

SPEED'98における人健康への内分泌かく乱作用による影響に関する 哺乳類を用いた試験体系の概況

◎ 基本的な考え方

優先してリスク評価に取り組む平成12年度に選定した12物質¹⁾、平成13年度に選定した8物質²⁾、平成14年度に選定した24物質のうち8物質³⁾及び平成15年度に選定した8物質⁴⁾にかかる人健康影響評価のための試験体系については、原則、スクリーニングとして①我が国独自で開発する「げっ歯類を用いた1世代試験」(以下、1世代試験)、②OECDを中心に各国がバリデーションとして進行中の(i)子宮肥大試験(ii)ハーシュバーガー試験(iii)28日間反復投与試験を実施するとともに、作用の有無・程度や確定試験実施等の判定の際には、経済産業省及び厚生労働省等で進められている試験結果に加え、これらの結果を補完する目的で実施する試験管内試験結果も考慮する。

- 1) トリブチルスズ、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、オクタクロロスチレン、ベンゾフェノン、トリフェニルスズ、フタル酸ジエチル、フタル酸ブチルベンジル及びアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル
- 2) ペンタクロロフェノール、アミトロール、ビスフェノールA、2,4-ジクロロフェノール、4-ニトロトルエン、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル及びフタル酸ジプロピル
- 3) ヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサン、クロルデン、オキシクロルデン、trans-ノナクロル、DDT、DDE及びDDD
- 4) アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、マイレックス、ケルセン、マラチオン及びペルメトリン

1. げっ歯類を用いた1世代試験

(1) 現在の試験実施状況等

① 平成12年度に選定した12物質について

a. 10物質について

優先12物質のうち、4-オクチルフェノール及びノニルフェノールを除く10物質については、1世代試験を実施し、平成14年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成14年6月14日開催)にて結果を公表。このうち、フタル酸ジ-n-ブチルについては追加試験を実施し、平成15年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成15年6月12日開催)にて結果を報告。

b. 2物質について

2物質(4-オクチルフェノール及びノニルフェノール)については、文献調査や試験管内試験により、エストロゲン様作用が疑われることから、陽性対照物質であるエチニルエストラジオール(EE)を使用したパイロット試験を実施し、終了。その結果を参考に1世代試験を実施し、平成15年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成

15年6月12日開催)にて結果を報告。

② 平成13年度に選定した8物質について

優先8物質のうちビスフェノールAを除く7物質について、1世代試験を実施し、平成15年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成15年6月12日開催)にて結果を報告。

なお、ビスフェノールAについては、文献調査やその信頼性評価において、生殖への影響等に関し、相反する結果が報告されていることから、特定の遺伝子座に着目し、陽性対照物質を投与したパイロット試験(子宮肥大試験及びハーシュバーガー試験)を実施。その後、1世代試験を実施し、平成16年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成16年7月27日開催)にて結果を報告。

③ 平成14年度に選定した24物質について

平成14年度に選定した24物質のうち、人又は魚類を用いた動物試験の用量(濃度)設定の可否の観点から、8物質について文献調査・信頼性評価の結果を参考に、物質ごとに個別にスクリーニング・試験の実施の有無及びその組み合わせを判断することとしていた。

ただし、今回の8物質には複数の異性体を有する物質が含まれていることから、環境実態調査*において異性体ごとに測定を実施した物質については、同調査において検出された異性体を文献調査・信頼性評価の対象とした。

ヘキサクロロベンゼン、 β -ヘキサクロロシクロヘキサン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル、*p,p'*-DDT、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDE 及び *p,p'*-DDD について、1世代試験を実施し、*p,p'*-DDT 及び *p,p'*-DDD について、平成16年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成16年7月27日開催)にて結果を報告。ヘキサクロロベンゼン、 β -ヘキサクロロシクロヘキサン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル、*o,p'*-DDT 及び *p,p'*-DDE について、平成16年度第3回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成17年3月8日開催)にて結果を報告。

なお、この8物質を除く10物質**については、文献調査・信頼性評価について平成16年度第3回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成17年3月8日開催)にて結果を報告。

*環境省(庁)が実施した「平成10年度緊急全国一斉調査」、「平成11年度全国一斉調査」、「平成12年度全国一斉調査」、「平成13年度環境実態調査」及び国土交通省(建設省)が平成10~13年度に実施した「水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査」の水質・底質・大気・土壌・水生生物(野生生物調査のコイの結果を含む)の各調査

**2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸、エチルパラチオン、1,2-ジブromo-3-クロロプロパン、メトキシクロル、ニトロフェン、トキサフェン、アルディカーブ、キーボン、メチラム及びビシクロゾリン

④ 平成15年度に選定した8物質について

平成15年度に評価に着手する物質としては、16物質**及び農薬取締法に基づき農薬として登録されている20物質があげられた。16物質**から、人又は魚類を用いた

動物試験の用量(濃度)設定の可否の観点より、5物質(アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、マイレックス)を選定し、また20物質***から、人又は魚類を用いた動物試験の用量(濃度)設定の可否及び内分泌攪乱作用に関連する哺乳類及び魚類を用いた動物試験の情報量の多さの観点より、3物質(ケルセン、マラチオン、ペルメトリン)を選定し、合計8物質について文献調査・信頼性評価の結果を参考に、物質ごとに個別にスクリーニング・試験の実施の有無及びその組み合わせを判断することとしていた。この8物質について、1世代試験を実施し、今回、結果を報告。

なお、この3物質(ケルセン、マラチオン、ペルメトリン)を除く17物質***及びベンゾ(a)ピレンについては、文献調査・信頼性評価について平成16年度第3回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成17年3月8日開催)にて結果を報告。

***2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、アトラジン、アラクロール、CAT、NAC、エンドスルファン、メソミル、トリフルラリン、ベノミル、マンゼブ、マンネブ、メトリブジン、シペルメトリン、エスフェンバレレート、フェンバレレート、ジネブ及びジラム

(2) 1世代試験のプロトコールの概要

① 平成12年度に選定した12物質について

a. 10物質について

a-1 10物質の1世代試験

- ア. 動物の種類 : ラット(クローズドコロニー; Wistar Imamichi)
- イ. 飼料の種類 : 実験動物用固型飼料(CE2、日本クア(株))(自由摂取)
- ウ. 投与経路 : 強制経口投与(コーン油に溶解)
※TBT, TPTについては混餌
- エ. 用量 : 低用量(文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した比較的low用量)にしぼり6群(物質ごとに検討)。フタル酸ジ-n-ブチルについては、低用量にしぼり7群。
ただし、最高用量については、LOEL、LOAELを参考とし、母動物あるいは児動物に何らかの影響が予測される用量を設定。
- オ. 1群あたりの動物数 : 妊娠動物として12匹/群
- カ. 試験期間 : 馴化・交配期間を含め17週程度(約120日)
- キ. 投与期間 : 妊娠0日~哺育21日
- ク. 観察項目 : 文献調査結果を参考に、物質ごとに検討。
- ケ. 分析 : 飼料、飲水、コーン油については、被験物質及び植物エストロジェン濃度を測定するとともに、被験物質の純度分析も実施。また、コーン油等に混合した実質投与量も測定。

a-2 フタル酸ジ-n-ブチルの追加試験

追加試験において変更した内容は以下のとおりである。

- ア. 動物の種類 : ラット(クローズドコロニー ; Wistar Hannover)
- カ. 試験期間 : 馴化・交配期間を含め 21 週程度(約 150 日)。離乳時の F1 哺育児の間引きを行わないため、試験を 2 回に分割して実施。
- ク. 観察項目 : パイロット試験において F1 哺育児の 3 週齢時、6 週齢時及び 10 週齢時に雌雄 1 匹/腹の割合で実施した病理組織学的検査を 3 週齢時及び 10 週齢時の全例実施に変更するとともに、帝王切開検査(妊娠 14 日目)、反応性検査を追加。

b. 2 物質について

b-1 エチニルエストラジオール(EE)を使用したパイロット試験

3 種類の投与期間で実施

- ① 妊娠中期～妊娠後期 妊娠 7～18 日
- ② 妊娠後期～哺育前期 妊娠 18 日～哺育 5 日
- ③ 妊娠～哺育期間 妊娠 0 日～哺育 20 日

ア. 動物の種類 : ラット(近交系 ; Wistar Kyoto)

イ. 飼料の種類 : Phytoestrogen-free の飼料(NIH-07-PLD, オリエンタル酵母(株))(自由摂取)

ウ. 投与経路 : 皮下投与(コーンオイルに溶解)

エ. 用量 : 低用量(ピル(経口避妊薬)としての体内濃度)を考慮した 6 群

- ① 0 ② 0.01 ③ 0.03 ④ 0.1 ⑤ 0.3 ⑥ 1.0 ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)

オ. 1 群あたりの動物数 : 妊娠動物として 12 匹/群

カ. 試験期間 : 交配期間を含め 17 週程度(約 120 日)

キ. 観察項目 :

- ① 母動物 : 臨床症状及び死亡、体重、体重増加量、摂餌量、飲水量、繁殖能力(受胎率、出産率、妊娠期間、着床数等)、剖検及び組織の保存等
- ② 児動物 : 臨床症状及び死亡、産児数、性比、肛門生殖突起間距離、生存率、体重、体重増加量、摂餌量、飲水量、身体発達、初期行動発達、繁殖能力(性成熟、発情周期、精巣の精子頭部数等)、病理学的検査(剖検、臓器の重量測定及び保存、病理組織学的検査)、遺伝子発現の定量的測定等

ク. 分析 : a-1 における分析項目に加え、飼料等の女性ホルモンも分析。

b-2 4-オクチルフェノール及びノニルフェノールの 1 世代試験

ア. 動物の種類 : ラット(クローズドコロニー ; Wistar Hannover)

- イ. 飼料の種類 : 実験動物用固型飼料(CE2、日本クア(株))(自由摂取)
- ウ. 投与経路 : 4-オクチルフェノールについては、強制経口投与(コーン油に溶解)、ノニルフェノールについては、飲水投与。
- エ. 用量 : 低用量(文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した比較的low用量)にしぼり5群(物質ごとに検討)。
EEを使用したパイロット試験結果を参考にし、陽性対照群を1群設定(EEの皮下投与)。
- オ. 1群あたりの動物数 : 妊娠動物として12匹/群
- カ. 試験期間 : 馴化・交配期間を含め17週程度(約120日)
- キ. 投与期間 : 妊娠0日～哺育21日
- ク. 観察項目 : 文献調査結果を参考に、物質ごとに検討。
- ケ. 分析 : 飼料、飲水、コーン油については、被験物質及び植物エストロゲン濃度を測定するとともに、被験物質の純度分析も実施。また、コーン油等に混合した実質投与量も測定。

② 平成13年度に選定した8物質について

a. ビスフェノールAを除く7物質について

- ア. 動物の種類 : ラット(クローズドコロニー; Wistar Hannover)
- イ. 飼料の種類 : 実験動物用固型飼料(CE2、日本クア(株))(自由摂取)
- ウ. 投与経路 : 強制経口投与(コーン油に溶解)。ただし、アミトロールについては、飲水投与。
- エ. 用量 : 低用量(文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した比較的low用量)にしぼり6群(物質ごとに検討)。
ただし、最高用量については、LOEL、LOAELを参考とし、母動物あるいは児動物に何らかの影響が予測される用量を設定。
- オ. 1群あたりの動物数 : 妊娠動物として12匹/群
- カ. 試験期間 : 馴化・交配期間を含め17週程度(約120日)
- キ. 投与期間 : 妊娠0日～哺育21日
- ク. 観察項目 : 文献調査・環境調査結果を参考に、物質ごとに検討
- ケ. 分析 : 飼料、飲水、コーン油については、被験物質及び植物エストロゲン濃度を測定するとともに、被験物質の純度分析も実施。また、コーン油等に混合した実質投与量も測定。

b. ビスフェノールAについて

- ア. 動物の種類 : ラット(クローズドコロニー; Wistar Hannover)
- イ. 飼料の種類 : 実験動物用固型飼料(CE2、日本クア(株))(自由摂取)
- ウ. 投与経路 : 低用量群については、飲水投与。最高用量は強制経口投与(1%CMC水溶液等に懸濁)。

- エ. 用量 : 低用量(文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した比較的low用量)にしぼり6群。ただし、最高用量については、LOEL、LOAELを参考とし、母動物あるいは児動物に何らかの影響が予測される用量を設定。
- オ. 1群あたりの動物数 : 妊娠動物として12匹/群
- カ. 試験期間 : 馴化・交配期間を含め17週程度(約120日)
- キ. 投与期間 : 妊娠0日～哺育21日
- ク. 観察項目 : 文献調査・環境調査結果を参考に、検討
- ケ. 分析 : 飼料、飲水、1%CMC水溶液等については、被験物質及び植物エストロゲン濃度を測定するとともに、被験物質の純度分析も実施。また、1%CMC水溶液等に混合した実質投与量も測定。

③ 平成14年度に選定した24物質のうちの8物質*について

- ア. 動物の種類 : ラット(クローズドコロニー; Wistar Hannover)
- イ. 飼料の種類 : 実験動物用固型飼料(CE2、日本クア(株))(自由摂取)
- ウ. 投与経路 : 原則として、混餌投与または強制経口投与(コーン油に溶解)。
- エ. 用量 : 低用量(文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した比較的low用量)にしぼり6群(物質ごとに検討)。ただし、原則として、最高用量については、LOEL、LOAELを参考とし、母動物あるいは児動物に何らかの影響が予測される用量を設定。
- オ. 1群あたりの動物数 : 妊娠動物として12匹/群
- カ. 試験期間 : 馴化・交配期間を含め17週程度(約120日)
- キ. 投与期間 : 妊娠0日～哺育21日
- ク. 観察項目 : 文献調査・環境調査結果を参考に、物質ごとに検討
- ケ. 分析 : 飼料、飲水、コーン油については、被験物質及び植物エストロゲン濃度を測定するとともに、被験物質の純度分析も実施。また、コーン油等に混合した実質投与量も測定。

*ヘキサクロロベンゼン、β-ヘキサクロロシクロヘキサン、cis-クロルデン、trans-ノナクロル、p,p'-DDT、o,p'-DDT、p,p'-DDE、p,p'-DDD

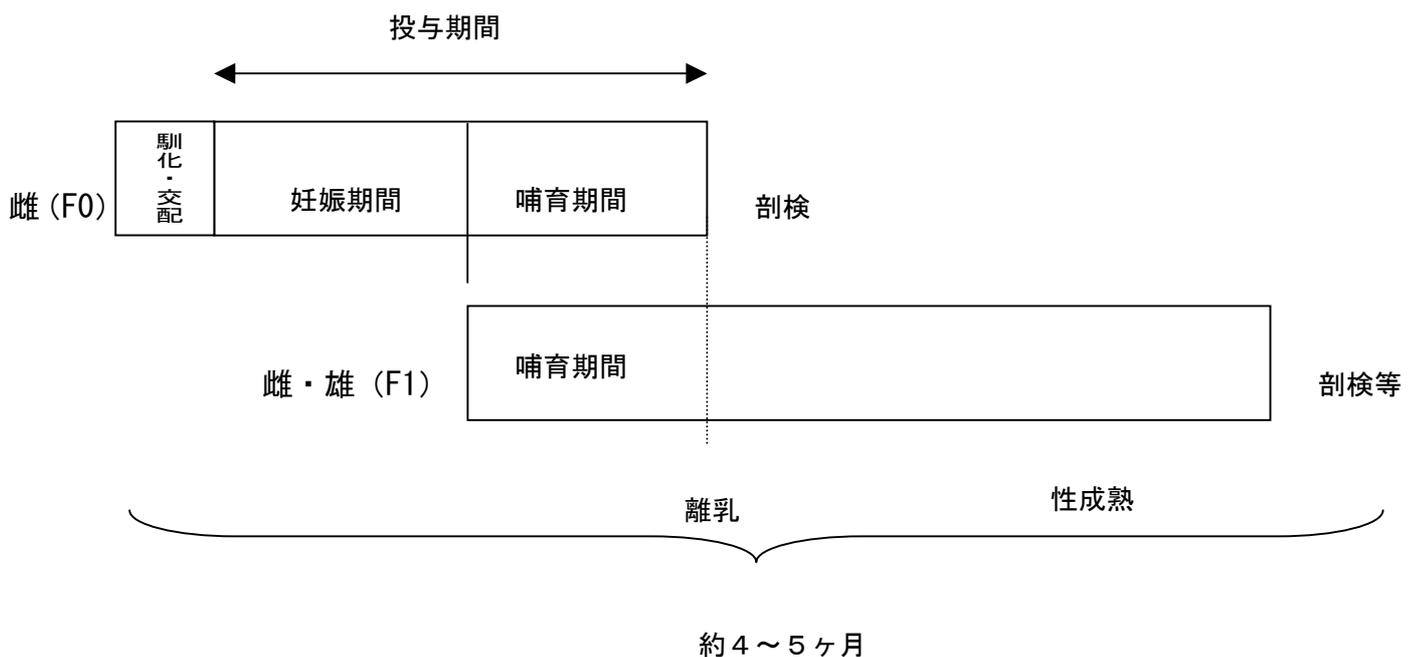
④ 平成15年度に選定した8物質*について

- ア. 動物の種類 : ラット(クローズドコロニー; Wistar Hannover)
- イ. 飼料の種類 : 実験動物用固型飼料(CE2、日本クア(株))(自由摂取)
- ウ. 投与経路 : 原則として、混餌投与または強制経口投与(コーン油に溶解)。

エ. 用量	: 低用量(文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した比較的 low 用量)にしぼり 6 群(物質ごとに検討)。ただし、原則として、最高用量については、LOEL、LOAEL を参考とし、母動物あるいは児動物に何らかの影響が予測される用量を設定。
オ. 1 群あたりの動物数	: 妊娠動物として 12 匹/群
カ. 試験期間	: 馴化・交配期間を含め 17 週程度(約 120 日)
キ. 投与期間	: 妊娠 0 日～哺育 21 日
ク. 観察項目	: 文献調査・環境調査結果を参考に、物質ごとに検討
ケ. 分析	: 飼料、飲水、コーン油については、被験物質及び植物エストロジェン濃度を測定するとともに、被験物質の純度分析も実施。また、コーン油等に混合した実質投与量も測定。

*アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、マイレックス、ケルセン、マラチオン及びペルメトリン

(3) 1 世代試験の概略図



2. 試験管内 (in vitro) 試験

in vivo 試験結果を補完し、作用機序を確認するために実施している。

(1) エストロジェン様作用

平成 12 年度、平成 13 年度、平成 14 年度及び平成 14 年度に選定した 33 物質*につ

いて①ヒトエストロゲン受容体($ER\alpha$ 及び $ER\beta$)結合競合阻害試験(レセプターバインディングアッセイ)及び②ヒト乳がん細胞E-screen試験を実施、終了。

(2) アンドロジェン様作用

平成12年度、平成13年度、平成14年度及び平成14年度に選定した33物質*について①ヒト乳がん細胞アンドロジェン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト及びアンタゴニスト)及び②ラットアンドロジェン受容体結合阻害試験(放射線リガンド結合法:RIA法)を実施、終了。

(3) 甲状腺ホルモン様作用

平成12年度、平成13年度、平成14年度及び平成14年度に選定した33物質*についてヒト甲状腺ホルモン受容体($TR\alpha$ 及び $TR\beta$)酵母試験を実施、終了。

*トリブチルスズ、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、オクタクロロスチレン、ベンゾフェノン、トリフェニルスズ、フタル酸ジエチル、フタル酸ブチルベンジル、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル、ペンタクロロフェノール、アミトロール、ビスフェノールA、2,4-ジクロロフェノール、4-ニトロトルエン、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル、フタル酸ジプロピル、ヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサン、クロルデン、オキシクロルデン、trans-ノナクロル、DDT、DDE及びDDD、アルドリル、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル及びマイレックス

3. 評価体制

平成16年度までは「内分泌攪乱化学物質問題検討会」の作業グループである「内分泌攪乱作用が疑われる物質のリスク評価検討会」のサブグループとして、「内分泌攪乱作用が疑われる化学物質のスクリーニング・試験法(哺乳類)評価検討会」を設置し、①各試験機関から提出された物質ごとのプロトコール及び②そのプロトコールに則った実施状況や試験結果について助言・評価を行った。

平成17年度からは「化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会」のもとに設置された「作用・影響評価検討会」のなかに人健康の専門家からなる「哺乳類試験実務者会議」を設置し、①各試験機関から提出された物質ごとのプロトコール及び②そのプロトコールに則った実施状況や試験結果について助言・評価を行った。

(別添)

内分泌攪乱化学物質の人健康への影響評価のための試験体系について

※必要に応じて、物質ごとに試験を追加する。

- 改良一世代試験

- *in vitro* 試験
 - ・レセプター・インタラクティブアッセイ
 - ・レポーター・ジーンアッセイ
 - ・E screen 等

- OECD 検証試験
 - ・子宮肥大試験
 - ・ハーシュバナー試験