

**化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価
の実施結果について(令和5年度実施分)(案)**

I. 令和5年度に実施した文献情報に基づく影響評価(信頼性評価)について

令和3年度に信頼性評価を実施する対象として選定した10物質(表1参照)のうち、表2に記載された1物質について令和5年度にヒトへの投与試験に関する報告について信頼性評価を追加して実施した(参考資料3-1参照)。

また、令和4年度に信頼性評価を実施する対象として選定した12物質群(表3参照)のうち、表2に記載された7物質群について令和5年度に信頼性評価を実施した(参考資料3-2参照)。

表1 令和3年度に信頼性評価の対象とした10物質

名称	主な用途	選定根拠 となった 調査区分 の記号**
報告済		
ベンジルパラベン(別名:4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル)	感熱紙用顔色剤 ¹⁾	3.(1)
イソシアヌル酸	水中塩素安定剤、シアヌル酸誘導体原料 ¹⁾	3.(1)
ドデカメチルシクロヘキサシロキサン	医薬部外品添加物(化粧品保湿剤) ²⁾	3.(1)
マラカイトグリーン塩酸塩	顔料 ¹⁾	3.(1)
デカメチルシクロペンタシロキサン	原料(シリコンオイル、化粧品) ¹⁾	3.(1)
オクタメチルシクロテトラシロキサン	原料(化粧品) ¹⁾	3.(1)
チアベンダゾール	食品添加物(柑橘類の防カビ剤)、駆虫剤(動物用)、殺菌剤(失効農薬) ¹⁾	3.(1)
バルプロ酸	原料(医薬品) ¹⁾	3.(1)
ピリドスチグミン	医薬品(抗コリンエステラーゼ剤)(ピリドスチグミン臭化物として) ²⁾	3.(1)
今回追加報告		
N,N-ジメチルビグアニド(別名:メトホルミン)	医薬品(血糖降下剤)(塩酸塩として) ²⁾	3.(1)

1) 化学工業日報社、17221の化学商品(2021)及びバックナンバー

2) 製品評価技術基盤機構、NITE化学物質総合情報提供システム
(https://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/systemTop)

**選定根拠となった調査区分の記号

3. (1) 化学物質環境実態調査

表2 令和5年度に信頼性評価を実施した8物質群

	物質名	選定年度	信頼性評価の実施年度
1	N,N-ジメチルピグアニド (別名: メトホルミン)	令和3年度	令和4年度及び令和5年度
2	ケトプロフェン	令和4年度	令和5年度
3	中鎖塩素化パラフィン類のうち塩素化テトラデカン類 (C=14、Cl=4~9)	令和4年度	令和5年度
4	中鎖塩素化パラフィン類のうち塩素化ペンタデカン類 (C=15、Cl=4~9)	令和4年度	令和5年度
5	中鎖塩素化パラフィン類のうち塩素化ヘキサデカン類 (C=16、Cl=4~9)	令和4年度	令和5年度
6	中鎖塩素化パラフィン類のうち塩素化ヘプタデカン類 (C=17、Cl=4~9)	令和4年度	令和5年度
7	ビスフェノールB (別名: 4,4'-(1-メチルプロピリデン)ビスフェノール)	令和4年度	令和5年度
8	りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル	令和4年度	令和5年度

表3 令和4年度に信頼性評価の対象とした12物質群

名称	主な用途	選定根拠となった調査区分の記号**
報告済		
ベンゾフェノン-4 (別名: 2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン-5-スルホン酸)	医薬部外品添加物 (化粧品等) ²⁾	3. (1)
ロイコマラカイトグリーン (別名: 4,4'-ビス(ジメチルアミノ)トリフェニルメタン)	マラカイトグリーン (顔料) ¹⁾ 代謝物	3. (7)
今回報告		
ケトプロフェン	医薬品(消炎剤、鎮痛剤) ¹⁾	3. (1)
中鎖塩素化パラフィン類のうち塩素化テトラデカン類 (C=14、Cl=4~9)	中鎖塩素化パラフィン類 (C=14~17、Cl=4~9) として防水防火塗料、樹脂可塑剤、路面ペイント、印刷インキ、潤滑油 ¹⁾	3. (1)
中鎖塩素化パラフィン類のうち塩素化ペンタデカン類 (C=15、Cl=4~9)	同上	3. (1)

名称	主な用途	選定根拠となった調査区分の記号**
中鎖塩素化パラフィン類のうち塩素化ヘキサデカン類 (C=16、Cl=4~9)	同上	3.(1)
中鎖塩素化パラフィン類のうち塩素化ヘプタデカン類 (C=17、Cl=4~9)	同上	3.(1)
ビスフェノールB (別名: 4,4'-(1-メチルプロピリデン)ビスフェノール)	有機合成中間体 ¹⁾	3.(6)
りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル	可塑剤 ¹⁾	3.(1)
実施中		
フタル酸ジエチル*	可塑剤 ¹⁾	3.(1)
フタル酸ジ- <i>n</i> -ブチル*	塗料、顔料、接着剤、合成レザー及び塩化ビニル樹脂の可塑剤、香料の溶剤、織物用潤滑剤、ゴム練り加工剤及び農薬の補助剤 ²⁾	3.(1)
ベンラファキシン	医薬 (抗うつ剤) ³⁾	3.(1)

*化管法第一種指定化学物質

- 1) 化学工業日報社、17322の化学商品(2022)及びバックナンバー
- 2) 製品評価技術基盤機構、NITE化学物質総合情報提供システム (https://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/systemTop)
- 3) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構、医療用医薬品の添付文書情報 (http://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu_tenpu_base.html)

**選定根拠となった調査区分の記号

- 3.(1) 化学物質環境実態調査
- 3.(6) 欧州化学物質庁において高懸念物質とされた物質
- 3.(7) 専門家から提案された物質

II. 令和5年度に実施した文献情報に基づく影響評価(信頼性評価)の結果について

令和5年度に信頼性評価を実施した8物質群について、その評価結果及び信頼性の認められた文献情報から示唆された作用について物質群ごとに表4に示した。

1. 信頼性評価の実施

令和5年度に実施した8物質群の化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価について、化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価作業班会議(第1回:令和5年5月24日、第2回:同9月5日開催、第3回:同9月6日開催、非公開)において評価を実施し、信頼性評価のまとめと今後の対応案について検討を行った。(信頼性評価の結果は別添参照)

2. 令和5年度に実施した8物質群の信頼性評価のまとめ

(1)内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る8物質

- *メトホルミン：動物試験の報告において、エストロゲン作用、視床下部一下垂体－甲状腺軸への作用、インスリン様作用、インスリンシグナル伝達への影響、糖代謝の改善を示すこと、試験管内試験の報告において、抗エストロゲン作用、エストロゲン受容体発現抑制作用、ER α 発現抑制作用、ER β 発現促進作用、アンドロゲン受容体発現抑制作用、プロゲステロン受容体発現促進作用、がん細胞増殖抑制作用、アポトーシス促進作用、抗グルカゴン作用、抗インスリン作用、インスリンによるグリコーゲン合成作用の促進、インスリンのグルコース取り込み促進作用、インスリンによる GLUT4 関与のグルコース取込み促進、インスリン誘導性卵母細胞の成熟促進作用、インスリン様成長因子1受容体及びインスリン受容体の mRNA 発現誘導を示すこと、ヒトへの投与試験において、抗アンドロゲン様作用、インスリン感受性亢進、視床下部一下垂体－生殖腺軸への作用、視床下部一下垂体－甲状腺軸への作用を示すことが示唆された。
- *ケトプロフェン：動物試験の報告において、プロスタグランジン合成抑制作用を示すこと、試験管内試験の報告において、抗アンドロゲン作用を示すことが示唆された。
- *中鎖塩素化パラフィン類（塩素化テトラデカン類（C=14、Cl=4～9）、塩素化ペンタデカン類（C=15、Cl=4～9）、塩素化ヘキサデカン類（C=16、Cl=4～9）、塩素化ヘプタデカン類（C=17、Cl=4～9））：動物試験の報告において、甲状腺組織への作用、サイロキシンへのグルクロン酸抱合の増加による血中サイロキシン濃度低下作用を示すこと、試験管内試験の報告において、甲状腺ホルモンのトランスサイレチンへの結合阻害作用を示すことが示唆された。
- *ビスフェノール B：動物試験の報告において、エストロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用、視床下部一下垂体－生殖腺軸への作用、ステロイドホルモン産生の抑制、ステロイドホルモン関連遺伝子の発現抑制、ライディッヒ細胞のアンドロゲン合成阻害、ライディッヒ細胞の増殖促進及び成熟抑制、視床下部一下垂体－甲状腺軸への作用を示すこと、試験管内試験の報告において、エストロゲン作用、抗エストロゲン作用、G 蛋白質共役型エストロゲン受容体(GPER)活性化作用、抗アンドロゲン作用、脂肪酸代謝亢進 PPAR β/δ 結合阻害作用を示すことが示唆された。
- *りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル：動物試験の報告において、エストロゲンの上昇、アンドロゲンの低下、視床下部一下垂体－生殖腺(肝臓)軸への作用、ステロイドホルモン代謝への作用を示すこと、試験管内試験の報告において、抗アンドロゲン作用を示すことが示唆された。

(2)現時点では試験対象物質としない物質

- *今回は得られなかった。

表4 信頼性評価結果を基にした物質ごとの確認すべき作用
(第1段階試験管内試験の実施対象候補)

名称		示唆された作用						
		エストロゲン	抗エストロゲン	アンドロゲン	抗アンドロゲン	甲状腺ホルモン	抗甲状腺ホルモン	脱皮ホルモン
1	メトホルミン	○	○	○	○	○	○	—
2	ケトプロフェン	—	—	—	○	—	—	—
3	中鎖塩素化パラフィン類 ^注	—	—	—	—	○	○	—
4	ビスフェノールB	○	○	—	○	○	○	—
5	りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニ	○	○	○	○	—	—	—
合計	18 試験	3	3	2	4	3	3	0

○：既存知見から示唆された作用、—：試験管内試験を実施しない作用

注：塩素化テトラデカン類 (C=14、Cl=4~9)、塩素化ペンタデカン類 (C=15、Cl=4~9)、塩素化ヘキサデカン類 (C=16、Cl=4~9)、塩素化ヘプタデカン類 (C=17、Cl=4~9)

I. メトホルミン

1. 内分泌かく乱作用に関連する報告

メトホルミンの内分泌かく乱作用に関連する報告として、生態影響、生殖影響、抗腫瘍影響、抗エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用、がん細胞への影響、AMP 活性化プロテインキナーゼ経由でのがん細胞への影響、両生類卵母細胞への影響、哺乳類細胞の糖代謝への影響、ヒトへの投与試験に関する報告がある。

(1) 生態影響

②Ussery ら(2018)によって、メトホルミン(塩酸塩、Toronto Search Chemicals) 0.94 ± 0.131 、 3.18 ± 0.441 、 11.9 ± 1.35 、 36.5 ± 3.59 、 $108 \pm 8.29 \mu\text{g/L}$ (測定濃度)に受精後 118 時間齢から 28 日間ばく露したメダカ (*Oryzias latipes*)への影響が検討されている。その結果として、 $3.18 \mu\text{g/L}$ 以上のばく露区で体重の低値、 $11.9 \mu\text{g/L}$ 以上のばく露区で体長の低値が認められた。

また、メトホルミン(塩酸塩、Toronto Search Chemicals) $3.22 \pm 0.237 \mu\text{g/L}$ (測定濃度)に受精後 118 時間齢から 28 日間ばく露したメダカ (*O. latipes*)への影響(全身中 mRNA 相対発現量及び代謝物相対濃度の解析)が検討されている。その結果として、*hgs* (HMG-CoA synthesis) mRNA 相対発現量、*hcd* (β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) mRNA 相対発現量、L-リシン相対濃度、DL-3-アミノイソ酪酸相対濃度、L-プロリン相対濃度の低値、ステアリン相対濃度、パルミチン酸相対濃度、りん酸相対濃度、アラキドン酸相対濃度、L-メチルニコチンアミド相対濃度の高値が認められた。なお、*ac2* (acetyl-CoA carboxylase-2) mRNA 相対発現量、*scd* (stearoyl-CoA desaturase) mRNA 相対発現量、*elo* (elongation of very long chain fatty acids protein 1-like) mRNA 相対発現量には影響は認められなかった。

また、メトホルミン(塩酸塩、Toronto Search Chemicals) $3.22 \pm 0.237 \mu\text{g/L}$ (測定濃度)に受精後 118 時間齢から 165 日間ばく露したメダカ (*O. latipes*)への影響が検討されている。その結果として、雌肝臓中 11-ケトテストステロン濃度の高値が認められた。なお、雌雄体重、雌雄体長、雌雄肝臓中エストラジオール濃度、雄肝臓中 11-ケトテストステロン濃度には影響は認められなかった。

(15681)(評価結果の略号：△?、以下同じ)

想定される作用メカニズム：不明

なお、受精後 118 時間齢から 165 日間のばく露で内分泌関連影響が認められている濃度範囲で、受精後 118 時間齢から 28 日間のばく露で体重の低値も認められている点に注意を要すると判断された。また、著者らの考察では、サンプルサイズが小さく統計的な感度が低いため、さらなる検討が必要と記述している点に注意を要すると判断された。

③Niemuth と Klaper (2015)によって、メトホルミン(CAS 1115-70-4、塩酸塩、Sigma-Aldrich) $40 \mu\text{g/L}$ (設定濃度)に 30 日齢から 360 又は 365 日間ばく露したファットヘッドミノー (*Pimephales promelas*)への影響(320 日後から 40 日間交配試験、交配雌雄については 40 日後に組織学的検査、未交配雌雄については 45 日後に組織学的検査)が検討されている。その結果として、雄体重、雄肥満度、総産卵回数、平均産卵数の低値、雄間性度スコア、雄における間性出現率の高値が認められた。なお、雌体重、雌体長、雌肥満度、雌間性度スコア、雄二次性徴スコアには影響は認められなかった。(15705)(△○P)

想定される作用メカニズム：インスリンシグナル伝達への影響

④Niemuth ら(2015)によって、メトホルミン(CAS 1115-70-4、塩酸塩、Sigma-Aldrich) 40 μ g/L(設定濃度、半止水式における測定濃度は41 \pm 8 μ g/L)に28日間ばく露した成熟ファットヘッドミノー(*Pimephales promelas*)への影響が検討されている。その結果として、雄肝臓中 VTG (vitellogenin) mRNA 相対発現量の高値が認められた。なお、雌肝臓中 VTG mRNA 相対発現量、雌雄血漿中ビテロゲニン濃度、雄血漿中テストステロン濃度、総産卵数、産卵回数、平均産卵数、雌雄肝臓中 CYP17 mRNA 相対発現量、雌雄肝臓中 CYP19A mRNA 相対発現量、雌雄肝臓中 CYP3A4 mRNA 相対発現量、雌雄肝臓中 CYP11A mRNA 相対発現量、雌雄肝臓中 3 β -HSD mRNA 相対発現量、雌雄肝臓中 PXR (pregnane X receptor) mRNA 相対発現量、雌雄肝臓中 GK (glucokinase) mRNA 相対発現量、雌雄肝臓中 FBPase (fructose-1,6-bisphosphatase) mRNA 相対発現量、雌雄肝臓中 FASN (fatty acid synthase) mRNA 相対発現量には影響は認められなかった。(15707)(Δ OP)

想定される作用メカニズム:エストロゲン作用(雄肝臓中 VTG (vitellogenin)mRNA 相対発現量の高値)

⑤Lee ら(2019)によって、メトホルミン(塩酸塩、Sigma-Aldrich) 49.86 \pm 2.46、139.96 \pm 6.6、373.06 \pm 16.8 μ g/L(測定濃度)に13週齢以上から4週間ばく露したメダカ(*Oryzias latipes*) F₀への影響(最後の1週間に交配、採卵)が検討されている。その結果として、雄において、139.96 μ g/L以上のばく露区で肝臓中グルタチオン濃度の低値、373.06 μ g/Lのばく露区で肝臓中活性酸素種濃度、肝臓中 CYP19a mRNA 相対発現量、肝臓中 ER α mRNA 相対発現量の高値が認められた。なお、肝臓中 ER β 1 mRNA 相対発現量、肝臓中 ER β 2 mRNA 相対発現量、肝臓中 VTG1 mRNA 相対発現量、肝臓中 VTG2 mRNA 相対発現量、生殖腺組織検査における間性発現率、肝臓中カタラーゼ相対活性、肝臓中グルタチオン-S-トランスフェラーゼ相対活性には影響は認められなかった。雌において、49.86 μ g/L以上のばく露区で生殖腺組織検査における間性発現率の高値、49.86 \pm 2.46、139.96 \pm 6.6、373.06 \pm 16.8 μ g/Lのばく露区で肝臓中 ER β 1 mRNA 相対発現量の低値(139.96 μ g/L区では有意差なし)、肝臓中カタラーゼ相対活性の低値(139.96 μ g/L区では高値)、373.06 μ g/Lのばく露区で肝臓中 VTG2 mRNA 相対発現量の低値が認められた。なお、肝臓中 CYP19a mRNA 相対発現量、肝臓中 ER α mRNA 相対発現量、肝臓中 ER β 2 mRNA 相対発現量、肝臓中 VTG1 mRNA 相対発現量、肝臓中グルタチオン-S-トランスフェラーゼ相対活性、肝臓中グルタチオン濃度、肝臓中活性酸素種濃度には影響は認められなかった。

また、メトホルミン(塩酸塩、Sigma-Aldrich) 49.86 \pm 2.46、139.96 \pm 6.6、373.06 \pm 16.8 μ g/L(測定濃度)にF₀による産卵後から15週間ばく露したメダカ(*O. latipes*) F₁への影響(最後の1週間に交配、採卵)が検討されている。その結果として、雄において、49.86 μ g/Lのばく露区で肝臓中 VTG1 mRNA 相対発現量の低値が認められた。なお、肝臓中 VTG2 mRNA 相対発現量、肝臓中 CYP19a mRNA 相対発現量、肝臓中 ER α mRNA 相対発現量、肝臓中 ER β 1 mRNA 相対発現量、肝臓中 ER β 2 mRNA 相対発現量、肝臓中カタラーゼ相対活性、肝臓中グルタチオン-S-トランスフェラーゼ相対活性、肝臓中グルタチオン濃度、肝臓中活性酸素種濃度には影響は認められなかった。雌において、49.86 μ g/L以上のばく露区で生殖腺組織検査における間性発現率の高値、373.06 μ g/Lのばく露区で肝臓中 VTG1 mRNA 相対発現量の低値、肝臓中 ER α mRNA 相対発現量の高値が認められた。なお、肝臓中 VTG2 mRNA 相対発現量、肝臓中 CYP19a mRNA 相対発現量、肝臓中 ER β 1 mRNA 相対発現量、肝臓中 ER β 2 mRNA 相対発現量、肝臓中カタラーゼ相対活性、肝臓中グルタチオン-S-トランスフェラーゼ相対活性、肝臓中グルタチオン濃度、肝臓中活性酸素種濃度には影響は認められなかった。(15679)(\times -)

想定される作用メカニズム:不明

なお、本試験結果の解釈にあたっては、死亡率、総産卵数、孵化率、卵稚仔形態異常率、生殖腺体指数、肝臓体指数、肥満度、組織病理学的変化(肝臓、脳、腎臓、鰓、甲状腺)については二世

代とも有意差なしとの言及があるが、実測データを含む詳細な記載がない点に注意を要すると判断された。また、認められた影響について統一的な解釈が現時点では得られない点に注意を要すると判断された。

- ⑥Capiotti ら(2014)によって、メトホルミン(塩酸塩、Merck) 1,290 $\mu\text{g/L}$ (=10 μM)(設定濃度)に4日間ばく露したゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)(試験開始前に14日間の111mMグルコース含有水中飼育処置)への影響が検討されている。その結果として、血中グルコース濃度の低値が認められた。

また、メトホルミン(塩酸塩、Merck) 1,290 $\mu\text{g/L}$ (=10 μM)(設定濃度)に4日間ばく露したゼブラフィッシュ(*D. rerio*)(試験開始前に14日間の111mMグルコース含有水中飼育処置、更に7日間のグルコースばく露中断ウォッシュアウト処置)への影響が検討されている。その結果として、血中グルコース濃度の低値が認められた。

(15712)(○?)

想定される作用メカニズム：インスリン受容体の活性化

なお、本試験結果の解釈にあたっては、メトホルミン投与前に高グルコースばく露処置を受けた試験である点に注意を要すると判断された。

※参考 生態影響(今回評価対象としなかった文献)

- ①Alla ら(2021)によって、メトホルミン(CAS 1115-70-4、塩酸塩、USP、100%) 1.29、12.9、129、1,290、12,900 $\mu\text{g/L}$ (=0.01、0.1、1、10、100 μM)(設定濃度)に受精後4日齢から24時間ばく露したゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)への影響(行動試験)が検討されている。その結果として、1.29、12.9、1,290、12,900 $\mu\text{g/L}$ のばく露区で総最大移動距離(maximum accumulated distance)の低値、平均移動角度(mean angle)の高値が認められた。

また、メトホルミン(CAS 1115-70-4、塩酸塩、USP、100%) 1.29、12.9、129、1,290、12,900 $\mu\text{g/L}$ (=0.01、0.1、1、10、100 μM)(設定濃度)に24時間ばく露した成熟雌ミジンコ(*Daphnia pulex*)への影響(行動試験)が検討されているが、総最大移動距離(maximum accumulated distance)、平均移動角度(mean angle)には影響は認められなかった。(15666)

評価未実施の理由：評価項目について、内分泌かく乱作用との関連性は低いと考えられたため。

- ⑦Zang ら(2017)によって、メトホルミン(塩酸塩、Enzo Life Sciences) 2,580 $\mu\text{g/L}$ (=20 μM)(設定濃度)に7日間ばく露したゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)(遺伝子組み換えによる糖尿病発症型 ins-EGFP 系統、4~6ヶ月齢、通常6倍に相当する日毎給餌量を6週間投与による給餌誘導性肥満(DIO: diet-induced obesity)処置)への影響が検討されている。その結果として、血中グルコース濃度の低値が認められた。(15697)

評価未実施の理由：評価項目について、内分泌かく乱作用との関連性は低いと考えられたため。

(2) 生殖影響

- ①Tas ら(2013)によって、メトホルミン(Glukofen、Sandoz) 50mg/kg/day を14日間経口投与した雌 Wistar ラット(9週齢で正中線開腹及び両卵巣摘出処置し17 β -エストラジオール半水和物 4 mg/kg/day を経口投与)への影響が検討されている。その結果として、子宮内膜高、子宮内宮上皮細胞高、子宮内膜腺密度の低値が認められた。(15721)(×)

想定される作用メカニズム：抗エストロゲン様作用

なお、本試験結果の解釈にあたっては、製品(純度を含む成分の記載なし)を使用している点、試

験生物の入手先の記載がない点に注意を要すると判断された。

- ②Yan ら(2015)によって、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 100mg/kg/day を3ヶ月齢以上から8週間経口投与した雄SDラットへの影響(高脂肪餌飼育し12時間絶食後に試験)が検討されている。その結果として、体重、増加体重、恒常性モデル評価によるインスリン耐性(HOMA-IR: homeostatic model assessment-insulin resistance)、血中グルコース濃度、血清中インスリン濃度、血清中レプチン濃度、血清中エストラジオール濃度、精巣中アポトーシス細胞率の低値、精巣絶対・相対重量、精巣中精原細胞数、精巣中ライディッヒ細胞数、精巣中セルトリ細胞数、精巣上体中精子濃度、生存精子率、運動精子率、正常形態精子率、血清中テストステロン濃度の高値が認められた。なお、血清中卵巣刺激ホルモン濃度、血清中黄体形成ホルモン濃度には影響は認められなかった。(15703)(△○P)
- 想定される作用メカニズム：糖代謝の改善

なお、本試験結果の解釈にあたっては、疾病モデル動物への症状改善効果を報告した論文である点に注意を要すると判断された。

- ③Derkach ら(2020)によって、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 120mg/kg/day を4週間経口投与した雄Wistarラット(9週間高脂肪餌投与後にストレプトゾトシン投与、更に3週間高脂肪餌投与し2型糖尿病を発症)への影響が検討されている。その結果として、体重、脂肪重量、体脂肪率、血中グルコース濃度(絶食後)、血中グルコース濃度(グルコース耐性試験120分後及び曲線下面積)、血清中インスリン濃度(グルコース耐性試験120分後)、血清中レプチン濃度(グルコース耐性試験120分後)、精巣中レプチン濃度、ヘモグロビンA1c値、血清中トリグリセリド濃度、血清中遊離脂肪酸濃度、形態異常精子率の低値、精巣相対重量、血清中テストステロン濃度(投与終了3日前の11:00~15:00)、精巣中テストステロン濃度、精巣中17-ヒドロキシプロゲステロン濃度、精巣中アンドロステンジオン濃度、精巣中*Star* mRNA 相対発現量、精巣中*Lhr* mRNA 相対発現量、精巣上体尾中精子濃度、精巣精細管中黄体形成ホルモン受容体蛋白質相対発現量の高値が認められた。なお、精巣絶対重量、血清中インスリン濃度(絶食後)、血清中レプチン濃度(絶食後)、血清中黄体形成ホルモン濃度(絶食後)、精巣中*Cyp11a1* mRNA 相対発現量、精巣中プロゲネロン濃度、精巣中プロゲステロン濃度、運動精子率には影響は認められなかった。(15668)(△?)

想定される作用メカニズム：不明

なお、本試験結果の解釈にあたっては、疾病モデル動物への症状改善効果を報告した論文である点に注意を要すると判断された。

- ④Hu ら(2017)によって、メトホルミン(Bristol-Myers) 500mg/kg/day を8週間経口投与した雄Wistarラット(9週齢から試験期間中を通して高脂肪餌投与、5週間後に一晩絶食後ストレプトゾトシンを腹腔内投与して2型糖尿病を発症)への影響が検討されている。その結果として、恒常性モデル評価によるインスリン耐性(HOMA-IR: homeostatic model assessment-insulin resistance)、血清中甲状腺刺激ホルモン濃度の低値、血清中遊離サイロキシン濃度、血清中遊離トリヨードサイロニン濃度の高値が認められた。なお、体重、血漿中グルコース濃度(絶食後)、血漿中インスリン濃度(絶食後)には影響は認められなかった。

また、メトホルミン(Bristol-Myers) 500mg/kg/day を8週間経口投与した雄Wistarラット(健常)への影響が検討されている。その結果として、体重、血清中甲状腺刺激ホルモン濃度の低値、血清中遊離サイロキシン濃度、血清中遊離トリヨードサイロニン濃度の高値が認められた。なお、HOMA-IR、血漿中グルコース濃度(絶食後)、血漿中インスリン濃度(絶食後)には影響は認められなかった。(15686)(△○P)

想定される作用メカニズム：視床下部一下垂体一甲状腺軸への作用

なお、本試験結果の解釈にあたっては、疾病モデル動物への症状改善効果を報告した論文である点に注意を要すると判断された。また、健常動物を用いた試験においては体重の低値が認められている点に注意を要すると判断された。

- ⑤Brill と Moenter (2009)によって、メトホルミン(Sigma) 500mg/kg/day (飲水中濃度 2.5mg/mL に相当)を 21 日齢から 35~38 日齢まで経口投与した雌 C57B16/J マウス(離乳後高脂肪餌で飼育)への影響が検討されている。その結果として、膣開口率(27 日齢)、血清中インスリン濃度(27 日齢)の低値、膣開口日の遅延が認められた。なお、体重(膣開口日)、血清中遊離脂肪酸濃度(35~38 日齢)、血清中インスリン濃度(35~38 日齢)には影響は認められなかった。なお、メトホルミン(Sigma) 500mg/kg/day (飲水中濃度 2.5mg/mL に相当)を 21 日齢から 35~38 日齢まで経口投与した雌 C57B16/J マウス(離乳後普通餌で飼育)への影響が検討されているが、体重(膣開口日)、膣開口率(27 日齢)、膣開口日、血清中インスリン濃度、血清中遊離脂肪酸濃度には影響は認められなかった。(15746)(△○P)

想定される作用メカニズム：インスリン様作用

なお、疾病モデル動物への症状改善効果を報告した論文である点に注意を要すると判断された。

(3) 抗腫瘍影響

- ②Zou ら(2016)によって、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 200mg/kg/day を 6 週齢から 2 週間経口投与した雌 BALB/c マウス(ヒト子宮内膜がん細胞 HEC-1B を異種移植片処置)への影響(投与終了から 21 日後に試験、測定対象蛋白質はアポトーシス抑制分子又は増殖促進分子)が検討されている。その結果として、腫瘍体積、腫瘍重量、増殖促進因子 Ki67 蛋白質相対発現量の低値、アディポジェネシス関連蛋白質(human Forkhead box O1: FOXO1)相対発現量(核内)、りん酸化 AMP 活性化プロテインキナーゼ(phosphorylated AMP-activated protein kinase: p-AMPK)蛋白質相対発現量の高値が認められた。なお、FOXO1 蛋白質相対発現量(細胞質内)には影響は認められなかった。(15698)(△?)

想定される作用メカニズム：ヒト子宮内膜がん細胞の増殖抑制作用

※参考 抗腫瘍影響(今回評価対象としなかった文献)

- ①Gu ら(2017)によって、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 100mg/kg/day を 4~5 週齢から 19 日間腹腔内投与したマウス(系統の記載なし、ヒト子宮内膜がん細胞 Ishikawa を皮下移植処置)への影響(測定対象蛋白質はアポトーシス抑制分子又は増殖促進分子)が検討されている。その結果として、腫瘍体積、Ki-67 蛋白質(細胞増殖促進因子)相対発現量、Bcl-2 蛋白質(アポトーシス抑制因子)相対発現量、Bcl-xL(アポトーシス抑制因子)蛋白質相対発現量の低値、Fas 蛋白質(アポトーシス促進因子)相対発現量の高値、が認められた。なお、FasL 蛋白質(アポトーシス促進因子)相対発現量には影響は認められなかった。(15692)

評価未実施の理由：評価項目について、内分泌かく乱作用との関連性は低いと考えられたため。

(4) 抗エストロゲン作用

- ①Jung ら(2011)によって、メトホルミン(Sigma) 10、100、1,000、10,000 μ M(=1,290、12,900、129,000、1,290,000 μ g/L)の濃度にばく露したヒト乳がん細胞 MCF-7 への影響が検討されている。その結果と

して、1,000 μ M(=129,000 μ g/L)以上の濃度区で細胞増殖率の低値が認められた。なお、細胞生存率には影響は認められなかった。

また、メトホルミン(Sigma) 1,000、10,000 μ M(=129,000、1,290,000 μ g/L)の濃度にはばく露(17 β -エストラジオール 10nM 共存下)したヒト乳がん細胞 MCF-7 への影響が検討されている。その結果として、1,000 μ M(=129,000 μ g/L)以上の濃度区で、腫瘍様塊(mammosphere)発生率、がん幹細胞マーカー OCT4 mRNA 相対発現量、がん幹細胞マーカー OCT4 mRNA のエストロゲン応答配列(ERE)相対発現量(エストロゲン受容体 α 共発現下)の低値が認められた。(15727)(\times)

想定される作用メカニズム：細胞増殖抑制作用

なお、本試験結果の解釈にあたっては、培養時間(ばく露時間)を含む記載全般が不明瞭である点に注意を要すると判断された。

(5) 抗アンドロゲン作用

① Wang ら(2015)によって、メトホルミン(Sigma) 2,000 μ M(=258,000 μ g/L)の濃度に7日間ばく露したヒト前立腺がん細胞 LNCaP への影響が検討されている。その結果として、細胞増殖率の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma) 1,000、5,000、10,000、20,000 μ M(=129,000、646,000、1,290,000、2,580,000 μ g/L)の濃度に24時間ばく露(ジヒドロテストステロン 10nM 共存下)したヒト前立腺がん細胞 LNCaP への影響が検討されている。その結果として、5,000 μ M(=646,000 μ g/L)以上の濃度区で PSA (アンドロゲン受容体(AR)応答因子の一種) mRNA 相対発現量、NKX3.1 (AR 応答因子の一種) mRNA 相対発現量の低値、10,000 μ M(=1,290,000 μ g/L)以上の濃度区でアンドロゲン受容体蛋白質相対発現量の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma) 2,000 μ M(=258,000 μ g/L)の濃度に7日間ばく露したヒト前立腺がん細胞 CWR22Rv1 への影響が検討されている。その結果として、細胞増殖率の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma) 1,000、5,000、10,000、20,000 μ M(=129,000、646,000、1,290,000、2,580,000 μ g/L)の濃度に24時間ばく露したヒト前立腺がん細胞 CWR22Rv1 への影響が検討されている。その結果として、5,000 μ M(=129,000 μ g/L)以上の濃度区で AR 蛋白質発現量、AR-V7 蛋白質発現量、PSA (AR 応答因子の一種) mRNA 相対発現量の低値、1,000、5,000、20,000 μ M(=129,000、646,000、2,580,000 μ g/L)の濃度区で NKX3.1 (AR 応答因子の一種) mRNA 相対発現量の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma) 10,000 μ M(=1,290,000 μ g/L)の濃度に48時間ばく露したヒト前立腺がん細胞 CWR22Rv1 への影響が検討されている。その結果として、アポトーシス率の高値が認められた。(15706)(Δ ?)

想定される作用メカニズム：細胞増殖抑制作用

② Tran ら(2017)によって、メトホルミン(Sigma、PHR1084-500MG) 100,000 μ M(=12,900,000 μ g/L)までの濃度に72時間ばく露したヒト前立腺がん細胞 LNCaP (アンドロゲン受容体 AR 及び非ヒストン蛋白質の一種 p53 を発現)への影響が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 2,900 μ M(=375,000 μ g/L)の濃度で、細胞増殖率の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma、PHR1084-500MG) 1,000、2,500 μ M(=129,000、323,000 μ g/L)の濃度に72時間ばく露したヒト前立腺がん細胞 LNCaP (AR 及び p53 を発現)への影響が検討されている。その結果として、1,000 μ M(=129,000 μ g/L)以上の濃度区で、アポトーシス率の高値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma、PHR1084-500MG) 100,000 μ M(=12,900,000 μ g/L)までの濃度に72時間

ばく露したヒト前立腺上皮細胞 PrEC(正常細胞)への影響が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 3,400 μ M(=439,000 μ g/L)の濃度で、細胞増殖率の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma、PHR1084-500MG) 1,000、2,500 μ M(=129,000、323,000 μ g/L)の濃度に 72 時間ばく露したヒト前立腺上皮細胞 PrEC(正常細胞)への影響が検討されている。その結果として、2,500 μ M(=323,000 μ g/L)以上の濃度区で、アポトーシス率の高値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma、PHR1084-500MG) 100,000 μ M(=12,900,000 μ g/L)までの濃度に 72 時間ばく露したヒト前立腺がん細胞 PC3 (AR も p53 も発現していない)への影響が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 16,500 μ M(=2,130,000 μ g/L)の濃度で、細胞増殖率の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma、PHR1084-500MG) 1,000、2,500 μ M(=129,000、323,000 μ g/L)の濃度に 72 時間ばく露したヒト前立腺がん細胞 PC3 (AR も p53 も発現していない)への影響が検討されている。その結果として、2,500 μ M(=323,000 μ g/L)以上の濃度区で、アポトーシス率の高値が認められた。

(15548)(Δ ?)

想定される作用メカニズム：細胞増殖抑制作用、アポトーシス促進作用

(6)がん細胞への影響

①Fuentes-Mattei ら(2014)によって、メトホルミン 100、1,000、10,000 μ M(=12,900、129,000、1,290,000 μ g/L)の濃度に 4 日間(成熟 3T3-L1 アジポサイト共存下)ばく露したヒト乳がん細胞 MCF-7 への影響が検討されている。その結果として、細胞増殖率の低値が認められた。

また、メトホルミン 10,000 μ M(=1,290,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露した成熟 3T3-L1 アジポサイトへの影響が検討されている。その結果として、インスリン様増殖因子 IGF-1 蛋白質相対発現量、IGF-II 蛋白質相対発現量、レプチン蛋白質相対発現量、TIMP-1 (Mus musculus tissue inhibitor of metalloproteinase 1)蛋白質相対発現量の低値、アディポネクチン蛋白質相対発現量、線維芽細胞増殖因子 FGF-21 蛋白質相対発現量の高値が認められた。なお、Pref-1 (Preadipocyte factor 1)蛋白質相対発現量には影響は認められなかった。(15711)(\times -)

想定される作用メカニズム：がん細胞増殖抑制作用、アディポカイン分泌促進または抑制作用

なお、本試験結果の解釈にあたっては、試薬の入手先及び純度の記載がない点に注意を要すると判断された。

②Xie ら(2021)によって、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 1,000 μ M(=129,000 μ g/L)の濃度に 5 日間ばく露したヒト前立腺がん細胞 LNCaP への影響が検討されている。その結果として、細胞生存率、AR (アンドロゲン受容体) mRNA 相対発現量、Bcl2/Bax 蛋白質相対発現量比の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 1,000 μ M(=129,000 μ g/L)の濃度に 5 日間ばく露したヒト前立腺がん細胞 VCaP への影響が検討されている。その結果として、細胞生存率、AR mRNA 相対発現量、Arv7 (変異型アンドロゲン受容体) mRNA 相対発現量の低値、Bcl2/Bax 蛋白質相対発現量比の高値が認められた。(15665)(Δ OP)

想定される作用メカニズム：アンドロゲン受容体発現抑制作用、アポトーシス促進作用、がん細胞増殖抑制作用

※参考 がん細胞への影響(今回評価対象としなかった文献)

③Gu ら(2017)によって、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 20,000 μ M(=2,520,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露したヒト子宮内膜がん細胞 Ishikawa への影響(p62 等はオートファジー関連蛋白質)が検討されて

いる。その結果として、生存率、生存率(エストラジオール 100nM 共存下)、エストロゲン受容体 ER α 蛋白質相対発現量、p62 蛋白質相対発現量の低値、Beclin-1 蛋白質相対発現量、LC3bI 蛋白質相対発現量、LC3bII 蛋白質相対発現量、アポトーシス率、初期アポトーシス率の高値が認められた。

メトホルミン(Sigma-Aldrich) 20,000 μ M(=2,520,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露したヒト子宮内膜がん細胞 RL95-2 への影響(p62 等はオートファジー関連蛋白質)が検討されている。その結果として、生存率、生存率(エストラジオール 100nM 共存下)、エストロゲン受容体 ER α 蛋白質相対発現量、p62 蛋白質相対発現量の低値、Beclin-1 蛋白質相対発現量、LC3bI 蛋白質相対発現量、LC3bII 蛋白質相対発現量、アポトーシス率、初期アポトーシス率の高値が認められた。(15692)

評価未実施の理由：細胞死亡率の高値が認められる濃度での試験結果であるため。

(7) AMP 活性化プロテインキナーゼ経路でのがん細胞への影響

①Xie ら(2011)によって、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 1、10、100 μ M(=129、1,290、12,900 μ g/L、細胞増殖率試験では 0.1 μ M 区も設定)の濃度に 72 時間ばく露したヒト子宮内膜がん細胞 Ishikawa (分化型)への影響が検討されている。その結果として、1 μ M(=129 μ g/L)以上の濃度区で細胞増殖率の低値(IC₅₀ 値 21.4 μ M)、プロゲステロン受容体(PR) A 蛋白質発現量、総 PR mRNA 相対発現量の高値、10 μ M(=129 μ g/L)以上の濃度区で PRB 蛋白質発現量、PRB mRNA 相対発現量の高値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 1、10、100 μ M(=129、1,290、12,900 μ g/L、細胞増殖率試験では 0.1 μ M 区も設定)の濃度に 72 時間ばく露したヒト子宮内膜がん細胞 HEC-1B (中程度の分化型)への影響が検討されている。その結果として、1 μ M(=129 μ g/L)以上の濃度区で細胞増殖率の低値(IC₅₀ 値 18.9 μ M)、PRA 蛋白質発現量、PRB 蛋白質発現量、PRB mRNA 相対発現量、総 PR mRNA 相対発現量の高値が認められた。

なお、これらの影響は、AMP 活性化プロテインキナーゼ(AMP-activated protein kinase: AMPK)阻害剤である Compound C 前処理によって抑制された。

(15735)(Δ OP)

想定される作用メカニズム：がん細胞増殖抑制作用、プロゲステロン受容体発現促進作用

②Saguyod ら(2020)によって、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 10、100 μ M(=1,290、12,900 μ g/L)の濃度に 48 時間ばく露(17 β -エストラジオール 10nM で 24 時間前処理後)したヒト子宮内膜がん細胞 Ishikawa (標準的グルコース濃度 5.5mM にて培養)への影響が検討されている。その結果として、10 μ M(=1,290 μ g/L)以上の濃度区で細胞増殖率の低値、100 μ M(=12,900 μ g/L)の濃度区でサイクリン D1 (cyclin D1: CCND1) mRNA 相対発現量の低値、プロゲステロン受容体(PGR) mRNA 相対発現量、プロゲステロン受容体-B (PGR-B) mRNA 相対発現量、PGR-B/PGR mRNA 相対発現量比の高値が認められた。なお、非接着性細胞(endosphere)率には影響は認められなかった。

また、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 10、100 μ M(=1,290、12,900 μ g/L)の濃度に 48 時間ばく露(17 β -エストラジオール 10nM で 24 時間前処理後)したヒト子宮内膜がん細胞 Ishikawa (高グルコース濃度 17.5mM にて培養)への影響が検討されている。その結果として、100 μ M(=12,900 μ g/L)の濃度区で PGR-B/PGR mRNA 相対発現量比の低値、PGR mRNA 相対発現量の高値が認められた。なお、細胞増殖率、CCND1 mRNA 相対発現量、PGR-B mRNA 相対発現量、endosphere 率には影響は認められなかった。

また、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 10、100 μ M(=1,290、12,900 μ g/L)の濃度に 48 時間ばく露(前処理なし)したヒト子宮内膜がん細胞 Ishikawa (標準的グルコース濃度 5.5mM にて培養)への影響が検

討されている。その結果として、100 μ M(=12,900 μ g/L)の濃度区で endosphere 率の低値が認められた。なお、細胞増殖率、CCND1 mRNA 相対発現量、PGR mRNA 相対発現量、PGR-B mRNA 相対発現量、PGR-B/PGR mRNA 相対発現量比には影響は認められなかった。

また、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 10、100 μ M(=1,290、12,900 μ g/L)の濃度に 48 時間ばく露(前処理なし)したヒト子宮内膜がん細胞 Ishikawa (高グルコース濃度 17.5mM にて培養)への影響が検討されている。その結果として、10 μ M(=1,290 μ g/L)の濃度区で細胞増殖率の高値、100 μ M(=12,900 μ g/L)の濃度区で PGR-B/PGR mRNA 相対発現量比の低値が認められた。なお、CCND1 mRNA 相対発現量、PGR mRNA 相対発現量、PGR-B mRNA 相対発現量、endosphere 率には影響は認められなかった。

なお、これらの影響のうち PGR-B の発現誘導は、AMP 活性化プロテインキナーゼ(AMP-activated protein kinase: AMPK)阻害剤である Compound C の投与で抑制、活性化剤である AICA リボヌクレオチド(5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside: AICAR)の投与で活性化された。(15667)(Δ OP)

想定される作用メカニズム：がん細胞増殖抑制作用、プロゲステロン受容体発現促進作用

なお、本試験結果の解釈にあたっては、細胞増殖率の測定以外は 100 μ M 区のみ提示されている点に注意を要すると判断された。

- ③Collins ら(2019)によって、メトホルミン(塩酸塩、Sigma-Aldrich) 10、50、100、200 μ M(=1,290、6,460、12,900、25,800 μ g/L)の濃度に 72 時間ばく露したヒト子宮内膜がん細胞 EM2 への影響が検討されている。その結果として、10 μ M(=1,290 μ g/L)以上の濃度で細胞生存率(24 時間)、エストロゲン受容体 α (ER α) mRNA 相対発現量、ER α 蛋白質相対発現量の低値、50 μ M(=6,460 μ g/L)以上の濃度区で細胞生存率(72 時間)の低値、100 μ M(=12,900 μ g/L)以上の濃度区で切断型ポリ(ADP リボース)ポリメラーゼ蛋白質相対発現量、AMP 活性化プロテインキナーゼ(phosphorylated AMP-activated protein kinase: p-AMPK)蛋白質相対発現量の高値が認められた。なお、総プロゲステロン受容体(PR) mRNA 相対発現量、PR-A mRNA 相対発現量、PR-B mRNA 相対発現量、PR-A 蛋白質相対発現量には影響は認められなかった。

また、メトホルミン(塩酸塩、Sigma-Aldrich) 10、50、100、200 μ M(=1,290、6,460、12,900、25,800 μ g/L)の濃度に 72 時間ばく露したヒト子宮内膜がん細胞 EM3 への影響が検討されている。その結果として、10、100、200 μ M(=1,290、12,900、25,800 μ g/L)の濃度で細胞生存率(24 時間)の低値、切断型ポリ(ADP リボース)ポリメラーゼ蛋白質相対発現量の高値(50 μ M 区データは提示なし)、100 μ M(=12,900 μ g/L)以上の濃度区で細胞生存率(72 時間)、ER α mRNA 相対発現量、ER α 蛋白質相対発現量の低値、PRA 蛋白質相対発現量、総 PR mRNA 相対発現量、PR-B mRNA 相対発現量、りん酸化 p-AMPK 蛋白質相対発現量の高値、200 μ M(=25,800 μ g/L)の濃度区で PR-A mRNA 相対発現量の高値が認められた。

なお、これらの影響の多くは、AMPK 阻害剤である Compound C 同時ばく露によって抑制された。(15683)(Δ OP)

想定される作用メカニズム：がん細胞増殖抑制作用、エストロゲン受容体発現抑制作用、プロゲステロン受容体発現促進作用

なお、本試験結果の解釈にあたっては、細胞増殖率の測定以外は 50 μ M 区のみ提示していない点に注意を要すると判断された。

- ④Zou ら(2016)によって、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 500、1,000、5,000 μ M(=64,600、129,000、646,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露(細胞増殖率は 48、72 時間も実施)したヒト子宮内膜がん細胞

Ishikawa への影響が検討されている。その結果として、500 μ M(=64,600 μ g/L)以上の濃度区で細胞増殖率(72 時間)の低値、1,000 μ M(=129,000 μ g/L)以上の濃度区でアポトーシス率の高値、5,000 μ M(=646,000 μ g/L)の濃度区で細胞増殖率(24 時間)の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 500、1,000、2,000 μ M(=64,600、129,000、258,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露(細胞増殖率は 48、72 時間も実施)したヒト子宮内膜がん細胞 Ishikawa への影響が検討されている。その結果として、500 μ M(=64,600 μ g/L)以上の濃度区でアディポジェネシス関連蛋白質(human Forkhead box O1: FOXO1)りん酸化率の低値、2,000 μ M(=258,000 μ g/L)の濃度区で AMP 活性化プロテインキナーゼ(phosphorylated AMP-activated protein kinase: p-AMPK)りん酸化率、FOXO1 蛋白質相対発現量の高値が認められた。なお、FOXO1 mRNA 相対発現量、プロテインキナーゼ B (Akt)りん酸化率には影響は認められなかった。

また、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 2,000 μ M(=258,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露(細胞増殖率は 48、72 時間も実施)したヒト子宮内膜がん細胞 HEC-IB への影響が検討されている。その結果として、細胞増殖率(24、48、72 時間)、FOXO1 りん酸化率の低値、p-AMPK りん酸化率、FOXO1 相対発現量の高値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 2,000 μ M(=258,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露(細胞増殖率は 48、72 時間も実施)したヒト子宮内膜がん細胞 HHUA への影響が検討されている。その結果として、細胞増殖率(24、48、72 時間)の低値が認められた。なお、FOXO1 りん酸化率、p-AMPK りん酸化率、FOXO1 相対発現量には影響は認められなかった。

なお、これらの影響の多くは、AMPK 阻害剤である Compound C 同時ばく露によって抑制された。
(15698)(Δ ?)

想定される作用メカニズム：細胞増殖抑制作用

- ⑤Zhang ら(2017)によって、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 1,000、5,000、15,000 μ M(=129,000、646,000、1,940,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露したヒト子宮内膜がん細胞 Ishikawa(分化型)への影響が検討されている。その結果として、1,000 μ M(=129,000 μ g/L)以上の濃度区でエストロゲン受容体 α (ER α) mRNA 相対発現量の低値、エストロゲン受容体 β (ER β) mRNA 相対発現量の高値、5,000 μ M(=646,000 μ g/L)以上の濃度区で ER α 蛋白質相対発現量、細胞増殖率、細胞増殖率(エストラジオール 1 μ M 共存下)、*c-fos* (proto-oncogene の一種) mRNA 相対発現量、*c-myc* (proto-oncogene の一種) mRNA 相対発現量の低値、ER β 蛋白質相対発現量の高値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 1,000、5,000、15,000 μ M(=129,000、646,000、1,940,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露したヒト子宮内膜がん細胞 HEC-1-A(未分化型)への影響が検討されている。その結果として、1,000 μ M(=129,000 μ g/L)以上の濃度区で ER α mRNA 相対発現量の低値、ER β mRNA 相対発現量の高値、5,000 μ M(=646,000 μ g/L)以上の濃度区で ER α 蛋白質相対発現量、細胞増殖率、細胞増殖率(エストラジオール 1 μ M 共存下)、*c-fos* mRNA 相対発現量、*c-myc* mRNA 相対発現量の低値、ER β 蛋白質相対発現量の高値が認められた。

なお、これらの影響の多くは、AMPK 阻害剤である Compound C 前処理によって抑制された。
(15690)(Δ OP)

想定される作用メカニズム：がん細胞増殖抑制作用、ER α 発現抑制作用、ER β 発現促進作用

- ⑥Madsen ら(2015)によって、メトホルミン(塩酸塩、Sigma) 1,000、2,000、5,000 μ M(=129,000、258,000、646,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露したラット肝臓がん細胞 FaO への影響(SRC は p160 ステロイド受容体コアクチベーター、G6pc はグルコース-6-フォスファターゼ、その他は脂質代謝関連蛋白質

の各遺伝子が検討されている。その結果として、1,000 μ M(=129,000 μ g/L)以上の濃度区で *SRC-2* mRNA 相対発現量、*G6pc* mRNA 相対発現量、*Elov6* mRNA 相対発現量、*Egr1* mRNA 相対発現量、2,000 μ M(=258,000 μ g/L)以上の濃度区で *Fasn* mRNA 相対発現量、*Hmgcr* mRNA 相対発現量、*Hmgcs1* mRNA 相対発現量、*Cyp51* mRNA 相対発現量、*Nsdh1* mRNA 相対発現量、*Sqle* mRNA 相対発現量の低値、*Insr* mRNA 相対発現量、*lgfbp1* mRNA 相対発現量の高値、2,000 μ M(=258,000 μ g/L)の濃度区で *SRC-1* mRNA 相対発現量の高値(5,000 μ M 区では低値)が認められた。なお、*SRC-3* mRNA 相対発現量には影響は認められなかった。

また、メトホルミン(塩酸塩、Sigma) 500、1,000、2,000 μ M(=64,600、129,000、258,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露したラット肝臓がん細胞 FaO への影響が検討されている。その結果として、1,000 μ M(=129,000 μ g/L)以上の濃度区で *SRC-1* 蛋白質相対発現量の低値が認められた。

また、メトホルミン(塩酸塩、Sigma) 5,000 μ M(=646,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露したラット肝臓がん細胞 FaO への影響が検討されている。その結果として、細胞内脂質量(Oil Red O 染色)の低値が認められた。

また、メトホルミン(塩酸塩、Sigma) 1,000、2,000、5,000 μ M(=129,000、258,000、646,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露した肝臓がん細胞 HepG2 によるレポーター遺伝子アッセイ(ヒト *SRC-2* 応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、2,000 μ M(=258,000 μ g/L)以上の濃度区でルシフェラーゼ相対発現量の低値が認められた。

また、メトホルミン(塩酸塩、Sigma) 5,000 μ M(=646,000 μ g/L)の濃度にばく露した肝臓がん細胞 HepG2 への影響(RNA ポリメラーゼ II *SRC-2* によるクロマチン免疫沈降法(ChIP: Chromatin immunoprecipitation)による測定)が検討されている。その結果として、*G6Pc* DNA 中のプロモーター領域相対発現量、*FASN* DNA 中のプロモーター領域相対発現量、*ELOVL6* DNA 中のプロモーター領域相対発現量、*SPREBPI* DNA 中のプロモーター領域相対発現量、*HMGCRCR* DNA 中のプロモーター領域相対発現量、*HMGCSCI* DNA 中のプロモーター領域相対発現量、*CYP51* DNA 中のプロモーター領域相対発現量、*NSDHL* DNA 中のプロモーター領域相対発現量、*SQLE* DNA 中のプロモーター領域相対発現量の低値が認められた。

なお、グルコース、脂質、コレステロール生合成酵素遺伝子の多くは *SRC-2* の発現をノックダウンすることによっても抑制された。(15702)(Δ ?)

想定される作用メカニズム：糖及び脂質の合成関連遺伝子の発現低下

⑦Kim ら(2016)によって、メトホルミン(Sigma) 15,000、20,000、25,000 μ M(=1,940,000、2,580,000、3,230,000 μ g/L)の濃度に 72 時間ばく露したヒト乳がん細胞 MCF-7 への影響が検討されている。その結果として、15,000 μ M(=1,940,000 μ g/L)以上の濃度区で細胞増殖率、エストロゲン受容体 α (*ER α*)蛋白質相対発現量の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma) 15,000、20,000、25,000 μ M(=1,940,000、2,580,000、3,230,000 μ g/L)の濃度に 72 時間ばく露したヒト乳がん細胞 TR MCF-7(タモキシフェン非感受性)への影響が検討されている。その結果として、15,000 μ M(=1,940,000 μ g/L)以上の濃度区で細胞増殖率、*ER α* 蛋白質相対発現量の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma) 25,000 μ M(=3,230,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露(17 β -エストラジオール 100nM 共存下)したヒト乳がん細胞 MCF-7 への影響が検討されている。その結果として、*ER α* mRNA 相対発現量の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma) 25,000 μ M(=3,230,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露(17 β -エストラジオール

ール 100nM 共存下)したヒト乳がん細胞 TR MCF-7(タモキシフェン非感受性)への影響が検討されている。その結果として、ER α mRNA 相対発現量の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma) 25,000 μ M(=3,230,000 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露(17 β -エストラジオール 100nM 共存下)したヒト乳がん細胞 MDA-MB-361 への影響が検討されている。その結果として、ER α mRNA 相対発現量の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma) 25,000 μ M(=3,230,000 μ g/L)の濃度に 48 時間ばく露したヒト乳がん細胞 MCF-7 への影響(対象蛋白質はいずれも ER α 応答性)が検討されている。その結果として、c-Myc 蛋白質相対発現量、cyclin D1 蛋白質相対発現量、プロゲステロン受容体(PR)蛋白質相対発現量、pS2 蛋白質相対発現量の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma) 25,000 μ M(=3,230,000 μ g/L)の濃度に 48 時間ばく露したヒト乳がん細胞 TR MCF-7(タモキシフェン非感受性)への影響(対象蛋白質はいずれも ER α 応答性)が検討されている。その結果として、c-Myc 蛋白質相対発現量、cyclin D1 蛋白質相対発現量、PR 蛋白質相対発現量、pS2 蛋白質相対発現量の低値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma) 25,000 μ M(=3,230,000 μ g/L)の濃度に 48 時間ばく露したヒト乳がん細胞 MDA-MB-361 への影響(対象蛋白質はいずれも ER α 応答性)が検討されている。その結果として、c-Myc 蛋白質相対発現量、cyclin D1 蛋白質相対発現量、PR 蛋白質相対発現量、pS2 蛋白質相対発現量の低値が認められた。(15701)(Δ OP)

想定される作用メカニズム：抗エストロゲン作用

なお、本試験結果の解釈にあたっては、これらの影響について AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMP-activated protein kinase: AMPK)を経由することが示唆されている点に注意を要すると判断された。

(8) 両生類卵母細胞への影響

①Detaile ら(1998)によって、メトホルミン(塩酸塩、LIPHA labs) 0.2、2、20、200、2,000 μ M(=25.8、258、2,580、25,800、258,000 μ g/L)の濃度に 90 分間ばく露したアフリカツメガエル由来卵母細胞(Stage III~IV)への影響が検討されている。その結果として、0.2、2、20 μ M(=25.8、258、2,580 μ g/L)の濃度区でグリコーゲンシンターゼ a 総比活性(インスリン 2 μ M 共存下)の高値、2、20 μ M(=258、2,580 μ g/L)の濃度区でグリコーゲンシンターゼ a 総比活性(インスリン 0.05 μ M 共存下)の高値が認められた。

また、メトホルミン(塩酸塩、LIPHA labs) 20 μ M(=2,580 μ g/L)の濃度に 90 分間ばく露したアフリカツメガエル由来卵母細胞(Stage III~IV)への影響が検討されている。その結果として、グルコース膜透過吸収速度(インスリン 2 μ M 共存下)、グルコースのグリコーゲンへの取り込み速度(インスリン 2 μ M 共存下)の高値が認められた。なお、グルコース膜透過吸収速度、グルコースのグリコーゲンへの取り込み速度には影響は認められなかった。(15759)(Δ OP)

想定される作用メカニズム：インスリンのグルコース取り込み促進作用

②Detaile ら(1999)によって、メトホルミン(塩酸塩、LIPHA labs) 0.01、0.1、0.5、1、10、20 μ M(=1.29、12.9、64.5、129、1,290、2,580 μ g/L)の濃度に 90 分間ばく露したアフリカツメガエル由来卵母細胞(Stage III~IV、哺乳類グルコーストランスポーターGLUT4 を一過的発現)への影響が検討されている。その結果として、0.5 μ M(=64.5 μ g/L)以上の濃度区で2-デオキシ-D-グルコース吸収速度(インスリン 2 μ M 共存下)の高値が認められた。

また、メトホルミン(塩酸塩、LIPHA labs) 10 μ M(=1,290 μ g/L)の濃度に 90 分間ばく露したアフリカツメガエル由来卵母細胞(Stage III~IV)への影響が検討されている。その結果として、2-デオキシ-D-グルコース吸収速度(インスリン 0.5~10 μ M 共存下)の高値が認められた。(15758)(Δ OP)

想定される作用メカニズム：インスリンによる GLUT4 関与のグルコース取込み促進

- ③Stith ら(1996)によって、メトホルミン(LIPHA labs) 0.0077、0.077、0.77、7.7 μ M(= 1、10、100、1,000 μ g/L)の濃度に 30 分間ばく露したアフリカツメガエル由来卵母細胞への影響が検討されている。その結果として、0.77 μ M(=100 μ g/L)以上の濃度区でホスホリパーゼ C 活性(イノシトール 3 リン酸産生量)の高値が認められた。

また、メトホルミン(LIPHA labs) 0.0077、0.077、0.77、7.7、77 μ M(= 1、10、100、1,000、10,000 μ g/L)の濃度に 7~10 時間(インスリン投与開始前にも 0.5 時間)ばく露したアフリカツメガエル由来卵母細胞への影響が検討されている。その結果として、7.7 μ M(=1,000 μ g/L)以上の濃度区でインスリン誘導性核胞崩壊(GVBD: germinal vesicle breakdown)率(インスリン 1 μ M 共存下)の高値が認められた。なお、GVBD 率(インスリンの共存なし)には影響は認められなかった。(15760)(Δ OP)

想定される作用メカニズム：インスリン誘導性卵母細胞の成熟促進作用

- ④Khan ら(1994)によって、メトホルミン(LIPHA labs) 20 μ M(=2,580 μ g/L)の濃度に 44 時間ばく露したアフリカツメガエル由来卵母細胞への影響が検討されている。その結果として、インスリン誘導性核胞崩壊(GVBD: germinal vesicle breakdown)率(インスリン 2 μ M 共存下)の高値が認められた。(15763)(Δ OP)

想定される作用メカニズム：インスリン誘導性卵母細胞の成熟促進作用

(9) 哺乳類細胞の糖代謝への影響

- ①Alengrin ら(1987)によって、メトホルミン(Aron Laboratory) 1、10、100、1,000 μ M(=129、1,290、12,900、129,000 μ g/L)の濃度に 20 時間ばく露したラット肝細胞(成熟雄 Wistar ラット由来)への影響が検討されている。その結果として、10 μ M(=1,290 μ g/L)以上の濃度区でグルコースのグリコーゲンへの取り込み速度の低値が認められた。なお、アミノイソブチル酸吸収速度、インスリン蛋白質結合率には影響は認められなかった。

また、メトホルミン(Aron Laboratory) 1、100、500、1,000、5,000 μ M(=129、1,290、6,460、12,900、129,000、646,000 μ g/L)の濃度に 2 時間ばく露(cAMP 0.1mM 共存下)した成熟雄 Wistar ラット由来ラット肝細胞への影響が検討されている。その結果として、500 μ M(=6,460 μ g/L)以上の濃度区でアミノイソブチル酸吸収速度の低値が認められた。(15766)(Δ OP)

想定される作用メカニズム：抗グルカゴン作用、抗インスリン作用

- ②Al-Khalili ら(2005)によって、メトホルミン(Sigma) 20 μ M(=2,580 μ g/L)の濃度に 20 分間ばく露した筋芽細胞(年齢 43 \pm 6.7 歳、BMI 26 \pm 2.4、空腹時血糖値 5.3 \pm 0.43mmol/L の代謝疾患男女各 3 名由来)への影響が検討されている。その結果として、グリコーゲン合成速度の高値が認められた。

また、メトホルミン(Sigma) 20 μ M(=2,580 μ g/L)の濃度に 8 日間ばく露した筋芽細胞(年齢 43 \pm 6.7 歳、BMI 26 \pm 2.4、空腹時血糖値 5.3 \pm 0.43mmol/L の代謝疾患男女各 3 名由来)への影響が検討されている。その結果として、PGC1 (ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 γ コアクチベーター1) mRNA 相対発現量、GLUT4 (グルコーストランスポーター4) mRNA 相対発現量、GLUT4 蛋白質相対発現量、MEF2a (筋細胞特異的エンハンサー因子 2a) mRNA 相対発現量、MEF2c mRNA 相対発現量、MEF2d mRNA 相対発現量の高値が認められた。なお、GLUT1 mRNA 相対発現量には影響は認められなかった。

(15753)(△○P)

想定される作用メカニズム：インスリンによるグリコーゲン合成作用の促進

- ③Capp ら(2011)によって、メトホルミン(Sigma-Aldrich) 1,000 μ M(=129,000 μ g/L)の濃度にばく露した子宮内膜間質細胞(健常女性由来)への影響が検討されている。その結果として、プロラクチン濃度(17 β -エストラジオール 10nM、プロゲステロン 1 μ M、インスリン様成長因子 20ng/mL 共存下、脱落まで 14 日間)、インスリン様成長因子 I 受容体 mRNA 相対発現量(24 時間)、インスリン受容体 mRNA 相対発現量(24 時間)、インスリン様成長因子 II 受容体 mRNA 相対発現量(24 時間)の低値が認められた。なお、Akt(セリン/スレオニンキナーゼで)りん酸化率(17 β -エストラジオール 10nM、プロゲステロン 1 μ M、インスリン様成長因子 20ng/mL 共存下、脱落まで 14 日間)には影響は認められなかった。

(15731)(△?)

想定される作用メカニズム：不明

なお、本論文の解釈にあたっては、メトホルミン前処置により脱落膜化自体が対照群と異なっている(脱落膜化の指標であるプロラクチン濃度が有意に低い：内分泌かく乱ではなく、脱落膜化の阻害と考えられる)このような状態(対照群と細胞の性質が異なる)でインスリンや IGF I 及び IGF II を作用させたとしても、これらのホルモンの作用をメトホルミンが増強しているのかどうかは判定できない点に注意を要すると判断された。

- ④Fuhrmeister ら(2014)によって、メトホルミン(Sigma) 10,000 μ M(=1,290,000 μ g/L)の濃度に 30 分間ばく露した黄体化顆粒膜細胞(年齢 34.5 \pm 4.6 歳、BMI 23.36 \pm 2.75 の不妊治療中女性患者 27 名由来)への影響が検討されている。その結果として、IGF1R (インスリン様成長因子 1 受容体) mRNA 相対発現量、IR (インスリン受容体) mRNA 相対発現量の高値が認められた。なお、IGF1R 蛋白質相対発現量、Aromatase (アロマトラーゼ) mRNA 相対発現量、Aromatase 蛋白質相対発現量には影響は認められなかった。(15715)(△○P)

想定される作用メカニズム：インスリン様成長因子 1 受容体及びインスリン受容体の mRNA 発現誘導

(10) ヒトへの投与試験

- ②Liu ら(2019)によって、中国にて、メトホルミン 1,500mg/day (Metformin)を 6 ヶ月間投与(月経開始 3 ~ 5 日目から開始)投与した多嚢胞性卵巣症候群(PCOS: polycystic ovary syndrome)女性患者(年齢 21 ~ 30 歳の 55 名と思われる)への影響が検討されている。その結果として、投与前との比較において、血清中黄体形成ホルモン濃度、血清中黄体ホルモン/卵胞刺激ホルモン濃度比、血清中テストステロン濃度、血清中アンドロステジオン濃度、血清中デヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体濃度の低値が認められた。

また、メトホルミン 1,500mg/day (Metformin)を 6 ヶ月間投与(月経開始 3 ~ 5 日目から開始)投与した PCOS 痩身女性患者 34 名(年齢 25.2 \pm 4.4 歳、BMI 21.3 \pm 2.4)への影響が検討されている。その結果として、健常女性 31 名(年齢 25.2 \pm 5.2 歳、BMI 21.4 \pm 2.3)との比較において、血清中可溶性レプチン受容体濃度の低値、血清中インスリン濃度(絶食後)、恒常性モデル評価によるインスリン耐性(HOMA-IR: homeostatic model assessment-insulin resistance)、血清中黄体形成ホルモン濃度、血清中黄体ホルモン/卵胞刺激ホルモン濃度比、血清中テストステロン濃度の高値が認められた。なお、血清中アンドロステジオン濃度、血清中デヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体濃度、血清中グルコース濃度(絶食後)には影響は認められなかった。

また、メトホルミン 1,500mg/day (Metformin)を6ヶ月間投与(月経開始3～5日目から開始)投与したPCOS肥満女性患者21名(年齢26.4±3.2歳、BMI25.0±3.1)への影響が検討されている。その結果として、健常女性31名(年齢25.2±5.2歳、BMI21.4±2.3)との比較において、血清中可溶性レプチン受容体濃度の低値、血清中インスリン濃度(絶食後)、HOMA-IR、血清中黄体形成ホルモン濃度、血清中黄体ホルモン/卵胞刺激ホルモン濃度比、血清中テストステロン濃度の高値が認められた。なお、血清中アンドロステンジオン濃度、血清中デヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体濃度、血清中グルコース濃度(絶食後)には影響は認められなかった。(15674)(○●P)

想定される作用メカニズム：抗アンドロゲン様作用

- ④Campagnoliら(2013)によって、イタリアにて、メトホルミン 500～1,500mg/day を9ヶ月間投与(500mg/day を3ヶ月、1,000mg/day を1ヶ月、1,500mg/day を5ヶ月)した女性乳がん患者43名(70歳未満、閉経後12ヶ月以上、乳がん手術後6ヶ月以上、糖尿病発症なし、血清中テストステロンホルモン濃度0.28ng/mL以上)への影響が検討されている。その結果として、投与開始前との比較において、血清中遊離テストステロン濃度、血清中エストラジオール濃度、血清中インスリン様成長因子1濃度、血清中エストロン濃度の低値が認められた。なお、血清中アンドロステンジオン濃度、血清中でデヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体濃度には影響は認められなかった。

また、メトホルミン 500～1,000mg/day を9ヶ月間投与(500mg/day を3ヶ月、1,000mg/day を6ヶ月)した女性乳がん患者53名(70歳未満、閉経後12ヶ月以上、乳がん手術後6ヶ月以上、糖尿病発症なし、血清中テストステロンホルモン濃度0.28ng/mL以上)への影響が検討されている。その結果として、投与開始前との比較において、血清中でデヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体濃度の高値が認められた。なお、血清中遊離テストステロン濃度、血清中エストラジオール濃度、血清中インスリン様成長因子1濃度、血清中エストロン濃度、血清中アンドロステンジオン濃度には影響は認められなかった。(15718)(△?)

想定される作用メカニズム：不明

なお、本試験結果の解釈にあたっては、血清中テストステロンの供給源を予想できない点に注意を要すると判断された。

- ⑤Mariら(2016)によって、オーストリアにて、メトホルミン 1,500～2,000mg/day を最長52週間投与した2型糖尿病患者140名(男性63名、女性77名、平均年齢55.5±10.5歳)への影響が検討されている。その結果として、投与開始前との比較において、血中グルコース濃度(空腹時)、血中グルコース濃度(食後3時間曲線化面積(AUC))、血中インスリン濃度(食後3時間AUC)の低値、インスリン感受性(HOMA2-%S: homeostatic model assessment of insulin sensitivity)の高値が認められた。なお、β細胞機能(血中インスリン/グルコースAUC比)、血中ヘモグロビンA1c濃度、血中インスリン濃度(空腹時)、血中C-ペプチド濃度(空腹時)、血中C-ペプチド濃度(食後3時間AUC)、血中グルカゴン濃度(空腹時)、血中グルカゴン濃度(食後3時間AUC)には影響は認められなかった。(15700)(△●P)

想定される作用メカニズム：インスリン感受性亢進

- ⑥Krysiakら(2020)によって、ポーランドにて、メトホルミン 2,550～3,000mg/day (日毎3分割、投与開始時850mg/dayから2～4週間かけて漸増)を16週間投与したテストステロン濃度正常(血清中濃度4～12ng/mL)男性患者(初発2型糖尿病及び無症候性甲状腺機能低下症)12名(年齢51±8歳)への影響が検討されている。その結果として、投与開始前との比較において、血糖値、恒常性モデル評価によるインスリン耐性(HOMA-IR: homeostatic model assessment-insulin resistance)の低値が認められた。なお、血清中甲状腺刺激ホルモン濃度、血清中遊離サイロキシン濃度、血清中遊離トリヨー

ドサイロニン濃度、血清中プロラクチン濃度、血清中甲状腺刺激ホルモン濃度、血清中黄体形成ホルモン濃度、血清中テストステロン濃度、Jostel's thyrotropin index には影響は認められなかった。

また、メトホルミン 2,550~3,000mg/day (日毎3分割、投与開始時 850mg/day から2~4週間かけて漸増)を16週間投与したテストステロン濃度低下(過去に遅発性男性性腺機能低下症と診断され血清中テストステロン濃度 3.0ng/mL 未満)男性患者(初発2型糖尿病及び無症候性甲状腺機能低下症)11名(年齢 52±8歳)への影響が検討されている。その結果として、投与開始前との比較において、血糖値、HOMA-IR、血清中甲状腺刺激ホルモン濃度、Jostel's thyrotropin index の低値が認められた。なお、血清中甲状腺刺激ホルモン濃度、血清中遊離サイロキシン濃度、血清中遊離トリヨードサイロニン濃度、血清中プロラクチン濃度、血清中甲状腺刺激ホルモン濃度、血清中黄体形成ホルモン濃度、血清中テストステロン濃度には影響は認められなかった。

また、メトホルミン 2,550~3,000mg/day (日毎3分割、投与開始時 850mg/day から2~4週間かけて漸増)を16週間投与したテストステロン濃度低下(過去に遅発性男性性腺機能低下症と診断され血清中テストステロン濃度 3.0ng/mL 未満)男性患者(初発2型糖尿病及び無症候性甲状腺機能低下症)11名(年齢 52±8歳)への影響が検討されている。その結果として、テストステロン濃度正常男性患者12名との比較において、HOMA-IR、血清中甲状腺刺激ホルモン濃度、Jostel's thyrotropin index、血清中テストステロン濃度の低値が認められた。なお、血糖値、血清中甲状腺刺激ホルモン濃度、血清中遊離サイロキシン濃度、血清中遊離トリヨードサイロニン濃度、血清中プロラクチン濃度、血清中甲状腺刺激ホルモン濃度、血清中黄体形成ホルモン濃度には影響は認められなかった。

(15673)(△○P)

想定される作用メカニズム：視床下部—下垂体—甲状腺軸への作用

- ⑦ Celik と Acbay (2012)によって、トルコにて、メトホルミン 2,000mg/day を12週間投与した多嚢胞性卵巣症候群(PCOS: polycystic ovary syndrome)女性患者20名(年齢 25.9±5.7歳、高脂血症及びグルコース不耐性を既発症)への影響が検討されている。その結果として、投与開始前との比較において、ボディマス指数、血清中インスリン濃度、血清中グルコース濃度、恒常性モデル評価によるインスリン耐性(HOMA-IR: homeostatic model assessment-insulin resistance)、血清中黄体形成ホルモン濃度、血清中エストラジオール濃度、血清中テストステロン濃度、血清中遊離テストステロン濃度、血清中総コレステロール濃度、血清中トリグリセリド濃度、血清中低密度リポ蛋白質コレステロール濃度、血清中アラニンアミノトランスフェラーゼ活性の低値、血清中高密度リポ蛋白質コレステロール濃度の高値が認められた。なお、血清中卵胞刺激ホルモン濃度、血清中デヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体濃度、血清中アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性には影響は認められなかった。(15725)(△○P)

想定される作用メカニズム：視床下部—下垂体—生殖腺軸への作用

- ⑧ Cheraghi ら(2013)によって、イランにて、2012年7月から2013年2月にかけて、メトホルミン (Glucophage, Merck) 1,500mg/day(日毎3分割)を6ヶ月間投与した多嚢胞性卵巣症候群(PCOS: polycystic ovary syndrome)女性患者80名(年齢 25~35歳)中15名への影響が検討されている。その結果として、プラセボ投与群との比較において(ランダム化二重盲検試験)、未成熟卵胞中受容体型チロシンキナーゼ(c-kit: receptor tyrosine kinase) mRNA 相対発現量、未成熟卵胞中 c-kit 蛋白質相対発現量の低値、未成熟卵胞中成長分化因子9 (GDF-9: growth differentiation factor-9) mRNA 相対発現量、未成熟卵胞中 GDF-9 蛋白質相対発現量、成熟卵胞率、正常 MII 卵胞率の高値が認められた。なお、卵胞液容量、卵胞液中エストラジオール濃度、卵胞液中プロゲステロン濃度、卵胞液中アンドロス

テンジオン濃度、卵胞液中 c-kit 可溶性蛋白質濃度、未成熟卵胞中骨形成因子 15 (BMP-15: bone morphogenetic factor-15) mRNA 相対発現量、未成熟卵胞中 BMP-15 蛋白質相対発現量、成熟卵胞中 BMP-15 mRNA 相対発現量、成熟卵胞中 BMP-15 蛋白質相対発現量、成熟卵胞中 GDF-9 mRNA 相対発現量、成熟卵胞中 GDF-9 蛋白質相対発現量、成熟卵胞中 c-kit mRNA 相対発現量、成熟卵胞中 c-kit 蛋白質相対発現量には影響は認められなかった。(15691)(○?)

想定される作用メカニズム：不明

- ⑨Hamed ら(2013)によって、エジプトにて、2011年1月から2012年10月にかけて、メトホルミン 1,500mg/day を6ヶ月間投与(開始から2週間は 1,000mg/day)した多嚢胞性卵巣症候群(PCOS: polycystic ovary syndrome)女性患者62名(年齢 29.3±4.2、クロミフェンクエン酸塩投与によっても無排卵)への影響が検討されている。その結果として、投与開始前との比較において、胸囲、恒常性モデル評価によるインスリン耐性(HOMA-IR: homeostatic model assessment-insulin resistance)、血清中テストステロン濃度、血清中黄体形成ホルモン濃度、血清中黄体形成ホルモン/卵胞刺激ホルモン濃度比の低値、血清中アディポネクチン濃度、血清中アディポネクチン受容体-1濃度、正常月経周期被験者率、排卵被験者率の高値が認められた。なお、ボディマス指数、血清中卵胞刺激ホルモン濃度には影響は認められなかった。(15720)(△○P)

想定される作用メカニズム：視床下部-下垂体-生殖腺軸への作用、インスリン感受性の亢進

- ⑩Codner ら(2013)によって、チリにて、メトホルミン 1,700mg/day(日毎二分投与)を9ヶ月間投与した1型糖尿病女性患者13名(平均年齢 17.7±1.6歳、高アンドロゲン症)への影響が検討されている。その結果として、投与開始前との比較において、血清中エストラジオール濃度、血清中17-ヒドロキシプロゲステロン濃度、血清中テストステロン濃度、血清中アンドロステンジオン濃度、遊離アンドロゲン指数の低値が認められた。なお、ボディマス指数、血中ヘモグロビン A1c 濃度、血清中デヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体濃度、血清中性ホルモン結合グロブリン濃度、月経周期回数、月経周期所要日数、排卵率には影響は認められなかった。(15717)(△○P)

想定される作用メカニズム：視床下部-下垂体-生殖腺軸への作用

なお、本試験結果の解釈にあたっては、対照群として1型糖尿病女性患者11名(平均年齢 16.7±1.7歳、高アンドロゲン症)プラセボ投与との比較(ランダム化二重盲検試験)も実施しているとしているが、記載が不明瞭な点に注意を要すると判断された。

※参考 ヒトへの投与試験(今回評価対象としなかった文献)

- ①Ito-Yamaguchi ら(2019)によって、日本にて、メトホルミン 750mg/day を3ヶ月間投与した多嚢胞性卵巣症候群(PCOS: polycystic ovary syndrome)女性患者10名(平均年齢 28.1±3.28歳)への影響が検討されている。その結果として、投与開始前との比較において、恒常性モデル評価によるインスリン耐性(HOMA-IR: homeostatic model assessment-insulin resistance)の低値が認められた。なお、ボディマス指数、血中黄体形成ホルモン濃度、血中卵胞刺激ホルモン濃度、血中遊離テストステロン濃度、血中デヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体濃度、血中エストラジオール濃度には影響は認められなかった。

また、上記10名の内、排卵が認められる5名(平均年齢 29.4±3.78歳)への影響が検討されている。その結果として、投与開始前との比較において、HOMA-IR、血中黄体形成ホルモン濃度の低値が認められた。なお、ボディマス指数、血中卵胞刺激ホルモン濃度、血中遊離テストステロン濃度、血中デヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体濃度、血中エストラジオール濃度には影響は認められ

なかった。

また、上記 10 名の内、排卵が認められない 5 名(平均年齢 26.8±2.39 歳)への影響が検討されている。その結果として、投与開始前との比較において、HOMA-IR の低値が認められた。なお、ボディマス指数、血中黄体形成ホルモン濃度、血中卵胞刺激ホルモン濃度、血中遊離テストステロン濃度、血中デヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体濃度、血中エストラジオール濃度には影響は認められなかった。(15708)

評価未実施の理由：特性が不明な少数名の PCOS 患者を扱った試験であるため。

- ③Crave ら(1995)によって、フランスにて、メトホルミン(Lipha Sahté)850～1,700mg/day を 16 週間投与(850mg/day を 1 週間、1,700mg/day を 15 週間、この間低脂肪及び低カロリー食摂取)した男性型多毛症女性患者 43 名(BMI 25kg/m² 超の肥満)への影響が検討されているが、血漿中グルコース濃度、血漿中インスリン濃度、血漿中コレステロール濃度、血漿中高密度リポ蛋白質(HDL)コレステロール濃度、血漿中トリグリセリド濃度、血漿中アポリポ蛋白質 A1 濃度、血漿中アポリポ蛋白質 B 濃度には影響は認められなかった。(15761)

評価未実施の理由：影響が認められなかった報告のため。

なお、本試験結果の解釈にあたっては、被験者の年齢の記載がない点に注意を要すると判断された。

2. 総合的判断(案)

得られた報告について信頼性評価を実施した結果として、内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠として認められると評価された報告が得られた。

試験対象物質として選定する根拠として認められると評価された報告から、動物試験の報告において、エストロゲン作用、視床下部—下垂体—甲状腺軸への作用、インスリン様作用、インスリンシグナル伝達への影響、糖代謝の改善を示すこと、試験管内試験の報告において、抗エストロゲン作用、エストロゲン受容体発現抑制作用、ER α 発現抑制作用、ER β 発現促進作用、アンドロゲン受容体発現抑制作用、プロゲステロン受容体発現促進作用、がん細胞増殖抑制作用、アポトーシス促進作用、抗グルカゴン作用、抗インスリン作用、インスリンによるグリコーゲン合成作用の促進、インスリンのグルコース取り込み促進作用、インスリンによる GLUT4 関与のグルコース取込み促進、インスリン誘導性卵母細胞の成熟促進作用、インスリン様成長因子 1 受容体及びインスリン受容体の mRNA 発現誘導を示すこと、ヒトへの投与試験において、抗アンドロゲン様作用、インスリン感受性亢進、視床下部—下垂体—生殖腺軸への作用、視床下部—下垂体—甲状腺軸への作用を示すことが示唆された。

なお、信頼性評価のまとめと今後の対応案について表 1 に示した。

表1 信頼性評価のまとめと今後の対応案

物質名：メトホルミン

区分	著者	作業班会議における信頼性評価結果			
		報告結果(Results)を検証するために必要である『材料と方法(Materials and Methods)』に関する記載の有無及びその評価 ¹⁾	内分泌かく乱作用との関連の有無 ²⁾	内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠としての評価 ³⁾	
(1)生態影響		①Alla ら(2021) 評価未実施			
	不明	②Ussery ら(2018)	△	?	—
	インスリンシグナル伝達への影響	③Niemuth と Klaper (2015)	△	○P	○
	エストロゲン作用(雄肝臓中 VTG (vitellogenin) mRNA 相対発現量の高値)	④Niemuth ら(2015)	△	○P	○
	不明	⑤Lee ら(2019)	×	—	×
	インスリン受容体の活性化	⑥Capiotti ら(2014)	○	?	—
		⑦Zang ら(2017) 評価未実施			
(2)生殖影響	抗エストロゲン様作用	① Tas ら(2013)	×	—	×
	糖代謝の改善	②Yan ら(2015)	△	○P	○
	不明	③Derkach ら(2020)	△	?	—
	視床下部—下垂体—甲状腺軸への作用	④Hu ら(2017)	△	○P	○
	インスリン様作用	⑤Brill と Moenter (2009)	△	○P	○
(3)抗腫瘍影響		①Gu ら(2017) 評価未実施			
	ヒト子宮内膜がん細胞の増殖抑制作用	②Zou ら(2016)	△	?	—
(4)抗エストロゲン作用	細胞増殖抑制作用	① Jung ら(2011)	×	—	×
(5)抗アンドロゲン作用	細胞増殖抑制作用	①Wang ら(2015)	△	?	—
	細胞増殖抑制作用、アポトーシス促進作用	②Tran ら(2017)	△	?	—
(6)がん細胞への影響	がん細胞増殖抑制作用、アディポカイン分泌促進または抑制作用	①Fuentes-Mattei ら(2014)	×	—	×
	アンドロゲン受容体発現抑制作用、アポトーシス促進作用、がん細胞増殖抑制作用	②Xie ら(2021)	△	○P	○
		③Gu ら(2017) 評価未実施			

区分	著者	作業班会議における信頼性評価結果			
		報告結果(Results)を検証するために必要である『材料と方法(Materials and Methods)』に関する記載の有無及びその評価 ¹⁾	内分泌かく乱作用との関連の有無 ²⁾	内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠としての評価 ³⁾	
(7)AMP活性化プロテインキナーゼ経路でのがん細胞への影響	がん細胞増殖抑制作用、プロゲステロン受容体発現促進作用	①Xie ら(2011)	△	○P	○
	がん細胞増殖抑制作用、プロゲステロン受容体発現促進作用	②Saguyod ら(2020)	△	○P	○
	がん細胞増殖抑制作用、エストロゲン受容体発現抑制作用、プロゲステロン受容体発現促進作用	③Collins ら(2019)	△	○P	○
	細胞増殖抑制作用	④Zou ら(2016)	△	?	—
	がん細胞増殖抑制作用、ER α 発現抑制作用、ER β 発現促進作用	⑤Zhang ら(2017)	△	○P	○
	糖及び脂質の合成関連遺伝子の発現低下	⑥Madsen ら(2015)	△	?	—
	抗エストロゲン作用	⑦Kim ら(2016)	△	○P	○
(8)両生類卵母細胞への影響	インスリンのグルコース取り込み促進作用	①Detaile ら(1998)	△	○P	○
	インスリンによるGLUT4 関与のグルコース取込み促進	②Detaile ら(1999)	△	○P	○
	インスリン誘導性卵母細胞の成熟促進作用	③Stith ら(1996)	△	○P	○
	インスリン誘導性卵母細胞の成熟促進作用	④Khan ら(1994)	△	○P	○
(9)哺乳類細胞の糖代謝への影響	抗グルカゴン作用、抗インスリン作用	①Alengrin ら(1987)	△	○P	○
	インスリンによるグリコーゲン合成作用の促進	②Al-Khalili ら(2005)	△	○P	○
	不明	③Capp ら(2011)	△	?	—
	インスリン様成長因子1 受容体及びインスリン受容体の mRNA 発現誘導	④Fuhrmeister ら(2014)	△	○P	○
(10)ヒトへの投与試験		① Ito-Yamaguchi ら(2019) 評価未実施			
	抗アンドロゲン様作用	②Liu ら(2019)	○	○P	○
		③Crave ら(1995) 評価未実施			

区分	著者	作業班会議における信頼性評価結果			
		報告結果(Results)を検証するために必要である『材料と方法(Materials and Methods)』に関する記載の有無及びその評価 ¹⁾	内分泌かく乱作用との関連の有無 ²⁾	内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠としての評価 ³⁾	
	不明	④Campagnoli ら(2013)	△	?	—
	インスリン感受性亢進	⑤Mari ら(2016)	△	○P	○
	視床下部一下垂体一甲状腺軸への作用	⑥Krysiak ら(2020)	△	○P	○
	視床下部一下垂体一生殖腺軸への作用	⑦Celik と Acbay (2012)	△	○P	○
	不明	⑧Cheraghi ら(2013)	○	?	—
	インスリン感受性亢進	⑨Hamed HO (2013)	△	○P	○
	視床下部一下垂体一生殖腺軸への作用	⑩Codner ら(2013)	△	○P	○
信頼性評価のまとめと今後の対応案	動物試験の報告において、エストロゲン作用、視床下部一下垂体一甲状腺軸への作用、インスリン様作用、インスリンシグナル伝達への影響、糖代謝の改善を示すこと、試験管内試験の報告において、抗エストロゲン作用、エストロゲン受容体発現抑制作用、ER α 発現抑制作用、ER β 発現促進作用、アンドロゲン受容体発現抑制作用、プロゲステロン受容体発現促進作用、がん細胞増殖抑制作用、アポトーシス促進作用、抗グルカゴン作用、抗インスリン作用、インスリンによるグリコーゲン合成作用の促進、インスリンのグルコース取り込み促進作用、インスリンによる GLUT4 関与のグルコース取込み促進、インスリン誘導性卵母細胞の成熟促進作用、インスリン様成長因子 1 受容体及びインスリン受容体の mRNA 発現誘導を示すこと、ヒトへの投与試験において、抗アンドロゲン様作用、インスリン感受性亢進、視床下部一下垂体一生殖腺軸への作用、視床下部一下垂体一甲状腺軸への作用を示すことが示唆されたため内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る。				

- 1)○：十分に記載されている、△：一部記載が不十分である、×：記載が不十分である、—：評価を行わない
2)○：内分泌かく乱作用との関連性が認められる(P：作用が認められる、N：作用が認められない)、?：内分泌かく乱作用との関連性は不明、×：内分泌かく乱作用との関連性が認められない、—：評価を行わない
3)○：試験対象物質として選定する根拠として認められる、×：試験対象物質として選定する根拠として認められない、—：内分泌かく乱作用との関連性が不明であるため、評価ができない

参考文献

- 15548: Tran LNK, Kichenadasse G, Butler LM, Centenera MM, Morel KL, Ormsby RJ, Michael MZ, Lower KM and Sykes PJ (2017) The combination of metformin and valproic acid induces synergistic apoptosis in the presence of p53 and androgen signaling in prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16 (12), 2689-2700.
- 15665: Xie Y, Wang L, Khan MA, Hamburger AW, Guang W, Passaniti A, Munir K, Ross DD, Dean M and Hussain A (2021) Metformin and androgen receptor-axis-targeted (ARAT) agents induce two PARP-1-dependent cell death pathways in androgen-sensitive human prostate cancer cells. *Cancers*, 13 (4) 633.
- 15666: Alla LNR, Monshi M, Siddiqua Z, Shields J, Alame K, Wahls A, Akemann C, Meyer D, Crofts EJ, Saad F, El-Nachef J, Antoon M, Nakhle R, Hijazi N, Hamid M, Gurdziel K, McElmurry SP, Kashian DR, Baker TR and Pitts DK (2021) Detection of endocrine disrupting chemicals in *Danio rerio* and *Daphnia pulex*: Step-one, behavioral screen. *Chemosphere*, 271, 129442.
- 15667: Saguyod SJU, Alhallak I, Simmen RCM and Velarde MC (2020) Metformin regulation of progesterone receptor isoform-B expression in human endometrial cancer cells is glucose-dependent. *Oncology Letters*, 20 (5), 249.
- 15668: Derkach KV, Bakhtyukov AA, Romanova IV, Zorina, II, Bayunova LV, Bondareva VM, Yu Morina I, Kumar Roy V and Shpakov AO (2020) The effect of metformin treatment on the basal and gonadotropin-stimulated

- steroidogenesis in male rats with type 2 diabetes mellitus. *Andrologia*, 52 (11), e13816.
- 15673: Krysiak R, Szkróbka W and Okopień B (2020) The impact of testosterone on metformin action on hypothalamic-pituitary-thyroid axis activity in men: A pilot study. *Journal of Clinical Pharmacology*, 60 (2), 164-171.
- 15674: Liu RB, Liu Y, Lv LQ, Xiao W, Gong C and Yue JX (2019) Effects of metformin treatment on soluble leptin receptor levels in women with polycystic ovary syndrome. *Current Medical Science*, 39 (4), 609-614.
- 15679: Lee JW, Shin YJ, Kim H, Kim H, Kim J, Min SA, Kim P, Yu SD and Park K (2019) Metformin-induced endocrine disruption and oxidative stress of *Oryzias latipes* on two-generational condition. *Journal of Hazardous Materials*, 367, 171-181.
- 15681: Ussery E, Bridges KN, Pandelides Z, Kirkwood AE, Bonetta D, Venables BJ, Guchardi J and Holdway D (2018) Effects of environmentally relevant metformin exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 205, 58-65.
- 15683: Collins G, Mesiano S and DiFeo A (2019) Effects of metformin on cellular proliferation and steroid hormone receptors in patient-derived, low-grade endometrial cancer cell lines. *Reproductive Sciences*, 26 (5), 609-618.
- 15686: Hu X, Liu Y, Wang C, Hou L, Zheng X, Xu Y, Ding L and Pang S (2017) Metformin affects thyroid function in male rats. *Oncotarget*, 8 (64), 107589-107595.
- 15690: Zhang J, Xu H, Zhou X, Li Y, Liu T, Yin X and Zhang B (2017) Role of metformin in inhibiting estrogen-induced proliferation and regulating ER α and ER β expression in human endometrial cancer cells. *Oncology Letters*, 14 (4), 4949-4956.
- 15691: Cheraghi E, Soleimani Mehranjani M, Shariatzadeh SMA, Nasr Esfahani MH and Alani B (2018) *N*-Acetylcysteine compared to metformin, improves the expression profile of growth differentiation factor-9 and receptor tyrosine kinase c-kit in the oocytes of patients with polycystic ovarian syndrome. *International Journal of Fertility and Sterility*, 11 (4), 270-278.
- 15692: Gu CJ, Cheng J, Zhang B, Yang SL, Xie F, Sun JS, Huang LQ, Yu JJ and Li MQ (2017) Protopanaxadiol and metformin synergistically inhibit estrogen-mediated proliferation and anti-autophagy effects in endometrial cancer cells. *American Journal of Translational Research*, 9 (9), 4071-4082.
- 15697: Zang L, Shimada Y and Nishimura N (2017) Development of a Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *Scientific Reports*, 7 (1), 1461.
- 15698: Zou J, Hong L, Luo C, Li Z, Zhu Y, Huang T, Zhang Y, Yuan H, Hu Y, Wen T, Zhuang W, Cai B, Zhang X, Huang J and Cheng J (2016) Metformin inhibits estrogen-dependent endometrial cancer cell growth by activating the AMPK-FOXO1 signal pathway. *Cancer Science*, 107 (12), 1806-1817.
- 15700: Mari A, Del Prato S, Ludvik B, Milicevic Z, de la Peña A, Shurzinske L, Karanikas CA and Pechtner V (2016) Differential effects of once-weekly glucagon-like peptide-1 receptor agonist dulaglutide and metformin on pancreatic β -cell and insulin sensitivity during a standardized test meal in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 18 (8), 834-839.
- 15701: Kim J, Lee J, Jang SY, Kim C, Choi Y and Kim A (2016) Anticancer effect of metformin on estrogen receptor-positive and tamoxifen-resistant breast cancer cell lines. *Oncology Reports*, 35 (5), 2553-2560.
- 15702: Madsen A, Bozickovic O, Bjune JJ, Mellgren G and Sagen JV (2015) Metformin inhibits hepatocellular glucose, lipid and cholesterol biosynthetic pathways by transcriptionally suppressing steroid receptor coactivator 2 (SRC-2). *Scientific Reports*, 5, 16430.
- 15703: Yan WJ, Mu Y, Yu N, Yi TL, Zhang Y, Pang XL, Cheng D and Yang J (2015) Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32 (7), 1097-1104.
- 15705: Niemuth NJ and Klaper RD (2015) Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere*, 135, 38-45.
- 15706: Wang Y, Liu G, Tong D, Parmar H, Hasenmayer D, Yuan W, Zhang D and Jiang J (2015) Metformin represses androgen-dependent and androgen-independent prostate cancers by targeting androgen receptor. *Prostate*, 75 (11), 1187-1196.
- 15707: Niemuth NJ, Jordan R, Crago J, Blanksma C, Johnson R and Klaper RD (2015) Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34 (2), 291-296.
- 15708: Ito-Yamaguchi A, Suganuma R, Kumagami A, Hashimoto S, Yoshida-Komiya H and Fujimori K (2015) Effects of metformin on endocrine, metabolic milieu and endometrial expression of androgen receptor in patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 31 (1), 44-47.
- 15711: Fuentes-Mattei E, Velazquez-Torres G, Phan L, Zhang F, Chou PC, Shin JH, Choi HH, Chen JS, Zhao R,

- Chen J, Gully C, Carlock C, Qi Y, Zhang Y, Wu Y, Esteva FJ, Luo Y, McKeehan WL, Ensor J, Hortobagyi GN, Pusztai L, Fraser Symmans W, Lee MH and Yeung SC (2014) Effects of obesity on transcriptomic changes and cancer hallmarks in estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 106 (7) dju158.
- 15712: Capiotti KM, Antonioli R, Jr., Kist LW, Bogo MR, Bonan CD and Da Silva RS (2014) Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 171, 58-65.
- 15715: Fuhrmeister IP, Branchini G, Pimentel AM, Ferreira GD, Capp E, Brum IS and von Eye Corleta H (2014) Human granulosa cells: Insulin and insulin-like growth factor-1 receptors and aromatase expression modulation by metformin. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 77 (3), 156-162.
- 15717: Codner E, Iñiguez G, López P, Mujica V, Eyzaguirre FC, Asenjo S, Torrealba I and Cassorla F (2013) Metformin for the treatment of hyperandrogenism in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Hormone Research in Paediatrics*, 80 (5), 343-349.
- 15718: Campagnoli C, Berrino F, Venturelli E, Abbà C, Biglia N, Brucato T, Cogliati P, Danese S, Donadio M, Zito G and Pasanisi P (2013) Metformin decreases circulating androgen and estrogen levels in nondiabetic women with breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 13 (6), 433-438.
- 15720: Hamed HO (2013) Role of adiponectin and its receptor in prediction of reproductive outcome of metformin treatment in patients with polycystic ovarian syndrome. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 39 (12), 1596-1603.
- 15721: Tas M, Kutuk MS, Serin IS, Ozgun MT, Oner G and Ozturk F (2013) Comparison of antiproliferative effects of metformin and progesterone on estrogen-induced endometrial hyperplasia in rats. *Gynecological Endocrinology*, 29 (4), 311-314.
- 15725: Celik O and Acbay O (2012) Effects of metformin plus rosuvastatin on hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome patients with hyperlipidemia and impaired glucose tolerance. *Journal of Endocrinological Investigation*, 35 (10), 905-910.
- 15727: Jung JW, Park SB, Lee SJ, Seo MS, Trosko JE and Kang KS (2011) Metformin represses self-renewal of the human breast carcinoma stem cells via inhibition of estrogen receptor-mediated OCT4 expression. *PloS One*, 6 (11), e28068.
- 15731: Capp E, Jauckus J, von Eye Corleta H, Toth B, Strowitzki T and Germeyer A (2011) Does metformin influence the insulin-, IGF I- and IGF II-receptor gene expression and Akt phosphorylation in human decidualized endometrial stromal cells? *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 158 (2), 248-253.
- 15735: Xie Y, Wang YL, Yu L, Hu Q, Ji L, Zhang Y and Liao QP (2011) Metformin promotes progesterone receptor expression via inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) in endometrial cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 126 (3-5), 113-120.
- 15746: Brill DS and Moenter SM (2009) Androgen receptor antagonism and an insulin sensitizer block the advancement of vaginal opening by high-fat diet in mice. *Biology of Reproduction*, 81 (6), 1093-1098.
- 15753: Al-Khalili L, Forsgren M, Kannisto K, Zierath JR, Lönnqvist F and Krook A (2005) Enhanced insulin-stimulated glycogen synthesis in response to insulin, metformin or rosiglitazone is associated with increased mRNA expression of GLUT4 and peroxisomal proliferator activator receptor gamma co-activator 1. *Diabetologia*, 48 (6), 1173-1179.
- 15758: Detaille D, Wiernsperger N and Devos P (1999) Metformin interaction with insulin-regulated glucose uptake, using the *Xenopus laevis* oocyte model expressing the mammalian transporter GLUT4. *European Journal of Pharmacology*, 377 (1), 127-136.
- 15759: Detaille D, Wiernsperger N and Devos P (1998) Potentiating effect of metformin on insulin-induced glucose uptake and glycogen metabolism with *Xenopus* oocytes. *Diabetologia*, 41 (1), 2-8.
- 15760: Stith BJ, Goalstone ML, Espinoza R, Mossel C, Roberts D and Wiernsperger N (1996) The antidiabetic drug metformin elevates receptor tyrosine kinase activity and inositol 1,4,5-trisphosphate mass in *Xenopus* oocytes. *Endocrinology*, 137 (7), 2990-2999.
- 15761: Crave JC, Fimbel S, Lejeune H, Cugnardey N, Déchaud H and Pugeat M (1995) Effects of diet and metformin administration on sex hormone-binding globulin, androgens, and insulin in hirsute and obese women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80 (7), 2057-2062.
- 15763: Khan NA, Wiernsperger N, Quemener V and Moulinoux JP (1994) Internalization of metformin is necessary for its action on potentiating the insulin-induced *Xenopus laevis* oocyte maturation. *Journal of Endocrinology*, 142 (2), 245-250.
- 15766: Alengrin F, Grossi G, Canivet B and Dolais-Kitabgi J (1987) Inhibitory effects of metformin on insulin and glucagon action in rat hepatocytes involve post-receptor alterations. *Diabete & Metabolisme*, 13 (6), 591-597.

II. ケトプロフェン

1. 内分泌かく乱作用に関連する報告

ケトプロフェンの内分泌かく乱作用に関連する報告として、生態影響、血漿中コルチゾール濃度への影響、甲状腺影響、エストロゲン作用、抗エストロゲン作用、アンドロゲン作用、抗アンドロゲン作用、ヒト乳がん細胞への影響、メダカ卵胞への影響、ヒト血清中サイロキシン濃度への影響に関する報告がある。

(1) 生態影響

①Mennillo ら(2018)によって、ケトプロフェン(ラセミ体、CAS 22071-15-4、Sigma-Aldrich) 1、10、100、1,000 μ g/L(設定濃度)に24時間未満齢から7日間ばく露したニセネコゼミジンコ(*Ceriodaphnia dubia*)への影響が検討されている。その結果として、1,000 μ g/L のばく露区で総産卵数の低値、死亡率の高値が認められた。なお、初出産までの所要日数には影響は認められなかった。

また、ケトプロフェン(S(+))体、CAS 22161-81-5、Sigma-Aldrich) 1、10、100、1,000 μ g/L(設定濃度)に24時間未満齢から7日間ばく露したニセネコゼミジンコ(*C. dubia*)への影響が検討されている。その結果として、100 μ g/L のばく露区で総産卵数の低値、死亡率の高値が認められた。なお、初出産までの所要日数には影響は認められなかった。【16203】(評価結果の略号：△?、以下同じ)
想定される作用メカニズム：毒性

②Bereketoglu ら(2020)によって、ケトプロフェン(CAS 22071-15-4、Sigma-Aldrich、98%) 100、1,000、10,000、50,000 μ g/L(設定濃度)に受精後120時間ばく露したゼブラフィッシュ胚への影響が検討されている。その結果として、50,000 μ g/L のばく露区で孵化率の低値が認められた。

また、ケトプロフェン(CAS 22071-15-4、Sigma-Aldrich、98%) 100 μ g/L(設定濃度)に受精後20日目から6日間ばく露したゼブラフィッシュへの影響が検討されている。その結果として、プロスタグランジン合成系遺伝子 *ptgs1* mRNA 相対発現量、プロスタグランジン合成系遺伝子(*ptgs2a*、*ptgs2b*) mRNA 相対発現量、雌性(female-biased)遺伝子 *zp2*、*vgt2*、*foxl2*、*wnt4* mRNA 相対発現量の低値が認められた。なお、プロスタグランジン合成系遺伝子 *ptgds* mRNA 相対発現量、薬物代謝関連遺伝子(*cyo1a1*、*ahr1a1*、*Sult1st1*、*Sult4a1*、*ugt1a1*) mRNA 相対発現量、アポトーシス関連遺伝子(*p21*、*casp8*、*mt-co2*) mRNA 相対発現量には影響は認められなかった。【16202】(△○P)
想定される作用メカニズム：プロスタグランジン合成抑制→エストロゲン低下→female-biased 遺伝子 (*zp2*、*vgt2*、*foxl2*、*wnt4*) の発現低下

なお、本試験結果の解釈にあたっては、試験生物の学名が示されていない点に注意を要すると判断された。

(2) 血漿中コルチゾール濃度への影響

①Ting ら(2003)によって、ケトプロフェン(Ketofen、Merial Animal Health、10%) 1.5、3 mg/kg を11ヶ月齢(平均体重300 \pm 3.3kg)にて精巣摘出処理20分前に単回投与した雄Holstein-Friesian ウシへの影響が検討されている。その結果として、1.5mg/kg 以上のばく露群で血漿中コルチゾール濃度(投与後12時間までの曲線下面積)の低値が認められた。【16208】(×ー)

想定される作用メカニズム：コルチゾール分泌抑制作用

なお、本試験結果の解釈にあたっては、低純度の試薬を用いて実施された試験である点に注意を要すると判断された。

- ②Sutherland ら(2002)によって、ケトプロフェン(Ketofen、Rhone Merieux、10%) 3.0~3.75mg/kg を3~4ヶ月齢(体重 56~169kg)にて除角処置(dehorning)15分前に単回静脈内投与した Friesian ウシ(除角処置対象となっていることから雌と思われる)への影響が検討されている。その結果として、3.0~3.75mg/kg のばく露群で血漿中コルチゾール濃度(除角処理後 5.5~7 時間)の低値が認められた【16209】(×ー)

想定される作用メカニズム：コルチゾール分泌抑制作用

なお、本試験結果の解釈にあたっては、低純度の試薬を用いて実施された試験である点に注意を要すると判断された。

※参考 (3) 甲状腺影響(今回評価対象としなかった文献)

- ①Daminet ら(2003)によって、ケトプロフェン(Merial) 1 mg/kg/day を2~3歳から7日間 8:00 に経口投与した雌 Beagle イヌへの影響が検討されているが、血清中総サイロキシシン濃度、血清中遊離サイロキシシン濃度、血清中総トリヨードサイロニン濃度、血清中総リバーストリヨードサイロニン濃度、血清中甲状腺刺激ホルモン濃度、血清中遊離/総サイロキシシン濃度比、血清中総トリヨードサイロニン/総サイロキシシン濃度比には影響は認められなかった。【16207】

評価未実施の理由：影響が認められなかった報告のため。

(4) エストロゲン作用

- ①Ezechiáš ら(2016)によって、ケトプロフェン(Sigma-Aldrich、98%) 0.33~65.54μM(=83.9~16,700μg/L)の濃度に 2.5 時間ばく露した酵母(エストロゲン受容体を発現)によるレポータージーンアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されているが、ルシフェラーゼ発現誘導は認められなかった。【14939】(△○N)

(5) 抗エストロゲン作用

- ①Ezechiáš ら(2016)によって、ケトプロフェン(Sigma-Aldrich、98%) 0.33~65.54μM(=83.9~16,700μg/L)の濃度に 2.5 時間ばく露(17β-エストラジオール 0.416μg/L(=1.53nM)共存下)した酵母(エストロゲン受容体を発現)によるレポータージーンアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 100μM(=25,400μg/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導の阻害が認められた。【14939 再】(△?)

なお、本試験結果の解釈にあたっては、IC₅₀ 値が計算値であり、試験濃度範囲外である点に注意を要すると判断された。

(6) アンドロゲン作用

- ①Ezechiáš ら(2016)によって、ケトプロフェン(Sigma-Aldrich、98%) 0.33~65.54μM(=83.9~16,700μg/L)の濃度に 2.5 時間ばく露した酵母(アンドロゲン受容体を発現)によるレポータージーンアッセイ(アンドロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されているが、ルシフェラーゼ発現誘導は認められなかった。【14939 再】(△○N)

(7) 抗アンドロゲン作用

①Ezechiáš ら(2016)によって、ケトプロフェン(Sigma-Aldrich、98%) 0.33~65.54 μ M(=83.9~16,700 μ g/L)の濃度に2.5時間ばく露(テストステロン4.16 μ g/L(=14.4nM)共存下)した酵母(アンドロゲン受容体を発現)によるレポーター遺伝子アッセイ(アンドロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、IC₅₀値6.76 μ M(=1,720 μ g/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導の阻害が認められた。【14939再】(△OP)

(8) ヒト乳がん細胞への影響

①Ezechiáš ら(2016)によって、ケトプロフェン(Sigma-Aldrich、98%) 12~393 μ M(=3,050~99,900 μ g/L)の濃度に2日間ばく露したヒト乳がん細胞 T47D (エストロゲン受容体を発現)への影響が検討されているが、サイトカイン CXCL12分泌量(17 β -エストラジオール9.18pM 共存又は非共存下)には影響は認められなかった。【14939再】(△ON)

※参考 (9) メダカ卵胞への影響(今回評価対象としなかった文献)

①Yokota ら(2016)によって、ケトプロフェン(和光純薬、98%) 5、50、500 μ M、(=1,270、12,700、127,000 μ g/L)の濃度に10時間ばく露した成熟雌メダカ(*Oryzias latipes*)由来卵胞(排卵予定時刻6:00の約10時間前に相当する20:00に卵巣から採取)への影響が検討されているが、排卵率(排卵予定時刻から6時間後)には影響は認められなかった。【14121】
評価未実施の理由：影響が認められなかった報告のため。

※参考 (10) ヒト血清中サイロキシン濃度への影響(今回評価対象としなかった文献)

①Lim ら(1988)によって、ケトプロフェン(Sigma) 30 μ M(=7,630 μ g/L)の濃度に16~18時間ばく露したヒト血清(甲状腺機能障害患者から採取し混合、総サイロキシン濃度95nM、サイロキシン結合グロブリン20mg/L、トランスサイレチン280mg/L)への影響が検討されているが、遊離サイロキシン濃度には影響は認められなかった。【14135】
評価未実施の理由：影響が認められなかった報告のため。

2. 総合的判断(案)

得られた報告について信頼性評価を実施した結果として、内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠として認められると評価された報告が得られた。

試験対象物質として選定する根拠として認められると評価された報告から、動物試験の報告において、プロスタグランジン合成抑制作用を示すこと、試験管内試験の報告において、抗アンドロゲン作用を示すことが示唆された。

なお、信頼性評価のまとめと今後の対応案について表2に示した。

表2 信頼性評価のまとめと今後の対応案

物質名：ケトプロフェン

区分		著者 【参考文献番号】	作業班会議における信頼性評価結果		
			報告結果(Results)を検証するために必要である『材料と方法(Materials and Methods)』に関する記載の有無及びその評価 ¹⁾	内分泌かく乱作用との関連の有無 ²⁾	内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠としての評価 ³⁾
(1)生態影響	毒性	①Mennillo ら(2018)【16203】	△	?	—
	プロスタグランジン合成抑制→エストロゲン低下→female-biased 遺伝子 (<i>zp2</i> , <i>vtg2</i> , <i>foxl2</i> , <i>wnt4</i>) の発現低下	②Bereketoglu ら(2020)【16202】	△	○P	○
(2)血漿中コルチゾール濃度への影響		①Ting ら(2003)【16208】	×	—	×
		②Sutherland ら(2002)【16209】	×	—	×
(3)甲状腺影響		①Daminet ら(2003)【16207】 評価未実施			
(4)エストロゲン作用		①Ezechiáš ら(2016)【14939】	△	○N	×
(5)抗エストロゲン作用		①Ezechiáš ら(2016)【14939】	△	?	—
(6)アンドロゲン作用		①Ezechiáš ら(2016)【14939】	△	○N	×
(7)抗アンドロゲン作用		①Ezechiáš ら(2016)【14939】	△	○P	○
(8)ヒト乳がん細胞への影響		①Ezechiáš ら(2016)【14939】	△	○N	×
(9)メダカ卵胞への影響		①Yokota ら(2016)【14121】 評価未実施			
(10)ヒト血清中サイロキシン濃度への影響		①Lim ら(1988)【14135】 評価未実施			
信頼性評価のまとめと今後の対応案	動物試験の報告において、プロスタグランジン合成抑制作用を示すこと、試験管内試験の報告において、抗アンドロゲン作用を示すことが示唆されたため内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る。				

- 1)○：十分に記載されている、△：一部記載が不十分である、×：記載が不十分である、—：評価を行わない
 2)○：内分泌かく乱作用との関連性が認められる(P：作用が認められる、N：作用が認められない)、?：内分泌かく乱作用との関連性は不明、×：内分泌かく乱作用との関連性が認められない、—：評価を行わない
 3)○：試験対象物質として選定する根拠として認められる、×：試験対象物質として選定する根拠として認められない、—：内分泌かく乱作用との関連性が不明であるため、評価ができない

参考文献

14121: Yokota H, Eguchi S, Hasegawa S, Okada K, Yamamoto F, Sunagawa A, Tanaka M, Yamamoto R and Nakano E (2016) Assessment of *in vitro* antiovarulatory activities of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and comparison with *in vivo* reproductive toxicities of medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology, 31 (12), 1710-1719.

- 14135: Lim CF, Bai Y, Topliss DJ, Barlow JW and Stockigt JR (1988) Drug and fatty acid effects on serum thyroid hormone binding. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 67 (4), 682-688.
- 14939: Ezechiáš M, Janochová J, Filipová A, Křesinová Z and Cajthaml T (2016) Widely used pharmaceuticals present in the environment revealed as *in vitro* antagonists for human estrogen and androgen receptors. *Chemosphere*, 152, 284-291.
- 16202: Bereketoglu C, Pradhan A and Olsson PE (2020) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) cause male-biased sex differentiation in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 223, 105476.
- 16203: Mennillo E, Arukwe A, Monni G, Meucci V, Intorre L and Pretti C (2018) Ecotoxicological properties of ketoprofen and the S (+)-enantiomer (dexketoprofen): Bioassays in freshwater model species and biomarkers in fish PLHC-1 cell line. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37 (1), 201-212.
- 16207: Daminet S, Croubels S, Duchateau L, Debunne A, van Geffen C, Hoybergs Y, van Bree H and de Rick A (2003) Influence of acetylsalicylic acid and ketoprofen on canine thyroid function tests. *Veterinary Journal*, 166 (3), 224-232.
- 16208: Ting ST, Earley B and Crowe MA (2003) Effect of repeated ketoprofen administration during surgical castration of bulls on cortisol, immunological function, feed intake, growth, and behavior. *Journal of Animal Science*, 81 (5), 1253-1264.
- 16209: Sutherland MA, Mellor DJ, Stafford KJ, Gregory NG, Bruce RA and Ward RN (2002) Cortisol responses to dehorning of calves given a 5-h local anaesthetic regimen plus phenylbutazone, ketoprofen, or adrenocorticotrophic hormone prior to dehorning. *Research in Veterinary Science*, 73 (2), 115-123.

中鎖塩素化パラフィン類

Ⅲ. 塩素化テトラデカン類 (C=14、Cl=4~9)

Ⅳ. 塩素化ペンタデカン類 (C=15、Cl=4~9)

Ⅴ. 塩素化ヘキサデカン類 (C=16、Cl=4~9)

Ⅵ. 塩素化ヘプタデカン類 (C=17、Cl=4~9)

1. 内分泌かく乱作用に関連する報告

塩素化テトラデカン類 (C=14、Cl=4~9)、塩素化ペンタデカン類 (C=15、Cl=4~9)、塩素化ヘキサデカン類 (C=16、Cl=4~9)、塩素化ヘプタデカン類 (C=17、Cl=4~9) の4物質群は、中鎖塩素化パラフィン類 (C=14~17、Cl=4~9) に分類される。これらの物質群については、報告数が限定的であったこと、炭素数 14~17 の混合物についての試験結果を示した報告がその半数を占めたことから、ここでは、中鎖塩素化パラフィン類 (C=14~17、Cl=4~9) として、一括して評価することとした。

中鎖塩素化パラフィン類 (C=14~17、Cl=4~9) の内分泌かく乱作用に関連する報告として、生態影響、甲状腺影響、甲状腺ホルモン作用又は抗甲状腺ホルモン作用に関する報告がある。

※参考 (1) 生態影響(今回評価対象としなかった文献)

①Cooley ら(2001)によって、中鎖塩素化パラフィン類(Polychlorinated *n*-alkane、著者らによる合成、炭素数 14、塩素数 4:5:6:7 の組成比 11:74:14:1) 0.78、2.9ppm(餌中濃度)に 21 日間混餌投与(全身中濃度 110、28 μ g/kg)したニジマス(*Oncorhynchus mykiss*)への影響が検討されている。その結果として、0.78 μ g/L 以上のばく露区で肝細胞容積指数の低値が認められた。なお、体重、肝臓体指数、肝細胞核直径、肝細胞核/細胞質面積比、甲状腺上皮細胞高さには影響は認められなかった。

また、中鎖塩素化パラフィン類(Polychlorinated *n*-alkane、著者らによる化学合成、炭素数 14、塩素数 4:5:6:7 の組成比 11:74:14:1) 0.082ppm(餌中濃度)に 85 日間混餌投与(全身中濃度 18 μ g/kg)したニジマス(*O. mykiss*)への影響が検討されているが、体重、肝臓体指数、肝細胞核直径、肝細胞容積指数、肝細胞核/細胞質面積比、甲状腺上皮細胞高さには影響は認められなかった。【5316】

評価未実施の理由：評価項目について、内分泌かく乱作用との関連性は低いと考えられたため。

なお、本試験結果の解釈にあたっては、餌中濃度と全身中濃度の関係に注意を要すると判断された。

(2) 甲状腺影響

①Poon ら(1995)によって、中鎖塩素化パラフィン類(Medium-chain chlorinated paraffin、ICI Canada、炭素数 14~17、塩素化率 52%) 0.4、3.6、36.2、362.9mg/kg/day (餌中濃度 5、50、500、5,000ppm)を 13 週間混餌投与した雄 SD ラットへの影響が検討されている。その結果として、36.2mg/kg/day 以上のばく露群で甲状腺の組織病理学的変化(角状構造の崩壊、濾胞サイズ低下、上皮細胞厚増加、細胞質液胞化、核の小胞形成)の顕在化、362.9mg/kg/day のばく露群で肝臓中ビタミン A 濃度の低値、肝臓絶対及び相対重量、腎臓相対重量、肝臓中 UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ比活性の高値が認められた。なお、増加体重、腎臓絶対重量、血清中コレステロール濃度、腎臓中ビタミン A 濃度、肝臓中アミノピリン-N-デメチラーゼ比活性には影響は認められなかった。

また、中鎖塩素化パラフィン類(Medium-chain chlorinated paraffin、ICI Canada、炭素数 14~17、塩素化率 52%) 0.4、4.2、42.2、418.9mg/kg/day (餌中濃度 5、50、500、5,000ppm)を 13 週間混餌投与

した雌 SD ラットへの影響が検討されている。その結果として、4.2mg/kg/day 以上のばく露群で甲状腺の組織病理学的変化(角状構造の崩壊、濾胞サイズ低下、上皮細胞厚増加、細胞質液胞化、核の小胞形成)の顕在化、42.2mg/kg/day 以上のばく露群で腎臓中ビタミン A 濃度の低値、肝臓相対重量、血清中コレステロール濃度の高値、418.9mg/kg/day のばく露群で肝臓絶対重量、腎臓相対重量、肝臓中 UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ比活性、肝臓中アミノピリン-N-デメチラーゼ比活性、腎臓中ビタミン A 濃度の高値が認められた。なお、増加体重、腎臓絶対重量には影響は認められなかった。【5317】(評価結果の略号：△○P、以下同じ)

想定される作用メカニズム：甲状腺組織への作用

②Wyatt ら(1993)によって、中鎖塩素化パラフィン類(Chloparaffin 40G、Dr Wiegand H-J から供与、炭素数 14~17、塩素化率 40%) 10、50、100、250、500、1,000mg/kg/day を 14 日間経口投与した雄 SD ラットへの影響が検討されている。その結果として、100、500、1,000mg/kg/day のばく露群で肝臓絶対及び相対重量の高値、500mg/kg/day 以上のばく露群で肝臓中パルミトイル CoA 濃度の高値、1,000mg/kg/day のばく露群で血漿中遊離サイロキシン濃度、血漿中総サイロキシン濃度の低値、血漿中甲状腺刺激ホルモン濃度、肝臓ミクロソーム中 UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ比活性(サイロキシンを基質とする)の高値が認められた。なお、増加体重、血漿中遊離トリヨードサイロニン濃度、血漿中総トリヨードサイロニン濃度には影響は認められなかった。

また、中鎖塩素化パラフィン類(Chloparaffin 40G、Dr Wiegand H-J から供与、炭素数 14~17、塩素化率 40%) 10、50、100、250、500、1,000mg/kg/day を 14 日間経口投与した雄 CD-1 マウスへの影響が検討されている。その結果として、500mg/kg/day 以上のばく露群で肝臓中パルミトイル CoA 濃度の高値、1,000mg/kg/day のばく露群で肝臓絶対及び相対重量の高値が認められた。なお、増加体重には影響は認められなかった。【5318】(△○P)

想定される作用メカニズム：サイロキシンへのグルクロン酸抱合の増加による血中サイロキシン濃度低下

(3) 甲状腺ホルモン作用又は抗甲状腺ホルモン作用

①Sprengel ら(2021)によって、中鎖塩素化パラフィン類(Medium-chain, chlorinated paraffins、著者らによる合成、炭素数 16、塩素化率 48.3%、平均分子量 427) 1 ~10,000µM(=427~4,270,000µg/L)の濃度に 24 時間ばく露したヒト骨肉腫細胞 U2-OS による TTR-TR CALUX アッセイ(TTR:トランスサイレチン、TR:甲状腺ホルモン受容体 β)が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 210µM(=89,700µg/L)の濃度でトランスサイレチン(0.058µM)に対するサイロキシン(0.052µM)の結合阻害が認められた。

また、中鎖塩素化パラフィン類(Medium-chain, chlorinated paraffins、著者らによる合成、炭素数 14、塩素化率 50.1%、平均分子量 384) 1 ~10,000µM(=427~4,270,000µg/L)の濃度に 24 時間ばく露したヒト骨肉腫細胞 U2-OS による TTR-TR CALUX アッセイ(TTR:トランスサイレチン、TR:甲状腺ホルモン受容体 β)が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 180µM(=69,100µg/L)の濃度でトランスサイレチン(0.058µM)に対するサイロキシン(0.052µM)の結合阻害が認められた。【16211】(△○P)

想定される作用メカニズム：甲状腺ホルモンのトランスサイレチンへの結合阻害

2. 総合的判断(案)

得られた報告について信頼性評価を実施した結果として、内分泌かく乱作用に関する試験対象物質

として選定する根拠として認められると評価された報告が得られた。

試験対象物質として選定する根拠として認められると評価された報告から、動物試験の報告において、甲状腺組織への作用、サイロキシンへのグルクロン酸抱合の増加による血中サイロキシン濃度低下作用を示すこと、試験管内試験の報告において、甲状腺ホルモンのトランスサイレチンへの結合阻害作用を示すことが示唆された。

なお、信頼性評価のまとめと今後の対応案について表3に示した。

表3 信頼性評価のまとめと今後の対応案

物質名：中鎖塩素化パラフィン類

区分	著者 【参考文献番号】	作業班会議における信頼性評価結果			
		報告結果(Results)を検証するために必要である『材料と方法(Materials and Methods)』に関する記載の有無及びその評価 ¹⁾	内分泌かく乱作用との関連の有無 ²⁾	内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠としての評価 ³⁾	
(1)生態影響	①Cooley ら(2001) 【5316】 評価未実施				
(2)甲状腺影響	甲状腺組織への作用	①Poon ら(1995) 【5317】	△	○P	○
	サイロキシンへのグルクロン酸抱合の増加による血中サイロキシン濃度低下	②Wyatt ら(1993) 【5318】	△	○P	○
(3)甲状腺ホルモン作用又は抗甲状腺ホルモン作用	甲状腺ホルモンのトランスサイレチンへの結合阻害	①Sprengel ら(2021) 【16211】	△	○P	○
信頼性評価のまとめと今後の対応案	動物試験の報告において、甲状腺組織への作用、サイロキシンへのグルクロン酸抱合の増加による血中サイロキシン濃度低下作用を示すこと、試験管内試験の報告において、甲状腺ホルモンのトランスサイレチンへの結合阻害作用を示すことが示唆されたため内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る。				

- 1)○：十分に記載されている、△：一部記載が不十分である、×：記載が不十分である、—：評価を行わない
 2)○：内分泌かく乱作用との関連性が認められる(P：作用が認められる、N：作用が認められない)、?：内分泌かく乱作用との関連性は不明、×：内分泌かく乱作用との関連性が認められない、—：評価を行わない
 3)○：試験対象物質として選定する根拠として認められる、×：試験対象物質として選定する根拠として認められない、—：内分泌かく乱作用との関連性が不明であるため、評価ができない

参考文献

5316: Cooley HM, Fisk AT, Wiens SC, Tomy GT, Evans RE and Muir DC (2001) Examination of the behavior and liver and thyroid histology of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to high dietary concentrations of C(10)-, C(11)-, C(12)- and C(14)-polychlorinated *n*-alkanes. *Aquatic Toxicology*, 54 (1-2), 81-99.

5317: Poon R, Lecavalier P, Chan P, Viau C, Håkansson H, Chu I and Valli VE (1995) Subchronic toxicity of a medium-chain chlorinated paraffin in the rat. *Journal of Applied Toxicology*, 15 (6), 455-463.

- 5318: Wyatt I, Coutts CT and Elcombe CR (1993) The effect of chlorinated paraffins on hepatic enzymes and thyroid hormones. *Toxicology*, 77 (1-2), 81-90.
- 16211: Sprengel J, Behnisch PA, Besselink H, Brouwer A and Vetter W (2021) *In vitro* human cell-based TTR-TR β CALUX assay indicates thyroid hormone transport disruption of short-chain, medium-chain and long-chain chlorinated paraffins. *Archives of Toxicology*, 95 (4), 1391-1396.

VII. ビスフェノール B

1. 内分泌かく乱作用に関連する報告

ビスフェノール B の内分泌かく乱作用に関連する報告として、生態影響、生殖影響、エストロゲン作用、抗エストロゲン作用、アンドロゲン作用、抗アンドロゲン作用、ヒト乳がん細胞への影響、ラット精巣組織への影響、マウス卵母細胞への影響、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体への影響、疫学的調査に関する報告がある。

(1) 生態影響

①Li ら(2022)によって、ビスフェノール B (Sigma Aldrich, 98%) 2.42、24.2、242 μ g/L (=0.01、0.1、1 μ M、設定濃度)に Stage 45/46 (受精後 4 日目)から Stage 52 (初期生殖腺発達期)までばく露したアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)への影響が検討されている。その結果として、2.42 μ g/L 以上のばく露区で精巣細胞増殖率、生殖腺一中腎中 gonomere (雄特異的な細胞内形態の一種)数の低値、生殖腺一中腎中 *vtgbl* mRNA 相対発現量の高値、2.42、24.2 μ g/L のばく露区で生殖腺一中腎中 *amh* mRNA 相対発現量、生殖腺一中腎中 *sox9* mRNA 相対発現量、生殖腺一中腎中 *cyp17a1* mRNA 相対発現量の低値、24.2 μ g/L 以上のばく露区で生殖腺一中腎中 *cyp19a1* mRNA 相対発現量の高値、24.2 μ g/L のばく露区で生殖腺一中腎中 *dmrt1* mRNA 相対発現量の低値が認められた。なお、生殖腺一中腎中 *foxl2* mRNA 相対発現量には影響は認められなかった。

また、ビスフェノール B (Sigma Aldrich, 98%) 2.42、24.2、242 μ g/L (=0.01、0.1、1 μ M、設定濃度)に Stage 45/46 (受精後 4 日目)から Stage 66 (変態期)までばく露したアフリカツメガエル(*X. laevis*)への影響が検討されている。その結果として、2.42 μ g/L 以上のばく露区で生殖腺正常個体率、生殖腺一中腎中 *amh* mRNA 相対発現量、生殖腺一中腎中 *sox9* mRNA 相対発現量、生殖腺一中腎中 *dmrt1* mRNA 相対発現量の低値、雄生殖腺相対長(対腎臓長)、生殖腺一中腎中 *vtgbl* mRNA 相対発現量の高値、2.42、24.2 μ g/L のばく露区で生殖腺一中腎中 *foxl2* mRNA 相対発現量の低値、24.2 μ g/L 以上のばく露区で生殖腺一中腎中 *cyp19a1* mRNA 相対発現量の高値、242 μ g/L のばく露区で精巣中精原細胞数の低値が認められた。なお、雌生殖腺相対長(対腎臓長)には影響は認められなかった。

また、ビスフェノール B (Sigma Aldrich, 98%) 2.42、24.2、242 μ g/L (=0.01、0.1、1 μ M、設定濃度)に Stage 45/46 (受精後 4 日目)から変態後 1 ヶ月目までばく露したアフリカツメガエル(*X. laevis*)への影響が検討されている。その結果として、2.42 μ g/L 以上のばく露区で生殖腺正常個体率の低値が認められた。【16159】(評価結果の略号： Δ OP、以下同じ)

想定される作用メカニズム：エストロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用

なお、本試験結果の解釈にあたっては、Stage 45/46 から Stage 52 までばく露した試験においては、陽性対照としてエストラジオール 10nM 区も設定し一層強い作用を確認している点、一部の影響がエストロゲン受容体アンタゴニスト ICI 182980 100nM 共存で減弱したとみなされる点に注意を要すると判断された。また、統計学的な検定において、雌雄それぞれの対照区との相対値を求めてから、雌雄混合している点に注意を要すると判断された。

②Yang ら(2021)によって、ビスフェノール B (J&K Scientific) 1、10、100、1,000 μ g/L(設定濃度)に受精後 2 時間から受精後 144 時間までばく露したゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)への影響が検討されている。その結果として、10 μ g/L 以上のばく露区で行動試験における平均遊泳速度、行動試験における総移動距離の低値、全身中トリヨードサイロニン濃度、全身中トリヨードサイロニン/サイロキシ

ン濃度比の高値、100 μ g/L以上のばく露区で孵化率、生存率の低値、奇形率の高値、1,000 μ g/Lのばく露区で全身中サイロキシン濃度の低値が認められた。

また、視床下部一下垂体—甲状腺軸関連遺伝子 mRNA 相対発現量についても検討されており、1 μ g/L以上のばく露区で *tsh β* 、*trh* の低値、*dio1*、*dio2*、*trhr1* の高値、10 μ g/L以上のばく露区で *tg*、*ttr*、*thra* の高値、100 μ g/L以上のばく露区で *thr β* の高値が認められた。なお、*nis*、*tshr* には影響は認められなかった。

また、神経発達関連遺伝子 mRNA 相対発現量についても検討されており、10 μ g/L以上のばく露区で *α 1-tubulin*、*myelin basic proten*、*syn2a*、*elavl3*、*zn5* の低値、100 μ g/L以上のばく露区で *gap43* の低値が認められた。【16163】(△○P)

想定される作用メカニズム：視床下部一下垂体—甲状腺軸への作用、高濃度では毒性

(2) 生殖影響

①Ijaz ら(2020)によって、ビスフェノール B(Santa Cruz Biotechnologies、99%) 0.05、0.5、5、50mg/kg/day を 28 日間腹腔内した成熟雌 SD ラットへの影響が検討されている。その結果として、0.05mg/kg/day 以上のばく露群で子宮絶対重量、卵巣中黄体数の低値、血漿中プロゲステロン濃度の低値、0.5mg/kg/day 以上のばく露群で子宮相対重量、卵巣中カタラーゼ比活性の低値、卵巣中閉塞卵胞数、卵巣中胞状卵胞直径の高値、0.5、5 mg/kg/day のばく露群で卵巣中活性酸素種濃度の高値、0.5、50mg/kg/day のばく露群で血漿中エストラジオール濃度、卵巣中スーパーオキシドディスムターゼ比活性の低値、0.5mg/kg/day のばく露群で卵巣中卵胞顆粒高の低値(50mg/kg/day 群では高値)、5 mg/kg/day 以上のばく露群で血漿中黄体形成ホルモン濃度の低値、50mg/kg/day のばく露群で両卵巣絶対重量、生殖腺体指数、血漿中卵胞刺激ホルモン濃度、卵巣中胞状卵胞数の低値、血漿中テストステロン濃度、卵巣中過酸化脂質濃度、卵巣中黄体直径の高値が認められた。なお、体重、増加体重、腎臓絶対重量、肝臓絶対重量、心臓絶対重量、卵巣中ペルオキシダーゼ比活性、卵巣中排卵前卵胞数、卵胞膜高には影響は認められなかった。【16171】(△○P)

想定される作用メカニズム：視床下部一下垂体—生殖腺軸への作用

②Ullah ら(2018)によって、ビスフェノール B(Santa Cruz Biotechnologies、99%) 5、25、50mg/kg/day を 70~80 日齢から 28 日間経口投与した雄 SD ラットへの影響が検討されている。その結果として、5 mg/kg/day 以上のばく露群で血漿中テストステロン濃度、精巣中テストステロン濃度、精巣中ペルオキシダーゼ比活性の低値、5、50mg/kg/day のばく露群で精巣中蛋白質濃度の低値、25mg/kg/day のばく露群で精巣中カタラーゼ比活性の低値、50mg/kg/day のばく露群で精細管上皮厚の低値、精巣中過酸化脂質濃度、精巣中総活性酸素種濃度の高値が認められた。なお、体重、左右精巣絶対重量、精巣中スーパーオキシドディスムターゼ活性、精巣中精細管画像面積、精巣間質画像面積、精細管直径には影響は認められなかった。【16175】(△○P)

想定される作用メカニズム：視床下部一下垂体—生殖腺軸への作用、ステロイドホルモン産生の抑制

なお、本試験結果の解釈にあたっては、動物入手及び投与開始時の日齢や投与量の記載に不整合がある点に注意を要すると判断された。

③Li ら(2021a)によって、ビスフェノール B(東京化成、98.0%) 10、100、200mg/kg/day を 35 日齢から 56 日齢まで経口投与した雄 SD ラットへの影響が検討されている。その結果として、10mg/kg/day 以上のばく露群で精巣中 CYP11A1 蛋白質発現量の低値、精巣中 SOX9 蛋白質発現量の高値、100mg/kg/day 以上のばく露群で血清中テストステロン濃度、血清中卵胞刺激ホルモン濃度の低値、

精巣中 CYP11A1 蛋白質発現ライディッチ細胞数の高値、200mg/kg/day のばく露群で体重、精巣上体絶対重量、血清中黄体形成ホルモン濃度、精巣中 HSD11B1 蛋白質発現量の低値、AKT1 キナーゼりん酸化率、AKT2 キナーゼりん酸化率、ERK1/2 キナーゼりん酸化率の高値が認められた。なお、精巣絶対重量、血清中テストステロン/黄体形成ホルモン濃度比、精巣中セルトリ細胞数、精巣中 HSD11B1 蛋白質発現ライディッチ細胞数には影響は認められなかった。

また、精巣中ライディッチ細胞関連遺伝子 mRNA 相対発現量についても検討されており、100mg/kg/day 以上のばく露群で *Cyp11a1*、*Hsd3b1* の低値、100mg/kg/day のばく露群で *Srd5a1* の高値、200mg/kg/day のばく露群で *Cyp17a1*、*Akr1c14*、*Nr5a1* の低値が認められた。なお、*Lhcgr*、*Scab1*、*Star*、*Hsd17b3*、*Hsd11b1*、*Insl3* には影響は認められなかった。

また、精巣中セルトリ細胞、抗酸化、細胞周期調節関連遺伝子 mRNA 相対発現量についても検討されており、10mg/kg/day 以上のばく露群で *Cdk2*、*Cdk4* の高値、100mg/kg/day 以上のばく露群で *Fshr*、*Pdgfa*、*Sox9*、*Pcna* の高値、200mg/kg/day のばく露群で *Amh* の低値、*Ccnb1* の高値が認められた。なお、*Dhh*、*Sod1*、*Sod2*、*Ppx1*、*Cat*、*Ccna2*、*Ccnd1*、*Cdk1* には影響は認められなかった。

また、精巣中ライディッチ細胞関連蛋白質相対発現量についても検討されており、10mg/kg/day 以上のばく露群で CYP11A1、HSD3B1 の低値、200mg/kg/day のばく露群で AKR1C14、HSD11B1 の低値が認められた。なお、LHCGR、SCARB1、STAR、SRD5A1 には影響は認められなかった。

また、精巣中セルトリ細胞、抗酸化、細胞周期調節関連についても検討されており、10mg/kg/day 以上のばく露群で PCNA、CDK2、CDK4 の高値、100mg/kg/day のばく露群で PDGFA、FSHR、SOX9、CCNB1 の高値、200mg/kg/day のばく露群で CDK1 が認められた。【16165】(〇〇P)

想定される作用メカニズム：ライディッチ細胞のアンドロゲン合成阻害、ステロイドホルモン関連遺伝子の発現抑制、ライディッチ細胞の増殖促進及び成熟抑制、視床下部一下垂体—生殖腺軸への作用、高用量では毒性

- ④Ullah ら(2019)によって、ビスフェノール B (Sigma-Aldrich) 、0.005、0.025、0.05ppm (飲水中濃度) を妊娠 1 日目から妊娠 21 日目(出産 1 日目)まで飲水投与した SD ラットへの影響(80 日齢雄仔動物について主に測定)が検討されている。その結果として、0.025ppm 以上のばく露群で精巣中ペルオキシダーゼ比活性、精巣上体中精子数、精巣中精細管画像面積の低値、0.05ppm のばく露群で精囊絶対重量、日毎精子産生数、精巣間質画像面積、精巣内腔画像面積、精細管直径、血漿中テストステロン濃度、血漿中黄体形成ホルモン濃度、血漿中卵胞刺激ホルモン濃度、精巣中精原細胞数、精巣中精母細胞数、精巣中精子細胞数、運動精子率、精巣中カタラーゼ比活性、精巣中スーパーオキシドディスムターゼ比活性の低値、精巣中過酸化脂質濃度、精巣中活性酸素種濃度、体重、精細管上皮厚、血漿中エストラジオール濃度の高値が認められた。なお、包皮分離日(23 日齢以後観察)、左右精巣絶対重量、左右精巣上体絶対重量、前立腺絶対重量、尿道球腺重量、球海綿体筋重量、脂肪体絶対重量、腎臓絶対重量、肝臓絶対重量、副腎絶対重量、精巣上体尾への精子移行所要時間、精巣上皮画像面積、生存精子率、出産パラメータ(母動物増加体重、同腹産仔数、新生仔雄性比、雄新生仔体重、雄新生仔肛門生殖突起間距離、雄新生仔乳頭残留率)には影響は認められなかった。【16170】(△〇P)

想定される作用メカニズム：視床下部一下垂体—生殖腺軸への作用

(3) エストロゲン作用

- ①Yamasaki ら(2002)によって、ビスフェノール B (東京化成、99.8%) 2、20、200mg/kg/day を 20 日齢

から3日間皮下投与した雌SDラットへの影響が検討されている。その結果として、200mg/kg/dayのばく露群で子宮絶対重量の高値が認められた。

また、ビスフェノールB(東京化成、99.8%)0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10 μ M(=0.00242、0.0242、0.242、2.42、24.2、242、2,420 μ g/L)の濃度に24時間ばく露した子宮頸がん細胞HeLa229(ラットエストロゲン受容体を発現)によるレポータージーンアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、EC₅₀値0.1674 μ M(=40.6 μ g/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導が認められた。【5872】(○●P)

②Durcikら(2022)によって、ビスフェノールB(Fluorochem、98%)0.01、0.1、0.5、1、5、10 μ M(=2.42、24.2、121、242、1,210、2,420 μ g/L)の濃度に24時間ばく露したヒト子宮頸がん細胞HeLa9903(ヒトエストロゲン受容体 α を発現)によるレポータージーンアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、EC₅₀値0.31 μ M(=75 μ g/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導が認められた。【16160】(○●P)

③Pelchら(2019)によって、ビスフェノールB(TCI America、99.8%)0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 μ M(=0.727、2.42、7.27、24.2、72.7、242、727、2,420 μ g/L)の濃度に18時間ばく露したヒト肝臓がん細胞HepG2(ヒトエストロゲン受容体 α を発現)によるレポータージーンアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、EC₅₀値0.32 μ M(=76 μ g/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導が認められた。

また、ビスフェノールB(TCI America、99.8%)0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 μ M(=0.727、2.42、7.27、24.2、72.7、242、727、2,420 μ g/L)の濃度に18時間ばく露したヒト肝臓がん細胞HepG2(ヒトエストロゲン受容体 β を発現)によるレポータージーンアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されているが、ルシフェラーゼ発現誘導は認められなかった。【15825】(○●P)

④Liuら(2021)によって、ビスフェノールB(Research Biochemicals International、98%)0.00001~10 μ M(=0.00242~2,420 μ g/L)の濃度に24時間ばく露したヒト子宮頸がん細胞HeLa(ヒトエストロゲン受容体 α を発現)によるレポータージーンアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、EC₅₀値0.332 μ M(=80.4 μ g/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導が認められた。

また、ビスフェノールB(Research Biochemicals International、98%)0.00001~10 μ M(=0.00242~2,420 μ g/L)の濃度に24時間ばく露したヒト子宮頸がん細胞HeLa(ヒトエストロゲン受容体 β を発現)によるレポータージーンアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されているが、ルシフェラーゼ発現誘導は認められなかった。【16166】(△●P)

⑤Pisapiaら(2012)によって、ビスフェノールB(Sigma-Aldrich)10 μ M(=2,420 μ g/L)の濃度に96時間ばく露したヒト乳がん細胞MCF-7による細胞増殖試験が検討されている。その結果として、細胞増殖誘導が認められた。【16178】(△●P)

(4) エストロゲン作用又は抗エストロゲン作用

①Liuら(2021)によって、ビスフェノールB(Research Biochemicals International、98%)のエストロゲン受容体 β リガンド結合ドメインによる17 β -エストラジオール1nMに対する結合阻害(競合結合)試験が検討されている。その結果として、IC₅₀値0.0752 μ M(=18.2 μ g/L)の濃度で結合阻害が認められた。

また、ビスフェノール B (Research Biochemicals International, 98%)のエストロゲン受容体 α リガンド結合ドメインによる 17 β -エストラジオール 1 nM に対する結合阻害(競合結合)試験が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 0.214 μ M(=51.9 μ g/L)の濃度で結合阻害が認められた。【16166】(△○P)

なお、本試験結果の解釈にあたっては、測定濃度範囲を含む測定データの提示がない点に注意を要すると判断された。

②Cao ら(2017)によって、ビスフェノール B (J&K Scientific, 98%)0.001、0.01、0.1、1、10 μ M(=0.242、2.42、24.2、242、2,420 μ g/L)の濃度で G 蛋白質共役型エストロゲン受容体(GPER: G protein-coupled estrogen receptor)による 17 β -エストラジオール 50nM に対する結合阻害(競合結合)試験が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 3.3 μ M(=800 μ g/L)の濃度で結合阻害が認められた。【16177】(○○P)

(5) 抗エストロゲン作用

①Liu ら(2021)によって、ビスフェノール B (Research Biochemicals International, 98%) 0.00001～10 μ M(=0.00242～2,420 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露(17 β -エストラジオール 10nM 共存下)したヒト子宮頸がん細胞 HeLa (ヒトエストロゲン受容体 β を発現)によるレポーター遺伝子アッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 0.630 μ M(=153 μ g/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導の阻害が認められた。【16166】(△○P)

②Durcik ら(2022)によって、ビスフェノール B (Fluorochem, 98%) 0.01、0.1、0.5、1、5、10 μ M(=2.42、24.2、121、242、1,210、2,420 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露(17 β -エストラジオール 1nM 共存下)したヒト子宮頸がん細胞 HeLa 9903 (ヒトエストロゲン受容体 α を発現)によるレポーター遺伝子アッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されているが、ルシフェラーゼ発現誘導の阻害は認められなかった。【16160】(○○N)

③Pelch ら(2019)によって、ビスフェノール B (TCI America, 99.8%) 0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 μ M(=0.727、2.42、7.27、24.2、72.7、242、727、2,420 μ g/L)の濃度に 18 時間ばく露(17 β -エストラジオール 1nM 共存下)したヒト肝臓がん細胞 HepG2 (ヒトエストロゲン受容体 α を発現)によるレポーター遺伝子アッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されているが、ルシフェラーゼ発現誘導の阻害は認められなかった。

また、ビスフェノール B (TCI America, 99.8%) 0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 μ M(=0.727、2.42、7.27、24.2、72.7、242、727、2,420 μ g/L)の濃度に 18 時間ばく露(17 β -エストラジオール 1nM 共存下)したヒト肝臓がん細胞 HepG2 (ヒトエストロゲン受容体 β を発現)によるレポーター遺伝子アッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されているが、ルシフェラーゼ発現誘導の阻害は認められなかった。【15825】(○○N)

④Okazaki ら(2017)によって、ビスフェノール B (東京化成, 98%) 25 μ M(=6,060 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露(17 β -エストラジオール 1nM 共存下)したヒト乳がん細胞 MCF (ヒトエストロゲン受容体 α を発現)によるレポーター遺伝子アッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されているが、ルシフェラーゼ発現誘導の阻害は認められなかった。【16176】(○○N)

(6) アンドロゲン作用

- ①Pelch ら(2019)によって、ビスフェノール B (TCI America、99.8%) 0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 μ M(=0.727、2.42、7.27、24.2、72.7、242、727、2,420 μ g/L)の濃度に 18 時間ばく露したヒト乳がん細胞 MDA-kb2 (アンドロゲン受容体を発現)によるレポータージーンアッセイ(アンドロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されているが、ルシフェラーゼ発現誘導は認められなかった。【15825】(○○N)
- ②Yamasaki ら(2003)によって、ビスフェノール B (東京化成、99.8%) 50、200、600mg/kg/day を 56 日齢から 10 日間経口投与した雄 Wistar ラット(精巣摘出处置)への影響が検討されている。その結果として、200mg/kg/day のばく露群で肛門挙筋・球海綿体筋相対重量の低値、600mg/kg/day のばく露群で体重の低値が認められた。なお、腹側前立腺相対重量、精囊相対重量、陰茎相対重量、カウパー腺相対重量には影響は認められなかった。【5714】(○?)

(7) 抗アンドロゲン作用

- ①Pelch ら(2019)によって、ビスフェノール B (TCI America、99.8%) 0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 μ M(=0.727、2.42、7.27、24.2、72.7、242、727、2,420 μ g/L)の濃度に 18 時間ばく露(テストステロン 1 nM 共存下)したヒト乳がん細胞 MDA-kb2 (アンドロゲン受容体を発現)によるレポータージーンアッセイ(アンドロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 1.4 μ M(=340 μ g/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導の阻害が認められた。【15825】(○○P)
- ②Yamasaki ら(2003)によって、ビスフェノール B (東京化成、99.8%) 50、200、600mg/kg/day を 56 日齢から 10 日間経口投与(テストステロンプロピオネート 0.2mg/kg/day も皮下投与)した雄 Wistar ラット(精巣摘出处置)への影響(Hershberger 試験)が検討されている。その結果として、200mg/kg/day 以上のばく露群で腹側前立腺相対重量の低値、600mg/kg/day のばく露群で体重の低値、精囊相対重量、肛門挙筋+球海綿体筋相対重量、陰茎相対重量、カウパー腺相対重量の高値が認められた。【5714】(○?)

なお、本試験結果の解釈にあたっては、ビスフェノール B がテストステロンプロピオネートのアンドロゲン作用を増強しているとも解釈される点に注意を要すると判断された。

(8) ヒト乳がん細胞への影響

- ①Cao ら(2017)によって、ビスフェノール B (J&K Scientific、98%)0.001、0.01、0.1、1、10 μ M(=0.242、2.42、24.2、242、2,420 μ g/L)の濃度に 48 時間ばく露したヒト乳がん細胞 SKBR3 への影響が検討されている。その結果として、0.01 μ M(=2.42 μ g/L)以上の濃度区で cAMP 産生量、細胞内カルシウム動員(calcium mobilization)率の高値が認められた。

また、ビスフェノール B (J&K Scientific、98%)0.001、0.01、0.1、1、10 μ M(=0.242、2.42、24.2、242、2,420 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露したヒト乳がん細胞 SKBR3 への影響が検討されている。その結果として、0.1 μ M(=24.2 μ g/L)以上の濃度区で創傷治癒アッセイ及びボイデンチャンバーアッセイ(wound-healing and Boyden chamber assay)における細胞移動率の高値が認められた。

なお、1 μ M(=242 μ g/L) ビスフェノール B によるこれらの影響は、G 蛋白質共役型エストロゲン受容体(GPER: G protein-coupled estrogen receptor)選択的阻害剤 G15 10 μ M 共存下で抑制された。

【16177】(○○P)

想定される作用メカニズム：G 蛋白質共役型エストロゲン受容体(GPER)活性化作用

- ②Okazaki ら(2017)によって、ビスフェノール B (東京化成、98%) 25 μ M(=6,060 μ g/L)の濃度に 48 時間ばく露したヒト乳がん細胞 MCF への影響が検討されているが、*ER α* mRNA 相対発現量、*ER β* mRNA 相対発現量、*ER β* 蛋白質相対発現量、*Cdc2* (細胞周期進行に関連する *ER α* 応答遺伝子) mRNA 相対発現量、*Egr-1* (early growth response-1 である *ER β* 応答遺伝子) mRNA 相対発現量には影響は認められなかった。【16176】(○○N)

(9) ラット精巣組織への影響

- ①Ullah ら(2018)によって、ビスフェノール B(Biotechnologies、99%) 1、10、100 μ g/L の濃度に 2 時間ばく露したラット精巣組織(成熟雄 SD 由来)への影響が検討されている。その結果として、10 μ g/L の濃度区で総活性酸素種濃度の高値が認められた。なお、テストステロン濃度、カタラーゼ比活性、ペルオキシダーゼ比活性、スーパーオキシドディスムターゼ活性、過酸化脂質濃度には影響は認められなかった。【16175】(△?)

想定される作用メカニズム：精巣組織における総活性酸素種濃度の増加

(10) マウス卵母細胞への影響

- ①Zhang ら(2020)によって、ビスフェノール B(Aladdin) 50、100、150、200 μ M(=12,100、24,200、36,300、148,500 μ g/L)の濃度に 14 時間ばく露したマウス卵母細胞(3～4 週齢雌 Kunming マウス由来)への影響が検討されている。その結果として、100 μ M(=24,200 μ g/L)以上の濃度区で第一極体放出(PBE: polar body extrusion)率の低値が認められた。

また、ビスフェノール B(Aladdin) 150 μ M(=36,300 μ g/L)の濃度に 14 時間ばく露したマウス卵母細胞(3～4 週齢雌 Kunming マウス由来)への影響が検討されている。その結果として、細胞周期における第二減数分裂期中期(MII: meiosis II)存在率の低値、細胞周期における卵核胞崩壊期(GVBD: germinal vesicle breakdown)存在率、細胞周期における第一減数分裂期中期(MI: meiosis I)存在率の高値が認められた。

また、ビスフェノール B(Aladdin) 150 μ M(=36,300 μ g/L)の濃度に 8 時間ばく露したマウス卵母細胞(3～4 週齢雌 Kunming マウス由来、卵核胞崩壊期)への影響が検討されている。その結果として、紡錘体異常率、染色体整列異常率、損傷 DNA 発現量、アセチル化チューブリン発現量、エストロゲン受容体 α 蛋白質発現量、リジン 27 トリメチル化ヒストン H3 (H3K27me3)発現量、リジン 9 トリメチル化ヒストン H3 (H3K9me3)発現量の高値が認められた。なお、活性酸素種発現量、ATP 含有量には影響は認められなかった。【16167】(△○P)

想定される作用メカニズム：エストロゲン様作用、卵発生毒性

(11) ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体への影響

- ①Li ら(2021b)によって、ビスフェノール B (J&K Scientific、98%) 0.1、1、10、25、50 μ M(=24.2、242、2,420、6,060、12,100 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露したヒト肝臓細胞 HL-770 への影響(ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 PPAR β/δ 標的遺伝子発現)が検討されている。その結果として、0.1 μ M(=24.2 μ g/L)以上の濃度で ANGPTL4 (angiopoietin like 4) mRNA 相対発現量の高値、25 μ M(=6,060 μ g/L)以上の濃度で PDK4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4) mRNA 相対発現量の高値が認められた。

また、ビスフェノール B (J&K Scientific, 98%) 0.1、1、10、25、50 μ M(=24.2、242、2,420、6,060、12,100 μ g/L)の濃度に24時間ばく露したヒト胎児腎臓由来細胞 HEC293 (PPAR β/δ を発現)によるレポータージーンアッセイ(PPAR β/δ 応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、25 μ M(=6,060 μ g/L)以上の濃度でルシフェラーゼ発現誘導が認められた。

また、ビスフェノール B (J&K Scientific, 98%) 0.5、1、2.5、5、10、25、50、100、250、500 μ M(=121、242、606、1,210、2,420、6,060、12,100、24,200、60,600、121,000 μ g/L)の濃度で PPAR β/δ リガンド結合ドメインによる蛍光プローブ標識 Dex-fl 10nM に対する結合阻害(競合結合)試験が検討されている。その結果として、IC₂₀ 値 311 μ M(=75,400 μ g/L)の濃度で結合阻害が認められた。【16162】(○P)

想定される作用メカニズム：脂肪酸代謝亢進、PPAR β/δ 結合阻害作用

※参考 (12)疫学的調査(今回評価対象としなかった文献)

- ①Tang ら(2021)によって、中国広西チワン族自治区の主要6郡にて、2015～2019年にかけて出産した妊娠女性を対象に、ビスフェノール類ばく露と妊娠糖尿病発症との関連性について検討されている。その結果として、症例群として妊娠糖尿病(GDM: gestational diabetes mellitus)と診断された妊娠女性100名(平均年齢 30.62 \pm 6.46歳、血清中ビスフェノール B 幾何平均濃度 0.241ng/mL)と対照群として健常妊娠女性400名(平均年齢 30.6 \pm 6.41歳、血清中ビスフェノール B 幾何平均濃度 0.243ng/mL)との比較において、ロジステック回帰分析における妊娠糖尿病発症率の補正オッズ比にビスフェノール B ばく露濃度とは相関性は認められなかった。【16161】

評価未実施の理由：内分泌かく乱作用と関連すると考えられた評価項目について、影響が認められなかった報告のため。

2. 総合的判断(案)

得られた報告について信頼性評価を実施した結果として、内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠として認められると評価された報告が得られた。

試験対象物質として選定する根拠として認められると評価された報告から、動物試験の報告において、エストロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用、視床下部一下垂体—生殖腺軸への作用、ステロイドホルモン産生の抑制、ステロイドホルモン関連遺伝子の発現抑制、ライディッヒ細胞のアンドロゲン合成阻害、ライディッヒ細胞の増殖促進及び成熟抑制、視床下部一下垂体—甲状腺軸への作用を示すこと、試験管内試験の報告において、エストロゲン作用、抗エストロゲン作用、G 蛋白質共役型エストロゲン受容体(GPER)活性化作用、抗アンドロゲン作用、脂肪酸代謝亢進 PPAR β/δ 結合阻害作用を示すことが示唆された。

なお、信頼性評価のまとめと今後の対応案について表4に示した。

表4 信頼性評価のまとめと今後の対応案

物質名：ビスフェノールB

区分	著者 【参考文献番号】	作業班会議における信頼性評価結果			
		報告結果(Results)を検証するために必要である『材料と方法(Materials and Methods)』に関する記載の有無及びその評価 ¹⁾	内分泌かく乱作用との関連の有無 ²⁾	内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠としての評価 ³⁾	
(1) 生態影響	エストロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用	①Liら(2022)【16159】	△	○P	○
	視床下部一下垂体—甲状腺軸への作用	②Yangら(2021)【16163】	△	○P	○
(2) 生殖影響	視床下部一下垂体—生殖腺軸への作用	①Ijazら(2020)【16171】	△	○P	○
	視床下部一下垂体—生殖腺軸への作用、ステロイドホルモン産生の抑制	②Ullahら(2018)【16175】	△	○P	○
	ライディッヒ細胞のアンドロゲン合成阻害、ステロイドホルモン関連遺伝子の発現抑制、ライディッヒ細胞の増殖促進及び成熟抑制、視床下部一下垂体—生殖腺軸への作用	③Liら(2021a)【16165】	○	○P	○
	視床下部一下垂体—生殖腺軸への作用	④Ullahら(2019)【16170】	△	○P	○
(3)エストロゲン作用		①Yamasakiら(2002)【5872】	○	○P	○
		②Durcikら(2022)【16160】	○	○P	○
		③Pelchら(2019)【15825】	○	○P	○
		④Liuら(2021)【16166】	△	○P	○
		⑤Pisapiaら(2012)【16178】	△	○P	○
(4)エストロゲン作用又は抗エストロゲン作用		①Liuら(2021)【16166】	△	○P	○
		②Caoら(2017)【16177】	○	○P	○
(5)抗エストロゲン作用		①Liuら(2021)【16166】	△	○P	○
		②Durcikら(2022)【16160】	○	○N	×
		③Pelchら(2019)【15825】	○	○N	×

区分	著者 【参考文献番号】	作業班会議における信頼性評価結果		
		報告結果(Results)を 検証するために必要である『材料と方法(Materials and Methods)』に関する記載の有無及びその評価 ¹⁾	内分泌かく乱作用との関連の有無 ²⁾	内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠としての評価 ³⁾
	④Okazaki ら(2017) 【16176】	○	○N	×
(6)アンドロゲン作用	①Pelch ら(2019) 【15825】	○	○N	×
	②Yamasaki ら(2003) 【5714】	○	?	—
(7)抗アンドロゲン作用	①Pelch ら(2019) 【15825】	○	○P	○
	②Yamasaki ら(2003) 【5714】	○	?	—
(8)ヒト乳がん細胞への影響	G蛋白質共役型エストロゲン受容体(GPER)活性化作用 ①Cao ら(2017) 【16177】	○	○P	○
	②Okazaki ら(2017) 【16176】	○	○N	×
(9)ラット精巣組織への影響	精巣組織における総活性酸素種濃度の増加 ①Ullah ら(2018) 【16175】	△	?	—
(10)マウス卵母細胞への影響	エストロゲン様作用 ①Zhang ら(2020) 【16167】	△	○P	○
(11)ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体への影響	脂肪酸代謝亢進 PPAR β/δ 結合阻害作用 ①Li ら(2021b) 【16162】	○	○P	○
(12)疫学的調査	①Tang ら(2021) 【16161】 評価未実施			
信頼性評価のまとめと今後の対応案	動物試験の報告において、エストロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用、視床下部一下垂体—生殖腺軸への作用、ステロイドホルモン産生の抑制、ステロイドホルモン関連遺伝子の発現抑制、ライディッヒ細胞のアンドロゲン合成阻害、ライディッヒ細胞の増殖促進及び成熟抑制、視床下部一下垂体—甲状腺軸への作用を示すこと、試験管内試験の報告において、エストロゲン作用、抗エストロゲン作用、G蛋白質共役型エストロゲン受容体(GPER)活性化作用、抗アンドロゲン作用、脂肪酸代謝亢進 PPAR β/δ 結合阻害作用を示すことが示唆されたため内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る。			

1)○：十分に記載されている、△：一部記載が不十分である、×：記載が不十分である、—：評価を行わない

2)○：内分泌かく乱作用との関連性が認められる(P：作用が認められる、N：作用が認められない)、?：内分泌かく乱作用との関連性は不明、×：内分泌かく乱作用との関連性が認められない、—：評価を行わない

3)○：試験対象物質として選定する根拠として認められる、×：試験対象物質として選定する根拠として認められない、—：内分泌かく乱作用との関連性が不明であるため、評価ができない

参考文献

5714: Yamasaki K, Takeyoshi M, Sawaki M, Imatanaka N, Shinoda K and Takatsuki M (2003) Immature rat

- uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicology*, 183 (1-3), 93-115.
- 5872: Yamasaki K, Takeyoshi M, Yakabe Y, Sawaki M, Imatanaka N and Takatsuki M (2002) Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. *Toxicology*, 170 (1-2), 21-30.
- 15825: Pelch KE, Li Y, Perera L, Thayer KA and Korach KS (2019) Characterization of Estrogenic and Androgenic Activities for Bisphenol A-like Chemicals (BPs): *In Vitro* Estrogen and Androgen Receptors Transcriptional Activation, Gene Regulation and Binding Profiles. *Toxicological Sciences*, 172 (1), 23-37.
- 16159: Li HM, Li YY, Zhang YC, Li JB, Xu HM, Xiong YM and Qin ZF (2022) Bisphenol B disrupts testis differentiation partly via the estrogen receptor-mediated pathway and subsequently causes testicular dysgenesis in *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 236, 113453.
- 16160: Durcik M, Hiti L, Tomašič T and Mašič LP (2022) New bisphenol A and bisphenol S analogs: Evaluation of their hER α agonistic and antagonistic activities using the OECD 455 *in-vitro* assay and molecular modeling. *Chemico-Biological Interactions*, 354, 109820.
- 16161: Tang P, Liang J, Liao Q, Huang H, Guo X, Lin M, Liu B, Wei B, Zeng X, Liu S, Huang D and Qiu X (2021) Associations of bisphenol exposure with the risk of gestational diabetes mellitus: a nested case-control study in Guangxi, China. *Environmental Science and Pollution Research International*.
- 16162: Li CH, Zhang DH, Jiang LD, Qi Y and Guo LH (2021b) Binding and activity of bisphenol analogues to human peroxisome proliferator-activated receptor β/δ . *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226, 112849.
- 16163: Yang Q, Zhu Z, Liu Q and Chen L (2021) Adverse effects of bisphenol B exposure on the thyroid and nervous system in early life stages of zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology & Pharmacology*, 250, 109167.
- 16165: Li Y, Yan H, Yu Y, Zou C, Tian L, Xin X, Zhang S, Li Z, Ma F and Ge RS (2021a) Bisphenol B stimulates Leydig cell proliferation but inhibits maturation in late pubertal rats. *Food and Chemical Toxicology*, 153, 112248.
- 16166: Liu X, Matsuyama Y, Shimohigashi M and Shimohigashi Y (2021) ER α -agonist and ER β -antagonist bifunctional next-generation bisphenols with no halogens: BPAP, BPB and BPZ. *Toxicology Letters*, 345, 24-33.
- 16167: Zhang SX, Ding ZM, Ahmad MJ, Wang YS, Duan ZQ, Miao YL, Xiong JJ and Huo LJ (2020) Bisphenol B Exposure Disrupts Mouse Oocyte Meiotic Maturation *in vitro* Through Affecting Spindle Assembly and Chromosome Alignment. *Front Cell Dev Biol*, 8, 616771.
- 16170: Ullah A, Pirzada M, Jahan S, Ullah H, Razak S, Rauf N, Khan MJ and Mahboob SZ (2019) Prenatal BPA and its analogs BPB, BPF and BPS exposure and reproductive axis function in the male offspring of Sprague Dawley rats. *Human and Experimental Toxicology*, 38 (12), 1344-1365.
- 16171: Ijaz S, Ullah A, Shaheen G and Jahan S (2020) Exposure of BPA and its alternatives like BPB, BPF and BPS impair subsequent reproductive potentials in adult female Sprague Dawley rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 30 (1), 60-72.
- 16175: Ullah A, Pirzada M, Jahan S, Ullah H, Shaheen G, Rehman H, Siddiqui MF and Butt MA (2018) Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F and bisphenol S: Comparative *in vitro* and *in vivo* studies on the sperms and testicular tissues of rats. *Chemosphere*, 209, 508-516.
- 16176: Okazaki H, Takeda S, Kakizoe K, Taniguchi A, Tokuyasu M, Himeno T, Ishii H, Kohro-Ikeda E, Haraguchi K, Watanabe K and Aramaki H (2017) Bisphenol AF as an Inducer of Estrogen Receptor β (ER β): Evidence for Anti-estrogenic Effects at Higher Concentrations in Human Breast Cancer Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40 (11), 1909-1916.
- 16177: Cao LY, Ren XM, Li CH, Zhang J, Qin WP, Yang Y, Wan B and Guo LH (2017) Bisphenol AF and Bisphenol B Exert Higher Estrogenic Effects than Bisphenol A via G Protein-Coupled Estrogen Receptor Pathway. *Environmental Science & Technology*, 51 (19), 11423-11430.
- 16178: Pisapia L, Del Pozzo G, Barba P, Caputo L, Mita L, Viggiano E, Russo GL, Nicolucci C, Rossi S, Bencivenga U, Mita DG and Diano N (2012) Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation. *General and Comparative Endocrinology*, 178 (1), 54-63.

VIII. リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル

1. 内分泌かく乱作用に関連する報告

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルの内分泌かく乱作用に関連する報告として、生態影響、代謝影響、エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用、ヒト肝臓がん細胞への影響、ヒト胎盤絨毛がん細胞 JEG-3 への影響、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体への影響、マウスライディッチ腫瘍細胞への影響に関する報告がある。

(1) 生態影響

①Li ら(2020)によって、リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル(Tronto Research Chemicals) 0.0299±0.0057、0.104±0.0123、0.434±0.0119µg/L(測定濃度であり、設定濃度 1.6、8、40µg/L に相当)に孵化後 0 日齢から 100 日間ばく露したメダカ(*Oryzias latipes*)(pMOSP1-EGFP transgenic)への影響が検討されている。その結果として、0.0299µg/L 以上のばく露区で雄魚における間性発生率の高値、0.104µg/L 以上のばく露区で血漿中 17β-エストラジオール濃度、肝臓中 *vtg-2* mRNA 相対発現量の高値、0.434µg/L のばく露区で血漿中テストステロン濃度の低値が認められた。なお、肝臓中 *vtg-1* mRNA 相対発現量には影響は認められなかった。

また、100 日間ばく露雄と非ばく露雌との交配試験において、0.104µg/L 以上のばく露区で受精率、ふ化率の低値、産卵までの所要時間の高値、0.434µg/L のばく露区で後追い行動時間、求愛行動(courtship)頻度、交配数の低値が認められた。【16194】(評価結果の略号：△○P、以下同じ)

想定される作用メカニズム：エストロゲンの上昇、アンドロゲンの低下

②Yang ら(2022)によって、リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル(東京化成、90%) 2.5、50、250µg/L(設定濃度)に6ヶ月齢から 21 日間ばく露したゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)への影響が検討されている。その結果として、雄において、2.5µg/L 以上のばく露区で生殖細胞に占める精原細胞率の低値、脳中 *ar* mRNA 相対発現量、脳中 *era* mRNA 相対発現量、脳中 *er2β* mRNA 相対発現量、脳中 *gnrh2* mRNA 相対発現量、脳中 *gnrh3* mRNA 相対発現量、脳中 *fshβ* mRNA 相対発現量、脳中 *lhβ* mRNA 相対発現量、脳中 *gnrhr1* mRNA 相対発現量、脳中 *gnrhr2* mRNA 相対発現量、脳中 *gnrhr3* mRNA 相対発現量、脳中 *gnrhr4* mRNA 相対発現量、精巣中 *fshr* mRNA 相対発現量、精巣中 *lhr* mRNA 相対発現量、精巣中 *er2β* mRNA 相対発現量、精巣中 *cyp17* mRNA 相対発現量、精巣中 *3βhsd* mRNA 相対発現量、精巣中 *cyp11a* mRNA 相対発現量、精巣中 *17βhsd* mRNA 相対発現量、精巣中 *cyp19a* mRNA 相対発現量、肝臓中 *ar* mRNA 相対発現量、肝臓中 *3βhsd* mRNA 相対発現量、生殖細胞に占める精母細胞率の高値、2.5µg/L のばく露区で生殖細胞に占める精子細胞率の高値、2.5、250µg/L のばく露区で精巣中 *era* mRNA 相対発現量、肝臓中 *vtg1* mRNA 相対発現量の高値、2.5、25µg/L のばく露区で脳中 *cyp19β* mRNA 相対発現量、精巣中 *star* mRNA 相対発現量の高値、50µg/L 以上のばく露区で血漿中 11-ケトテストステロン濃度の低値、血漿中テストステロン濃度、血漿中 17β-エストラジオール濃度、血漿中ピテロゲニン濃度の高値、250µg/L のばく露区で精巣中 *ar* mRNA 相対発現量、精巣中 *hsd11b* mRNA 相対発現量の低値、精巣中 *cyp11b* mRNA 相対発現量、肝臓中 *era* mRNA 相対発現量、肝臓中 *er2β* mRNA 相対発現量、肝臓中 *vtg3* mRNA 相対発現量の高値が認められた。なお、肥満度、生殖腺体指数、肝臓体指数、脳体指数には影響は認められなかった。

また、雌において、2.5µg/L 以上のばく露区で脳中 *era* mRNA 相対発現量、脳中 *cyp19β* mRNA 相対発現量、脳中 *gnrh2* mRNA 相対発現量、脳中 *gnrh3* mRNA 相対発現量、脳中 *fshβ* mRNA 相対発現

量、脳中 *lhβ* mRNA 相対発現量、脳中 *gnrhr1* mRNA 相対発現量、脳中 *gnrhr2* mRNA 相対発現量、脳中 *gnrhr3* mRNA 相対発現量、卵巣中 *era* mRNA 相対発現量、肝臓中 *ar* mRNA 相対発現量の低値、肝臓中 *3βhsd* mRNA 相対発現量の高値、2.5、250μg/L のばく露区で肝臓中 *era* mRNA 相対発現量、肝臓中 *era* mRNA 相対発現量、脳中 *ar* mRNA 相対発現量、脳中 *er2β* mRNA 相対発現量、脳中 *gnrhr4* mRNA 相対発現量、卵巣中 *ar* mRNA 相対発現量、卵巣中 *3βhsd* mRNA 相対発現量の低値、2.5μg/L のばく露区で肝臓中 *vtg3* mRNA 相対発現量の高値(50μg/L 区では低値)、2.5μg/L のばく露区で卵巣中 *star* mRNA 相対発現量の低値、50μg/L 以上のばく露区で生殖細胞に占める卵黄形成卵母細胞率、卵巣中 *er2β* mRNA 相対発現量、卵巣中 *hsd11b* mRNA 相対発現量、肝臓中 *er2β* mRNA 相対発現量の低値、生殖細胞に占める核周辺(perinucleolar)卵母細胞率、卵巣中 *cyp17* mRNA 相対発現量、卵巣中 *17βhsd* mRNA 相対発現量、卵巣中 *cyp19a* mRNA 相対発現量の高値、50μg/L のばく露区で血漿中 11-ケトテストステロン濃度の低値、卵巣中 *fshr* mRNA 相対発現量、卵巣中 *lhr* mRNA 相対発現量、卵巣中 *cyp11a* mRNA 相対発現量の高値、250μg/L のばく露区で卵巣中 *cyp11b* mRNA 相対発現量の低値、血漿中 17β-エストラジオール濃度の高値が認められた。なお、肥満度、生殖腺体指数、肝臓体指数、脳体指数、生殖細胞に占める変性卵母細胞率には影響は認められなかった。

また、21 日間ばく露後、非ばく露 7 日間の交配試験において、50μg/L 以上のばく露区で総産卵数の低値、2.5μg/L のばく露区(この区のみ産卵が認められた)で稚仔体長(受精後 7 日目)の低値、稚仔全身中ビテロゲン濃度(受精後 10 日目)の高値が認められた。なお、2.5μg/L のばく露区(この区のみ産卵が認められた)では受精卵直径(受精後 3 日目)、稚仔体長(受精後 7 日目)には影響は認められなかった。【16190】(△○P)

想定される作用メカニズム：視床下部—下垂体—生殖腺(肝臓)軸への作用、ステロイドホルモン代謝への作用

(2) 代謝影響

①Yan ら(2020)によって、りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル(J&K Scientific、95%) 0.03、0.3mg/kg/day を妊娠 7 日目から出産後 21 日目まで経口投与した CD-1 マウスへの影響(雄仔動物を 3 週齢から 15 週齢まで高脂肪餌で飼育し、14 週齢でグルコース耐性試験及びインスリン耐性試験を実施)が検討されている。その結果として、0.03mg/kg/day 以上のばく露群で肝臓中トリグリセリド濃度の低値、0.03mg/kg/day のばく露群でグルコース耐性試験における血中グルコース濃度曲線下面積の高値、0.3mg/kg/day のばく露群で体重、増加体重、肝臓重量、精巣上体白色脂肪組織重量の低値、肝臓中総コレステロール濃度、血清中アラニンアミノトランスフェラーゼ比活性の高値が認められた。なお、インスリン耐性試験における血中グルコース濃度曲線下面積には影響は認められなかった。

また、りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル(J&K Scientific、95%) 0.03、0.3mg/kg/day を妊娠 7 日目から出産後 21 日目まで経口投与した CD-1 マウスへの影響(雄仔動物を 3 週齢から 15 週齢まで低脂肪餌で飼育し、14 週齢でグルコース耐性試験及びインスリン耐性試験を実施)が検討されている。その結果として、0.03mg/kg/day のばく露群で体重の高値が認められた。なお、増加体重、肝臓重量、精巣上体白色脂肪組織重量、肝臓中トリグリセリド濃度、肝臓中総コレステロール濃度、血清中アラニンアミノトランスフェラーゼ比活性、グルコース耐性試験における血中グルコース濃度曲線下面積、インスリン耐性試験における血中グルコース濃度曲線下面積には影響は認められなかった。

【16195】(×—)

想定される作用メカニズム：肝障害

(3) エストロゲン作用

- ①Li ら(2020)によって、りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル(Tronto Research Chemicals) 1 ~ 100 μ M(=362~36,200 μ g/L)の濃度に4時間ばく露した酵母(メダカエストロゲン受容体を発現)によるレポータージーンアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いた β -ガラクトシダーゼ発現誘導)が検討されているが、 β -ガラクトシダーゼ発現誘導は認められなかった。【16194再】(△○N)

(4) 抗アンドロゲン作用

- ①Li ら(2020)によって、りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル(Tronto Research Chemicals) 1 ~ 100 μ M(=362~36,200 μ g/L)の濃度に4時間ばく露(ジヒドロテストステロン 2.0nM 共存下)した酵母(ヒトアンドロゲン受容体を発現)によるレポータージーンアッセイ(アンドロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いた β -ガラクトシダーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 37.5 μ M(=13,600 μ g/L)の濃度で β -ガラクトシダーゼ発現誘導の阻害が認められた。【16194再】(△○P)

(5) ヒト肝臓がん細胞への影響

- ①Negi ら(2021)りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル(東京化成、90.0%) 2、10 μ M(=725、3,620 μ g/L)の濃度に24時間ばく露したヒト肝臓がん細胞 HepG2 への影響(遺伝子は脂質代謝関連)が検討されている。その結果として、2 μ M(=725 μ g/L)の濃度区で *srebp1c* mRNA 相対発現量の高値、10 μ M(=3,620 μ g/L)の濃度区で細胞内 ATP 濃度の低値、細胞内油滴蓄積量(画像面積比)の高値が認められた。なお、*acly* mRNA 相対発現量、*cpt1a* mRNA 相対発現量、*apob* mRNA 相対発現量、*dgat1* mRNA 相対発現量、*dgat2* mRNA 相対発現量、*acca* mRNA 相対発現量、*scd1* mRNA 相対発現量、*fasn* mRNA 相対発現量、*cd36* mRNA 相対発現量には影響は認められなかった。【16192】(△?)
想定される作用メカニズム：不明

(6) ヒト胎盤絨毛がん細胞 JEG-3 への影響

- ①Hu ら(2017)によって、りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル(東京化成) 5、10、20、40 μ M(=1,810、3,620、7,250、14,500 μ g/L)の濃度に48時間ばく露したヒト胎盤絨毛がん細胞 JEG-3 への影響(遺伝子はプロゲステロン産生関連)が検討されている。その結果として、5 μ M(=1,810 μ g/L)以上の濃度区で *hCG* (human chorionic gonadotropin) mRNA 相対発現量の高値、10 μ M(=3,620 μ g/L)以上の濃度区でプロゲステロン産生量、*3 β -HSD1* mRNA 相対発現量の高値、20 μ M(=7,250 μ g/L)以上の濃度区で *PAPP-A* (pregnancy-associated plasma protein-A) mRNA 相対発現量の低値、ヒト絨毛性ゴナドトロピン産生量の高値、40 μ M(=14,500 μ g/L)の濃度区で *Muc-1* (mucin gene-1) mRNA 相対発現量の高値が認められた。

また、りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル(東京化成) 40 μ M(=14,500 μ g/L)の濃度に48時間ばく露したヒト胎盤絨毛がん細胞 JEG-3 への影響(遺伝子はプロゲステロン産生関連)が検討されている。その結果として、プロゲステロン産生量の高値(ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPARG9) 阻害剤 GW9662 5 μ M 添加で影響消失)、*hCG* mRNA 相対発現量の高値(PPARG 阻害剤 GW9662 5 μ M 添加で影響消失、PPARG ノックダウン処理によって影響消失)、*3 β -HSD1* mRNA 相対発現量の高値

(PPARG ノックダウン処理によって影響消失が認められた。【16198】(×ー)

想定される作用メカニズム：不明

(7) ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体への影響

①Hu ら(2017)によって、りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル(東京化成) 0.05~25 μ M(=18.1~9,060 μ g/L)の濃度に24時間ばく露したヒト胚性腎臓細胞293T(ヒトペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPARG)を発現)によるレポーター遺伝子アッセイ(PPARG9 応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、EC₂₀ 値2.46 μ M(=892 μ g/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導が認められた。【16198 再】(×ー)

想定される作用メカニズム：PPAR γ の転写促進作用

(8) マウスライディッチ腫瘍細胞への影響

①Schang ら(2016)によって、りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル1、2、5、10、20、50、100 μ M(=362、725、1,810、3,620、7,250、18,100、36,200 μ g/L)の濃度に48時間ばく露したマウスライディッチ腫瘍細胞MA-10への影響が検討されている。その結果として、10 μ M(=3,620 μ g/L)以上の濃度区でミトコンドリア活性、細胞数の低値が認められた。

また、りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル1、10、100 μ M(=362、3,620、36,200 μ g/L)の濃度に48時間ばく露したマウスライディッチ腫瘍細胞MA-10への影響が検討されている。その結果として、10 μ M(=3,620 μ g/L)以上の濃度区で活性酸素産生量、プロゲステロン産生量の高値が認められた。なお、プロゲステロン産生量(48時間ばく露後更にdbc AMP 1 mM 共存下2時間処理)、プロゲステロン産生(48時間ばく露後更に黄体形成ホルモン100ng/mL 共存下2時間処理)量には影響は認められなかった。

また、りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル100 μ M(=3,620 μ g/L)の濃度に48時間ばく露したマウスライディッチ腫瘍細胞MA-10への影響(遺伝子はステロイド産生関連)が検討されている。その結果として、*Hsd3b* mRNA 相対発現量の低値、*Adcy3* mRNA 相対発現量の高値が認められた。なお、*Star* mRNA 相対発現量、*Tspo* mRNA 相対発現量、*Cyp11a1* mRNA 相対発現量、*Lhcgr* mRNA 相対発現量には影響は認められなかった。【16199】(×ー)

想定される作用メカニズム：プロゲステロン分泌促進

なお、本試験結果の解釈にあたっては、試薬の入手先及び純度の記載がない点に注意を要すると判断された。

2. 総合的判断(案)

得られた報告について信頼性評価を実施した結果として、内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠として認められると評価された報告が得られた。

試験対象物質として選定する根拠として認められると評価された報告から、動物試験の報告において、エストロゲンの上昇、アンドロゲンの低下、視床下部-下垂体-生殖腺(肝臓)軸への作用、ステロイドホルモン代謝への作用を示すこと、試験管内試験の報告において、抗アンドロゲン作用を示すことが示唆された。

なお、信頼性評価のまとめと今後の対応案について表5に示した。

表5 信頼性評価のまとめと今後の対応案

物質名：りん酸(2-エチルヘキシル)ジフェニル

区分		著者 【参考文献番号】	作業班会議における信頼性評価結果		
			報告結果(Results)を 検証するために必要である『材料と方法(Materials and Methods)』に関する記載の有無及びその評価 ¹⁾	内分泌かく乱作用との関連の有無 ²⁾	内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠としての評価 ³⁾
(1)生態影響	エストロゲンの上昇、アンドロゲンの低下	①Li ら(2020) 【16194】	△	○P	○
	視床下部一下垂体—生殖腺(肝臓)軸への作用、ステロイドホルモン代謝への作用	②Yang ら(2022) 【16190】	△	○P	○
(2)代謝影響	肝障害	①Yan ら(2020) 【16195】	×	—	×
(3)エストロゲン作用		①Li ら(2020) 【16194】	△	○N	×
(4)抗アンドロゲン作用		①Li ら(2020) 【16194】	△	○P	○
(5)ヒト肝臓がん細胞への影響	不明	①Negi ら(2021) 【16192】	△	?	—
(6)ヒト胎盤絨毛がん細胞 JEG-3 への影響	不明	①Hu ら(2017) 【16198】	×	—	×
(7)ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体への影響	PPAR γ の転写促進作用	①Hu ら(2017) 【16198】	×	—	×
(8)マウスライディッヒ腫瘍細胞への影響	プロゲステロン分泌促進	①Schang ら(2016) 【16199】	×	—	×
信頼性評価のまとめと今後の対応案	動物試験の報告において、エストロゲンの上昇、アンドロゲンの低下、視床下部一下垂体—生殖腺(肝臓)軸への作用、ステロイドホルモン代謝への作用を示すこと、試験管内試験の報告において、抗アンドロゲン作用を示すことが示唆されたため内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る。				

1)○：十分に記載されている、△：一部記載が不十分である、×：記載が不十分である、—：評価を行わない

2)○：内分泌かく乱作用との関連性が認められる(P：作用が認められる、N：作用が認められない)、?：内分泌かく乱作用との関連性は不明、×：内分泌かく乱作用との関連性が認められない、—：評価を行わない

3)○：試験対象物質として選定する根拠として認められる、×：試験対象物質として選定する根拠として認められない、—：内分泌かく乱作用との関連性が不明であるため、評価ができない

参考文献

16190: Yang R, Wang X, Wang J, Chen P, Liu Q, Zhong W and Zhu L (2022) Insights into the sex-dependent reproductive toxicity of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate on zebrafish (*Danio rerio*). Environment International, 158, 106928.

- 16194: Li Y, Kang Q, Chen R, He J, Liu L, Wang L and Hu J (2020) 2-Ethylhexyl Diphenyl Phosphate and Its Hydroxylated Metabolites are Anti-androgenic and Cause Adverse Reproductive Outcomes in Male Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Science & Technology*, 54 (14), 8919-8925.
- 16192: Negi CK, Bajard L, Kohoutek J and Blaha L (2021) An adverse outcome pathway based *in vitro* characterization of novel flame retardants-induced hepatic steatosis. *Environmental Pollution*, 289, 117855.
- 16195: Yan S, Wang D, Teng M, Meng Z, Yan J, Li R, Jia M, Tian S, Zhou Z and Zhu W (2020) Perinatal exposure to 2-Ethylhexyl Diphenyl Phosphate (EHDPHP) affected the metabolic homeostasis of male mouse offspring: Unexpected findings help to explain dose- and diet- specific phenomena. *Journal of Hazardous Materials*, 388, 122034.
- 16198: Hu W, Gao F, Zhang H, Hiromori Y, Arakawa S, Nagase H, Nakanishi T and Hu J (2017) Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and Disruption of Progesterone Synthesis of 2-Ethylhexyl Diphenyl Phosphate in Human Placental Choriocarcinoma Cells: Comparison with Triphenyl Phosphate. *Environmental Science & Technology*, 51 (7), 4061-4068.
- 16199: Schang G, Robaire B and Hales BF (2016) Organophosphate Flame Retardants Act as Endocrine-Disrupting Chemicals in MA-10 Mouse Tumor Leydig Cells. *Toxicological Sciences*, 150 (2), 499-509.