

Endocrine disruption in ecotoxicology

Testing and assessment

with a focus on pesticide active substances

Lennart Weltje, PhD

BASF SE
Crop Protection – Ecotoxicology
Limburgerhof
Germany

 **BASF**
We create chemistry

Tokyo, February 22, 2018

御紹介ありがとうございます。御招待いただきまして大変光栄です。環境省に対しまして、この機会をいただきましたことを御礼申し上げたいと思います。少し寒いですが、非常に美しい日本という国でありますので、来日できてとてもうれしいです。

私、BASFに勤務しております。グローバル企業です。様々な物質、農薬、バイオサイド、そういったものを登録しているのですが、今日は、農薬についてお話しいたします。環境に対する内分泌かく乱作用についてお話しいたします。



まず最初に御紹介したいのは、これは私が今住んでいる場所です。ドイツでも寒かったです。雪も降ってました。これは私の裏庭ではないのですが、ほぼ裏庭のようなものです。ワインをつくっています。まだ眠っている状態です。先ほど御質問がありました。ブドウを栽培しアルコールを生産することはできますが、例えばビール1本を登録したり、ワイン1本を登録することはできないのです。なぜかという、アルコールというのは毒性がありますから、これを登録はできません。ワインを登録はできませんが、ブドウを生産することはできるということです。



これは1カ月後ぐらい、春になるとこういう景色になります。これは私が住んでいるノイシュタットという町というか村です。こういったいろいろな花々が咲き誇るすばらしい季節になります。東京は3月24日にサクラが咲くといわれていますが、その3月24日というのは母の誕生日なので非常にうれしく思います。偶然の一致ですね。

- Regulatory background
- Activities in EU, US
- OECD activities - Testing for relevant taxonomic groups
- SETAC Pellston workshop
- Scientific input from industry - ECETOC
- Triggering endocrine testing in ecotoxicology
- Are we addressing the right substances?
- Case study on azole fungicides and fish
- Conclusions

さて本日は、内分泌かく乱の規制の背景を御紹介したいと思います。先ほどの内容と重複するものがあると思いますが、米国と欧州連合（EU）の話を行います。日本については後半でお話ししたいと思いますので、主にEUと米国における取り組みを御紹介します。それからOECDにおける取り組み、生物分類群を用いた試験、2016年に開催されたSETACのPellstonワークショップ、それから産業界からの科学的インプット、欧州化学物質生態毒性及び毒性センター（ECETOC）ですね。なぜ、そしていつから生態毒性学における内分泌試験の機運が高まったか。それからケーススタディ、適切な物質を対象にしているのか。つまり、アゾール系の抗菌剤と魚類でのケーススタディというのは果たして適切なのか、そして総括したいと思います。

EU Regulatory background: Regulation 1107/2009



- Defines endocrine disruption as cut-off criteria for a.s.
 - Draft ED criteria shall be proposed by Dec 2013
 - Pending the adoption of criteria, interim criteria are in place for human health
 - no interim criteria for ecotoxicology
- Final criteria will be in place in 2018

まず農薬に対する規制の背景ですが、欧州では1107/2009の規制に端を発しており、内分泌かく乱をカットオフ・クライテリアとして定義しています。ある化学物質が内分泌かく乱化学物質（ED）となりますと、市場から除外されねばならないこととなります。当初は2013年12月までに提案されることになっていましたが、この期限は守られませんでした。そして、発がん性及び生殖毒性に基づくヒト健康に関する暫定クライテリアが設定されましたが、生態毒性に関する暫定クライテリアは設定されませんでした。今年2018年になりまして最終クライテリアの策定というのが殺生物性製品については6月、農薬については11月というスケジュールになっています。

EU Regulatory background: ED definition in Regulation 1107/2009

3.6 Toxicology

Adverse effect

link



Human relevant ED MoA

3.8 Ecotoxicology

Adverse effect on **population level**

link



ED MoA

ごく簡潔に規制の背景を述べますと、ある化学物質をEDと呼ぶには3要件があります。まず、有害影響がなければなりません。その次にその影響が内分泌を経由した作用機序（MOA）があるかどうか問題であり、ヒト影響の場合にはヒト健康に関連しているかどうか。そして、この両者に蓋然性の高い因果関係があるかどうかです。毒性学や生態毒性学は、伝統的に有害影響の特定に長けていました。しかし今ここではMOAについても規制上考慮せねばなりません。これまでなかったことです。生態毒性学でも同様ですが、ヒト関連のMOAについては考慮する必要はなく、個体群レベルでの有害影響ということになります。哺乳類であっても野外のラットが対象であったり。生態毒性学では、ヒトではなくて個体群レベルでの有害影響が対象になります。ヒトの場合は個人が対象になります。

EU Regulatory background: ED Guidance document

 **BASF**
We create chemistry



APPROVED: 16 December 2016



PUBLISHED: 20 December 2016

**Outline of Draft Guidance Document for the
Implementation of the Hazard-based Criteria to Identify
Endocrine Disruptors**

Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009

Draft for public consultation

Drafted by EFSA and ECHA staff, with support from JRC
7 December 2017

- Oct 2016 Mandate to EFSA and ECHA (JRC)
- Dec 2016 Outline published
- Dec 2017 Draft guidance published - public consultation opened

7

ダン先生が詳しく説明された通り、欧州化学物質庁（ECHA）と欧州食品安全機関（EFSA）とが殺生物性製品に関するガイダンス文書案を提出しています。欧州委員会の科学的機関である共同研究センター（JRC）がこれをサポートしています。2016年12月に概要が公表され一般からの意見聴取（オープンコメント）を実施しました。この1月末に締め切られましたが、産業界からもかなりのコメントが出されました。このガイダンス文書は6月に完成予定とされています。

Activities at OECD and EU authorities

- OECD GD 150 currently under revision
- OECD TGs (regularly updated, new proposals), Conceptual framework, fish testing strategy etc.



GUIDANCE DOCUMENT ON STANDARDISED TEST GUIDELINES FOR EVALUATING CHEMICALS FOR ENDOCRINE DISRUPTION

Series on Testing and Assessment

No. 150

Even without formally agreed criteria ED evaluations are made:

- EFSA - endocrine properties evaluations in the pesticide conclusions
- Member states make ED evaluations when they are rapporteur
- The ECHA ED EG conducts biocide and REACH chemicals evaluations

経済協力開発機構（OECD）等、その他のEU行政における取り組みです。OECDガイダンス文書150は初版が公表されており、改訂版については年内に公表予定です。非常に分厚い文書になっています。

御存じの通りOECDテストガイドラインの更新や新規提案が定期的に行われています。概念的フレームワークや魚類の試験戦略などもOECDの取り組み事項です。

EU行政では、正式なクライテリアが存在しない場合であっても、ED評価を実施しています。例えばEFSAは、自らの結論に基づいて内分泌かく乱特性の評価を実施しています。ある化学物質が何らかの内分泌活性や内分泌副作用を有する場合、大抵は何らかのデータ要件が生じるにとどまります。クライテリアが未定である以上、最終的な結論は出せませんので。

また、欧州連合加盟国各国は何らかの化学物質について評価担当国となっているわけで、ED評価を実施しています。そして、ヘルシンキに拠点を置くECHAのED専門家グループが殺生物性製品及びREACH化学物質の内分泌かく乱特性について助言をしています。

Activities in the US: key findings from EPA's EDSP list 1 (52 substances)

Terrestrial vertebrates

- Birds: no avian data requested
 - Current bird testing appropriately assesses **risk** to birds
- Mammals: 4 requests for mammalian data (thyroid triggered)

Aquatic vertebrates

- Amphibians: 5 requests for LAGDA studies (thyroid triggered)
- Fish: 13 requests for MEOGRT (estrogen-androgen pathway triggered)

Note: 32 out of 52 chemicals (selection based on exposure!) interacted with the endocrine system.

None of the requests were actually translated into data call ins

-> **U.S. EPA's future focus is on high-throughput screening**

次に米国ではどのような取り組みが行われているかですが、数年前に米国環境保護庁（USEPA）の内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム（EDSP）がリスト1を取り纏めました。これはばく露クライテリアによるものであって、内分泌かく乱の関する懸念によるものではありません。産業界側に対しTier 1試験バッテリーの結果の提供が求められました。2015年末には52物質が公表され、全Tier 1データについてWoE（証拠の重み）、関連文献、実施された試験結果が公表されました。

陸生脊椎動物では、鳥類についてはデータ要請はありませんでした。EPAは現行の鳥類繁殖試験が鳥類リスクを適切に評価しているという立場です。哺乳類の甲状腺影響について4件のデータ要請がありました。

一方、水生脊椎動物では、18件のデータ要請がありました。甲状腺影響を確認するための幼生期両生類成長発達試験（LAGDA）に5件、エストロゲン及びアンドロゲン経路を確認するためのメダカ拡張1世代繁殖試験（MEOGRT）に13件となっています。

興味深いことに、この52物質は内分泌懸念ではなくばく露懸念に基づいて選定されたわけですが、このうち32物質が内分泌系に作用しました。半分以上ということになります。もし内分泌懸念に基づいて選定するとしたら、ほぼ100%に近いでしょう。

それから、内分泌系の複雑な一面をお伝えするために是非述べておきたいことは、ある十分量の化学物質ばく露があると、その点から恒常性を維持しようと反応が起きることがあります。このような二次的反応と本来問題とすべきED特異的反応とを区別することも課題です。これは既に発現している副作用、一般毒性、肝毒性とも違います。

興味深いことに、52物質に関するWoE文書を発表後、EPAは企業側に対し試験実施の公式な要求（data calls in）をしていません。すべての試験を実施していたのではあまりにも時間がかかるので、今後はハイスループットなスクリーニングに注力する予定です。Tox21では、より多くの化学物質をより短期間でスクリーニングしていく予定です。

Testing and assessment: For which (vertebrate) taxa can we assess ED?

- Mammalian testing: mechanistic *in vitro*, *in vivo*, 2-gen rat, derive population-relevant endpoint **OK**
- Fish: *in vivo* biomarkers, Fish Full Life Cycle Test **OK**
 - MEOGRT (OECD TG 240) – insufficient validation*
- Birds: reproduction test (OECD TG 206)
 - 2-gen test development stopped at OECD (USEPA published TG)*
- Amphibians: *Xenopus* AMA (OECD TG 231), no reproduction
 - LAGDA (OECD TG 241)* – still no reproduction
- Invertebrates: apical testing possible – mechanistic testing lacking

* **Very expensive tests (too expensive to properly validate); no experienced CROs; high number of animals; many endpoints; outcome/evaluation highly uncertain**

生態毒性試験の場合、内分泌かく乱を、どの生物群において、どのツールを用いて評価するか。まずは主に毒性学的なメカニズムを知るための哺乳類試験があります。試験管内試験 (*in vitro*)、生物試験 (*in vivo*)、ラット二世世代などの試験があります。個体群への有害影響に関連する、一連のメカニズムに関する十分な情報を得ることができるでしょう。毒性学とは異なり、生態毒性学では個体群への関連性に着目する必要があります。

魚類については、*in vivo* バイオマーカー、フルライフサイクル試験があります。魚類においても内分泌かく乱は完全に評価可能とってよいでしょう。MEOGRTについてはまだ検証不十分で複雑なため実施可能なラボが少ないのが現状です。経験が蓄積し次第TGに反映されることが望まれます。なお、MEOGRTプロトコルは二世世代試験の検証がほぼ終了した段階で出されています。

鳥類については、繁殖試験がありますが、メカニズム的データが得られないので内分泌の評価が困難です。二世世代試験の開発はOECDでは中断されましたが、EPAがTGを公表しており通常の繁殖試験で鳥類リスクを十分に評価できるとしています。二世世代試験の検証過程においては感受性が不十分であったとのこと。

両生類については、変態試験がありますが、この試験では繁殖をみていません。現行のLAGDAでも繁殖はみていません。個体群全体への関連性はわかりません。

無脊椎動物については、EATSに着目しています。日本ではミジンコのステロイド受容体単離という特筆すべき成果がありました。メカニズム的試験が欠落しているというのが一般的な見解だと思います。繁殖試験が実施可能です。

- Highly successful Pellston workshop (Florida, US, Feb. 2016)
- 48 scientists from academia, authorities, industry, consultancy
- 5 papers emerged, covering cross-cutting issues

Integrated Environmental Assessment and Management — Volume 13, Number 2—pp. 267–279

Received: 5 August 2016 | Revised: 12 September 2016 | Accepted: 28 November 2016

267

Special Series

Recommended Approaches to the Scientific Evaluation of Ecotoxicological Hazards and Risks of Endocrine-Active Substances

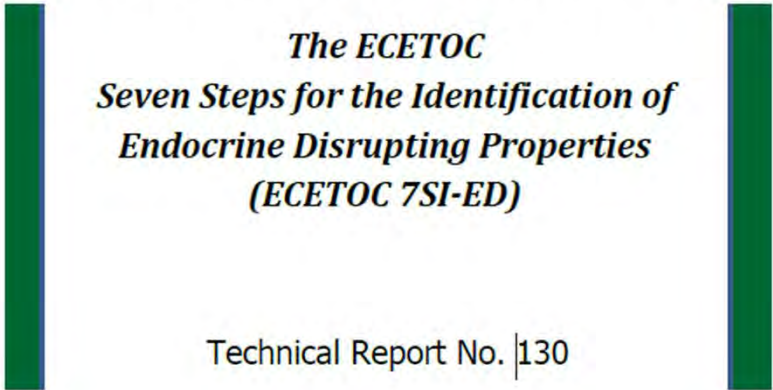
Peter Matthiessen,^{1*} Gerald T Ankley,² Ronald C Biever,³ Poul Bjerregaard,⁴ Christopher Borgert,⁵ Kristin Brugger,⁶ Amy Blankinship,⁷ Janice Chambers,⁸ Katherine K Coady,⁹ Lisa Constantine,¹⁰ Zhichao Dang,¹¹ Nancy D Denslow,¹² David A Dreier,¹² Steve Dungey,¹³ L Earl Gray,¹⁴ Melanie Gross,¹⁵ Patrick D Guiney,¹⁶ Markus Hecker,¹⁷ Henrik Holbeck,¹⁸ Taisen Iguchi,¹⁸ Sarah Kadlec,¹⁹ Natalie K Karouna-Renier,²⁰ Ioanna Katsiadaki,²¹ Yukio Kawashima,²² Werner Kloas,²³ Henry Krueger,²⁴ Anu Kumar,²⁵ Laurent Lagadic,²⁶ Annegaaïke Leopold,²⁷ Steven L Levine,²⁸ Gerd Maack,²⁹ Sue Marty,³⁰ James Meador,³¹ Ellen Mihaich,³² Jenny Odum,³³ Lisa Ortego,³⁴ Joanne Parrott,³⁵ Daniel Pickford,³⁶ Mike Roberts,³⁷ Christoph Schaefer,³⁸ Tamar Schwarz,²¹ Keith Solomon,³⁹ Tim Verslycke,⁴⁰ Lennart Weltje,⁴¹ James R Wheeler,⁴² Mike Williams,⁴³ Jeffrey C Wolf,⁴⁴ and Kunihiko Yamazaki⁴⁵

11

SETACフォーラムは、生態毒性分野の専門家ワークショップで、グローバルに機能しています。学術、産業、行政分野から参加があります。私もその一員でありましたが、例えばダン先生、井口先生、川嶋先生、山崎先生などもこのワークショップに入っています。私も井口先生と同じグループに属し、特定の課題について6論文を発表することができました。これらの6論文は、環境中の内分泌かく乱問題をよく網羅した内容だったと思います。

Scientific input from industry: ECETOC activities

- Bars *et al.* (2011) ED identification - *Reg. Tox. Pharm.* **59**: 37–46
- Bars *et al.* (2012) ED risk assessment - *Reg. Tox. Pharm.* **64**: 143–154
- ECETOC (2016) AOPs for ED - report
- ECETOC (2017) 7SI-ED - report
- Gross *et al.* (2017) WoE for EDCs - *Reg. Tox. Pharm.* **91**: 20-28



*The ECETOC
Seven Steps for the Identification of
Endocrine Disrupting Properties
(ECETOC 7SI-ED)*

Technical Report No. 130

All papers/reports
freely available

産業界は、その他の活動にも参画しています。何名かの毒性学者や生態毒性学者が参画しており、この筆頭著者であり議長でもあるBiocrop Science社のRemi Bars氏による2010年の1報目はどのようにEDを同定するかに関する内容、2報目はどのようにEDをリスク評価するかに関する内容でした。欧州化学物質生態毒性及び毒性センター（ECETOC）は、欧州作物保護協会（ECPA）の科学的支部ですが、EDに関する報告書を何報か公表しています。EDの有害性発現経路（AOP）は、内分泌かく乱特性を同定のための7段階について述べており、ガイダンスドキュメントへのインプットでもあります。昨年はEDのWoEに関する論文を公表しており、影響の様式に着目してデータを結び付けることによって一定の結論を引き出しています。すべて無料で入手可能ですので、希望される方は私宛に御連絡ください。

Ecotoxicology testing - Triggering from toxicology

Toxicology usually drives cause for concern, as more (mechanistic) data are generated for mammalian systems. Thus, endocrine concerns may trigger studies in ecotoxicology. The triggering is based on evolutionary conservatism of hormone receptors in vertebrates, focusing on estrogen, androgen, thyroid and steroidogenesis (EATS). See: Ankley and Gray (2013) *Env. Tox. Chem.* **32**: 1084–1087

Despite this, EFSA lately (since May 2014) concludes:

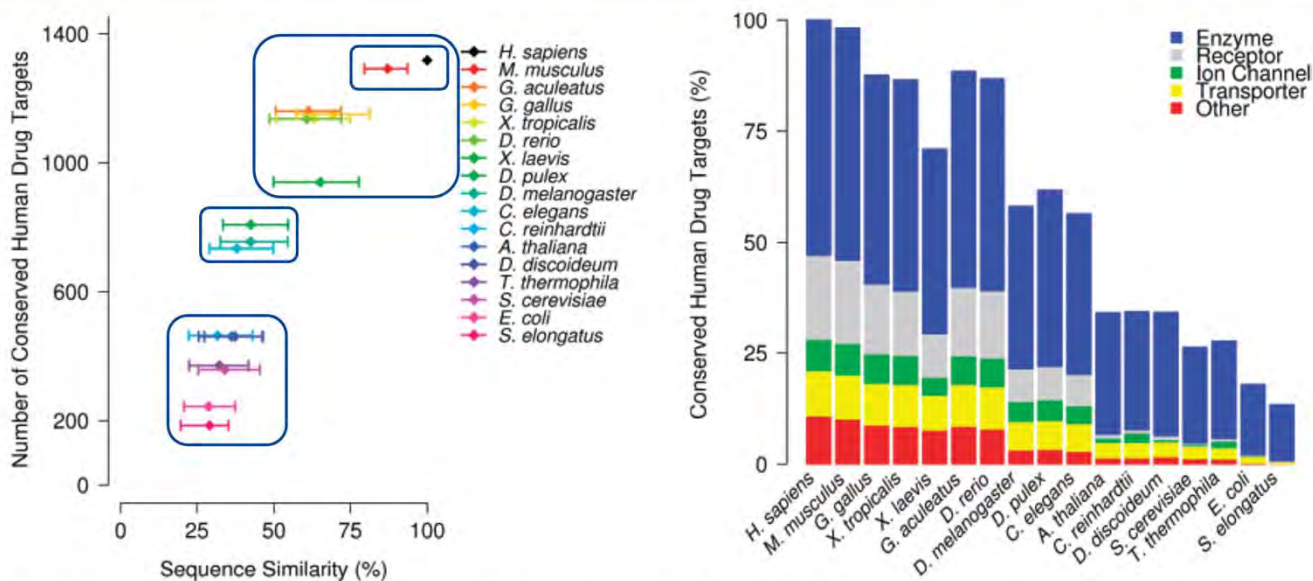
“Chemical X did not indicate an endocrine disrupting potential in mammals; however, no firm conclusion can be drawn regarding fish and birds” or:

“No specific concerns on the potential for endocrine disruption have been identified from the available ecotoxicological data set on birds and fish. However, no firm conclusion can be drawn from the available information, as in general, these studies alone are not sufficient to investigate all the relevant mechanisms and they may not be sufficient to detect all adverse effects which could be caused by an endocrine mechanism”

生態毒性学的な検討開始に先立ち、哺乳類データを待つのが普通です。哺乳類データはよりメカニズム的視点からの毒性学的情報を提供するからです。その他の脊椎動物類において機能しているメカニズムと同じなのです。これは生物進化の過程でのホルモン系の保存性に関連しています。その他の脊椎動物においても、エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン、ステロイドホルモン合成経路に着目します。この点については、EPAの科学者であるGerald T. Ankley氏とEarl Gray氏が魚類試験とラット試験との比較を実施し、よい対応性を示しています。

しかし、EFSAは、2014年5月以降、「哺乳類においては潜在的な内分泌かく乱性を示さなかった。しかしながら、魚類及び鳥類においては確固とした結論は導き出せなかった」と結論するようになりました。あるいは「生態毒性学的データセット（通常メカニズム的ではないので）からは、メカニズム的な潜在的な内分泌かく乱特性に対する特別な懸念は認められなかった。しかしながら、確固とした結論は導き出せなかった」と述べています。毒性学的に提起される経路が生態毒性学では必ずしも決定的ではないということでしょう。しかし、私としては、脊椎動物を試験するグループ間で情報交換することには意義があると考えています。

Similarities between mammals and other species



Gunnarsson et al. (2008) *Environ. Sci. Technol.* **42**: 5807–5813

Significant overlap between organisms, but clear division between vertebrates, invertebrates and unicellular organisms

Gunnarsson氏が薬物標的に関するよい論文を出しています。引用データになりますが、右図が青色がステロイド合成経路などの酵素、灰色がエストロゲンやアンドロゲンなどの受容体です。左図が各生物において保存されているヒトの薬物標的の数になりますが、ヒト、マウス、ニワトリ、二種類の両生類、二種類の魚類、無脊椎動物、単細胞生物で明確な区別が存在します。それぞれの群間にジャンプがあります。このようなデータを考慮すると、哺乳類データを魚類、鳥類、両生類に用いることが可能な場合が見えてきます。

Differences between toxicology and ecotoxicology

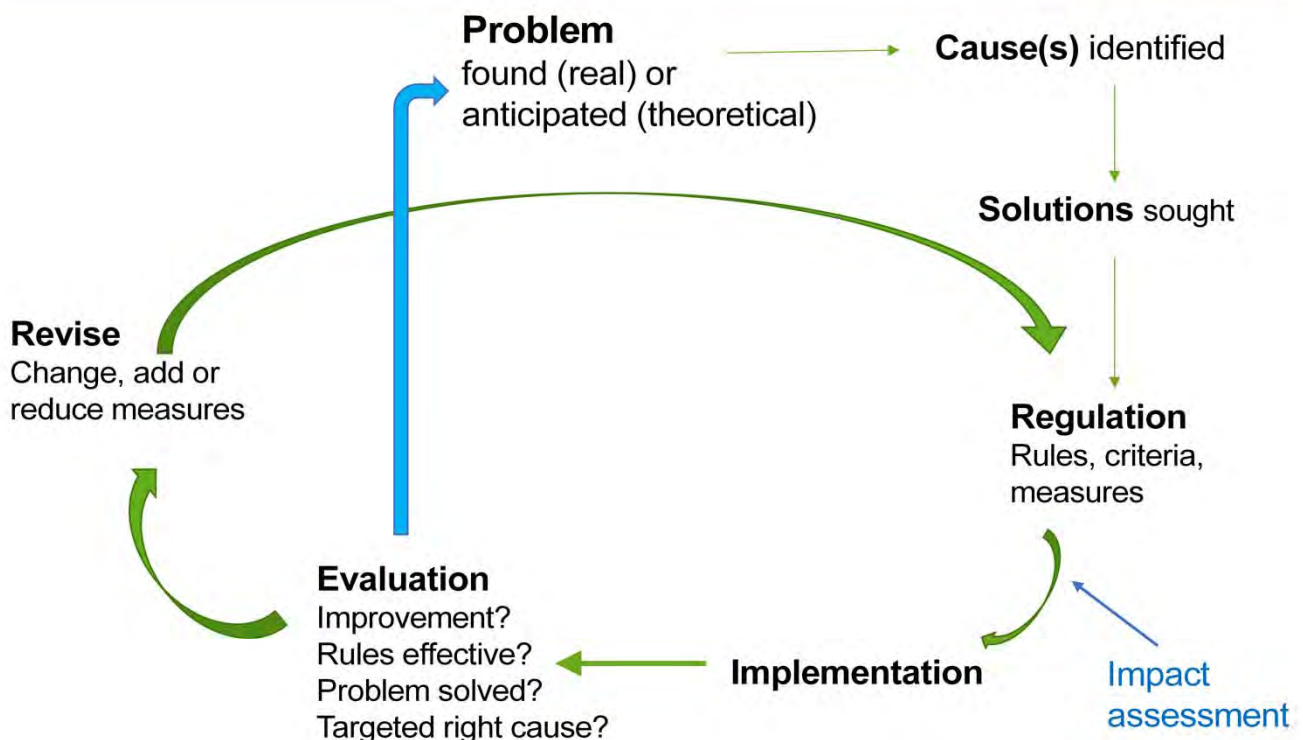
- Protection goal: population instead of individual
- Human relevance of endocrine mechanisms is not considered
- Consideration of many non-target species
- Consideration of other exposure routes (e.g. fish via surrounding water)
- For non-mammals there is less mechanistic insight in cause for effects (UK CRD 2010: only for mammals and fish ED can be assessed)
- Long-term testing of relevant non-target species is possible (generating apical endpoints covering potential endocrine-mediated effects)
 - most EDs defined for human health are EDs in ecotoxicology, unless effects would be specific for humans (extremely rare) or not population relevant (more common)

生態毒性学と毒性学との評価の考え方の違いについては既に述べてきましたが、私たちは、個体ではなく個体群を保護対象としています。生態毒性学者は、内分泌メカニズムのヒトとの関連性にはこだわりません。もし何らかのメカニズムが哺乳類で見つければ、生態毒性学に潜在的な関連性があるということにはなりません。多くの非標的生物種に対する考慮が当然必要となります。私の元上司が「毒性学者はただ1つの生物種、ヒトだけを考慮してればいいから楽だね」とよく冗談半分に言っていました。もちろん私も毒性学を多少知っているのですが、そんなわけではないのですが。とにかく生態毒性学ではヒト以外のすべて、広範な生物多様性について考慮せねばなりません。

私たちは、その他のばく露経路について考慮せねばなりません。例えば魚類は完全に水に囲まれており、水を鰓から取り入れながら代謝を行っています。ばく露の違いというものもあるわけです。哺乳類については、吸入ばく露や経皮ばく露もありますが、あくまでも食餌経路に重点が置かれています。

既に述べてきたように哺乳類ではメカニズムがかなり解明されていますが、哺乳類以外ではそれほどでもありません。2010年に英国政府は、哺乳類と魚類以外では、個体群レベルのメカニズムからのED評価は不可能だと述べています。しかし、関連する非標的生物種を用いる場合であっても、長期試験を実施できる利点はあります。潜在的な（アピカル）エンドポイントを得ることが可能です。アピカルというのは、繁殖、成長、発達といったいったエンドポイントであり、内分泌を含むあらゆるメカニズムを網羅するエンドポイントを意味します。例えば、ヒト健康に対するEDが同定された場合、生態毒性学上のEDである場合がほとんどですが、影響メカニズムが私たちヒトに限定的であって、他の脊椎動物には影響せず個体群レベルの影響が見いだされないという場合もあり得るわけです。まだ、私はそのような事例を知りませんが。

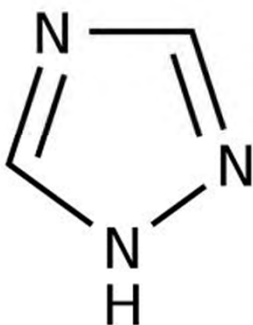
A step back: Endocrine disruption in the regulatory cycle



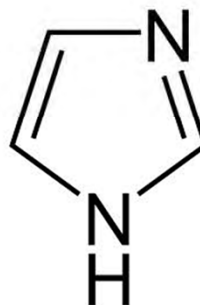
手短なステップ・バック、そして私がとりあげたケーススタディに進みたいと思います。規制サイクルについて考える際、通常は課題から着手します。現実に環境問題が発生した場合、例えば巻貝のインポセックスですが、原因は何かと追究するとトリブチルスズ同定されました。あるいは、欧米各国の多くで雄魚に精巣卵が発見されましたが、原因として処理下水中のエストロゲンが同定されました。しかし、時として理論的な問題が生じます。実験室にて農薬を試験すればあらゆる種類の影響の検出が可能でしょうが、その結果を実験室外の世界にあてはめることが可能かという問題です。

課題が発生し、原因を同定し、その化学物質のメカニズムを調べ、その解決を模索し、規則、クライテリア、方策といった規制手段に反映させていきます。規制を開始するに先立ちインパクト評価を通常実施します。例えばEDSPリストの化学物質の半数以上が市場から除かれるような事態が受け入れられるかどうか。この情報に基づいて課題の規模を勘案し規制を実施します。規制実施後に忘れられがちなのは、改善点はあるか、規則は有効か、課題は解決されたか、正しい原因を対象としているのかについて評価し、改訂を加える必要性です。このようなサイクルを経る必要があります。

Case study – azole fungicides and fish



Triazoles



Imidazoles

アゾール系抗菌剤を考えていきたいと思ひます。トリアゾール類が最大のグループです。それとイミダゾール類があります。

Azoles – general characteristics

Imidazoles and triazoles (a.k.a. DMI, sometimes also EBI, SBI fungicides)

Used in plant protection products, biocides and (veterinary) pharmaceuticals

MoA (FRAC group G1): inhibition of lanosterol C14-demethylase (CYP51) in fungi

Azoles are infamous for causing endocrine-mediated effects in fish by inhibiting aromatase (CYP19)

Acute toxicity to fish is not particularly high: 96-h LC₅₀ ca. 3 mg/L

デメチラーゼ阻害剤あるいはステロイドであるエスゴステロール生合成を阻害する抗真菌剤としても知られています。植物保護製品（PPP）としてだけでなく、医薬や殺生物性製品としても使われています。

MOAとしてはラノステロールC14-デメチラーゼの阻害であり、真菌のCYP51酵素を阻害します。ところが、P450（CYP）酵素というものは生物に普遍的であって、酵素として数十万以上は知られていると思います。デメチラーゼ（CYP51）に対する親和性がアロマトラーゼ（CYP19）にもある程度の親和性を示す場合があります。後で図示しますが、ステロイド合成経路において重要な酵素となっています。

それから魚類に対する急性毒性はアゾール類ではそれほど高くはありません。平均1～5 mg/L程度です。

CYP enzymes in fish steroidogenesis

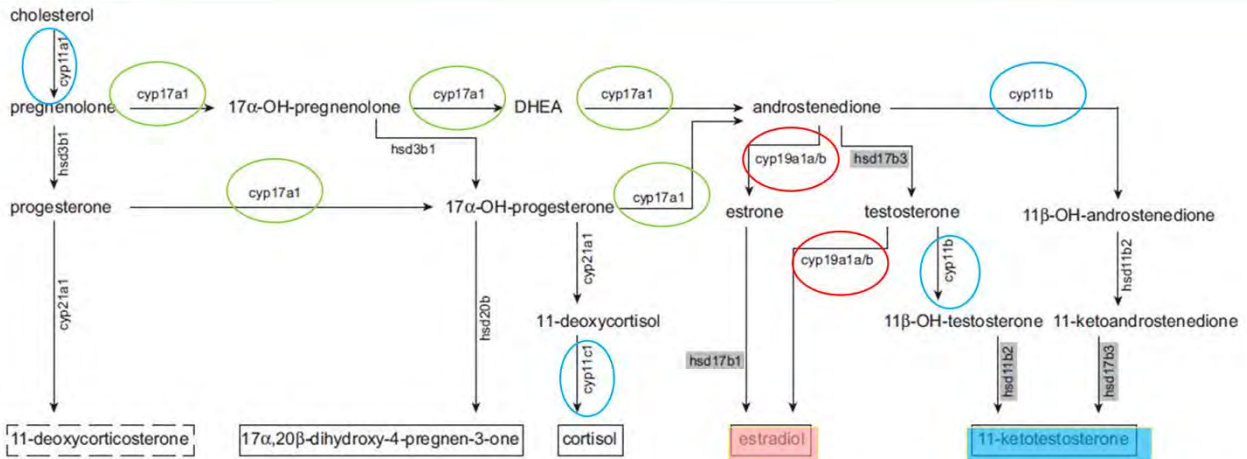


Fig. 2. Postulated pathway of steroidogenesis in zebrafish. Gene names of supposed enzymes are denoted on each arrow. Major circulating steroids are framed and the putative ligand for the mineralocorticoid receptor is framed dashed. Enzymes that have been experimentally demonstrated to catalyze the denoted reaction are highlighted in gray. Source data from [10,29,37,72,86,131].

From. Tokarz et al. (2013)

しかし、アゾール系抗菌薬の内分泌系に対する懸念は、CYP19、そして潜在的にその他のCYP酵素を阻害する可能性です。この図は魚類のステロイド産生経路ですが、アロマターゼCYP19が阻害されると、アンドロゲンであるテストステロンやアンドロステジオンが増加し、エストラジオールが低下します。ホルモン濃度のバランスが変わって、その結果として雄性化が起きます。これは魚類において実験室的に観察される現象です。

Test concentration setting considerations – aromatase inhibition potency

Reference	K	L new data
Fungicides		
Bitertanol	>20	≥300
Cyproconazole	8.5	≈100
Epoxiconazole	1.44	≈100
Flusilazole	0.055	1.7
Hexaconazole	9.9 ^a	96
Imazalil (I)	0.072	3.6
Myclobutanil	0.47	47
Penconazole	0.85	47
Prochloraz (I)	0.047	0.44
Propiconazole	5.2	199
Tebuconazole	5.8	609
Triadimefon	17.5	483
Triadimenol	12.6	972
Antifungal drugs		
Bifonazole (I)	0.019	0.24
Clotrimazole (I)	0.11	1.2
Fluconazole	>140	≥300
Itraconazole	>70	≈100
Ketoconazole (I)	5.6	281
Miconazole (I)	0.064	8.2
Aromatase inhibitors		
Fadrozole (I)	0.0076	0.66
Letrozole	0.015	0.15

IC₅₀ values in μM obtained in two different assays show potency differences spanning 3 to 4 orders of magnitude.

Considering that all organic chemicals have a baseline (narcotic) toxicity, it is evident that for the less potent ones systemic toxicity sets in before aromatase inhibition takes place.

Data from Trösken et al. (2006) *Toxicology* **219**: 33–40

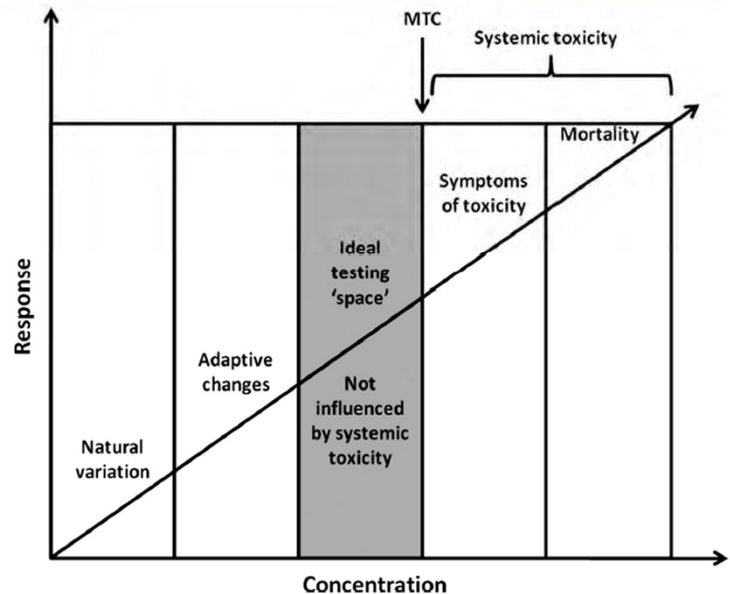
一連のアゾール類のリスト、*in vitro*アロマトラーゼ阻害試験結果ですが、物質によって大きな差があります。陽性対照として用いたファドロゾールは医薬品ですが、大変強力です。フルコナゾールなどは微弱で、3～4桁以上は弱いかと思えます。

ここで興味深いのは、アゾール類が強力でない場合も、すべての有機物質が麻酔毒性を有しているため、魚類で試験を開始するとアロマトラーゼ阻害が起きる前に死亡するかもしれません。逆に、魚類をファドロゾールにばく露した場合には、急性毒性発現以前に何らかの内分泌かく乱が起きるかもしれません。

Test concentration setting for screening assays

For optimal testing, systemic toxicity should be avoided, as this may evoke or interfere with endocrine effects.

Thus, on basis of available information the maximum tolerated concentration (MTC) needs to be determined.

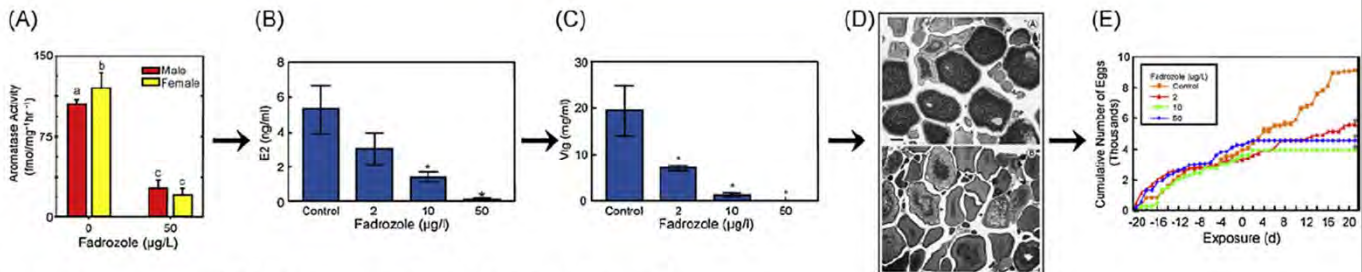


Wheeler, Panter, Weltje and Thorpe (2013) *Chemosphere* **92**: 1067–1076

そこで我々は、試験濃度を選択するための試験戦略を設計してみました。述べてきたように、内分泌かく乱で困難な点は、全身毒性による干渉を回避しながら明瞭なシグナルを得ることです。濃度軸の上昇に伴う生物の反応をみていきましょう。まず自然発生的な変動があります。次に生物の適応的な変化が起き、ばく露に対する補償的な反応がまだ可能です。そして、ここが理想的な試験「領域」であって、明確なシグナルが得られるであろう領域が確保されます。更に高濃度では明確な全身毒性、ついには死亡に至ります。

この最大許容濃度（MTC）を決定するためには、既存試験に基いた検討を行います。もしMTCが適応的な変化が起きる濃度よりも低いと、ご想像どおり、内分泌のシグナルが得られないまま全身毒性が発現することになります。

Simplified AOP for fadrozole - aromatase inhibition in fish



Ankley et al. (2009) *Aquat. Toxicol.* **92**: 168–178

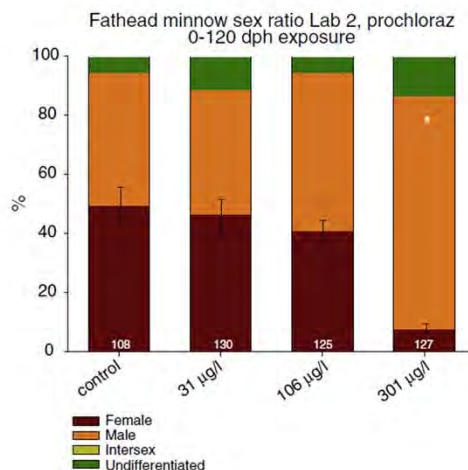
- a) Aromatase inhibition – molecular initiating event (MIE)
- b) Estradiol decrease
- c) Vitellogenin decrease in females
- d) Decreased deposition of VTG in ovary
- e) Reduced fecundity – adverse outcome (AO)

魚類での有害性発現経路（AOP）はどのようなものとなるのでしょうか。EPAのGerald T. Ankley氏がよい仕事を行っており、この図は、それぞれの段階で何が起きているかを示しています。強力なアロマターゼ阻害剤ファドロゾールを用い、対象区とばく露区の魚類を比較しています。ばく露区ではアロマターゼ活性が有意に低下し、その結果エストラジオール産生量が低下しています。先ほどステロイド生合成経路で確認した通りです。エストラジオールの制御下にある蛋白質であるビテロゲニンが低下し、卵巣中のビテロゲニン蓄積量も低下しています。そして、遂に魚類体内にとどまらない潜在的なパラメータとして、経時的な産卵数低下が認められます。見ての通り、この濃度で産卵の阻害が起きている。アロマターゼ阻害が標的分子への作用（MIE）であり、主要な段階を経て産卵数低下という有害事象（AO）に至り、個体群に関連してきます。

What could be associated apical effects of aromatase inhibition?

There are different apical, chronic effects depending on life stage:

- in adult fish fecundity may be reduced
 - possibly secondary sexual characteristics
- in juvenile fish:
 - sexual differentiation may be impacted, leading to more phenotypic males
 - growth may be reduced (a less specific effect)



From: Holbech et al. (2012)

成熟魚、幼若魚、いずれをばく露するかという違いもあります。これまでみてきたように成熟魚をばく露すると産卵数が低下する可能性があります。二次性徴への影響が認められる可能性もあります。一方、性分化していない幼若魚をばく露すると、性分化に影響が生じ表現型雄が増加する可能性があります。

デンマークのHenrik Holbech氏がOECDリングテストの一環として実施した性発達試験は、とてもよい事例です。対象区ではほぼ雄50%雌50%ですが、高濃度になると雄が約80%という結果でした。幼若魚ではこのような影響が認められます。成長遅延も認められますが、これは特異的パラメータとはいえません。

Azole toxicity in other aquatic species

In some cases, fish are driving the European risk assessment:

- Regulatory Acceptable Concentration (RAC) derived from chronic fish test -> NOEC/10
- For some azoles, the RAC is derived from other species, e.g.:
 - Epoxiconazole -> *Lemna* EC₅₀/10
 - Prochloraz -> green alga E_bC₅₀/10
- In these cases, an additional margin of safety is provided for fish

では、他の生物種に対する毒性はどうでしょうか。欧州のリスク評価では、魚類の急性及び慢性毒性試験以外にも、一次生産者であるアカウキクサ類、ミジンコ類、ユスリカ類等の無脊椎動物について試験を実施しています。その際にアセスメント・ファクターを用いており、慢性影響では10となっています。2つのアゾール類、エポキシコナゾールとプロクロラズについて最も低いエンドポイントだったのは、エポキシコナゾールではアカウキクサ類、プロクロラズでは緑藻類を用いた生育阻害試験においてでした。これらの数値は内分泌シグナルが認める濃度よりも低いです。言い換えれば、一次生産者がリスク評価を動かしており、魚類に対する追加的な安全マージンを付与しています。

Retrospective assessment

Is there a reason to ban azoles, because they cause endocrine disruption in fish in the field, that is not covered by the standard aquatic risk assessment?
-> let's check!

**Critical Reviews
in Toxicology**

<http://informahealthcare.com/txc>
ISSN: 1040-8444 (print), 1547-6898 (electronic)
Crit Rev Toxicol, 2015; 45(5): 453-467
© 2015 Informa Healthcare USA, Inc. DOI: 10.3109/10408444.2015.1018409

informa
healthcare

REVIEW ARTICLE

A review of the effects of azole compounds in fish and their possible involvement in masculinization of wild fish populations

Peter Matthiessen¹ and Lennart Weltje²

¹Independent Consultant in Ecotoxicology, Old School House, Brow Edge, Backbarrow, Ulverston, Cumbria, UK and ²BASF SE, Crop Protection - Ecotoxicology, Limburgerhof, Germany

25

もしリスク評価が有効に機能しているのであれば、農家は表示された使用要領に従って水系との距離を保ちながらアゾール散布率を計算するので、環境中はいへん低く抑えられ、内分泌かく乱が起きるような濃度になることはないでしょう。この総説はPeter Matthiessen氏と共著ですが、OECDでの作業の一環です。野外での観察において魚類の雄性化が認められている事例を探し、文献調査を実施しました。

We searched the literature for masculinisation (defeminisation) in wild fish populations

- not so abundant as feminisation (due to estrogens)
- nevertheless, some studies found (fish are quite well-studied)
 - checked link with azole exposure
 - checked other possible causes
- we collected measured azole concentrations in surface waters

魚類での研究が進んでいるためです。判明したことは、雌性化は予想通り広範な地域で発生していました。先に述べた通り、下水処理問題に伴うエストラジオールやエチニルエストラジオールです。雄性化は稀でしたが、それでも調査事例は存在しました。次に、表層水におけるアゾール類濃度の測定値を文献から収集しました。

Masculinisation in fish - causes

Masculinisation in fish, or of their populations, can be caused by many things other than azoles, e.g.:

- Non-aromatisable androgens e.g. trenbolone
- Aromatisable androgens e.g. methyl testosterone
- Progestins e.g. levonorgestrel
- Thyroid hormone
- Anti-estrogens e.g. tamoxifen
- Pulpmill effluents
- Elevated temperatures
- Hypoxia
- Reduced pH
- Predation
- Stress
- Crowding

野生魚類に認められる雄性化の原因とは一体何でしょうか。試験で認められるアゾール類による作用だけでなく、多くの原因が考えられます。当然アンドロゲンもその一つで、例えばトレンボロンは牛肉増産に利用されています。しかしそのアンドロゲンも芳香化を受けるとエストロゲンに変換されます。アンドロゲンシグナルのみならずエストロゲンシグナルも出るので話は紛らわしくなります。プロゲステロン、甲状腺ホルモン、抗エストロゲン、製紙工場排水、天然化合物などだけでなく、高水温、低溶存酸素、低pH、捕食なども原因となります。調査によるとニシン類は雌を好んで捕食するとのことでした。ストレス、高個体密度が雄性化の原因となることもあります。

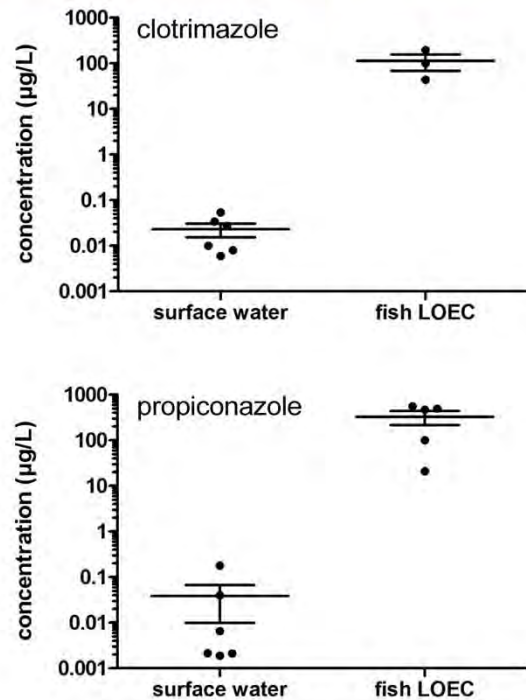
Azole effects on fish populations in the field?

Our review of the literature yielded no evidence for azole-mediated masculinisation in wild fish populations.

Occasional masculinisation was observed, not linked to azoles, but to other causes.

Various azoles are frequently detected in surface water, but the concentrations appear too low to induce effects in fish.

Matthiessen and Weltje (2015) *Crit. Rev. Toxicol.* **45**: 453–467



魚類のアゾール類へのばく露が雄性化に関連することを示す野外調査結果は見い出せませんでした。そこでばく露濃度を確認すべきと考え、文献データを収集しました。表層水中濃度を対数ケールで示しましたが、実験室で影響が認められる濃度よりも、この場合は数千倍低いことがわかりました。論文から引用したこれらの図は、医薬品であるクロトリマゾール、PPP及びBPであるプロピコナゾールですが、実験室で影響が出た濃度と表層水中濃度とには常に大きな乖離が認められます。環境中濃度がとても低いので影響は認められないと結論されます。

Azole case study: Conclusions

- Azoles are a widely used group of compounds with the ability to inhibit aromatase in fish
- This may cause population-relevant apical effects, e.g. masculinising effects in fish
- However, azole concentrations in the environment are too low to produce these effects (risk assessment procedures are fit for purpose)
- This is supported by an absence of reports linking masculinisation in wild fish with azole exposure
- Azoles are a good example of endocrine-active substances which are environmentally safe to use in practice

問題となるのは、影響が実験室的に認められたことを理由に、その化学物質製品を市場から除かねばならないのかという点です。魚類において内分泌かく乱がある以上、環境によくない、ということになるのでしょうか。欧州規制の課題も、まさにその点だと思います。実験室ではなく現実の環境中で問題が起きているかどうかを問うていません。

アゾール類については、そのいくつかについて力価データが判明しており理論的には個体群に対する影響を及ぼす可能性はあるということです。しかし、環境中濃度は非常に低く、リスク評価は有効に機能しており、魚類の雄性化とアゾール類ばく露との関連性を示す報告は見当たりませんでした。したがって、アゾール類は、確かに内分泌かく乱作用を有する化学物質ではありますが、実際には安全に使用されている好事例になると思います。

General Conclusions

- Endocrine disrupting properties need to be addressed in regulatory ecotoxicology
 - Can be done for mammals and fish
- Uncertainties:
 - Mechanisms in non-mammalians less clear
 - Triggering from toxicology questioned by EFSA
 - Availability of test methods (specific groups e.g. birds, mechanistic assays)
 - Potential for high animal use
- Industry makes significant scientific contributions to the debate
- We should consider if we address the right substances in a proportionate manner

さて、最後のまとめになりますが、内分泌かく乱特性という問題は、規制的な生態毒性学の中で扱われる必要があります。そのためには哺乳類と魚類で試験を実施することが必要ですが、不確実性が残ります。

哺乳類以外の生物におけるメカニズムがまだ不明瞭である。毒性学的に提起される新たな疑問がある。特定の群、例えば鳥類について試験が欠落している。動物を多用する可能性、これも規制上相応しくない可能性もあります。

産業界としては科学的議論に貢献すべく努めています。これまでの取り組みについてはご説明した通りですが、ある化学物質に対する規制が本当に環境の役に立っているのかどうか、この点が我々からの最も重要な問いかけとなります。

Thank you for your attention!

御清聴ありがとうございました。