった。

1. 背景

内分泌かく乱物質は環境に存在し、内分泌システムの機能を変える疑いを持つ化学物質(自然又は合成の工業用化学物質又は副産物)のグループであり、従って、損傷のない生命体、又はその子孫、又は(サブの)個体群に意に沿わない健康作用を引き起こす。

野生生物では、内分泌かく乱物質は、いくつかの種における異常と生殖機能の損傷を引き起こすこと、及び、免疫性、行動上、骨格上の奇形の変化に関係することが明確に示された。人間においては、内分泌かく乱物質が最近の数10年にわたる人間の健康パターンに見られる明らかな変化を引き起こすことが指摘されている。これらは、いくつかの地域における精子の数の減少傾向、生殖器奇形を持つ男子の出生数の増加、ホルモンに敏感であることが知られているあるタイプのがんの発生数の増加を含む。更に言えば、神経の発達、損傷と性的な行動の間に関連があることが示された。内分泌かく乱の環境と健康に対する潜在的衝撃を指摘するために、委員会は1999年12月に“内分泌かく乱物質のための共同体戦略”に、協議会と欧州議会への情報伝達システムを取り入れた。この戦略はとりわけ物質の識別、監視、研究、国際協力、及び一般の人々とのコミュニケーションに関する数々の活動を挙げている。2000年10月26日、欧州議会は、予防原則の適用を強調し、委員会に対して即座の処置を要する物質を特定するように呼びかける決議を採択した。

2000年3月30日、環境協議会は、予防原則、迅速で効果的なリスク管理戦略を発展させる必要性、一貫した総合的な化学物質政策の必要性を強調した“委員会伝達に関する結論”を採択した。協議会は一定の間隔で作業の進捗を報告することと、第1回を2001年前半に実施することを委員会に要請した。

2. 短期的活動における進捗

2005年11月¹に採択された健康と環境リスクに関する科学委員会(SCHER)の見解¹で強調されているように、“内分泌かく乱はそれ自体が毒物学的な指標ではなく、異なった種に対する様々な種類の影響をもたらす多くの活動メカニズムの1クラスであり、人間と生態系に不利な結果をもたらすかもしれない”。従って、短期的な活動は内分泌かく乱作用に関する最新の科学情報の収集の必要性和それが人々と野生生物にどの程度影響しているかに焦点を合わせた。内分泌かく乱作用の更なる評価のための物質の識別と優先順位付けの作業が続き、準備段階の優先物質リストが確立された。

2.1. 内分泌かく乱作用の更なる評価のための優先物質リストの確立 (添付1、図1参照)

2.1.1. 経緯

2000年から2006年の間、委員会は内分泌かく乱作用に関する物質の識別と評価の3つの研究を契約した。2000年6月、内分泌かく乱作用の更なる評価のための優先物質リスト確立のための研究一優先度設定2の基礎としての物質の“候補リスト”の作成² (BKH-研究)は553の候補物質のリストを確立した業界関係者、加盟国及び毒物学、生態毒性、及び環境の科学委員会 (CSTEE)は、対応について諮問を受けて、それぞれ提案を行った。更に、内分泌かく乱作用又は潜在的内分泌かく乱作用を示す118の物質の最初のリストが確立された。内分泌かく乱作用の証拠又は潜在的証拠を示すこれらの118の物質のうち、109の物質は既存のコミュニティの法律に既に扱われていた。2002年、“十分なデータがない435の物質に関する情報収集”³に関する追跡調査が実行された (RPS-BKH-研究)。これは、評価方法論の改良と、“候補リスト”上の残り435の物質の調査を目的とし、環境に残留し人間又は野生生物の暴露が予想される高生産量化学物質 (HPVC)であると特定された候補物質に焦点を合わせた。これらの評価基準に従って204の物質が特定され、それらの内分泌かく乱作用が評価された。そのうち147は内分泌かく乱作用又は潜在的内分泌かく乱作用の明確な証拠を示すものと特定された。内分泌かく乱作用の明確な証拠を示す物質については、人間又は野生生物に対する暴露の懸念がないか調査された。これらのうち、84は高度な暴露の懸念、5は中程度の、

¹ SCHER Opinion on “Endocrine Disrupting Chemicals: a Non-animal Testing Approach” (BUAV report-2004)

² Study “towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrinedisruption – preparation of a candidate list of substances as a basis for priority setting” BKH, 2000

³ Study on “gathering information on 435 substances with insufficient data”, RPS-BKH, November 2002.

4)は低い暴露の懸念を示した。

内分泌かく乱作用又は潜在的内分泌かく乱作用を示す147の物質の内、129は既存のコミュニティの法律に既に記述されていた。2002年の研究では、172の候補物質が主に低生産量化学物質(LPVC)であると考えられるため、まだ評価されていないと報告された。

2.1.2 “低生産量化学物質に焦点を当てた内分泌かく乱物質の優先リストの強化に関する調査”(DHI－調査)

2005年11月、欧州委員会(環境総局)は更なる調査⁴を実行するために、残る低生産量化学物質(LPVC)に焦点をあてた更なる研究を“DHI Water and Environment”に委託した。この調査を開始するに当たって、委員会はまた、以前の毒性、生態毒性及び環境に関する科学委員会(CSTEE)⁵からの勧告を考慮に入れた。委員会は、環境に対する高度の放出又は高度の影響力を持つLPVCは優先度設定に関する以前の作業では十分カバーされていなかったと述べた。

作業を始めて、173の物質が前の調査から外され、22の物質が業界関係者により新たに候補として特定されることとなり、従って合計195の物質が評価の対象となった。これらの物質の最初の詳細な調査により、それらの多くがLPVCでもHPVCでもなく、生産量が10t/年未満であることが明らかになった。その上、88の物質はそれらが既存の化学物質データベース“ESIS”⁶に記載されておらず、既に使われていない兆候があり、又は単一のCAS N° に明確に特定されておらず、関連性が疑わしいことが判明した。従ってこれらの88の物質を除外することが決定され、107の物質が評価の対象として残った。

以前の調査と同じく、人間又は野生生物に対する内分泌かく乱作用の評価は次のスクリーニング基準、すなわち持続性、生産量、消費/使用の形態、環境濃度(範囲)、及び作用パラメタの妥当性、試験の信頼性、用量反応性、内分泌かく乱の強さ、内分泌かく乱構造活性相関、全身毒性との比較、人間と野生生物に対する暴露の懸念の評価を考慮に入れた内分泌かく乱作用の評価に基づいた。

⁴ Study on “enhancing the endocrine disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals”, DHI Water and Environment 2006

⁵ Opinion of the CSTEE on “two study reports for endocrine disrupters by WRc-NSF and BKH Consulting Engineers”, November 2003

⁶ ESIS: European chemical Substances Information System, DG JRC, European Chemicals Bureau

評価の結果は107の物質中34は、少なくとも1つの生物種における内分泌かく乱作用の明らかな証拠(カテゴリ1)、21は内分泌かく乱の可能性を示唆するいくつかの証拠(カテゴリ2)、52の物質は内分泌かく乱(ED)作用を決めるには不十分なデータを示し、あるいは、優先リストに含めるための科学的根拠がまったくなかった(カテゴリ3aか3b)。結果に関しては、添付2、物質のグループ分け、表1-5を参照のこと。更に、内分泌かく乱作用の明らかな証拠を示す34の物質について、人間又は野生生物(カテゴリ1)の暴露の関与が評価された。これらの物質については、極めてわずかな監視データセットしか利用可能でなかったため、暴露評価はEUSES⁷計算に基づくことを決定した。EUSESは、人と環境に対する化学物質の暴露の評価のための意思決定支援システムとして設計されている。34の物質のうち12の物質が高い暴露関与を示し、16の物質が中程度の暴露関与を、そして、6つの物質が低い暴露関与を示した。

内分泌かく乱作用の証拠、又は作用の可能性がある証拠を持つDHI-評価された物質の法的な状況の査定は、29の物質が既に禁止又は制限され、又は既存のコミュニティの法律に記述され、一方27の物質が制限も記述もされていないこと示した(添付2、物質のグループ分け、表1-3を参照のこと)。DHI調査の間、業界関係者、専門家、及び加盟国は当初より関与し、問題の候補物質に関する最近の科学的データ、及び更なる候補物質の識別が求められた。後に、かれらは再び2006年11月の最終報告書草稿のインターネット会議に参加した。そして、主に専門家が、単一の物質の評価と報告書のプレゼンテーションに関して回答を行った。産業界はこれら物質の評価の結果が完全なリスク評価結果として誤解されるかもしれないという懸念を述べた。更に、産業界は優先リストが内分泌かく乱作用の更なる評価のための物質のリストではなく、物質の最終的なリストと見られるのではないかと懸念を述べた。また、産業界はいくつかの評価された物質に関する科学的データを提供した。すべての受領されたコメントができるだけ考慮に入れられた。

DHI調査の最終報告書はDG ENVの内分泌かく乱物質ウェブサイト⁸で閲覧可能である。

2.1.3. 内分泌かく乱作用の更なる評価のための準備段階の物質優先リスト

優先リスト上の物質は、産業、農業及び民生用製品で使用される主に人工の化学物質である。内分泌かく乱作用の明らかな証拠ある物質は、多くの異なった化学物質のグループ、例えば、アルキルフェノールとその誘導体、安息香酸エステル類、塩素化パラフィン類、フタレート、ダイオキシン/フラン、トリアジン誘導体又はPCBに属する。

物質の更なる評価のための準備段階の優先リストは、物質のネガティブリストではなく、それらの物質の内分泌かく乱の影響に関する詳しいデータを集め、その後の評価を行うための基礎を提供するものである。リストは現在、合計428の物質を含む。そのうち、194の物質は内分泌かく乱作用の明らかな証拠を示し(カテゴリ1)、125の物質は、内分泌かく乱作用の潜在的証拠を示した(カテゴリ2)。一方、109の物質はリストに含めるための科学的な根拠がないかあるいは決定するに不十分なデータを示した(カテゴリ3aか3b)。

優先順位設定の基礎となるすべての科学情報を包括するデータベースが確立された。それは3つの調査で集められた人間の健康と野生生物への影響に関する科学的データと典拠を、また、その科学的根拠で結論づけられた優先順位によるカテゴリとを、透明な方法で提示している。このデータベースの編纂は、DHI調査の結果の1つであった。データベースはDG ENVの内分泌かく乱物質ウェブサイト⁹で閲覧可能である。

⁷ EUSES: European Union System for the Evaluation of Substances

⁸ http://ec.europa.eu/environment/endocrine/index_en.htm

⁹ http://ec.europa.eu/environment/endocrine/index_en.htm

将来は、更にリストを箇条書きにする方法を開発してデータベースに関する作業を行う計画である。これはリストに物質を含めたり除外することができることを意味する。開発すべき方法論は、専門家、加盟国、及び業界関係者と広範に議論する必要がある。かくして、データベースはリスクを適切に管理するために、物質を必要に応じて常に関連法律に供給可能とすることを確実にする“動的な作業リスト”として役立つであろう。優先物質(カテゴリ1とカテゴリ2)の法的な状況の評価の結果は、全体で269物質は既に禁止もしくは使用制限を受けるか、あるいは既存のEU法で対応済みであり、51物質は使用制限も、対応もされていなかった。

3. 中期活動での進歩

中期活動の一部として、委員会は、欧州連合からOECDへの提案を取り纏めるため、加盟国と密接に連携し、試験法開発と検証をサポートしている。中期活動には研究開発も含まれている。

3.1. 内分泌かく乱物質の検出と評価

内分泌かく乱化学物質の識別と評価のための合意された試験戦略/方法の可用性は、これらの化学物質によって引き起こされる潜在的危険から人々と環境を保護することを目的とする包括的な法的措置のための基本的要件である。

委員会はテストガイドラインプログラムの国家コーディネータの権限の下において1998年に設定されたOECD内分泌かく乱物質試験法と評価特別委員会(EDTA)に関与している。特別委員会の目的は国際的に整合性のとれた試験法戦略を開発することであり、また化学物質の潜在的内分泌かく乱特性を評価する新しいテストガイドラインの開発又は既存のテストガイドラインの改訂を課された異なるサブグループの作業を調整し、監督するものである。特別委員会は2007年春に10回目の会合を行った。

最新の予測では、人間の健康のための合意された試験法は2007年に成立する予定である。特にエストロゲン作用、子宮肥大試験法のためのin vivo試験ガイドラインは2007年の終わりまでに利用可能となる可能性が最も高い。ハーシュバーガー試験法や改訂された試験ガイドライン407のような、他のin vivo試験ガイドラインの草稿は作成中であり、2008年以後に利用可能になるであろう。環境作用のための試験法は魚類の選別試験法、両生類変態試験法、及びいくつかの無脊椎動物の試験法(例えば、カイアシ類試験法)を含んでいる。最初の合意したテストガイドラインは2008年までに利用可能になると予想される。また、EDスクリーニングのための代替の非動物実験方法はOECDの主催で進行中である。特に、in vitroのエストロゲン受容体(ER)転写活性化分析を用いるアゴニストエストロゲン評価のOECDテストガイドライン草稿は日本から提出され、今年の初めにピアレビューされた。EC/JRCは(ER)結合試験法、アンドロゲン受容体(AR)結合試験法、及びステロイド合成試験法の検証試験に関して米国及び日本と協力している。

OECDの主催で現在、予備認証中のED試験法の概観を添付3に述べる。

3.2. 研究と開発

第5期フレームワークプログラム(FP5、1999-2001)においては、6000万ユーロ以上が内分泌かく乱物質を扱う23のプロジェクトに費やされた。これら大部分のプロジェクトに関する最終報告書は閲覧可能¹⁰である。

¹⁰ http://ec.europa.eu/research/quality-of-life/ka4/ka4_reports_en.html

欧州委員会の内分泌かく乱物質に対する戦略による、研究活動の強化の呼びかけへの直接の応答として、CREDO集団(ヨーロッパにおける内分泌かく乱の研究の集団)が設立された。¹¹ これは2003年4月に開始されており、2007年まで続くであろう。総予算およそ2000万EURの4つのプロジェクトがヨーロッパの63の研究所を擁するこの集団に参加した。この集団はEDENプロジェクト¹² によって調整された。CREDOは既に現在まで内分泌かく乱に関する知識の向上に大きく貢献した。

FP5の下で資金供給されるこれらのプロジェクトは、様々なグループの内分泌かく乱物質の危険とその恐れの特徴付け; 生体標識と出生コホートの使用を含む暴露評価の疫学的研究アプローチ; 毒性分析のための新しい手段と試験法の開発; 発病における遺伝的感受性の役割; そして'現実の'暴露状況(すなわち、低用量と多重暴露)における様々な器官の発病のメカニズムの研究など多くの問題に焦点を合わせた。また、内分泌関連の生殖上の影響も広く研究され、特に様々な化学物質の暴露とさまざまな動物モデルと人体研究における生殖パラメタとの間の相関関係が示された。

更に、プロジェクトはいくつかの化学物質の神経行動学的影響を観測した。特に、高いポリ塩化ビフェニル(PCB)血清濃度は子供達の貧弱な運動支配系機能に関連付けられた。最後に、内分泌かく乱物質の多重作用に関する研究は、形態学的な変化が示されない幾つかの研究と矛盾する結果となった。他方、他の研究は、作用とその詳細なメカニズムを見出し、ヒトの生殖臓器以外の臓器に対するリスク評価を推奨した。

第6期フレームワークプログラム(FP6、2002-2006)は、内分泌かく乱に関連する異なる課題を対象とした。FP6の終りまでには、内分泌かく乱物質の領域に少なくとも何らかの関連ある10のプロジェクトに、合計およそ5000万EURのECの出資による資金が供給された。2004年のヨーロッパの環境と健康アクションプランの採用は、このアクションプランの目標の1つが、このアクションプランの勧告の1つであるリスク軽減手段を調整する観点で、内分泌かく乱物質の健康上の影響¹³ を理解することであり、調査のための刺激となった。最近発表されたアクションプランの中期レビュー¹⁴ は、リスク軽減手段を調整するメカニズムのより良い識別に著しい進歩を認めた。しかしながら、“優先する疾病の研究を適切な政策過程と情報システムにリンクすることに、より多くの作業が必要である”と認められる。

FP6に支持されるプロジェクトは、潜在的神経免疫又は内分泌系介在性作用を有する化学物質の暴露後の健康結果の研究、あるいはそれらの検出のための試験法を開発することに焦点を合わせている。また、幾つかのプロジェクトは統合環境と健康リスク評価との関連でこの問題を取り上げた。ヨーロッパの32の参加グループから成る共同研究センター(JRC)が率いる統合プロジェクトREPROTECT¹⁵ が910万EURのECの出資と、5年間の総予算1320万EURで始動した。

目的は生殖毒性の領域でコンセプチュアルフレームワークを検証して、先進技術を利用して相当数の代替の試験法を開発することである。そして、このプロジェクトでは、(抗)エストロゲン様と(抗)アンドロゲン様化合物を評価する6つの試験法が最適化されて、現在、検出力の分析が行われている。これらのうち2つの試験法がOECDにおいて検証が続けられている。これらのin vitro試験法は、現在の生殖毒性試験法で必要な動物数を実質的に減少させることに貢献するであろう。その上、このような方法には、ヒトの細胞や受容体を使用することが可能であり、時間や費用、使用動物数の削減といった以上の利点がある。

¹¹ <http://www.credocluster.info/>

¹² <http://www.edenresearch.info>

¹³ http://ec.europa.eu/environment/health/index_en.htm

¹⁴ http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/com/2007/com2007_0314en01.pdf

¹⁵ <http://www.reprotect.eu>

CASCADEプロジェクトは2004年に、5年間に1440万EUR¹⁶のECの出資で始まった。CASCADEは9つのEU加盟国からの24の研究グループを、食物中の化学物質残渣(特に内分泌かく乱性を有する化学物質)に関する研究の永続的な調整と統合のためのネットワークにまとめている。

更に、以下のプロジェクトは内分泌かく乱の分野に関連する。すなわち、小児がんと免疫異常の進行における遺伝毒性化学物質の暴露の仕組みに焦点を合わせるNEWGENERIS¹⁷、高感受性人口層への、長期の低レベル混合要素暴露の公衆衛生上の影響に焦点を合わせるPHIME¹⁸、食物中の多重化学汚染物質をスクリーニングする新技術に取り組むBIOCOP¹⁹、化学的危険をよりよく評価するための新しい手段とツールを開発するNOMIRACLE²⁰がある。INTARESE²¹は完全チェーンアプローチ(汚染の源、様々な生活環境への放出、分散、移動、暴露形態/皮膚接触/食物摂取、取入、吸上げ、用量、健康効果及び衝撃にわたる因果連鎖)に基づいて新しい統合リスク評価枠組みを作ることを目としている。それは家庭用化学品を含んでいる。2007年に始動した別の2つの統合プロジェクトHEIMTSAと2-FUNは、完全チェーン方法論を更に強化し、内分泌かく乱化学物質を含む環境ストレス源からの健康衝撃と、それらのストレス源と他のストレス源の組合せ暴露の健康衝撃の金銭的見積もりを含めるよう拡張することを目指している。これらのプロジェクトはコミュニティ方針に対する内分泌かく乱物質などの化学物質にリンクされた健康衝撃を評価するためのコンピューターツールを開発する予定である。更に、最大4年間の100万ないし500万EURのECの貢献により、8件の“特定対象に対する研究計画”といくつかの調整活動/特定サポート活動が融資を受けた。

内分泌かく乱物質に関するFP6によって資金を供給されたプロジェクトは2007年6月に発表された環境と健康アクションプラン中期レビューレポート²²の付属文書に記載されている。内分泌かく乱物質研究に対する出資は第7期研究フレームワークプログラム(FP7、2007.2013)に続くだろう。例としてテーマ6‘環境’は特に内分泌かく乱物質を含む化学物質の健康衝撃に関連する研究に資金を供給する“環境と健康”活動を含むだろう。更に、JRCは人間の環境的ストレスの暴露と健康効果に関するJRCの作業において、内分泌かく乱に内在する生物学的基礎を研究するためにトキシコゲノミクス技術を開発してきた。また、JRCはケーススタディとして内分泌かく乱と代謝を使用して、化学物質の人間に対する危険要因の評価のための分子シミュレーション手法に関する専門家のワークショップ(2006)を開催した(報告書は準備中)。このワークショップでは、EDの有害性評価試験バッテリーに有用なin silico手法が見出され、現在、JRCがリードする検証プログラムで追跡評価が行われている。

内分泌かく乱物質関連の研究に関するウェブページがDG Research²³によって作成され、JRC²⁴は間もなくDG ENVが契約した研究で開発された内分泌かく乱化学物質のデータベースを主催する、(前記2.1.3項)

¹⁶ www.cascadenet.org

¹⁷ www.newgeneris.org

¹⁸ www.phime.org

¹⁹ www.biocop.org

²⁰ <http://nomiracle.jrc.it/default.aspx>

²¹ www.intarese.org

²² http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/com/2007/com2007_0314en01.pdf

²³ http://ec.europa.eu/research/endocrine/index_en.html

²⁴ <http://ecb.jrc.it>

4. 長期活動における進歩

長期の活動はEU内での化学品と物質の試験法、評価、及び使用を管理する現行法のレビューと適応を含んでいる。

4.1. 法的措置

4.1.1. 化学物質の登録、評価、認可、及び制限に関する規制(EC) N° 1907/2006(REACH)

化学物質の登録、評価、認可、及び制限に関する規制(REACH)²⁵ は、2006年12月13日の欧州議会の第2読会における票決に続いて、2006年12月18日に環境閣僚会議によって正式に採択された。REACHは2007年6月1日発効した。

REACHのキー要素の1つは非常に強い懸念のある物質の認可手順である。非常に強い懸念のある物質は、発がん性、変異原性又は生殖毒性のあるもの(CMR)、カテゴリ1と2である。更に、難分解性、蓄積性と毒性(PBT)のあるもの、及び非常に持続的であり非常な蓄積性(vPvB)を有する物質に関する規制上の基準に合致する物質も非常に強い懸念のある物質に属する。更に、CMR-、PBT-又はvPvB-基準でカバーされていない物質は、人間又は環境にCMR、PBT、及びvPvBと同等な重大かつ非可逆的作用を引き起こしている場合には、ケースバイケースで認定することができる。これらの物質は“同等な懸念”があるものと考えられ、REACHの付属文書XIVへの包含のための“候補リスト”に置くことが提案され認可に関して優先されている限り認可を受けることができる。“同等な懸念”のある物質は内分泌かく乱特性をもつものを含んでいる。非常に強い懸念のある物質の識別は、委員会又は加盟国の主導で開始され候補リストの確立に通じている。“内分泌かく乱物質の優先リスト”はこの過程において参照資料として使用することができる。加盟国がどのようにして同等な懸念のある物質を選び、提案を正当化するべきかに関する指導ドキュメントは現在、ヨーロッパの化学物質事務局²⁶ が作成中である。

認可手順は、認可を要する物質がそれ自身又は製品の構成要素として特定の目的に使用される前に、委員会が許可を与えることを要求している。今までのところ内分泌かく乱化学物質に関連した重大な人間の健康効果の多くは、睾丸がん、乳がん、前立腺がん、精液品質低下、睾丸停留、及び尿道下裂であることを考えれば、多くの物質が直接CMR物質としてこの認可手順の適用範囲に入る可能性がある。その上、野生生物種の内分泌システムへの悪影響の原因は、ある難分解性、生物濃縮性、及び毒性の物質に結びついていて、そのような物質はPBT-特性のゆえ認可が必要となるであろう。優先物質の多くは農薬と、例えば燃焼の間に形成されるその副産物であり、REACHの範囲に入らないことに注意するべきである。REACHに定義された“同等な懸念”のある物質としてケースバイケースで認可され得る内分泌かく乱物質優先リスト上の物質の数は少ないであろう。

²⁵ Regulation concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals, establishing a European Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) N° 793/93 and Commission Regulation (EC) N° 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC and 2000/21/EC

²⁶ RIP-4.3: Guidance document on Inclusion of Substances in Annex XIV

4.1.2. 水政策(水政策枠組み指令)の分野におけるコミュニティ活動のための枠組みを確立する指令2000/60/EC、及び地下水を汚染と劣化から保護するための指令2006/118/EC

水(政策)枠組み指令(WFD)は地表水と地下水の汚染防止のために良好な化学状態の環境目標を設定している。地表水に関しては、指令は化学汚染を制御するために2段階アプローチを規定している。これは国家レベルの活動とEU全域の活動を含む。国家レベルでは、加盟国は、それぞれの水域における著しい化学汚染物質を識別して(主な汚染物質の指定リストは指令書の付属文書VIIIに含まれている)、水質規格を設定し、排ガス規制手段を確立して、2015年までにこれらの規格を完成しなければならない。具体的なカテゴリは、“水生の環境中又は水生の環境を通して、ステロイド産生、甲状腺、生殖上又は他の内分泌かく乱関連機能に影響するかもしれない発がん性又は変異原性の性質を持っていると証明された物質と製品又はこれらの分解生成物を含んでいる(付属文書VIII-グループ4)。これは、加盟国には水生環境を通して人間が内分泌かく乱物質に暴露することを防ぐための活動を行う義務があることを意味する。この活動は河川流域間で調整され、対策プログラムは、2009年に提出、2012年に運用しなければならない。

コミュニティレベルにおいて、WFDは化学汚染物質(第16条)による表面水の汚染に対する戦略を提示している。この戦略はコミュニティレベルにおける特別の懸念ある物質の識別、及びそのような物質に関する環境基準と排ガス規制の採択を含んでいる。最初の33の物質のリストは2001年に採択され(決議2455/2001/EC)、そして、委員会は2006にこれらの物質のための環境基準を設定する指令(COM(2006)397)の提案を、関連するコミュニケーション(COM(2006)398)と共に採用した。これらの33の物質のうち21が2000-2003年の優先度設定の過程で、内分泌かく乱作用の証拠又は潜在的証拠が発見された内分泌かく乱物質の候補物質であることに注目するべきである。物質のリストは4年ごとに再検討され、内分泌かく乱性に関する更なる知識が収集されたとき、コミュニティレベルでの将来の物質優先順位付け活動にこの情報を考慮に入れることができる。最初の優先物質リスト上の、ある物質は“優先危険物質”として分類することができて、20年の時間の枠内ですべての放出、損失、及び排出の段階的な廃止を完了しなければならない。内分泌かく乱作用は物質又は物質グループをこのグループに分類するための重要な要素になるであろう。

地下水に関して、新しい地下水指令(WFDの第17条の下で開発)は2006年12月12日に採択された(指令2006/118/EC)。それは、加盟国に対して、地下水へのリスクを示すすべての汚染物質について、最小限のリスト(指令書の付属文書III)を考慮に入れて、限界値(地下水の良好な化学状態を定義する地下水規格)を定めることを要求している。内分泌かく乱物質は明示的に記載されていないが、加盟国がそれらが地下水汚染の危険性があると考えたら、原則として、この条項を適用することができる。また、この提案は汚染物質濃度の著しい増大傾向を特定して、逆転する要求をしており、内分泌かく乱物質による汚染の危険性があるとみなす場合、事実上内分泌かく乱物質をカバーする。

防止に関して、汚染物質の直接及び間接的な混入は水(政策)枠組み指令と地下水指令の両提案(提案書の第6条)によって規制される。これにより2013年に撤廃される予定の指令80/68/EECの保護体制の連続性は確保される。この原則に沿って、地下水汚染を避けるために有害物質の混入は防がなければならない、また、非有害汚染物質の混入は制限されなければならない。

4.1.3. 植物防疫製品の市場投入に関する指令91/414/EEC

指令91/414/EECは植物防疫製品の認可、使用、及び管理のためのコミュニティの整合性のとれた枠組みを提示している。1992年に、欧州委員会は欧州連合の中で植物防疫製品の中に使用されるすべての活性成分の、コミュニティ全体によるレビューの過程を始動した。レビューは、活性物質を、食物連鎖の中で人間の健康、環境、生態毒性、及び残留物に関して安全に使用することができることを確実にするであろう。これは2008年に完了するであろう。植物防疫製品の中に使用される活性物質にあり得る内分泌かく乱特性の問題は、調和した国際的に合意された試験法プロトコルの欠如のためにまだ完全にリスク評価手順に取り入れられていない。しかし、EUの所管官庁は、このギャップをつきとめ、“特定された候補”が本当の内分泌かく乱物質であるかどうかを確認することができる試験手順の必要性を強調した。この事に対する作業はOECDで進行中であり、合意された試験法が是認されれば間もなく、これらが共同体リスク評価で適用される評価手

順と統合されると予想される。この間、物質が現在評価されている場合と、内分泌かく乱の潜在性が疑われる場合は、追加試験が要求され、実行されて、結果が評価された。今までのところ数個の物質が“魚類一生涯試験”と呼ばれる特定のプロトコールにより試験された。これらの試験の結果は所管官庁にそれらの物質に関する疑問を解決させた。近い将来解決すると予想される技術的側面は別として、活性物質の内分泌かく乱特性の考慮は意志決定において、より大きい優先度を得るだろう。2006年7月に委員会によって採用された指令91/414/EECを改定する新しい提案は、植物防疫製品中の活性物質のヒトの暴露が、提案された現実的な使用条件の下で無視し得ない限り、内分泌かく乱物質として特定された活性物質の使用を禁止する条項を含んでいる。

4.1.4. 生物致死性製品の市場投入に関する指令98/8/EC

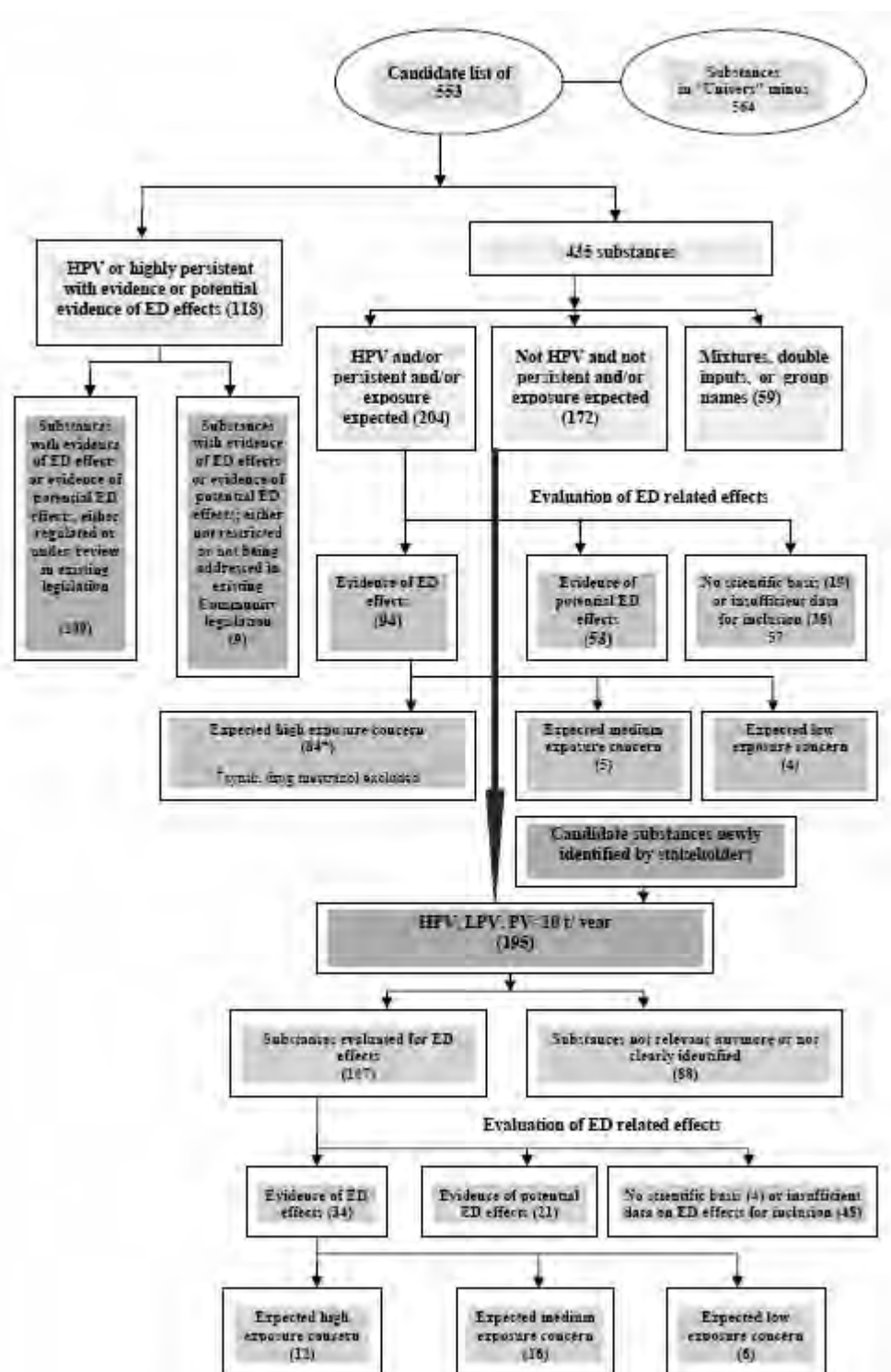
この指令の中で、人と環境に対するリスクが査定された後に、活性物質の生物致死性製品への利用が評価され認可されている。また、この査定は内分泌かく乱化学物質の暴露から生じる潜在的悪影響を考慮に入れている。内分泌かく乱作用の査定のための具体的な評価戦略はこの指令の中で明示的に記述されていないが、この物質の使用に関するリスクを査定する際に、これらの悪影響は考慮に入れられる。また、これらの局面は、特定の“PBT作業部会”で殺生物剤の難分解性、生物濃縮性、及び毒性を査定しながら考慮される。また、他のすべての法的措置と同じく、指令98/8/ECもOECDレベルで標準化された試験法の最終承認により恩恵を得るだろう。

4.1.5. ホルモン、又は、甲状腺ホルモン産生阻害活性及びベータ作動性を持つ特定物質の牧畜業における使用の禁止に関する指令96/22/EC

エストロゲン、ゲスターゲン又はアンドロゲンの作用を持つ物質の使用は、指令2003/74/ECによって修正された通り、ホルモン、又は、甲状腺ホルモン産生活性とベータ作動体を持つ一定の物質の牧畜業における使用の禁止に関する指令96/22/ECによって制限されている。この指令は家畜の成長促進のためのホルモン作用を持つ物質の使用を禁止し、他の目的のために食用動物に与えても良い正確な環境を識別している。2006年10月14日、すなわち、条項5aに制定された過渡的な期間の満了日以降、17 β -エストラジオール又はそのエステル様誘導体は牛、馬、羊又はヤギの発情期誘導に使用してはならない。

添付1: 優先リストの確立

図1: 内分泌かく乱(ED)作用の更なる評価のための優先物質リストの確立



添付2: DHI研究 2005/2006 において評価された物質のグループ分け

表1: 既存のコミュニティの法律の下に制限されていない、又は現在採り上げられていないED作用の証拠又は潜在的証拠がある物質 (27物質)¹

Group name	CAS Number	Substance	Status under Dir 76/769/EEC 28 or adaptations to technical progress ²	Status under Reg 793/93/EEC ³	Status of review under Dir 91/414/EEC ⁴	Other Risk Assessment Instruments	Other Risk Management Instruments	Other Hazard Identification Instruments
Alkylphenols and derivatives	99-71-8	4-sec-Butylphenol = 4-(1-Methylpropyl)phenol						
	1131-60-8	Cyclohexylphenol						
	3115-49-9	Nonylphenoxyaceticacid						
	27193-28-8	Phenol(1,1,3,3-tetramethylbutyl) octylphenol ⁵						
Benzophenones	131-55-5	Benzophenone-2,(Bp-2), 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone						

¹ These substances have not been specifically evaluated in the past because they were considered as having a low priority due to their low production volumes and the fact that, at that point in time, there was no toxicological knowledge on their possible endocrine disrupting effects available.

² Directive 76/769/EEC relating to restrictions on marketing and use of certain dangerous substances and preparations, or adaptations to technical progress (ATP) of Dir 76/769/EEC

³ Regulation (EEC) No.793/93 on the evaluation and control of the risks of existing substances

⁴ Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market

⁵ Despite the fact that this substance is not a priority substance under Reg. 793/93/EC, UK has put this substances on its national priority list because of its similarity to nonylphenol

Group name	CAS Number	Substance	Status under Dir 76/769/EEC28 or adaptations to technical progress	Status under Reg 793/93/EEC	Status of review under Dir 91/414/EEC	Other Risk Assessment Instruments	Other Risk Management Instruments	Other Hazard Identification Instruments
	131-54-4	2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenon						
Bisphenols	77-40-7	Bis(4-hydroxyphenyl)-nbutan= Bisphenol B						
	92-69-3	4-Hydroxybiphenyl = 4-Phenylphenol						
	1806-29-7	2,2'-Dihydroxybiphenyl = 2,2'-Biphenol						
Camphor 3-derivatives	15087-24-8	Benzylidene camphor (3-BC)						
	36861-47-9	3-(4-Methylbenzylidene)-camphor						
Coumaric acid and derivatives	7400-08-0	p-Coumaric acid (PCA)						
	5466-77-3	2-ethyl-hexyl-4-methoxycinnamate						
DDT derivatives and metabolites	83-05-6	p,p'-DDA						
Flavonoids	491-80-5	Biochanin A						
	84-69-5	Diisobutylphthalate						
	4376-20-9	Mono 2 ethyl hexylphthalate						

		(MEHP)						
	131-70-4	Mono-n-butylphthalate						
	131-16-8	Di-n-propylphthalate (DprP) = Dipropylphthalate						
	84-75-3	Di-n-hexylphthalate (DnHP) = Di-hexylphthalate (DHP)						
Group name	CAS Number	Substance	Status under Dir 76/769/EEC28 or adaptations to technical progress	Status under Reg 793/93/EEC	Status of review under Dir 91/414/EEC	Other Risk Assessment Instruments	Other Risk Management Instruments	Other Hazard Identification Instruments
Siloxans	33204-76-1	2,6-cis- Diphenylhexamethylcyclo tetrasiloxane - 2,6-cis- [(PhMeSiO)2(Me2SiO)2]						
Other substances	77-09-8	3,3'-Bis(4- hydroxyphenyl)- phthalid = Phenolphthaleine						
	81-92-5	2-[Bis(4-hydroxyphenyl)- methyl]-benzylalcohol = Phenolphthalol						
	14007-30-8	2,2-Bis(4- hydroxyphenyl)-n-hexane						
	2581-34-2	3-methyl-4-nitrophenol						
	50-18-0	Cyclophosphamide						
	96-12-8	Dibromochloro-propane (DBCP)						

表2: 既に規制されるか、又は現行法に記述されているED作用に関する証拠のある物質(カテゴリ1) (20物質)

Group name	CAS Number	Substance	Exposure concern	Status under Dir 76/769/EEC28 or adaptations to technical progress	Status under Reg 793/93/EEC	Status of review under Dir 91/414/EEC	Other Risk Assessment Instruments	Other Risk Management Instruments	Other Hazard Identification Instruments
Alkylphenols and derivatives	104-40-5 4-	Nonylphenol (4-NP)	Medium	Dir 2003/53/EC 26th ATP. Dir 76/769/EEC (Restriction)					
Alkylphenol ethoxylates	20427-84-3 4-	Nonylphenoldiethoxylate (NP2EO)		Dir 2003/53/EC 26th ATP. Dir 76/769/EEC (Restriction)					
Benzenic acid and derivatives	94-26-8	n-Butyl phydroxybenzoate	Medium					Com Dec 1999/217/EC ⁶	
	94-13-3	n-Propylphydroxybenzoate	Medium					Dir 2002/72/EC ⁷	
	99-76-3	Methyl phydroxybenzoate	Medium					Dir 2002/72/EC; Dir 95/2/EC	
	120-47-8	Ethyl-4-hydroxybenzoate	Medium					Com Dec 1999/217/EC Dir 2002/72/EC;	

⁶ Commission Decision 1999/217/EC adopting a register of flavouring substances used in or on foodstuffs drawn up in application of Regulation (EC) No 2232/96.⁷ Directive 2002/72/EC relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs

Group name	CAS Number	Substance	Exposure concern	Status under Dir 76/769/EEC28 or adaptations to technical progress	Status under Reg 793/93/EEC	Status of review under Dir 91/414/EEC	Other Risk Assessment Instruments	Other Risk Management Instruments	Other Hazard Identification Instruments
	99-96-7	p-Hydroxybenzoic acid	Medium				Dir 2002/72/EC		
Benzophenones	131-56-6	2,4-Dihydroxybenzophenon = Resbenzophenone	High				Dir 2002/72/EC		
	611-99-4	4,4'-Dihydroxybenzophenon	Medium				Dir 2002/72/EC		
Biphenol	92-88-6	4,4'-Dihydroxy-biphenyl = 4,4'-Biphenol	High				Dir 2002/72/EC		
Organophosphor pesticides	1113-02-6	Omethoate	Low		Phased out in 2003 (Regulation (EC) 2076/2002)	Omethoate is a metabolite of dimethoate. Risk for consumer assessed when setting pesticider residues MRLs			
Organothio phosphor pesticides	13593-03-8	Quinalphos = Chinalphos	Medium		Phased out in 2003 (Regulation (EC) 2076/2002)				
Phthalates	131-18-0	Di-n-pentylphthalate (DPP) = Dipentylphthalate	Medium						Dir 67/548/EEC Annex I

Siloxans	556-67-2	Cyclotetrasiloxane	High						Dir 67/548/EEC ,Annex I
Group name	CAS Number	Substance	Exposure concern	Status under Dir 76/769/EEC28 or adaptations to technical progress	Status under Reg 793/93/EEC	Status of review under Dir 91/414/EEC	Other Risk Assessment Instruments	Other Risk Management Instruments	Other Hazard Identification Instruments
Other substances	25013-16-5	tert.-Butylhydroxy-anisole (BHA)	High				Dir 2002/72/EC; Dir 95/2/EC ⁸		
	1634-04-4	Methyl-tert-butyl ether (MTBE)	Medium		Priority substance covered by Reg. (EC) 143/97				
	10043-35-3	Boric Acid	Medium		Priority Substance covered by Reg. (EC) 2364/2000	Covered by Dir 91/414; phased out in 2004 by Decision 129/2004		Dir 2002/72/EC ; Dir 95/2/EC	
Other pesticides	6164-98-3	Chlordimeform	Low						PIC substance
	1582-09-8	Trifluralin	High			SCFCAH voted in March 2007 in favour of COM proposal not to authorize			

⁸ Directive 95/2/EC of the European Parliament and of the Council of 20 February 1995 on food additives other than colours and sweeteners

						the substance; publication of decision is Pending			
Group name	CAS Number	Substance	Exposure concern	Status under Dir 76/769/EEC28 or adaptations to technical progress	Status under Reg 793/93/EEC	Status of review under Dir 91/414/EEC	Other Risk Assessment Instruments	Other Risk Management Instruments	Other Hazard Identification Instruments
	96-45-7	Ethylene Thiourea (ETU)	Low			ETU is a metabolite of some dithiocarbamates. Risk for consumer assessed when setting pesticide residues MRLs			

表3: 既に規制されるか、又は現行法に記述されている、ED作用に関する証拠のある物質(カテゴリ2) (9物質)

Group name	CAS Number	Substance	Status under Dir 76/769/EEC or adaptations to technical progress	Status under Reg 793/93/EEC	Status of review under Dir 91/414/EEC	Other Risk Assessment Instruments	Other Risk Management Instruments	Hazard Identification Instruments
Alkylphenols and derivatives	106-44-5	p-cresol					Dir 2002/72/EC Com Dec 1999/217/EC	Dir 67/548/EEC, Annex I
Bisphenols	6807-17-6	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-pentane						Dir 67/548/EEC, Annex I
Benzophenones	131-57-7	2-hydroxy-4-methoxybenzophenone					Dir 2002/72/EC	
Nitrophenols	100-02-7	4-nitrophenol						Dir 67/548/EEC, Annex I
Organophosphor pesticides	2597-03-7	Elsan = Dimephenthoate						Dir 67/548/EEC, Annex I
PCBs	2051-60-7	PCB 1 (2-Chlorobiphenyl)					Reg 850/2004/EEC ⁹	
	2051-61-8	PCB 2 (3-Chlorobiphenyl)					Reg 850/2004/EEC	
	2051-62-9	PCB 3 (4-Chlorobiphenyl)					Reg 850/2004/EEC	
Pyrethrins	121-29-9	Pyrethrin			covered by Dir91/414;			Dir 67/548/EEC,

⁹ Regulation (EC) N° 850/2004/EEC of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on persistent organic pollutants and amending Directive 79/117/EEC

								Annex I
--	--	--	--	--	--	--	--	---------

表4: EDに関するデータが収集されていないか、十分でない物質（カテゴリ3aと3b）。現在、優先リストへの包含に対する裏づけはない。（48物質）

Group name	CAS Number	Substance
Alkylphenols and derivatives	87-26-3	2-sec-Pentylphenol = 2-(1-Methylbutyl)phenol
	27214-47-7	Phenol, 4-sec-octyl-
	26401-75-2	Phenol, 2-sec-octyl-
	18626-98-7	Phenol, 2-(1-methylheptyl)-
	1818-08-2	Phenol, 4-(1-methylheptyl)-
	17404-44-3	Phenol, 2-(1-ethylhexyl)-
	37631-10-0	Phenol, 2-(1-propylpentyl)-
	3307-01-5	Phenol, 4-(1-propylpentyl)-
	949-13-3	Phenol, 2-octyl-
	27985-70-2	Phenol, (1-methylheptyl)-
	3884-95-5	Phenol, 2-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-
	3307-00-4	Phenol, 4-(1-ethylhexyl)-
	1322-97-0	Ethanol, 2-(octylphenoxy)- = Octylphenoethoxylate
	27986-36-3	Ethanol, 2-(nonylphenoxy)-
	1009-11-6	4-Hydroxy-n-butyrophenone
	70-70-2	Hydroxypropiophenone
	628-17-3	4-vinylphenol (4-VP)
	7786-61-0	4-4-vinylguaiacol (4-VG)2

Group name	CAS Number	Substance
Phenylhydroxyphenylmethanes	28994-41-4	Phenyl-2-hydroxyphenylmethane = 2-Benzylphenol = o-Benzylphenol
Chlorphenole	25167-81-1	Dichlorophenol
Hexachlorocyclohexane and isomers	13171-00-1	4-Acetyl-1,1-dimethyl-6-tert.-butylindane
Naphthalene and derivatives	530-91-6	Tetrahydronaphthol-2
	15231-91-1	6-Bromo-2-naphthol
	1125-78-6	5,6,7,8-Tetrahydro-2-naphthol = 6-Hydroxytetralin
	90-15-3	1-Naphthol(*)
Bisphenols	3373-03-3	1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-n-heptane
	24362-98-9	1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-n-hexane
	620-92-8	Bis(4- hydroxyphenyl)methane
	52479-85-3	2,3,4,3',4',5'-Hexahydroxybenzophenon
Siloxanes	56-33-7	Diphenyltetramethyldisiloxane PhMe ₂ -SiOSiMe ₂ Ph
	10448-09-6	Phenylheptamethylcyclotetrasiloxane [(PhMeSiO)(Me ₂ SiO) ₃]
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons	53-96-3	n-2-Fluorenylacetamide
Methoxychlor and derivatives	14868-03-2	Bis-OH-MDDE
Organophosphor pesticides	682-80-4	Demefion
	2540-82-1	Formothion
	70393-85-0	Glufosinate-ammonium

Polychlorinated Biphenyls and biphenylethers	2050-68-2	PCB 15 (4,4'-Dichlorobiphenyl)(*)
Group name	CAS Number	Substance
Other substances	303-38-8	2,3-dihydroxybenzoicacid (2,3-DHBA)
	490-79-9	2,5-dihydroxybenzoicacid (2,5-DHBA)
	533-73-3	Hydroxyhydroquinone
	1222-05-5	1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta(g)-2-benzopyrane(*)
	33704-61-9	6,7-dihydro-1,1,2,3,3-pentamethyl-4(5H)indanone
	114369-43-6	Fenbuconazole
	118-56-9	3,3,5-trimethyl-cyclohexyl salicylate
	25550-58-7	Dinitrophenol(*)
	463-56-9	Thiocyanate(*)
	21245-02-3	2-ethyl-hexyl-4-dimethyl-aminobenzoate
	79-44-7	Dimethylcarbamyldchloride(*)

(*) Some information and legislative coverage for these substances is already achieved, but there is no data available in relation to endocrine disrupting effects that would support their inclusion into the priority list

表5: 入手可能な情報に基づいて内分泌かく乱物質でないと考えられる物質 (4物質)

Group name	CAS Number	Substance
Alkylbenzenes and Styrenes	104-51-8	n-Butylbenzene
Pyrimidines and Pyridines	314-40-9	Bromacil
Other substances	537-98-4	Ferulic acid (FA)
	545-55-1	TEPA

添付3: 現在OECDの主催のもとで（予備）認証中のED試験法の概観

Receptor Binding Assays				
hrER α	The FWA assay protocol utilizes the Pan Vera hrER α full length ER, and the CERI protocol utilizes the CERIER α , which contains the ligand binding domain of hrER α .	Binding	Validation starting in February 2007 in 5 labs	US lead international Collaboration study
hrAR	Human recombinant AR assay. Ligand binding domain expressed in E. coli.	binding	Under development. Approximately 900 chemicals have been tested.	METI Japan
hrAR	Human recombinant AR assay.	binding	Prevalidation starting now (initially as part of ReProTect.)	EC:ECVAM Bayer Lead International collaboration study
hrTR	Human recombinant TR assay. Full-length expressed in E. coli. TRs α 1 and β 1 binding assays.	binding	Under development. Approximately 60 chemicals have been tested using both receptors.	METI Japan

Transcriptional Activation Assays				
ER α	HeLa-9903 cells with plasmids containing hER α cDNA driven by SV40 promotor and luciferase reporter plasmid.	Stable, ag/antag	The agonist assay was peer reviewed in March- 07. International validation of the antagonist assay is planned for 2007.	CERI/MHLW Japan
ER α	HeLa-9903 cells: hER α /pcDNA3.1 receptor expressing plasmid and EREAUG- Luc+ reporter plasmid	Transient, ag	Pre-validated and Validated under domestic multi-lab. Validation using same test chemicals as hER α -HeLa-9903 cell line. Should be considered for (preliminary) Peer review.	CERI/MHLW Japan
ER α	MELN. MCF-7 cells with endogenous ER α + luciferase stably transfected	ag/antag	Validation in 2007. Report in late 2007 or early 2008	EC/ECVAM
ER α	ER-CALUX. T47 D (human breast cancer) cells with endogenous ER α + luciferase stably transfected	ag/antag	Going through optimisation. Validation planned for 2008	EC/ECVAM
ER α	LUMI cell, BG1 cells with endogenous ER α + luciferase stably transfected (XDS Inc)	ag/antag	Validation will be initiated in late 2007, done by late 2008. In delay.	US lead (ICCVAM) international collaboration study with ECVAM and JaCVAM
ER β	HeLa,hER β /pcDNA3.1,ERE-AUGLuc+	Transient, ag	Completed data collection for 250 compounds	CERI/MHLW Japan
AR	CV-1 cells hAR/pcDNA3.1 receptor expressing plasmid and AREAUG- Luc+ reporter plasmid	Transient, ag/antag	Pre-validated and validated in Japan in 4 labs, with 5 chemicals. Should be considered for (preliminary) Peer review.	CERI/MHLW Japan
AR	AR-Ecoscreen™ stable CHO clone	Stable, ag/antag	Pre-validated and validated in Japan in 4 labs, with 5 chemicals. should be	CERI/MHLW Japan

			considered for (preliminary) Peer review	
AR	PALM. PC-3 (prostate adenocarcinoma) cells stably transfected with hAR and luciferase reporter gene	ag/antag	Validation in 2007	EC/ECVAM
AR	CALUX. U2-OS (bone cell) cells stably transfected with hAR and luciferase reporter construct	ag/antag	Validation in 2007	EC/ECVAM
TR β	RXR co-transfected CHO cells are used	Transient, ag/antag	Under development, 150 chemicals tested so far	MHLW Japan
Aromatase & Steroidogenesis Assays				
	Aromatase, KGN cells.		Prevalidated	
	Steroidogenesis, H295R		Validation starts March 2007.	US lead international collaboration study

付属書3
フランスにおける取組

1. フランスの監督機関は現在、まだいずれの国家的化学物質規制の中においても内分泌かく乱特性を評価していない。しかしながら、フランスには、労働者と一般住民に対する一般的な環境要因のインパクトを評価するために、2つの主な政府プログラムがある。これらの、いわゆるPNSE(国家の環境と健康アクションプラン)とPST(職業的及び健康アクションプラン)のプログラムは、決められた時間の中での主な研究方針を決定する目標プログラムである。
2. PNSE(2004-2008)¹ は環境と人間の健康との関係の全分野をカバーしている。このプログラムの3つの主要な目標の1つは環境暴露に関連する病気を予防することである。45の活動のうち2つの活動が内分泌かく乱物質に関わり、アクション11は農薬と内分泌かく乱化合物を含む潜在的に危険な物質によって引き起こされる限られた水と土壌の汚染に、アクション34は公共の決断を容易にするために、数種の化合物(内分泌かく乱化合物が含まれている)の存在と影響に関する知識を向上させる研究プロジェクトへの呼びかけを強め調整する。
3. PST (2005-2009)は特に労働者を対象とするもので、PNSEを完結する。PSTは職業上のリスク防止策を改善することを目的とする。PSTの目標1は職業領域における知識を向上させることであり、公共の政策のもとで決定した研究手段の使用を調整し、公共の決断を容易にするために、数種の化合物(すなわち、内分泌かく乱化合物、特に生殖毒性あるもの)の存在と影響に関する知識を向上させる研究プロジェクトへの呼びかけを調整する。目標4はREACHヨーロッパ規制に従って、最も危険な化学物質CMR、PBT、vPvB、及び内分泌かく乱物質の代替原則を推進する。
以下で説明するプログラムはこれらの枠組みに含まれている。

政府のプログラム、数種類の化学物質: 産業既存の化学物質と農薬

4. 先に引用したプログラムに従って、フランスの生態環境と持続開発省(MEEDDAT)は特に内分泌かく乱化合物の評価に向けたプログラムPNRPEを開発する。
5. 内分泌かく乱物質に関する国家的調査計画(PNRPE)は前記の省(MEEDDAT)によって提案され、内分泌かく乱物質の調査に基づき予防と対策委員会(CPP)の勧告に従って2004年に始動した(結論は2003年12月に発表された)。
このプログラムは、公共事業体の要請に応えることを目的とし、選別方法論、活動のメカニズム、作用生体標識の探索、生物種と環境における内分泌かく乱物質の動きと変化、危険の識別、リスク評価、関連する社会経済的局面的監視についての基礎的及び実用的な多角的研究をサポートする。
研究提案の最初の要請は2005年5月に開始され、7つの構造的プロジェクトの選択にいたった。これらのプロジェクトの要約は <http://www.ecologie.gouv.fr/-Projets-retenus1917-.html> においてフランス語で閲覧可能であり、そして、結果の返還は2008年秋となるはずである。
調査のための新しい要請は、活動を続け、前7つのプロジェクトから提起された疑問に対応するために2008年6月に開始された。最終的にREACH手続きの枠組みの中で、PNRPEの設定は内分泌かく乱性を有するいくつかの化学汚染物質の毒性評価のための重要なツールである。

¹ Summary available in English on Afsset website :

http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/422558914315638390228017937553/2004_2008_pnse_abstract_en_260707.pdf

開発中の戦略、産業既存の化学物質：生殖と発育的毒性作用に関する毒性学的基準値(VTR)を構築する方法論

6. フランスでは、多数のプログラムに平行して、各省から健康機関に具体的な問合せが来る：“saisines”とも呼ばれる。（“生物学的又は化学物質の健康被害をより良く評価するツールを開発するための”）PNSEのアクション21によると、フランスの：環境及び職業的健康安全機構(AFSSET)は、いくつかのグリコール・エーテルを評価するための“委託”を受けた。そして、この枠組みの中で、AFSSETはこの領域でのフランスの専門的知識を向上させるために、生殖と発育上の毒性作用に基づくVTRに関する国家プログラムを確立した。
7. VTRは化学物質の暴露と人間に対する健康上悪影響との間の量的、及び/又は、質的な関係を確立することを可能にする値である(参照投与量(RFD)、又は最小危険レベル(MRL)とも呼ばれる)。VTRは、環境、ガイドライン値、勧告又は規格などの媒体の質的な目標を構築するために使用される。
8. AFSSETは、有毒物質に関する生殖と発育に関するVTRの構成のための参照方法論を提案し、そのようなVTRを構成するに当たってどの物質を優先するかを特定するために、INERIS、INRS、Afssa、InVS、ENSP、Cnam、Inserm、CNRS、CAPs、及びUIC² を集結する組織間特別専門委員会を設立する。ヨーロッパの状況におけるこの関心は最も警戒すべき生殖毒性化学物質に対してVTRの選択と構成に関する危機分析を発展させることを主な目的としている。二つの報告書³ が発行されている：
 - 生殖と発育に対する有毒物質のリストの識別、VTRを分析する階層構造の提案、2005
 - 生殖毒性作用に基づくVTRを構築するための参照図書、2006
9. 次に、生殖毒性 VTRの構成の開発方法の枠組みの中で、特別専門委員会によって、いくつかのモデル物質について提案された方法を“分析”するために予備試験を行った。この目的のために、AFSSETはいくつかの専門技術組織に対して、特別委員会の参照図書に従って、以下の物質⁴ に関する生殖毒性VTRを構成することを要求した：
 - トルエン (INERIS)
 - エチレングリコール エチルエーテル; EGEE (INERIS)
 - リヌロン (Vincent Nedellec Consultant)
 - ベンジルブチルフタレート; BBP (Vincent Nedellec Consultant)
 - Nonylphenol (ESMISAB/UBO, Technopôle Brest-Iroise)
 - ジ-n-ブチルフタレート; DBP (ESMISAB/UBO, Technopôle Brest-Iroise)
10. PNSE(アクション21と24)の枠組みにおける委託から発生したこの作業は生殖毒性作用に基づくVTRの開発方法、いつ数値的に弱いVTRが存在、又は非生殖毒性に関して開発できるかを詳しく述べている。特定の生殖毒性の影響に関するVTRの構成は以下によって正当化される。
 - 特定の暴露時間(短時間暴露)に起こる発育に対する影響の記述
 - 生殖毒性作用に固有の答えを得る必要性

² Afssa : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments ; CAP/TV : Centres Anti-poison et de Toxicovigilance ; Cnam : Conservatoire National des Arts et Métiers ; CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique ; ENSP : Ecole Nationale de la Santé Publique ; Ineris : Institut National de l'environnement et des risques industriels ; INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité ; Inserm : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale ; InVS : Institut de Veille Sanitaire ; UIC : Union des Industries Chimiques.

³ Reports are available in French only, but a poster is available in English on AFSSET website : www.afsset.fr

⁴ Reports are available in French only on AFSSET website : www.afsset.fr

11. フランスは生殖毒性化合物が必要な(必ずしも)内分泌かく乱物質でないことを認識している。しかしながら、試験される物質の多くが内分泌依存システムに干渉するので、それらは内分泌かく乱物質と疑われる。
12. これらの話題を続けるために、新しいPNSE 2が設立されつつあり、新しい生殖毒性VTR特別委員会が創設されつつある。
13. 更に、生殖と環境との相互作用に関するいくつかの監視システムが存在しており、主に(先天性奇形、死産…の)記録、フランスにおける生殖能力の疫学的観測、又は健康現象に関する記録を含んでいる(卵と精液の保存と研究の中心であるCECOSによる)。

付属書4
ドイツにおける取組

OECD加盟国の内分泌かく乱物質評価報告書作成へのドイツの取組

人の健康

このセクションは後日提供される。

環境:

法的背景

2.1.1 REACH

EU指令1907/2006 REACHの第57(f)条は内分泌かく乱物質の公認を促進するものである。これに関し、認証に必要な規準とデータはこれまでのところ詳細には規定されていない。各個別の場合で、問題の物質が‘ポイント(a)から (e)でリストされた他の物質と同等レベルのヒトの健康又は環境へのありそうな深刻な影響を起こす科学的な証拠がある’(CMR、PBT、vPvB)かどうかにかかわらず、なんらかの決定が必要である。

2.1.2 農薬

市場での農薬製品の配置についての指令98/8/ECは第38条で内分泌影響について指摘している: ‘既存の農薬製品に含まれる活性物質又はその懸念がある物質の中で、特定の潜在的影響に関連して危険識別のために試験が実施された結果が農薬製品の分類に至らなかったものは、それら懸念に関する他の正当な根拠がない限り、その影響に関連したリスク説明は必要でないこととする。が、その正当な根拠は農薬製品におけるどのような活性物質又は懸念物質の特性や影響からでも引き出せる。特に:

- 生物濃縮可能性の兆候
- 持続性
- 生態毒性試験における毒性/時間曲線の形
- 毒性研究(例えば突然変異誘発要因としての分類)に基づいた他の有害作用の兆候
- 構造上相似の物質に関するデータ
- 内分泌影響

まだ、指令は内分泌機構を明確化するために特別なデータ要件を含まない。従って、農薬製品—正当な疑惑によるものさ—の評価における内分泌影響に関する何らかの研究を求めることは困難である。

2.1.3 植物防疫製品

市場の植物防疫製品の配置に関係している現在の理事会指令91/414/EECは、内分泌かく乱に直接的な文献ではないが、一定の場合の魚類一生試験の要件などの慢性の研究の要件経由での間接的な文献である。水生試験と陸生試験における指導文書の中で、内分泌かく乱は試験戦略なしで指摘されている。しかし、植物防疫製品のマーケティングに対するEU規制案は、とりわけ、代用への候補である内分泌かく乱物質を指摘すると思われる。

2.1.4 薬剤

ヒト使用のための医薬品へのコミュニティコード関連におけるEU指令2001/83/ECは内分泌影響のどのような特殊評価も含まない。‘ヒト使用のための医薬品の環境上の危険性の評価指針’(EMA/CHMP/SWP/4447/00, 01.06.2006日付)は、親油性化合物と潜在的な内分泌かく乱物質などの一定の物質が、環境(予測環境濃度10ng/Lを発動値とする(PEC))中に放出された量とは無関係に、指摘される必要を示す文節を含む。

獣医医薬品へのコミュニティコード関連におけるEU指令2001/82/ECにおいて、ホルモン作用は第68条'1の中で直接指摘されるだけである。加盟国は、有効な彼らの全国的な立法の下での権能者だけが、同化作用の、反伝染性で、反寄生的で、抗炎症性で、ホルモンの、又は向精神性の特性を持つ獣医用医薬品として使われるであろう獣医学医薬品又は物質を所有しているか、あるいは彼らのコントロール下にあると保証できる、必要なすべての手段を取ることにしている。獣医薬製品の環境影響評価指針(CVMP/VICH/592/98最終版、30.06.2000日付)では、未婚の動物だけが扱われる時には、ホルモンがフェーズIにおける拡張された環境評価から除外される。フェーズII(CVMP/VICH/790/03最終版、2004年10月付)中で、内分泌かく乱は他のメカニズムとして扱われ、分けては言及されていない。

既存の概念と開発

環境評価について、内分泌かく乱は一般にリスク原因と見なされる。REACH以外にはドイツ(EU)の物質評価規制に内分泌かく乱についての試験戦略はない。内分泌かく乱についての一般的な選別はどのような法律の枠組みの中でも意図されていないので、兆候についてのケースバイケースの決定が必要だ。法的背景に依存するが、内分泌影響を査定するためにそれぞれ関連の研究を申請者に要求することは可能だ。

ドイツでこの問題に対処するために、‘魚類の中での内分泌媒介影響の解明’のための学界、産業、及び管理者の代表からなるワークショップが立ち上がった。ワークショップでは他にも議論された問題があるが、以下特に、

- 1) 内分泌かく乱環境の疑惑を構成している関連物質(例えば、PPP、工業薬品)は何か?
- 2) 証拠の重み:どの規則に基づいて、魚類選別試験(FSA)の決定がなされるか?
- 3) FSAの機能:作用モード(MoA)を明確化する? 規制の意思決定への試験結果の使用? 特定試験: (...)
- 6) どの試験が適当か:一生涯試験(FLCT)又は2世代の試験(2-GT)?

結果は下記のように出版された。

‘WORKSHOP-BERICHT Zur Entwicklung einer Prüfstrategie auf sexualendokrine Wirksamkeit einer chemischen Substanz bei Fischen’ Christoph Schaefers · Tobias Frische · Hans-Christian Stolzenberg · Arnd Weyers · Sabine Zok · Thomas Knacker (page 229-233 in ‘Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung, Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie’, Bd. 20, Nr. 3, August 2008).
今のところ、ドイツ語でのみ入手可能である。

ドイツの環境調査プログラムUFOPLANの出資を受け、R+Dプロジェクト20467454/02がOECD EDTAの特別な活動であるテストガイドラインプログラムへのドイツの貢献分の素材提供を進めている。プロジェクトは特に、最適の指標(複数)を識別し、どのようにFLCTが、魚類の中で環境ホルモンの毒性を決定するための特定試験として適用できるかについての概念的アプローチを含めるという観点から、ゼブラフィッシュ(ダニオレリオ)によるFLCTの更なる開発と(予備)認証を目的とした。この目的を達成するには、

- (1) 具体的なED関連の作用モードに応じた文献からの関連した魚類試験における既存のデータは編集され、評価されて、(2)具体的なED関連の作用モードを示す物質によるFLCT成果を要求するかもしれないデータギャップが識別された;(3) 三つのFLC(2世代)研究は試験物質トレンボロン、フルタミド、及びタモキシフェンを用いて実施された。最終的なプロジェクト報告は、2008年の終わりまでに出版される予定である。

REACH

REACHへの詳細な技術指導文書は、主に文書のパートR.7b⁵の付録R.7.8-5 102ページに規制の関係資料の中では初めて、情報要件における案内と化学の安全性評価の具体的な手順を与えている。指導文書は原則として3ステップのリスク指向手続を説明する。(1. 予備的なしるし、2. そのままの水生生物中の内分泌作用モードの具体的なしるし、3. 長期有害作用の特徴説明)。

内分泌影響と個体数減少関連作用間の因果関係などが、条項57 (f)に従って物質を認可させる基礎である場合、第3ステップは特別な役割を持つ。

農薬

どの概念もこれまで存在していない。内分泌かく乱について試験するかどうかの決定はケースバイケースの研究による。データ要求(2.1.2参照)に関する法的背景がないので、ほとんどの場合正当な疑惑があっても更なる研究を要求することができない。

植物防疫製品

法律の背景によると、慢性の研究は必要とされるので、植物防疫製品(PPP)の既存の内分泌影響を確認するための研究を行う。PPP中の内分泌かく乱物質を選別、評価するための一般的試験戦略はまだ存在しない。従って、内分泌かく乱について試験するかどうかの決定は、活性媒体のメカニズム、化学構造、及びその他を考慮して、ケースバイケースの原則(DMI-Fungicideポイント2.3に關してのケーススタディ参照)によってなされる。農薬の制度下で内分泌かく乱物質を評価するためにこれまで開発された現状と概念は、添付1として付加した論文「ドイツ認可手続(責任官庁:UBA、連邦環境庁)における植物防疫製品及びその有効成分の内分泌媒介有害作用の識別、解明、及び環境上の危険性の評価」中で要約される。

薬剤

どの概念も存在していない。活性媒体のメカニズムについての入手可能なデータにより、内分泌影響はより容易に検出され、また法律の背景(2.1.4参照)に従って更なる試験を要求することができる。

ケーススタディ

DMI防かび剤の内分泌影響はこの2～3年植物防疫製品認可の枠組みの中で評価された。

その仕事の結果としてプロジェクト報告書‘魚類への内分泌媒介影響の説明’。規制された環境上の危険性の評価における新しいOECD試験法と適用法の開発のための関連パラメータ’ができています。報告書はドイツ語でだけ入手可能だが、英語の摘要がある：

‘研究の範囲は、指標感度について一般的な結論を引き出し、評価において不確定要素を減らす助けとなる、環境ホルモンに関わる魚類一生試験の既存の経験の収集と比較であった。関連する個体数特性と、対応する直接的な性ホルモン作用モード(MoA)の最終指標が、感度の上で識別され、比較された。データベースは一生試験 (FLCT)とフラウンホーファーIMEによる2世代試験、そして文献から成る。結果に基づいて、UBA規制データベースからの試験データが、分類するために試された。2番目の部分で、潜在的内分泌かく乱化学薬品のための段階的試験戦略についての提案を引き出すため、感度と可能性指標の面で、魚類選別試験(FSA)からのバイオマーカーデータが個体数関連FLCTの最終データと比較され、評価された。エストロゲン受容体(ER)との相互影響の上で最も敏感な暴露期間は性的な成長フェーズである。最も敏感な明示指標は受精率、若年成長の感度、及び接近時の性的誇示の減少である。FSSAにおけるビテロゲン(VTG)測定は比較できるほど敏感である。下層試験としてそれを使う時に、偽陰性結果は予期されていない。アンドロゲン受容体(AR)相互影響は、アゴニスティックで、アンタゴニスティックなMoAの中で区別する必要がある。両方にとって、VTGはいつも強力なバイオマーカーであるわけではない。多産性は調査されたARアゴニストのための最も敏感な個体数関連指標である；FSAと2世代の試験において最も敏感な最終指標は強化された性的なステロイド11-ケト-テストステロンである。ARアゴニストについて、性的な発育は性比が最も敏感な指標であって、最も敏感な暴露期間である。十分に敏感なバイオマーカーは識別されなかった。性的な発育はまたアロマトラーゼ阻害薬への最も敏感な暴露期間であり、近い感度で以下のような異なる指標が明白になっている：性比、成長遅れ、又は多産性における雄性へのシフト。VTG縮小はFSAにおい

⁵URL:http://reach.jrc.it/docs/guidance_document/information_requirements_r7b_en.pdf?vers=30_07_08

だけでなく特定試験において敏感であった。調査された魚種は主としてホルモン受容体相互影響に比較できるほど敏感であった。作用の明示はすなわち、メダカとファットヘッド・ミノウが、ERアゴニスト原因で雌性化するのに対し、ゼブラフィッシュ類は彼らの男性発現フェーズの中に拘束されるように、異なることがある；ゼブラフィッシュは、アロマトーゼ阻害による男性化により敏感なようであるのに対して、ファットヘッド・ミノウは、若年成長の縮小の中でより敏感なようだ。2世代の試験がFLCTの代わりに行われるべきかどうかは母性作用転送の適合性に依存し、同等のデータの不足のため明確化はできなかった。FLCT又は2世代の試験の代わりに、短縮した試験手続を使うためには、MoAについての精密な情報は、短縮されたプロトコールが最も敏感な暴露期間と最も敏感な個体数関連指標をカバーすることに適切であるかどうかについての証拠と同様に、必要である。従って、短期生殖試験などの部分的なライフサイクル試験は決して適切であるはずがない。魚類の性的な成長試験(FSDT)はARアゴニストとアロマトーゼ阻害薬のための適正な試験であるかもしれない。初期のライフステージ又は若年成長試験は、FLCT結果の十分に安全な外挿をし、予備的な規制のリスク評価をDMI－防かび剤について行うために使うことができる’。

DMI－防かび剤の問題についての別の専門家の報告書はIndustrieverband Agrar IVA(産業組合農業)によって委任された。タイトル‘早いライフステージと若年成長試験(OECD 210、204、215)の成長データからのDMI防かび剤のリスク評価における魚類一生試験のNOECまでの外挿の安全評価’の名で、専門家の報告書をこの文書の添付2として添付する。

ドイツ産業

Verband der Chemischen Industrie e. V.(VCI - ドイツの化学の企業団体)は内分泌かく乱における政治的で、技術的な議論に従事している。試験戦略(毒物学上で、環境毒物学上で)についてのVCIの提案は、VCIウェブサイト上で公表される‘VCIの内分泌活性物質概要’におけるドキュメンテーションで参照される。
(<http://www.vci.de/default2~rub~0~tma~0~cmd~shd~docnr~116782~nd~.htm>).

VCIはまた‘魚類の中での内分泌媒介作用の特性説明’のためのドイツのワークショップに、参加した。

添付1

ドイツ認可手続(責任官庁:UBA、連邦環境庁)における植物防疫製品とそれらの有効成分による内分泌媒介有害作用の識別、解明、及び環境上の危険性の評価

1. 基本的に、UBAはEU指令91/414/EEGによって設定されたリスクベースの手続を、内分泌系のかく乱によって非標的有機体の中で有害作用を引き起こす植物防疫製品とそれらの有効成分(「内分泌かく乱物質」と呼ばれる)にも適用可能なことと考える。
2. この認識は生態毒性における科学の状態と一致していて、例えば指令91/414/EEGに関連した指針SANCO/4145/2000:「内分泌かく乱は、化学薬品の多くの既存の作用モードの1つとみなされ、それにより、正常な概念の枠組みの中で評価することができる。環境評価は観察された作用の、そのような作用を引き起こす個別の作用メカニズムとの生態学的な関連性に基づく。従って、リスク評価のための一般的な手続はまた内分泌かく乱物質について適用できる」に準拠する。
3. しかし、それぞれの生物学的試験法を含む非標的有機体における内分泌媒介作用の試験と評価のための適正な(すなわち内分泌特有の)戦略の入手可能性は信頼できるリスク評価のための必要不可欠な前提条件である。現在、非標的有機体のすべての関連したグループに対する(i)体系的に潜在的な内分泌かく乱物質を識別するため、(ii)機械的に内分泌媒介作用を特徴付けるため、及び(iii)それぞれエコロジカルな関連の内分泌媒介有害作用についての放置と規制間の許容濃度の閾値を確かに引き出すための、国際的に合意された、内分泌特有な試験と評価の戦略が欠けている。質的で、機械的な情報(選別試験)を導き出すための内分泌特有の試験手続、と同様に、頂点の指標(例えば成長、生殖、性的な発育)への内分泌媒介作用の量的な評価のための試験プロトコルの開発と国際的な認証がまさに進行中である(cf.OECD活動)。更に、内分泌物に特有なデータ要件は指令91/414/EEGやそれぞれの全国的な立法において明示的に示されていない。
4. 非標的有機体における内分泌媒介有害作用が、指令91/414/EEGに従って標準データ要件に基づいて、適正に評価されるかどうかという、この欠点は重大な懸念をもたらす。この不確実性は、内分泌系の意義と機能についての限られた知識しか手近にない有機体のグループにとって、及び／又は適正な試験プロトコルが存在していない(地上及び水中の節足動物、地上及び水中の軟体動物、両生動物、鳥類)にとって特に重大である。
5. 結果として、植物防疫製品とそれらの有効成分の網羅的で、体系的な内分泌に特有な評価は今日実現可能でなく、たぶん、また近い将来でも可能でないであろう。ヒトの健康リスク評価のために導き出された毒物学上で、臨床のデータからの外挿は、また他の非標的有機体の中で内分泌影響を評価する際の適用性は、限定されたものとなる。
6. 従って、植物防疫製品のための全国的な認可手続における内分泌媒介作用の評価はケースバイケースで、それぞれ証拠の重みアプローチに基づく。特定の物質(例えば報知者又はオープンな科学に関する文献によって提供された毒物学上のデータからの)の内分泌かく乱可能性の兆候があるならば、すべての入手可能な情報はそれらの再現性、もっともらしさ、意義、及び関連についてUBAによって評価される。特定の物質の内分泌潜在力が証拠の重みによって設定されて、非標的有機体の個体数への容認できない害についての懸念があるならば、機関は報知者に追加情報を要求している。要求された情報は、それぞれエコロジカルな関連の内分泌媒介有害作用についての放置と規制間の許容濃度の確かな閾値を引き出すことに十分に違いない。これは、内分泌物に特有な非標準研究(例えば水中軟体動物の)を行うために報知者を必要とするかもしれない。
7. 内分泌特有の試験と評価の開発は今日一国内的・国際的な両方のレベルで一魚類について最も多く進んだ。2007年12月に、「魚類における内分泌媒介作用の特性解明」(ドイツ語からの翻訳)という表題のワークショップが始まった。産業、規制当局、及び学界を代表するドイツからの専門家は魚類における内分泌影響についての(全国)試験と評価戦略の基本設計について合意した。ワークショップ規約はまさに最近一般に利用可能にされた(申し訳ないが、ドイツ語紙のみ添付。英語での出版物は進行中である。)。しかし、合意された戦略の強化と洗練に更なる仕事

- が必要である。この理由により、全国的な立法への実装はまだ実現可能でない。
8. 潜在的に影響された非標的有機体のための量的、生態的リスク評価に適切な高品質なデータが手近に、内分泌かく乱物質であると識別された具体的な植物防疫製品又はその有効成分について、得られるならば、指令91/414/EEGに応じた標準の評価ファクターがリスク評価に適切である。更に、一般にドイツで入手可能なすべてのリスク緩和手段はまたそのような場合に考慮されて良い。

添付2

専門家の報告

早いライフステージと若年成長試験(OECD 210、204、215)の成長データからDMI防かび剤のリスク評価における魚類一生涯試験のNOECまでの外挿の安全評価

Christoph Schäfers

Hans Ruffliによる翻訳

Fraunhofer-Institut Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME)

Auf dem Aberg 1

57392 Schmallenberg-Grafschaft

Schmallenberg, October 10, 2007

1. イントロダクション

抑制された標的酵素がアロマターゼなどに高い構造類似を示しているチトクロムP-450酵素であるので、意図されている作用メカニズム(標的菌類中のエルゴステロール生合成の抑制)に基づいて、デメチラーゼ抑制剤(DMI)-防かび剤グループの植物防疫製品の有効成分は内分泌かく乱の可能性を示す。アロマターゼは脊椎動物と軟体動物の中でステロイド生合成の中心的な酵素であり、それはテストステロンを17-β-エストラジオールに変換し、従って性の統制と性的な生理特性の表現について決定役割を果たす。これらの物質が脊椎動物の内分泌系に影響を及ぼすかもしれないという仮定はこのグループの何人かの代表によって哺乳動物、鳥類、及び魚類の上の長期研究において確認された。

この理由により、ドイツ登録当局はDMI防かび剤グループのすべての代表を潜在的な内分泌かく乱物質とみなしている。この「初期の疑惑」が、適当な研究を使って、予期されている環境の濃度域の上で指摘されるまで、登録証明は中断されている。当局とIVAの間の最後の議論で、例えば一生涯試験(FLCT)など、適切なデータが提出され、レビューされるという一定の条件の下で、登録証明が継続されることが合意された。この目的のため、暫定的な登録証明を考慮する規準を決定することが必要である。従って、現存する魚類の慢性研究(ELSなど)からのFLCT NOECの外挿を許すための適当な外挿ファクターが、議論されている。そのようなファクターを考慮することは容認できるリスクの初期評価を許し、すべての関連したリスク緩和手段(最小距離要件)を勘案させられる。ドイツ連邦環境庁(UBA)による評価において、ファクター5が提案された。

この外挿ファクターの強制力はすべての入手可能なデータに基づいた中間的な例としてフラウンホーファーIMEによって評価されることとし、問題があれば、修正されたファクターが提案されることとする。

2. 入手可能なデータと仕事の定義

UBAは内密に、すでに評価されたFLCTの研究報告を提供した。更に、社内資料は、秘密裏に収集された信頼できるデータなど、急性、慢性の魚毒性(OECD 203、204、210、215)上、潜在的な内分泌影響(魚類選別試験(FSA);魚類性的成長試験(FSDT))と生物濃縮可能性(OECD 305)、ならびにFLCTデータから構成される。更に、会社が様々なDMI防かび剤のアロマトターゼ阻害への文献評価を提供した。目的は、議論された外挿ファクターが広い範囲の性状をカバーすることを保証するように、できる限り違う物理化学の性状と潜在力を持つ多くのDMI防かび剤についての、違う研究から入手可能な指標を比較することであった。特に、入手可能な魚類研究は、次のことをするために評価された:

1. FLCTにおいて敏感な指標を識別する、そして次に:
 - 敏感な個体数の間の比率に関連した指標(例えば性比、成長、生殖)と二次性徴又はビテロゲニン(VTG)などの標示的バイオマーカー指標への比率を示す。
 - 内分泌媒介リスクについての違う指標の強制力を議論する。
2. 敏感なFLCTデータ(cf. 1)と早いライフステージ(ELS)、若年成長(JG)、FSAとFSDTデータを比較することによって:
 - ELS又はJG試験のNOECから外挿してFLCTのNOECを推定するために十分安全な規制の観点からのファクターを明らかにする、
3. それぞれの発見(cf. ポイント1と2)に関する試験済みの魚種の影響を評価する。感度における、指標に特有な違いと共通の特徴の傾向が示される。
4. 観察された内分泌媒介作用がリスク評価において最終的に関連しているかどうかを明確化するために、これらのデータを他の関連した生体毒物学的なデータ(例えば藻類)の最も敏感なものと比較する。

より少ない情報によって化合物に外挿するオプション、限界、及び最小の要件は評価される。認可に付随的な必要とされている研究を決めるためにELSNOCに適用された外挿ファクターの安全を評価することに加えて、DMI防かび剤のための特定試験戦略の開発に貢献する更なる情報が誘導された。

生物濃縮のような感度と化合物の物性の間だけでなく、in vitro試験の中とFLCTの間の感度の関連が、より明確な機械作用の全体像への貢献を提供するためと未来の規制の決定の安全を増大させるために設定される。

FSAがFLCTのために安全なトリガー又は距離計のどちらかであり得るか、又はFSDTが与えられた作用モード(MoA)についてのFLCTへの十分な代案であり得るか、この調査に利用可能なデータベースに基づいて、はっきり答えることはできない。

3. データ取り扱い

以下の諸図(Fig.1~8)におけるデータの編集のために、いくつかの変数についてNOECとEC_xの値が報告された。FLCTデータとELS又はJG試験からのいくつかの強く逸脱するNOEC(値)が詳細に評価された。評価の目的が規制のリスク評価ではなく指標感度の比較にあったので、統計的有意性だけでなく用量反応関係も考慮されている。UBA又は会社による再評価が存在した場合は、より保守的な値が使われた。以下において、データは物質の名前なしで示される。物質がランク付けされたならば、これは、関連した指標の感度を減少させることになったであろう。

4. 結果

4.1 FLCTにおける感度指標の比較

16個の物質のデータが提出された。7つの物質の9つのFLCTが考慮された。NOECの信頼性についてあまりにも多くの不確定要素があったので、1つの研究が除かれた。本質的な毒性を比較するために、時間加重平均(TWA)濃度は沈殿物のある静態FLCTの実験された生活相のものが使われた。すべての試験で、生殖と成長が評価された。性の比率のデータが抜けている場合、これらは、生データ(「証拠がない」とだけ述べられている場合部分的に)から、又は別個のFSDTから評価された。性比は4つの試験の中で、成長は3つの、生殖は2つの試験の中で最高感度指標であった(図1)。両方の試験の中で最高感度指標(異なる魚種)としての生殖と、性比は直接には評価されていない。しかし、生データに基づき後の段階で決定された性比についてのNOECは成長についてのNOECと同一だ。

個体数関連指標性比、成長、及び生殖の感度は本質的に同等だ;重要な作用の感度における違いはすべての3つの指標について9つの試験の6つにおいて1つの濃度段階の中にあった。

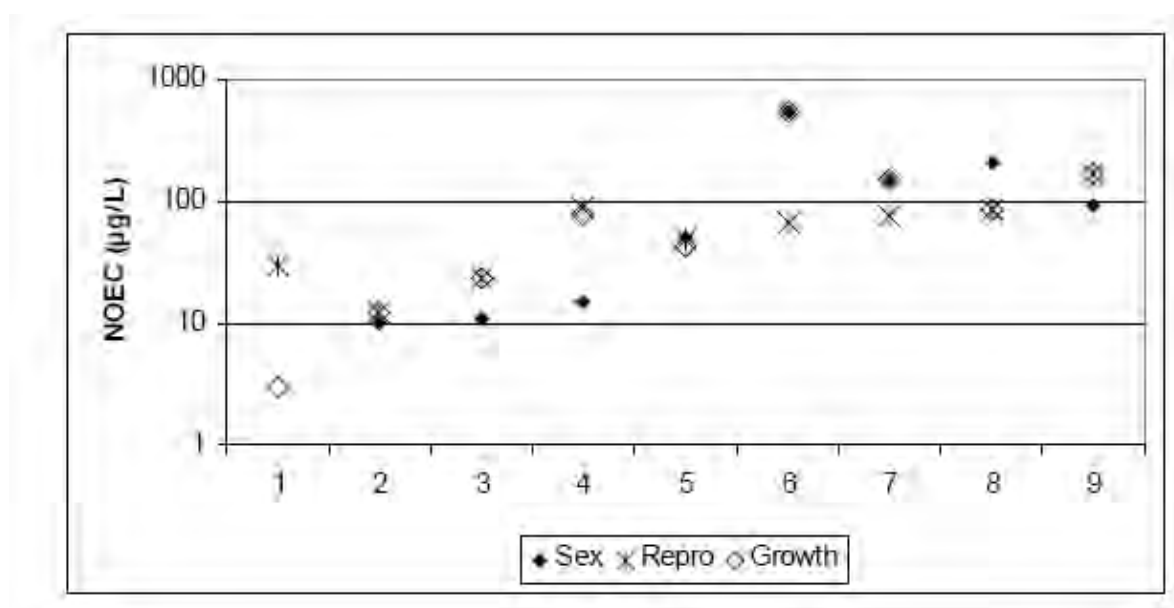


図1: 魚類一生涯試験における様々な個体数関連指標のNOECの感度の比較。早いライフステージと若年成長試験の成長データからDMI防かび剤の魚類一生涯試験までの、外挿の安全の感度評価の程度による、試験(1-9)のランキング

3つの例外がある:

初期のピーク暴露後の異なるライフステージにおける作用を評価するための、沈殿物のある静態検査(Nr. 4)において、性比は成長より5倍敏感で、生殖より6倍敏感であった。性比>成長>生殖のこのランキングはピーク暴露によって設定された作用の持続可能性を反映する。つまり、濃度を減少させることによって、指標生殖が最初に回復(関係している生理学上のプロセスの期間のため)し、成長が続くのである。一度引き起こされた性転換の回復は試験した種においては可能でないようだ。これまでのところ、これらの結果は上記6つの研究において状況を否定しない;本質的な毒性の比較のためには、性比だけが使われるべきだ。

研究1において、試験項目の濃度において正常な性比があり、濃度－反応関連が認められないにも拘らず、コントロール(支配要因)における性比は女性に強く偏っていた。成長と生殖についてのコントロールへの作用は除くことができない。これまでのところ、研究は慎重に扱われるべきだ。

研究6において、生殖は成長と性比より8倍敏感であった。研究のより詳しい観察は、より高い試験濃度での低い生殖比率がF1の複製を許さず、それゆえ、どの統計評価も可能でなかったことを明らかにした。その結果、成長NOECはおとなのF0に基づくだけだ；研究は、いずれにせよ性比を評価するためには設計されていなかった。この理由により、指標の感度における違いはあまり有意義でないようだ。

指標VTGは3つの研究において評価されるだけで、その感度はいつも性比(最も敏感な個体数関連パラメータ)と一致していた。別の物質についての、一参考文献が考慮された、それによれば、VTG減少が性比と同じくらい敏感であったけれども最も敏感な指標成長より半分しか敏感でなかった。全体に、FLCTデータセットは性比の決定について弱い。VTGの取決めは動かしがたい規制のNOECの決定には重要でないけれども、関連した毒物学上のMoAの識別のために役立つであろう。

4.2 ELSとJG試験とのFLCTからのNOECの比較

すべての16個の物質について、ELS研究(OECD 210)、及び／又は延長した魚類からの成長データ又は入手可能な(OECD 204、 OECD 215;以下においてもJGとして区別されない)JG試験がある。これらのNOECと、7つの物質についての既存のFLCTのそれらとの比較により、ファクター5の適用によるFLCTのNOECへの外挿が規制の決定に十分に安全であったかどうか説明すべきだ。

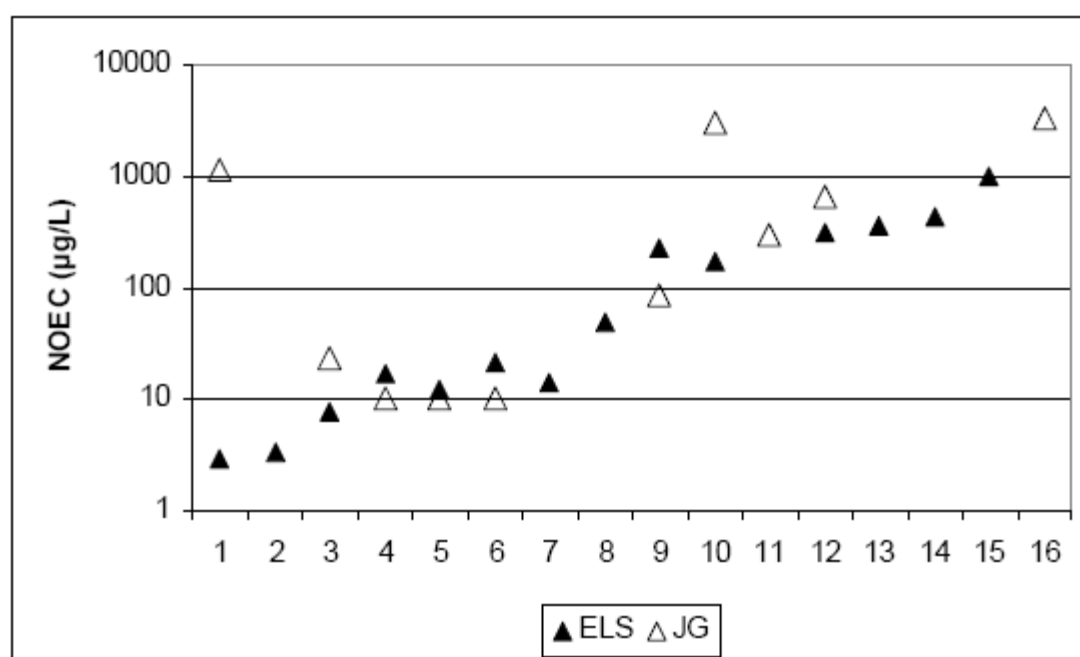


図2: ELSとJG試験からの成長についてのNOECデータ。感度に応じた物質(1-9)のランキング。

8つの物質について、成長NOECがELSとその延長と、JGとの試験によって決定された。6つの場合に、結果はほとんど同様で(図2)、与えられたMoAにとって、両方の試験法が規制のNOECを導くのに同等である(指標成長について)という結論を許す。残りの2つの場合(図2中の物質1、8、及び10)で、JG試験は著しく敏感でなかった。両方のケースはより古い研究を表している(そこでは、ニジマスの28日 OECD204試験で成長データが評価された)。魚類の初期サイズ及びサイズの増加についての情報は与えられず、暴露の終わりのサイズだけが比較され、致死作用についてNOECに至るまでの経過につき何の結果も得られなかった。これらの試験はOECD215又はOECDの210の試験への適正な代案とみなされていない。

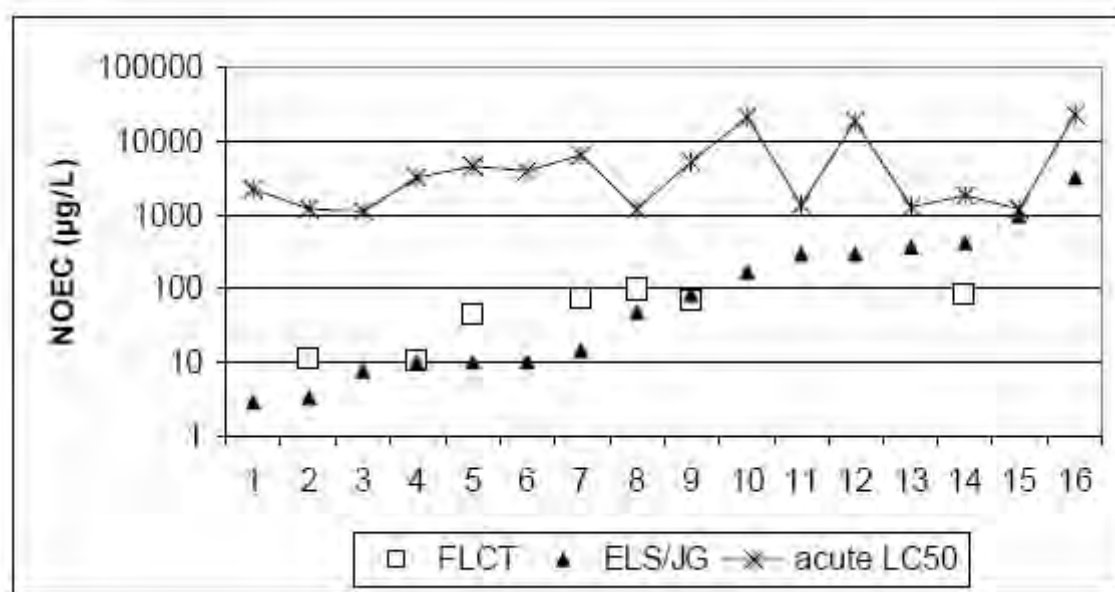


図3: ELSからの最も敏感なNOECs、又は有効なFLCTs-及び急性毒性データの最低指標と比べてのJG試験。ELS/JG試験における感度に応じた物質のランキング。

調べられた16個の物質の急性毒性が慢性作用(3桁;図3)よりそれほど散乱しないこと(1.5桁)は注目すべきだ。これは、調査中の物質が非常に異なる急性対慢性の比率(ACR)を持っていることを意味している。非特異性の代替物質についての物質統制の文脈の中で、急性LC50から1桁の大きさによる慢性のNOECまでの外挿は適用される。高いACRは慢性の指標の感度と一般的な基礎的毒性の間に広いスパンがあることを示し、具体的なMoAを示す。最も敏感な物質1-10で、ACRは、125から760の範囲(例外:25を持つ物質8)で、魚類への明確に特有な作用を示している、一方物質11-16ではACRが00より決して高くなく、5つの場合に10よりも低くなっている。データ列のこの部分で、非特異性の基礎的毒性はことによると慢性作用の濃度域で予期されるかもしれない。

FLCTからの最も敏感な個体数関連NOECとELSとJG試験からのNOECの比較は、データ列のより敏感な半分におけるすべての物質にとって、ELS/JG-NOECがより低いか、FLCT-NOECと同一であることを示す。より高いNOECの物質には、より少ないFLCTデータがある。ここにFLCT-NOECのより高い感度を持つ唯一の値がある:5.1のファクターを持つ物質14は唯一の臨界値(現在の評価の目的についての)を持っている。試験結果のより綿密な調査は不規則性の情報を全然与えなかった。しかし、ACRが対FLCTで約20に対して、対ELSではほんの4であることは考慮されるべきだ。FLCTにおいて最も敏感な指標が成長であるので、アロマターゼ阻害より一般的なMoAがその原因であるかもしれない。

しかし、ELS又はJG-NOECからFLCT-NOECへの外挿の安全を評価するために、成長データの最低値のみにその基礎を置くことは十分でない。外挿は各提出されたELS又はJG試験から高い統計的安全生を持って可能であるはずだ。現在の評価のために、有効なFLCTとの7つの物質のELS又はJG試験からのすべての入手可能なNOECはFLCTからの最も敏感なNOECと関連していた(表1)。上で議論された物質14では、最大値と最小値の比率が (11.5、及び5.1)であり それは両方とも平均の99.9%の信頼性限界の外にあり、従って統計的には特別なケースを表している。この物質についても、99.9%以上の信頼性限界はまだ議論されたファクター5の中で横たわっている。この物質がなければ、3のファクターは可能であろう;信頼できる研究に基づく極端な値は4から5の間に横たわっているけれども。

表1: FLCT NOEC ELS又はJG / NOEC FLCTに関連したELS又はJG試験のすべてのNOEC比率の統計

NOEC ELS or JG / NOEC FLCT	All seven substances	Without substance
Number of comparisons	16	14
Mean	2,2	1,4
Standard deviation of the population mean	2,8	1,3
Maximum	11,5	4,6
Minimum	0,2	0,2
Upper 95% confidence limit of mean	3,6	2,12
Upper 99% confidence limit of mean	4,1	2,3
Upper 99,9% confidence limit of mean	4,6	2,5

これまで入手可能なデータに基づいて、ELS又はJG試験の最も敏感なNOECに適用されたファクター5はFLCTのNOECに予備的な外挿として保護する。

特に、内分泌媒介作用に明らかな優越を持つ物質について、この点で高い安全がある。

FLCTが、すべての潜在的なMoAをカバーする唯一の試験とみなされているので、ACRを増大させることによって、そのような試験を実行する必要性は増大する。現在のMoAでは、見積りの安全が、指標「若年成長」の使用によっても増大するようだ。もしMoA「アロマトーゼ抑制」がはっきりと支配的であれば、FLCTの入手可能性のない最終的なリスク判断が、追加の安全ファクターを適当な成長NOECの上に適用することによって実行できるかどうか議論されるべきだ。提出者によって必要とされているならば、試験結果がこれを許すならば、必要なリスク緩和手段は、たぶん、より高層の試験(FLCT)を提出することによって減らされるかもしれない。

4.3 FSAとFSDTデータとのFLCTからのNOECの比較

魚類選別試験(FSA、OECD試験法として実施目前)は、in vivo試験により予備的な情報(MoA、毒物学、in vitroデータ)から引き出された疑惑を確認するために実行される。これが事実であるならば、更なる試験層は、個体数に関連する作用の可能性をはっきりさせなければならない。これは、FSAが、ネガティブな試験結果の場合に試験計画から外れることを暗示している。従って、偽陰性結果は用心の原則を考慮して除かれるべきだ。リスク評価の観点から、あまりにも強い感度(偽陽性)を持つことはまた望ましくない;FSAはFLCTにおいて作用のための予測的な可能性を持たなければならない。これはFSAとFLCTの間で作用別感度の比較によってはっきりさせることができる。

魚類の性的な成長試験(FSDT、OECDの認証プロセス期間中)は、拡張されたELS試験で、性の成長が完遂されるまで、魚を暴露して、性比、ELS指標のほかに、組織学上の諸指標及び多くはまたVTGを評価する。内分泌活性物質のリスク評価におけるそのような試験の実現可能性は論争的に議論されている。著者はFSDTをFSAとFLCTの中間的な層と見なすのは適当ではないとする。その理由は、一方では、それが必須の個体数関連指標(例えば生殖)を含んでいない、それゆえそれが敏感ではなく、FLCTを引き起こすことができない。一方ではそれがFLCTの一部としての最も敏感なフェーズ(例えば、性的な成長)をカバーしており、従って、FLCTを取り替えることができるからである。そこで、FLCTに比べて短縮した試験法が最終的な層として使えるかどうかの議論だけが残っている。今までのところ、データベースは、FSA(部分的に生殖指標に関わる)又はFSDTのそれらとのFLCTからの最も敏感な指標との堅固な比較を許すことについて十分でない。4つの物質にだけ、これらの具体的な試験からの内分泌媒介作用についての情報がある。3つの物質について、2つは性比と1つは生殖に関しVTGは評価された。3つの追加の物質には、FSA結果があるけれども、FLCTデータは無い。VTGのためのすべてのNOEC又はEC10はFLCTからNOECへの性比のファクターが2以内であり、入手可能な所でFLCTからVTG-NOECとマッチしていた。生殖はそれぞれのFLCT-NOEC(177 µg/L対>85 µg/L)と一致している同一のNOECを産出しているあるケースに含められて

いた。1つのFSDTにおいて、VTGのNOECがそうであったように、性比のNOECは最も敏感な指標であった。他の物質についての性比はFLCTにおいて評価されていない。FSDTはFLCTにおける個体数関連指標として同様なNOECを結果として生じていたけれども、更に、それは肝臓毒性に基づいた顕著にむしろ敏感な組織学のNOECを提供した。この値はFLCTデータより敏感だけれどもELS/JG研究から導かれた成長についての最低NOECに近かった。

全体に、既存のFSAとFSDTデータが、それらがFLCT(FSA)について予測的でないであろうという、又はそれらが等しく敏感な結果(FSDT)を提供しないであろうという、どのような証拠も提供しないことは断定できる。データベースの拡張は望ましい。FSAは普通、より広い間隔を使つてのほんの3つの濃度によって実行され、NOEC又はEC_xを決定しないので、FSAとFLCTデータの正確な比較は可能でない。純粋な選別試験としてのFSAの分類が、このタイプの試験がリスク評価についての有益なデータを生成することを難しくしていることは遺憾だ。FSAのその十分な感度が確認されれば、FSAが、試験(著者の意見において、最終的な層を表す)を更に引き起こすため又は試験計画を終了するために使えるかどうか、議論されるべきだ。出口規準としては例えば急性LC₅₀の10分の1以下の濃度域でNOECを決めることで良いかもしれない。

4.4 さまざまな魚種の比較

急性試験

物質がELS/JG試験におけるそれらの感度に従ってランク付けされるならば、ニジマスはいつも、ランキングのより敏感な半数において、物質に対して最も敏感な種である。より敏感でない半数においては、マスは3回、ブルーギルも3回、金色のオーフが1回、及び羊頭ミノウが1回であった。

ELS/JG-試験

長期の魚類又はJG試験で、ニジマスは独占的に使われた。ELS試験はマス(7x)又はファットヘッド・ミノウ(まぬけの小魚)(7x)で実施された。羊頭ミノウでの1つのELS試験がある、それは同じ物質と試験についてマスよりほんの少し低い感度を示した。

FLCT

9つのFLCTで、4つは、ファットヘッド・ミノウ、3つはゼブラフィッシュ、及び2つは羊頭ミノウを使って、実施された。2つの物質についてだけ、基本的に両方の種についての同等の感度を示しているファットヘッド・ミノウとゼブラフィッシュについての同等なデータがある。ゼブラフィッシュとファットヘッド・ミノウの間には、作用の表現における違い、ゼブラフィッシュ(たぶんホルモン力価の比率によって引き起こされた雄性発育における雌性先熟生殖腺の変換)の性の成長メカニズムによるものがあるようだ。

従って、ゼブラフィッシュはアロマトーゼ阻害にファットヘッド・ミノウより敏感に反応し、ファットヘッド(まぬけ)は明らかに、逆調節についてのより高い補償可能性を処理するようだ。同じく、ファットヘッド・ミノウは、そのより大きな絶対的成長性のため、成長作用の統計識別により高い精度を許す。これは再びゼブラフィッシュにそのより多くの均質で、増殖の産卵のための生殖パラメータを促す。これらの結論は何年もの試験と評価経験に基づくけれども、この評価における研究の限られた数から引き出すことができない。しかし、それらは現在のデータの結論を否定しない。

ファットヘッド・ミノウを持つほとんどのFLCTは米国で実行され、内分泌へのフォーカス無しで実行されて、より古いデータを表している。従って、比較は難しい。討議中のMoAの性質のため、すべての個体数関連指標が同等の感度をもっているようだ。従って、種の潜在的感応性についてのどの推薦も推論できない。修正された試験プロトコールのための実行可能性、努力、及び使用容易性は、他の場所で議論されることになっている。著者は自身をこの点で中立的だとみなしていない。

4.5 アロマトーゼ抑制活動とBCFの考慮

その保守的な進化のため、ステロイド生合成酵素の構造は脊椎動物の中で相対的に同様だとみなすことができる。この理由により、FLCTからの最も敏感な(臼歯)個体数関連データは、作用の機械作用の背景をはっきりさせるためにひとりのアロマトーゼ(Troskenなど、2004年)のIC₅₀に対してプロットされた。一つのケースで、抜けているIC₅₀データが他の出版されたデータから概算することができた。最も敏感なアロマトーゼ阻

害を持つ物質が外れ物(図4)とみなされれば、ヒトのアロマターゼのIC₅₀と魚の個体数関連指標との有意な相関関係は結果として生じている($r=0.858$; $p<0.05$)。この物質がニジマス原形質微粒においてまた非常に強力だと評されたので、慢性の魚類試験におけるその相対的に鈍感な内分泌影響は他の理由によらなければならない。物質の作用が目標に対する親和力だけでなくその入手可能性に依存するので、魚類の長期内分泌媒介作用研究での最低NOECが、OECD305に従って研究からBCFに対してプロットされた(図5)。最後のパラグラフの中で議論された物質が外れ物(媒体作用だけを持つ特に高いBCF)とみなされていても、高い生物濃縮と敏感な作用の間の関係は重要でない。

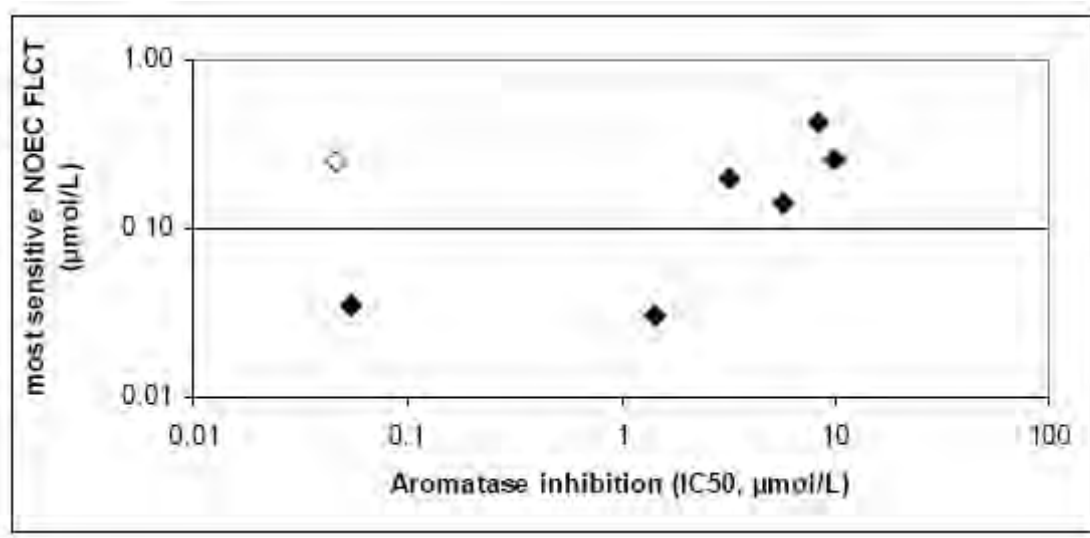


図4: ヒトのアロマターゼの抑制に比べての魚類一生涯試験からの最低NOEC。オープンな菱面体: 潜在的な外れ物。

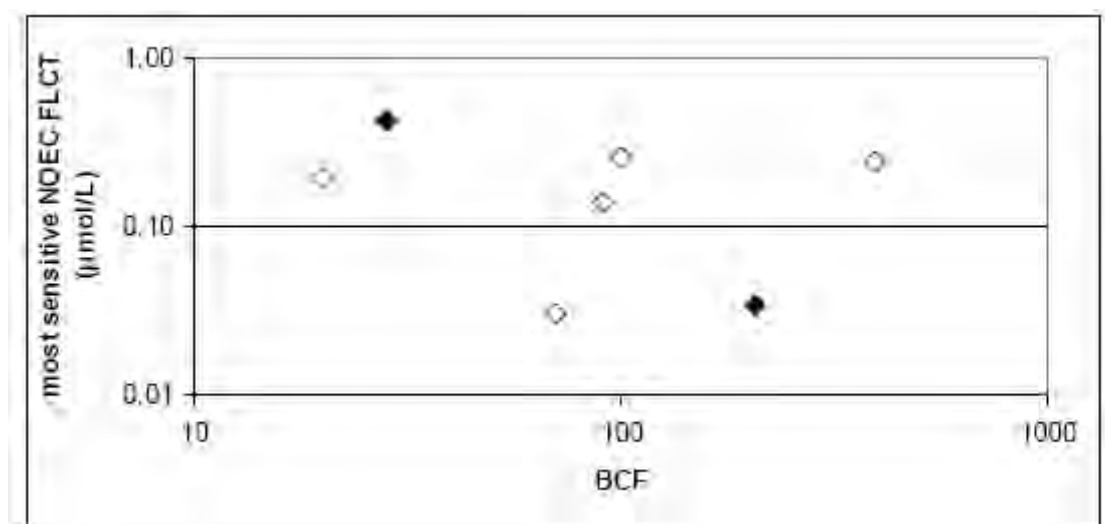


図5: OECD305研究からのBCFに比べての魚類一生涯試験からの最低NOEC。
オープンな菱面体: 総放射能について決定されただけのBCF

BCFとNOECの弱い相互関係の可能な理由は、7つの物質の5つのBCFが総放射能として与えられるだけであったという事実によるのかもしれない。総放射能がまたすべての分解製品を含む時に、真実のBCFvalueはより低い。魚類における浄化レートに依存して、BCFの縮小は、摂取と浄化レートの関係から結果し、物質固有である。ただし、ただ総放射能が与えられるだけではそれは決定することができない。この警告は魚類長期試験における内分泌影響のNOECと、BCFとIC50(図6)の修正されたアカウンティングの間の関係にもあてはまる。2つの“真”のBCFに属している最高及び最低NOECの間で、NOECは特に再び前の2章の中で言及された外れ物を除いてアロマターゼ阻害による計算ファクターへのクリアな依存状態にある。

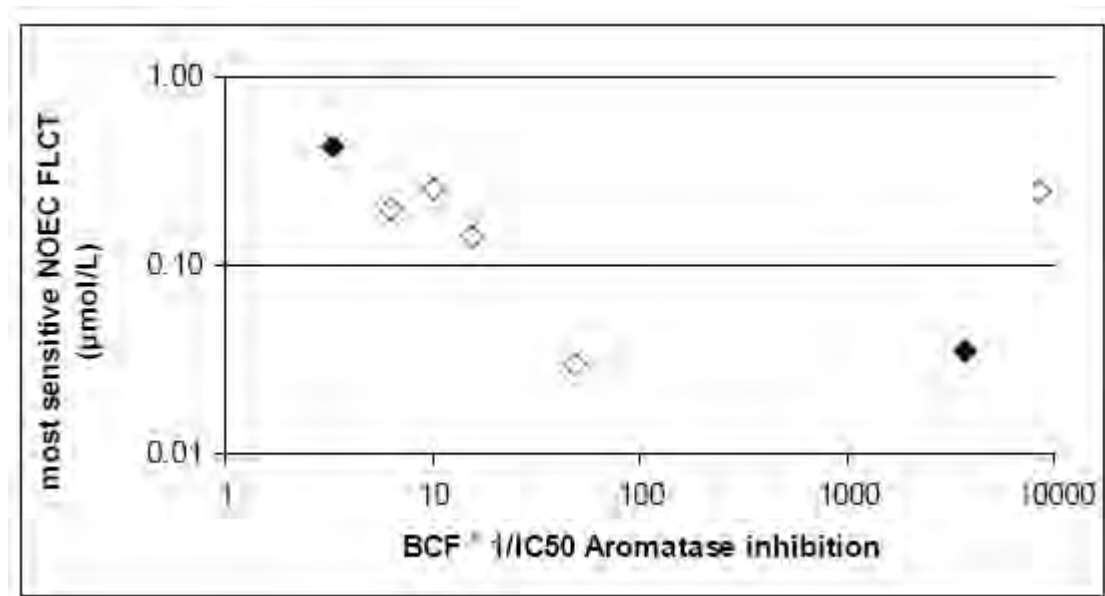


図6: 内分泌魚類長期試験からの最低NOECをBCFと1/IC50アロマターゼ阻害の製品と比べる。オープンな菱面体: 総放射能について決定されただけのBCF。

4.6 他の関連した生態毒性学上の指標との比較

魚類における観察された内分泌媒介作用が規制の作用評価について関連しているかどうかにかかわらず、評価(藻類、ミジンコ、浮草科、ユスリカ属)について関連している他の最も敏感な生態毒性学上の指標との比較は明確化するべきだ。この目的のために、データは16個の物質(図7)の11個について提供された。

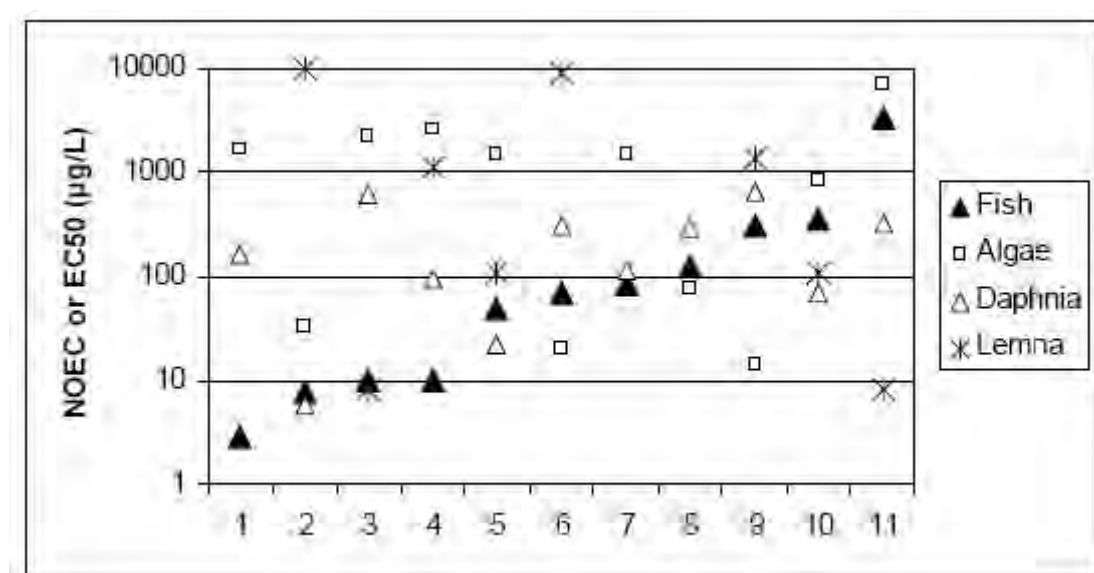


図7: 水生生物における慢性毒性の評価のための最高感度の規制指標。魚類試験における感度に応じた物質(1-11)のランキング。いつも魚類指標より敏感ではなく、従って示されなかったユスリカ属指標。

このMoAにとって、他の水生生物のための慢性の魚毒性と慢性の指標の間の関係に特性上の規則正しさは明白でない。個々の物質の魚NOECの違う感度が考慮される(図8)ならば、 $100 \mu\text{g/L}$ より高いNOECでは、他の指標がはっきりとより敏感に反応することが明らかで、そこでは、魚類への作用は評価に関連が薄い。範囲の10から $100 \mu\text{g/L}$ において、ほとんどの場合に、同等の感度を持つ別の水生生物のNOECは存在している。この状況において、魚NOECは、魚類の長い世代の時間による臨界値と回復するその生殖の可能性を表すかもしれない。はっきりと他のすべての水生指標より敏感な両方の魚NOECは $15 \mu\text{g/L}$ より低い。

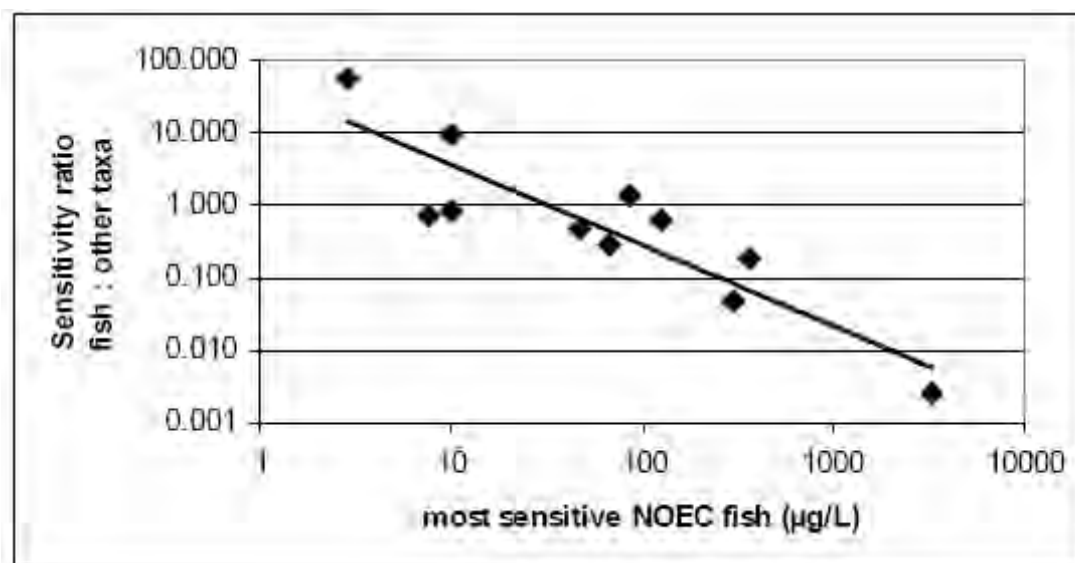


図8: 魚類試験からの最も敏感な慢性のNOECと他の水生生物との試験からのそれらの間の感度のファクター。

4.7 魚類ためにDMI防かび剤のリスクを評価するデータ要件のための推奨

最終的なリスク評価が登録後に必要なものとされる場合、明確化すべき予備的なリスク評価

入手可能なデータに基づいて、1/5のファクターをELS又はJGデータのNOECに適用している外挿は、アロマターゼ阻害によって起こされた作用についてのFLCTのNOECを評価するのに十分に安全だ。将来、OECD215に従って、成長データが長期の魚類試験において念入りに作られるべきだ。

最終的なリスク評価

入手可能なFLCTにおいて違う指標が最も敏感なものと認定されたので、DMI防かび剤に対するFLCTがまだ最終的な層の試験法として必要である。追加の安全ファクターを付け加えることによって、成長NOECから最終的な層の試験としてのNOECまでの外挿は、議論されることになっているとする。

最終指標 (例えばVTG又はホルモン力価) は作用モードを説明するかもしれず、それから、統制の不確実性の縮小に役立っているかもしれないけれども、統制のための決定的なNOECの推論について必要でない。

未来の研究がFSDTから導かれたデータと同等の感度を立証するならば、指標感度間の明らかに密接な相関関係により、FLCTを中期FSDTと取り替えることが許されるべきだ。

IC50とBCFデータに基づいたリスクを評価することが未来に可能になるであろうかどうかを決めるには親化合物に基づいたBCF再評価が要求されるであろう。

付属書5
日本における取組

経済産業省 (Ministry of Economy, Trade and Industry)

1. 諮問機関

経済産業省(METI)は1999年に化学物質協議会の下に内分泌かく乱作用検討小委員会(大臣の諮問機関)を設立した。小委員会は生物学、生態学、医学、及び薬学の専門家から成り、1年に3、4回催されている。2000年に、小委員会は、内分泌かく乱性質を持っている物質として心配されていた化学物質の既存のデータと同様に内分泌かく乱性質の試験の方法を開発するために、情報を収集する中間報告を公表した。2002年に、小委員会は15個の優先された化学物質についてリスク情報の評価結果を提示した。2006年に、小委員会は内分泌かく乱物質のヒトの健康に及ぼす影響に関するリスク評価と今後の調査研究への行動計画について中間報告を公表した。

2. 調査と研究

経済産業省 (METI)は2000年以来、化学物質評価研究機構(CERI)とともに、内分泌かく乱物質がヒトの健康に及ぼす影響について調査研究を始めた。研究の初期の段階において、内分泌かく乱性質を持っている物質として懸念された15個の化学物質について危険評価が行われ、ヒトの健康への重要なリスクが日本の現在の状況では発見されなかったことが上記の小委員会で結論付けられた。経済産業省 (METI)は研究の主要な目標をOECDテストガイドラインプログラムへの寄与に移し、小委員会の技術的助言の下に、非動物と動物の試験を以下のように実施している。

(1) 非動物試験

- i. 感覚器官を縛る試験法
- ii. レポーター遺伝子試験法
- iii. ステロイド起源物試験法
- iv. QSAR

(2) 動物の試験

- i. 子宮肥大試験法
- ii. 去勢雄ラット反応試験法
- iii. 強化されたTG407
- iv. 子宮内の、そして授乳暴露研究
- v. 2世代の研究

厚生労働省 (Ministry of Health Labour and Welfare)

1. 諮問委員会

内分泌かく乱化学薬品の健康に及ぼす影響についての諮問委員会は1998年以来設立されている。委員会は厚生労働省で医薬及び食品安全局の理事長の下での私的なパネルである。委員会は流行病学者、毒物学者、分析者、消費者代表のメンバー、その他から成る。

1998年以来、委員会は20回、公開で開催された。委員会は中間報告(1998年)、中間報告の1番目の補足的なレポート(2002年)、及び中間報告の2番目の補足的なレポート(2005年)を編集、出版した。

委員会は内分泌かく乱物質のヒトの健康へのリスクの評価、公衆衛生を保護する機敏な行動の必要性、危険事態についての公衆との交信、などにつき提案をしている。委員会は行動計画を定期的に作成してきた。最初の行動計画は2002年に設定され、2回目は2005年に設定された。様々な試験と研究がこれらの計画に従って実施されている。

委員会は内分泌かく乱物質の可能性のある化学薬品に対する試験体系の枠組みを描出した。

枠組みは2つの部分から成る。一方は、コンピューター内試験、in vitro試験法、及びin vivo試験法の部分であり、他方は確定試験の部分である。委員会は前者の部分の結果によって優先度を付けられたものに従って化学薬品のリストを作成した。

リスク伝達を改善するために、MHLWは、委員会と協力して内分泌かく乱化学薬品についてのウェブサイトを立て上げた。このホームページの中で、MHLWはFAQシステム、委員会の議論についての説明、及び委員会によって提出された様々なステートメントを準備した。

2. 調査と研究

MHLWは厚生労働科学研究費補助金を提供した。1996年以来、MHLWは内分泌かく乱物質のヒトへの健康効果についての新しい研究フィールドを始めた。この新しい研究フィールドで、内分泌かく乱物質の、疫学的研究、人体への暴露作用の調査、及びその検出方法についての研究が開始された。MHLWは国立医薬品食品衛生研究所との委託契約研究として、スクリーニング試験プロジェクトを実施した。プロジェクトの中で、ハーシュバーガー生物検定と齧歯類の子宮腫大試験が実施されている。MHLWは、コンピューター内試験、in vitro試験法による優先順位に従って、in vivo試験法を実施した。

環境省 (Ministry of the Environment)

1. 諮問機関

(1) 歴史

1997年3月に環境における内分泌かく乱性質作用を議論するために、日本環境庁(以前の環境省(MOE)(2000年以來の))は「外因的な内分泌かく乱化学物質ワーキンググループ(WG)」を設立した。そのWGは生物学、生態学、医学、及び薬学のエキスパートから構成された。

このWGは1997年7月に中間報告を発表した。WGから報告に基づいて、MOEは1998年5月に「環境の内分泌かく乱物質への戦略的なプログラム98」(SPEED '98.)を出版した。

更なる科学的議論とSPEED'98の実行のために、「内分泌かく乱物質委員会」は1998年6月に設立された。

MOEは2003年に、専門家、その分野のエキスパート、及び消費者グループからの担当者などから構成される、SPEED'98の改訂ワーキンググループを設立した。この改訂WGは2年の間ミーティングを催した。それはこれまでのSPEED'98の活動と結果を、国際的に示されている問題と比較し、未来への問題点を識別した。改訂WGはまたこの問題についての地方自治体からのヒアリングを実施した。

(2) 現在の諮問機関

学界、メディア、及び市民社会からのエキスパートで構成されている委員会は、研究結果の評価と一般の人々の認識の改良に取り組んだ。この委員会はi) 内分泌かく乱物質の作用について、ii) 内分泌かく乱物質のメカニズムの上の基礎研究、iii) 野生生物の監視、及びiv) リスク伝達の4つの小委員会を持っている。

2. 調査と研究

(1) 内分泌かく乱化学物質(環境ホルモン)と関連したプログラム: ExTEND (2005年)

i. 経緯

MOEは、「内分泌かく乱におけるMOEのパースペクティブ(展望)－ExTEND 2005」(今後は、「ExTEND 2005」と呼ぶ、ExTEND 2005のサブタイトルは内分泌かく乱における強化方針の頭字語である。)を2005年3月に出版した。このプログラムに従って、内分泌かく乱のメカニズムについての研究は、環境モニタリング、試験法の開発、年に一度の国際的な討論会、及び関連した国との協力的な調査研究の上で前進があった。

ii. 研究領域

以下は、ExTEND 2005における内分泌かく乱問題を扱う活動の支柱である。: 1) 野生生物の観察、2) 環境の集中と暴露レベルの評価、3) 基礎研究の推進、4) 危険評価、5) リスク評価、6) リスク管理、及び7) 情報共有とリスク伝達の推進。

1) 野生生物の観察

- a. 地方(局地)レベルでの野生生物の連続観察
- b. エキスパートによる結果の評価

2) 環境集中の評価と暴露レベル

- a. 環境の調査と野生生物観察
- b. 環境における物質の集中レベルの評価
- c. 環境のサンプル保存
- d. より敏感な分析方法の開発

- 3) 基礎研究の推進
 - a. 野生生物に対する生物学の知識の蓄積
 - b. In-vivo試験
 - c. In-vitro試験
 - d. 試験法開発に寄与する基礎研究
- 4) 危険評価
 - a. 内分泌かく乱作用についての試験物質の選択と評価の手續
 - b. 選ばれた手續に基づいた実験の実施
- 5) リスク評価
- 6) リスク管理
- 7) 情報共有とリスク伝達の推進
 - a. 情報共有
 - b. リスク伝達
 - c. 環境教育

(3) 相互協力

内分泌かく乱作用の科学的研究での相互協力は1999年以来UKと、2004年以来米国との間で促進されている。

- i. UK-日本
North Bovey(UK)における10回目のワークショップUK日本共同調査は2008年10月5日-7日に予定された。
- ii. 米国-日本
4番目の米国-日本のワークショップは2008年2月14日-15日にサンフランシスコ(米国)で持たれた。東京(日本)の5番目の米国-日本のワークショップは2008年12月に予定されている。

(4) 情報交換のプロモーション

MOEは、科学的に環境上の危険性を評価し、減小させる様々な手段を実施した。そのような手段の一部として、省は、一般、産業、及び政府のメンバーを呼び集め、日本と他の国で取得された内分泌かく乱物質についての正確な情報を共有することを目標として、1年に一度国際シンポジウムを開催した。

付属書6
韓国における取組

内分泌かく乱物質に対する国家計画 (2007年改訂)

2007年3月

大韓民国

国土輸送海事省
食料農業森林漁業省
環境省
地域開発局
韓国食料医薬局

1. イントロダクション

1-1. 経緯

1990年代後期に、内分泌かく乱物質(EDs)が国際的な問題として大きく浮かび上がってきて以来、環境省を含む関連政府各省は「内分泌かく乱物質に関する中長期学術調査計画」を確立し、各省ではそれ以来各種の調査プロジェクトを実施してきた。

国土輸送海事省(海洋生態系)、食料農業森林漁業省(リスク評価と管理、動物用医薬、家畜製品、海産物)、環境省(大気、水、堆積物、土壌、生物相など)、地域開発局(農業及び農地)、韓国食料医薬局(食料及び医薬品など)

プロジェクトは、各種環境媒体における内分泌かく乱物質の曖昧さと、内分泌かく乱物質のテストガイドライン作成の国際的な遅延のゆえに、内分泌かく乱物質の監視に第一の焦点を当てて推進されてきたが、その結果政策の適用に限界があった。

とりわけ、関係各省間のそれぞれの「内分泌かく乱物質に関する中長期学術調査計画」は、調査結果の共有と共同調査プロジェクトの推進には不十分であった。各種のプロジェクトが進展する中で、内分泌かく乱物質の調査結果を反映する改定計画の必要性和共に、各省間の協力の必要性が提案された。

関係各省間の協力計画の詳細について討論するために省間会議を催した際に、省の間で内分泌かく乱物質に関する5ヵ年(2007-2011)計画を共同で改定することに同意した(2005年8月)。

更に、内分泌かく乱物質の作用の曖昧さと、内分泌かく乱物質に関するテストガイドライン作成の国際的な遅延を考慮して、各省の現行の中長期調査計画を見直して改定することが必要である。

従って、各省は、これまでに実施してきた調査プロジェクトの結果を検討した上で、内分泌かく乱物質に関する整合性のとれた次の5ヵ年調査計画(2007-2011)を作成した。その計画は、各省の内分泌かく乱物質の安全な管理に適した計画の作成につながることに寄与するものと思われる。

2. 中長期調査プロジェクトの主要な成果

2-1. 陸上環境の分野

2-1-1 全般要約

環境省は1999年に「内分泌かく乱物質に関する中長期調査計画」を確立し、この計画に従って各種の調査プロジェクトを推進してきた。1999年から2005年までの調査プロジェクトの実施を通して、環境省はその内分泌かく乱物質調査計画に基づいた34のプロジェクトに対して、11,500,000米ドルを投資してきた。特に、化学情報サービスを指向した省のウェブサイト(<http://www.ncis.nier.go.kr>)を通じて、調査結果を国民一般に年々提供し、情報を継続的に配布することによって、国民の知る権利を満足させるのに貢献して来た。

2-1-2 プロジェクトの成果の評価

1999年から2005年の間に、全部で228か所についての環境モニタリングと生態学的作用を実施して、毎年これらのプロジェクトに約1,000,000米ドルを提供した。

Media Subjected to Inspection		No. of Survey Sites
Environmental media	Air (Ambient)	42
	Water	73
	Soil	82
	Sediment	27
Biota monitoring	Fish	32
	Amphibians	32
Total		288

スクリーニング方法論の作成のために、省は2002年に食用蛙のビテロゲニン測定、そして2001年から2004年にかけては環境運命の推定のためのツールの開発に関係したいくつかの調査プロジェクトを実施した。国際協力の一環として、環境省は2001年以来、韓国政府と日本政府の間でシンポジウムを開催し、共同調査プロジェクトを実施している。

2-2. 海洋環境分野

2-2-1 全般要約

国土輸送海事省は、海洋生態系に関する内分泌かく乱物質の調査計画に基づいた2002年から2005年までの合計9つのプロジェクトにプロジェクト費用として3,300,000米ドルを確保した。

2-2-2 プロジェクトの成果の評価

モニタリング

- 2002年から2005年の間に、代表的な25の場所で環境モニタリングを実施した(毎年、約3-4億米ドルを確保した)。内分泌かく乱物質の全体的な濃度は毎年同じレベルであって、外国の人口稠密区域のものと比べるとより低いか同等であった。
- 海洋生物種中のダイオキシンの連続的調査モニタリングを実施した。

生態学的影響の評価

- 以下の学術調査の推進: ビテロゲニン試験法の展開、解毒酵素と抗酸化システムと性比率の研究、TTRとRBPの遺伝学的シーケンスとCYP1A1バイオマーカーの有用性、そして分子の生物学的毒性の検証
- 海岸魚類を使用するバイオインジケーターの研究と、海底の群集構造の研究

海洋生態系における内分泌かく乱物質の運命の予測モデルの展開

- Ulsan 湾、Nakdong 川の河口、Busan 湾、そして Jinhae 港におけるダイオキシンの流入負荷、そして環境媒体の間での物質移動、などの調査

2-3. 家畜の分野

2-3-1 全般要約

疑わしい内分泌かく乱物質のスクリーニングと評価、それに(1)食品安全の保証のために食品製造過程での内分泌かく乱物質による汚染の防止のため、(2)製造過程で使用され汚染が避けられない農薬、飼料添加物、動物医薬品、それに環境汚染物質に関するリスク管理ポリシーの作成、を行うための汚染レベルの研究を実施した。

- 動物医薬品、畜産物、飼料の安全確保を目的として、国立獣医学研究防疫サービスは、ヒトの健康や家畜を害する恐れのある残留物質のリスク評価の方法を作成し、そのような有害残留物の予防の科学的基礎を確立するために、1998年から2005年の間に研究基金として約2,800,000米ドルを受け取った。
- 遺伝子組換え細胞を使用した甲状腺ホルモンかく乱物質のスクリーニングツールを含む15の手法を確立開発し、内分泌かく乱作用の見地から14種の物質のリスク評価を行った。

2-3-2 プロジェクトの成果の評価

試験法の開発の研究

- 1998年から2005年の間に、合計で15の試験法が確立され開発され、それには下記のプロジェクトが含まれている。すなわち、性ホルモン(エストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン)かく乱のスクリーニングのための遺伝子組換え酵母の開発、甲状腺ホルモンかく乱のスクリーニングのための遺伝子組換え細胞の開発、in vivoの第1・第2段階試験法(子宮の栄養に関する試験法、ハーシュバークー試験法、1世代生殖研究、多世代生殖研究、男性病学試験法)の確立、遺伝子組換え細胞を使用したダイオキシン類似物質のスクリーニング技術の開発、PAH化合物、ポリ臭素化化合物、それに重金属の暴露レベルスクリーニングのためのバイオマーカーの開発、そしてカビ毒のユニークな中毒パラメーターの開発。
- 開発された技術の独創性や応用性は国内的にも国際的にも、研究報告の発表、特許の取得、標準的な正式技術としての利用を通じて証明されている。
- 現実にこれらの技術は、動物起源の食品や家畜用飼料の中に存在する農薬、環境汚染物質、家畜医薬品などの内分泌かく乱化学物質の評価の敏速性や精度の改善に貢献してきた。

2-4. 農薬の分野(農産物と農地)

2-4-1 全般要約

WWFがリストアップした67の内分泌かく乱物質のうちで、韓国では17の農薬がいまだに農作物の保護のために使用されている。地域開発局(RDA)は、約4,500,000ドルの研究資金を使用して2000年から2002年の間に、内分泌かく乱物質とみなされている17種の農薬に関するいくつかの協同研究を行った。

プロジェクトの主な目的は、可能性のある内分泌かく乱農薬の予備的なスクリーン方法を確立し、農産物や、地表水や農地土壌のような農業環境の農薬汚染レベルを監視することであった。それに加えて、いくつかの農薬の環境生物(魚類)への内分泌かく乱影響の研究や、ヒトの健康リスク評価が実施された。

2-4-2 主な成果

内分泌かく乱作用を有すると疑われる17の農薬の、国中のビニールハウス内の作物や土壌内の残留量をモニターする。

- 6タイプの果実野菜と170サンプルの耕作土壌から選んだ133サンプルに含まれる残留農薬の分析を実施した。

内分泌かく乱物質と疑われる農薬へのヒトの暴露の評価

- 梨果樹園内での農薬散布後の作業者の農薬暴露量の調査を実施
- 環境生物に対する農薬による内分泌かく乱影響の研究
 - 太刀魚へ内分泌かく乱物質であると疑われている3種の農薬の影響の研究を実施し、内分泌かく乱作用の試験法方法を確立した。
- 哺乳動物への農薬の内分泌かく乱影響についての研究
 - 5種の農薬の動物の生殖器への影響を評価し、用量作用関係を見出す試験をした。

2-5. 食物と医薬の分野

2-5-1 食品の汚染レベルのモニタリング

食品、容器、医薬品、薬草、化粧品、食器洗剤のような各種の材料の内分泌かく乱物質の汚染レベルについて、1999年から2005年の間に実施したモニタリングの結果、外国のレベルよりも低いあるいは同等のものであることが示された。

2-5-2 ヒトの健康への影響

ヒトの健康に対する内分泌かく乱物質の影響を研究するために、生殖構造(精子のカウント、男性生殖構造、女性不妊)、先天性奇形、乳がん、甲状腺機能不全に関する機能的な研究を行った。

2-5-3 スクリーニング試験法の確立

スクリーニングと試験法に関して1999年から2005年の間に実施した研究プロジェクトは、内分泌かく乱物質に対する30のプロジェクトであった。

- 2005年までに実施された30のプロジェクトは、OECDのEDTA会議や開発国で推奨されてきたレベル2～レベル4の試験法に相当するものであった。

国際的に標準化されているスクリーニング試験法の確立

- E-screen試験法、酵素活性化試験法、エストロゲン・アンドロゲン受容体接合定量法

2-5-4 リスク評価

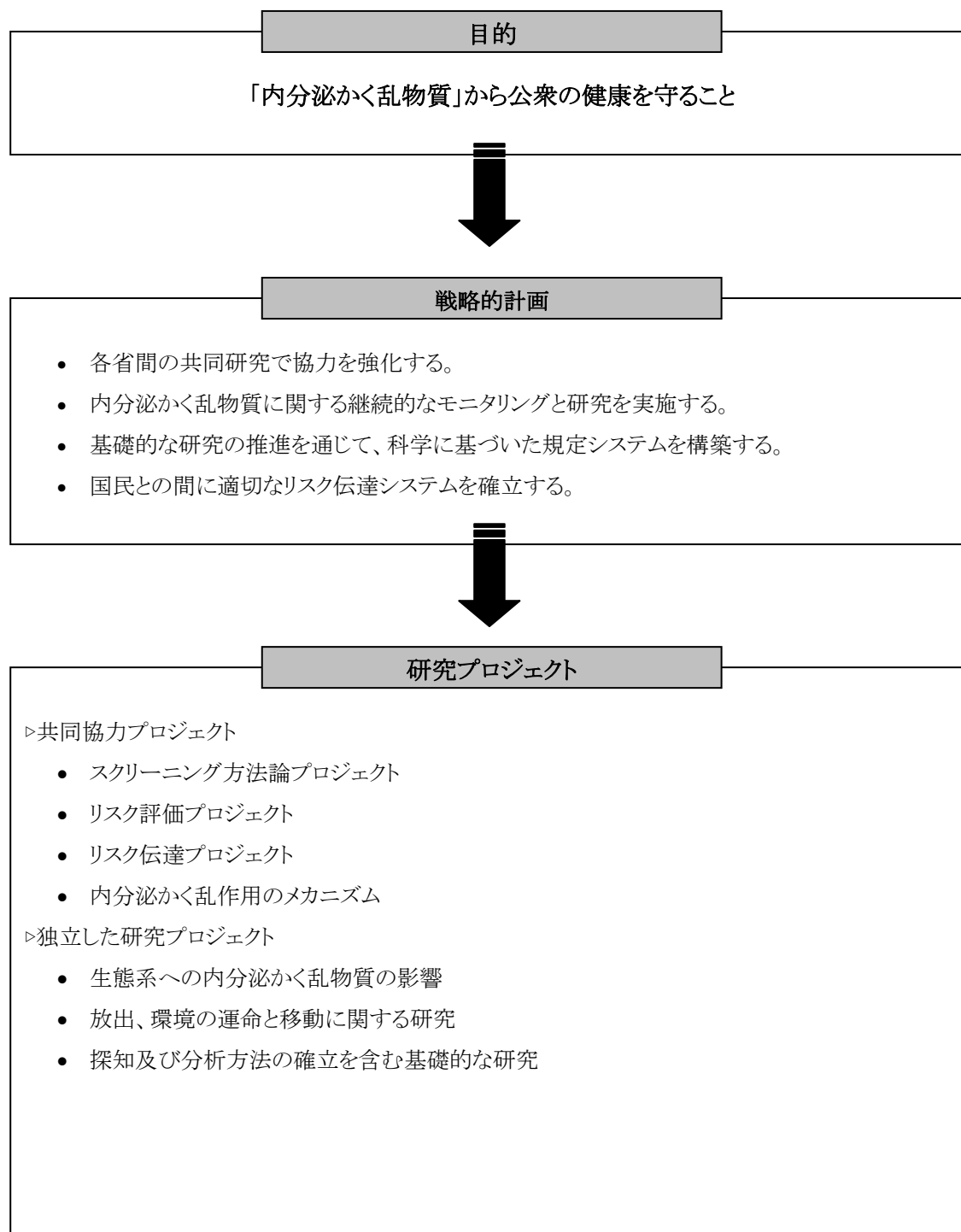
国立毒理学研究所での独立したプロジェクトとして、毎年、リスク評価の方法論に関する研究が実施されている。

- ダイオキシンの許容摂取日量(TDI)の確立(2001年1月): 4 pg TEQ/kg b.w./日 で、ダイオキシンのTDI(2005年と2006年)のリセットが規定された。
- 許容摂取日量(TDI): ダイオキシンへ生涯露出されても安全と考えられる濃度レベル

教育と広報

- カスタマイズされた教育とクラスごとの広報資料の開発

3. 内分泌かく乱物質の5ヵ年計画



3-1 計画の方向性と主なアウトライン

3-1-1 プロジェクトの方向性

プロジェクトはこれまで実施された研究の結果に基づいた安全管理ポリシーの確立に焦点を当てる。

- 陸上/海洋の環境と食品における内分泌かく乱物質のモニタリングは、将来のリスク評価のための基本的なデータを確保するために、ヒトの健康への潜在的な作用を提供する。
- 汚染経路の生態学的影響と、内分泌かく乱物質の健康影響を管理し、暴露関連変数を算出する。
- 陸上環境についてのモニタリングの結果に基づいて研究のホットスポットを選択し、野生の生物体の種の食物連鎖を考慮に入れた各省間の共同モニタリングを行う。

3-1-2 プロジェクト戦略

研究プロジェクトを共同研究プロジェクトと、独立研究プロジェクトへ分類

- 共同研究プロジェクトは省間の政策委員会を通して選ばれ、民間の関心の高い物質、あるいは、社会問題化している物質に研究の優先権を与える。そしてこれらの物質に対してリスク評価を実施する。
- 省間ネットワークから、より役に立つ詳細研究プロジェクトから、あるいは共同プロジェクト計画がそのようなプロジェクトを共同協力プロジェクトとして推進するようなプロジェクトから、プロジェクト(内分泌かく乱への探求、共同広報資料の作成と提供、リスク評価など)の選択を行う。
- 内分泌かく乱物質のリスク評価のための戦略的なアプローチとして、各省の作業エリアに基づいて役割を分割し、リスク評価と管理における研究プロジェクトから生み出された情報を分配する。

各省の独立した計画を確立して、独立した研究プロジェクトを実施する。

プロジェクト戦略の作成

- 2007年のプロジェクトは各省の研究計画に従って実施され、プロジェクトの詳細は関係省間で討議された。
- 2008年からは、研究プロジェクトは、5ヵ年計画に基づいた共同及び独立プロジェクトの選択を通じて、より組織的に実施されなければならない。

プロジェクトは二度評価される。すなわち、各省の自己評価と、省間の政策委員会での省間協力成果の評価である。省の包括的評価は3年に一度の政策委員会で行い、プロジェクトの結果はワークショップとシンポジウムで発表される。

内分泌かく乱の曖昧さ解明の調査も実施されなければならない。プロジェクト戦略は初期のリスク評価のインフラの確立を目的とし、OECDや開発国のような国際組織の傾向を理解することによってリスク評価と管理に進んでゆくことを計画している。

リスク評価を必要とする特定の化学物質については、国土輸送海事省、環境省、食料農業森林漁業省、そして韓国食料医薬局のような各省が集まって、暴露評価と用量作用関係を含むプロセス全体のリスク評価を実施するための包括的な研究プロジェクトについて同意する。環境省は、研究詳細についての省間の調整と、プロジェクトの効果的、そして効率的な実施のための準備をする役目を担う。

実施活動のための次期5ヵ年(2007-2011)の投資財源は、研究費用減少によって研究計画が後退するのを防止するような優先順位に従って評価予算を確保する。

3-1-3 省間協力プロジェクトと独立プロジェクトの分類

省間の協力によるシナジー効果から得られるリスク評価のような主題は、共同プロジェクトのトピックスとして選択されるであろうし、共同研究(必要な場合はタスクフォースチームが組織される)が推進されるであろう。

＜ 共同プロジェクトと独立プロジェクト ＞

Classification	Details	Research Subjects
Joint Projects	Selection of Joint Project through the Inter-Ministerial of Policy Committee	Action Mechanism Risk Assessment, Education & Publicity
Independent Projects	Projects that are Suitable for the Responsibilities of Each Ministry but Avoids Duplication through Prior Consultation and Review	Ministry of Environment: air, water, soil, sediment, biota Ministry of Health and Welfares: food and drug Ministry of Land, Transport and Maritime Affairs: marine ecosystem, etc. Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries: farmlands, livestock products, etc.

- 関係省の政策委員会の組織を通じてのデータ共有とネットワークシステムの強化。
- 内分泌かく乱物質政策委員会の組織: 環境省が国家の調整役を担当する。
- 共同シンポジウムやセミナーによって、データ共有のような共同システムを構築する。

3-1-4 計画の主なアウトライン

2011年までに4省は、マッチング/研究プロジェクトに合計51,300,000米ドルを投資する。

Classification	Field & Projects	Est. Budget (Mil. US dollar)
Ministry of Environment (National Institute of Environmental Research)	20 Projects in 6 Fields	13.1
Ministry of Land, Transport and Maritime Affairs (National Fisheries Research and Development Institute)	8 Projects in 3 Fields	13.9
Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (National Veterinary Research & Quarantine Service)	13 Projects in 5 Fields	2.0
Rural Development Administration	9 projects in 4 fields	4.5
Ministry of Health and Welfare (Korea Food and Drug Administration)	105 Projects in 5 Fields	10.8

内分泌かく乱作用の曖昧さと国際的な傾向を考慮して、基礎的な研究とモニタリングを継続して実施し、その後で、リスク評価と管理を行う。

省は共同して、組織的で効果的に国民へのリスク情報伝達をすることによって、国民を心配から取り除く望ましい解決策を熟考しなければならない。

< 分野ごとの投資規模と詳細 >

Classification	Details	Est. Budget (Mil. US dollar)
Monitoring	Verification of Concentration Level of Endocrine Disruptors in the Terrestrial & Marine Environment, and Food	21.65 (42%)
Risk Assessment	Risk Assessment on Humans & Eco-system	7 (14%)
Fundamental Research such as Action Mechanism	Development of Analytical Methodology & Toxicity Research	22.65 (44%)

3-1-5 共同プロジェクトと独立プロジェクト

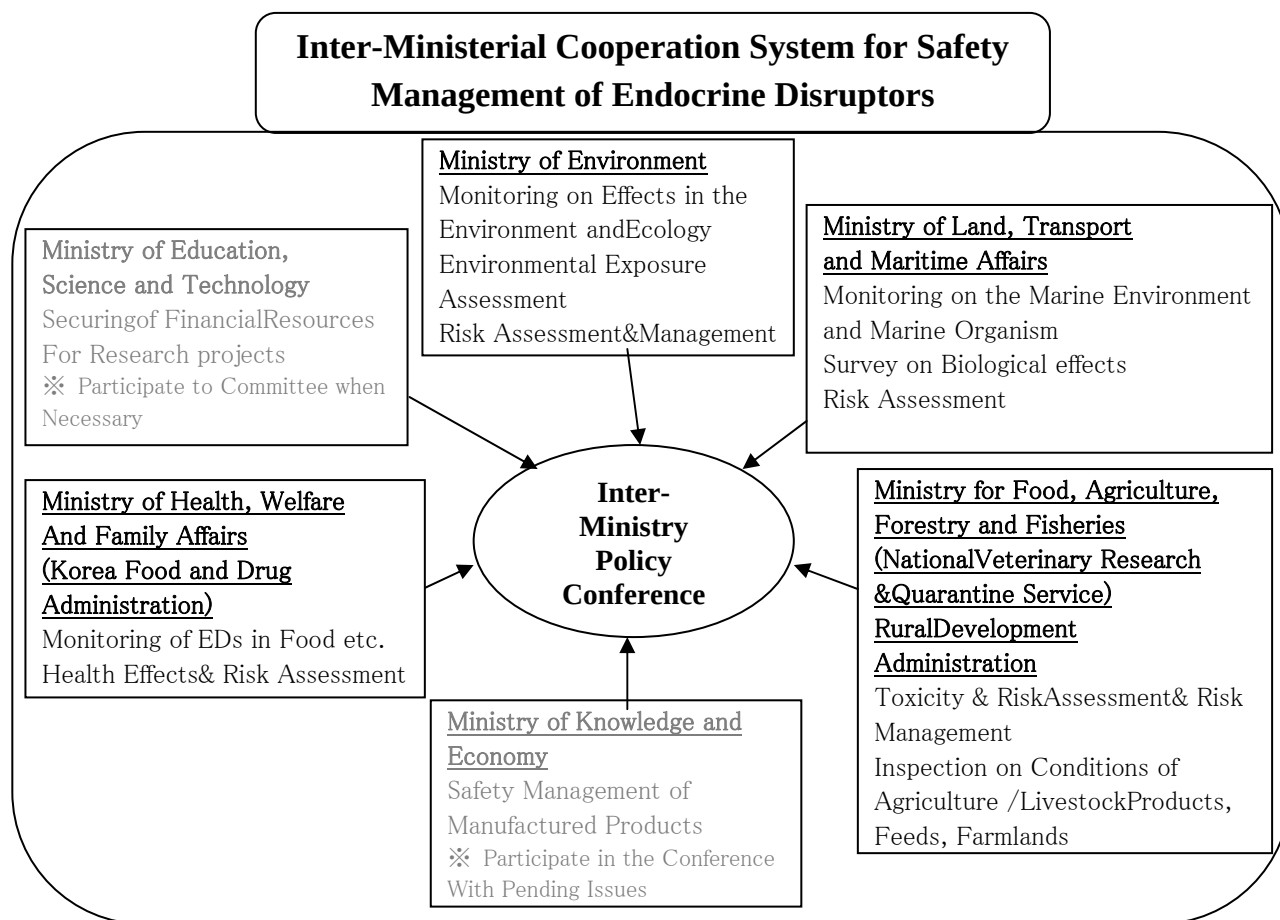
共同プロジェクト

- モニタリング研究 (共同及び独立) (国土輸送海事省、食料農業森林漁業省、環境省、地域開発局、韓国食料医薬局)
 - 基本的には、各省は独立した研究を推進するが、汚染に関連した区域の共同モニタリングを推進しなければならない(場所と物質の調整)。
- スクリーニングと試験法の開発 (共同及び独立) (国土輸送海事省、食料農業森林漁業省、環境省、地域開発局、韓国食料医薬局)
 - 各省は、その責任を考慮したスクリーニング方法を確立し開発するが、必要な場合はいくつかの主題について共同研究を推進しなければならない。
- 内分泌かく乱のメカニズムの探求 (共同及び独立) (国土輸送海事省、食料農業森林漁業省、環境省、地域開発局、韓国食料医薬局)
 - 各省は各省の責任に応じて、行動メカニズムの研究のような独立プロジェクトを実施し、これまで国際的に認知されている試験法に基づいた方法で各省の間で査定されていない疑わしい内分泌かく乱物質のスクリーニング作業を配分することによって共同研究を実施する。
- リスク評価研究 (共同) (国土輸送海事省、食料農業森林漁業省、環境省、地域開発局、韓国食料医薬局)
 - 各省は、各省の基本的モニタリング結果に基づいて共同リスク評価研究プロジェクトを推進する。

- 国際的共同プロジェクト(共同及び独立)(国土輸送海事省、食料農業森林漁業省、環境省、地域開発局、韓国食料医薬局)
 - 各省は、OECDにおけるスクリーニング及び試験法開発への参加のような共同参加を可能にする分野への共同協力計画を作成し、各省によって独立して実施されるプロジェクトは独立のままとする。(たとえば、環境省による韓-日共同研究)
- 国民のための広報及び情報伝達プロジェクト(共同及び独立)(環境省、食料農業森林漁業省、地域開発局、韓国食料医薬局)
 - 国民のための広報プロジェクトは省間の作業分配によって独立して実施され、共同プロジェクトに関しては関係省は共同してテレビ番組開発やリスク情報プログラムの開発のような大規模プロジェクトを探索して実行する。

独立プロジェクト

- 生態学的な影響の研究は、住んでいる生物の差異があるため独立して実施される(例えば、環境省 → 内陸の魚種、海洋魚種 食料農業森林漁業省 → 畜産物製品)
- 排出源の調査及び毒性削減技術の開発
 - 排出源の調査及び物質の毒性削減技術の開発は、これらのプロジェクトは各省の特別な責任を必要とするため独立して実施される。
- 環境の運命と移動についての研究
 - 環境における内分泌かく乱物質の運命と移動についての研究は、各省の関心と従属する媒体の相違のため独立して実施される。
- 分析方法の研究
 - このタイプの研究も、研究分析の従属する媒体の違いのため独立して実施される



3-2. 各省の詳細プロジェクト計画

3-2-1 国土輸送海事省 (国立漁業調査開発研究所)

- **目的**
清浄なる海洋環境の形成、健全なる海洋環境系の維持、そして安全な漁業製品の供給
- **全体の概要**
省は、2007年から2011年 (5年の期間) に、8つの分野の8つの研究プロジェクトに12,800,000米ドルを投入する計画である。

主要研究プロジェクト

- 1) 基礎的研究
 - 分析方法の確立
 - 海洋環境での内分泌かく乱物質の標準的な方法の確立
 - 品質評価/品質管理の inter-calibration プログラムの開発
 - 品質評価/品質管理の標準参考物質の製造
- 2) 海洋環境系内の内分泌かく乱物質のモニタリング
 - 各環境媒体における汚染レベルのモニタリング
 - モニタリング技術の開発

- 3) 国際的協力の調査と国内国際間の規制への戦略的対応
 - 国際協力への基礎の強化
 - 海洋生物の安全の確保に対する政策の提案
 - 省間ネットワークの構築

生態学的影響の評価

- 1) 生態学的影響の研究
 - 汚染区域内の海洋生命の生態学の点検
 - 生態学的毒性の評価
- 2) 毒性評価技術の研究
 - バイオマーカーの開発
 - 遺伝子組換え微生物を使用したスクリーニング試験法の開発
 - 内分泌かく乱物質に関するスクリーニングと生物学的検定のためのキットの開発

内分泌かく乱物質の運命に関する予想モデルの研究

- 1) 海洋生態系内の流入負荷についての研究
 - 汚染源の流入経路の特定とそれらの寄与比率
 - 内分泌かく乱物質の移動及び分布特性に関する研究
 - モデル内で必要なインプットパラメーターの調査
- 2) 海洋生態系内の内分泌かく乱物質の運命に関する予想モデルの開発と応用
 - 内分泌かく乱物質の運命を予想するモデルの開発
 - 海洋生態系内のサイバーモニタリングシステムの構築

3-2-2 食料農業森林漁業省（国立獣医学研究防疫サービス）

- 目的
 - 農産林産畜産物の製造における安全管理
 - 安全な農産畜産製品の製造と流通
- 全体の概要
 - 農産物林産物畜産物の製造の過程で使用あるいは汚染された内分泌かく乱物質についての毒性評価の基礎の構築
 - 内分泌かく乱物質のリスク評価と安全管理計画の構築
 - 農産物林産物畜産物及び飼料中の内分泌かく乱物質の汚染レベル調査
 - リスク軽減の研究の強化
 - リスク情報交換の活性化と防止管理システムの進化
 - 食料農業森林漁業省は2007年から2011年(5ヵ年計画)の間に4つの分野における10の研究プロジェクトの推進に対して、1,800,000米ドルをつぎ込もうと計画している。
- 主要プロジェクト研究
 - 内分泌かく乱物質についてのスクリーニング試験法の開発と応用
 - 動物医薬品、農薬、農産品あるいは畜産品における環境汚染物の残留物に関する、リスク評価とリスク管理ポリシーの確立
 - 内分泌かく乱物質に対するモニタリングとヒトの暴露評価
 - 毒性予防あるいは低減の研究と代替物質の開発
 - 家畜製品中の内分泌かく乱物質の予防管理システムの構築

分野ごとの研究の詳細

スクリーニング試験法の開発

- 1) 高処理量-高感度の内分泌かく乱物質のスクリーニング技術の開発と確立
 - 内分泌かく乱を探し出すためのユニークなバイオマーカーの開発
 - プロテオミクスあるいはまたゲノミクスによる内分泌かく乱の評価技術の開発

毒性とリスク評価

- 1) 動物用医薬品とEtcの内分泌かく乱作用の評価
 - サルファ薬剤のような抗菌薬の甲状腺かく乱作用の評価
 - 遺伝子組換え細胞内の受容体媒介作用のメカニズムの研究
 - 下垂体の内分泌かく乱についての研究
 - サルファ薬剤に関するリスク評価
 - 「観察されない逆作用レベル (NOAEL)」の再評価
 - 「許容される摂取日量 (ADI)」の再評価
- 2) 内分泌かく乱物質の発がん性ポテンシャルの評価
 - 内分泌かく乱と発がんの間の相互関係の研究
 - 機能的遺伝子を使用した、内分泌かく乱と発がんの間の相互関係の研究
 - プロテオミクスのレベルでの内分泌かく乱と発がんとの時間経過についての研究
 - 内分泌かく乱物質の適切な安全ファクターの創設の研究
 - 毒性の表現メカニズム、及び発がん性との相互関係による、適切な安全ファクターの創設

モニタリング(暴露評価)

- 1) 家畜、畜産物、飼料内の内分泌かく乱物質のモニタリング
 - 家畜内の内分泌かく乱物質のモニタリング
 - 畜産物内の内分泌かく乱物質のモニタリング
 - 飼料内の内分泌かく乱物質のモニタリング
- 2) 家畜環境内の内分泌かく乱物質のモニタリング

毒性防止と代替物質の開発

- 1) 毒性低減と代替物質の技術の開発
 - ヒトの疾病の細胞及び動物モデルの開発
 - 高感度モデルを使用して、ホルモン受容体への観察される逆作用レベルのない治療誘発物質の開発
 - 天然物起源であって、毒性を低減する生物分解性物質の発見探知

防止管理システムの確立

- 1) 畜産品内の内分泌かく乱物質のリスクについての情報ネットワークの確立
- 2) 畜産物内の内分泌かく乱物質の防止対策に関する公報資料の発行
- 3) 国際協力及び、国内/国際間の規制に対する戦略的反応に関しての共同研究

3-2-3 環境省(国立環境調査研究所)

- 環境省の目指すゴールは「内分泌かく乱物質の健全な管理のためのインフラの確立」である。
- スクリーニングとリスク評価方法論の確立
- リスク評価に基づいた環境管理と政策決定のためのインフラの作成
- 内分泌かく乱物質の研究のための国内及び国際間の協力の強化

目的の完遂のために環境省は2007年から2011年までの間に、以下に分類する6つの分野の15の研究プロジェクトの実施に対して13,000,000米ドルの投入を計画している。

- 環境モニタリング(内分泌かく乱物質の環境汚染レベルの評価)
- それらの生態系への影響の調査(用量作用関係)
- 発生源と影響区域の調査(暴露源の評価)
- リスク評価と管理(リスクの特徴付け)
- 国際的協力(共同研究プロジェクトの強化)
- 基礎研究(内分泌かく乱の検証)

- 各研究分野はいくつかの詳細から構成される

1) 環境モニタリング

媒体の異なった環境モニタリング

- 優先的な化学物質に注目して、研究はその背景と産業分野に基づいて分類される。

環境生物相モニタリング

- 生物相モニタリングは淡水魚と水陸両生動物について焦点をあてる。
- 生きている生物種の集合パターン、ビテロゲニンの濃度レベル、そして生殖器の機能異常は、生物相モニタリングの重要なデータである。

環境サンプル保存プロジェクト

- 環境省は、土壌、堆積物、魚類や両生類を含む生物相などのような環境サンプルの長期保存のために建造物を作る。

2) それらの生態系への影響の調査

生態学的な影響の詳細にわたる調査

- 指標生物のライフサイクルや、実験室規模の生態学試験の調査
- 内分泌かく乱物質の影響を特定するためのホットスポットの詳細な検証

生態学的影響の調査

- 野生生物における内分泌かく乱物質の作用メカニズムの研究
- 種の感受性の検査と生態学的影響の指標の開発

3) 発生源と影響区域の調査

発生源の調査

- 汚染物移動と発生経路のモニタリング

- 優先的化学物質のための放出リストと排出目録の作成
環境の運命の調査
- 地域スケールの運命評価モデルの開発と検証

4) リスク評価と管理

スクリーニング方法論の確立

- レベル1 関心物質のリスト
- レベル2 In vitroスクリーニング方法論
- レベル3 In vivoバイオマーカー測定
- レベル4 再生試験
- レベル5 ライフサイクル試験法

リスク評価の方法論の確立

リスク伝達と情報サービスシステムの強化

ソース管理の技術

5) 国際間協力の強化

韓-日共同研究の強化とOECDテストプログラム参加

6) 基礎研究

野生生物の基礎調査の強化

- 魚類と水陸両生動物を含む野生生物のライフサイクルの研究
- 生物種に対する各種環境要素の影響の研究
- 生体内の化学品の運命についての調査

高度な感度分析方法の開発

- リスク評価のための十分な感度を備えた分析方法の調査と開発

試験法の開発

- 毒性ゲノム学を利用したバイオマーカーの探索
- in vitro及びin vivo試験結果の間の相互関係の調査

3.2.4. 地域開発局(主として国立農業科学研究所で実施される)

- 目的
 - 農産物と農業環境における内分泌かく乱物質のリスク管理システムの構築
- 全体の概要
 - 農産物、農地、そして目標外の生物種、農業用水池に住む魚類の中の内分泌かく乱農薬の汚染レベルについての理解
 - 生産過程で使用された農薬あるいはまた内分泌かく乱物質に関する標準的な毒性と暴露の分析システムの確立
 - 内分泌かく乱物質に対する国家のリスク評価とリスク管理システムの地球規模の整合
 - 汚染された農地のリスク低減と改善の研究の強化
 - 産業/学術の共同研究と国際協力の活性化
 - 研究計画の安定した実施のためのタスクフォースチームの存立

- **主要な研究プロジェクト**

- 汚染モニタリング（農業用水、土壌、農産物）、作物耕作における行動の予想（農薬の運命と移動性の研究と、作物内の汚染経路のトレース）
- 農業生態系に対する内分泌かく乱影響の研究（用量作用評価、農業用貯水池の中の内分泌かく乱農薬のバイオモニタリング）
- 人間リスクに関する評価システムの確立（農地作業者の農薬リスク評価） 基本的な研究（分析方法の確立、リスク情報伝達、など）

- **プロジェクトの詳細**

1) 汚染レベルのモニタリングと運命の研究

汚染モニタリング

- サンプルング場所： 農場、果樹園、水田、など
- サンプルング母体： 農地の土壌、農産物、農業用水
- 分析物： ダイオキシン、PCBs、PAHs、有機塩素、など

農業環境内の農薬の運命の研究

- 汚染物の源についての研究
- 農薬の移動性と分布の特性についての研究
- 各種条件下での残留性に関する研究

農薬の収穫物への移動性に関する研究

- 収穫物における汚染物質の移動経路に関する研究
- 地域の代表的なモデルを使用して移動性の評価をする研究
- 主な収穫物ごとと標的農薬ごとの移動特性の研究

2) 農業生態系内で内分泌かく乱物質であると疑われている農薬の生物学的な影響の評価

農業生態系への有害影響の検証

- 主要な農業用貯水池内に住む魚類の汚染レベルのモニタリング
- 指標生物種への逆影響の研究

生態学的影響の評価のための試験法の研究

- 環境生物種内の内分泌への影響のメカニズムに関する調査
- 暴露と影響インジケータの開発
- スクリーニング方法の開発、種の感度についての研究、など

3) 内分泌かく乱物質と疑われる農薬の人間リスク評価の研究

農業作業者の暴露評価とリスク軽減に関する研究

- 農薬使用の調査
- 農業作業者に対するバイオモニタリング
- 農業作業者に対するリスク評価システムの確立
- 農業作業者の農薬によるリスクの軽減に関する研究

汚染された農産物のリスク分析

- 農産物の汚染レベルのモニタリングとリスク評価
- NOAELの決定
- リスク軽減対策の開発

4) 内分泌かく乱物質と疑われている農薬の基本的調査

内分泌かく乱物質の分析方法の確立

- 内分泌かく乱物質の標準的試験法の確立
- QAとQCの管理の相互検証プログラムの開発
- QAとQCの管理の標準物質の製造

国際間の協力とリスク情報交換システムの強化

- 国際的協力のための基礎の強化
- 農産物の安全確保のための政策と計画の提言
- 省間の戦略的計画に関する合同情報ネットワークの構築

3.2.5. 韓国食料医薬局(国立毒物学調査研究所)

● 目的

- 内分泌かく乱物質の科学的合理的管理計画の作成

● 全体の概要

- 内分泌かく乱物質の研究基本の強化
- 内分泌かく乱物質の健康影響についての研究の進展
- 産業-学術の関係と、国内/国際間のネットワークからの情報の共有
- リスク軽減と安全管理についての研究の強化
- 韓国食料医薬局は5つの分野における105の研究プロジェクトの推進に関して、2007年から2011年までに9,900,000米ドルを投入する計画である。

● 主要研究プロジェクト

- 食品、食品パッケージ、化粧品、などのモニタリング
- スクリーニング及び試験法の確立と、評価技術の開発
- ヒトの健康への影響
- 毒物作用と作用メカニズム
- 安全管理方法論
- 広報と公教育

● 詳細研究分野

1) モニタリング

食品及び食品容器内の内分泌かく乱物質のモニタリング、など

2) 国際間の協力によるスクリーニングと試験法の開発

内分泌かく乱物質のスクリーニングと試験法の確立

トランスクリプトミックスのような高処理能力の技術を使用した内分泌かく乱物質の評価

3) 毒物作用

毒性と行動メカニズムについての研究

- 個々のレベルでの研究
- 細胞や分子のレベルでの研究
- 次世代への影響に関する研究

4) ヒトの健康影響

ヒトの生物サンプル内の内分泌かく乱物質のモニタリング

- 乳房の乳のようなヒトの生物サンプル内に含まれる内分泌かく乱物質の暴露量の調査
- 精子の数と運動性、内分泌かく乱物質の間の関連性の調査

内分泌の病気と、内分泌かく乱物質の間の相関関係の研究

5) 安全管理方法論の研究

内分泌かく乱物質に関する情報システム

- 内分泌かく乱物質関連のデータベースの構築

リスク評価と管理システム

- リスク評価とリスク情報システム

広報と公教育

安全管理方法論

付属書7
英国における取組

OECDメンバー国の中での内分泌かく乱物質の評価についての報告書の開発に対する英国の取組

イントロダクション

この報告書は、単に英国政府の見方を提示するのではなく、内分泌かく乱化学物質に関するOECDの確認した試験の進展に関与した英国内のコミュニティの意見を反映するものである。

全般的なアプローチ

1. 英国は、特定の化学物質の内分泌かく乱作用について強い疑問を持っているが、我々の基本的なアプローチは、リスクが見分けられるようヨーロッパレベルの十分なリスク評価の前にそれらを前面に出すことである。それらを管理するために、ヨーロッパ中での対策がとられるであろう。英国は、ノニルフェノールやビスフェノールAを含む内分泌かく乱に関する討議において、目立って考慮されるいくつかの化学物質のリスク評価をリードしてきた。

人の健康

2. 人の健康リスクの評価における内分泌かく乱の評価のための特定の試験の使用は、環境の場におけるものとはまったく異なるものである。
3. 人の健康に対する潜在的なリスクの評価には、英国の監視員は、内分泌かく乱作用がある、あるいはその可能性が疑われている物質に対して特定の試験を実施することを一般的には推薦しない。英国の監視当局は、関連する英国あるいはヨーロッパの当局によってそのようなクラスの化学物質に対して確立された標準的な毒物学試験要求条件を使用して、新しい化学物質を試験することを要求する(すなわち、大量生産化学物質、農薬、医薬品、食品添加物、など)。もし標準的な毒性試験で内分泌システムへの影響があることが示されたら、認可の決定の前にはリスク低減対策が取られる前に、人の健康への重要性が評価されるであろう。同様に、特定な内分泌かく乱の試験は、化学汚染物が内分泌かく乱作用を有するかどうかの評価には、英国では使用されてこなかったし、将来もおそらくこのままであろう。内分泌システムに対する影響の特定な試験は、標準的な毒物学試験において見られる影響のメカニズムを解明するには便利かもしれない。実際には、英国では特定の汚染物質の毒性学的試験を稼働させるのはまれである。政府の研究資金は限られており、特定のテーマの研究プログラムが委託される方が、特定化学物質の毒性試験よりも可能性が高いであろう。
4. 内分泌かく乱の特定試験で最も使用の可能性のあるのは、産業内のもので、標準的な毒性学試験へ前進すべきかどうかの決定をするのに先立って行う、新しい候補化学物質の内分泌影響試験のためのスクリーニングのためのものである。

植物防疫製品

5. 基本的に英国は、このカテゴリーの化学物質のための内分泌かく乱作用の試験のための手順のセットは持っていないが、指令91/414/EECによって実施された評価は、EUの水生及び陸生のガイダンス書類 SANCO/3268/2001 (rev4) 及び SANCO/10329/2002 (rev 2) にある情報に基づいている。
6. 内分泌かく乱作用のある農薬を考えると、鉛が一般に哺乳類の毒性学的評価に規定されるが、それは、もし、ヒトの健康の評価が、活性物質が内分泌かく乱の性質を有するかもしれないことを示すならば、更に生態毒性学的なデータが要求されるかもしれない。例えば、水生の生物を考えるならば、我々は魚類の一生の生涯の研究を要求するか、魚類の部分的な生涯を要求するかを考えるであろう。水生の無脊椎動物、鳥類、陸生の無脊椎動物のような他の分野に関しては、現在のところ、可能性を適切に決定させるような研究プロトコルあるいはガイドラインは見当たらない。可能性のある影響を示すいかなるデータでも、それを解釈するには、暴露のプロフィールを考慮する必要がある:すなわち、内分泌かく乱の可能性は短い暴露によるものなのかあるいは長いものによるものなのか? 現在のところでは、このことに関しては情報がなく、このことから、影響は短期の暴露の結果であると仮定する用心深いアプロー

チがとられがちである。

環境評価

7. 環境評価に関して、英国は、可能性のある内分泌かく乱化学物質の試験に対しては実用本位のアプローチをとりがちであるので、その結果、もしもそれらが個体の中で健康への不利な影響と結びついていと確実に示されるならば、内分泌影響に関する標準的でないデータも考慮される。このことは、科学的に信頼できるものであるなら集団レベルの影響を与えるかもしれない。例えば、最近WFDのアネックスVIIIで、ある種の有機リン酸塩のドラフトEQSを設定するに際して、魚類の嗅膜の妨害の可能性とその結果の精子の成熟のフェロモントリガリングに関するデータが考慮された。同様に、過排卵の雌の腹足類動物に関する実験データは、比較的「重量」ベースにはあるが他のデータと共にビスフェノールAの最近のリスク評価に考慮された。
8. 英国は、集団関連の健康への逆作用との機械的なつながりがいまだ論証されていないゆえに、ビテロゲニン (VTG) 誘導とか、ホルモンのアンバランスのような内分泌かく乱作用のバイオマーカーのリスク評価目的での直接使用には慎重である傾向がある。しかしながら、これらのつながりのいくつかが強固になりつつあり⁶、優先度の高い仕事の分野となりつつあることは確かである。同様に、内分泌かく乱で誘発された魚類の卵精巣に関しては、劣った品質の生殖体の生産とのつながりに関する証拠となるデータがある⁷。
9. 内分泌かく乱物質のバイオマーカーは、今日ではリスク評価で決定的に鍵となる証拠として使用できるようになった。鍵となる証拠として主張するのは健全ではないのであるが、支援する役割に使用することはできる(たとえば、明らかな異常値の確認)。例えば、もし魚類の生涯試験がもしそうでなかったら異常値と考えられるような非常に低いNOECを示したなら、同様な濃度で作用を示すVTGデータはEQSの設定においては(あるいは更に厳密に言うならばPNECの設定において)確証する証拠として使用できるであろう。その上、VTGのようなバイオマーカーは、試験濃度の選択のガイドとか、有効な試験設計の補助に使用される意味において動物福祉の恩恵があると思われる^{8,9}。
10. 一言でいえば、英国はVMG-ecoに述べられた、最終的な先端の試験(たとえば、魚類のライフサイクル

⁶ See, for example: Miller DH, Jensen KM, Villeneuve DL, Kahl MD, Makynen EA, Durhan EJ, et al. 2007. Linkage of biochemical responses to population-level effects: a case study with vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 26: 521-527; and

Folmar LC, Gardner GR, Schreiber MP, Magliulo-Cepriano L, Mills LJ, Zaroogian G, Gutjahr-Gobell R, Haebler R, Horowitz DB, and Denslow ND. 2001. Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquat Toxicol*. 51:431-441; and also

Karen A. Kidd, Paul J. Blanchfield, Kenneth H. Mills, Vince P. Palace, Robert E. Evans, James M. Lazorchak and Robert W. Flick Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen (<http://www.pnas.org/content/104/21/8897.full>).

⁷ See, for example: Jobling, S., Coey, S., Whitmore, J. Klme, D.E., vanLook, KL, McAllister BG, Beresford, N., Henshaw, AC, Brighty, G., Tyler, C.R. and Sumpter, J.P. (2002). Wild roach (*Rutilus rutilus*: Cyprinidae) living in effluent contaminated rivers have reduced fertility. *Biology of Reproduction* 67 (2):515-524

⁸ Williams TD, Caunter JE, Lillicrap AD, Hutchinson TH, Gillings EG, Duffell S (2007) Evaluation of the reproductive effects of tamoxifen citrate in partial and full life-cycle studies using fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 695-707

⁹ Hutchinson TH (2007) Small is useful in endocrine disrupter assessment – four key recommendations for aquatic invertebrate research. *Ecotoxicology* 16: 231-238

試験)へのバイオマーカーの使用は強制的なものよりも望ましいと思われるという見解を支持する。たとえば、1つの物質が、レベル4の内分泌かく乱物質関連のハザードで、哺乳類あるいはin vitroの研究からの作用モードの知識なしで試験されているようなまれな場合の使用。

11. しかし、批准され国際的に標準化されていない試験からデータが得られ、特に結果の複製が困難であるような場合、解釈についての論争が容易に起こりうる。このようなことは、討論、広範なデータセットの準備、報告書、そして標準化問題に関する一連の研究さえも含む、ほとんど十年にも及ぶ広範な努力にもかかわらず、まだEDCにセンシティブなOECDガイドラインがないゆえに、潜在的な内分泌かく乱化学物質の評価における特有の問題である(哺乳類の子宮の栄養に関する分析評価は別として)。USEPAガイドラインに従って実施された魚類のライフサイクル試験は、内分泌影響がカバーされているであろうと我々が正当に確信を持てる唯一の場合である。無脊椎動物にとって唯一の日常的に使用されている生殖の試験は、ミジンコ 21日ガイドラインで、それは、EDC作用のいくつかの関連あるモードに対して、確かにセンシティブではない。
12. このような不確実性は、産業にも取締側にも同様に、高価な困難性をもたらす。英国はそれゆえに、健全な科学を継続するという基本に立って、検証試験プロセスをスピードアップしようとしてOECDを全面的に支持し、その側にあるパートナーと共に行動することを高い優先度と見ている。一路前進は、現行の検証試験のクライテリアを切り詰めることかもしれない。例として、魚類のライフサイクルの試験の批准は、1つの種に限定されるかもしれないし、更なる使用は発表されたデータでできるかもしれない。すでに部分的なライフサイクル試験で検証されているならば、生殖能力の測定の検証を2度繰り返す必要はないであろう。
13. その他の英国にとって優先すべきものは：
 - a) バイオマーカーの効率的な使用による、試験する魚の数の削減のような倫理学上の問題、あるいは、機械的に関連する代りの試験種の使用による脊椎動物試験種の入れ替え¹⁰
 - b) 現在のところ適切な内分泌かく乱試験が欠落している、軟体動物(あるグループは最初に基礎的な生理学の研究が必要であると認識されている)のような、本質的な生態学的にそして経済的に重要な動物のグループをも包含すること。そして、
 - c) 現在のガイドライン種の特定の作用モードをもってEDCに受け入れられる指標/試験を得ることである。

英国環境食品農業局
8月、2008年

¹⁰ Hutchinson TH, Caldwell D, Galay-Burgos M, Hartmann A, Holt M, Huggett D, Mastrocco F, Maund S, Oberwalder C, Versteeg D (2007) Intelligent testing strategies in ecotoxicology: mode of action approach for specifically acting chemicals. ECETOC Technical Report number 102, 145 pp

付属書 8
米国における取組

OECDへの寄与のための、U.S. EPAの内分泌かく乱物質のスクリーニングプログラム(EDSP)の概観 ケーススタディの文書

最終ドラフト：2008年8月14日

I. イントロダクション

2008年5月、OECD WNT-EDTAからワーキンググループに対し、「OECDメンバー国における内分泌かく乱物質の評価に関する報告書」へ導かれると期待される書類である「ケーススタディ」の開発に貢献するよう要請を求める通知が送付された。

それに応じて、米国のEPAは、その内分泌かく乱物質スクリーニングプログラム(EDSP)の概観を提供することにより、貢献している。そのプログラムは、農薬と農薬以外の化学物質がヒトの健康、野生動物そして環境に対して適用された場合の、エストロゲン、アンドロゲン、それに甲状腺(EAT)ホルモンシステムに対して可能性のある相互作用をスクリーニングし試験する2段階のシステムである。EPAが、可能性のある内分泌かく乱物質のスクリーニングにいかに期待を寄せているかを示すために、EDSP 第1段階バッテリーに重点を置いて、ここに討論を提示する。エストロゲン、アンドロゲンそして甲状腺の活性のある化学物質を探知する可能性を示すために精選された例を示す。哺乳類の*in vitro*の、そして非哺乳類の*in vivo*のスクリーニング試験法は、エストロゲンとアンドロゲンモードの行動、それぞれのステロイド合成の経路、視床下部一下垂体—生殖腺(HPG)、及び、視床下部一下垂体—甲状腺(HPT)軸系、をも含めた拮抗関係にあるそして相反する影響をカバーしてデザインされた。試験化学物質が内分泌システムと相互反応するかどうかを決定するために、証拠の重みのアプローチで、第1段階バッテリー内の試験法内の補足的そして確認的な証拠がどのように使用されるのかが強調されるであろう。もし、第1段階の結果が正であれば、すなわち、物質がE、AあるいはTホルモン経路と反応する可能性を示すのであれば、可能性のある危険を更に確認し、公衆と環境に対する災難とリスクを評価するために、第2段階で更に複雑で正確な用量反応試験が実施されるに違いない。

II. EDSPの概観

A. 議会の命令

1996年通過の食品品質保護条例(FQPA)と安全飲料水条例(SDWA)のその後の修正箇条と、連邦食品、医薬品、化粧品条例(FFDCA)は、EPAに対して下記のことを要求した：

自然のエストロゲンによって引き起こされる影響、あるいは行政官の指定するであろうその他の内分泌への影響と同様な影響を、ある種の物質がヒトに対して、有するかどうかを決定するため、最適な有効試験システムやその他の科学的に関連のある情報を駆使したスクリーニングプログラムを開発すること[21 U.S.C. 346a(p)]。

この命令に応じてEPAは、連邦顧問委員会条例(FACA)、5 U.S.C. App. 2. Section 9(c) のもとに、複数利害関係者による連邦顧問委員会すなわち内分泌かく乱物質スクリーニング及び試験顧問委員会(EDSTAC)を組織した。当委員会は、EPAに対して内分泌かく乱化学物質のスクリーニング及び試験プログラムをどのように設計するか助言することを求められた。1998年にEDSTACは最終報告書を発表したが、それは下記に要約するように、3つの基本的な勧告を盛り込んでいた。

- 1) エストロゲンかく乱を超えて視床下部一下垂体—生殖腺(HPG)、及び、視床下部一下垂体—甲状腺(HPT)軸系、を経てアンドロゲンと甲状腺のかく乱を見出す試験システムを含むように、追加的な作用モードの評価を拡張する。

- 2) 目標となる個体数を、ヒトを超えて野生動物まで広げる。
- 3) 2段階のアプローチをとり、第1段階は、エストロゲン・アンドロゲン・甲状腺 (EAT) ホルモンシステムとの相互作用のための物質を効果的にそして効率的にスクリーニングするためのひと組として一緒に動くようにデザインされた、ひと組の補足的な試験法から成り立つ。もし、証拠の重みで第1段階の結果が、試験物質がE、A、あるいはTホルモンシステムと相互作用する可能性を示す場合は、第2段階で、より包括的な試験法でもって、更に可能性のある障害を見つけ出し、用量作用関係を通じてリスクを評価するために追加的な試験が必要となるであろう。

EPAはEDSTACの勧告を考慮して2段階の試験戦略を採用し、EDSPを拡張してアンドロゲン甲状腺ホルモンシステムを、更に、EDSPのウェブサイトで詳細に検討しているように、野生動物までも含むように拡大した。 <http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/>

B. 試験法妥当性検証

試験法妥当性検証の基本は妥当性と信頼性の確立である。EDSPの第1段階スクリーニングでは、妥当性は、試験法の能力、あるいは、1つあるいはそれ以上のEATホルモンシステムと相互作用する可能性のある化学物質を探し出す試験法内の指標なのであるが、信頼性は実験室内の、そして実験室間のそのような結果の再現能力である。個々の試験法の検証試験過程を通じて、そして、FACAに従って、EDSPはガイダンス (たとえば、プロトコルの展開、知られている正・負の試験化学物質の選択、そして結果の解釈) を、EPA 内部 (研究開発オフィス、ORD) や、内分泌かく乱方法検証小委員会 (EDMVS)、内分泌かく乱物質方法検証助言委員会 (EDMVAC)、それに2001年から2007年まではコメントとして一般に公開されているFIFRA SAPなどに求めた。

EPAは、5段階の試験法妥当性検証プロセスに従った。それは、1) 試験の開発、2) 予備検証、3) 実験室間の検証、4) ピアレビュー、5) EDSPウェブサイトで詳細に検討されたような確認。
<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/assayvalidation/status.htm>

C. 第1段階スクリーニングバッテリーのための試験法選択の基礎

スクリーニングバッテリーは全体として動くようデザインされていた。バッテリーに組み込む候補試験法の選択の基準には下記がある: 1) 受容体拘束 (拮抗と相反の) と活性化/転写、生殖のステロイド合成、それに視床下部一下垂体一生殖腺 (HPG) フィードバックを含む行動の各種モードによるエストロゲン-媒介、アンドロゲン-媒介の影響を探し出すその試験法の能力、それと、2) 下記の表1にまとめたような、in vitro及び in vivo試験法がバッテリー内で互いに補足した度合い。更に、in vivo試験法の齧歯動物や両生類が、甲状腺機能に対する直接間接の影響を探す能力に基づいて、提案されたバッテリーのために選択された (視床下部一下垂体一甲状腺、HPT、フィードバック)。このようにして、提案された第1段階スクリーニングバッテリーの強固さは、個々の試験法ごとの強さと、それらのバッテリー内でEATホルモン機能への影響を見つけ出す補足的な性格に基づいたものなのである。

表1: EDSP 第1段階スクリーニングバッテリーにおける試験法の組

<i>In vitro</i>
Estrogen receptor (ER) binding – rat uterus or recombinant
Estrogen receptor – (hER α) transcriptional activation - Human cell line (HeLa-9903)
Androgen receptor (AR) binding – rat prostate
Steroidogenesis – Human cell line (H295R)
Aromatase – Human recombinant
<i>In vivo</i>
Uterotrophic (rat)
Hershberger (rat)
Pubertal female (rat)
Pubertal male (rat)
Amphibian metamorphosis (frog)
Fish short-term reproduction

E、A、あるいはTホルモンシステムに対する影響を見出すと期待される、作用の内分泌モードと補足的な試験法が示されている。

- 1) 発情原性かあるいは抗発情原性か — エストロゲンシグナルの増効で拮抗的に行動するかあるいは減衰で相反的に行動するか、*in vitro*のエストロゲン受容体接合と転写の活性化試験法と、*in vivo*の子宮の栄養に関する、思春期の雌の、そして魚類の短期生殖試験法の、結合された結果によって決定される。
- 2) 男性化あるいは抗男性化 — アンドロゲンシグナルの増効で拮抗的に行動するかあるいは減衰で相反的に行動するか、*in vitro*のアンドロゲン受容体接合試験法と、*in vivo*のハーシュバーガー試験法、思春期の雄の、そして魚類の短期生殖試験法の、結合された結果によって決定される。
- 3) ステロイド合成の影響 — *in vitro*のステロイド合成とアロマターゼ試験法と、それに、*in vivo*の思春期の雌と雄の、そして魚類の短期生殖試験法との、結合された結果によって決定される生殖腺のステロイド合成に関与するところの、誘発あるいは抑制する酵素によって、ステロイド合成のプロセスを変化させる。
- 4) 視床下部—下垂体—生殖腺 作用 (HPG) — *in vivo*の思春期の雌と雄の、そして魚類の短期生殖試験法との、結合された結果によって決定される、生殖腺のステロイド合成と配偶子形成の視床下部—下垂体の調整の干渉
- 5) 視床下部—下垂体—甲状腺 作用 (HPT) — 甲状腺ホルモン受容体の相互作用に直接含まれている、そして、*in vivo*の思春期の雌と雄と、両生類の変態試験法の組み合わせの結果によって決定されるような甲状腺機能に間接的に含まれている変化過程

*in vitro*及び*in vivo*試験法は、マルチモードの作用をカバーするものが第1段階スクリーニングバッテリーに含まれて、証拠の重みアプローチを支持するバッテリーの中の試験法中の確証する情報を提供する。バッテリー内の試験法中の補足的作用の度合いは、表2に要約されている。

表2. EDSP 第1段階のスクリーニングバッテリーにある試験法中の作用モードと補足的作用の度合い

Battery of Assays	Modes of Action							
	E ²	Anti-E	A ²	Anti-A	Steroidogenesis		HPG ³ Axis	HPT ³ Axis
					E ²	A ²		
<i>In vitro</i>								
ER Binding ¹	■	■						
ER α Transcriptional Activation	■							
AR Binding ¹			■	■				
Steroidogenesis H295R					■	■		
Aromatase Recombinant					■			
<i>In vivo</i>								
Uterotrophic	■							
Hershberger			■	■				
Pubertal Male			■	■		■	■	■
Pubertal Female	■	■			■		■	■
Amphibian Metamorphosis								■
Fish Short-term Reproduction (male & female)	■	■	■	■	■	■	■	

¹Estrogen and Androgen Receptor binding²Estrogen and Androgen³Hypothalamic-pituitary-gonadal or -thyroidal axis

全ての第1段階試験法が実施されて全ての試験法の結果がバッテリー内で否定であったなら、試験した物質はEATホルモンのプロセスと影響し合う可能性はないと結論してよいだろう。もし第1段階の結果が、物質がE、AあるいはT機能と影響し合う可能性を提示するならば、第2段階において、より複雑で決定的な用量作用試験が実施されるであろう。

D. EDSP第1段階スクリーニングバッテリーのSAPピアレビュー

EPAの第1段階バッテリーは、FIFRA SAP によって検討された。SAPは、提案されたバッテリーの試験法の構成が、試験化学物質のE、A、あるいはTホルモンシステムと影響し合う可能性を見極めるという目的を満たしているかどうかについてコメントする役割を担っていた。局へのSAPの最終報告は、SAPのウェブサイト <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2008/march/minutes2008-03-25.pdf> で見ることができる。

SAPは、個々に、そしてバッテリーとして試験法について論議して、結論を下した。

- 1) 第1段階のバッテリーでの試験法においてポジティブと試験された化学物質は、可能性のあるエストロゲン、アンドロゲンそして甲状腺ホルモン活性物質であろうとみられる。
- 2) 内分泌活性物質を見分ける能力は、試験が十分な反復性と冗長性を示しているため、第1段階バッテリーにおいて高められた。
- 3) 両生類変態と魚類の短期生殖の頂点の試験法の包含は、まだ発見されていない作用のメカニズムによって作動するであろう内分泌活性物質を見出すのに重要であることは明らかであった。
- 4) 一般のコメントで提案された、15日の成長した雄の試験法は、雄雌の思春期試験法への適切な代替物とはなりえないであろう。なぜなら、思春期の試験法は性の間の差異を提供し、開発中の組織的な影響の試験へのアプローチのみを提供するからである。

このようにして、SAPは、表1に示した、EDSP 第1段階バッテリー試験法は、E、AあるいはTホルモンシステムへの影響を見出すための化学物質のスクリーニングに十分であることを見出した。

III. EDSP 第1段階のスクリーニングバッテリーのダイナミクス

A. エストロゲンシグナル経路に影響を及ぼす化合物の探索のための試験法

最も早期における内分泌かく乱物質への関心は、エストロゲン受容体に結びついて、それによってエストロゲンシグナル経路を妨害する環境化学物質に関連したものであった。そのため、エストロゲン影響の農薬化学物質を洗い出すというFQPA内部での法令による必要事項につながる関心事項であったし、また、それ故に、EPAとEDSTACがEDSPのためのバッテリーの設計にあたって考慮した最初の行動モードでもある。エストロゲンは、脳の性に関連する分化や、雌の第二次の性関連の特性の発達を含めて、雄にも雌にも生殖機能にとって重要である。更に、エストロゲンは、性区別を超えたその他の身体のシステムの構造的それに機能的な発達、更に全体のホメオスタシスを維持することにも関与している。

EDSPの第1段階スクリーニングバッテリー内の5つの試験法は、ある化学物質がエストロゲン受容体機能に影響するかどうかを見つけることができる。と同時に、これらの試験法は発情性そして反発情性活性を有する化学物質を見つけ出すものと期待されている。それには、1) エストロゲン受容体(ER)接合 2) ER転写活性化 3) 子宮の栄養に関する 4) 思春期の雌 そして、5) 魚類短期生殖試験法 が含まれる。5つの試験法のうち2つのin vitro試験法(ER接合と転写活性化)は、試験化学物質の、エストロゲン受容体と影響し合う能力を見つけ出し、その結果、細胞レベルでその化学物質がどのように影響するのかについての機械的な情報をもたらす。三つのin vivo試験法は、その化学物質の影響の確認的証拠をもたらす。それぞれ、in vivoの皮下注射、経口胃管栄養法、そして水中の媒体によっている。子宮の栄養に関する試験法は、皮下の処理で弱いエストロゲンを見出すのに示されてきたが、一方、雌の思春期試験法は、その他のエストロゲン頼りの指標に加えて、膣の開口(VO)での年齢の検査によって、作用薬、拮抗薬の両方を見出すことができる。多くの化学物質は皮下の経路で活性であるが、いくつかの例では、吸収と代謝の違いのため経口の暴露がより効果的である。子宮の栄養に関する、雌の思春期の、そして魚類の短期生殖試験法に付随する暴露の別の経路は、第1段階のバッテリーに強さを付加し、更に、EDSP第2段階試験の設計に際してガイダンスを提供するだろう。バッテリー内のエストロゲン/抗エストロゲン試験法の部分集合の結果の解釈は、いかなる1個の試験法だけによってもたらされる情報よりも、証拠の重みアプローチにおける全データセットの合計の方がはるかに大きいので、すべての試験法の結果の検査によって完成する。簡潔な説明が、エストロゲンシグナリング経路に影響を与える可能性のある化合物を見出すための5つの試験法の各々の価値と共に提示されている。更に、以下の試験法とこのMOAを含むポジティブな試験化学物質の例が、セクションIVに表示されている。

1. ER接合試験法

ラットの子宮のサイトソル(RUC)を使用したER受容体の接合試験法は、急速なin vitro試験法である。それは、エストロゲン受容体に接合する試験化学物質の親和性を測定する(あるいは、ヒトの組換え型のER接合試験法の場合にはエストロゲン受容体の配位子結合領域)。配位子-受容体の相互の影響を測るのは機械的試験法である。それは、作用薬、拮抗薬、作用・拮抗混合作用あるいは影響の機能的な結果を有する化学物質の区別ができない。それでも、技術的な簡潔さと、高い処理量形式は、多数の化学物質のスクリーニングに対しては資するところ大である。かくして、試験法は、ER接合のための内生的なエストロゲンと競合する化学物質の鑑定のための貴重なツールなのである。この試験法の実際的な使用とそのin vivoでの影響との関連性については、科学文献に十分に報告されている。試験法は標準化され、数多くの正負の試験化合物で試験調査されてきた。ER接合試験法の実験室の間での検証試験は完成して、その結果は2008年末のピアレビューに提出されるであろう。2009年初のEDSPウェブサイトでプロトコールが入手できると期待される。

2. ER転写活性化試験法

ER転写活性化(ERTA)試験法は、化学物質のエストロゲン受容体への相互の影響と反応を見出す方法である。ERTA試験法は、化学物質に誘導され、配位子-受容体接合と、それに続くその結果としての転写活性化に続く、報告者遺伝子の表現に基づいたものである。OECDのテストガイドラインプログラムの下での内分泌かく乱試験及び評価タスクフォースの活動の一部として、日本の化学物質評価研究機関(CERI)は、hER-HeLa-9903(HeLa)細胞系を使用して、ERalfaの安定してトランスフェクションされたトランス活性化試験法を開発し確認した。この試験法はER作用物質を見分けることができるので、ER接合試験法を補足するものである。このようにしてこの試験法は、ERalfa作用物質の検出のための、より現代的そして機能的なアプローチとしてバッテリーに組み込まれている。

3. 子宮の栄養に関する試験法

子宮の栄養に関する試験法は、エストロゲン作用物質の影響と矛盾しない子宮の変化を顕在化させる化学物質の能力をまず第一に評価するin vivo試験法である。この試験法は成長した卵巣切除したメスを使用して実施されるが、性的には未熟な健全な雌のラット(内生的なエストロゲンが最小である)を使用して実施してもよい。エストロゲンが誘発した水の吸収や肥大による子宮の重量の増加が本質の指標である。皮下(sc)の暴露経路を使用することにより、子宮の栄養に関する試験法は、いかなる最初に通過する肝臓の代謝をも排除するところの特定のエストロゲン関連の生物学的反応に関する情報に貢献する。こうして、子宮の栄養に関する試験法からのデータは、代謝活動が感知できない(ER接合)か最小である(ERTA試験法)in vitroのER試験法を補足することができる。あるいはまた、in vivoの雌の思春期の試験法におけるように肝臓を最初に通過する。そしてそれは経口の暴露を含む。たとえば、エストロゲン様の(たとえばビスフェノールA)化学物質はER接合ERTAや子宮の栄養試験法では陽性であるに反して、エストロゲン化(たとえばメキシクロール)するために新陳代謝させる必要のある化学物質は、ER接合、ERTA、それに子宮の栄養に関する試験法では弱く、あるいは見逃してしまうであろうが、雌の思春期の試験法では陽性なのである。

4. 思春期の雌の試験法

思春期の雌の試験法はエストロゲン及び抗エストロゲンに反応しやすいin vivoの試験法である。それは、エストロゲン受容体アゴニストを感知できる、最近認知された唯一の生物学的検定法である。例えば、エストロゲン作用のある化学物質(たとえば、メキシクロール、ノニルフェノール、そして、オクチルフェノール)は、膣開口(VO)と、思春期の始まりの年齢を促進する。作用/拮抗の混合作用のある、選択的エストロゲン受容体モジュレーター(SERM)であるタモキシフェンを調べた際、タモキシフェン誘発のエストロゲン作用によってVOは促進された。それは子宮と膣の器官の重量変化によって実証された。エストロゲン作用は最初の発情の年齢を加速し、膣の上皮角化を誘発する。たとえあったにしても、わずかな環境の抗エストロゲンしか確認されていないために、思春期の雌の試験法における知られた抗エストロゲン化合物の作用について記述されたデータが不足しているけれど、抗エストロゲンに対する推定的解答は、VOと思春期の始まりの遅れであろう。VOの年齢はHPG軸系への影響によっても遅れうるので、VOへの時間の変化は特定のER作用にとつて必ずしも特徴的であるとはいえない。それでもなお、in vitroのER接合、ERTA、そして、子宮の栄養に関する試験法に組み合わせて使用したなら、ERメカニズムとその他のHPGメカニズムの間の相違は容易に明らかである。特定の化学物質誘発の反応のMOAは第1段階にとって判断基準ではないことを知っていても、

この領域で獲得したいかなる情報も、EDSP第2段階での更なる試験のための戦略の設計に使用できる。

雌の思春期の試験法は特定のエストロゲン関連の生物学的反応に関する情報をもたすことができる、そしてそのことには吸収、分配、代謝、そして、排出 (ADME) が十分に考慮され、経口の胃管栄養法が暴露の経路であるため、抗エストロゲンそしてSERMs (たとえば、タモキシフェン) の確認にとって極めて重要なのである。

5. 魚類の短期生殖試験法

コチヒメハヤの魚類短期生殖試験法は、エストロゲン作用物質及び拮抗物質に反応して HPG 軸系への妨害を反映する、産卵形態学と特定の生化学的指標の変化を見出すように設計されている。ひとまとめにしていえば、指標は、可能性のあるエストロゲンホルモン経路を含む内分泌かく乱に関する推論を見越して、このようにして、EDSP第2段階での更なる試験のためのガイダンスを提供する。

ビテロゲニンは卵黄たんぱく質で、その生産は、本来、エストロゲン受容体の相互作用によってコントロールされている。コチヒメハヤ特定の、ビテロゲニン生産を容易に測定可能とした免疫学的検定のキットが商業的に入手可能であるので、これは十分に確立された指標である。雄の魚のビテロゲニンの誘導は、雄は内生的なエストロゲンの循環濃度が大変低いので、極端に敏感であり、ER作用物質の特定の目安である。生殖能力のある雌はビテロゲニンの循環濃度が適度で、それはER拮抗物質によって減少可能である。エストロゲン及び抗エストロゲンは魚類試験法において卵の生産に影響を及ぼすことができる。生殖腺組織病理学における変動と組み合わさった生殖能力の変化は、生殖に関する健康状態の良い指標となり、エストロゲンそして抗エストロゲン暴露に敏感であるとして証明されてきた。

B. アンドロゲンシグナル経路に影響を及ぼす化合物の探索のための試験法。

アンドロゲンは性の分化と雄の第二次性特性の発達、更には雄雌両方の機能の広範にわたる多様さにとって重要である。これまで、多数の環境化学物質がアンドロゲンあるいは抗アンドロゲンとして作用することが示されてきた。EDSP第1段階のスクリーニングバッテリーの中の4つの試験法は、化学物質がアンドロゲン受容体機能に影響を与えるかどうかの見極めをすることができた。同時に、これらの試験法はアンドロゲンと抗アンドロゲン作用のある化学物質の見極めができるものと期待されている。1) AR接合、2) ハーシュバーガー、3) 思春期の雄、4) 魚類の短期生殖試験法が含まれる。

*in vitro*のAR接合試験法は作用の細胞(核)モードに関する機械的な情報を提供する。3つの*in vivo*試験法は生殖システムへの化学物質の与える影響に関する確証的証拠を提供する。特に、ハーシュバーガー試験法はアンドロゲン及び抗アンドロゲン作用の両方に対して診断的である。雄の思春期及び魚類の生殖試験法は、AR調節における変化を反映するが、頂端の性質のために、HPG機能に含まれる作用の他のモードに影響するかもしれない化学物質に対しても敏感である。更に、バッテリー内のこれら試験法の結果の解釈は、すべての試験法の結果を検討することにより成し遂げられる。それは、証拠の重みアプローチにおけるデータセットのすべての合計が、どの一つの試験法のみにもたらされる情報よりもはるかに大きいからなのである。アンドロゲンシグナル経路に影響する可能性のある化合物の探索のための4つの試験法の各々の簡潔な説明を、その価値と共に提示する。その上、以下の試験法と、このMOAを含む正の試験化学物質の例をセクションIVに示す。

1. AR接合試験法

ラットの前立腺サイトソルを利用したアンドロゲン受容体接合試験法(AR接合)は、試験化学物質のアンドロゲン受容体との接合の親和力を測定する急速のin vitro試験法である。それは、配位子-受容体の相互作用のみを測定する機械的な試験法である。ER接合試験法と同様に、その技術的簡便さと高い処理量のフォーマットは数多くの化学物質のスクリーニングに資するものである。このようにして、この試験法は化学物質の鑑定における内生的な配位子と競争しうる貴重なツールなのである。

AR接合試験法は作用物質と拮抗物質の両方の探索が可能であるが、その二つの区別はできない。従って、それは作用物質を拮抗物質から区別できるハーシュバーガー試験法と組み合わせて使用できる。

2. ハーシュバーガー試験法

ハーシュバーガー試験法は、アンドロゲン作用物質あるいは拮抗物質と両立する生物学的な作用を顕在化させる、化学物質の能力を評価する短期のin vivoスクリーンである。それには、5つのアンドロゲン依存の組織の重量の変化を利用する。1)腹側の前立腺 2)精囊 3)肛門球海綿体(LABC)筋 4)カウパー腺 そして 5)亀頭。特に、組織の重量の増加はアンドロゲン作用の症状を示す。対照的に、抗アンドロゲン化学物質は、プロピオン酸テストステロンのようなアンドロゲンと同時投与した場合、組織重量の増加をブロックするであろう。ハーシュバーガーは、特定のアンドロゲン関連の生物学的反応についての情報を提供して、バッテリーに貢献し、in vivoの試験法として、ADMEを反応の中に統合する。試験法は、ビンクロゾリンやフルタミドを含むいくつかの化学物質の抗アンドロゲン影響を見出すのに使用されてきた。

3. 思春期の雄の試験法

雄の思春期試験法は、アンドロゲンあるいは抗アンドロゲンとして作用するか、あるいはアンドロゲン合成を妨害する化学物質によるかく乱に敏感なin vivoの試験である。重要なことに、in vivoの試験法として、それは、ARと相互作用するために代謝の必要な化学物質を検出することができるのである。例えば、ビンクロゾリンのような化学物質は、包皮の分離(思春期の始まり)の年齢を遅らせ、アンドロゲン依存の組織の成長を減少させる。雄の思春期試験法は再現可能で、アンドロゲンホルモン作用を変化させる化学物質に敏感であり、in vitroのAR受容体試験法で検出されるAR作用物質や拮抗物質の有用な確認的情報を提供してくれる。

4. 魚類短期生殖試験法

コチヒメハヤの第二性徴は、アンドロゲン/抗アンドロゲン物質の影響を受ける指標である。つまり、雌は、AR作用物質に暴露した時に、雄の外部第二性徴(交尾の隆起)を展開する。この指標はこの行動のモードにとって特徴的であるのみならず、これらの特性を現さない雌においては非常に敏感なのである。対照的に、AR拮抗物質は、雄のコチヒメハヤにおいては、雄の第二性徴の表現を減少させる。コチヒメハヤの第二性徴の変化は、生物学的には妥当で、ユニークで、力強い。研究室間でのこれら指標の比較は、再現性があった。アンドロゲンと抗アンドロゲン物質は、生殖腺の組織病理学における同時変更を伴った魚類試験法で、卵の産出を効果的に禁止する。

C. 生殖のステロイド合成に影響を与える化合物の検出のための試験法

多数の環境化合物が、エストロゲン(たとえばエストラジオール)やアンドロゲン(たとえばテストステロン)の合成を妨害することが示されている。これに関連して、数多くのステロイド合成のためのin vitroの試験法がバッテリーのために考慮され、H295R細胞ラインを、それがエストラジオール及びテストステロン合成を誘導あるいは禁止する化学物質を特定する可能性を持っているがために、採用する決定がなされた。更に、多数の環境化合物がアロマターゼを禁止すること、アンドロゲン基質のエストロゲンへの転換が知られているため、ヒトの組換えアロマターゼ試験法を批准する決定がなされた。in vitroそしてin vivo試験法の組み合わせが、一つの化合物がエストロゲンとアンドロゲンの生産を妨害するかどうかについての通知済みの決定のための情報を十分に提供すると期待される。それには、1)ステロイド合成 2)アロマターゼ 3)思春期の雌 4)思春期の雄 そして、5)魚類短期生殖試験法 が含まれる。ステロイド合成に影響する可能性のある化合物の探索のための5つの試験法の各々の簡潔な説明を、その価値と共に提示する。その上、以下の試験法と、このMOAを含む正の試験化学物質の例をセクションIVに示す。

1. ステロイド合成(H295R)試験法

H295Rは、ヒトの副腎皮質のがんの細胞ラインで、ステロイド合成経路中の鍵となる酵素をすべて所有している。いくつかの研究の結果、これらの酵素と、それらのmRNAと中間生成物や最終製品は、すべて、高処理量書式において容易に測定できることが示されている。EDSP第1段階スクリーニングバッテリーの目的のために、試験化合物と共に、あるいはなしに製造されたエストラジオールとテストステロンの測定が鍵となる指標である。H295R細胞の生体異物を代謝する能力が明らかに低いことを考慮して、試験法は、1つあるいはそれ以上の指標ホルモンの生産を減らすことにつながる経路中の酵素を禁止するか、あるいは1つあるいはそれ以上の指標ホルモンの生産を増加することにつながる酵素の生産を誘発するか、によってステロイドホルモン合成に影響を与える化学物質を探し出す簡単で安価で明確な方法を提供する。バッテリー内のその他の試験法は、ステロイドホルモン合成を妨害する化学物質の逆作用を見出すことができる一方、変更された経路の特定の要素を見分けることができない。H295Rステロイド合成試験法は標準化されており、多数の正負試験化合物で検査されてきた。研究所間での検証試験も終了しており、結果はピアレビューに出されてきた。プロトコールは2008年末にはEDSPのウェブサイトで見ることができると期待されている。

2. アロマターゼ(ヒトの組換え体)試験法

ヒトの組換え個体アロマターゼ試験法は、アロマターゼ作用を禁止しその結果アンドロゲンのエストロゲンへの転換をブロックする化学物質を探し出す安価で速い方法である。同時に、アロマターゼ ステロイド合成試験法は、第一段バッテリー内で称賛を浴びており、アロマターゼとエストロゲン合成を弱く禁止する生体異物の作用を見出すのに十分な感度を示してきた唯一の試験法である。

3. 思春期の雌と思春期の雄の試験法

雄と雌の思春期試験法における数多くのホルモン依存指標の変化は、精巣と卵巣による内生的なステロイドホルモンの生産を妨害する化学物質の影響を見出すであろう。そして、思春期の雄とステロイド合成の試験法は、欠陥のあるエストロゲンとアンドロゲンの生産を識別するのに必要な診断の情報を提供する。雄の思春期試験法も、エストロゲン(たとえば、ケトコナゾール)の生成に先立ってステロイド合成に影響する化学物質の検出のために示されている。雌の思春期試験法は変更されたアロマターゼ活性の影響を検出するであろう。例えば、フアドロゾールによるアロマターゼ活性の抑制は、エストロゲン依存の指標を変化させた。雄と雌の思春期プロトコールは共に、ステロイド合成に影響する化合物を容易に検出する能力を有しているけれど、作用のステロイド合成モードの正しい識別は、支持するin vitroのデータによってのみ可能である。アンドロゲンホルモンレベルの測定が、精巣によってアンドロゲン合成をブロックする化合物の検出を行う雄の思春期試験法の感度を高めることが示されている。

4. 魚類の短期の生殖試験法

ステロイド合成経路での妨害は、魚類の試験法におけるいくつかの指標で探知される。雄の精巣の中の間細胞(ライジヒ細胞)増殖、ステロイドの循環濃度の低下、雌の減少した血漿ビテログネン、それに、損なわれた生殖、はすべて、可能性のあるステロイド合成の変化を示す。

D. HPG 軸系を変化させる化学物質の検出のための試験法

視床下部-下垂体-生殖腺 軸系 (HPG) に対する環境化学物質の影響の評価をすることも重要であると、EDSTACは結論付けた。この問題の処理にあたって、バッテリーは雄と雌の思春期の試験法と魚類の短期生殖試験法を含んでいる。そしてそれは、雄と雌の魚を含んでいる。影響を受ける対象となるメカニズムにはいろいろな種類があるので、生殖の発達と機能の視床下部-下垂体 規制は、多くの環境化合物に対して敏感である。多くの医薬品が、生殖腺機能の視床下部規制と、究極的には生殖腺ホルモンと、生殖体生産を邪魔することがありうることはよく知られている。同様に、多くある中で例えばジチオカルバミン酸塩、フォルムアミジン、クロロトリアジン、のような環境化合物が、下垂体ホルモン合成と分泌の視床下部規制を変化させることによって、内分泌機能を妨害することが見つかっている。このような作用のモードによって、これら同様の化学物質が生殖の発達や加齢に干渉することが示されてきた。

スクリーニングプロセスの間にEATに影響する特定の反応に横たわるMOAについて知る必要はないが、EDSP第1段階バッテリーはHPG 軸系が変更されたと推論的に決めるためにバッテリーに含まれているin vivo試験の組み合わせられた結果を利用するよう設計されている。例えば、もしひとつの化学物質が、それぞれ雄と雌のラットの包皮の分離と膣の開口を遅らせるが、ERあるいはAR接合又はステロイド合成が変わらない、ということが見つかったら、思春期の遅れは損なわれた視床下部-下垂体の機能の所為であると結論付けられるかもしれない。これは、ジチオカルバミン酸塩サイラム(ノルエピネフリン合成とGnRH放出を損なう)や、アトラジン(LHの分泌を損なう)のような中枢神経システムに作用する化合物によって、雄と雌の思春期試験法に際して作られるプロフィールである。ドーパミン作動性の受容体機能を変化させる、ブロモクリプチン、ピモザイド、ハロペリドール、などの医薬品も、思春期試験法で査定されている。全てのケースで、中枢神経システムに作用するこれらの化合物は、正常な思春期発達を変化させることが分かった。

コチヒメハヤに関する魚類短期生殖試験法は、HPG 軸系の変化を反映する、産卵、形態学、それに特定の生化学的指標の、それに(抗)エストロゲン、そして(抗)アンドロゲン経路を含めた、変化を探るように設計されている。ここでも、バッテリーに含まれるin vivo試験法の組み合わせられた結果は、HPG 軸系が変更されたことを推論的に決定するものである。HPG軸系対その他の可能性のある作用モードへの影響を識別するのに必要となるだろう、課題のタイプの例を表4に示す。

表4: 化学物質暴露後の第1段階スクリーニングバッテリーにおける各種作用モード(MOA)の診断上のプロフィール

Assay	Was an effect detected?			
ER Binding	Yes	No	No	No
AR Binding	No	Yes	No	No
Steroidogenesis	No	No	Yes	No
Male Pubertal	No	Yes	Yes	Yes
Female Pubertal	Yes	No	Yes	Yes
Fish	Yes	Yes	Yes	Yes
Likely MOA:	ER	AR	Steroidogenesis	HPG

E. HPT軸系に影響する化学物質の検出の試験法

エストロゲン及びアンドロゲンホルモン経路を含む生殖機能のホルモン調整を変化させる可能性を有する環境化合物の探知に加えて、提案された第1段階のスクリーニングバッテリーに含まれるいくつかの試験法も、甲状腺機能を妨害する化学物質の可能性についての関連情報を提供するであろう。甲状腺ホルモンは、脊椎動物の生理学上の機能の正常な発達と保持にとって、欠くことのできないものである。甲状腺ホルモンの組織や細胞への送付は、成人においては早期の発達の期間に高度に調節され、視床下部-下垂体甲状腺(HPT)軸系を巻き込んだ、複雑な生理学的プロセスに、周辺の器官/組織も含めて、支配されている。特定の毒物の存在のような、環境のファクターは、in vivo試験法での甲状腺関連指標で検知されるいろいろな反応を含めた、各種の調整のポイントでのこのシステムを混乱させるものである。この目的のために、3つの試験法が設計されている、1) 思春期の雌 2) 思春期の雄 3) 両生類の変態。甲状腺の発達と機能を妨害する可能性のある化合物の探索のための3つの試験法の各々の簡潔な説明を、その価値と共に提示する。その上、以下の試験法と、このMOAを含む正の試験化学物質の例をセクションIVに示す。

1. 思春期の雄と雌の試験法

思春期の雄と雌の試験法は、漿液TSHとT4濃度、甲状腺器官重量と組織構造、それに肝臓の重量を含む、試験化学物質と甲状腺ホルモンシステムとの相互作用を見出すことのできる多数指標を含む。雄と雌両方の試験法は、甲状腺ホルモンの合成と除去を妨害するいろいろなメカニズムによって作用する、甲状腺中毒物質を見つけ出すために示された。雄と雌の思春期試験法は同じ甲状腺指標を含んでいるが、両性の甲状腺軸系の調査は、処理に反応して性の相違を見出す機会を与えてくれる。この早い段階では、雄あるいは雌が甲状腺軸系の妨害をする毒物に対して、より敏感であるかどうかは明らかでない。しかしながら、雄の方が少しばかり長い時間処理されるので、雄の思春期試験法の方が雌の場合よりも強固なのであろう。予備検証試験研究において、雄の方が、低い服用レベルに反応することに基づいた甲状腺ホルモンの肝臓クリアランスを誘導する、化学物質に対して、より敏感であることが示されている。雄の試験法においては、食事制限研究の結果、コントロールに対して9%あるいはもっと大きな末期重量の減少が、循環T4濃度の減少をもたらしていることが示された。この影響は、バッテリーの甲状腺MOAを解釈するにあたっては考慮する必要がある。もしその他の試験法がHPT軸系を含む影響を見出さないなら、単一の指標における1つの変化が正の結果とは解釈できないであろうから、in vivo試験法の中の補足的な結果は、データの解釈の助けになることが期待される。

2. 両棲類の変態の試験法

両棲類の変態の試験法(AMA)は、HPT軸系の正常な機能を妨害する物質の見分けを目的としたスクリーニング試験法である。AMAは、種の間の甲状腺システムの保存された構造と機能に基づいているという範囲で、一般化された脊椎動物のモデルを代表する。AMAは、HPT軸系と共に活性な物質に反応するところの、良く研究された甲状腺依存のプロセスを提供する。そして、形態学の展開を受ける種の中で甲状腺作用を評価する、第1段階バッテリーにとって唯一の試験法である。

AMAは、後胚発生期に起きる劇的な形態学的な変化が、HPT軸系の正常な作動次第であって、これらのプロセスの妨害は無視できない影響をもたらす、という原理に基づいている。オタマジャクシの変態において、甲状腺ホルモン(TH)は、実質的に動物の体のすべての組織に対して、細胞の増殖、分化、それに死を含む、多様な形態学的、生理学的、そして生化学的な変化の影響を及ぼす。結果は器官の改めでの生成、器官の損失、そして広範囲な組織の再建である。THへの変態の依存、そして厳密な生化学的な制御、その下でのこれらのプロセスの生起、があるとしても、これらのプロセスのタイミングと性格は、甲状腺軸系の機能を代表する指標として役立つことができる。ということで、AMAの中で利用されている。更に、後胚発生は、哺乳類とほとんどの両生類とは(直接発達 対 変態)まったく異なっているようであるが、脊椎動物の間では甲状腺システムの高いレベルの進化的な保存が存在する。そして、これらのプロセスを制御する、基礎となる細胞や分子の経路は同一ではないかもしれないが類似している。進化的に保存された脊椎動物の甲状腺システムの特徴は、両生類、特に無尾類を、HPT軸系の妨害の評価の一般的なモデルとして使用する能力を高め、結果がその他の脊椎動物種について外挿できる。

AMAにおける第一の指標は、発育段階、後肢の長さ、そして、甲状腺の組織構造である。各指標はHPT軸系と影響し合う化学物質によって影響される。例えば、甲状腺生産の拮抗薬、ヨウ素化、過塩素酸塩やメチマゾールのような作用は、甲状腺における発育を遅らせ、特徴的な障害を誘発する。甲状腺の作用薬(たとえば、本来の甲状腺ホルモン)は、発育を加速する。その上、HPT軸系に沿った相互作用を検知するために開発されてきた哺乳類の試験法とは異なって、AMAは周辺の組織に作用する化学物質を検知する能力を有している。例えば、T4をT3に変形させるモノデオジナーゼの禁止は、オタマジャクシに対して発育段階を割り当てる能力がないことによって検知される非同期性の発育を引き起こすことができる。このメカニズムに関する知識は、この場合、甲状腺の組織構造あるいは循環する甲状腺ホルモンに対する付随する影響なしに発育が影響されうるがゆえに、重要なのである。

IV. EATホルモンシステムと相互作用する、知られた試験化学物質のケース例

このセクションでは、EDSP第1段階スクリーニングバッテリーのダイナミクスが、選択的な例の使用を通じて、E、AあるいはTホルモン経路と相互作用することが知られている試験化学物質と、どのように働くことができるかを示す。その例には、セクションIIIで述べたように、バッテリー内の作用の特定のモード(MOA)をカバーするように設計された個々の試験法のグループを含んでいる。結果の概観が、各々のスクリーニング試験法のためにEPAとOECDによって実施された検証試験プロセスの部分として示されている。EPA確認プロセスの詳細な報告と各試験法の結果は、EDSPウェブサイトで見ることができる。

<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/assayvalidation/status.htm>

A. エストロゲンMOAと補足的 第一段試験法: 1) エストロゲン受容体(EP)接合 2) ER転写活性化(ER TA) 3) 子宮の栄養に関する 4) 思春期の雌、そして 5) 魚類の短期生殖

1. Mメキシクロール親化合物が代謝物質に比べて弱いバインダーである農薬

ER Binding assay	$K_i = 65 \pm 9 \text{ uM}$
ER TA assay (hER-HeLa-9903)	$PC_{max} = 33.4 \pm 0.2\%$

表1. メキシクロールは、禁止定数(K_i)で示されるように、エストロゲン受容体にポジティブな方法で接合している。メキシクロールは PC_{50} を成し遂げるのに失敗している。従って、 PC_{max} を与えた。 PC_{max} は、メキシクロールが、活性化転写でポジティブ制御の、大略33%の作用であったことを示している。

子宮の栄養に関する試験法

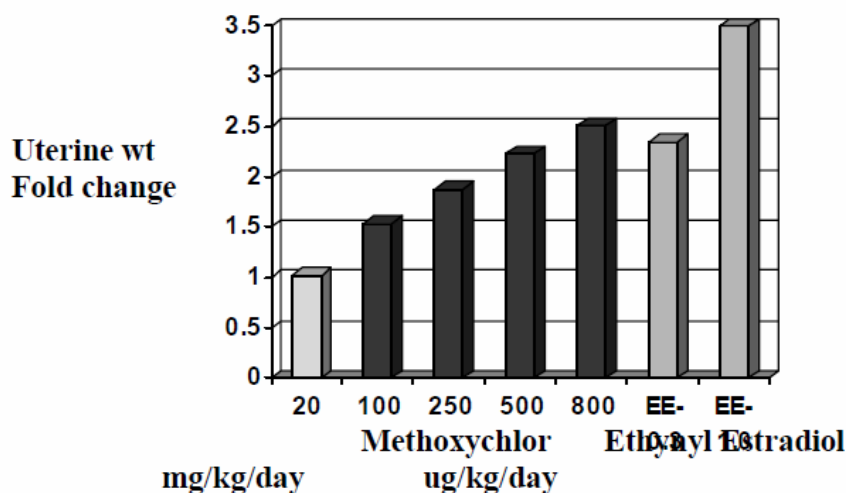


図1. メキシクロールの皮下注射の後で卵巣切除したラットを使用した、3つの契約実験室の平均結果。子宮の重量の1倍の変化に等しい vehicle control(0 mg/kg/day)に比例してメキシクロールは20mg/kg/day(灰色のバー)で異なっていない($P>0.05$)が、100から800 mg/kg/day(赤色のバー)では異なっている($P<0.05$)。同様に、ポジティブ制御は、vehicle control から 0.3 と 1.0 ug/kg/day(緑色のバー)で異なっている($P<0.05$)。

思春期の雌の試験法

End point	Methoxychlor dose level (mg/kg/day)			
	0	12.5	25	50
Age at VO (d)	31.9 ± 0.3	27.9 ± 0.2*	27.0 ± 0.2*	27.0 ± 0.2*
BW at VO (g)	117.58 ± 2.5	92.41 ± 2.3*	87.48 ± 2.2*	82.02 ± 1.2*
BW Gain (g)	111.0 ± 1.8	110.8 ± 2.4	113.5 ± 3.1	106.8 ± 1.7
Final BW (% Ctl)	100	97.6	100.7	96.3
Age at first estrus (d)	33.4	30.9*	30.7*	28.6*
Regular cycles (%)	80	80	27*	20*

*Different (P<0.05) from vehicle control.

表2. 経口胃管栄養法によった、12.5 mg/kg/day から始めたメトキシクロールの暴露は、早期の思春期の始まりを誘発した。図示されたように膣開口 (VO) の時の年齢と体重の著しい減少が見られる。更に、最初の発情の年齢と規則的な周期のパーセントは、12.5 mg/kg/day と25mg/kg/day からそれぞれ始まって著しく減少している。

魚類の短期生殖試験法

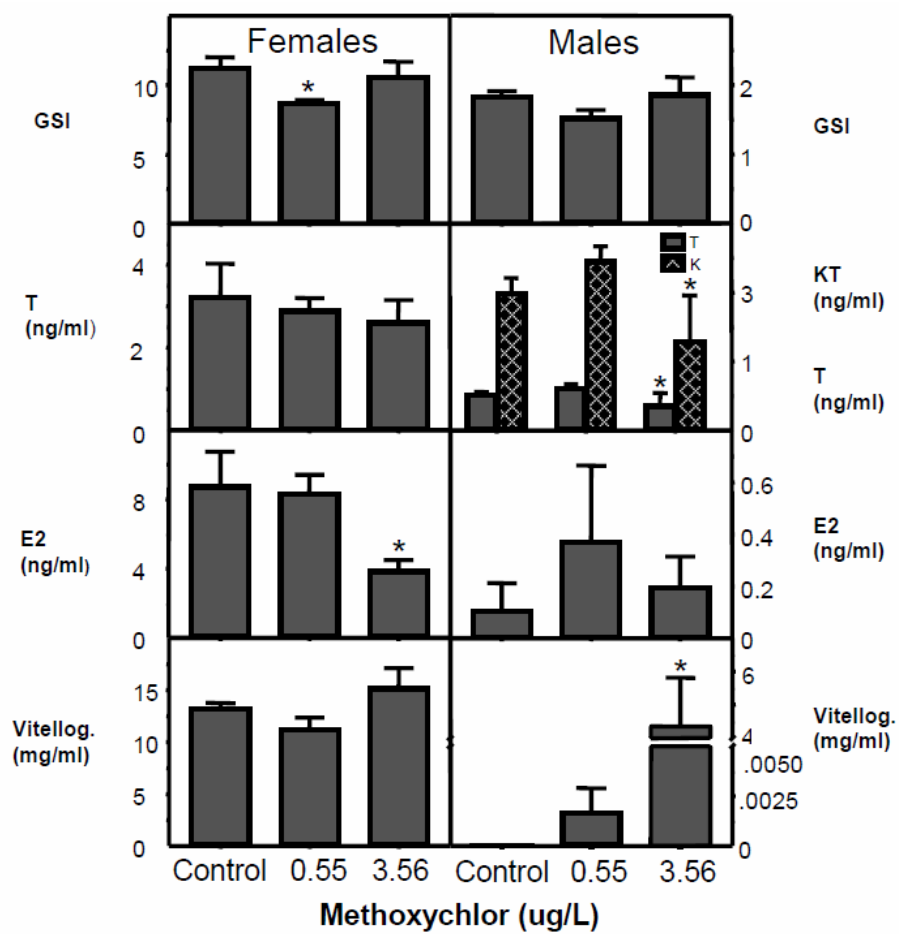


図2. メトキシクロールは、ビテログニン生産を誘発し、3.56 μ g/L で雄のテストステロン、雌のエストラジオールの生産を抑制した。

魚類の短期生殖試験法

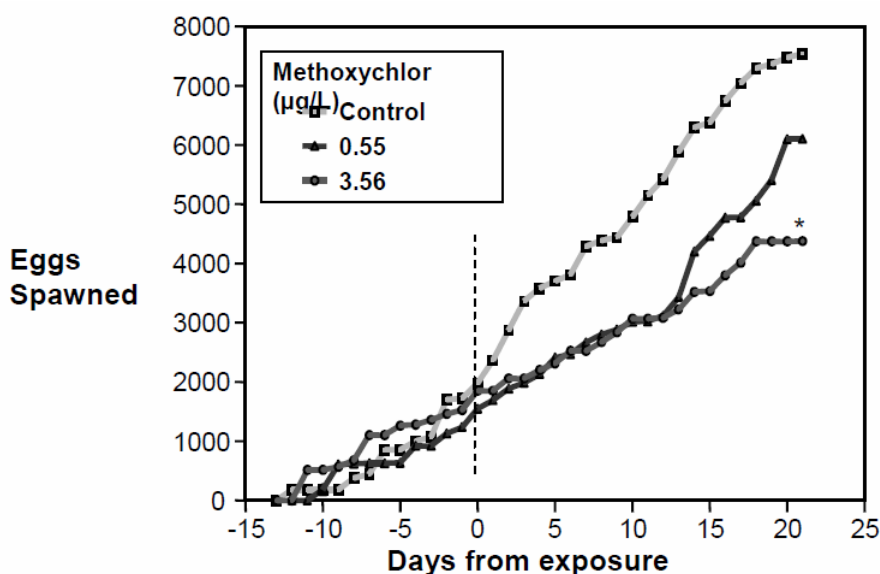


図3. メトキシクロールは、3.56 $\mu\text{g/L}$ で、卵の生産を20.5から8.3卵/雌/日まで著しく減らした。

メトキシクロールのまとめ: in vitroのER試験法、in vivoの思春期試験法における、比較的弱いが確実な、自然のままのメトキシクロールの反応が、in vivoの雌の思春期の、そして魚類の生殖の試験法で、明白なメトキシクロール代謝産物の比較的強い確実な反応によって確証された。このことから、全ての試験法の中の複合された確実な反応は、メトキシクロールがエストロゲンホルモン経路と拮抗関係にある仕方で、強い証拠の重みを示している。その結果、続いての試験のEDSP 第2段階でのきっかけとなるだろう。

2. **ビスフェノールA** - ポリカーボネートプラスチックの生産に主として使用される工業用化合物で、これは in vitroでは発情性で、in vivoでは混合された結果を示す。

ER binding assay	Full binding curve, %RBA = 0.2
ER TA assay (hER-HeLa-9903)	Log PC ₅₀ = -6.14

表3. ビスフェノールAは、比較類似性 0.2% で完全禁止のカーブをもたらした。(%RBA= IC₅₀ reference/IC₅₀ 試験物質 x100) それに Log PC₅₀ of -6.14

子宮の栄養に関する試験法

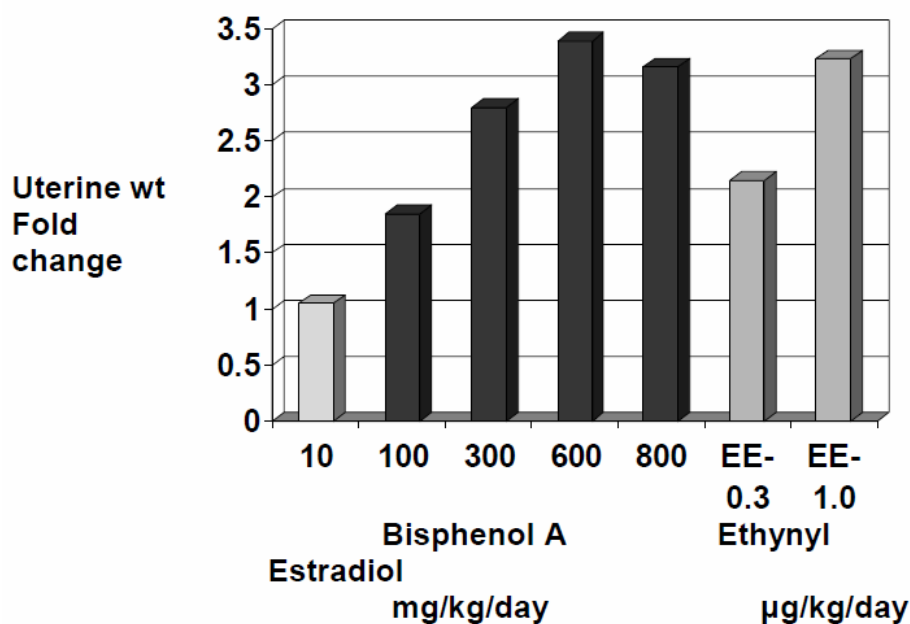


図4. 結果は、ビスフェノールAの皮下注射に続いて卵巣切除したラットを使用した、5つの契約研究所にわたる平均のもの。子宮の重量の 1 fold の変化に等しい vehicle control (0 mg/kg/day) に関連して、ビスフェノールAは 10 mg/kg/day (グレーのバー) で変化ないが ($P>0.05$)、100 から 800 mg/kg/day (赤のバー) で変化あり ($P<0.05$)。同様に、positive control は0.3 及び 1.0 $\mu\text{g/kg/day}$ (グリーンのバー) の vehicle control とは異なっており ($P<0.05$) いる。

思春期の雌の試験法

End point	Bisphenol A dose level (mg/kg/day)		
	0	400	600
Age at VO (d)	32.3 $\pm$ 0.4	33.0 $\pm$ 0.6	32.3 $\pm$ 0.7
BW at VO (g)	122.70 $\pm$ 3.2	116.36 $\pm$ 3.5	108.42 $\pm$ 4.0*
BW Gain (g)	121.11 $\pm$ 2.8	101.82 $\pm$ 1.4*	95.86 $\pm$ 2.5*
Final BW (% ctl)	100	88.7	85.8
Age of first estrus	33.5	34.4	34.3

*Different ($P<0.05$) from vehicle control.

表4. 経口胃管栄養法によるビスフェノールA暴露による結果は、否定的であると考えられた。ただ、影響が認められたのは、400 mg/kg/day で始まって、膣開口 (VO) の時のBWが 600 mg/kg/day と著しい体重 (BW) の減少をみせたもののみであった。

魚類の短期生殖試験法

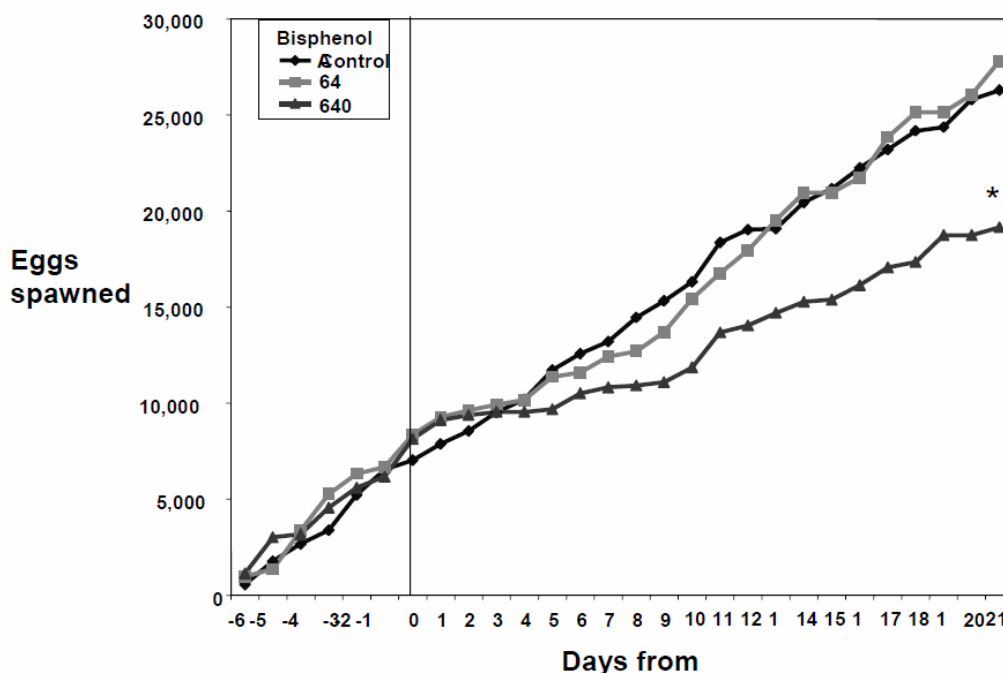


図5. ビスフェノールA (BPA)は、高い用量では卵の生産を減らし、雄では、両方の用量レベルでビテログエンを誘発した。

ビスフェノールAのまとめ — in vitroのER試験法及び、in vivoの子宮の栄養に関する、そして魚類の生殖試験法での、BPAの影響は、補足的に明確なものであった。子宮の栄養に関する、そして魚類の試験法のための、それぞれ、皮下のそして水中の暴露経路と違って、経口の暴露と思春期の雌の試験法でのBPAの初回通過代謝は、明らかに否定的な反応へ導いた。複合された結果は、EDSP第1段階のスクリーニングバッテリーの強さを、in vitroとin vivoの試験法の両方と、異なった経路の暴露と間違った否定を最小化する為の分類群とを組み合わせることによって、証明する。このようにして、試験法の大多数における明確な反応は、BPAがエストロゲンホルモン経路と拮抗関係にある方法で相互作用することを示す、十分な証拠の重みを供する。結果として、EDSP第2段階で更なる試験のきっかけとなる。

B. アンドロゲンMOAと補足的な第1段階試験法： 1)AR接合 2)ハーシュバーガー 3)思春期の雄 4)魚類の短期生殖

1. ビンクロゾリン - 抗アンドロゲン作用を持った農薬

AR binding assay	Equivocal
------------------	-----------

表5. ビンクロゾリンは、50%の接合閾値を超えない部分的な接合カーブを示したため、ラットの前立腺サイトソルを使ったAR接合試験法で、意義の曖昧なものとしてリストアップされた。部分的なカーブが観測されたのは、それが試験された最高の濃度が、制限用量の 10^{-3} Mでなくて、 10^{-4} Mだったからであろう。

ハーシュバーガー試験法

End point	Vinclozolin dose level (mg/kg/day)				
	0	3	10	30	100
VP (mg)	131 (34)	120 (21)*	104 (25)*	78 (21)*	69 (34)*
SV (mg)	348 (29)	344 (30)	271 (30)*	187 (36)*	69 (34)*
LABC (mg)	506 (21)	485 (25)	445 (20)*	374 (20)*	256 (23)*
GP (mg)	80 (13)	78 (12)	75 (9)*	70 (10)*	57 (12)*
Cow (mg)	30 (27)	29 (29)	25 (30)*	20 (25)	12 (38)*

*Different (P<0.05) from vehicle control.

表6. 去勢されたラットを使用した、経口胃管栄養法によるビンクロゾリン暴露は、腹部の前立腺の重量の3～100 mg/kg/day という著しい減少をもたらし、その他のすべての指標では、10 mg/kg/day という著しい器官の重量の減少となった。

思春期の雄の試験法

End point	Vinclozolin dose level (mg/kg/day)		
	0	30	100
Age at PPS	41.4 ± 0.7	43.8 ± 0.3*	46.8 ± 0.3*
BW at PPS (g)	219.5 ± 5.8	242.9.15 ± 5.0*	259.6 ± 6.0*
VP (mg)	240.7 ± 11.3	258.2 ± 16.8	206.4 ± 11.7
SV (mg)	552.9 ± 33.2	465.4 ± 35.5	304.4 ± 20.0*
LABC (mg)	706.0 ± 25.9	685.7 ± 44.1	544.2 ± 27.3*
Paired Testes (mg)	2740.0 ± 49.7	2960.0 ± 68.7*	2935.0 ± 77.7*
Paired Epidid (mg)	485.6 ± 12.9	456.1 ± 14.4	400.1 ± 15.7*

*Different (P<0.05) from vehicle control.

表7. 経口胃管栄養法によるビンクロゾリン暴露は、年齢と包皮の分離(PPS)の時の体重(BW)の 30 mg/kg/dayで始まる著しい増加によって示されるように、思春期の開始を遅らせた。その上、精囊(SV)、肛門挙筋/球海綿体筋(LABC)、それに副睾丸は100 mg/kg/dayで著しく減少した。精巣の重量は、30 mg/kg/day で著しく増加した。

魚類の短期生殖試験法

Dose levels (ug/L)	60, 255, 450
Fecundity	decreased at ≥ 60 ug/L
Gonad Histology (oocyte atresia)	increased at ≥ 60 ug/L
GSI	increased at ≥ 255 ug/L
VTG	increased at ≥ 255 ug/L
Tubercles	decreased at 450 ug/L
Reference	Martinovic et al. 2008. ET&C 27(2):478-488

表8. ビンクロゾリンはすべての試験濃度 (60, 255, そして $450 \mu\text{g/L}$) で、卵の生産を減少し、卵母細胞閉鎖症を増加させ、最高試験濃度では雄のSSCを減少させた。

ビンクロゾリンのまとめ — in vivoのハーシュバーガーの、雄の思春期の、そして魚類の生殖の試験法の間
の明確な反応は、in vitroのAR試験法における確認的な反応がないにもかかわらず、互いに補足し合っ
ている。in vivo試験法と違って、in vitro試験法でのARは、代謝の能力を持っておらず、それは、明らかに不確
かな反応を導いた。組み合わせた結果は、ここでも、in vitro、in vivoの両方の試験法において偽陰性を最
小にするために組み合わせることによって、EDSP第1段階スクリーニングバッテリーの強さを示している。こ
のようにして、in vivoの試験法間の明確な反応は、ビンクロゾリンが相反する方法によって、アンドロゲンホル
モンの経路と影響し合うのを示して、in vitroの試験法における不確かな反応よりも、より大きな証拠の重みを
与える。その結果、EDSP第2段階での更なる試験のきっかけとなるだろう。

C. ステロイド合成MOAと、補足的な第1段階試験法: 1)ステロイド合成 2)アロマターゼ 3)思春期の雌
4)思春期の雄 そして、5)魚類の短期生殖。

1. ケトコナゾール — ステロイド合成酵素を変えて、強化されたプロゲステロンと、弱められたエストロゲン
とアンドロゲンにする農薬と医薬品

Steroidogenesis assay (H295R)	>90% reduction of estradiol and testosterone production
Aromatase assay (Recombinant human aromatase)	Full binding curve, Log IC ₅₀ = -7.16

表9. ケトコナゾールは、テストステロンとエストラジオールの両方の生産を抑制した。>90% は、H295Rの試
験法における vehicle control に比例して。それは、組換え型のアロマターゼ試験法においても、完全抑
制カーブを作りだした。このことは、それがテストステロンの上流及び下流の酵素を抑制するので、非特定の
P450抑制剤である化学物質と両立する。

思春期の雌の試験法

End point	Ketoconazole dose level (mg/kg/day)		
	0	50	100
Age at VO (d)	32.3 ± 0.4	33.0 ± 0.4	33.7 ± 0.6
BW at VO (g)	122.70 ± 3.2	126.54 ± 2.5	122.6 ± 3.6
BW Gain (g)	121.11 ± 2.8	121.11 ± 2.1	107.42 ± 2.5*
Final BW (% ctl)	100	100	92
Age at first estrus (d)	33.5 ± 0.8	33.3 ± 0.6	35.1 ± 0.8
Regular cycles (%)	93	87	85
Adrenal wt (mg)	47.8 ± 2.9	79.9 ± 3.9	78.5 ± 3.7
CL vacuolization	0/15	12/15**	9/15**
CL absence	0/15	0/15	5/15*

*Different (P<0.05) from vehicle control and **numerically different from vehicle control.

表10. 経口胃管栄養法によるケトコナゾール暴露の結果は、明らかな排卵数の減少と、特に、100mg/kg/dayでの黄体(CL)の発達と関連した組織病理学に基づいて、肯定的であると考えられた。

思春期の雄の試験法

End point	Ketoconazole dose level (mg/kg/day)		
	0	50	100
Age at PPS	39.6 ± 0.4	42.4 ± 0.4*	44.1 ± 0.2*
BW at PPS (g)	207 ± 4.2	227.15 ± 7.3*	234.76 ± 5.0*
VP (mg)	265.7 ± 16.8	237.2 ± 11.6	205.8 ± 24.3
SV (mg)	639.6 ± 46.2	478.9 ± 21.5*	419.3 ± 37.2*
LABC (mg)	638.4 ± 27.9	575.7 ± 26.2	542.5 ± 30.6
Paired Testes (mg)	2859.1 ± 28.7	2801.9 ± 53.7	2733 ± 23.8
Paired Epidid (mg)	455.9 ± 12.5	428.4 ± 12.1	413.4 ± 12.5

*Different (P<0.05) from vehicle control.

表11. 経口胃管栄養法によるケトコナゾール暴露は、思春期の始まりを遅延させた。それは、50 mg/kg/dayで始まる包皮の分離(PPS)の時期における年齢と体重(BW)の著しい増加によって示された。更に、精囊(SV)の著しい減少が、50 mg/kg/dayで始まった。

魚類の短期生殖試験法

End point	Ketoconazole dose level (μg/L)	
	0	400
Testicular histopathology	Interstitial areas contain small aggregates of Leydig cells which have wispy, pale cytoplasm.	Relative to controls, aggregates of Leydig cells are larger, tending to fill and expand the interstitial space. Grade 2 (mild) severity.

Table 12. ケトコナゾールは、雄の精巣内のライジヒ細胞の増殖を 400 μg/Lで誘発する。

ケトコナゾールのまとめ — in vivoの雌と雄の思春期及び魚類の生殖試験法、それに雄の思春期試験法での遅れた思春期、における卵巣と精巣の形態学の変更は、in vitroのステロイド合成とアロマターゼ試験法での結果によって確認された。よって、すべてのin vitroとin vivo試験法での明確な反応は、ケトコナゾールがステロイド合成の経路において抑制しているであろうことを示す強い証拠の重みを与えるものである。結果として、EDSP段階での更なる試験のきっかけとなるだろう。

D. 甲状腺MOAと補足的な第1段階試験法: 1) 思春期の雌 2) 思春期の雄 そして、3) 両生類の変態

1. 過塩素酸塩 - ステロイド合成酵素を変えて、強化されたプロゲステロンと、弱められたエストロゲンとアンドロゲンにする農薬と医薬品

思春期の雄の試験法

Perchlorate dose levels (mg/kd/day)	Thyroid gland histology*	T4*	T3*	TSH*
0	—	—	—	—
6.25	↑ Follicular cell height ↓ Colloid area	—	—	—
125	↑ Follicular cell height ↓ Colloid area	↓	—	↑
250	↑ Follicular cell height ↓ Colloid area	↓	—	↑
500	↑ Follicular cell height ↓ Colloid area	↓	—	↑

*Difference (P<0.05) between control and treated groups indicated by arrows for T4 and TSH. Negative sign indicates no significant difference from vehicle control.

表13. 経口胃栄養法による過塩素酸塩の暴露は、甲状腺の組織変化を、すべての用量レベルと、125 mg/kg/day で始まるT4とTSHのそれぞれの変化で誘発した。

思春期の雌の試験法

Perchlorate Dose levels (mg/kg/day)	Thyroid gland histology *	T4*	T3*	TSH*
0	–	–	–	–
6.25	↑ Follicular cell height ↓ Colloid area	↓	–	–
125	↑ Follicular cell height ↓ Colloid area	↓	↓	–
250	↑ Follicular cell height ↓ Colloid area	↓	↓	↑
500	↑ Follicular cell height ↓ Colloid area	↓	↓	↑

*Difference (P<0.05) between control and treated groups indicated by arrows for T4 and TSH. Negative sign indicates no significant difference from vehicle control.

表14. 経口胃栄養法による過塩素酸塩の暴露は、甲状腺の組織変化を、すべての用量レベルと、62.5 mg/kg/day で始まるT4の、125 mg/kg/day で始まるT3の、そして、250 mg/kg/day で始まるTSHのそれぞれの変化で誘発した。

両生類の変態の試験法

Perchlorate Dose levels (μ g/l)	Thyroid gland histology *	Developmental Stage*	Hind limb Length*	Glandular wet wt*	Body Length*
0	–	–	–	–	–
6.25	↑ Follicular cell height ↓ Colloid area Follicular cell hyperplasia	–	–	–	–
125	↑ Follicular cell height ↓ Colloid area Follicular cell hyperplasia	–	–	–	–
250	↑ Follicular cell height ↓ Colloid area Follicular cell hyperplasia	–	↓	↑	↑
500	↑ Follicular cell height ↓ Colloid area Follicular cell hyperplasia	Delayed	↓	↑	↑

*Difference (P<0.05) between control and treated groups indicated by arrows and negative sign indicated no significant difference from control.

表15. >62.5 μ g/L の濃度の過塩素酸塩は、胞状細胞の高さを増加し、甲状腺にコロイドのエリアを減少させた。500 μ g/L では発育段階の進行を遅らせた。

過塩素酸塩のまとめ — in vivoの雌と雄の思春期と、両生類変態の試験法における、甲状腺の重量、組織形態学、そして関連ホルモンの変化は、過塩素酸塩が甲状腺の発達と機能を妨害することの強力な証拠の重みを示した。結果として、EDSP第2段階での更なる試験のきっかけとなるだろう。

E. EDSP第1段階スクリーニングバッテリーの結果の解釈

バッテリーの結果の解釈への科学に基づいたアプローチは、一般に、EDSTACの推薦する原則に従う。主要な原則は下記の通り。

1. バッテリーの解釈は、証拠の重みのアプローチを使用し、in vitro/in vivoの食い違い(もしあるならば)、代謝、そして暴露の経路を考慮し、バッテリー内の結果に照らして考慮される。
2. 全てのスクリーニング試験法が実施され、すべての試験法が否定的であるならば、その化学物質はバッテリーに含まれたEATホルモンプロセスと相互作用しそうもないであろうと結論してもよい。

米国環境保護局の内分泌かく乱物質に関する研究プログラム

1994年、米国環境保護局(USEPA)は、国民一般の健康とエコロジーへの増大する関心の結果、統合された内分泌かく乱物質研究プログラム(EDRP)へ向かって進行中の努力を統一し拡張することを決定した。当時の科学の状態をよりよく理解するため、また、取りかかるべきキーとなる科学の問題を見極めるために、USEPAは、1995年に2つの国際ワークショップを開催し、国家の研究計画を展開する努力が始められた。1996年には、USEPAの研究とプログラムの両方の背景からの優先性を形造るいくつかのでき事があった：1) USEPAの研究開発局(ORD)は、内分泌かく乱物質を6つの優先研究のうちの一つと確認した。これは下記の項目の認識に基づいている。a) 問題の可能性のある範囲、b) 住民の健康に対する重大な影響の可能性 c) 環境内のいくつかの内分泌かく乱物質の持続、そして、d) 国境を越えての運命と移動についての広範囲にわたるグローバルな関心、2) 食品品質保護法及び、安全飲料水法の改訂版の制定を通じて、米国議会は、USEPAに対して、それぞれ、ヒトにおける可能性のあるエストロゲンの、あるいはその他の内分泌作用を有する農薬と飲料水汚染物質を、確認された研究を利用して、選び出すことを命令した。議会の命令に従うため、数多くの科学的質問が、研究を通して取り扱われる必要が生じた。USEPAの研究プログラム及び、命令された内分泌かく乱物質スクリーニングプログラム(EDSP)の展開と実施、それはこの書類の他の所に記されているが、約13年間にわたって、強く相互に作用する平行な路線であった。

ORDの内分泌かく乱物質研究計画は、1998年¹¹⁾に発表された。それ以来、ORDは、次の5ないし10年間にわたって取りかかるであろう特定の科学の質問を特定するところの、内分泌かく乱物質の多年度計画を展開した。現在の科学の状態と、プログラムの最新の戦略的方向について考慮するために、数年ごとにこの書類はアップデートされる(www.epa.gov/ord/npd/pdfs/Draft-EDCs-MYP-091407.pdf)。多年度計画では、ORDは、三つの長期のゴール(LTGs)を確認しているが、それは同局に対して下記を規定する。1) EDSPの実施に必要な方法 2) EDSPからのデータの解釈とリスク評価と局の決定にとりこまれることができるための、科学的な支柱、そして、3) 人類と野生生物に対する内分泌かく乱物質の影響のより良き理解。

USEPA EDRPにとっての最優先項目は、局のEDSPにとってクリティカルな試験法の実施要綱の展開である。この13年にわたって、プログラムは、基礎となる多くの研究を実施し、プロトコルを展開し標準化し、移転のためのバックグラウンドの資料を準備し、局の助言委員会のために摘要を作り、国際間のプロトコル調整委員会に参加し、あるいはまた、約19の異なった局の2段階のEDSPの開発と実施のためのin vitroとin vivoの試験法の検証試験に参加した。これらの活動の焦点は、哺乳類、魚類、両生類、そして無脊椎動物のモデルを使用した上での、エストロゲン、アンドロゲン、そして甲状腺の介在するメカニズムに当てられてきた。ひとまとめに言えば、EDRPのこの部分は、局が、スクリーニングと試験のプログラムを開発し実施するという、議会の命令に成功裏に応えるのにクリティカルなプロトコルの発展につながってきた。(詳細は、この書類の他の場所にあるEDSPの概観を参照されたい)。

データはEDSPを通じて局に提出され始めているので、USEPAは、調査結果を理解し、それらを評価の中に組み込む必要がある。数多くの科学的に不明確な点があるので、それらに対しては、まだ研究が必要であり、それゆえにEDRPを通じて、続けて取りかからなければならない。例えば、研究は下記の科学の領域を扱ってきており、焦点を当て続けている。

内分泌かく乱化学物質(EDCs)が、受容体に基づいた相互作用、膜組織受容体、酵素変性、そしてその他の非核受容体に基づいた、特に、用量作用曲線の下端での経路、これは特に評価の大気環境暴露レベルでの影響に関係しているが、を通じて、どのようにして毒性を導き出すかについての理解。

EDCsの、定義されたメカニズム/行動のモード(MOAs)への影響が脊椎動物のクラスを超えて推定されうる度合いを決定する。この研究は、1) 化学物質の種にわたる推定の影響と関連する不確実さを減らすこと、そして、2) 定量的な推定が弁護できる/可能である度合いを理解し、十分に定義されたMOAsのある化学物質を使用した、比較毒物学の研究が必要である。重要なのは、種の間の推定をする研究の評価と実施を行うアプローチの開発は、究極的には、ヒトの健康と生態学的なリスクの評価の両方における不確実性を減らし、

¹¹⁾ www.epa.gov/ord/htm/documents/ORD-EDR-Feb1998.pdf

試験に必要な動物の数を減らすことに寄与しなければならない。

EDCsの混合物への暴露査定評価へのアプローチの展開。最近の局の混合物の影響を予想する点での欠点は、投与量の追加を当然のことと考えることである。この推定が、正確に内分泌かく乱物質の混合物の経験的な影響を正確に予想しているかどうか、同様なそして異なった作用メカニズムによって決めることがまことに重要である。更に、これらのデータをリスク評価に組み入れられるようなアプローチを開発することが重要である。

発育中に暴露の原因となり、後の生活において発生する毒性となる(たとえば、脆弱性の窓、発育上の組織の薬量測定、作用のモード)クリティカルなファクターを決定する。発育とは、ホルモン媒介の遺伝子発現の変化が、生涯における後の時期まで明らかにならないかもしれないような永久的な結果をうながす期間である。なぜならば、機能的な変化は、その間に特別な変化が起きるところの思春期あるいは成人期までに起きないからである。

バイオマーカーと、可能性のある内分泌かく乱に関与する化学物質のスクリーニングのための次の世代の試験法の開発。新しい分子手法の展開における途方もない成長の有利さを取り上げ、予言的なバイオマーカーと、EDSPの今後のラウンドにおいて使用する可能性のある次世代の試験法とを開発する必要がある。これらの試験法の主な利点は、それらが内分泌システムと反応する能力について評価するのに要する時間が少なく、その他のよりコンベンショナルな試験法及び試験よりもコストが少なく済み、そして、全動物の使用が少なく済み(場合によっては完全に不要)ことである。これらの後者の要素については、最近発行された国立科学アカデミーの報告書の、21世紀における毒性試験での新しいテストングパラダイムに関する勧告と一致している。

EDCsの主要な源と環境運命は何か？不合理なリスクはどのように管理されるのか？最も優先度の高い内分泌活性化学物質への暴露に対するケミカルそして分子のインジケーターを開発する必要がある。EDCsへの暴露を減少させるのに応用できると思われる既存のリスク管理ツールがいくつもある。もし、主要な暴露の源に対して応用できる技術が存在するのであれば、作用はおそらく、環境に放出されたEDCsの大きな減少となるであろう。USEPAは、その努力を、EDCsへのヒトの暴露や、環境に入ってくるEDCsの主な源、たとえば、廃水処理プラント(WWTPs)、濃縮された動物飼料操作(CAFOs)、それに、飲料水処理プラント、に影響するキーとなるファクターの見極めに応用することに集中しているし、また、リスクの減少や、これらの源に関する緩和戦略のツールを開発している。

EDCsに関して未だ回答のない最大の問題の一つは、それらがいったいどこまでヒトや野生生物や環境に対して影響するのかということである。USEPAの研究は、従って：

EDCsへの暴露によって、ヒトの発達/生殖の受けている悪影響がどの程度のものかを見極める。発達と生殖が、実験室動物と野生生物の研究で高度に敏感な指標のようであるとして、また、特定の指標(たとえば、尿道下裂、潜在睾丸、精液の品質)では報告された変更があるとして、もし何らかの逆影響が発見されるのであれば、ヒトにおけるこれ等の指標の評価は論理的であるように見える。複数の米国連邦局の申し出の勧誘を通して、12の疫学的研究に対して資金が提供された。

複雑な環境媒体において内分泌活性化合物の存在と影響を特徴づける、そして、不合理なリスクを和らげる管理アプローチの開発。効果的なリスク管理戦略を開発するためには、EDC暴露の程度と、源—暴露—投与量の関係に影響する因子を理解することが重要である。運命と移動のプロセス、EDCsの源から受容体への相互作用に関する改善された理解を得ること、そして、マルチ媒体、マルチ経路のモデルの開発のために、高品質な暴露データを集めることが、エコロジカル及びヒトの健康のリスク評価のために重要である。混合物の化合物の研究への暴露の生物学的インジケーターの応用は、これらのモデルを有効にし、改良する可能性を提供する。USEPAは、彼らがその他の組織と共に、WWTPs、飲料水プラント、そして、CAFOsからの排出物を性格付けするために、そして、いかなる不合理なリスクをも緩和するであろう管理のアプローチを開発するために開発してきた方法、モデル、そしてツールを応用している。

過去13年にわたって、USEPA EDRPは、EPA内部とその他の組織でのリスク評価を改善してきたクリティカル

なデータを提供してきた、そしてEDRPの実施で使用するために確認されてきたひと組の試験法の基になってきた、それに科学の共同体が環境に対してEDCsが及ぼす影響をよりよく理解するのを助けるための情報を提示してきた。

USEPA EDRPは、プログラムが「EDCの研究において意義あるリーダーシップを成し遂げてきた」と思っている分野(www.epa.gov/osp/bosc/pdf/edc0504rpt.pdf と www.epa.gov/osp/bosc/pdf/edcmc0804rpt.pdf) のエキスパートで成り立っている外部の仲間のレビューパネルによって再調査されてきた。

USEPAのEDRP及びEDSPは、局がヒト及び野生生物に対する内分泌かく乱物質のリスクを減少あるいは防止する長期的な成果を成し遂げるのを助ける努力を、統合して来た。

米国環境保護局の内分泌かく乱物質及びその他の化学物質に関連したコンピューターによる毒物学の研究プログラム

USEPAは、そのコンピューターによる毒物学の研究プログラムの一部として、ToxCastと称する、可能性のある毒性を特定するin vitroのアプローチ高処理能力の、スクリーニング(HTS)を試験する、大規模な実験を行っている。ToxCastの目指すところは、幾千もの試験されていない環境汚染物質の蓄積を、一続きのin vitro試験法を使用してスクリーンすること、そして、毒性につながる対生物活性と結びついた経路に基づいた更なる試験のための化学物質に優先順位を付けることである。ToxCastの第1フェーズは、309のユニークな化学物質を試験する(複製を含んで320)もので、そのほとんどは広範囲な動物毒性試験をされたもので、後で行う大規模スクリーニングフェーズで使用可能な最初の予見的なアプローチを展開するためのものである。これらフェーズIの化学物質はほとんどが、農薬活性成分プラス多数の大量生産の工業化学物質である。これら化学物質の毒性データはToxRefDB関連のデータベースに含まれていて、化学物質クラス内の及びそれをまたがる予見モデルや比較の組み立てに便利なものである。ToxCast及びToxRefはwww.epa.gov/ncctで見ることができる。ToxCastのPhase I 化学物質ライブラリーは、9つの別々の試験法技術から引き出された、470の別々の試験法に対して運用されている。そのすべては、濃度反応書式で、またいくつかのケースでは、多重時点でも運用されている。これらには、受容体接合と酵素抑制の細胞フリーの生化学試験法、遺伝子表現試験法、転写因子活性試験法、細胞イメージング試験法、それに、リアルタイム細胞インピーダンス測定、が含まれる。試験法の中で、4件はアンドロゲンシグナリング経路を評価し、5件はエストロゲンシグナリングに関連し、4件は甲状腺シグナリング、そして1件はアロマターゼ活性に関連している。ToxCast 内分泌プロファイルと、第1段階EDSPバッテリーからの結果の比較は、約55のEDSP優先化学物質が、ToxCastフェーズI 化学物質ライブラリーにあるので、これらの結果が得られてからなされるであろう。ToxCastは、USEPA、国家毒性学プログラム、国立健康研究所(NIH)化学ゲノムセンター、そして数多くのその他の組織、の間の共同研究の部分であって、ヒトに対する毒性に通じるメカニズムと経路を見つけ出すために幾千もの環境汚染物質や医薬品化合物をスクリーニングしている。更に、USEPAは、OECDの毒性ゲノムアドバイザー委員会を通じて、高処理量分子スクリーニングに関連した国際間の協力を進める作業を行っている。

VL Dellarco, T Steeger, 及び S Bradbury (US EPA, Office of 4/9/2009 作成)

内分泌かく乱物質のリスク評価

アトラジンのケーススタディの特徴

(キーとなる参考資料: USEPA 農薬プログラムオフィス、2006年4月、アトラジンの再登録の有資格決定、http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/atrazine_combined_docs.pdf)

ヒトの健康リスク評価

- アトラジンの神経内分泌モード作用を十分に確立するためにうまく設計された研究があった。
- アトラジンは視床下部からの性腺刺激ホルモンの放出ホルモン (GnRH) の拍動性の放出を抑制する。それはその代わりに、脳下垂体からの黄体形成ホルモンの放出を抑える。
- 実験動物 (ラット) におけるアトラジンの神経内分泌作用モード (MoA) に対する合意が、公衆衛生についてのリスク管理の決定に因果関係を持つヒトの関連性についての問題を扱うのに使用された。
 - LH抑制がラットに特有の生殖老化プロセスに影響を与えていたと仮定して、ラットの乳腺腫瘍のMoAが、ヒトのそれと関係ないと考えられた。
 - 視床下部－脳下垂体の相同関係が、正常な生殖発達と機能をコントロールするとして、MoA と、LHに対するアトラジンの影響と、そのラットの発達と生殖への影響が、ヒトに関連あるものと仮定された。

参考資料:

1. FIFRA Scientific Advisory Panel Meeting June, 2000, Atrazine: Hazard and Dose- Response Assessment and Characterization, at <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2000/june27/finalatrazine.pdf>
 2. A MoA case study on atrazine can be found in Meek B. *et al*, (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action *Crit Rev Toxicol*. 2003;33(6):591-653.
- 化学の安全のヒト関連枠組みについてのWHOの国際プログラムは、動物のMoAsのヒト関連性を確立するための価値ある分析と整合性のとれたアプローチを与えている。
(http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer_mode.pdf)
- アトラジンのMoA内分泌のキーイベント、LH抑制は、用量作用評価のベースとして使用された (NOAEL = 1日当たり 1.8 mg/kg体重; LOAEL 1日当たり 3.65 mg/kg体重 6カ月のラットのダイエツ研究より)。出発点と参考用量 (RfD) の派生をLHの抑制に基づかせることは、下流のLHの生殖と発育への依存作用を保護することになる。
 - アトラジンの神経内分泌作用モードの理解は、あるクロロ-s-トリアジン農薬を毒性の共通メカニズムによってグループ化する基礎として役立ち、また、蓄積するリスク評価の基礎として役立った。

参考文献:

1. US EPA, Office of Pesticide Programs, March 2002, The Grouping of a Series of Triazine Pesticides Based on a Common Mechanism of Toxicity, at http://www.regulations.gov/search/search_results.jsp?css=0&&Ntk=All&Ntx=mode+matchall&Ne=2+8+11+8053+8054+8098+8074+8066+8084+8055&N=0&Ntt=EPA-HQ-OPP-2005-0481-0011&sid=11FDBE85D076
2. US EPA, Office of Pesticide Programs, March 28, 2006, Triazine Cumulative Risk Assessment, at http://epa.gov/oppsrrd1/REDs/triazine_cumulative_risk.pdf

生態学リスク評価

- 可能性のある内分泌影響は考慮されたが、水生の生物種と野生生物については確定的ではないとされた。

➤ 両生類

- 特に、全体的な証拠の重みは、アトラジンが矛盾のない生殖影響を、暴露濃度と試験された両生類の種の範囲にわたって作ることを示さない。

- 分類群にわたる良く設計された研究と、文献研究の注意深い解釈、の重要性を示している。

➤ 魚類

- 淡水魚について、4つの魚類のライフサイクル試験がある。研究のうち2つは、成長が減少に終わり、1つは、平衡の損失(行動の影響)に終わり、そして1つは、生存の減少に終わった。これらの影響のどれもが、内分泌媒体のプロセスへの影響を示しているとは解釈されなかった。

- 例えば、100 ug/Lに処方されたアトラジンに20日間暴露させたオオクチバス (*Micropterus salmoides*) では、雌のバスは、対照標準に比べて著しく高いプラズマエストラジオールとビテロゲニン濃度を示したが、雄のバスは、著しく低いプラズマ 11-ケトテストステロン濃度を示した。この研究からの結果は、変化が激しく、そのリスク評価への有用性は確定していない。

- アトラジンの水生動物へのリスクを評価するのに使用した規定指標のすべては、オオクチバスの研究での 100 ug/L の値以下であった。そして、2003 IREDは、個体数と群集を含むターゲットとしない水生生物種への可能性のある逆影響が、水中のアトラジン濃度が、回帰ベースかあるいは長期間にわたって、約10から20 ug/L に等しいかあるいはそれを超えれば、最大となりそうだと述べた。このようにして、これらのより敏感な指標の使用は、魚類へのアトラジンのより高い濃度での影響に対する防護となりそうである。

➤ 鳥類

- アトラジンに関する2つの鳥類の生殖研究がある。コリンウズラ (*Colinus virginianus*) とマガモ (*Anas platyrhynchos*) の両方で、アトラジンの暴露は卵の生産の減少を来した (NOAEC=225 mg/kg 食餌)。コリンウズラでは、欠陥のある卵の数がかすかに増加し、胎児の生育力が減少したが、マガモでは、卵の孵化の減少があった。これらの結果は多数の因子によるもので、内分泌が関係しているとはっきり結論付けることはできない。

参考文献:

1. FIFRA Scientific Advisory Panel Meeting, June 17 – 20, 2003: Potential Developmental Effects of Atrazine on Amphibians, at http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2003/061703_mtg.htm
2. FIFRA Scientific Advisory Panel Meeting, October 9 – 12, 2007: The Potential for Atrazine to Affect Amphibian Gonadal Development, at http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2007/100907_mtg.htm
3. Potential Risks of Atrazine Use to Federally Threatened California Red-legged Frog (*Rana aurora draytonii*) and Delta Smelt (*Hypomesus transpacificus*) Pesticide Effects Determinations, at <http://www.epa.gov/espp/litstatus/effects/redleg-frog/atrazine/analysis.pdf>

米国内分泌かく乱物質スクリーニングプログラム(EDSP)の結果 試験法の開発と検証プログラム

EDSP第1段階の研究で述べられた結果

(<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/assayvalidation/status.htm>) は、EPAのリスク評価、それにアトラジンの神経内分泌の作用のモードの理解から構成されている。in vitro ER及びARの接合試験法において、そしてラットの子宮の栄養に関する試験法に対して、否定的な所見が見られた(高用量での結果を除いて)。しかし、EDSP第1段階のラットの思春期試験法では雌と雄の思春期の遅れが見られた。それは、性の成熟において役割を果たす、アトラジンの下垂体LHのうねりを抑える能力があれば期待できるであろう。in vitroのステロイド合成H295R試験法でも肯定的結果が得られた。アトラジンがCYP19あるいはあるヒトの細胞系(Sanderson,2000)においてはアロマトラーゼ作用(アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素)を誘発すると報告されているけれども、in vivoの結果は、この酵素の作用あるいはラットの脳、精巣、あるいは脂肪組織での遺伝子表現における、アトラジン誘導の変化に対する支持は示していない(Modic, 2004a, 2004b, アブストラクト)。アトラジンがラットの副腎のステロイド合成をかく乱することが解ったが、それは、少年の雄に観察される血清エストロンとエストラジオールの少量の増加と関係しているかもしれない (Stoker et al., 2000; Laws, 2006, 2007 アブストラクト)。このアトラジン誘発の副腎の反応と、可能性のあるそれに続いた副腎のステロイド合成での増加、それとアンドロゲンからエストロンへの末梢性の転換は、下垂体のLHの分泌を減少するのに必要な量よりも高いアトラジンの用量で起きる。EPAのヒトの健康リスク評価における調節指標。このようにして、LHの抑制は、ヒトの健康を、可能性のあるアトラジンの神経内分泌影響から守る、もっとも敏感で生物学的に妥当な指標を意味する。EDSP第1段階の魚類試験法の全体結果は、アトラジン暴露が、試験法の指標に対して統計的に意味のある作用を持たないことを示した。唯一の注目に値する発見は、精巣の組織学における微妙な変化で、それは、高暴露グループにおける、精液を生み出す細管の直径の著しい減少と、成長段階2Aでの精子の数の増加を含んでいた。その他の注目すべき点ではあるが統計的には意味のない傾向は、生殖能力と雌のE2レベル、雄のTと11-KTの若干の減少であった。

参考文献:

1. USEPA. EDSP Assay status table see <http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/assayvalidation/status.htm>.
2. Laws SC, Ferrell J, Best D, Buckalew A, Murr A, Cooper RL 2006. Atrazine stimulates the release of ACTH and adrenal steroid in male rats. 45th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Diego, CA. Abstract No. 1946, The Toxicologist, 90(1): 398. www.toxicology.org/ai/pub/Toxicologist_archive.asp
3. Laws SC, Ferrell J, Hotchkiss M, Buckalew A, Murr A, Cooper RL. 2007. Effects of atrazine (ATR) and metabolite, diamino-s-chlorotriazine (DACT), on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in rats. 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Charlotte, NC. Abstract No. 119, The Toxicologist, 96(1):531. www.toxicology.org/ai/pub/Toxicologist_archive.asp
4. Modic, WM. 2004a. The role of testicular aromatase in the atrazine mediated changes of estrone and estradiol in the male wistar rat. Thesis. North Carolina State University, Raleigh, NC. <http://www.lib.ncsu.edu/theses/available/etd-08052004-132003/>
5. Modic W, Ferrell JM, Wood C, Cooper RL, Laws SC. 2004b. Atrazine alters steroidogenesis in male wistar rats. 43rd Annual Meeting of the Society of Toxicology. Baltimore, MD, Abstract No. 568.2004. Itinerary Planner, The Toxicologist, 78(S-1): 117. www.toxicology.org/ai/pub/Toxicologist_archive.asp

著者: VL Dellarco, J Holmes, and S Bradbury
 US EPA, Office of Pesticide Programs
 4/13/2009

内分泌かく乱物質のリスク評価

マンコゼブ ケーススタディの特徴

(USEPA, 2005年9月 マンコゼブの再登録適格決定
http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/mancozeb_red.pdf)

ヒトの健康のリスク評価

マンコゼブに対して甲状腺がターゲット器官であるとの認識

- 甲状腺の毒性が、甲状腺のホルモン、増加した甲状腺の重量、顕微鏡的な甲状腺の傷害(主として、甲状腺濾胞の過形成)の変更、そして、甲状腺腫瘍、として明らかにされた。
- リスク評価において、代謝産物の役割を考慮する。
- エチレンチオ尿素 (ETU)は代謝産物であって、マンコゼブの環境分解物である。
- 親化合物のいくつかの甲状腺毒性は、ETUの所為かもしれない。なぜならば、それも甲状腺ホルモンのホメオスタシスをかく乱すると知られているからである。

甲状腺の指標は、慢性のRfDを引き出すのに使用された。非食事性の暴露(偶発的な経口、皮膚から、そして吸入)の指標もそうである(EPA, 2005年)。例えば、

- 長期にわたる食事の評価は、甲状腺毒性(LOAEL = 30.9 mg/kg/day 甲状腺毒性に基づいて)に基づいている。
- 偶発的な経口の暴露評価(期間不定; 1日から6ヵ月)は、やや長期のラットの毒性から減少したチロキシン(LOAEL = 17.82 mg/kg/day)に基づいている。
- 吸入の暴露(期間不定; 1日から6ヵ月)は、甲状腺の過形成と減少したチロキシン(雌)(LOAEL = 0.326 mg/L)に基づいている。そして、それはやや慢性のラットの吸入、甲状腺の過形成、そして、減少したチロキシン(雌)に基づいている。

甲状腺のかく乱の作用のモードの理解は、公衆衛生についてのリスク管理の決定に対して影響を及ぼしうる、異なったライフステージにおけるヒトの関連性についての問題を取り扱うのに使用できる。

- マンコゼブは、ラットの甲状腺濾胞の腫瘍を作る。
- ラットは、ヒトよりもずっと、甲状腺ホルモンのアンバランスによる甲状腺濾胞の腫瘍の発生に対して敏感であると知られている(たとえば、IARC, 1999) Meek et al., 2003)。この作用モードで作用する化合物は、甲状腺ホルモンのホメオスタシスを変更しない用量では、ヒトに対して発がん性とはならないであろう。

変化した甲状腺ホルモンは、若年では神経発育に対する影響をもたらすかもしれない。

- 甲状腺アンバランスと神経発育影響への関心のため、若年で成年のラットにおける比較に関する甲状腺毒性研究はデータへの必要性がクリティカルであろう。
- WHOの、化学安全のための国際プログラムのヒト関連性枠組みは、価値のある分析と整合性のとれたアプローチを、動物のMoAsのヒト関連性を確立するために提供する。がん及びがん以外の結果の甲状腺かく乱作用モードについての他のケーススタディの例は、下記で見ることができる：

(http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer_mode.pdf), Meek B. *et al*, (2003), Crofton and Zoeller (2005), Zoeller and Crofton (2005).

生態学リスク評価

鳥類

- マンコゼブに関して、3つの鳥類の生殖研究がある。2つのコリンウズラ (*Colinus virginianus*) 研究と、1つのマガモ (*Anas platyrhynchos*) の研究では、生後14日の生きた鳥の体重は、最も低い逆影響濃度で減少した。ウズラの研究の一つでは、追加的な逆影響が観察された。それは、孵化したての幼鳥の体重減少と、14日生存鳥のパーセント減少を含んでいる。カモの研究では、LOAECでミツユビナマケモノ125 ppm の暴露濃度で観察された追加的な逆影響が、次に示す様な卵生産の減少を含んでいた。すなわち、早い、そして遅い胎児の生存力、孵化、そして、孵化での結果重量。これらの結果は、多くの因子の所為であるだろうが、内分泌関連であるとはっきり結論付けることはできない。

両生類

- 危険にさらされた種のリスク評価で考慮した主な代謝産物の役割。マンコゼブに関するカリフォルニア赤脚蛙(CRLF)のリスク評価では、長期にわたるEECsと毒性の暴露では、マンコゼブの主要な分解物であるエチレンチオ尿素(ETU)に主として関連していると推定された。
- ETCと共に実施された長期にわたる淡水無脊椎動物の毒性試験で決定された指標が、餌動物(淡水無脊椎動物)の減少を経たCRLFへの間接的な影響を評価するのに使用された。
- ETUは、4.1 ppm でオオミジンコの成長と生殖に逆影響を与えた。成長物の長さ、生存、そして、生殖能力(生殖日当たりの成長物当たりの平均幼体数)は 4.1 ppm の処理レベルで著しく減少した。
- 哺乳類(ラット)の研究で見つかった甲状腺の影響は、ヒトと生態系の両方ともに内分泌への影響の可能性を示している。
- 甲状腺かく乱への野生生物の敏感度を評価する両生類の形態形成試験法は、データを不可欠的に必要としている。マンコゼブ”代謝産物のETUはEDSP第1段階の両生類変態試験法において評価されてきた(下記参照)。

魚類

- コチ ヒメハヤ (*Pimephales promelas*) について実施された淡水魚の早期ライフステージの研究はマンコゼブについて見ることができる。生存及び成長欠損の影響が、2.19 ppb のLOAECで観察された。これは、CRLFのリスク評価で使用された指標ではなかった。

米国内分泌かく乱物質スクリーニングプログラム(EDSP)試験法開発及び検証プログラム

甲状腺の合成インヒビターであるETUは、アフリカツメガエルを使用したEDSP第1段階両生類試験法において、変態展開と甲状腺組織学を変化させることが見つかった。

(<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/assayvalidation/status.htm> 参照)

参考文献

Crofton K and T Zoeller (2005) *Mode of action: Neurotoxicity included by thyroid hormone disruption during development—hearing loss resulting from exposure to PHAHs. Crit. Rev Toxicol.* 35:757–770.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 1999. Species Differences in Thyroid, Kidney and Urinary Bladder Carcinogenesis. Eds: C.C.Capen, E. McClain *et al.* (1999) A mechanistic relationship between thyroid follicular cell tumors and hepatocellular neoplasm in rodents. In: Species differences in thyroid gland, kidney and urinary bladder carcinogenesis. CC Capen, E Dybing, JM Rice and JD Wilbourn eds. pp. 61–68. IARC Scientific Publications No 147, Lyon France.

Meek *et al.*, (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Crit. Rev Toxicol.* 33 (6)591–654. See pages 620–624.

Zoeller T and K Crofton (2005) *Mode of action: Developmental thyroid hormone insufficiency-- Neurological abnormalities resulting from exposure to propylthiouracil. Crit. Rev Toxicol.* 35:771–781.

作成: VL Dellarco, T Steeger, and S Bradbury (US EPA, Office of Pesticide Programs)
4/9/2009

内分泌かく乱物質のリスク評価

ヴィンクロゾリンのケーススタディの特徴

(キー参考書: US EPA, 農薬プログラムオフィス, 2000年10月、再登録適格決定 (RED)ヴィンクロゾリン,
<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/2740red.pdf>)

ヒトの健康・食物のリスク評価

- ヴィンクロゾリンによって誘発される主な毒性作用は、その抗アンドロゲン作用と関係がある。
- リスク評価において、食物の許容の確立を含む、代謝産物の役割を考慮する。
 - ヴィンクロゾリンとその2つの代謝産物はアンドロゲン受容体の働きを接合し抑制する。
 - 2つの代謝産物が哺乳動物、植物、それに土壌に起こり、ヴィンクロゾリンの所為である抗アンドロゲン作用の多くに責任がある。
- ヴィンクロゾリンの抗アンドロゲン作用に対するライフステージの反応を識別する。
 - 成長した動物の長時間の暴露は、ライジヒ細胞の腫瘍の原因となり、重要な発育期間での短期間の暴露は、たとえば雄の生殖管の奇形の可能性をうながす。
 - 重大な食事の農薬リスク評価は、生まれる前の暴露によって注目される最も敏感な発育影響に基づいていた。(たとえば、前立腺の重量の減少、その他の性器官の重量の減少、乳頭/乳輪の発育、それに、雄のラットの肛門-性器官の距離の減少)。
- 実験動物での発見内容とヒトとの関連性の評価
 - 抗アンドロゲン作用は、ヒトでも予想される。なぜならば、種の間でアンドロゲン受容体は広く保存されている。
 - IPCS/ILSIのヒトの作用のモードの関連性/ヒトの関連性の枠組みのアプローチは、作用のモードの確立や、種の差異の評価に関する貴重なツールである。
http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer_mode.pdf
 - Kavlock and Cummings, (Critical Reviews in Toxicology, 35:721-726, 2005) で論じられたように、ヴィンクロゾリンがヒトの中で新陳代謝されて2つのより活性な代謝産物になるであろうことを示すデータがあり、また、in vitroで示されたように、2つの代謝産物が組換え型のヒトアンドロゲン受容体 (AR) に接合でき、DNA反応エレメントへのAR接合をブロックすることができるというデータがある。

生態学的リスク評価

- 分類群にわたって多数の証拠のラインを考慮する重要性を示す。
 - ヴィンクロゾリンあるいは又はその代謝産物への暴露によって生じる、哺乳類と鳥類の種への逆生殖影響は、in vitro及びin vivoの研究で見つかった抗アンドロゲン作用に関連しているようである。
- ある分類群におけるヴィンクロゾリンの抗アンドロゲン作用の逆の結果をよりよく特徴づけるときの重要な情報ギャップを見極める。魚類における一生の生殖研究と、水生の無脊椎動物の生涯研究の欠如は、他の分類群で見られる生殖影響のゆえに重要なデータニーズであると考えられる。
 - たとえば、改良された魚類のライフサイクル毒性試験で、コチ ヒメハヤ (Pimephales promelas) は、112日間流水状態で、0.12 mg 総ヴィンクロゾリン残量/L の状態で暴露された[ヴィンクロゾリン、代謝産物B(酸)、それと代謝産物E(アミド)]。F0-世代では、卵の数/雌は統計的に減らされ、卵/卵の数はヴィンクロゾリン処理のグループでは著しく高かった。F1-世代では、孵化生存率は、コントロールと比べて孵化の開始と終了の両方で統計的に減少した。ただ1つの濃度の試験しかしていないので、この研究はNOAEC、あるいはまたLOAECの定義に使用することはできない。

米国内分泌かく乱物質スクリーニングプログラム(EDSP)試験法開発及び検証プログラム

EDSP第一段の研究で観察された結果

(<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/assayvalidation/status.htm>) は、ヴィンクロゾリンの抗アンドロゲン活性を確認している。上述のEPAリスク評価はEDSP第1段階の試験法での研究結果と矛盾のないものである。EDSP第1段階の魚類の研究では、雄の第二性徴、精巣の変性、それに、雄の生殖腺重量とGSIは、最も健全で敏感な指標であった。それは、AR拮抗薬としてヴィンクロゾリンの活性と矛盾しないものである。ヴィンクロゾリンは、アンドロゲン拮抗薬そして作用薬を検知するよう設計されたラットのハーシュバーガー試験法でもポジティブであった。ラットの雄の思春期試験法では、ヴィンクロゾリンは抗アンドロゲンに期待されるプロファイルを示した(たとえば、遅れた思春期、精巣の組織病理学、そして精巣上体の重量、それにより高い用量ではテストステロンの増加)。

付属書9

BIAC (ビジネスと工業諮問委員会)における取組

化学物質の内分泌作用評価のためのグローバルに整合したアプローチにおける BIAC(経済産業諮問委員会)の展望

2008年12月

1. 化学産業は、安全に製造、輸送、使用、処理される化学品の提供を約束する。化学産業はまた、すべての新規及び既存の製品とプロセスについて、健康、安全、環境、及び資源保護に厳密な考慮を払うことを約束する。責任があるCare(R)との連携により、化学企業団体のメンバー会社は、製品がライフサイクルにわたってもたらすリスクを理解し、それらのリスクを効果的かつ適切に管理するためのシステムを適所に、下流のユーザーとの共同責任において持つことに努める。責任があるCare(R)への関与と同様に、化学産業は、環境における人工及び自然発生の化学品への僅かな暴露が人と野生生物にリスクをもたらすかもしれないという公衆の懸念を認識している。
2. 化学産業は、内分泌かく乱問題と関連した科学をよりよく理解するために政府、科学コミュニティ、及び他の利害関係者と一緒に働き続ける。OECD EDTAへの進行中の参加を通して、産業は、新規あるいは改訂されたOECD内分泌スクリーンと試験の開発、標準化、及び検証に寄与しており、今後も寄与し続けるだろう。科学的に検証済みの試験法に基づいた国際的に調整されたOECDテストガイドラインは、内分泌系の要素と相互作用する潜在力を持つ物質をスクリーニングするための、またその潜在力のある素材を有害作用発生に絡む服用量対作用関係が理解できるよう試験するための、中心的な基盤を構成するものである。
3. 効率的に物質を優先順位付けするため、内分泌作用について選別するため、有害作用について試験するため、及び首尾一貫した化学品方針の枠組みの中で物質を評価するために、化学産業は国際的に調整された手続きの開発を支援する。これらの手続きは、認証済みの選別試験法を含め、内分泌作用によって物質を選別し、より特定の試験により優先順位付けするための、段階的、階層的かつ科学的な枠組みの一環として備えられるべきである。認証済みで、整合的なプロトコルを使う特定試験が、内分泌系機能に加えられた変更によって起こされた有害作用を識別するために必要である。段階的なアプローチによる、特定試験からの結果は、公共部門と民間セクターの両方の指導方針と管理による選別試験の結果に優先するか、取って代るべきものである。特定試験は危険とリスクの特性を明確化するために必要である。
4. 危険性評価のために、化学産業は、内分泌メカニズムに起因するかもしれないホルモンの働きと有害作用について、科学的な証拠全体の包括的で、客観的、透明で、バランスが取れた解釈から成る「証拠の重み」評価プロセスの開発を支援する。ホルモンの作用をする化学品のための防御できる危険性の評価は、毒物学上の選別と試験のデータ(危険有害性の特定)を要約するだけでなく、生み出された作用が逆であるかどうか、そして有害作用が化学品のホルモンの働きによるかどうかについての証拠評価に対する客観的な重み付けをも要求する。
5. 化学産業は優先度付け、危険性評価、及びリスク評価において内分泌選別データの解釈、特定試験データと選別データの統合、及び優先度付け、危険性評価、及びリスク評価におけるそのようなデータの使用に関係するグローバルに整合したアプローチの開発をサポートする。選別分析調査は、後続する特定試験のために物質に優先度を付けるように使われることになっている。特定試験の結果が危険性評価とリスク評価に使用される有害作用と用量反応に関するデータを提供する。選別試験結果だけでリスク評価を実行することはデータの不適当な使用になるであろう。OECDが試験法検証を完了し、内分泌テストガイドラインを採用すれば、そのような分析調査法がEPAの内分泌かく乱物質を選別するプログラムの一部として米国で、そしてヨーロッパではREACHの一部としてすぐに展開されるであろうから、グローバルに整合した評価プロセスと枠組みへの差し迫ったニーズがある。同じ内分泌固有のテストガイドラインからの同じデータの一貫した解釈と、危険性評価におけるそのような情報の一貫した使用が、OECDのデータの相互受け入れを支えるために必要である。
6. 化学産業は、内分泌選別試験結果の均一で、一貫した説明と同様に、選別と特定試験結果を危険性評価とリスク評価に使用するための、証拠の重み枠組みの適切な採用を保証する、すべてのOECD加盟国に

適用可能な、支配的指針の開発を支援する。
(証拠の重みの細目は、添付1 CEFIC EMSG証拠の重みペーパー 参照)。

7. 内分泌選別と試験のための段階的、階層的、科学的枠組みは、物質を評価するための最も効率的で、効果的なアプローチを提供する。この階層的な枠組みの中で、OECDの検証が済み、国際的に調整されたテストガイドラインは、内分泌系の1つ以上の要素と相互作用する潜在力を持つ物質を識別し、更なる特定試験のために優先度を付けて選別するために使われる。特定試験は、検証済みで、整合的なプロトコールを使って、内分泌系機能の変更によって起こされた有害作用を識別するために必要である。段階的アプローチによる、特定試験の結果は、方針とリスク管理における選別試験の結果に優先するか、取って代らなければならない。in vitro 及び in vivo 選別試験法の結果は、物質が、1つのメカニズムを通じて、内分泌システムの1つの要素と相互作用することを示すだけである。そのような選別結果は、その物質が生物学上有害な作用を起こすであろうかどうかについての証拠を提供しない。in vitro 及び in vivo の選別試験法は、完全な内分泌系の生物学上の複雑さを表したり有害作用を評価したりしない。選別試験の結果が、内分泌作用への潜在力を示唆するならば、より長い期間の in vivo の研究が必要である。この場合、危機的なライフステージとプロセスを含む完全な内分泌系全体に対する暴露法が評価される。更に、内分泌系や他の組織又は器官への潜在的に内分泌が介在する有害な健康作用への用量(放射線量/薬用量)反応を十分に特徴付けるため、評価試験には、有害作用の計量を含む。

8. 段階的枠組みの中に毒性試験を配列することが、異なる化学毒性を説明し、現存の、あるいは予期される特定の化学品への暴露に関連した具体的な懸念を指摘する上で、科学的な厳密さと柔軟性を与えるということが経験的に分かっている。この方法で、段階的試験は、多くの優先度を付けられた化学品(又は化学品のクラス)の選別を促進するために、データを収集する努力の焦点をそれが最も必要な分野に合わせ、また、具体的な毒性結果が示される場合には、どの物質が特定の懸念を引き起こすかを明らかにするために考慮すべき具体的で、複合的な試験を示す。科学的にサポートされる化学カテゴリーの使用は、化学物質の潜在的な生物活性に関する知識を提供する上で効率を上げる。

9. 化学産業は、化学品が懸念される反健康作用について、化学品の統制法、OECDの高生産量化学品試験プログラム、REACHに従って、試験され続けるべきであること、また内分泌関連活動の推進のために個々の会社が、選別法と試験の整合したOECDテストガイドラインの開発、標準化、及び検証への一様な奉仕活動を行うことに同意する。

10. 化学産業は、人や野生生物の内分泌系と相互作用するかもしれない化学品を識別し、優先度を付けることに必要なin vitro 及び in vivo 選別試験法を開発し、検証する国内的・国際的な努力への出資と専門知識の提供をこれまでと同様に続ける。化学産業は経済協力開発機構(OECD)内分泌かく乱物質試験と評価部門 (EDTA) の内分泌スクリーンと試験を開発、有効化する努力にこれまでと同様、関与し続けるであろう。化学産業メンバーは、各国政府に内分泌かく乱のための新しい選別と試験の手続き規定を作り始める前に、進行中のグローバルに整合的なテストガイドラインを標準化し、有効にするOECDタスクフォースEDTAの努力を優先するよう勧める。

11. 化学産業は、最も効率的に既存の資源を使い、努力の不要な繰り返しを避け、実験用動物の使用を最小化して、国際的な整合に必須のデータの相互受け入れを保証するのを手伝う、選別と試験法の妥当性検証におけるすべての利害関係者間の国際協力の恩恵を認識している。

12. 化学産業は、更なる研究と理解が、より効果的な社会政策のためにしっかりした基礎を提供することに同意する。付加研究は、私達の科学的理解を増大させ、環境における化学薬品への暴露がホルモンが媒介するプロセス経由で人と野生生物の中に有害作用をもたらす潜在力があるかどうかを決定するのに必要だ。内分泌かく乱について、包括的な国際純正・応用化学連合出版 J.ミヤモト、及び J.バーガー(2003年)において述べられたように、「多くの人口がEAS(内分泌かく乱活性物質)へ暴露可能性のひどく危険な状態にあるかどうかについて確固たる結論に達するにはまだ早すぎて、更なる警戒がはっきりと必要とされている。しかし、過去10年間でかなりの研究の後で、人の病気を起こしているEASへの低レベルな環境暴露の決定的な発見が全然なかったことは多少心強い」。

13. 化学産業は、化学物質の安全性に関する長期的研究(LRI:長期研究イニシアティブ)を通して、そのメンバーの研究の効率と有効性を最大化し、また努力の繰り返しを避けるために、グローバルベースで調整する。ヨーロッパ、北アメリカ、及びアジアのLRIメンバーは、学究的、研究組織や政府とともに働いて、化学品の相互作用、ホルモンシステムへの影響、有害作用を起こす潜在力に関する基礎研究を後援する。LRIメンバーは、公募で選ばれた組織で開放的で、透明なプロセスを通して研究を実施することを誓約した。この研究の成果は適時一般に利用可能とされ、産業により準拠されるだろう。

14. 段階的、階層的な科学的枠組みが、選別し、試験するために必要である(表1)。検証済みの選別試験法は、内分泌作用によって物質を識別し、更なる特定試験のため物質を優先順位づけするために使われる。特定試験は、検証済みで、統合的なプロトコルを使って、内分泌系機能の変更によって起こされた有害作用を識別するために必要である。段階的アプローチを使つての、特定試験による結果は、公共部門と民間セクターの両方における指導方針と管理による選別試験法からの結果に優先するか、取って代らなければならない。議論のために、3つの段階が提案されている。

表1. 提案されたOECD内分泌選別・調査の階層的な枠組み

STAGE	DESCRIPTION	ASSAYS FOR MAMMALIAN TOXICITY	ASSAYS FOR ECOTOXICITY
OECD Stage 1 Initial Assessment to Set Priorities for Further Evaluation	Available data (for example) Production volume and pattern of use Available exposure information Predicted environmental properties, e.g., fate Toxicological data, especially endocrinerelevant data (i.e., results of histopathology on reproductive organs from repeat dose studies, developmental or reproductive toxicological information.)	All relevant studies	It is presumed that the data review will incorporate both mammalian and ecotoxicological issues.
	Structure activity Relationship Molecular screening results	It is presumed that structure activity relationships for receptor mediated modes of action will be applicable across mammalian orders. All relevant studies	It is presumed that structure activity relationships will be applicable across vertebrate classes. Invertebrates may have unique receptors. All relevant studies
OECD Stage 2 Screening Assays (mode of action) <i>OECD 2002 Framework Level 2-4</i>	<i>In vitro</i> assays providing mechanistic information / data <i>OECD 2002 Framework Level 2</i>	Oestrogen and androgen and receptor binding assays Transfected mammalian cell assays (ER and AR and TR) <i>In Vitro</i> Aromatase <i>In Vitro</i> Steroidogenesis	It is presumed that receptor binding will in principle be applicable across vertebrate classes and to any invertebrates expressing similar receptors.

	<i>In vivo</i> assays providing mechanistic information / data on single endocrine mechanisms OECD 2002 Framework Level 3	Uterotrophic screening assay (estrogen and antioestrogen) Hershberger screening assay (androgen and antiandrogen)	Fish screening assay (vitellogenin and secondary sex characteristics) Frog metamorphosis assay
	<i>In vivo</i> assays providing mechanistic information / data on multiple endocrine mechanisms OECD 2002 Framework Level 4	Enhanced TG407* Adult Intact Male assay Male Pubertal assay Female Pubertal assay	OECD Fish Screening Assay (VTG and secondary sex characteristics as mandatory endpoints; other endpoints are optional)
OECD Stage 3 Definitive Testing (evaluation of apical endpoints, adverse effects and dose response for hazard identification and characterization) OECD 2002 Framework Level 5	Reproduction/developmental tests –shorter scope – includes <i>in utero</i> exposure, developmental, and reproductive capacity endpoints	(TG407* (as adopted on October 03,2008) depending on the exposure situation as the method does not include the reproductive phase) Reproductive /developmental screening test (TG 421) Combined repeat dose with reproduction / developmental screening (TG 422) One generation reproductive toxicity (TG 415) Two generation reproductive toxicity (TG 416) [Enhanced one generation reproductive toxicity –if and when a final OECD TG is developed]	Partial and full life cycle assays in fish, birds, amphibians and invertebrates (developmental and reproduction) Fish full life cycle

* 備考:状況によっては、選ばれた例にNOAEL(無毒性量)を設定するのにTG-407の1つを適用することで十分であろう。そのような例は、例えば影響力の低い物質、人体暴露可能性最小と思われるクローズなシステム中で製造した中間あるいは最終生産物、環境放出の可能性が制限されているものなどである。

これは、より広い試験対象の焦点を高い暴露可能性を持っている物質にだけ合わせることに役立つであろう。

15. 提案されたOECDステージ1: 初期評価

提案されたOECDステージ1の目的: 初期評価(表2)は、急速な優先度付けと評価ができるだけの科学的に関連したデータが存在する物質を認知するため、より速く広大な物質世界を評価するためのものだ。

OECDステージ1: 初期評価は、次のことを許すだろう:

- (a)関係したデータが存在しない物質、(b)評価によって目標とされた特定の危険(例えば生殖発生影響、発達的な作用)をもたらす、例えばエストロゲン又はアンドロゲン(男性ホルモン)受容体に結合する行動のモードを表すいくつかの可能性を持つ物質を認知すること。これらの物質はそこで優先度を付けられるべきだ。
- 評価の目標とされた特定の危険をもたらしている行動のモードが加わらないか、加わることがほとんど無さそうな物質を認知すること。これは全体の努力と評価計画の規模を減らす。新しく、注目すべき情報が現れれば、これらの物質は再考ができる。

表2. 提案されたOECDステージ1:更なる評価への優先順位を設定する初期評価

OECD Stage 1 Initial Assessment to Set Priorities for Further Evaluation	Available data (for example) Production volume and pattern of use Available exposure information Predicted environmental properties, e.g., fate Toxicological data, especially endocrine-relevant data (i.e., results of histopathology on reproductive organs from repeat dose studies, developmental or reproductive toxicological information.)	All relevant studies	It is presumed that the data review will incorporate both mammalian and ecotoxicological issues.
	Structure activity relationship	It is presumed that structure activity relationships for receptor mediated modes of action will be applicable across mammalian orders.	It is presumed that structure activity relationships will be applicable across vertebrate classes. Invertebrates may have unique receptors.
	Molecular screening results	All relevant studies	All relevant studies

16. 入手可能な毒物学上の情報の閲覧は重要なステップだ。現在の毒物学試験プロトコールは、潜在的な内分泌媒介毒性についての多くの情報を提供する。内分泌媒介毒性を示す最終情報は現在のテストガイドラインに存在するか、開発中だ：

- 内分泌媒介の発がんメカニズムはよく知られていて、これらのメカニズムの最終情報は現在のがん生物検定に含められている。
- 多世代再生研究は、おとなの機能再生可能期間と同様に、子宮内、泌乳期と思春期におけるすべての関連した感覚器官を調査するために設計されている。
- OECD内分泌かく乱物質選別評価タスクフォース(作業チーム)により選別と評価のプロトコールを見直し、適切な場合は交換/導入する作業が進行中だ。

17. 優先度設定の目的のため、内分泌メカニズムに起因するかもしれないホルモンの働きと有害作用についての科学的な証拠の総合的な考慮が必要だ。これは以下を含むべきだ：

現行規制活動の評価；有害作用についての既存のデータ；異なる分類群における反応の存在又は不在；調査の適用及び信頼性に関連したポジティブな(プラスの)反応の性質とマグニチュード(強さ)；用量反応(又はその欠如)；反復可能性；相対的な効力；仮定された作用モードに関連しての反応の首尾一貫性。証拠の重みを示すケースの中で、ホルモン作用がないか、極めて低い場合、ほとんど又は全然環境への放出の可能性がなく、又は暴露の可能性もないような物質は更なる調査のためには非常に低い優先順位を与えられるべきだ。

18. モデル予測が検証できる場合、構造活性相関((Q)SARs)と分子選別法は、目標モードのある物には迅速な評価が可能であろう。例えば、エストロゲン作用モードに関連したプロパティ(性質)は、エストロゲン受容体にバインド(結合)することだ。エストロゲン結合部位のボリューム(量)と性質は、物質が受容器と結合する能力と実際の結合親和力を決定する。(Q)SARと分子選別試験は、そのとき、結合親和力の予測によって物質の優先度付けを補助することができ、エストロゲン受容器に結合することがほとんどありそうにない多くの物質を示すこともできる。

19. 優先度付けには次に示すいくつかの属性の総合的な評価を含むべきだ：

- 最初の構造活性評価によって示されるような物質の可能な力；
- 生産量；
- 継続監視によって示された環境への放出量と環境レベル；
- 長距離の移動、持続性、及び生物濃縮などの環境の属性；
- 暴露された人数と関連する、暴露経路、暴露強度及び期間、ならびに部分母集団中の不釣り合いな暴露の可能性などの関連性を用い、そして
- 既存データの証拠の重み評価。

20. 提案されたOECDステージ2:選別。

提案されたOECDステージ2選別の目的は、物質が、内分泌系の1つ以上の要素と相互作用する可能性を持っているかどうかについて効率的、効果的に情報を展開させることだ。最もしばしば、OECDステージ2では、選別試験法は関連した生体応答に導く特定の作用モードに基づく。ポジティブな機械的な反応は更なる、評価及び、関連した危険がもしあつて必要ならば、それを特徴付ける作用モードに連結した試験を行う根拠となる。

21. 提案されたOECDステージ2:選別(表3)はin vitro試験とin vivo試験に二分される。これらの試験が同等ではないからだ。経済性と動物福祉考慮の両面から、in vitro試験が、かなりの数の化合物を適応させるためと物質を評価する上での不当な遅れを避けるために、使用されるべきと主張される。柔軟性を持つため、直接in vivo試験を進める選択肢も除外されるべきでなく、in vivo試験結果が入手可能ならば、in vitroの試験結果も必要とはされない。in vivo試験では、i) 吸収、分配、代謝、及び排出など、in vitro試験では得られない物質固有の複雑さを組み入れ、またii) 全内分泌系の複雑で、動的な恒常性と働きを反映させる。従って、Veldhovenワークショップ(SETACヨーロッパ1997年)によって言及されたように、in vivo試験結果はin vitroの結果に取って代るであろう。in vitro試験の例には以下がある: エストロゲン受容器結合試験、ホルモン受容器とホルモン応答性レポーター遺伝子を含む酵母種、あるいはエストロゲン受容器支配のレポーター遺伝子に核酸感染して自然にエストロゲン受容器そっくりな表現をする哺乳類細胞系などだ。in vivo選別試験法の1つはエストロゲン作用モードでの子宮肥大試験だ。この試験は子宮の目標器官の成長と重量増加反応に基づくもので、3日間で実施でき、最小数の動物を使う。子宮の目標器官の反応はエストロゲン作用モードには非常に適切だ。

表3. 提案されたOECDステージ2:内分泌系の1つ以上の要素と相互作用する物質の潜在力を評価するための選別試験

LEVEL	DESCRIPTION	ASSAYS FOR MAMMALIAN TOXICITY	ASSAYS FOR ECOTOXICITY
Stage 2: Screening (mode of action)	<i>In vitro</i> assays providing mechanistic information / data OECD 2002 Framework Level 2	Oestrogen and androgen and receptor binding assays Transfected mammalian cell assays (ER and AR and TR) <i>In Vitro</i> Aromatase <i>In Vitro</i> Steroidogenesis	It is presumed that receptor binding will in principle be applicable across vertebrate classes and to any invertebrates expressing similar receptors.
	<i>In vivo</i> assays providing mechanistic information / data on single endocrine mechanisms OECD 2002 Framework Level 3	Uterotrophic screening assay (estrogen and anti-oestrogen) Hershberger screening assay (androgen and anti-androgen)	Fish screening assay (vitellogenin and secondary sex characteristics) Frog metamorphosis assay
	<i>In vivo</i> assays providing mechanistic information / data on multiple endocrine mechanisms OECD 2002 Framework Level 4	TG407* Adult Intact Male assay Male Pubertal assay Female Pubertal assay	

* 備考:状況によって、TG-407は、選ばれた例にNOAEL(無毒性量)を設定するのに十分であろう。そのような例には、例えば低活性な物質や、クローズなシステムの中で製造し人体暴露最小と思われる中間生産品、最終製品、そして環境放出の可能性が制限されているものが含まれる。これは、高い暴露可能性を持っている物質にだけより広範な試験の焦点を合わせることに役立つであろう。

22. 段階的枠組みの選別レベルでの試験を考慮する原則は以下の通りだ:

- 必要な情報を資源効率的な方法で提供するように個々の試験は選ばれるべきであり、プロトコールは設計されるべきだ。すなわち、予期されている数の物質に対処する能力を持つことに加えて、試験自身は簡単で、速く、経済的であるべきだ。
- 必須でない限り、非常に専門的で、技術的に厳しいテクニックは避けられるべきだ。試験テクニックは必要な研究所資源の能力と資格の範囲にあるべきだ。
- 提案されたOECDステージ2を構成する試験からの結果として:選別は機械的な情報だけを提供し、有害作用の証拠は提供せず、そのような結果は分類又は規制のために使われるべきでない。Weybridge定義(EC 1996年)、OECDステージ2に従えば:選別ステージ結果は、化合物が‘内分泌かく乱物質’であることを示さない。

- TG407は選別試験と特定試験の両方に使えるいくつかのユーティリティを持っている。TG407は商品化学薬品のための主要な反復服用毒性研究の1つとしてOECD SIDSバッテリーにおいて主要な役割を果たした。TG407の認証は、特に活性の弱い物質について、強い、適度な内分泌作用を持つ物質だけが検出され、全体の研究結果が一般毒性に支配されていたことを示した。この点で、TG407は成長指標、有害作用、及び用量反応と同様にいくつかの内分泌に特有な指標を評価する方法であり、従って危険性の特定と解明のために一定の例において使うことができる。そのようなものとして、TG407は提案されたOECDステージ3:特定試験に入れることができる。しかし、新しく出されたTG407 OECDテストガイドラインにおいて説明されるように、提案されたOECD段階2:選別ステップにおいて選別試験法として、又は提案されたOECD ステージ3:特定試験ステップにおいて反対作用のための試験として、TG407を採用することのどちらにも固有のいくつかの能力と限界がある。観察された全体の(すなわち毒性のタイプとは無関係に)無毒性量についてのより高い層での研究とTG407の比較において、感度における違いは通常10倍(ゲルプケなど、2007年)より多くはない。暴露状況によってTG 407の1つは、提案されたOECDステージ3:選ばれた例における人の健康危害説明のための特定試験に、十分であるかもしれない。そのような例として、例えば潜在能力の低い物質、閉じ込められた中間物、最小の人体暴露、及び制限された環境放出可能性を含めることができる。そのような場合人の健康危害説明のためTG407に依存できるということは、高い暴露可能性を持っている物質にだけより広範な試験の焦点を合わせることに役立つであろう。

23. ステージ2を構成する選別試験法:エストロゲン、アンドロゲン、及び甲状腺作用モードの行動を検出することに焦点を絞って選別する。未知の内分泌作用を持つ化学薬品を効果的に選別するために、評価は、提案されたステージ2:選別ステップを構成する試験の完全な組み合わせによる化学薬品の実験研究から構成される。既存の試験又は機能的に等しい試験法からの情報が入手可能ならば、それは、提案されたステージ2:選別ステップに包含される作用モードの1つ以上についての物質の活動について人が科学的で堅実な結論に達することを可能にする。そしてそのような物質のためにそのような作用モードのための試験を別に行う必要は必ずしもないであろう。

24. 証拠の重み手順は、提案されたOECDステージ2:選別ステップを構成する全試験を横断して結果を統合するために実施される必要がある。OECDステージ2:選別における証拠の重みの総括的な考察に基づいて、ポジティブな物質は、特定試験(OECDステージ3:特定試験)中で更なる評価への最優先候補であると考えられる。しかし、自動的な引き起こしはない。代わりに、証拠の重みアプローチ(添付1(CEFIC EMSG証拠の重みペーパー)参照)が、選別試験組合せの結果を評価するために使われるべきだ。追加の仕事を開始することに先がけて、人体暴露の可能性と環境への入境の可能性を考慮することは適切だ。証拠の重み評価は以下を含むべきだ:違う系統樹の中の反応の存在又は不在;試験の適合性と信頼性に関連したポジティブな反応の性質とマグニチュード;用量反応(又はその不足);相対的な潜在力;そして、仮定された作用モードに関連しての各試験反応間の首尾一貫性。更に、上で示されるように、証拠の重み(検済済みの選別試験結果の考察から引き出される)が、最も低い潜在力と、ほとんど又はまったく環境へのリリースや暴露の可能性を示さない場合、そのような物質は特定試験における更なる調査には非常に低い優先順位を与えられるべきだ。標準の毒性研究(例えば繰り返し服用試験(TG 407とTG 408)、発達毒性研究(TG 414; TG 421/422)、慢性の毒性研究(TG 452と453))からの既存の情報とデータは証拠の重み評価の一部として閲覧されるべきだ。これらの研究結果は潜在的な懸念の指標への用量反応と有害作用についての重要な情報を提供することができる。用語‘潜在的な内分泌かく乱物質’は誤解され易いので、一般にこの用語の使用は避けるべきだ。科学的な展望により、上で説明されるように、選別試験法/試験組合せによる物質の性能について全体として証拠の重みを決定することが重要だ。

25. 提案されたOECDステージ3:特定試験

提案されたOECDステージ3:特定試験の目的は、化学薬品から正確に、効果的に危険を識別し、特徴付けることだ。提案されたOECDステージ3:特定試験を構成する試験は、特に生殖及び成長毒性試験を評価するために発展してきた。得られた結果は、目標分野に関連する毒性で評価されるべきであり、評価された結論は内分泌及び非内分泌両方の毒性結論を含む。表4に含められている試験の配列は試験と試験の連続したリストではなく入手可能な選択肢の行列とみなされるべきだ。すべての試験を実施することは必要でな

いであろうけれども、代わりに、この行列から、適切な試験を選ぶことができよう。柔軟性と、動物と資源の最小化の観点から、より広い範囲試験がすでに入手可能な、又は計画されている場合には、例えば強化された繰り返し服用試験やより狭い範囲の再生/発達検査は必要とされないであろう。

表4. 提案されたOECDステージ3:有害作用と用量反応についての特定試験（危険性解明とリスク評価に使用するため）

LEVEL	DESCRIPTION	ASSAYS FOR MAMMALIAN TOXICITY	ASSAYS FOR ECOTOXICITY
Stage 3: Definitive Testing (evaluation of apical endpoints, adverse effects and dose response for hazard identification and characterization) <i>OECD 2002 Framework Level 5</i>	Reproduction/developmental tests –shorter scope – includes <i>in utero</i> exposure, developmental, and reproductive capacity endpoints	(TG407* depending on the exposure situation as the method does not include the reproductive phase) Reproductive /developmental screening test (TG 421) Combined repeat dose with reproduction / developmental screening (TG 422) One generation reproductive toxicity (TG 415) Two generation reproductive toxicity (TG 416) [Enhanced one generation reproductive toxicity –if and when a final OECD TG is developed]	Partial and full life cycle assays in fish, birds, amphibians and invertebrates (developmental and reproduction)

* 備考:状況によって、TG-407は、選ばれた例にNOAEL(無毒性量)を設定するのに十分であろう。そのような例には、例えば低活性な物質や、クローズなシステムの中で製造し人体暴露最小と思われる中間生産品、最終製品、そして環境放出の可能性が制限されているものが含まれる。これは、高い暴露可能性を持っている物質にだけより広範な試験の焦点を合わせることに役立つであろう。

26. ホルモン活性を持つ化学薬品に対し防御できる危険性解明には毒物学上の選別、試験データ(危険有害性物質の特定)の要約を必要としているだけでなく、また、生じた作用が逆であるかどうか、そして有害作用が化学薬品のホルモン活性によるかどうかの客観的な評価を要求する。危険性解明は証拠の重みの総合的な考察に基づく。これは提案されたOECDステージ2選別と提案されたOECDステージ3特定試験の考察と、標準の毒性研究(例えば繰り返し服用試験(TG 407/408)、再生/発達毒性研究(TG 414/421/422)、慢性毒性研究(TG 452/453)など)の結果を含む。そのような評価は、器官システムと作用モードを横断する有害作用を考慮するためとNOAEL(無毒性量)を比較するための文脈を提供する。しかし、リスクの特徴解明には、危険有害性物質の特定では不十分だ。

27. リスクの特徴解明には科学的なデータ、危険、用量反応、及び暴露に関する知識の統合と同様に、危険データの基礎、データから得られた推論、及び固有の不確定要素の評価とを必要としている。低い活性や、低いか取るに足りない実際の潜在的な暴露の場合には、繰り返し服用試験(TG 407)、再生/発達毒性選別試験(TG 421/422)などの試験法が、成長指標への作用についての用量反応データを提供するために使えるかもしれない。これは、高い生産量と、ヒトや生態への最も高い暴露可能性を持っている物質にだけより広い試験の焦点を合わせることに役立つであろう。すべての場合、ステージ3:特定試験からの結果はステージ2:選別からの結果に優先するか、取って代る。

28. 内分泌作用を評価するためのOECDフレームワークを開発することにおいて、みな、OECD(フレームワーク)を採用する必要性と、そのフレームワークが標準化され、検証され、国際的に整合的な試験法を使わなければならないことを認めていて、これはこの10年の間のOECD EDTAとWNT作業の基礎であった。内分泌作用を評価するための選別法、試験法を考慮するにあたって、OECD EDTAがあるタイプの研究を標準化しなかったため、認証確定のための適正なデータを欠いた。それゆえ、標準化し、有効にされた試験法を達成するのに必要な実験研究を調整するために、OECD EDTAは認証管理グループを形成した。産業、政府、学界、及び研究所の努力により、この点においてかなりの進歩があった。

29. 新しい試験法、標準化せずにまだ検証済みでない方法と非標準試験種を使つての、研究所実験研究は一般に、OECDテストガイドラインと医薬品の安全性試験の実施に関する基準を使つての研究において普通に含まれる品質標準を欠き、従って、そのような新しい方法又は非標準試験種は規制の目的にあわせ適切な注意を払って評価されなければならない。内分泌メカニズム(機構)の基礎研究が進むにつれて、新しく、斬新な科学的方法が報告されてきたし、今後もされ続けるであろう。これらの新しく、斬新なタイプの研究は、標準化し、検証されたテクニックを使つての研究所研究とかなり違う。例えば、彼らは最終評価点に関連する試験法、性能の信頼性、又は明白な解釈のための適切な文書化を欠くことがある。従って、そのような斬新な調査研究は規制を伴う行動のためには使われるべきでなく、更に研究、及び方法の認証努力を引き起こすべきだ。

30. 試験法の認証は、それが規制上の使用のために考慮されるべき必要条件だ。新しいか、改訂された試験法が、規制の目的のために検証済みであると見なされるために、それはOECD GD 34(2005年)、ICCVAM(1997年)によって指定された基準を満たすべきだ。認証のためには研究所内、及び研究所間での試験法の変更可能性と再現性の範囲が示され、その方法の適用範囲と限界を評価できるだけのデータが提供されていなければならない。

31. OECDによって認知されているように、GLP、品質保証、及び品質管理の問題は重要な国際的な次元を持っている。データの相互引受けの下で、OECD加盟国の規制当局は、外国で開発された安全試験データに頼ること、従って重複試験を省くことができ、このことは、実験用動物福祉を強化し、試験効率を上げる、と同時に高品質の科学情報が規制と生産を補助する目的のために発展させることに役立つ。検証済みでない方法を使って、実行された研究に比べて、検証済みの試験法を使っている物質の選別と試験は結果へのより大きな信頼を産み出す。OECD加盟国間でのデータ相互引受けの必要条件は、化学薬品の評価が十分な品質、厳格さ、及び再現性のある試験データに基づくという基礎に基づいている。

32. 科学的方法が進む中で、規制団体は、新しく、斬新な方法と非標準種を含む研究を検閲し解釈することに挑み続けるであろう。発見が特に有力であるかもしれないそのような研究からの結果を扱う信頼できる標準は、科学的方法—仮説の形成、実験を通しての仮説試験、及び独立な複製、に具現化される標準だ。OECD EDTA枠組みは化学物質の内分泌作用の評価のためのOECDのグローバルに整合したアプローチの中にこの信頼できる標準概念を承認し、組み込むべきだ。

33. 新しく、斬新な方法と非標準種を持つ研究は重要な科学情報を提供するかもしれない。この事実を認めて、そのような研究報告を取り上げるために、私達は以下の行動方針を提案する。第一次の仕事は研究報告の完全な閲覧であるべきだ。これは方法と手続の独立な閲覧とデータの閲覧を伴うであろう。研究文書化は、結果の独立な立証/計算を許すに十分であるべきであり、方法は、他の研究所による研究手順書の複製を許すために十分に説明されるべきだ。この閲覧に続いて、追加の研究所が研究を複製することが推奨される。そして、発見が、再現可能であると明らかにされれば、二通りの行動方針が勧められる：

A) 新しいか、斬新な試験法は、そのような方法が、選別、試験の組み合わせ中で1つ以上の既存の試験法を増やすか、取り替える必要があるとみなされると、OECD TGプログラム(EDTA)中又は政府又は認知された科学組織(ISO、ASTM)によって後援された同様な公式のプログラムの中で、標準化、認証を受ける対象になり得る。データの相互引受けを促進するためと実験用動物の利用を最適化するために、国際的な整合はまた目的の1つであるべきだ。OECD EDTAのそれに類似している方法中で可能な範囲まで、先進的な組織が、ある程度の標準化と認証前の作業を引き受けること、そして情報がセクタ(政府、産業、学会、及び他の科学の研究者)間で共有されることが有益だ。公式の試験法認証努力の組織と指導は、関連した管轄庁の既存のプロセスの中で実施されるべきだ；又は

B) 懸念の物質は標準化したOECDのTGの方法と種(又は同様に検証済みの科学的方法、例えばISO、ASTM、米国のEPAによって公表されたそれら)を使っている多種多様な既存の検証済みの試験法のどれかにより評価されることが可能であろう。この研究の結果はその時点で段階的階層的なOECD EDTA枠組みの中での評価を得られる。一般に、この行動方針が望まれる。

34. 堅実な規制の意思決定のためには関連した科学情報全体の閲覧が必要だが、規制調査の中で、標準化し、認証された試験法や、GLPの下で実施した研究からの結果に与えられる重みは一般に、斬新で、検証済みでなく、non-GLP研究に与えられる重みを越えている。セクション33中のコースA又はBのどちらかが完了する時まで、新しく、斬新な、又は検証済みでない試験法のレポートに基づく極端なリスク管理行動を開始することは軽率であろう。経験は、斬新で、新しい研究報告を規制の目的として自動的に認めることが不適當であることを示している。時々、学術雑誌によるピアレビューでも、欠陥研究や、単独研究で過度に熱狂的な受容(一特に結果が並みはずれていて、新開拓である)を見直す必要のある事実などを排除するために十分でないことがある。単一の研究の結果が特に重要であれば、そのような研究の品質を検証するために特別な注意が払われるべきだ。ピアレビューの範囲を考慮することはまた重要だ。学術雑誌出版物の大部分で、ピアレビューは実のところ詳細な研究所研究記録を調査しない。代わりに、このシステムは提出著作者の実験操作と結果の要約に依存している。単一の研究の結果が特に重要であれば、特別な注意は、そのような研究の品質を検証するために払われるべきだ。

参考文献

J. Miyamoto and J. Burger (2003) Implications of endocrine active substances for humans and wildlife: Executive summary. Pure and Applied Chemistry Vol. 75, Issue 11-12, xv-xxiii. (<http://www.icsuscope.org/projects/complete/endocrineexecsum.htm>)

Veldhoven workshop. SETAC 1997 SETAC (1997) SETAC-Europe/OECD/EC Expert Workshop on Endocrine Modulators and Wildlife: Assessment and Testing (EMWAT). Veldhoven, The Netherlands, 10-13 April 1997. Editors L Tattersfield, P Matthiessen, P Campbell, N Grandy and R Lange. SETAC Å-Europe Publications, Brussels

Weybridge EC 1996. European Workshop On The Impact Of Endocrine Disrupters On Human Health And Wildlife. 2-4 December 1996 Weybridge, UK. Report Of Proceedings [REPORT EUR 17549]

EMSG. Towards the establishment of a weight of evidence approach to prioritizing action in relation to endocrine disruption. Endocrine Modulation Steering Group, LRI-CEFIC: Brussels. (2000); Attachment 1.

H-P. Gelbke, A. Hofman, J. Owens and A. Freyberger. The enhancement of the subacute repeat dose toxicity test OECD TG 407 for the detection of endocrine active chemicals: comparison with toxicity tests of longer duration. Archives of Toxicology 81:227-250, 2007

OECD GD 34 (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (http://www.oecd.org/document/30/0,3343,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html)

ICCVAM (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods: A Report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (NIH 97-3981). http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/about_docs/validate.pdf

添付1. CEFIC EMSG ペーパー: 内分泌かく乱との関係において行動に優先度を付けることへの証拠の重みによる接近法の設立に向けて

要約

内分泌かく乱物質によってもたらされた実際のリスクとリスク管理選択を展開させる時に含まれるべきである科学的評価について、大きな不確実性がまだ残っている。CEFICのポジションは、最も信用できる科学的なデータを使っている証拠の重みによる接近法が、決定をすることにおいて使われるべきだということにある。多くの出版物はデータ品質とそれを危険とリスク査定に使用することをどのように評価するかを記述する。

(例えば Ref. 1 & 2)

この文書はこのより初期の仕事を基にし、内分泌系のかく乱を通して有害作用を起こす物質の潜在力に関連して科学的な証拠のバランスを評価する手順書の重要な要素を集約する。物質の危険とリスクを評価するためにどんな行動をとる必要があるか、- 証拠の重みによる接近法を使って、データの関連性、品質、及び重要性の問題を取り上げる。それは、特にEU DG環境プロジェクト:「内分泌かく乱におけるそれらの役割の更なる評価のための物質の優先度リストに向けて」の優先順位付けプロセスとアウトプットを強化するために開発されている。

手順書は以下を含む:

- 特に規制の目的のために使われたデータを集めるために、出版された文献の検索と未刊行の文献への検索の拡張をカバーする情報収集ステップ。
- 以下を考慮する評価ステップ:
 1. どんな指標が測定されていて、その指標の潜在的な内分泌かく乱メカニズム作用への関連性はどうか。
 2. ピアレビューの範囲と、特定の研究とそのプロトコールの反復可能性、信頼性、及び品質。
 3. 上記1と2での評価に基づいたデータの意義(又は‘重み’)。
 4. 結論(‘証拠の重み’のバランス)を引き出すデータの十分な首尾一貫性があるかどうか
 5. 規制枠組みに関わる既存あるいは新規化学薬品についての、リスク査定に導くために要求される追加の証拠、及びその識別のための先行作業は何か。

イントロダクション

欧州委員会は、「内分泌かく乱における物質の役割の更なる評価のための優先度リスト」を準備するためにDG環境を通してプロジェクトの初期の段階を完成した。優先度格付けを達成するために、この演習は毒物学上のデータの評価を必要としていたけれども、化学産業は、初期のリストを作成するために取られたアプローチが、有意義に討論に追加するには表面的でありすぎて、リストが誤解されるかもしれない、と考える。

リストを開発するプロセスは、内分泌毒性の推定がたった1つのデータポイントに基づくかもしれない「疑惑の証拠」アプローチを使った。内分泌毒性の証拠が全然ないことを一貫して示している研究は、それらが疑惑の力を付加しないため、品質とは無関係に無視されて来ている。

更に、それが、適切にED危険とリスクを評価するために必要とされている先行作業を識別し、含むことに失敗するので、「リスト」は何も討論に追加しない。それはまた、ED危険を判断するために、ほとんど又は全然データがないすべての他の物質を評価するための戦略を示すことに失敗する。それは、見かけ上「公式な」ステータスと疑似科学的分析のため、「内分泌かく乱物質の決定的なリスト」として誤解されるかもしれないが、よくある根拠薄弱な疑惑の単なる別リストでしかない。

すべての入手可能なデータを考慮することは、人の健康又は環境を保護せずに、製品の経済的に有害な除外を引き起こす可能性が十分にある、という点で良くない。

この分かりきった懸念にもかかわらず、ヨーロッパ化学産業は、内分泌かく乱におけるそれらの役割の更なる評価のために優先物質のリストを開発したいという政治的な願望を受け入れるけれども、「リスト」がより「行動」指向で、確かな科学原理に基づいていれば、公的な及び環境の健康の利益が守られるであろうと信じる。

この文書を通して、CEFICは、疑惑の各物質と、再検討されるかもしれないすべての他の物質について、科学に基づいた基準を使って必要とされる先行作業を識別するために、証拠の適用性と信頼性の両方をバランスよく検討するアプローチを提供する — 既存のコミュニティ規則の下に置かれたプロセスの範囲でリスク評価への先行作業計画を本当に提供する。私達はこのアプローチを「証拠の重みによる接近法」と呼び、それは評価を必要としている化学薬品のグループを定義する初期のステップとデータギャップを埋めリスク評価を引き受ける後の方のステップの間で、適合している。これは次のページに図1においてグラフィックで示される。

Weybridgeにおける欧州連合ミーティング (Ref 3) で、以下の定義は合意された：

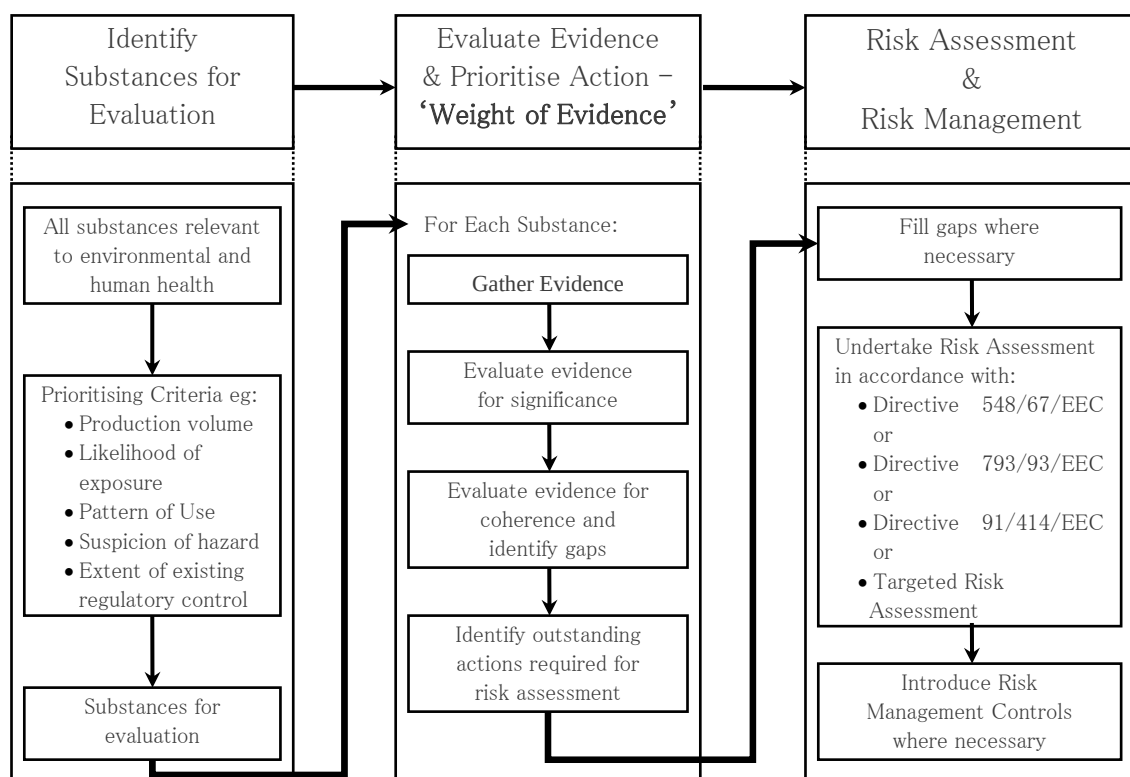
「内分泌かく乱物質は、内分泌機能の変化に帰結する全生物体又はその子孫の中で健康に有害な作用を起こす外因的な物質だ」。

「潜在的な内分泌かく乱物質は、全生物体の内分泌かく乱をもたらすかもしれない性質を備えている物質だ」。

これらの定義は国際的なアリーナで広い受容を得て、化学安全(IPCS)のための国際的なプログラムによって採用されていて、その結果、この提案セットのための基礎として使われている。

欧州委員会プロジェクトを目標とした協定において、それらの潜在的な内分泌かく乱活動に関連して物質の更なる評価のために必要とされる諸作業に優先度を付加するよう手順書が開発された。この文脈の中で、フレーズ「帰結する」は、機械的な活動と、健康に有害な作用の間の因果関係の表示を意味すると解釈される。それは特にエストロゲン、アンドロゲン、及び甲状腺のシステムそれぞれへのアゴニスト(agonistic)作用、拮抗(antagonistic)作用の6通りのモデル機構を意味する。しかし、関連する所で、他のソースからのリスクが無視されないように、それはまた、非内分泌関連有害作用を報告する余地も与える。

図1: 証拠の重みによる接近法の役割



証拠の重みによる接近法

以下のアプローチは、内分泌物関連の活動に関連した更なる評価のために化学薬品の識別と優先度付けを可能にするように入手可能な毒物学上のデータの証拠の重みの調査実行を補助するために設計された。それは下で示された2つの基本的な仕事から成る：

- 2.1 データを収集する。
- 2.2 以下を考慮する評価ステップ：
 - 2.21 どんな指標が測定されていて、潜在的な内分泌かく乱メカニズムの作用へのその指標の関連性(データ関連性)。
 - 2.22 ピアレビューの範囲とともに特定の研究とそのプロトコルの反復可能性、信頼性、及び品質(研究反復可能性)。
 - 2.23 上記2.21と2.22での評価に基づいたデータセットの意義(又は‘重み’)(データ意義)。
 - 2.24 結論(‘証拠の重み’のバランス)を引き出すデータの十分な首尾一貫性があるかどうか、必要な追加の証拠とそれを得るための行為は何か(これ以上の行為のための首尾一貫性、ギャップ、及び枠組み)。

専門家の判断は各段階で必要とされていて、透明度を保つため、決定の基礎を記録することは重要だ(セクション3参照)。

これらの提案のどれも新しくないことは強調されるべきだ。そのようなアプローチはよく受け入れられて、ピアレビューした機関紙に文書化された(例えば Refs. 1, 2 and 4)。

2.1 データ収集

可能な限り多くのデータが評価に含まれていると保証するために、すべての関連したデータベースの広い検索が必要とされている。これは出版された文献だけでなくSIDS、IUCLID、及び他の関連したデータベースから入手可能などのようなデータでも捕らえるべきだ。検索結果の検索と構成のための規準は専門家の判断に基づき、ケースバイケースの原則によって開発され、その詳細が記録されるべきだ(セクション3参照)。資料調査には少なくとも付録1にリストされた市販のデータベースを含むべきだ。考慮はまた一品質がセクション2.23下で評価される範囲で一未刊行の文献(特に規制の目的のために使われたデータ)の探索に払われるべきだ。

2.2 データ評価

2.21 データ関連付け

違うソースによって、内分泌かく乱のアセスメントに関連していると主張される様々な試験、手段、及び毒物学上の指標がある。現実において、このフィールドはまだ初期の開発段階にあり、多くの発見、特にin vitro試験と毒物学上の作用についての短期選別試験の関連、についての意義に不確実性がある。証拠の重みによる接近法は、機械的な証拠へのそれらの関連に関連した様々な毒物学上の指標と観察された作用を区別することができるはずだ。ここで説明されたアプローチのために、関連指標は、次を区別することができる階層を可能にするために重み付けされている：

- 観察された健康への有害作用と機械的な支持の因果関係の立証
- 観察された健康への有害作用とメカニズムについての限られた理解

- ・ 暴露のバイオマーカー
- ・ 作用の観察されない機械的潜在力

「内分泌機能の変化に帰結する全生物体又はその子孫の健康に有害な作用」を起こす場合にだけ、その物質は内分泌かく乱物質と考えられるべきだ(ref. 3)それゆえ、機械的なin vitroの試験だけに基づいて内分泌かく乱物質として物質を評価することは不相当で、アプローチは、これを反映するために設計されている。同様に、多くの現在の試験規準は、機械的な原因の証拠を提供せずに再生及び／又は発達への有害作用のin vivo決定のために存在する。これらの状況の下で、ネガティブな結果は、物質が一内分泌かく乱物質ではないことを証明することについて十分であるかもしれないけれども、ポジティブな結果には、機械的原因を特徴づけるために更に試験が必要であるかもしれない。それにもかかわらず、物質への金銭的利益を持つ人たちは、すぐ内分泌原因の一追加試験を引き受けるよりも一保守的な仮定によるリスク評価に進む方がより安上がりで、効率的であると思うかもしれない。非標準プロトコール指標について、関連指標の評価は多くの例において、しっかりした専門家の判断に基づく主観的決定であるべきであろう。そのような判断が不可能であると判明するならば、データは、追加の研究が、問題の物質にさらされると知られている種のためにリスクへの関連を明確化することができるそのような時間まで、‘低い意義’(セクション2.23参照)をもっていとみなされるべきだ。すべての例において、関連格付けは、適切な正当化によってはっきりと文書化される必要がある。識別されたけれども非内分泌起源であると考えられる有害作用は更なる評価のために関連した管轄庁によって報告されるべきだ。

in vivoデータの評価関連

内分泌毒性の評価に達するための最も関連したデータは、内分泌毒性と関連した計量と観察を含む反復服用毒性、及び／又は生殖毒性研究から見つかる。子宮肥大試験やハーシュバーガー試験法などの選別試験を含み、他のタイプのin vivo研究からの関連情報を用意し、そのような研究からのデータは全て証拠の重み検閲に含められるべきだ。選別試験におけるポジティブな結果は健康に有害な作用の確証ではなく、内分泌かく乱について判断をする上で、繰り返し服用試験より低い関連性しかないことは、覚えておくべきである。それにもかかわらず、in vivo選別試験法は、有害潜在力を示すことによって有益な目的にかない、図2において示されるように、行動につながる「暗示した研究」とみなされるべきだ。in vivo研究の関連性の要約は表1に示される。

表1: In Vivo試験法の関連性	
High relevance	endpoint(s) in a multi-generation test or other repeat dose toxicology test that is specifically controlled by the endocrine system, or parallel dose-responsive changes in hormone levels in the presence of consequent toxicological effects (mammalian only) negative data from a short term/screening assay specifically controlled by the endocrine system
Medium relevance	endpoint in a multi-generation test, or other repeat dose standard toxicology test, which may be influenced by the endocrine system, but is also known to be affected by other factors, e.g. water quality, environmental stress, toxicity etc.; or endpoint in a short-term/screening assay specifically controlled by the endocrine system; or changes in hormone levels in the absence of any toxicological effects (mammalian only)
Low relevance	evidence indicates that the endpoint is not controlled by the endocrine system. Positive results of adverse effects should be reported for further risk assessment.

in vitroデータの関連性を評価する

in vitro試験の目的は基本的に、本質的な内分泌変調潜在力を識別し、参照ホルモンと関連している力を決定することだ。例えば、「物質は受容器に結合することができるか?」「どんな量が、エストロゲンなどの自然なホルモンへの等しい反応を引き起こすために必要とされているか?」。in vitro試験で動物の中に作用を検出する予測的な能力は、最良でも不確かであるために、物質が内分泌毒性を起こすかどうかを判断するには、in vivo試験の中の結果がより関連していることは認められなければならない。そのような制限にもかかわらず、in vitro試験は、本来潜在的な内分泌転調活動を検出するために信頼できるかもしれず、従って、内分泌毒性試験の全体の文脈の中で有益なツールだ。多くのin vitroの選別システムは入手可能であり、それは脊椎動物のステロイド受容器と化学薬品の相互作用を包含している。哺乳動物以外の系統樹のためのin vitro試験の数は制限されるけれども、エストロゲン、アンドロゲン、及び甲状腺のためなどの受容器とそれらの必須の役割は脊椎動物を横断して保存される。無脊椎動物の内分泌系の理解は不十分である。エストロゲンと他の脊椎動物ホルモンの役割は、無脊椎動物の中ではもしあっても不明瞭で、ここで更に議論されないであろう。データ閲覧がすべての入手可能なin vitroのデータを含んでいること、in vitroの指標の関連を評価する目的のために、以下の注意が情報の階層と特定の測定システムの品質の両方に焦点を合わせるべきであることが推奨される。

- 試験が、潜在的な簡単な受容器結合対象か、又は転写の活性化と結び付けられた受容器結合をより予兆的に示すよう設計にデザインされているかどうか。
- 試験が細胞か又は細胞下であるかどうか、それは、内分泌受容器が、親化合物の代謝産物にさらされそうであったかどうかを示すであろう。
- 試験がステロイド代謝などの関連した内分泌パラメータを調査するかどうか。

上記の議論に基づいて、in vitroの関連指標の階層は表2中で提案される。

表2: <i>In Vitro</i> 試験法の関連性	
High relevance	endpoint is based upon receptor binding potential coupled with transcriptional activation, whole cell or subcellular assay; or receptor binding potential in a whole cell assay assessment of steroid metabolism in a whole cell assay
Medium relevance	endpoint is based on receptor binding activity in a subcellular assay, or endpoint is based on cell growth or other endpoint not a direct measurement of receptor mediated activity endpoint of steroid metabolism in a subcellular assay
Low relevance	not applicable

階層が指標の関連のためだけであり、結果に適用された最終的な重み付けを示すものではないことは注目されるべきだ。証拠の重み手続はセクション2.23で説明される。

2.22 研究反復可能性

研究反復可能性の評価は以下を考慮する：

- 研究のプロトコールが検証済みである範囲、研究中で結論の引きだせる限界
- 毒物学上の指標が理解されている範囲
- 通時的なデータベースの範囲とこれが提供する信頼性
- 基本的な実験計画 - 妥当性管理；濃度域の適合性
- 暴露データ - 試験素材の純度、暴露濃度の検証
- 試験種 - 適合性、健康状態、環境条件
- 結果の分析 - 観察された作用の統計的妥当性
- 研究報告の透明度

人が研究を繰り返すことができ、またその結果を再生することに信頼を持てるような評価であることが、本質的である。伝統的に、毒性研究は国際的に認知されて、有効にされた標準のプロトコール(例えばASTM、ISO、OECD)への準拠に対して評価されている。そのような研究はハイレベルの信頼によって繰り返されることができる。内分泌かく乱の決定のためのプロトコールの評価は、標準のプロトコールが現在この特定分野で利用可能でないので、難しい。それにもかかわらず、これらの標準の試験の多くは、内分泌かく乱に起因しそうな有害作用に光を当てて、それらの結果は、有益な証拠を提供するために頼ることができる。他の、たぶんより新しいプロトコールは内分泌固有の情報を生み出すかもしれないけれども、それらの信頼性に慎重な評価が必要だ。報告されたデータのための提案された規準は付録2にリストされていて、科学的慣行のよい標準に取り入れられている研究における規準として選ばれている。セクション2.21で以前に説明されたように、指標の関連に基づいての加重(重み付け)と結合される時に、これらの規準に従って実行された試験が、物質を評価するための適当な基礎を形成することが提案される。

この基礎の上で、研究反復可能性のための階層が表3の中で次の通りランク付けされるべきであることが提案される：

表3: 反復可能性の階層

High Confidence of repeatability	All criteria for the experimental design and conditions, and for reporting transparency are met <i>full details of experimental method available and these indicate that studies have been carried out to an acceptable standard</i>
Medium Confidence of repeatability	The main criteria for the experimental design and conditions, and for reporting transparency (see bolded points of attached Annex 2) are met <i>some details of the experimental method are available which indicate that studies have been carried out to an acceptable standard</i>
Low Confidence of repeatability	Insufficient information is available for the experimental design and conditions to determine reporting reliability
Unreliable	Analysis of the experimental design and conditions indicate that the study may be unreliable or not reported transparently.

2.23 データ意義

データのどのようなセットにでも起因しているべき‘重み’を設定する際の最終的な研究はセクション2.21と2.22で評価されるように、データの‘関連性’と‘反復可能性’両方を考慮することである。事実上、‘重み’は、内分泌かく乱について結論に達するときのデータセットに帰することができる危険率として測られる。

上で議論されるように、繰り返し服用/長期動物研究からのin vivoデータが危険評価において最も重要だ。in vivo選別研究のin vitro情報とデータは危険の推定判断をすることに有益だが、それらは今のところ内分泌かく乱に関連した有害/毒物学上の作用について直接結び付けられないか、又は予測的でもない。

これらの理由のために、クリティカルなライフステージの間の成長、再生と発達などの機能的な指標を調べる繰り返し慢性*の研究からのin vivoデータは、有害作用の潜在力を評価し、リスク管理決定をすることにおいてin vitroデータより重要であると考えられる。後者は、健康上の問題をもたらすかもしれないし、もたらさないかもしれない一連のでき事の中で1ステップ又は2ステップについての情報を提供することができるだけだ。せいぜい、そのような結果はただの‘兆候’であるとして取りあげることができる。

* この論文の中で、用語‘慢性’は28日の暴露又はより長く、生殖調査のすべての研究のために使われる。

このペーパーは、データセットに起因しているかもしれない4つの危険率を提案する：

- 高い意義
- 指標意義
- 低い意義
- 使用できない

これらの用語は、下で説明されるように、in vivoとin vitroのデータに置かれることができる危険率を目盛り設定するために使われる：

in vivo証拠の意義を評価する

表4はin vivoデータの中の『意義』の評価を表示し、以下の基本的な原則に基づく：

- 表4はin vivoデータの中の『意義』の評価を表示し、以下の基本的な原則に基づく：
- 選別試験の全体の意義が慢性の試験より低いので、中と高信頼性の研究からの高い関連性のin vivo選別指標は指標意義として考慮されるべきだ。
- 慢性の研究からの作用が中間関連をもっているならば、指標意義だけのように、中と高信頼性の研究はまた考慮されるべきだ。
- 中間関連性だけの中と高信頼性の選別研究は、低い意義と考慮されて、単に、情報をサポートするものとして使われるべきだ。
- 低い信頼性として又は信頼できないとして考慮された研究からのデータは使用できないと考えられるべきだ。

表4: in vivoデータの意義

		Study Repeatability			
Endpoint Relevance		Unreliable	Low	Medium	High
Chronic	High	<i>Unusable</i>	<i>Unusable</i>	<i>High</i>	<i>High</i>
test	Medium	<i>Unusable</i>	<i>Unusable</i>	<i>Indicative</i>	<i>Indicative</i>
Relevance	Low	<i>Unusable</i>	<i>Unusable</i>	<i>Positive effects to be reported</i>	<i>Positive effects to be reported</i>
Screening test	High	<i>Unusable</i>	<i>Unusable</i>	<i>Indicative</i>	<i>Indicative</i>
Relevance	Medium	<i>Unusable</i>	<i>Unusable</i>	<i>Low</i>	<i>Low</i>

in vitro証拠の意義を評価する

表5は、in vitroの研究の意義を評価するために以下の基本原則に基づく。

- どのin vitroの研究も高い意義をもっていると考えられない。せいぜい、それは機械的な潜在力のただの‘指標’であるかもしれない。しかし、‘指標意義’のネガティブな結果は、決定的であることについて十分であろう。
- 高信頼性と高い関連性の両方に見合う研究だけが‘指標意義’をもっていることとして評価されるべきだ。
- 中間の信頼性と高い関連性を持つ研究か、逆もまた同様、‘低い意義’を割り当てられるべきだ - サポート目的だけのために。
- 信頼できない又は低い信頼性を持つ研究からのデータは使用できないと考えられるべきだ。

表5: in vitroデータ意義

		Study Reliability			
Endpoint Relevance		Unreliable	Low	Medium	High
Receptor	High	<i>Unusable</i>	<i>Unusable</i>	<i>Low</i>	<i>Indicative</i>
Relevance	Medium	<i>Unusable</i>	<i>Unusable</i>	<i>Unusable</i>	<i>Low</i>
Metabolic	High	<i>Unusable</i>	<i>Unusable</i>	<i>Low</i>	<i>Indicative</i>
Relevance	Medium	<i>Unusable</i>	<i>Unusable</i>	<i>Unusable</i>	<i>Low</i>

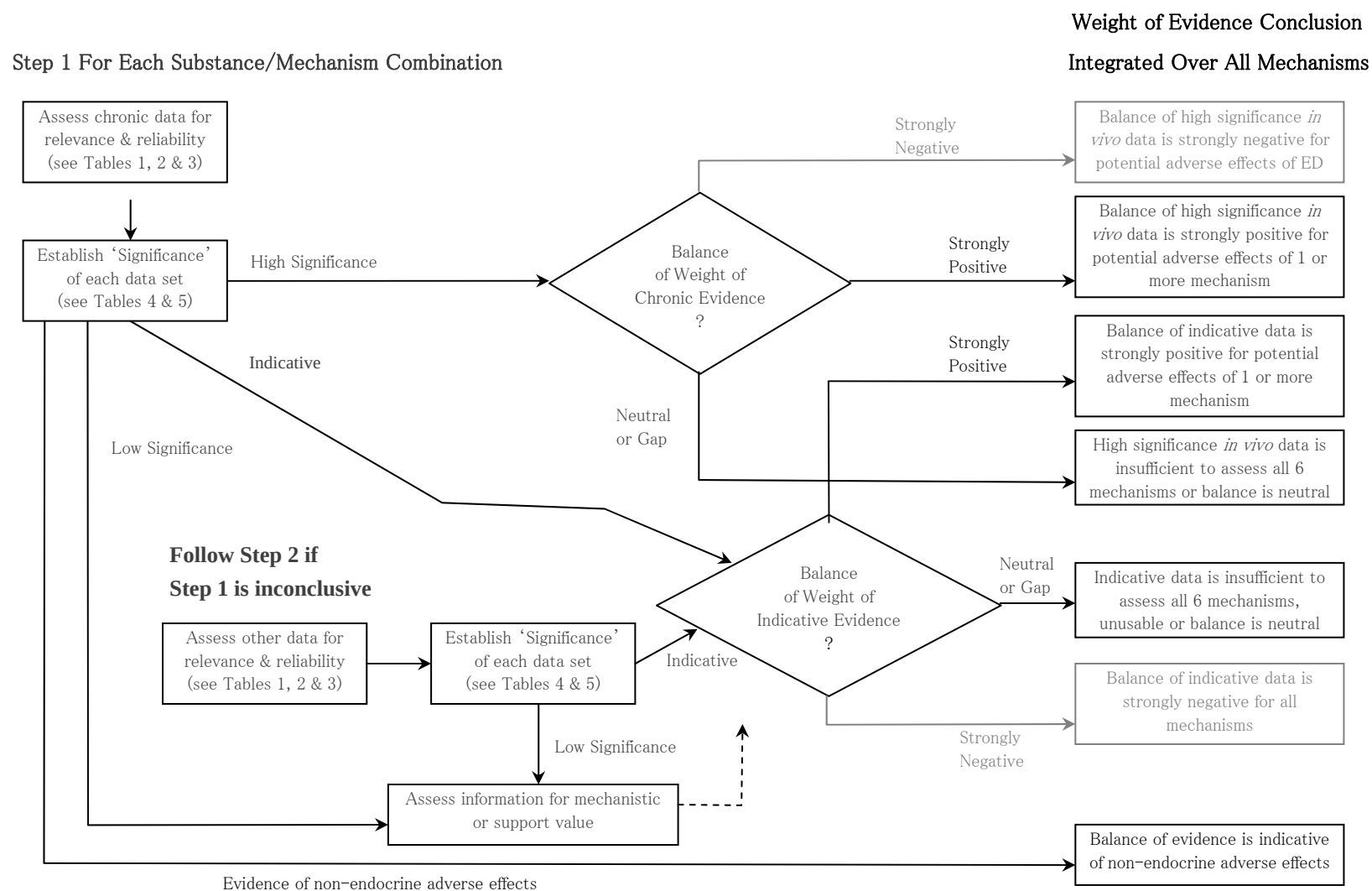
意義評価の使用

意義の評価は、(次ページ*上で見つけられる)図2において明らかにされたプロセスにおいて使われる。それは2ステップのプロセスを、各メカニズムに適用されると明らかにし、‘in vivoの高い意義’の証拠だけが第1ステップの中で決定的であると考えられるという前提に基づく。その他のin vivoデータはどれも‘指標’として又は‘サポート’証拠のみとして第2ステップの中のin vitroのデータとならんで考慮されなければならない。

第1ステップが決定的でない場合のみ、第2ステップに進む必要がある。

* 図2と3のための潜在的な前提と仮定は表6中で発見される。

図2: 証拠のバランスを評価し重み付けする



**内分泌かく乱
その重みに基づき、行動を優先順位付けするためのアプローチ
証拠アプローチ**

表6: 図2と3に当てはまる前提と仮定

- 図2と3に当てはまる前提と仮定。図2と3において示された計画は、6つのメカニズムに起因するかもしれない有害作用に関連する化学物質に焦点が合った評価に基づく：
 - エストロゲンの
 - 反エストロゲンの
 - アンドロゲンの
 - 反アンドロゲンの
 - 甲状腺
 - 反甲状腺
- そして、有害作用が識別されるけれども他のメカニズムに起因している場合、これは物質のより一般的なリスク評価の一部として報告され、調査されるべきだ。
- ‘in vivo の高い意義’以下のすべての証拠は‘選別値のみ’現在又は‘使用できない’として考慮される。
- もし、適切な服用範囲で十分量が分かっているならば、服用／反応試験は選別のすぐ後に実施できて、従って、必要な動物性の試験の全体の量を減らせる。
- 計画は、上の6つのメカニズムのための OECD 第1段階試験が選別のためにすぐ入手可能になるであろうし、関連した指標をカバーする多世代試験のための拡張がすぐその後 OECD 第2段階試験として合意されて、有効にされているであろうと仮定する。
- 優先度は色において示される：‘最優先’のための赤；‘中間の優先度’のための青；
- ‘これ以上の行動はない’のために緑色。

2.24 これ以上の行動のための首尾一貫性、ギャップ、及び枠組み

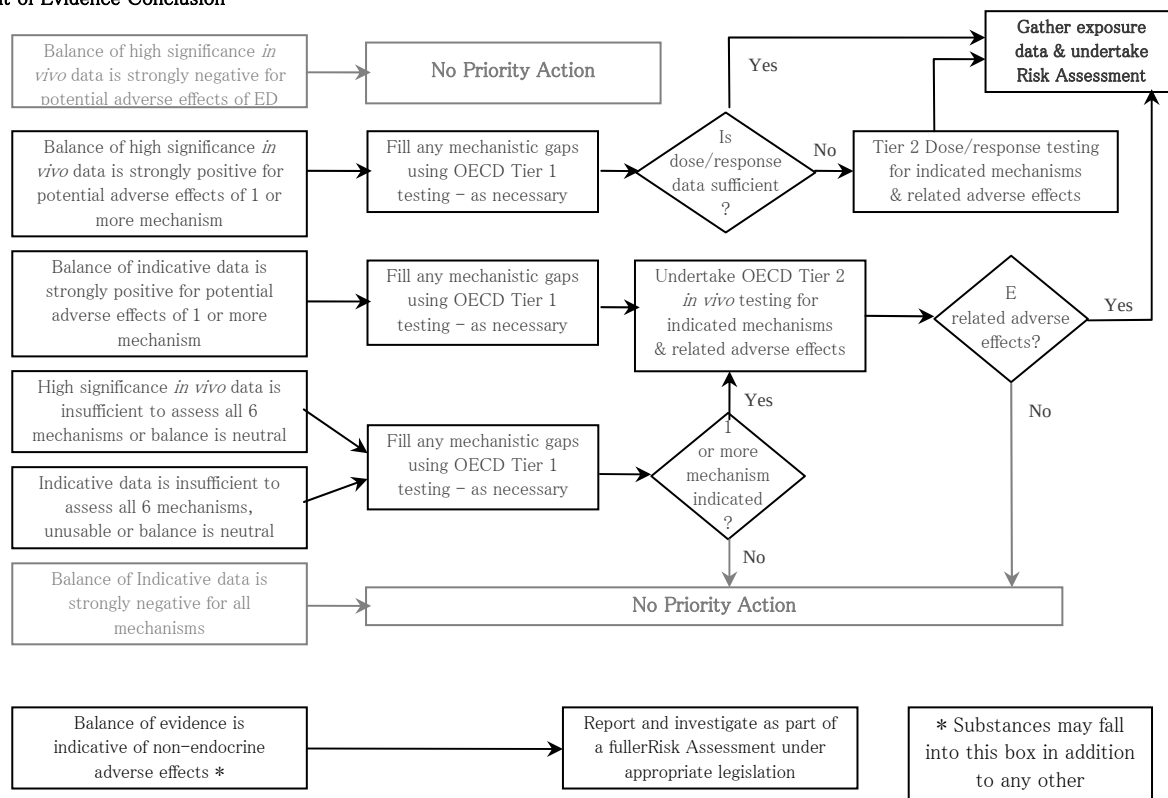
すべての関連データがセクション2.23で概説された手続に従ってすべての6つのメカニズムに対し、意義として評価されたら、各物質を図2における右手ボックスの1つに割り当てて、埋める必要がある知識におけるギャップを識別することは可能であるはずだ。平易に、データのすべてが図2において説明されたボックスの1つに落とし込めれば、図3(次のページ参照)において提案されるように、物質は次の行動に進めることができる。例えば、すべての高い意義の慢性のデータが図2の右上ボックスに落とし込めれば、これを前に図3に持って行って、手続は、これ以上の行動の必要が全然なく、物質が‘先行作業のリスト’から取り除かれるべきであることを提案する。代わりに、入手可能なすべてのデータが万一、図3に前に行き、そして再び2番目のボックスに落とし込まれれば、至急のリスク評価が推薦される。そして、すべての6つのメカニズムと関連した指標をカバーしているin vivo用量反応データの高意義がすでに存在している場合には、直接、更なる試験実行なしでリスク評価にジャンプすることが可能であろう。しかし、これは、リスクを評価することについて十分であるかもしれないが、それはメカニズムについていくらかの曖昧さを残すかもしれない。物質への経済的利益を持つ人たちは、追加の機械的な証拠が付加価値を提供することができるかどうかを判断するべきだ。そして、入手可能なデータがメカニズムのいくつかに光を当てることができるだけの場合に、ギャップが、まずOECD第1段階試験を使って、埋められることが推奨される。それにより、第2段階検査が、不要な試験の複雑さなしで懸念のすべてのメカニズムをカバーするよう設計されることが可能になろう。実際の場合で、多くの物質はいくつかのメカニズムにポジティブで、他にはネガティブであるかもしれない — 示された行動を引き起こす。

更に、データは首尾一貫しないかもしれない—高い意義があると考えられる研究のためにでさえ。はっきりと、同様な意義の多くの間に‘変わった(odd)’研究が1つしかないならば、その1つは、‘証拠の重みのバランス’に基づいた結論を引き出すことができるであろう。しかし、バランスがニュートラルであるか、ニュートラルに近いならば、明確な結論を引き出すために、追加の高い品質の研究が1つ以上のメカニズムの

ために実施されることが必要になるであろう。

図3: 証拠の重みから引き出された行動計画

Weight of Evidence Conclusion



レポート

情報検索のための規準は、今後の検索の複製を保証するために、レポートに記録されるべきだ。除外規準は、なぜ個々の参照が更なる調査のために考慮されなかったかを説明するために、この記録に組み入れられるべきだ。

セクション2.21、2.22、2.23で下された決定は記録されて、正当化されるべきだ。

レポートは、必然的に、どうアクションのための最終的な結論と推奨が得られたかについて、説明と結び付けられ、考えられたすべてのデータの広いリストを表1-5と図2と3に組み入れるだろう。

結論

ヨーロッパ化学産業は、証拠の重みによる接近法が、先行作業リストを識別するためのプロセスに含められているように勧める。これは、決定が、「ポジティブ」を考慮する研究より少しも良くない‘疑惑の証拠’アプローチなどの部分的な評価よりも、情報の完全な評価においてなされることを保証するであろう。

先行作業リストを開発するために、証拠の重みによる接近法の包含は、科学的な精密さをプロセスに導入する。提案されたアクションは具体的で、緊急性の観点から、真に優先度付けされる。更に、ほとんど何も今のところ知られていない化学薬品のずっと大きなグループを評価するために、それはプラットフォームを提供する。手続がすぐ既存のデータに適用されるので、多くのデータギャップがある、結果を出している分析から迅速にクリアになるであろう。更に、内分泌かく乱物質のよりよい評価と管理を援助するであろう研究を実施するニーズがある。この研究の重要な要素は試験法のエリアにあり、委員会は、OECDテストイニシアチブへの多くの必要な支援を提供することを最も強く勧めている。

試験プロトコルの改良と拡張が内分泌毒性についてのよりよい理解を築くであろう間、内分泌かく乱物質が、いくつかの新しい知識を含む小さな調整又は試験プロトコルの拡張だけを持つ、現在のリスク評価/管理の枠組みの中で適正に対処されることが予期されている。

参考文献

1. Klimisch, H-J., Andreae, M. and Tillmann, U. – A Systematic Approach For Evaluating The Quality of Experimental Toxicological and Ecotoxicological Data. Regulatory Toxicology and Pharmacology **25**, 1-5 (1997)
2. Rosner, G. – Validierung von SDS: Standardbegründungen – Fraunhofer-Institut Für Toxikologie und Aerosolforschung. (1994)
3. European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife (Weybridge, UK, 1996). European Union Report EUR 17549
4. Office of Science and Technology Policy. Chemical Carcinogens; A Review of the Science and its Associated Principles. (1985)

付録1

データベース検索サイト

Aquatic Sci&Fish Abs (c) 1998 FAO (for ASFA Mv Brd)
 BioBusiness(R) (c) 1998 BIOSIS
 BIOSIS PREVIEWS(R) (c) 1998 BIOSIS
 CA SEARCH(R) (c) 1998 American Chemical Society
 CAB Abstracts (c) 1998 CAB International
 ChemEng & Biotec Abs (c)1998 RoySocChm,DECKEMA,FizChemie
 CHEMTOX (R) Online (c) 1998 MDL Info Systems
 CHRIS Chemical Hazards response system
 Current Contents Search(R) (c) 1998 Inst for Sci Info
 Ei Compendex(R) (c) 1998 Engineering Info. Inc.
 EMBASE (c) 1998 Elsevier Science B.V.
 Energy SciTec (c) 1998 Contains copyrighted material
 Env.Bib. (c) 1998 Internl Academy at Santa Barbara
 Enviroline(R) (c) 1998 Congressional Information Service
 Hazardous Substances Database
 Life Sciences Collection (c) 1998 Cambridge Sci Abs
 Medline(R) (c) format only 1998 The Dialog Corporation
 NTIS Comp&distr 1998 NTIS, Intl Copyright All Righ
 Oceanic Abst. (c) 1998 Cambridge Scientific Abstracts
 OHMTADS Oil and Hazardous materials/technical assistance data system
 Pascal (c) 1998 INIST/CNRS
 Pollution Abs (c) 1998 Cambridge Scientific Abstracts
 RTECS Comp & dist by NIOSH, Intl Copyright All Rights Res
 SciSearch(R) Cited Ref Sci (c) 1998 Inst for Sci Info
 The Merck Index Online(SM) (c) 1998,1998 Merck & Co. Inc.
 Toxline(R) (c) format only 1998 The Dialog Corporation
 Water Resour.Abs. (c) 1998 Cambridge Scientific Abs.
 WATERNET(TM) (c) 1998 American Water Works Association
 Zoological Record Online(R) (c) 1998 BIOSIS

Endocrine Mechanism	Adverse Effect	Existing Regulations	Classification Category	Indicative Screen	RA Level Test	Existing Research To Fill Test/Screen Gaps
Oestrogenic						
	Carcinogenic (type)	Existing Chemicals				
		Pesticides				
		DSD				
		etc				
	Reduced Sperm Count/Quality					
	Hypospadias					
	Cryptorchidism					
	etc					
Anti-oestrogenic						
Androgenic						
Anti- androgenic						
Thyroidal						
Anti-thyroidal						
Etc						

付録2

信頼できるin vitro実験研究への一般的要求事項

1. 基本的な実験計画

- 理想的に、濃度の1つが反応を全然起こさないと見られる状態で、最小限3つ(通常5つ)の試験濃度があるべきだ。
- 試験濃度の間の間隔は1ケタの大きさより少ないようにするべきだ。
- 適当なコントロールは、キャリア溶媒が試験に用いられるならばキャリアコントロールを含めて、試験濃度と同様に含まれるべきだ。
- すべてのコントロールと処理は複製されるべきだ。
- トップ服用はわずかな細胞毒性を示すべきだ。

2. 試験法の他の面

- 試験素材の原材料、及び／又は純度は指定されるべきだ。

3. 結果の分析

- ポジティブな反応のために、結果は正常に濃度依存の反応を示すべきだ。
- 結果は、信頼限界又は統計的有意性と、示されたデータの立証を許すために分析されるべきだ。

すべての上記の基準を満たしている試験は高信頼性を持っている。太字のポイントと基準を満たしている試験は中間の信頼性を持っている。他のすべての試験は低い信頼性に値しているか、使用できない。

信頼できるin vivo実験研究への一般的要求事項

1. 基本的な実験計画

- トップ服用は哺乳動物試験のための最大の許容されている服用レベルであるべきだ。
- 哺乳動物研究のためには最小限2つ(通常3つ)の試験濃度と、非哺乳動物研究においては一般に3から5つの濃度があるべきで、理想的には、作用を全然起こさないと見られる濃度の1つが含まれるべきだ。
- 適当なコントロールは、キャリア溶媒が試験に用いられるならばキャリアコントロールを含めて、試験濃度と同様に含まれるべきだ。
- すべてのコントロールと処理は、できれば、試験(この要件の必要は、実験の複雑さに基づいて、評価され、専門家の判断によっては、外来であると考えられるかもしれない)を選別するために複製されるべきだ。
- 指標として使われている全生物体(動物)とすべての器官への毒性は評価されるべきだ。

2. 測定された濃度

- 暴露濃度は分析されるべきだ。

3. 試験濃度(非哺乳動物研究のみ)の維持

- 試験濃度は適度に一定のレベルに維持されているべきだ。
- 試験物質の規則的な補給により、流水研究は通常、静態検査より試験濃度を維持し易い。

4. 試験法の他の面

- 飼養密度又は動物の数は適切であるべきだ。
- 試験は適切な給餌制度(必要な場合)を含むべきだ。
- ストレスの外来原因例えば騒音、照明、振動は最小化されるべきだ。
- 供試生物は定義されて、適切な時期、性、及び健康であるべきだ。
- 試験装置の中の互換性がない素材の使用は避けられるべきだ。(濃度が分析され、管理死亡率が、報告されれば、これは余り重要でなくなる)。
- 試験素材の純度と出所は指定されるべきだ。

5. 周辺のデータ

- 周辺の試験データは測定されて、報告された(すなわち)水の研究、pH、溶存酸素、温度、及びできれば硬度、水のタイプなど、であるべきだ。
- 潜在的に関連した汚染物(例えば PCB)のための飲食物の分析。

6. 結果の分析

- 結果は同時的な、及び通時的な両方の制御データの文脈の中で分析されるべきだ。

- 理想的には、結果は濃度依存の作用を示すべきであり、結果は信頼限界又は統計的有意性のために分析されるべきだ。

すべての上記の基準を満たしている試験は高信頼性を持っている。太字のポイントと基準を満たしている試験は中間の信頼性を持っている。他のすべての試験は低い信頼性に値しているか、使用できない。

付属書10

ワークショップにおける各国/地域及び利害関係団体の代表者によって
なされたプレゼンテーション



Status of the US Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)

Steven Bradbury
US Environmental Protection Agency
Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances

1

EPA's Statutory Authority

Federal Food, Drug, & Cosmetic Act (FFDCA)

- Requires EPA to:
 - Develop a screening program using validated assays to identify chemicals that may have estrogenic effects in humans.
 - Test all pesticide chemicals (both active & inert ingredients).
- Authorizes EPA to obtain testing on:
 - Other endocrine effects, as designated by EPA Administrator (e.g., androgen & thyroid; endocrine effects in species other than humans).
 - Other chemicals (non-pesticides) that:
 - May have "an effect cumulative to that of a pesticide," if a "substantial human population may be exposed" to the chemical.

Safe Drinking Water Act (SDWA) Amendments

- Allow EPA to require testing of chemical substances that may be found in sources of drinking water if a substantial human population may be exposed to the substance.

2

US EPA EDSP

- Established the following recommendations:
 - The Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) of 1996-1998.
- Estrogen, androgen, and thyroid.
- Human health, fish, and wildlife.
- Pesticides, commercial chemicals, and environmental contaminants.

3

US EPA EDSP

Based on EDSTAC Recommendation (1998):

- Sorting and Prioritizing Chemicals.
- Tier 1 Screening.
 - Data to determine if a chemical has the potential to interact with the estrogen, androgen or thyroid systems.
- Tier 2 Testing.
 - Data to determine if endocrine-mediated adverse effects occur and quantify dose-response.
- Hazard and Risk Assessment.

OECD Endocrine Testing & Assessment Conceptual Framework

- **Level 1** - Sorting and prioritizing with existing data and/or (Q)SARs.
- **Level 2** - *In vitro* assays to provide mechanistic data.
- **Level 3** - *In vivo* assays providing data about single endocrine mechanisms and effects.
- **Level 4** - *In vivo* assays providing data about multiple endocrine mechanisms and effects.
- **Level 5** - *In vivo* assays providing data about endocrine and other effects.

(OECD, 2004)

US EPA EDSP Implementation



- **Assay Validation**
 - Development and validation of test assays.
 - Tier 1 screening and Tier 2 testing.
- **Procedures**
 - Developing procedures to require and evaluate data.
- **Priority Setting**
 - Selecting chemicals to be screened.

6

US EPA EDSP Implementation



- **Assay Validation**
 - Development and validation of test assays.
 - Tier 1 screening and Tier 2 testing.

7

EDSP Assay Validation

Two-Tiered Approach

- **Tier 1:**
 - *In vitro* & *in vivo* screens.
 - Detect potential to interact with endocrine system.
 - OECD workshop case studies illustrate responses of assays to specific chemicals.
 - Methoxychlor/metabolites and Bisphenol A agonists in ER assays.
 - Vindoxolol/metabolites antagonist in AR assays.
 - Kelpconazole & Perchlorate positive in steroidogenesis assays.
 - Perchlorate positive in thyroid sensitive assays.
- **Tier 2:**
 - Tier 2 data called in only after review of Tier 1 data.
 - Multi-generation studies covering broad range of taxa.
 - Provide data for hazard assessment.

8

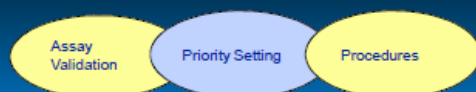
US EPA EDSP Tier 1 Screening Battery

In vitro
Estrogen receptor (ER) binding – rat uterus
Estrogen receptor α (hER α) transcriptional activation - Human cell line (HeLa-9903) [OECD Test Guideline 455]
Androgen receptor (AR) binding – rat prostate
Steroidogenesis – Human cell line (H295R) [US lead, validated in OECD program]
Aromatase – Human recombinant
In vivo
Uterotrophic (rat) [OECD TG 440]
Hershberger (rat) [OECD TG 441]
Pubertal female (rat)
Pubertal male (rat)
Amphibian metamorphosis (frog) [OECD TG 231]
Fish short-term reproduction [OECD TG 229]

US EPA EDSP Tier 2 Tests

Mammalian two-generation rat (may be replaced by Extended F1-Generation)
Avian two-generation (Japanese quail) [US lead, OECD validation program]
Amphibian growth/reproduction (S. tropicalis) [US/Japan lead, OECD validation program]
Fish multigeneration (medaka) [US/Japan lead, OECD validation program]
Mysid multigeneration [US lead, OECD validation program]

US EPA EDSP Implementation



- **Priority Setting.**
 - Selecting chemicals to be screened.

11

Sorting & Prioritizing Chemicals

EDSTAC Recommended Four Categories:

1. Chemicals unlikely to interact with hormone systems (e.g., certain polymers, strong mineral acids/bases).
2. Chemicals without sufficient existing data to determine if Tier 2 testing required.
3. Chemicals with sufficient existing data to determine if Tier 2 testing required.
4. Chemicals with sufficient data to support a hazard assessment.

Sorting Chemicals for Screening

Category 3 & 4 Chemicals:

- EDSTAC and SAB/SAP indicated some chemicals, potentially pesticide active ingredients with existing chronic reproductive/developmental assays in rodents, fish and birds, may fall in these categories.
- OECD workshop risk assessment case studies integrate a range of test data related to adverse effects mediated through interactions with endocrine systems.

Standard Toxicity Guideline Studies

- Provides results across different study designs for:
 - Different species (fish, birds, invertebrates, rats, mice, rabbits, dogs).
 - Different time course and durations of exposure (acute, short-term, chronic).
 - Different critical life stages (pre-conception, in utero, young, adults, old) over a broad range of doses.
 - Different routes of exposure (oral, dermal, inhalation).
 - Redundancy in reproductive parameters and histopathology.
- Endocrine disrupting compounds typically cause multiple effects depending on life stage & duration of exposure.

Risk Assessment

- Hazard Assessment/Characterization.
 - Lines of evidence across taxa – Coherence of observations in the broader data base.
 - Mode of action and human relevance of animal findings.
 - Toxicokinetics/metabolites/degradates.
- Dose Response Assessment/Characterization.
- Exposure Assessment/Characterization.
 - Life stage exposure – Endpoint selection to match exposure scenarios.
- Risk Characterization – Information gaps, uncertainties, consistency, etc.
- Importance of well designed studies across and careful interpretation of literature studies.
- Cumulative risk.

Case Studies for Both Human Health & Ecological Assessment

- **Atrazine** – A triazine herbicide that in rats inhibits pulsatile release of gonadotrophin releasing hormone from hypothalamus, which in turn suppresses release of luteinizing hormone from pituitary.
- **Vinclozolin** – A dicarboximide fungicide whose metabolites are androgen receptor antagonists.
- **Mancozeb** – A fungicide, with its metabolite, ethylene thiourea (ETU), alters thyroid hormones, increases thyroid weight, and causes microscopic thyroid lesions and thyroid tumors in rats.

Prioritizing Chemicals for Screening

- Category 2 Chemicals (those without sufficient existing data):
 - Considered by the EDSTAC to have the largest number of chemicals and the greatest need for prioritization.
 - EDSTAC, EPA's Science Advisory Board, and EPA's Scientific Advisory Panel strongly recommended a prioritization scheme that included an effects and exposure component.

Prioritizing Chemicals for Endocrine Disruptor Tier 1 Screening: Effects

- EDSTAC recommended the use of measured or predicted receptor binding and/or transcriptional activation data derived through in vitro assays/High Throughput Screening (HTPS) and (Q)SARs, respectively.
- SAB/SAP in 1999 concurred, however, concluded that HTPS and (Q)SARs were not sufficiently developed at that time – encouraged continued research.
- As part of US EPA's computational toxicology and endocrine disruptor research programs, the Office of Research and Development (ORD), in collaboration with OPP and OSCP, has been developing in vitro assays, HTPS applications, and (Q)SARs.

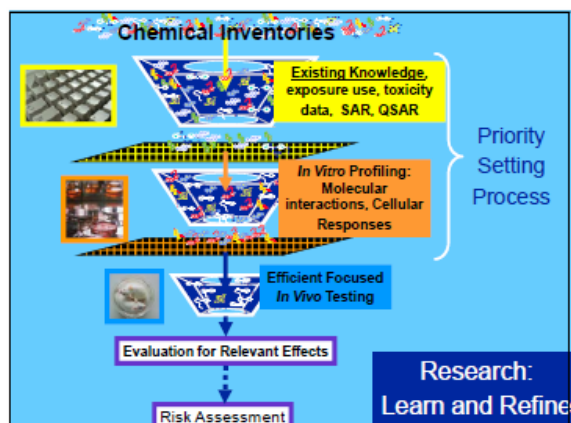
Priority Setting: First Chemicals to be Screened

- Selection based on potential human exposure.
 - Pesticide active ingredients: presence in food and water, residential use, and occupational contact.
 - High Production Volume inert ingredients detected in human and environmental monitoring.
- Selected chemicals found in multiple exposure pathways.
- Issued the final list of chemicals for initial screening 15 April 2009.
 - 58 Pesticide active ingredients.
 - 9 High Production Volume / pesticide inert ingredients.
- **NOT** a list of "known" or "likely" endocrine disruptors.

19

Future Prioritization for EDSP Tier 1 Screening

- **Pesticide active ingredients** – current plan is to use EPA's schedule for re-evaluating registered active ingredients in the Registration Review program, consistent with EDSTAC and SAB/SAP recommendations (http://www.epa.gov/oppsrdd1/registration_review/)
- **Inert ingredients and other chemicals** – develop *in vitro* and *in silico* tools that are integrated with exposure-based metrics



A (Q)SAR-Based System to Predict ER Binding Affinity

- Application for use in a prioritization scheme in the context of EDSTAC and SAB/SAP recommendations.
- Development focused on chemicals without sufficient existing data to determine if Tier 2 testing required.
- Model's applicability domain – Structures associated with inert ingredients and antimicrobial pesticides.
- External peer-review by USEPA SAP, August 2009. (www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2009/082509meeting.html)
- Development benefitted from EDTA VMG-NA and two OECD peer consultations.
 - May, 2008 Structural Alert Workshop. ([www.oils.oecd.org/olis/2008doc.nsf/linkto/env-jm-mono\(2009\)4](http://www.oils.oecd.org/olis/2008doc.nsf/linkto/env-jm-mono(2009)4))
 - February, 2009 Expert Consultation to Evaluate an Estrogen Receptor Binding Affinity Model for Hazard Identification. ([www.oils.oecd.org/olis/2009doc.nsf/linkto/env-jm-mono\(2009\)33](http://www.oils.oecd.org/olis/2009doc.nsf/linkto/env-jm-mono(2009)33))

Partnerships

- Collaboration on development and application of predictive approaches models:
 - OECD's Integrative Approaches to Testing and Assessment (OECD Workshop December 2007).
 - EPA's Pesticide Program Federal Advisory Committee Workgroup on Integrated Testing Strategies.
 - Purpose is to advise on communication and transition.

EPA Public Website on Integrative Testing and Assessment
www.epa.gov/pesticides/science/policies.htm

US EPA EDSP Implementation



- **Procedures**
 - Developing procedures to require and evaluate data

US EPA EDSP Policies and Procedures

- Publication of final notice of Tier 1 Screening Battery – September, 2009.
- Posting of final Test Method Protocols – September, 2009.
- Issuance of Test Orders for 67 chemicals – Begins Fall, 2009.

25

EDSP Tier 1 Test Orders

- Approximately 750 Test Orders will be issued to the manufacturers and importers of the 9 inert ingredients and the manufacturers of the 58 pesticide active ingredients.
- EPA anticipates issuing Test Orders over several months.
- Test Orders for chemicals will require all the assays in the Tier 1 battery.
- Responses to Test Orders due in 90 days.
- Data due 24 months from Test Order issuance.
- EPA will publically post decisions.

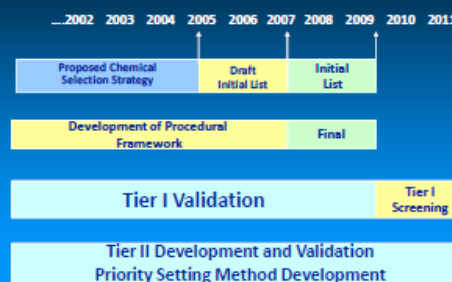
26

Possible Responses to Test Orders

- I will generate new data.
- I am citing existing data.
- I am entering into an agreement to form a consortium to provide the data.
- I am not subject to the Test Order.
- I intend to voluntarily cancel the pesticide registration.
- I intend to reformulate the product(s) to exclude this chemical from the formulation.
- I am claiming a formulators' exemption.
- I have/am in the process of discontinuing the manufacture/import of this chemical.
- I do not and will not sell my chemical for use as an inert ingredient to the pesticide market.

27

US EPA EDSP Timeline



28

Supplemental Information

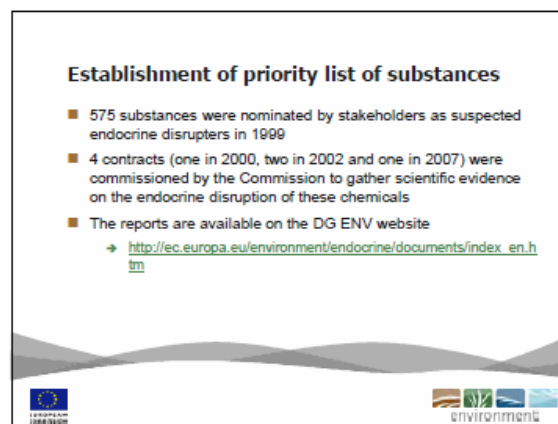
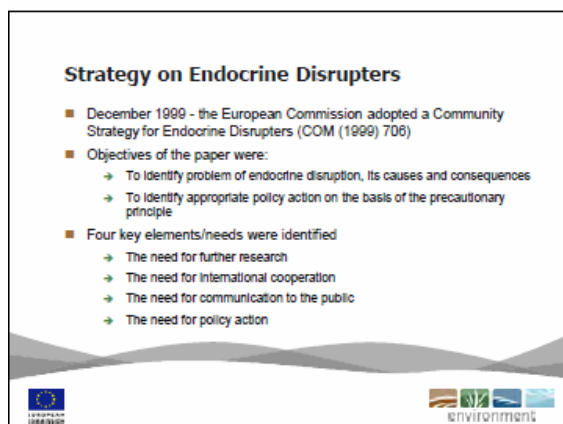
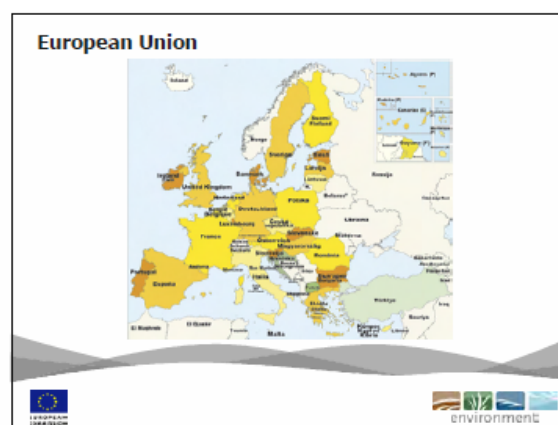
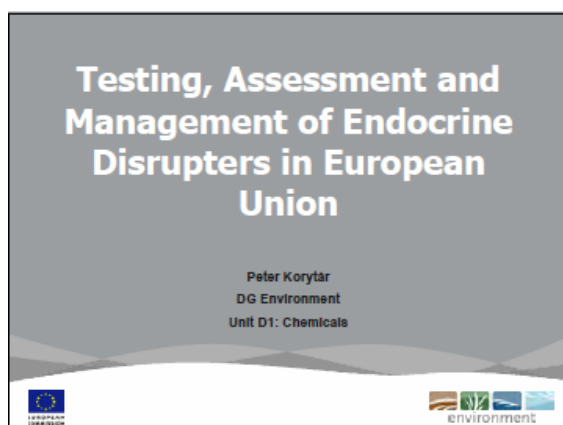
EPA Strategic Direction

Transition toward new integrative and predictive techniques, to increase efficiency and effectiveness of testing and assessment.

Animal Testing:
Reduce, Refine,
Replace

- 2005 EPA White Paper on Pesticides and Industrial Chemicals.
- 2007 NRC Report on Testing in the 21st Century.
- 2009 EPA's Strategic Plan for Evaluating the Toxicity of Chemicals.

Continue to advance computational tools to evaluate and establish priorities.



Database of substances having endocrine properties for further testing

- Substances were categorized into 3 classes:
 - 1 – At least one study published providing evidence of endocrine disrupting effects in an intact organism. Not a formal weight of evidence approach. On the basis of the precautionary approach, substances with insufficient evidence, but chemically closely related to category 1 substances, have been categorized as category 1
 - 2 – Potential for endocrine disrupting effects. In vitro data indicating potential for endocrine disruption in intact organisms. Also Includes effects in-vivo that may, or may not, be ED-mediated. May include structural analyses and metabolic considerations.
 - 3a – substances with no scientific basis for inclusion in list (ED studies available but no indications on ED effects)
 - 3b – substances with no or insufficient data gathered.




Database of substances having endocrine properties for further testing

- Database currently contain 428 substances
 - Category 1 – 194 substances
 - Category 2 – 125 substances
 - Category 3a and 3b – 109 substances




Identification and assessment of endocrine disruptors

- Development of testing methods for endocrine disruptors
 - DG JRC – Institute of Health and Consumer Protection
 - Support of the action for harmonization and validation of test methods under auspices of OECD – Working group 'National Coordinators for Test Guidelines'
 - Development of alternative non-animal testing methods for screening and testing substances for endocrine disrupting properties by JRC




Research and development

- More than 80 projects funded via the Community Framework Programme for R&D
- The support started under FP4 programme
- Continued under FP5 and FP6
- Support of research focused on effects, identification and assessment of endocrine disrupting chemicals continues under the 7th Framework Programme
- http://ec.europa.eu/research/endocrine/index_en.html




Legislative action

- REACH (1907/2006) – Regulation concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
 - Most of the provisions currently in force
 - Implementation period
- Regulation on Plant Protection Products
 - Passed the second reading in Parliament
 - Formal adoption expected in summer 2009
- Regulation on biocides
 - Commission proposal in 2009



Registration under REACH (1907/2006)

- no requirement in REACH Annexes VII to X to provide information on the endocrine activity of a substance or on a substance's reproductive or specific developmental toxicity in aquatic organisms
- However, according to Article 12, the information specified in Annexes VII-X is to be seen as a minimum requirement.



Evaluation under REACH

- Community rolling action plan for evaluation will be established
- Prioritization shall be on a risk-based approach (hazard, exposure, tonnage, ...)
- If competent authority considers that further information is required, including information not required in Annexes VII to X, it can require from the registrants to submit further information
 - Information on endocrine disrupters can be included



Authorisation under REACH

- Substances to be included in Annex XIV (Article 57)
 - CMR cat. 1 or 2
 - PBT (criteria in Annex XIII)
 - vPvB (criteria in Annex XIII)
 - Substances – such as those having endocrine disrupting properties or those having persistent, bioaccumulative and toxic properties or very persistent and very bioaccumulative properties, which do not fulfil the criteria of points (d) or (e) – for which there is scientific evidence of probable serious effects to human health or the environment which give rise to an equivalent level of concern as CMR, PBT and vPvB and which are identified on a case-by-case basis in accordance with the procedure set out in Article 59.



Authorisation under REACH

- Identification of substance as Substance of Very High Concern (SVHC)
- Listing of substance in Annex XIV
- Application for authorisation
- Granting the authorisation
 - If risks are adequately controlled (not applicable for PBT, vPvB and non-threshold CMs)
 - Socio-economic benefits outweigh the risks and there are no alternatives available



Authorisation under REACH (Review)

- By 1 June 2013 the Commission shall carry out a review to assess whether or not, taking into account latest developments in scientific knowledge, to extend the scope of Article 60 (3) (socio-economic route) to substances identified under Article 57 (f) as having endocrine disrupting properties. On the basis of that review the Commission may, if appropriate, present legislative proposals



Restriction under REACH

- Restriction on any condition for or prohibition of the manufacture, use or placing on the market
- May be imposed when
 - an unacceptable risk to human health or the environment is not adequately controlled
 - this risk needs to be addressed on a Community-wide basis



Restriction vs. Authorisation

- Authorisation: industry is not allowed to place on the market or use a substance included in Annex XIV unless industry has an authorisation granted by the Commission
- Restriction: industry has to comply with the conditions of the restriction in Annex XVII for the substance, no specific dossier submitted



REACH Guidance

- Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment
- Chapter 7.b: Endpoint specific guidance
- Appendix 7.8-5 Assessment of available information on endocrine and other related effects (ca 20 pp)
 - Appended to main guidance on aquatic toxicity testing
 - Evaluation of information
 - Not part of standard requirements ↔ available info



REACH Guidance – Content

- Non-testing
- In vitro
- In vivo: vertebrates, invertebrates
- Use of the data in relation to Article 57.f
- Integrated assessment of potential endocrine activity
 1. Preliminary indication of potential endocrine activity in aquatic organism
 2. Indication of specific mode of action in intact aquatic organisms
 3. Characterisation of long-term adverse effects



REACH Guidance – Integrated Assessment

1) Preliminary indication of potential endocrine activity in aquatic organisms		
Estrogen/androgen axis:	Thyroid:	Invertebrate systems:
• molecular structure	• molecular structure	• molecular structure
• mammalian toxicity	• mammalian toxicity	
• in vitro screening		
→ determine concern of potential endocrine mode of action of the substance using WoE of all available information, including environmental fate and exposure		
→ among concerns may prompt a proposal by the Competent authority to include the substance in the Community rolling action plan in order to perform a substance evaluation		
2) Indication of specific endocrine modes of action in intact aquatic organisms		
Estrogen/androgen axis:	Thyroid:	Invertebrate systems:
• biochemical markers	• thyroid histopathology	• one individual cases
• morphological changes (e.g. gonad histopathology)		
Study type:	Study type:	
Fish Screening Assay	Amphibian Metamorphosis Assay	
Fish Sexual Develop. Test		
Fish Reproduction Test		
Fish Full Life-Cycle Test		



REACH Guidance – Integrated Assessment

→ determine concern of potential endocrine mode of action in intact aquatic organisms using WoE of all available information, including environmental fate and exposure		
→ among concerns may prompt a proposal by the Competent authority to include the substance in the Community rolling action plan in order to perform a substance evaluation		
3) Characterisation of long-term adverse effects ⁸		
Estrogen/androgen axis:	Thyroid:	Invertebrate systems:
• fish (sexual) development	• amphibian development	• development
• fish reproduction		• reproduction
Study type:	Study type:	Study type:
Fish Sexual Develop. Test	Amphibian Metamorphosis Assay	Invertebrate Reproduction or Life-Cycle Tests
Fish Reproduction Test		
Fish Full Life-Cycle Test		
→ consider use of chronic NOEC for PBT assessment and Chemical Safety Assessment		
→ consider classification and labelling according to safety net categories (R52, R53)		
→ causal link of adverse effect with an endocrine mode of action may prompt consideration for Annex XIV by Cd		



Regulation on Plant Protection Products

■ Provisions in relation to human health (Annex II, point 3.6.5.):

→ An active substance, safener or synergist **shall only be approved** if, on the basis of the assessment of Community or internationally agreed test guidelines or other available data and information, including a review of the scientific literature, reviewed by the Authority, **it is not considered to have endocrine disrupting properties that may cause adverse effect in humans**, unless the exposure of humans to that active substance, safener or synergist in a plant protection product, under realistic proposed conditions of use, is negligible, i.e. the product is used in closed systems or in other conditions excluding contact with humans and where residues of the active substance, safener or synergist concerned on food and feed do not exceed the default value set in accordance with point (b) of Article 18(1) of Regulation (EC) No 396/2005.




Regulation on Plant Protection Products

■ Provisions in relation to ecotoxicology (Annex II, point 3.8.2.):

→ An active substance, safener or synergist **shall only be approved** if, on the basis of the assessment of Community or internationally agreed test guidelines or other available data and information, it is not considered to **have endocrine disrupting properties that may cause adverse effect on non-target organism** unless the exposure of non-target organism to that active substance in a plant protection product under realistic proposed conditions of use is negligible.




Regulation on Plant Protection Products

■ Requirements on the Commission

→ Within four year from the entry into force of this Regulation, the Commission shall present to the Committee referred to in Article 79 (1) a draft of the measures concerning specific scientific criteria for the determination of endocrine disrupting properties to be adopted in accordance with the regulatory procedure with scrutiny referred to in Article 79 (4)




Next steps

■ Development of criteria and assessment methodology for identification of endocrine disruptors

→ Review of the scientific state of the art of the assessment of endocrine disruptors

→ The results will be communicated to EDTA AG

■ Further development of "Endocrine-Active Compounds Database and Web Portal" to become living database

■ Continuation in development of alternative testing methods (ECVAM)

■ Continue to support OECD work on test methods development






Testing, Assessment and Management of Endocrine Disruptors in Denmark

Pia Juul Nielsen
Chemicals Division
Danish EPA

OECD Workshop 22 September 2009



EUROPEAN COMMISSION
DIRECTORATE-GENERAL FOR ENVIRONMENT

TESTING, incl. development of assessment tools and research

- Cause-effect relationship
- Increases knowledge about specific substances or specific problems
- Development of assessment tools
 - investigation of tools for assessment of combination effects
 - development of (Q)SAR models
 - development, validation and standardisation of OECD TG's & drafting of DRP's and GD's



EUROPEAN COMMISSION
DIRECTORATE-GENERAL FOR ENVIRONMENT

DK contribution to OECD TGP

- Fish Sexual Development Test (FSDT)
- Reproduction of springtails (TG232)
- GD on reproductive toxicity (co-operation with U.S.)
- Uterothrophic assay (TG440)
- Hershberger assay (TG441)
- Fish short term reproduction assay (TG230)
- Fish screening assay (TG229)
- In vitro steroid synthesis assay (H295R)
- Extended one-generation reproduction toxicity
- Revision of 2-generation study (TG416)
- Developmental neurotoxicity (TG426)
- Repeated dose 28-day study (TG 407)

Research/development

- In vivo thyroid assay
- In vitro screen for effects on the thyroid receptor
- Method to include metabolism in in vitro ED assays with cell lines



EUROPEAN COMMISSION
DIRECTORATE-GENERAL FOR ENVIRONMENT

Co-operation

- ED network
 - fruitful integration of research and test method development*
- important new findings
- new regulatory interventions
- Centre for Endocrine Disruptors
 - applied research directed towards the preventive work, including regulation*



EUROPEAN COMMISSION
DIRECTORATE-GENERAL FOR ENVIRONMENT

Assessment	
<i>General approach in relation to testing, assessment and management of substances with especially concerning hazardous properties</i> Discriminate between - Confirmed/regarded as - Suspected for - Potential for 2 categories for EDC's - ED <i>in vivo</i> (confirmed) - Suspected ED (<i>in vivo</i>) - Potential ED (<i>in vitro/in silico</i>)	

Assessment and decision making framework on EDC's	
Nordic report as input to OECD EDTA - EDC <i>in vivo</i> - If risk $\Rightarrow$ risk reduction (restriction of production/use or authorisation) - Suspected EDC <i>in vivo</i> - preliminary risk assessment - additional assessment factor - If risk $\Rightarrow$ soft regulatory intervention and/or definitive testing, evidence required from industry > Incentives to industry to provide more confirmatory evidence > while waiting $\Rightarrow$ voluntary interventions / advice to the public	

Assessment and decision making framework on EDC's	
- Potential EDC - <i>in vitro/in silico</i> - prioritisation for further investigations - supporting evidence and WoE expert judgements <i>Other types of information (exposure, potential for uptake & metabolism etc. are used + other considerations)</i>	

Management	
"Strict" - level of evidence high - severity of the effect/concern large $\Rightarrow$ strong regulation at the EU level preferably (restrictions or authorisation, e.g. phthalates in toys or phthalates in general) "Soft" - Consideration of the level of evidence and severity and nature of hazard and risk - suspicion substantiated - severity of the effect/concern large $\Rightarrow$ regulatory intervention at the national level - make incentives for generation of confirmatory evidence	

Soft regulatory interventions



General principles

- Avoid unnecessary use of / minimize exposure to the chemical
- Promote generation of definitive evidence

How to make this operational

- Communication / advice to the public
 - information campaigns www.bskykem.de
- Incentives for industry
 - development of alternative substances
 - promote voluntary risk reduction agreements
- Proposal for / promotion of regulatory action at the EU level
 - generation of definitive data
 - regulation based on the precautionary principle

REPORT IN COOPERATION WITH THE ENVIRONMENTAL AGENCIES

The end



■ Thanks for your attention!

REPORT IN COOPERATION WITH THE ENVIRONMENTAL AGENCIES

1

Screening and Testing Scheme for Endocrine Disrupting Chemicals (MHLW) updated for OECD EDTA Workshop, September 22-24, 2009 @ Copenhagen

Jun Kanno, MD, PhD,
Division of Cellular and Molecular Toxicology,
Biological Safety Research Center,
National Institute of Health Sciences, Tokyo.

Note: This presentation is partly endorsed by the MHLW Endocrine Disruptor Committee and partly based on personal opinion of the presenter who is a member of the Committee and of a member of the MHLW-funded research groups.

Do not cite, nor the OECD EDTA Workshop only, contains unpublished data

2009-09-22 OECD EDTA Workshop @ Copenhagen, JN Do not cite, for the OECD EDTA Workshop only

2

- **Hormonally Active Chemicals (HACs)**
=candidate for EDC
- **Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs)**
=HACs that induce "adverse effects"

- **Hormonal Effects**
=Receptor **Mediated** Effects
- **Endocrine Disruption**
=Receptor **Mediated** Toxicity

2009-09-22 OECD EDTA Workshop @ Copenhagen, JN Do not cite, for the OECD EDTA Workshop only

3

Receptor Mediated Toxicity

- **Examples:**
 - **TCDD**: AhR KO* mice → virtually no toxic symptom.
 - Symptoms = results of gene expression through AhR
 - Wild type mice die of their own gene products!
 - **Estrogens**: ERKO** mice → no DES effect.
No uterotrophic response.
 - Intrinsic ligand (estradiol) is present for physiological function.

Physiological responses ↔ adverse effects

2009-09-22 OECD EDTA Workshop @ Copenhagen, JN Do not cite, for the OECD EDTA Workshop only

4

Traditional Toxicity

Toxic Substance (●)

Target Sites

- Normal function
- Proteins(Enzyme)
- Membrane
- Etc.

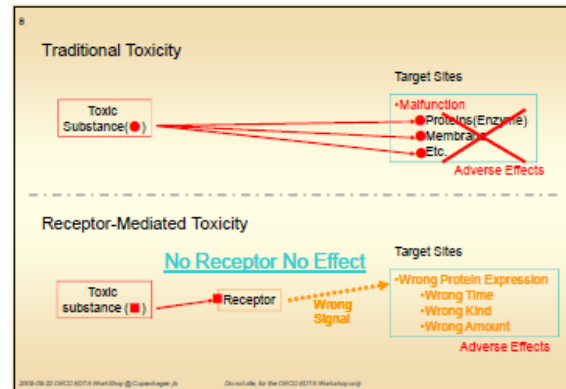
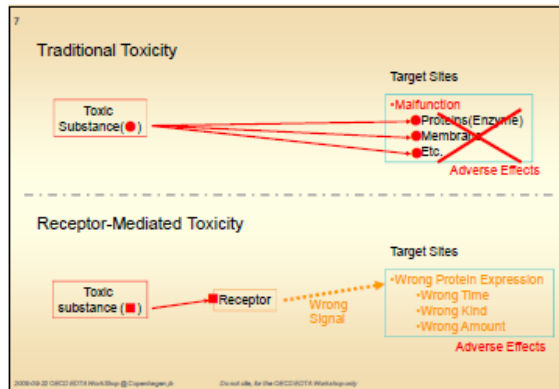
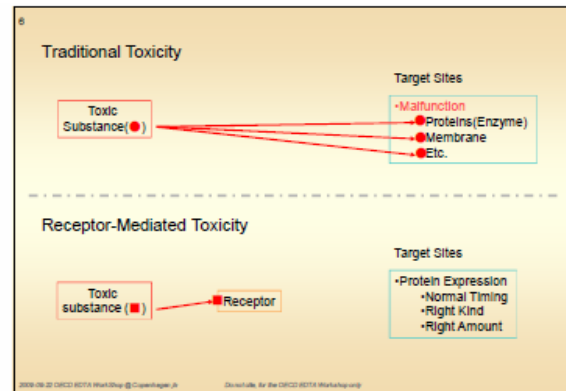
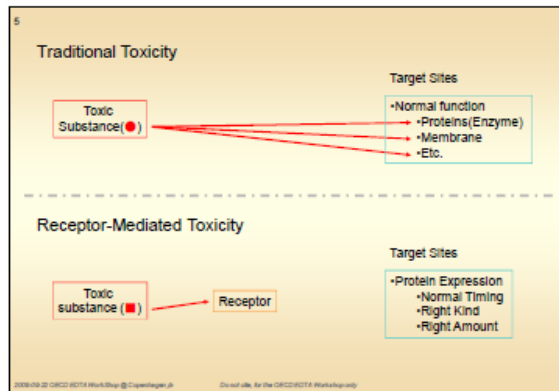
Receptor-Mediated Toxicity

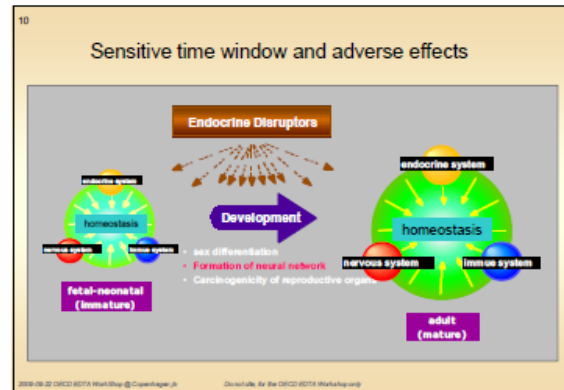
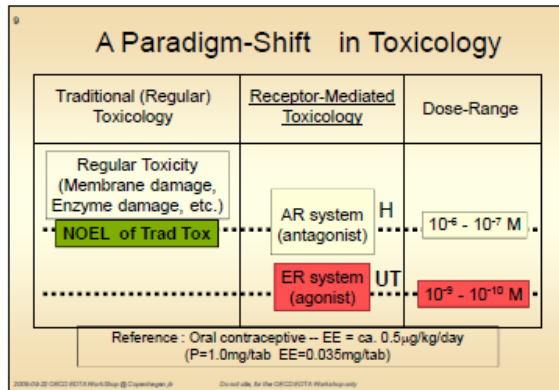
Toxic substance (■) Receptor

Target Sites

- Protein Expression
- Normal Timing
- Right Kind
- Right Amount

2009-09-22 OECD EDTA Workshop @ Copenhagen, JN Do not cite, for the OECD EDTA Workshop only





THE POSTNATAL DEVELOPMENT OF THE VISUAL CORTX AND THE INFLUENCE OF ENVIRONMENT

Nobel lecture, 8 December 1981

by
TORSTEN N. WIESEL
Harvard Medical School, Department of Neurobiology,
Boston, Massachusetts, U.S.A.

... The design of these experiments was undoubtedly influenced by the observation that children with congenital cataract still have substantial

2009-09-22 09:02:02 00719 WordShop @ Copernicus.de Download for the 09:02:02 00719 Workshop only

The Developing Synapse: Construction and Modulation of Synaptic Structures and Circuits

Susana Cohen-Cory, et al.
Science 298, 770 (2002).

Fig. 4. Activity-dependent refinement of synaptic connections. (A) Synapses made by terminals of different axons co-maintaining the same postsynaptic densities are initially maintained by low-level constitutive secretion of neurotransmitters. (B) Synchronous firing of two axon terminals (middle and right) leads to increased postsynaptic depolarization and neurotransmitter receptor activation (red arrows). (C) The unmyelinated axon terminal (left) does not experience postsynaptic spilling at the time of synaptic activation, therefore gradually reducing its retrograde neurotrophic support and ultimately resulting in the retraction of the synaptic terminal. (D) Terminals that are active receive neurotrophic support and sprout (path) to establish new synapses.

Hebbian theory: Hebb, D.O. (1949), The organization of behavior, New York: Wiley

2009-09-22 09:02:02 00719 WordShop @ Copernicus.de Download for the 09:02:02 00719 Workshop only

Intrauterine environment-genome interaction and Children's development (2):
Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams

Kentaro Tanemura, Katsuhide Igasaki, Toshiko R Matsugami, Ken-ichi Aisaki,
Seizohi Kitajima and Jun Konno

Division of Cellular & Molecular Toxicology, Biological Safety Research Center, National Institute of Public Health Sciences, 7-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received February 17, 2009)

ABSTRACT — To demonstrate induction of delayed central nervous toxicity by disturbing neonatal

injection in the developing brain, we administered a single intraperitoneal dose of domoic acid (DA; 1 mg/kg), a potent glutamate receptor agonist, to pregnant female mice at the postnatal day of 11.5, 16.5, or 17.5. The dams had recovered from acute exposure within 24 hr, followed by normal dieting, feeding and weaning. All male offspring born after weaning were apparently normal in response to handling during early maintenance, body weight measurement and to maze tests in group housing conditions. At the age of 11 weeks, our noncholinergic testing battery revealed severe impairment of learning and memory with unusual deviations of anxiety-related behavior. The developed brain apparently impaired memory and learning was associated with a variety of structural processes in the cerebellum, medulla and hippocampus. Our results suggest that the developmental window of the developing brain includes irreversible structural and functional damage to offspring with outcomes comparable to those attributed by a major battery of amygdala and/or toxic tests.

Key words: Thiamine acid, Prenatal exposure, Brain structure, Behavior

2008-09-22 OECD BETS Workshop © Copenhagen A

Do not use for the ORCDPOTA Workshop only

Openfield test



Light/Dark transition test



Elevated Plus maze test



Fear conditioning test



2009-09-22 OECD HOTA Workshop @ Copenhagen, A

Dissemin. for the CHICO RCTA Workshop and

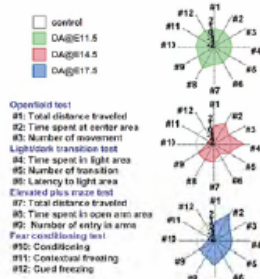


Fig. 7. Summary radar chart of the neurobehavioral battery test results. Radial axis indicates the direction (increase or decrease) of the deviation, and the p value of the endpoints (compared to the control) (+1 and -1, $0.01 < p < 0.05$; +2 and -2, $p < 0.05$). Regular dodecagon of radius 0 indicates no deviation from control.

© 2008-09 3D ORCID EDIT & HELP FILE © Copyrighted A

Do not use for the ORCID iD. Marking and

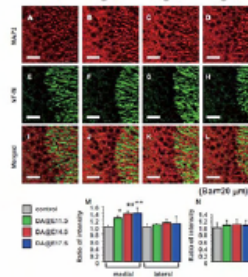


Fig. 2. Delayed effects on hippocampus induced by prenatal exposure of DES. A-D, Immunohistochemical staining against IBA1, GFAP, immunohistochemical staining against NF-M, NF-L, merged images of GFAP/IBA1 staining. A, E, I, group A (control); B, F, I, group B (DES(1)1.5); C, G, K, group C (DES(1)3.5) and D, H, J, group D (DES(1)7.5). Scale bar = 200 μ m. M, Quantitative analysis of IBA1⁺ expression, and N, NF-M expression among the groups (means $\pm$ S.E. SE). * denotes (%) and (*) indicated significant difference compared to control ($P < 0.05$) and (*) ($P < 0.01$).

2009-09-22 04:00 EDT A New Study By C. Cooper, A.

Downloaded by the OREGON STATE UNIVERSITY

17

Characteristics of signal toxicity in embryo/fetus, neonate and children

- Target:
 - Neuronal system, Immune system, Endocrine system (under neuro)
- Key
 - Systems that keep MEMORY = Stepwise build up of the system
 - Disruption during building up cannot be perfectly repaired
 - Level of disruption
 - Cell death (loss) level
 - Non-cell death level => Wiring defect / circuit defect

time

repair

2009-09-22 OECD BETTA Workshop @ Copenhagen, Jh. Downloaded for the OECD BETTA Workshop only

18

Scientific basis for risk analysis of food-related substances with particular reference to health effects on children
- Yuzo Hayashi

Comparative juvenile safety testing of new therapeutic candidates: Relevance of laboratory animal data to children
- Tim Anderson

Children's toxicology from bench to bed
- Liver injury x 4

Children's toxicology from bench to bed
- Drug-induced Renal injury x 4

Intrauterine environment-genome Interaction and Children's development x 4

Essentials for starting a pediatric clinical study x 4

Children's immunology, what can we learn from animal studies x 3

2009-09-22 OECD BETTA Workshop @ Copenhagen, Jh. Downloaded for the OECD BETTA Workshop only

19

The Scheme

- Since 1998, multiple Research Groups have been assembled for studying EDCs issue by MHLW*
- MHLW **Screening and Testing Scheme** for Endocrine Disrupting Chemicals (2002 (ver.1) and 2005 (ver. 2).
- Endorsed by the Advisory Committee on Health Effects of Endocrine Disruptors. <http://www.nihs.gov/piedol/english/edc.html>
- **Screening**: Prioritize tens of thousands of chemicals by hormonal activities.
- **Definitive Testing** for the risk assessment and following risk management (prioritized chemicals).

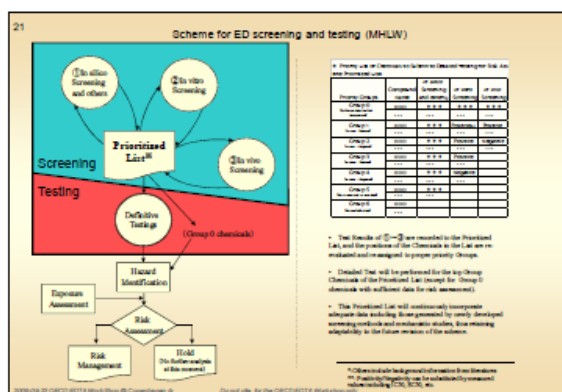
*The Japanese Ministry of Health Labour and Welfare (MHLW) Health Science Research Grants.

2009-09-22 OECD BETTA Workshop @ Copenhagen, Jh. Downloaded for the OECD BETTA Workshop only

20

The Endocrine Disruptor Page - Webpage Internet Explorer

2009-09-22 OECD BETTA Workshop @ Copenhagen, Jh. Downloaded for the OECD BETTA Workshop only

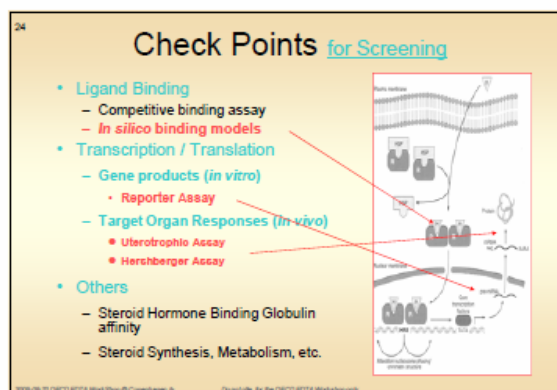
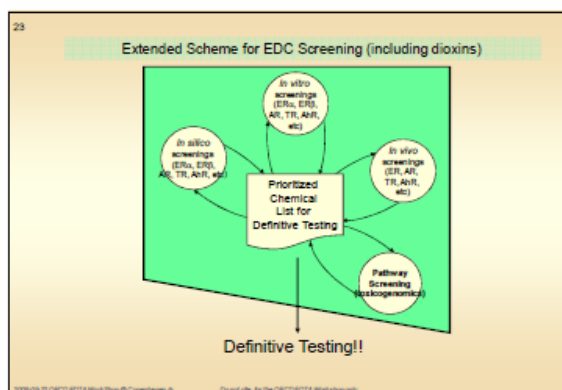


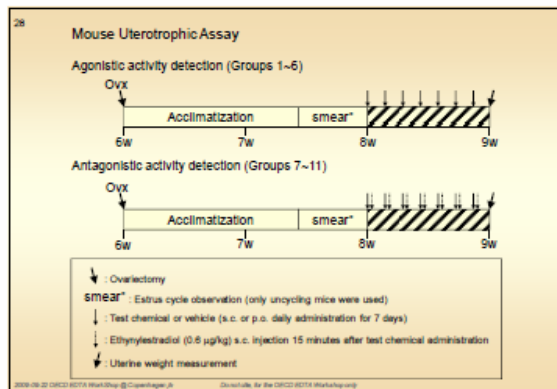
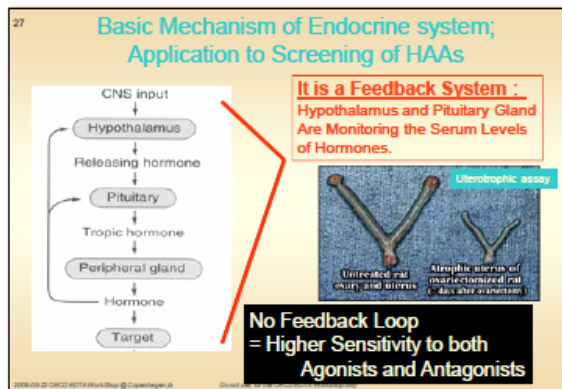
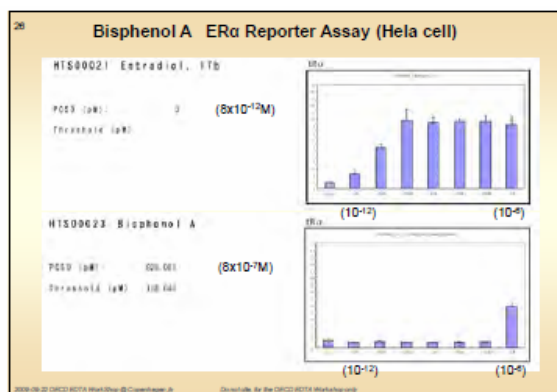
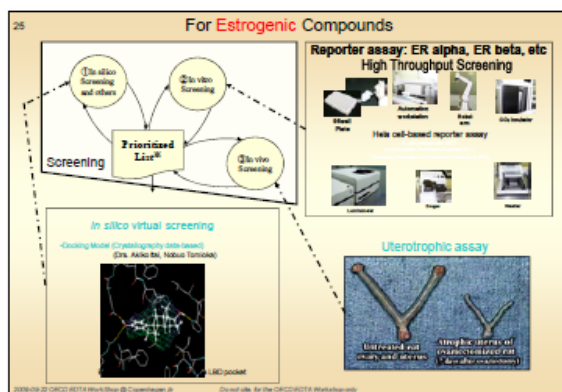
22 Developing priority list DB

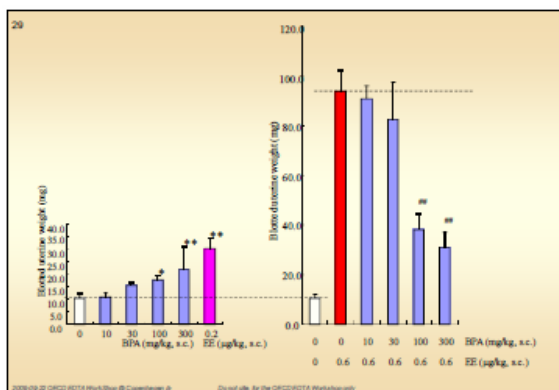
Chemical	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical A	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical B	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical C	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical D	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical E	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical F	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical G	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical H	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical I	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical J	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical K	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical L	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical M	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical N	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical O	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical P	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical Q	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical R	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical S	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical T	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical U	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical V	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical W	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical X	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical Y	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data
Chemical Z	Reporter assay data	In silico data	CPE assay	Ultrasensitive data

Rearrangement of a priority list by a combination of accumulated data

2009-09-22 OECD ED714 Workshop @ Copenhagen, JN Do not cite for the OECD ED714 Workshop only







30

Data

	In silico Virtual screening	In vitro Reporter Assay	SPR (6x6-free)	β v β0 WT & (Hersh)
Receptor	ER α	②/antagonist ① 200,000	② 600	③ 35 ③ 35
	ER β	① 200,000	② 600	③ 7 ③ 7
	AR	△*	② 60	
	TR β	△*	② 60**	
Receptor Interacts	ER α + ERE	→	② 000	
	ER β + ERE	→	② 00	
	TR β + DR4	→	△ under dev	
	AR + AR1	→	△***	
Co-Receptor	ER α + TFF-2	→	② 000	
	ER β + TFF-2	→	② 00	
	ER α + SRC-1	→	①	
	ER β + SRC-1	→	①	

* AR sequence-based simulation
** TR beta + RXR system
*** Waiting for AR protein

Only from MHLW. MET1 dose some more

2009-09-22 OECD-OTIS WorkShop @ Copenhagen, Jø

Do not cite for the OECD-OTIS Workshop only

31

Definitive testing

(under development by MHLW research groups)

2009-09-22 OECD-OTIS WorkShop @ Copenhagen, Jø

Do not cite for the OECD-OTIS Workshop only

32

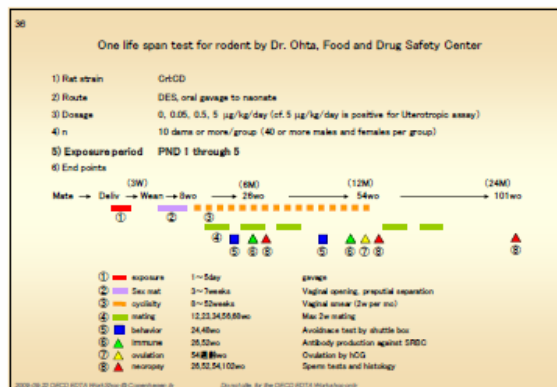
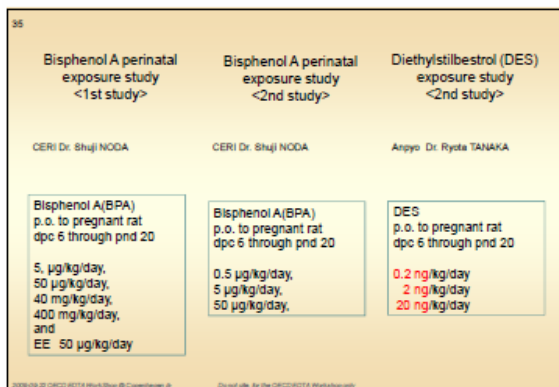
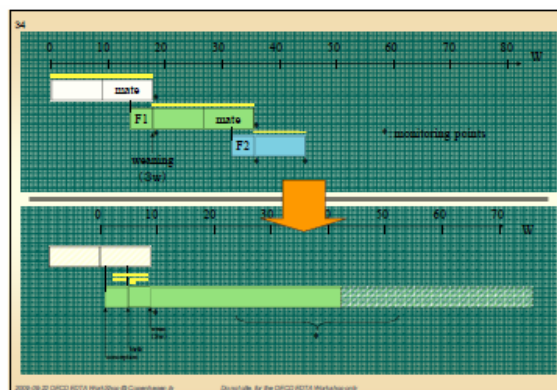
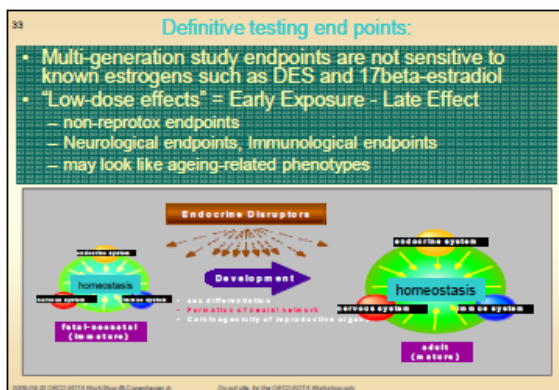
Definitive testing

(under development by MHLW research groups)

Key is to use ordinary strain of rat (or mouse)
and combination of ordinary procedures (more
precisely "as ordinary as possible").

2009-09-22 OECD-OTIS WorkShop @ Copenhagen, Jø

Do not cite for the OECD-OTIS Workshop only



37

Schedule Controlled Operant Behavior (SCOB) by Dr. M. Miyagawa (National Institute of Industrial Health)

0. Restricted Feeding (Body Weight: 300g(♂), 200g(♀))
1. Auto-shaping (7 sessions) (start at 12 weeks of age)
2. FR 2 (2 sessions)
3. FR 5 (1 session)
4. FR 10 (10 sessions)
5. Alt Mix FR 10 DRO 10 sec TO 4 sec (25 sessions)
6. Alt Mix FR 10 DRO 10 sec TO 4-20 sec (A, 25 sessions)
7. Alt Mix FR 10 DRO 10 sec TO 4-20 sec (C, 25 sessions)
8. Pharmacological challenge tests (methamphetamine)
9. Pharmacological challenge tests (haloperidol)

Pregnant rat from dpc 6 to pnd 20
0, 0.33, 3.3, 33 ppm of BPA in diet
(= 0, 0.025, 0.25, 2.5 mg/kg b.w.)



2009-08-22 ORCID iD: M. Miyagawa@cihi.ac.jp Do not cite for the ORCID iD: M. Miyagawa@cihi.ac.jp

38

Percellome Method

- Concept:
 - Obtain mRNA quantity data in a "per one cell" basis (average).
- Merits:
 - Accurate comparison among samples // organs
 - Accurate comparison between studies
 - Accurate comparison between different microarray (different version, different make)

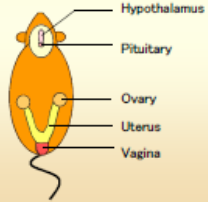
2009-08-22 ORCID iD: M. Miyagawa@cihi.ac.jp Do not cite for the ORCID iD: M. Miyagawa@cihi.ac.jp

39

Background Transcriptome Data for Endocrine Disruptor Study: Adult (cycling) Female Mouse

Current Tox Study: Averaging out the cycling females

Mouse : C57BL/6JSlc ♀ 11wo
cycle : 4 stages (vaginal smear during sampling)
Target : 5 organs →
Percellome
GeneChip Mouse Genome 430 2.0
n=5 per stage



2009-08-22 ORCID iD: M. Miyagawa@cihi.ac.jp Do not cite for the ORCID iD: M. Miyagawa@cihi.ac.jp

40

Percellome Toxicogenomics

- Will shift EDC research from Regression model-based (fingerprint-based) to Signal cascade based (mechanism of action-based)
- Can be used as EDC "Screening backup" and "Testing backup"
- In the future — may lead to modification of existing methods / protocols

2009-08-22 ORCID iD: M. Miyagawa@cihi.ac.jp Do not cite for the ORCID iD: M. Miyagawa@cihi.ac.jp

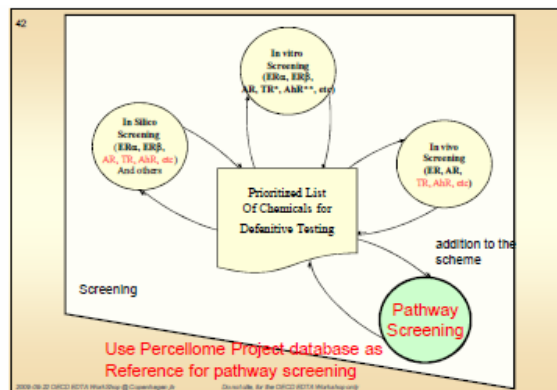
41

Receptor-Mediated Toxicity

To cover as many known cascades as possible

- Estrogenic (receptor-mediated)
- Anti-Androgenic (receptor-mediated)
- Anti-Thyroid (TPO inhibitors)
- ER agonists/antagonists
- AR antagonists
- TR antagonists
- RXR agonists
- PPAR agonists
- AhR agonists

2009-08-20 OECD BETT Workshop @ Copenhagen, Jø
Downloaded for the OECD BETT Workshop only



43

Percellome Project Toxicogenomics Back up

- In vitro samples
 - neuronal culture
 - ES culture, etc
- In vivo samples
 - brain
 - thymus
 - liver
 - sex organs
 - etc

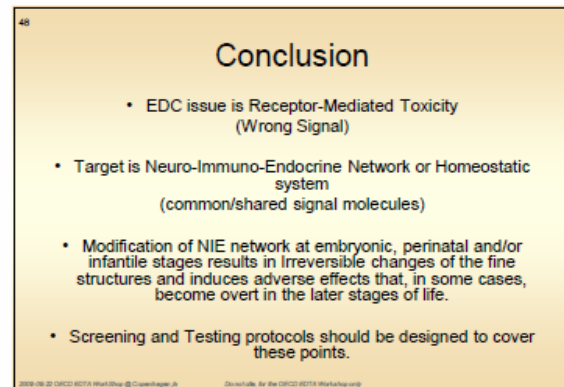
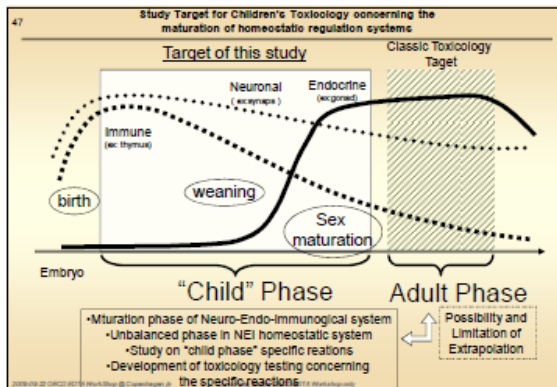
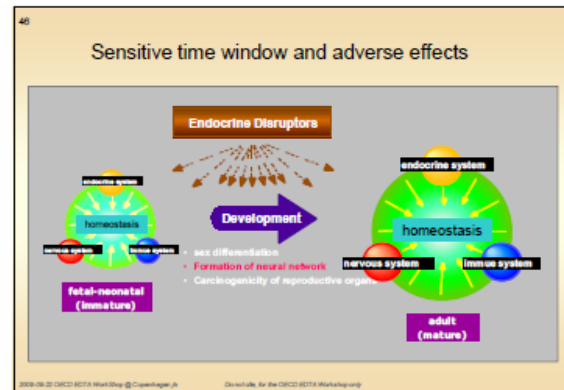
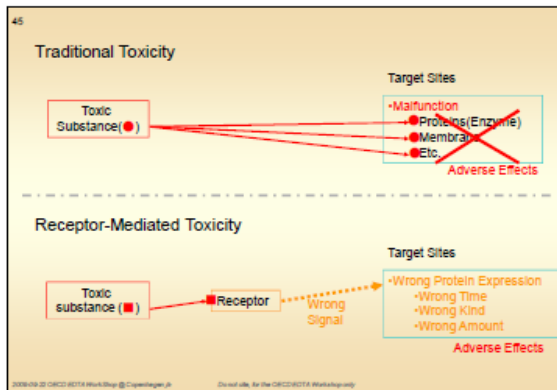
Neuro-: behavior (operant experiments)
Immuno-: autoimmune modulation
Endocrino-: male, female, development / maturation, aging-related

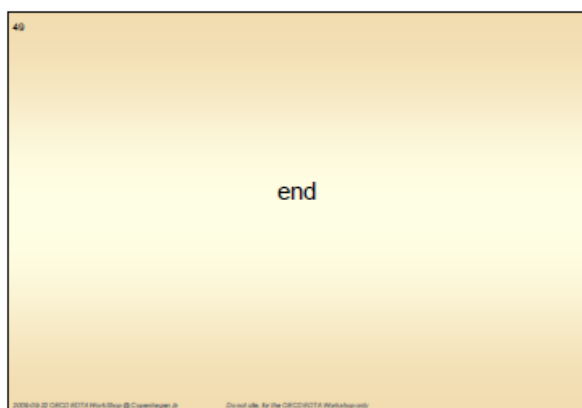
2009-08-20 OECD BETT Workshop @ Copenhagen, Jø
Downloaded for the OECD BETT Workshop only

44

Summary

2009-08-20 OECD BETT Workshop @ Copenhagen, Jø
Downloaded for the OECD BETT Workshop only



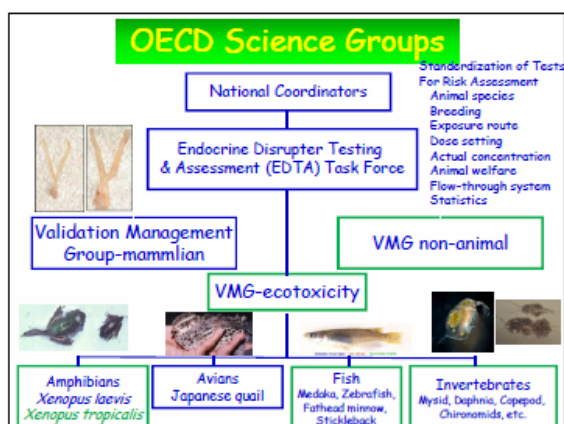


Activities on Testing and Assessment of ED in Ministry of the Environment, Japan

Taisen Iguchi
National Institutes of Natural Sciences
National Institute for Basic Biology
Okazaki Institute for Integrative Bioscience

Kunihiko Yamazaki
Environmental Health Department
Ministry of the Environment, Japan

1. SPEED '98: Assessment of potential EDCs using medaka
Monitoring of chemicals in the environment, Literature search,
In vitro receptor binding,
Vitellogenin assay, Partial Life Cycle Test, Full Life Cycle Test
2. ExTEND 2005 
3. Participation for establishment of TGs in OECD
Fish: **21-day fish screening assay**, Fish sexual development assay,
(Comparison of 2-generation test vs Full life cycle test)
Amphibian: **Metamorphosis assay**, (Partial life cycle test)
Invertebrates: **Daphnia reproduction assay (Annex)**
Non-animal: (*In vitro* screening using receptors of fish, amphibians)
4. Collaboration with USA EPA (US-Japan) and UK DEFRA (UK-Japan)
Comparison of 2-generation test vs Full life cycle test using medaka
Amphibian partial life cycle test using *Xenopus tropicalis*
Use the same chemicals for invertebrates (mysid, copepod and daphnia)
Establishment of reporter gene assay using fish and amphibian hormone
receptors
Establishing testing methods for stickleback



Framework for the risk assessment of EDCs in SPEED'98

Screening

In vivo testing animal: Japanese medaka *Oryzias latipes*

Selection of priority chemicals based on the monitoring data & published data

Estrogen (Androgen) receptor binding assay

In vivo vitellogenin assay (VTG assay)

21 days: 4 months old, males

Partial life-cycle test (PLCT): Evaluation during 1 generation

Secondary sex characteristics: Hepatic VTG-Gonad histopathology

70 days: Eggs to 2 months old, both sex

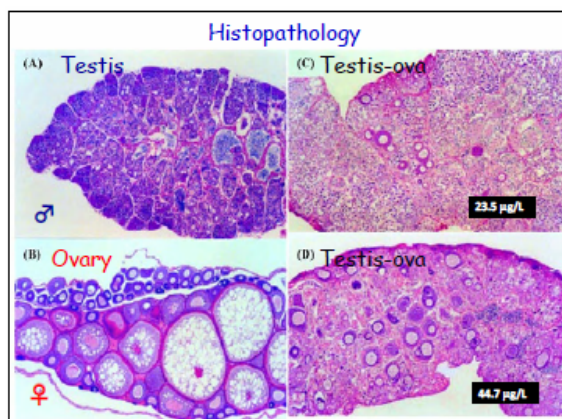
Final examination

Full life-cycle test (FLCT): Evaluation during 2 generations

Examining the same analysis as PLCT in both F0 and F1

Breeding test is examined between F0 and F1.

170 days: Eggs to 2nd generation



Medaka Test Results					
Methods	Endpoints	LOEC (µg/L)			
		NP	OP	BPA	op'-DDT
Estrogen receptor (ER) binding assay	Binding to ER	+	+	+	+
Vitellogenin (VTG) assay	VTG induction	22.5	64.1	334	1.50
Partial life-cycle test	VTG induction	11.6	11.4	470	-
	Testis-ova development	11.6	23.7	890	0.195
	VTG induction	-	9.92	>1185	0.522
Full life-cycle test	Testis-ova development	17.7	30.4	1185	0.522
	Fertility	(17.7)	82.3	>1185	0.522
	NOEC (Testis-ova in F1ct)	8.2	9.92	248	0.145

MOE's Perspectives on EDCs —ExTEND 2005—

Observation of wildlife

- Continuous observation of wildlife at the local level
- Survey and evaluation by monitoring

Evaluation of the environmental concentration and exposure level

- Environment survey and wildlife monitoring of substance
- Estimation of concentration levels of substances in the environment and so on

Promotion of basic research

- Accumulation of basic biological knowledge of wildlife
- Species level approach
- Cellular/molecular level approach (for example development of DNA micro array)
- Basic research contributing to test methods development

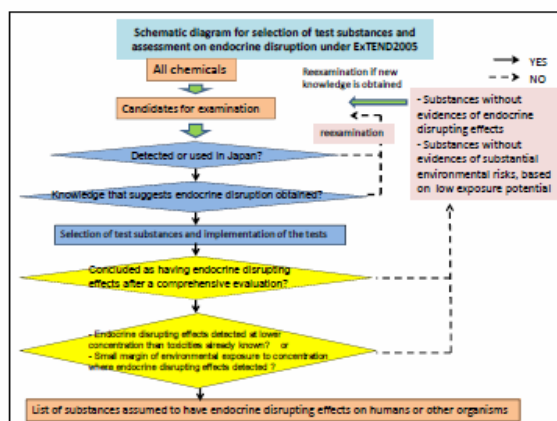
Assessment the substance which has endocrine disrupting effects

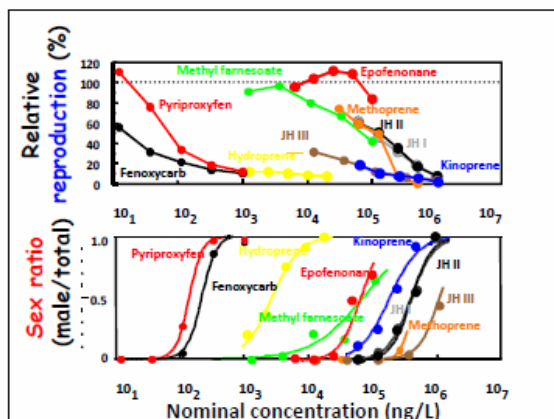
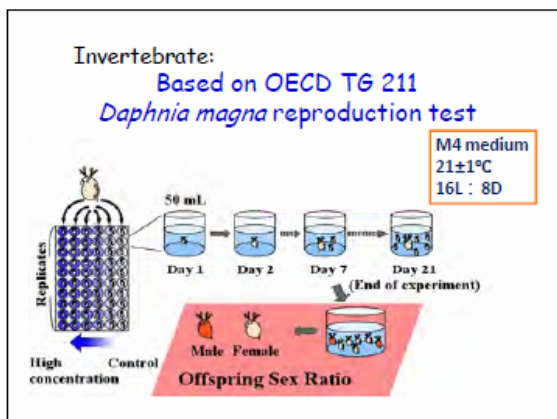
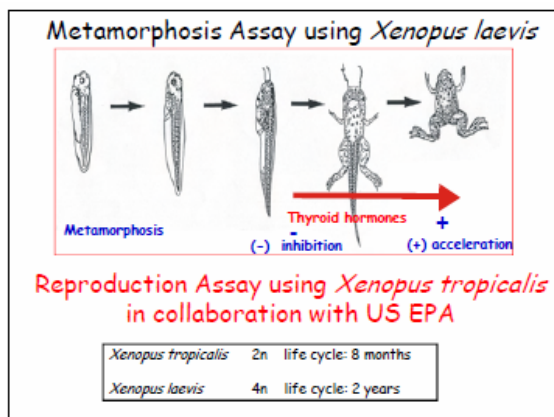
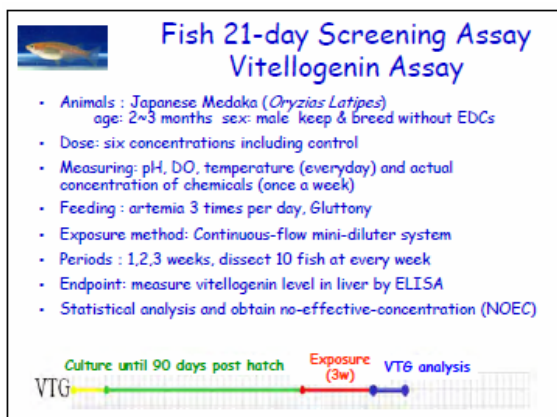
- The selection and assessment procedures of test substances concerning the endocrine disrupting effects (see next figure)
- Implementation of the test (use TGs in OECD and so on)

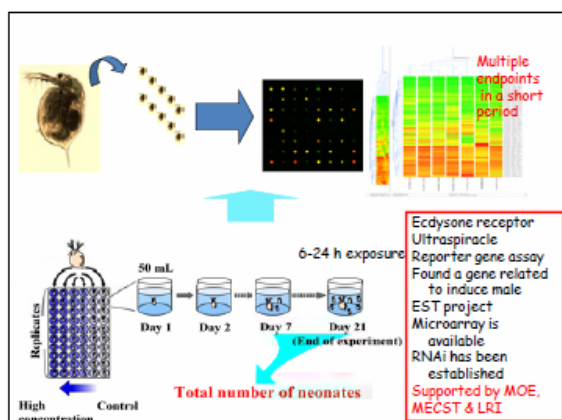
Risk assessment and management

Promotion of information sharing and risk communication

<http://www.env.go.jp/en/chemi/ed.html>



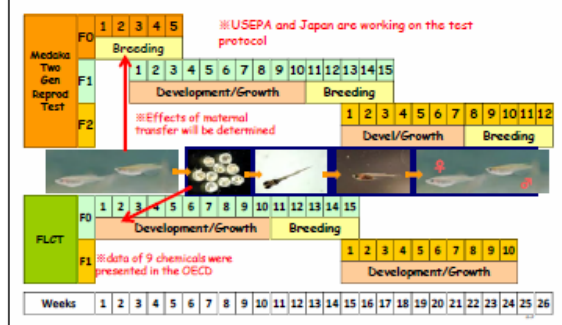




USA-Japan Bilateral Meeting

1. Fish group:
Comparison of Full life cycle test vs Two generation test using medaka
2. Amphibian group:
Establishment of partial life cycle test using *Xenopus tropicalis*
3. Invertebrate group:
Selection of test chemicals for *Daphnia magna*, mysid and copepod.

Comparison of FLCT and Two Generation Test



UK-JAPAN Research Cooperation on Endocrine Disruption -Future Aspect-

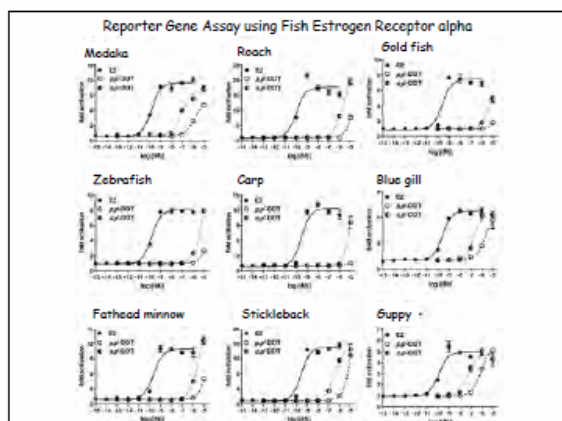


Co-operation will be pursued through several means including, but not limited to:

1. Sharing of research findings and the development of joint research projects;
2. Free exchange of technical information;
3. Joint symposia, workshops and academic discussions;
4. Exchange of experts.

Themes

1. Study on evaluation of effective reduction of estrogenic activity in wastewater
2. Study on endocrine disrupting potency evaluation method using stickleback
3. Study on ligand-specificity of fish estrogen receptors and marker genes for detection of testis-ova in medaka
4. Study on amphibian ecological impact assessment method and establishment of basic data of *Xenopus tropicalis*





The use of Test Guidelines for assessment of EDCs – views of Environment and Health NGOs

Gwynne Lyons, Director of CHEM Trust
- also on behalf of WWF-EPO and HEAL
OECD Meeting, Copenhagen, Sept 2009

www.chemtrust.org.uk



Overview of talk - 8 short topics

- Problems with legal definition of EDCs.
- Non OECD tests must be considered.
- Use sensitive species - OECD mollusc TG.
- Address complexity of endocrine and inter-linked system.
- Ensure best use of sacrificed animals.
- Make explicit - limitations of any proposed battery.
- Take account of new insights in toxicology.
- In risk assessment – consider 'mixtures'

www.chemtrust.org.uk



Issue 1: Definition of EDCs

- No need to have an OECD-wide agreed definition, better left to national or regional regulatory regimes.
- IPCS (WHO) definition is NOT acceptable for legislation ...
“... *alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects*”
- This requires proof of the mechanism of action – and the ability to show without doubt that the effects seen are a consequence of this mechanism – and also proof of adverse health effects.

www.chemtrust.org.uk



Mechanisms of action can take decades or more to elucidate.

- Still debate over how TBT causes imposex.
- Do not want a definition in legal text which would mean regulators having to prove an endocrine disrupting mechanism of action – and that the effects seen were a direct consequence of this.

www.chemtrust.org.uk



Inclusion of the term 'adverse' effects in definition is not appropriate

- In EU, REACH regulates chemicals with ED properties if evidence of **probable** serious effects.
 - pesticides with ED properties will be regulated if **may cause adverse** effects.
- Therefore, inappropriate to have a definition which would mean a chemical was only defined as an EDC if a higher level of proof was available to show it definitely caused adverse effects.



Barrier to action if have to prove an EDC causes 'adverse' effects.

- Does it mean adverse effects in humans and wildlife. If so, how to extrapolate with certainty from lab tests?
- If it means adverse effects in lab animal – could preclude regulating on basis of in-vitro tests or on the basis of oestrogenicity identified in a uterotrophic assay – as some suggest increased wt of uterus is not 'adverse'.
- If definition is too restrictive – it will effectively mean that no chemical is ever identified as an EDC.

www.chemtrust.org.uk



Issue 2: Use of non-OECD tests

- Scientific knowledge develops all the time. Non-OECD test results must be considered.
- Independent test results should undergo scientific peer review and be published. Regulators should decide how to weight such studies.
- Should not be necessary in all cases to repeat – nor to subject the method to a validation procedure - nor to evaluate the substance in an existing OECD test method.
- Industry should bear responsibility for assessing safety of their chemicals – but may be problems with bias. Need independent scientists & Government laboratories



Issue 3: Identify sensitive species for use in tests

- ImPOSEX in wild – but still no OECD agreed TG.
- OECD now has mollusc draft Detailed Review Paper.
- Prioritise partial life cycle test with *Potamopyrgus antipodarum*. Optimisation and validation of SOP now!
- Other mollusc species need to be worked on.
- Urge Governments & industry to support this work.

www.chemtrust.org.uk



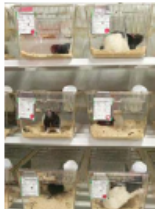
Issue 4: Address the complexity of the endocrine system

- Could current testing be done better ?
- Need to move beyond attempts to validate a handful of narrowly focused assays.
- Consider a comprehensive assay – looking at all tissues and organs. Examined by experts in that part of the endocrine system.

www.chemtrust.org.uk



Issue 5: If test on animals...



.. do not 'waste' the life of these laboratory animals, -

but ensure TGs make best use of the animals that have to be sacrificed to identify harmful chemicals.

www.chemtrust.org.uk



If Extended 1– Gen reproductive toxicity test is to be conducted...

- It should be mandatory to include endpoints for developmental neurotoxicity and immunotoxicity.
- Also - include mammary gland development.
- Why not? Cost ? Or an unexpressed wish to avoid getting information which could identify chemicals with such worrying effects?

www.chemtrust.org.uk



Issue 6: Proposed testing batteries should make explicit their limitations

- Only by making it more explicit where the known gaps are – will there be the necessary impetus to fill such gaps.
- Existing screens and tests are sufficient to say some chemicals have endocrine disrupting properties, but not sufficient to ensure a chemical is not an EDC.

www.chemtrust.org.uk

 **CHEMTrust**
Protecting humans and wildlife
from harmful chemicals

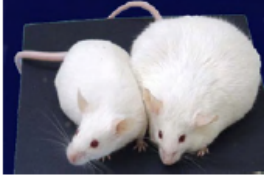
Issue 7: Take account of new insights

- Hormones work at low concentrations
- System already 'off the base-line'
- Low dose effects may not be predicted by high dose testing
- Non monotonic 'inverted-U' or 'U' dose-response curves for EDCs do exist
- LUPRON – for prostate cancer and endometriosis
TAMOXIFEN -for breast cancer. Both non-monotonic
- TGs should specify the need for low dose testing

www.chemtrust.org.uk

 **CHEMTrust**
Protecting humans and wildlife
from harmful chemicals

Non-monotonic response to fetal exposure



Control

1 ppb DES

Newbold *et al.*
2005

Mother's exposure during pregnancy to 1 ppb DES causes obesity in offspring, while 100 ppb causes weight loss. High doses did not predict the low dose impacts.

 **CHEMTrust**
Protecting humans and wildlife
from harmful chemicals

Issue 7: New Insights

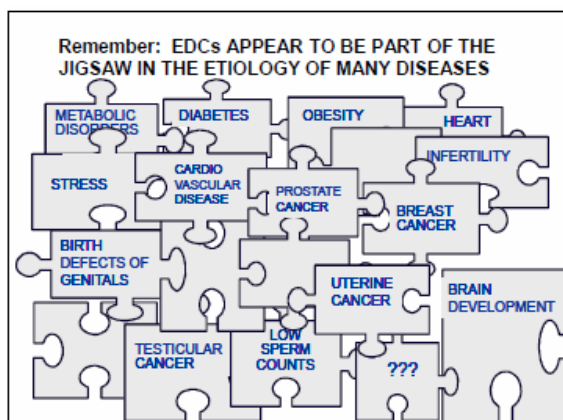
- Phytoestrogens in the diet
- TGs need to clearly specify optimum range ?

www.chemtrust.org.uk

 **CHEMTrust**
Protecting humans and wildlife
from harmful chemicals

Issue 8: Mixture effect

- Recent lab work shows that hormone disrupting chemicals can cause effects even if each is individually below its effect level - 'something from nothing'
- Not an issue for test method development – but it is an issue for chemicals assessment
- Must be dealt with – in a simple easy way. Urgently!



Conclusions ...

- More work to address complexity of endocrine system.
- More resources needed to identify chemicals with ability to cause brain developmental disorders and metabolic disorders.
- Urgent need for an OECD TG on mollusc.
- Need to find, if possible, alternatives to testing on animals. Improve non-animal tests predictive ability / metabolism.
- If lab animal are used in testing, make best use of these.



Conclusions....

Progress has been made. TGs have been developed and more in the pipeline. Much has been learned about basic endocrinology in various taxa.

Vital to keep up the momentum.

Governments and industry **MUST** ensure adequate funding



www.chemtrust.org.uk



Conclusions cont...

- Environmental NGOs are aware of the many pressures and constraints in your work.
- Whenever consideration of the costs of testing chemicals threaten best practice – we hope you will ensure these costs are weighed against some of the human and financial costs of ED-linked disorders – such as diabetes, fertility treatments, hormone related cancers, and deficits in intelligence.



www.chemtrust.org.uk



www.chemtrust.org.uk



Neurological Impairment in Children
Authors: English, German, Italian, Russian. Written by CHEM Trust

**What could new EU chemicals legislation deliver for public health?
 A Briefing for Doctors**
Authors: English, Italian, Polish, Czech, Slovakia, Hungary, German. Written by CHEM Trust

**Breast Cancer and exposure to hormonally active chemicals:
 An appraisal of the scientific evidence.**
Written by Professor Andrew Katerndahl, Head of the Centre for Toxicology, London School of Pharmacy

Briefings on the potential role of hormone disrupting chemicals in breast cancer
Authors: English, Polish, German, Czech, Italian, Russian, Czech

**Effect of pollutants on the reproductive health of male vertebrate wildlife -
 Males under threat**
Written by CHEM Trust. Also a Russian edition

**Male reproductive health disorders and the potential role of exposure to
 environmental chemicals**
Written by Professor Richard Sharpe, Human Reproductive Sciences Unit, Medical Research Council

www.chemtrust.org.uk

1

THE USE OF TGS AND OTHER TOOLS FOR THE ASSESSMENT OF ENDOCRINE DISRUPTERS: VIEWS FROM BIAC

Rémi Bars
23 September 2009

Outline

- 2
- Endocrine disruption
- Definition
- Assays and testing
- Approaches
 - ECETOC
 - IPCS Mode of action framework
- Hazard identification vs risk assessment
- Challenges
- Suggestions for future OECD activities

Endocrine disruption (toxicology)



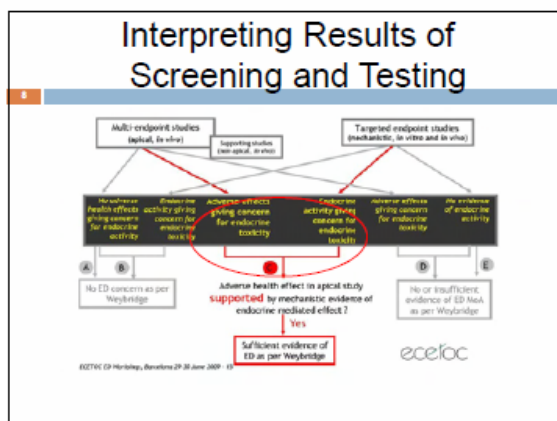
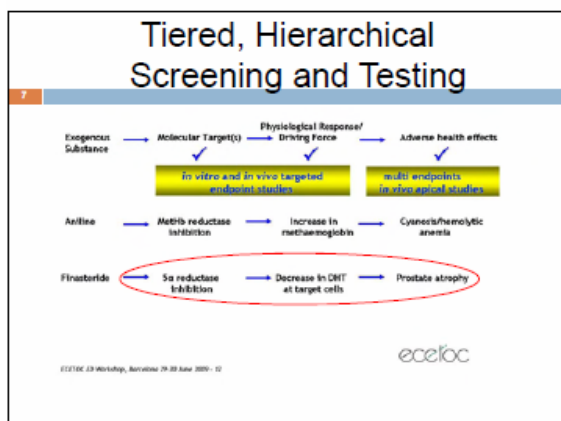
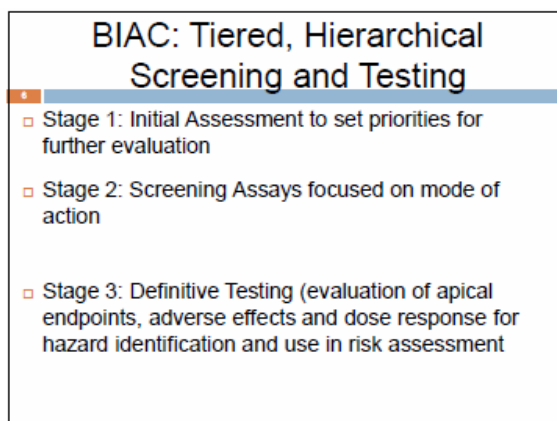
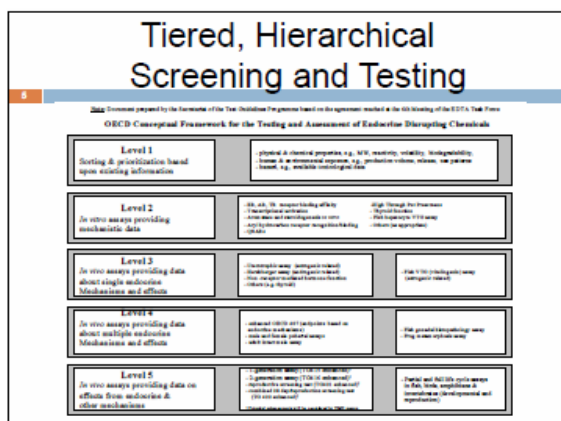
- Disruption is only used to describe = effects = on the endocrine system. Why?
- Endocrine system is just another physiological system.
- The way endocrine toxicity is determined is no different from the way other forms of toxicity are determined.

ecetoc

ECETOC 12th Meeting, Barcelona 29-30 June 2009 - 9

Definition of an Endocrine Disrupter

- 4
- "An **exogenous** substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes **adverse** health effects in an **intact** organism, or its **progeny**, or (sub)populations" (WHO IPCS, 2002)
- Endocrine activity
- Endocrine disruption / toxicity



IPCS Mode of Action Framework

Elements of the IPCS WOE analysis

- 1/ Description of key events
- 2/ Dose-response relationship
- 3/ Temporal association
- 4/ Strength, consistency and specificity of association of adverse effects with key events
- 5/ Biological plausibility and coherence
- 6/ Other modes of action

OVERALL STRENGTH OF EVIDENCE

- an evaluation regarding the relationship between an outcome of concern and exposure to a substance and whether or not these associations involve endocrine-mediated mechanisms

Interpreting Results of Testing: Potency Considerations

- ✓ **Specificity:** Endocrine adverse effects observed at lower doses than other types of toxicity.
- ✓ **Relevance:** Relevance of ED mechanism of action to human or environmental species
- ✓ **Dose level:** NOAEL for endocrine adverse effects at:

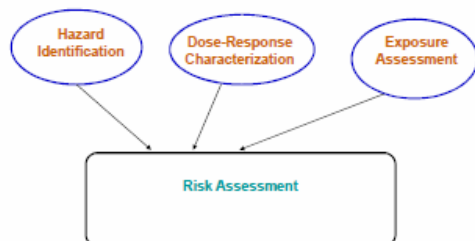
- ✓ **Exposure duration:** Endocrine adverse effect detected in:

- ✓ **Nature/Severity of adverse effects:** Slight delay in signal opening with no consequence on the reproduction function vs clear effect on fertility.
- ✓ **Number of species affected from regulatory toxicity studies:** Rat, mouse, dog, fish, amphibian, bird.

EEFRIK ED Workshop, Barcelona 29-30 June 2009 - 17

ecetoc

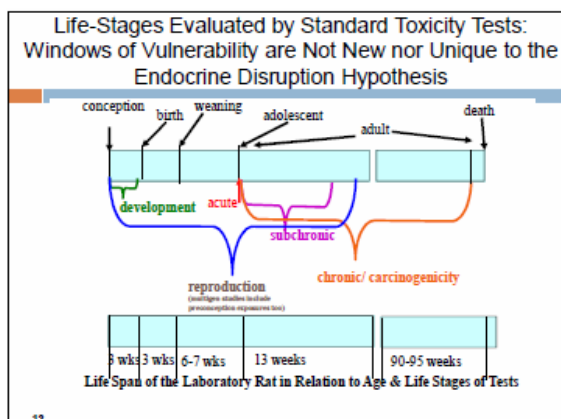
Should Use Components of Risk Assessment



11

Challenges

- **Thresholds**
 - MoA like others
- **Sensitive lifestages**



Interpreting Results of Screening and Testing

- Weight of Evidence: systematic & comprehensive review of ALL relevant studies
- Published studies need careful weighting
- Weight of Evidence requires qualified experts
- Validated appropriate methods conducted to GLP are given greater weight

Path Forward

- Need to avoid fragmented approaches to testing and assessment
- Scientific approach must consider mode of action, dose response and exposures and therefore risk
- Must be a formal, systematic Weight of Evidence process applied
- Risk is the basis for determining appropriate product stewardship and management actions
 - with Margin of Exposure using MOA and data derived values for UFs
 - There is a need to have adequate exposure information for EAS substances with thresholds, including exposures of any identifiable susceptible subpopulations.

Consideration for Future OECD EDTA Activities

- Work to develop Harmonized Data Interpretation Procedures for endocrine screening assays
- Organize a workshop on Weight of Evidence approaches integrating results from mechanistic screens (and if available, with results from apical tests)
 - To better understand when additional apical testing would be necessary
- Need for pooling case studies, making these more broadly available: IPCS, OECD, ECETOC, etc.

Consideration for Future OECD EDTA Activities

17

- Mutual Acceptance of Data
- Animal welfare

- **Guidance on how to use the TGs in regulatory settings**