

平成15年度選定物質を対象とした 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結果（案）

I. 平成15年度優先物質の試験結果について

1. アルドリンの試験結果

(1) げっ歯類を用いた1世代試験

① 最高用量(1 mg/kg/day)における変化

F1 児動物(3週齢)の生存率の低値が認められた。

F1 雌雄(生後19日)の行動発達試験における空中正向反射完成率の低値が認められた。

F1 雌雄(3週齢)の肝臓相対重量の高値が認められた。

F1 雌(4週齢)のオープンフィールド試験における区間移動数・身繕い数・立ち上がり数の高値が認められた。

F1 雌(3～4週齢及び3～5週齢)の体重増加量の低値が認められた。

F1 雌(5週齢)の体重の低値が認められた。

F1 雌(10週齢)の胸腺(絶対、相対)重量の低値が認められた。

F1 雌雄の肝臓相対重量の高値及びF1 雌のオープンフィールド試験における立ち上がり数の高値については信頼性の認められた既報告で報告されている。

② 低用量群(0.1、0.5、2.5、12.5 μ g/kg/day)における変化

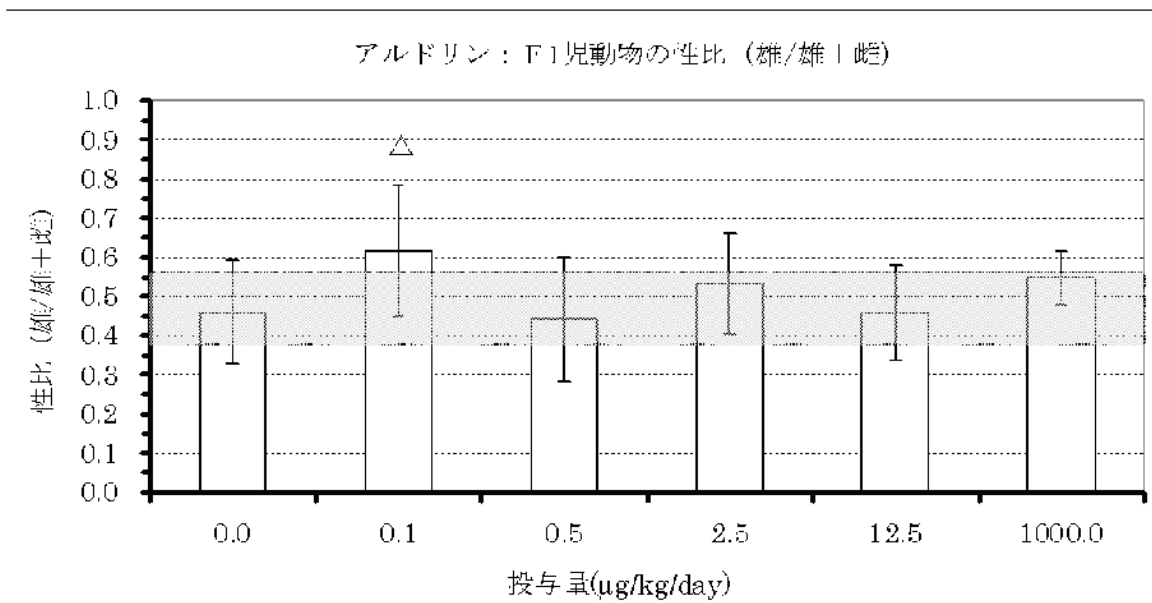
F0 母動物(哺育4～7日)の0.5、2.5 μ g/kg/day 投与群において摂餌量の高値が認められたが、哺育17～21日の摂餌量には有意な差は認められず、一過性の変化であると考えられた。なお、体重、体重増加量には有意な差は認められなかった。

F1 児動物(生後4日)の0.5 μ g/kg/day 投与群において生存率の低値(98.03%)が認められたが、生後21日の生存率には有意な差は認められず、背景データ*(90.01～100%)の範囲内に含まれる変化であり、生理学的変動の範囲内と考えられた。なお、体重には有意な差は認められなかった。

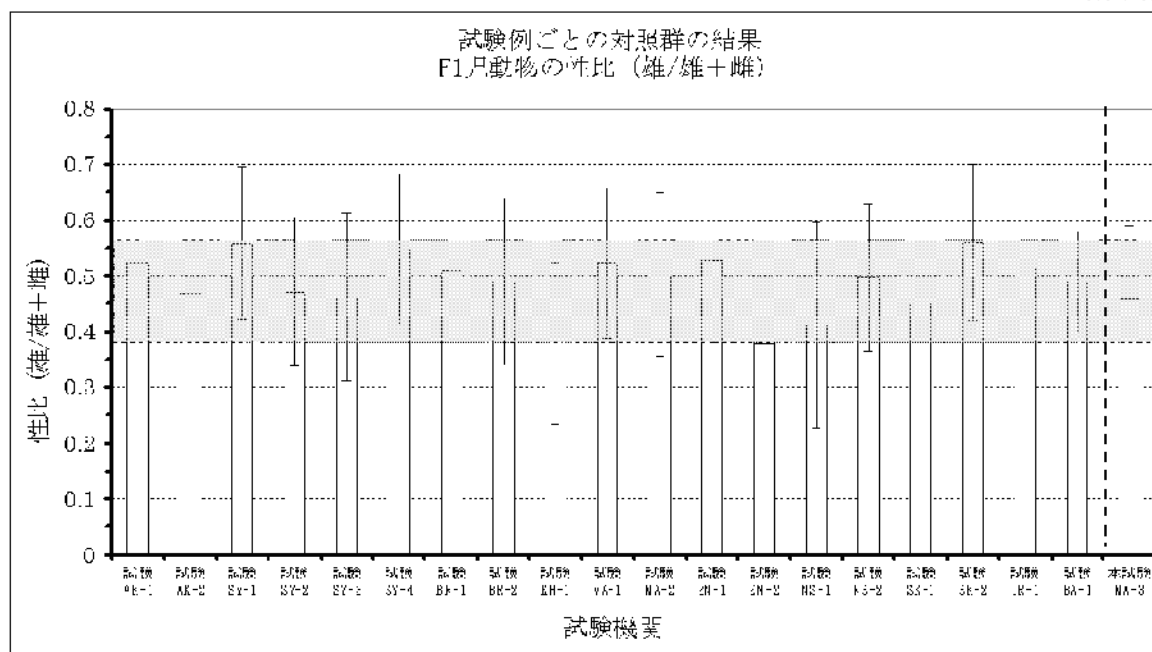
*背景データについて：ここでは、これまで環境省で実施したWistar Hannover ラットを用いた「改良1世代試験」における対照群(被験物質無投与)の平均値の範囲を、背景データとした。

F1 児動物の0.1 μ g/kg/day 投与群において性比(雄/雄+雌)の高値(0.6169)が認められたが、性比の期待値を1:1として χ 二乗検定を行うと、対照群及び投与群における値はいずれも1:1とみなし得るものであった(対照群、0.1、0.5～12.5 μ g/kg 投与群におけるp値は、それぞれ0.52、0.11、0.41～0.55)ため、偶発的な有意差であると考えられた。なお、背景データ*は0.377～0.56。(実施機関における背景データは0.4108～0.5689)。

*背景データについて：ここでは、これまで環境省で実施したWistar Hannover ラットを用いた「改良1世代試験」における対照群(被験物質無投与)の平均値の範囲を、背景データとした。



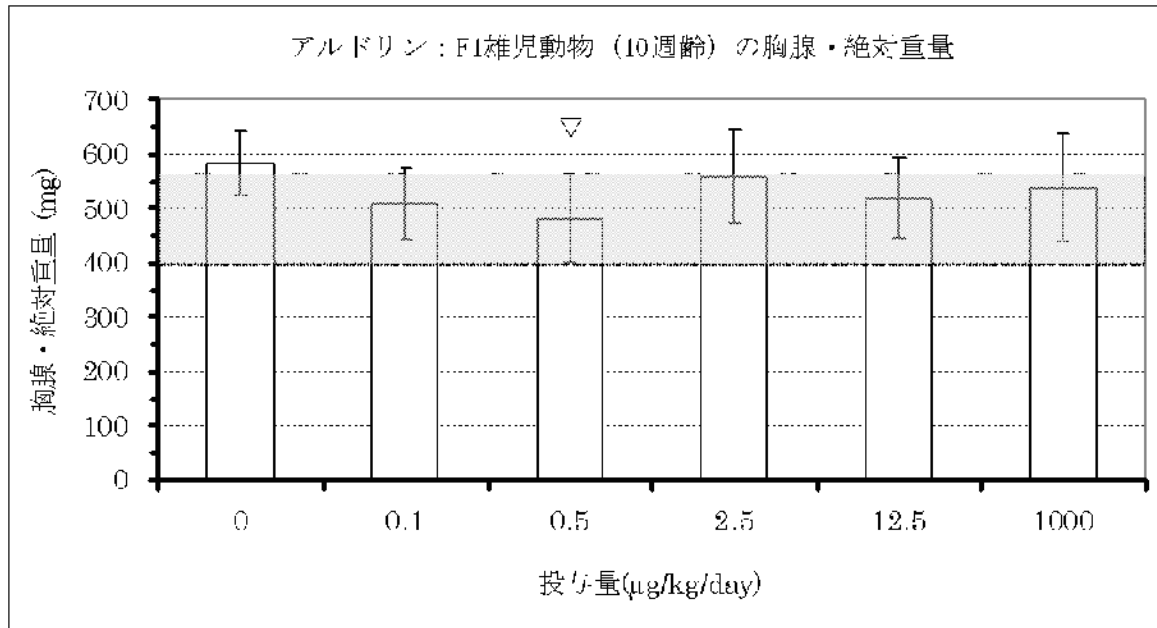
注1) △：統計学的に有意な高値(<0.05)
 注2) 網掛け部分：背景データの範囲(平均値)



注) 網掛け部分：背景データの範囲(平均値)

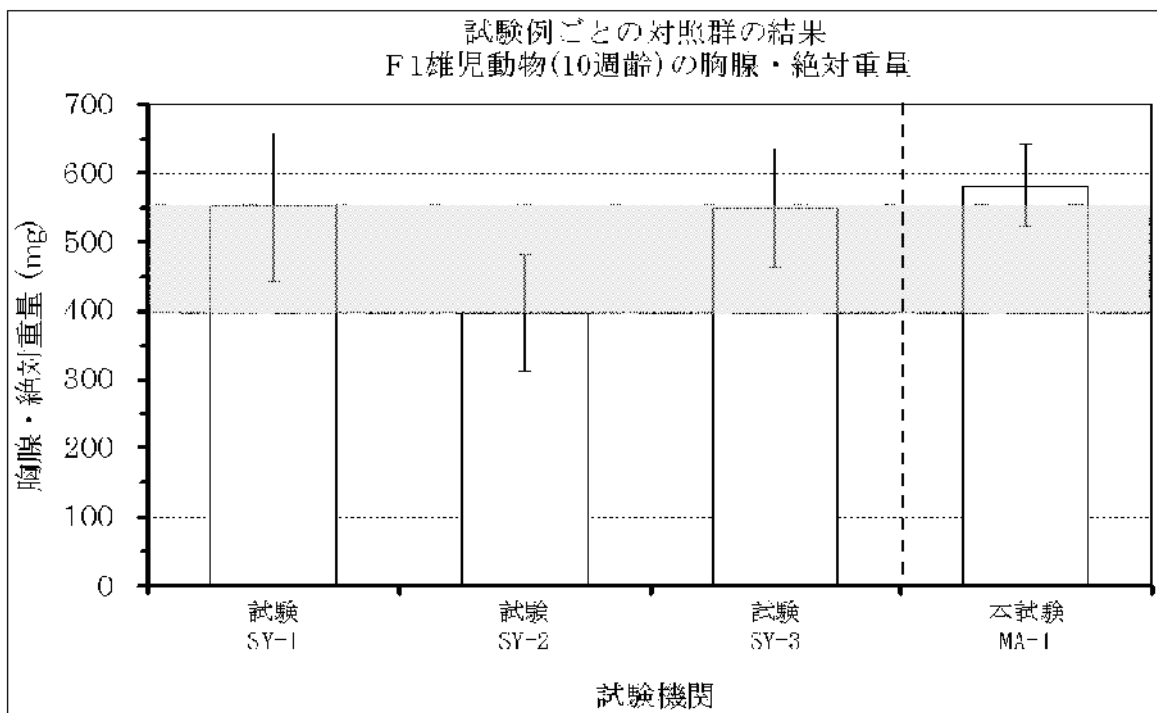
F1 雄(10 週齢)の 0.5 μ g/kg/day 投与群において胸腺(絶対、相対)重量の低値及び F1 雌(10 週齢)の 0.5、12.5 μ g/kg/day 投与群において胸腺(絶対、相対)重量の低値が認められたが、21 週齢時には有意な差は認められず、一過性の変化であると考えられた。雄の 0.5 μ g/kg/day 投与群での胸腺(絶対、相対)重量(絶対重量 480.4mg、相対重量 152.36mg%)は、背景データ*(絶対重量 397~551.3mg、相対重量 96.2~173.58mg%)の範囲内に含まれる変化であり、生理的変動の範囲内と考えられた。雌の 0.5 μ g/kg/day 投与群での胸腺(絶対、相対)重量(絶対重量 429.2mg、相対重量 200.18mg%)及び 12.5 μ g/kg/day 投与群での胸腺(絶対、相対)重量(絶対重量 410.3mg、相対重量 195.86mg%)は、背景データ*(絶対重量 387~461.2mg、相対重量 158~203.02mg%)の範囲内に含まれる変化であり、生理的変動の範囲内と考えられた。なお、病理組織学的検査において有意な差は認められなかった。

*背景データについて：ここでは、これまで環境省で実施した Wistar Hannover ラットを用いた「改良 1 世代試験」における対照群(被験物質無投与)の平均値の範囲を、背景データとした。

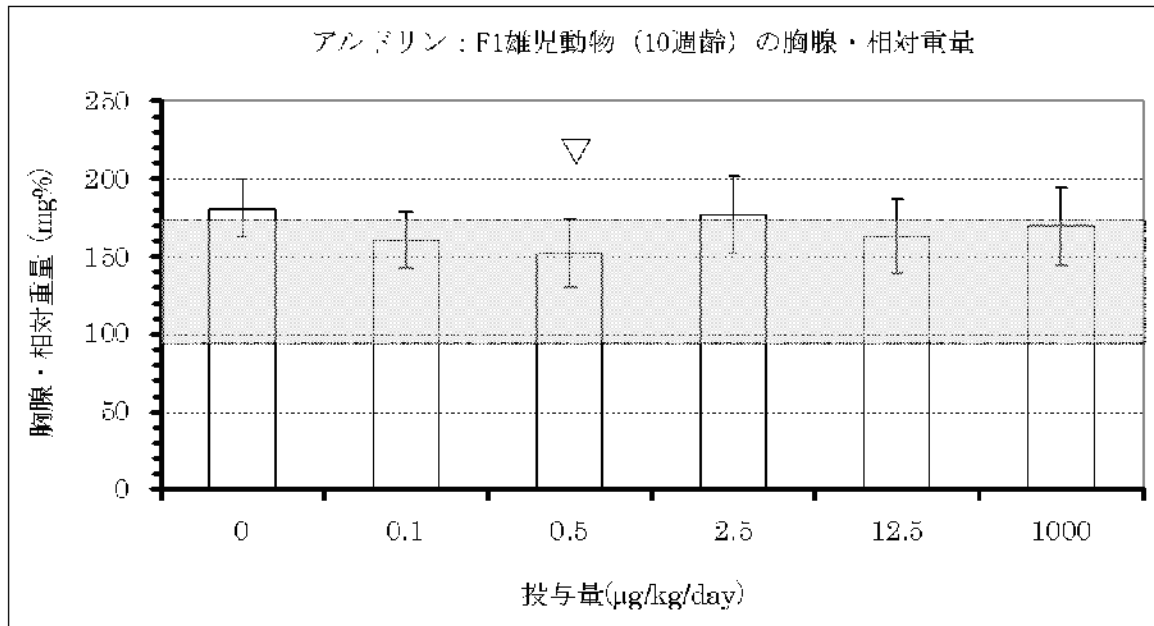


注1) ▽：統計学的に有意な低値(<math>p < 0.05</math>)

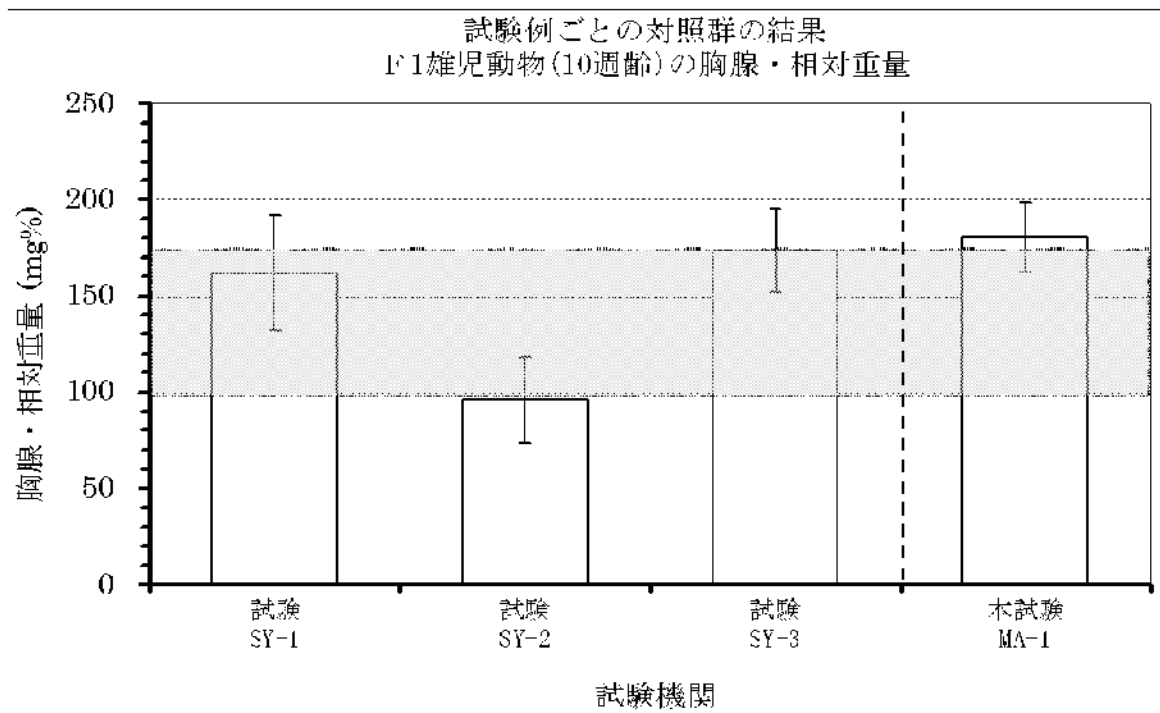
注2) 網掛部分：背景データの範囲（平均値）



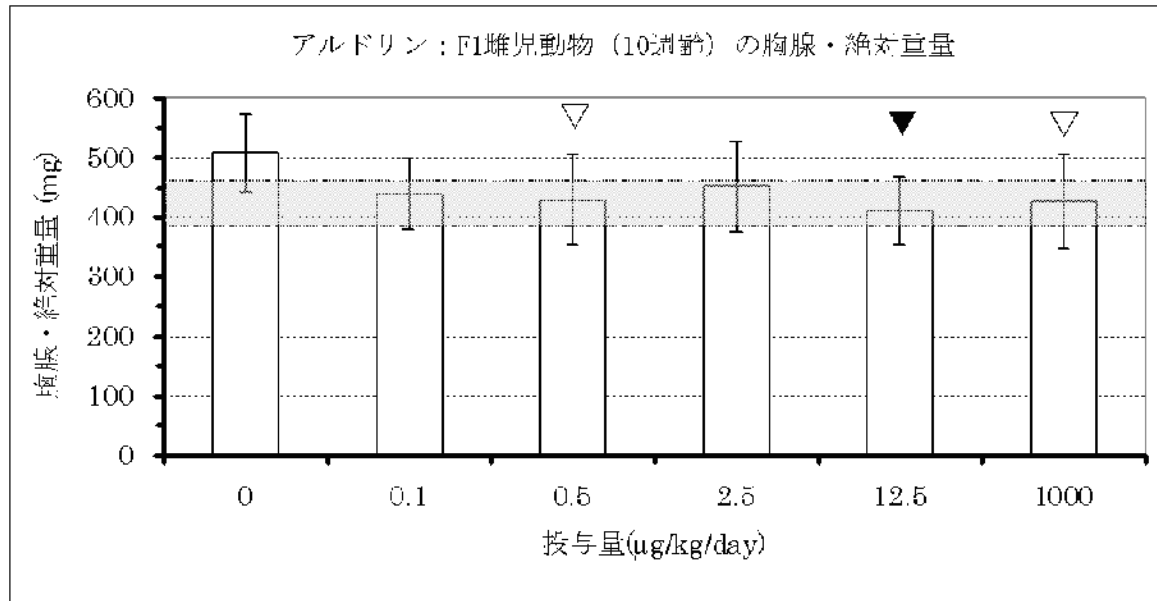
注) 網掛部分：背景データの範囲（平均値）



注1) ▽：統計学的に有意な低値 (<0.05)



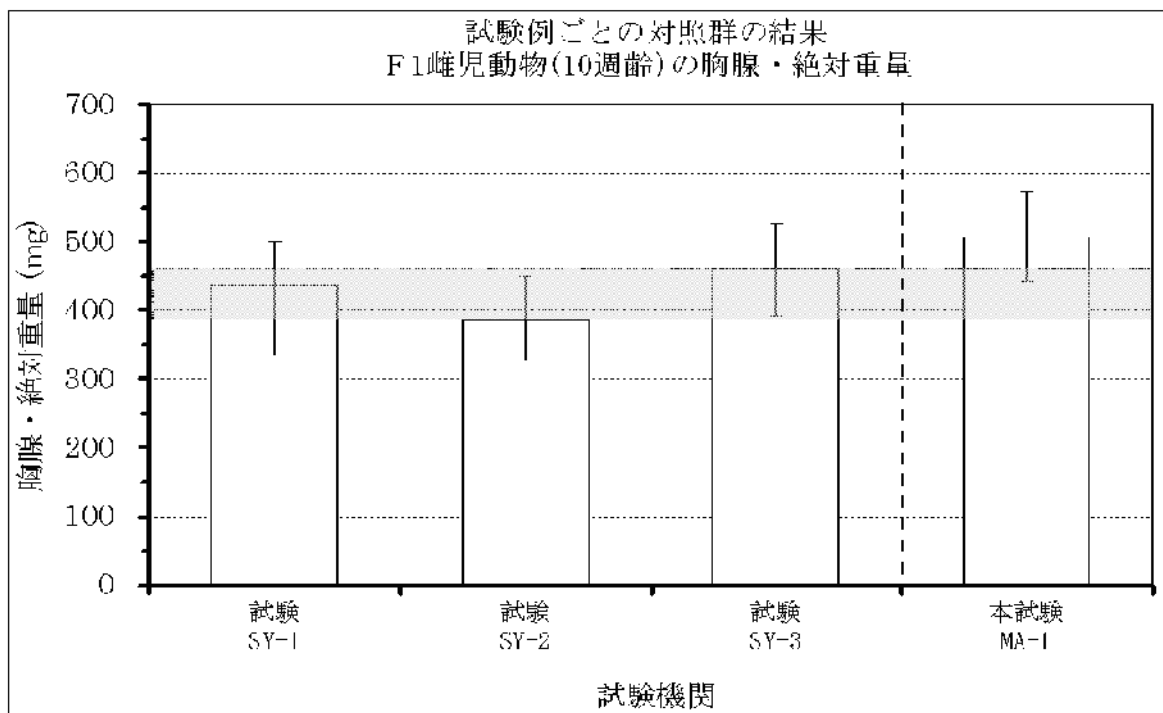
注) 網掛部分：背景データの範囲 (平均値)



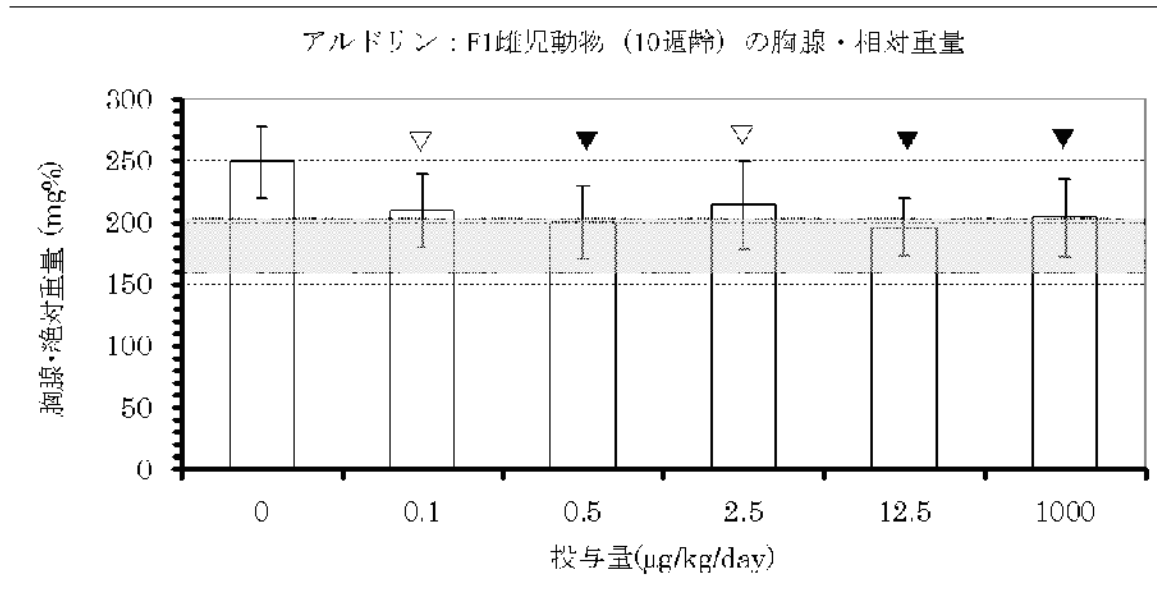
注1) ▼：統計学的に有意な低値(<0.01)

注2) ▽：統計学的に有意な低値(<0.05)

注3) 網掛部分：背景データの範囲(平均値)



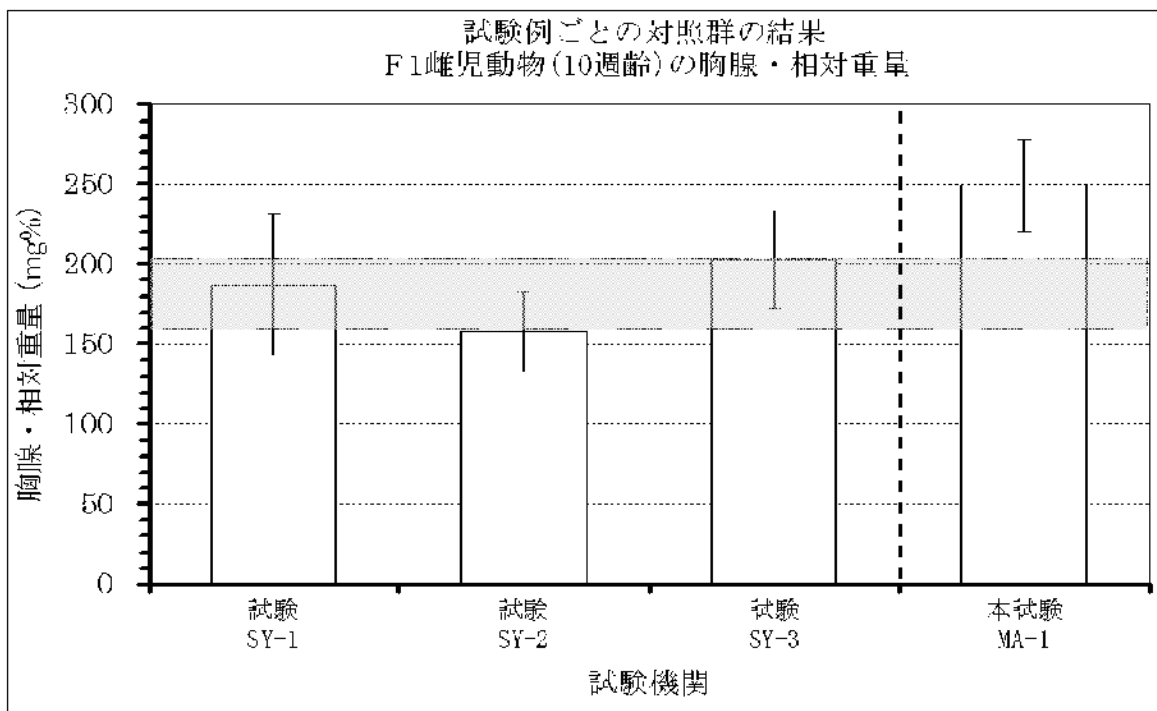
注) 網掛部分：背景データの範囲(平均値)



注1) ▼：統計学的に有意な低値(<0.01)

注2) ▽：統計学的に有意な低値(<0.05)

注3) 網掛部分：背景データの範囲（平均値）



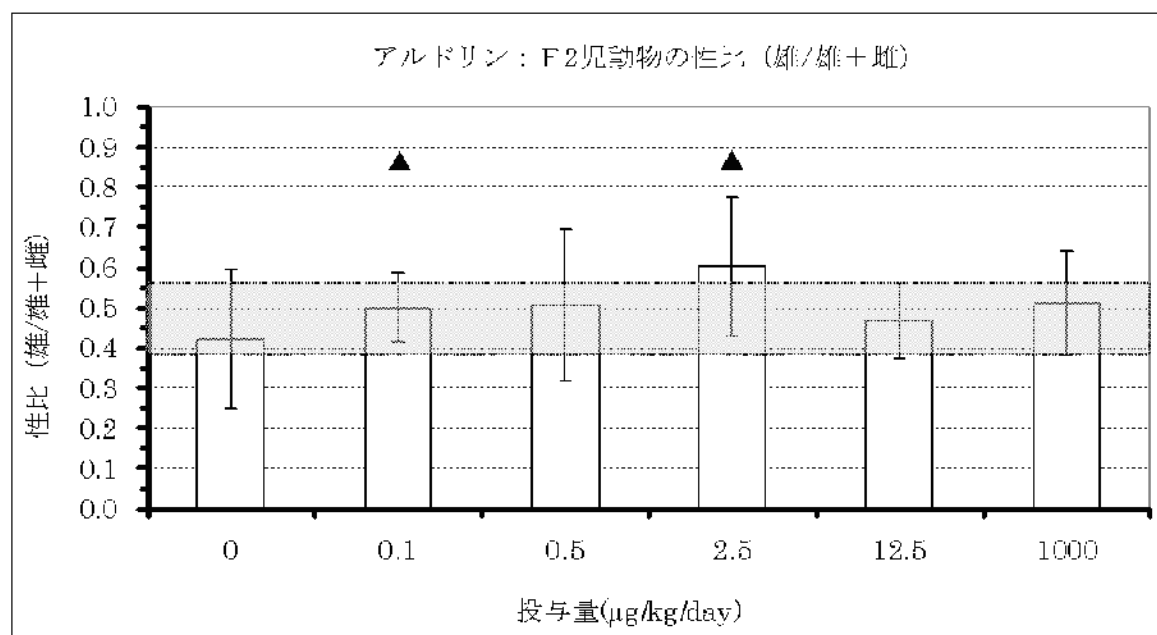
注) 網掛部分：背景データの範囲（平均値）

F2 児動物の 0.1、2.5 µg/kg/day 投与群において性比(雄/雄+雌)の高値(0.5701、0.6016)が認められたが、性比の期待値を 1:1 として χ^2 二乗検定を行うと、対照群及び投与群における値はいずれもが 1:1 とみなし得るものであった(対照群、0.1、2.5µg/kg 投与群、他の投与群における p 値は、それぞれ 0.20、0.29、0.36、0.71~1.00)ため、偶発的な有意差であると考えられた。なお、F1 児動物の背景データ*は 0.377~0.56。(実施機関における背景データは 0.4108~0.5689)。

*背景データについて：ここでは、これまで環境省で実施した Wistar Hannover ラットを用

いた「改良1世代試験」における対照群(被験物質無投与)の平均値の範囲を、背景データとした。

U.377-C.56



注1) ▲：統計学的に有意な高値(<0.01)
注2) 網掛け部分：背景データの範囲(F1の平均値)

F2雌雄(生後4日)の0.5 μg/kg/day投与群において体重の高値及びF2雌雄(生後0～4日)の体重増加量の高値が認められたが、高値であり、悪影響とは考えられなかった。

なお、絶対重量及び相対重量ともに有意差の認められた変動は得られなかったものの、その一方に有意差が認められた器官(脳を除く)は以下のとおり。

*F0母動物：0.1 μg/kg/day投与群において甲状腺絶対重量の高値

*F1雌(10週齢)：0.1、2.5 μg/kg/day投与群において胸腺相対重量の低値

(2) 試験管内(*in vitro*)試験

ヒトエストロゲン受容体(ER α 及びER β)結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞E-Screen試験、ヒト乳がん細胞アンドロゲ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)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及びTR β)酵母試験を行った。

その結果、ヒトエストロゲン受容体(ER α 及びER β)結合競合阻害試験では、活性がみられた。ヒト乳がん細胞E-Screen試験では、細胞毒性を示す濃度未満の10⁻⁶Mにおいて有意な細胞増殖が認められた。ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アンタゴニスト)では、IC₅₀値(7.14×10⁻⁵M)が得られた。ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験では、IC₅₀値(4.1×10⁻⁴M)が得られた。ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト)及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及びTR β)酵母試験では、有意な反応は得られなかった。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおりアルドリンについては、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌かく乱作用

は認められなかった。

また、最高用量(既報告で影響が認められた用量)においてのみ、一般毒性と考えられる影響が認められた。

アルドリンについては、健康リスク初期評価が「化学物質の環境リスク評価 第1巻」において行われ、「健康リスクについては現時点では作業は必要ないと考えられる」と評価されている。

アルドリンについては、既に農薬登録は失効しており(昭和50年2月)、化学物質の審査及び製造の規則に関する法律(化審法)の第一種特定化学物質に指定されている(昭和56年10月)。また、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(POPs条約)の対象物質となっている*。

*詳細については、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約に基づく国内実施計画」(平成17年6月)を参照。

プロトコール概要 (アルドリン)

| 被験物質名 | 試験機関名 | 使用動物数 | 投与方法 | 用量設定 | 投与量 | 試験方法の形式 | 母動物の観察項目 | 児動物の観察項目 | 備考 |
|-------|--------------------|---|--|---|---|--|---|----------|----|
| アルドリン | (株)三菱化学 安全科学研究所 | 1. 系統 Wistar-Hann over GALAS 2. 群構成 12 匹/群×6 群 (対照群, 低用量群 4 群, 毒性用 量群) | 1. 経路 強制経口投与 (媒体: コー ン油) 2. 期間 妊娠 0 日~離 乳を経て剖検 前日まで | 1. 低用量群 アルドリンの ADI を参考 に決定した。すなわち, ADIは0.1 μg/kg相当との 情報から, 低用量群には, 0.1 μg/kg を最低用量と し, 以下公比 5 で上げ, 0.5, 2.5 および 12.5 μg/kg を設定した。 2. 毒性用量群 予備試験 (用量: 0, 1, 3, 5, 10, 15 mg/kg, 投与期 間: 妊娠 0 日~哺育 4 日, 4~5 匹/群) の結果, 5 mg/kg 以上の群では母動物 のほぼ全例が妊娠期間中 に死亡し, 3 mg/kg 群では 母動物の死亡は認められ なかったものの, ほぼ全例 で全出産児死亡が認めら れた。1 mg/kg 群では母動 物死亡および出生児死亡 は認められなかった。これ らの結果から 1 mg/kg を設 定した。 | 0 μg/kg 0.1 μg/kg ¹⁾ 0.5 μg/kg 2.5 μg/kg 12.5 μg/kg (公比 5) 1 mg/kg | 1. 児数調整 実施しない。 2. 離乳後検査 離乳時に雌雄各 3 匹/腹を選 抜し, 以下の検査に供する。 この他の児動物は離乳時に 剖検する。 [離乳後検査への対応] No.1: 生殖機能検査動物 剖検時期: 生後 17 週以降 体重, 性成熟, 性周期 (10 週 齢から 2 週間), 精子検査, 生殖機能, 分娩させ哺育 4 日まで観察 ^{a)} No.2: 10 週齢剖検動物 剖検時期: 生後 10 週以降 体重, 性成熟, 性周期 (陰 開口から 3 サイクル), 剖 検, 器官重量, 病理組織検 査 No.3: 行動検査動物 剖検時期: 生後 13 週以降 行動検査 (情動性, 学習能), 剖検, 血中ホルモン濃度*, mRNA* *: 10 週齢剖検で異常が認 められた場合 離乳時剖検動物 剖検時期: 生後 3 週 剖検, 器官重量 (雌雄各 2 匹) <計画書変更> a): オプンフィールドテストの結果, 1 mg/kg 群の雌で多動の傾 向があったため, 帝王切開 を変更し, 分娩・哺育行動 を観察。 | 1. 一般検査 一般状態, 体重, 摂餌量, 受胎率, 分娩状態, 妊娠期 間, 着床数, 出産率, 出生 率, 哺育状態 2. 病理学的検査 以下の器官を採材し, 必要 に応じて組織検査を実施す る (下線: 器官重量測定). <u>脳, 下垂体, 甲状腺, 肝臓,</u> <u>腎臓, 脾臓, 副腎, 卵巢,</u> <u>子宮, 陰, 乳腺, 肉眼的異</u> <u>常部位</u> 1. 離乳前検査 出生時生存率 (生存, 死亡), 性比, 生存率 (出 生時生存率, 4 日生存率, 離乳率), 外表 異常, 一般状態, 体重, AGD (生後 4 日), 乳頭発育 (生後 12 日), 生後形態分化 (耳 介展開, 切歯萌出, 眼瞼開裂), 反射反応 性 (平面正向反射, 角膜反射, 聴覚性驚 愕反応, 疼痛反応, 空中正向反射) 2. 離乳後検査 体重, 性成熟 (陰開口, 包皮分離), 行動 検査 (オプンフィールドテスト ^{b)} , 水迷路), 性周 期, 精子検査, 生殖機能 (交尾率, 受胎 率), 分娩・哺育機能 (妊娠期間, 黄体数, 着床数, 出産率, 出生率, 出産児数, 出 生時生存率, 4 日生存率) ^{a)} 3. 病理学的検査 以下の器官を採材し, 10 週齢剖検動物に ついて組織検査を実施する (下線: 器官 重量測定) 1) 3 週齢: <u>脳, 胸腺, 肝臓, 脾臓, 精巣,</u> <u>精巣上体, 精囊(凝固腺), 前立腺(腹葉),</u> <u>卵巢, 子宮, 陰, 肉眼的異常部位</u> 2) 10 週齢: <u>脳, 下垂体, 甲状腺, 胸腺,</u> <u>肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓, 精巣, 精巣上</u> <u>体, 精囊(凝固腺), 前立腺(腹葉), 卵巢,</u> <u>卵管, 子宮, 陰, 肉眼的異常部位</u> 3) 行動検査: 10 週齢時に異常が認めら れた場合, 追加検討を実施する ^{c)} 4. その他 (必要なら追加検査) 血中ホルモン濃度および mRNA* *: 10 週齢剖検時に必要の可能性が考 えられた場合, 行動検査動物から採 取し, 血清および生殖器を凍結保存 <計画書変更> b): オプンフィールドテストの結果, 1 mg/kg 群の 雌で多動の傾向があったため, 同動物の 再検査と生殖用動物の検査を実施。 c): 10 週齢の胸腺重量で有意差がみられ たため行動検査用の胸腺を測定。 | | |

注: 試験方法の形式には、間引きの有無を記載する。備考には被験物質固有の特記事項を記入する

2. エンドリンの試験結果

(1) げっ歯類を用いた1世代試験

① 最高用量(0.4mg/kg/day)における変化

- F0 母動物の全児死亡した個体の出現頻度の高値が認められた。
- F0 母動物(妊娠0～7日及び0～14日)の体重増加量の低値が認められた。
- F0 母動物(妊娠0日及び6日)の摂餌量の低値が認められた。
- F1 雄(生後4日)の肛門生殖突起間相対距離の高値が認められた。
- F1 雌雄(16～17週齢)の肝臓相対重量の低値が認められた。
- F1 雌(16～17週齢)の下垂体(絶対、相対)重量の低値が認められた。

F0 母動物の全児死亡した個体の出現頻度の高値及びF0 母動物の体重増加量の低値については信頼性の認められた既報告で報告されている。

② 低用量群(0.1、1、5、25 μ g/kg/day)における変化

F0 母動物(妊娠6日)の1 μ g/kg/day 投与群において摂餌量の低値が認められたが、妊娠0、9、12、15、17、19日の摂餌量には有意な差は認められず、一過性の変化であると考えられた。なお、体重、体重増加量には有意な差は認められなかった。

なお、絶対重量及び相対重量ともに有意差の認められた変動は得られなかったものの、その一方に有意差が認められた器官(脳を除く)は以下のとおり。

- *F1 雄(3週齢)：0.2 μ g/kg/day 投与群において下垂体相対重量の低値
- *F1 雄(16～17週齢)：1 μ g/kg/day 投与群において副腎絶対重量の高値
- *F1 雄(16～17週齢)：1、25 μ g/kg/day 投与群において前立腺腹葉絶対重量の低値
- *F1 雄(16～17週齢)：5、25 μ g/kg/day 投与群において肝臓相対重量の低値
- *F1 雄(16～17週齢)：25 μ g/kg/day 投与群において脾臓相対重量の低値
- *F1 雌(16～17週齢)：0.2、1 μ g/kg/day 投与群において腎臓絶対重量の高値
- *F1 雌(16～17週齢)：1 μ g/kg/day 投与群において脳絶対重量の高値
- *F1 雌(16～17週齢)：25 μ g/kg/day 投与群において甲状腺相対重量の低値
- *F1 雌(16～17週齢)：25 μ g/kg/day 投与群において肝臓相対重量の低値

(2) 試験管内(*in vitro*)試験

ヒトエストロゲン受容体(ER α 及びER β)結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞E-Screen試験、ヒト乳がん細胞アンドロゲ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)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及びTR β)酵母試験を行った。

その結果、ヒトエストロゲン受容体(ER α 及びER β)結合競合阻害試験では、活性がみられた。ヒト乳がん細胞E-Screen試験では、細胞毒性を示す濃度未満の10⁻⁵Mにおいて有意な細胞増殖が認められた。ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アンタゴニスト)では、IC₅₀値(2.28 \times 10⁻⁵M)が得られた。ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験では、IC₅₀値(7.07 \times 10⁻⁴M)が得られた。ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト)及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及びTR β)酵母試験では、有意な反応は得られなかった。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおり、エンドリンについては、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌かく乱作

用は認められなかった。

また、最高用量(既報告で影響が認められた用量)においてのみ、一般毒性と考えられる影響が認められた。

エンドリンについては、健康リスク初期評価が「化学物質の環境リスク評価 第1巻」において行われ、「健康リスクについては現時点では作業は必要ないと考えられる」と評価されている。

エンドリンについては、既に農薬登録は失効しており(殺そ剤として昭和48年6月及び殺虫剤として昭和50年12月)、化学物質の審査及び製造の規則に関する法律(化審法)の第一種特定化学物質に指定されている(昭和56年10月)。また、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(POPs条約)の対象物質となっている*。

*詳細については、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約に基づく国内実施計画」(平成17年6月)を参照。

プロトコル概要 (エンドリン)

| 被験物質 | 試験機関 | 被験動物 | 使用動物数 | 投与方法 投与期間 | 用量設定 | 投与容量 | 試験方法 の形式 | 母動物の観察項目 | 児動物の観察項目 | 備考 |
|-------|-----------|--|---|--------------|---|----------------|---|---|---|--------|
| エンドリン | 株式会社新日本科学 | Wistar-Hannover ラット BrlHan: WIST@Jcl (GALAS) | 購入 雄 30 匹 雌 100 匹 交尾成立 母動物 各群 12 匹 ×6 群 | 強制経口 | 0 0. 2 1 5 25 μg/kg/day 被験物質の1日許容摂取量が0. 2 μg/kg/day であることから低用量は0. 2 μg/kg/day とした. | 1 mL/kg/day | 哺乳児数の調整は行わない. 離乳児は各腹4匹のみを試験に用いる. | 一般状態 体重測定 摂餌量測定 分娩/哺育状況 妊娠期間 着床痕数 出産率 全例剖検 器官重量測定、固定保存 ☆脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、副腎、腎臓、脾臓、卵巣、子宮 | 哺乳児 出生率、生存率、離乳率、一般状態、体重、AGD (生後4日)、身体発達 (耳介展開、切歯萌出、眼瞼開裂)、初期行動発達 (正向反射、背地走性、瞳孔反射、プレイヤー反射、痛覚反応)、保存 (死亡児、異常児) 離乳時の器官重量測定 (各腹の雄2匹、雌2匹、固定保存) ☆脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、副腎、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺腹葉、卵巣、子宮 ☆病理組織学的検査 剖検で肉眼的に異常の認められた器官及び下垂体、甲状腺、肝臓について、病理組織学的検査を実施する. ☆剖検時採血/肝臓の外側右葉の一部 (約1g) を凍結保存する. (血中或いは肝臓中のエンドリン濃度測定が必要な場合は試験計画書を変更する). ☆離乳時の器官重量測定児及び育成児以外はすべて離乳時に剖検する. | 比重約1.0 |
| | | | | 強制経口 | 最高用量群 0.40 mg/kg/day ラット妊娠期間に0.45 mg/kg/day を投与投与した報告では、母動物の著しい体重増加抑制がみられた. 一方、ラットの妊娠及び哺育期間に0.3 mg/kg/day を投与した報告では、母動物の体重増加抑制はみられなかったが、F1 児の運動量への影響が報告されていることから、親動物の一般毒性的影響が予想される0.40 mg/kg/day (400 μg/kg/day) とした. | 1 mL/kg/day | 病理組織学的検査 ☆剖検で肉眼的に異常のみられた器官及び肝臓 剖検時採血/肝臓採取 ☆肝臓外側右葉の一部 (約1g) を凍結保存する. (血中或いは肝臓中のエンドリン濃度測定が必要な場合は試験計画書を変更する). | 離乳後の育成児 (各腹の雄2匹、雌2匹) ☆ 一般状態、包皮分離、膣開口、性周期 (各腹雌1例)、オープンフィールド検査、剖検、 同群内交配 (各腹雄1匹、雌1匹)、固定保存. ☆成熟動物の剖検及び器官重量 (各腹の雄1匹、雌1匹、固定保存) 脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、副腎、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺腹葉、卵巣、子宮 剖検時採血/肝臓の外側右葉の一部 (約1g) を凍結保存する. (血中或いは肝臓中のエンドリン濃度測定が必要な場合は試験計画書を変更する). ☆ 病理組織学的検査 (各腹の雄1匹、雌1匹) 肝臓、胸腺、脾臓、腎臓、生殖器 (精巣、精巣上体、精嚢、前立腺腹葉、卵巣及び子宮) 及び内分泌器官 (下垂体、甲状腺、副腎). ☆ 生殖機能検査 交尾率、受胎率、妊娠13日剖検 (着床率、胚生存率) | | |

3. デILDロリンの試験結果

(1) げっ歯類を用いた1世代試験

① 最高用量(1 mg/kg/day)における変化

F1 児動物(生後4日)の生存率の低値が認められた。

F1 雌(10週齢)の肝臓相対重量の高値が認められた。

② 低用量群(0.1、0.5、2.5、12.5 μg/kg/day)における変化

F0 母動物(哺育7~14日)の12.5 μg/kg/dayにおいて体重増加量の高値が認められたが、哺育0~21日の体重増加量には有意な差は認められず、一過性の変化であると考えられた。なお、体重には有意な差は認められなかった。

F0 母動物(哺育8日)の0.1 μg/kg/day 投与群において摂餌量の低値が認められたが、哺育1~17日の摂餌量には有意な差は認められず、一過性の変化であると考えられた。なお、体重、体重増加量には有意な差は認められなかった。

F1 雌(妊娠0、4日)の0.1 μg/kg/day 投与群及びF1 雌(妊娠0、4、7、11、13日)の0.5 μg/kg/day 投与群において体重の低値が認められたが、体重増加量には有意な差は認められず、解剖動物と交配検査動物の振り分けにより生じた偏りによるものと考えられた。

F1 雄(16週齢)の0.1 μg/kg/day 投与群において精子検査における精子頭部の振幅の低値が認められたが、精子密度等のその他の項目には有意な差は認められなかった。また、交配検査における受胎率にも有意な差は認められなかった。

なお、絶対重量及び相対重量ともに有意差の認められた変動は得られなかったものの、その一方に有意差が認められた器官(脳を除く)は以下のとおり。

*F0 母動物：0.1 μg/kg/day 投与群において子宮絶対重量の高値

*F1 雌(10週齢)の12.5 μg/kg/day 投与群において腎臓相対重量の高値

(2) 試験管内(*in vitro*)試験

ヒトエストロゲン受容体(ER α 及びER β)結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞E-Screen試験、ヒト乳がん細胞アンドロゲ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)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及びTR β)酵母試験を行った。

その結果、ヒトエストロゲン受容体(ER α)結合競合阻害試験では、活性がみられた。ヒトエストロゲン受容体(ER β)結合競合阻害試験では、弱い活性がみられた。ヒト乳がん細胞E-Screen試験では、10⁻⁶Mにおいて有意な細胞増殖が認められた。ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アンタゴニスト)では、IC₅₀値(2.28×10⁻⁵M)が得られた。ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及びTR β)酵母試験では、有意な反応は得られなかった。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおり、デILDロリンについては、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。

また、最高用量(既報告で影響が認められた用量)においてのみ、一般毒性と考えられる影響が認められた。

ディルドリンについては、健康リスク初期評価が「化学物質の環境リスク評価 第1巻」において行われ、「健康リスクについては現時点では作業は必要ないと考えられる」と評価されている。

ディルドリンについては、既に農薬登録は失効しており(昭和50年6月)、化学物質の審査及び製造の規則に関する法律(化審法)の第一種特定化学物質に指定されている(昭和56年10月)。また、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(POPs条約)の対象物質となっている*。

*詳細については、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約に基づく国内実施計画」(平成17年6月)を参照。

プロトコール概要 (ディルドリン)

| 被験物質名 | 試験機関名 | 被験動物名 | 使用動物数 | 投与方法 | 用量設定 | 投与量 | 試験方法の形式 | 母動物の観察項目 | 児動物の観察項目 | 備考 |
|--------|-----------------------|--|---------------------------------------|---------------------|---|------------|--|--|--|----|
| ディルドリン | 株式会社 日本バイオリサーチセンター | Wistar Hannover ラット、BrlHan: WIST@Jc1 (GALAS) | 各群 14 匹、但し、1mg/kg 群 22 匹、全 6 群 計 86 匹 | 強制経口投与 (溶媒: コーンオイル) | 0 | 1mL/kg/day | 離乳時(哺育 21 日)まで間引きは行わない。離乳時に半数の母動物の児動物を剖検し、残りの半数の母動物の児動物を各検査に割り当てる。 | 一般状態観察、体重測定、体重増加量、摂餌量測定、分娩および哺育行動観察、剖検、器官重量測定 (下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、卵巣、子宮)。器官・組織を 10%中性緩衝ホルマリンで保存。肝臓一部凍結保存 (♂1♀1/腹)。 | 哺育期 (全児/腹) 出生児数、死産児数、一般状態観察、体重測定、AGD (4 日)、乳頭発現 (14 日)。 | |
| | | | | | 0.1 | | | | | |
| | | | | | 0.5 | | | | | |
| | | | | | 2.5 | | | | | |
| | | | | | 12.5µg/kg/day | | | | | |
| | | | | | ADI 0.1µg/kg を参考に公比 5 で乗じて設定した。 | | | | | |
| | | | | | | 1mg/kg/day | | | | |
| | | | | | 1mg/kg 予備試験 (10、5、2、1 および 0mg/kg、1 群 5 匹の交尾雌使用) の結果から決定した。1mg/kg 群では、全出生児死亡が 3 母動物で認められた。 | 1mL/kg/day | | | | |
| | | | | | | | | | 21 日齢児 (半数の母動物) 剖検、器官重量測定 (胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、卵巣、子宮)。器官組織を 10%中性緩衝ホルマリンで保存。肝臓一部凍結保存 (♂1♀1/腹)。 | |
| | | | | | | | | | 離乳から成熟まで (半数の母動物) 一般状態観察、体重測定、自発運動量測定 (♂♀半数/腹)、膈開口、包皮分離、性周期。 | |
| | | | | | | | | | 70 日齢児 (♂♀半数/腹) 剖検、器官重量測定 (下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、卵巣、子宮)。器官・組織を 10%中性緩衝ホルマリンで保存。肝臓一部凍結保存 (♂1♀1/腹)。血清凍結保存。 | |
| | | | | | | | | | 交配 (♂♀半数/腹) | |
| | | | | | | | | | 交配後 (雌) 体重測定、妊娠 13 日剖検、胚の観察。 | |
| | | | | | | | | | 交配後 (雄) 剖検、器官重量測定、精子検査。 | |

4. ヘプタクロルの試験結果

(1)げっ歯類を用いた1世代試験

①高用量群(1、3 mg/kg/day)における変化

F0 母動物の3 mg/kg/day 投与群において全児死亡した個体の出現頻度の高値が認められた。

F1 児動物の3 mg/kg/day 投与群において死亡・消失個体の出現頻度の高値及び哺育0日の生存率の低値が認められた。

F1 雌雄(3週齢)の1、3 mg/kg/day 投与群において肝臓(絶対、相対)重量の高値ならびに肝臓の病理組織学的検査における小葉中心性肝細胞肥大個体の出現頻度の高値が認められた。

F1 雌の1 mg/kg/day 投与群において性成熟試験における膈開口日の高値(遅延)及び膈開口完了時体重の高値が認められた。

F1 児動物の生存率の低値については信頼性の認められた既報告で報告されている。

②低用量群(0.05、0.5、5 μ g/kg/day)における変化

F1 雄(12週齢)の5 μ g/kg/day 投与群において甲状腺の病理組織学的検査における小胞上皮細胞水腫変性個体の出現頻度の低値が認められた。低値であり、悪影響とは考えられなかった。

(2)試験管内(*in vitro*)試験

ヒトエストロゲン受容体(ER α 及びER β)結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞E-Screen試験、ヒト乳がん細胞アンドロゲ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)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及びTR β)酵母試験を行った。

ヒトエストロゲン受容体(ER α 及びER β)結合競合阻害試験では、活性がみられた。ヒト乳がん細胞E-Screen試験では、細胞毒性を示す濃度未満の 10^{-6} Mにおいて有意な細胞増殖が認められた。ヒト乳がん細胞アンドロゲ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)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及びTR β)酵母試験では、有意な反応は得られなかった。

(3)試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおり、ヘプタクロルについては、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。

また、高用量群(既報告で影響が認められた用量群)においてのみ、一般毒性と考えられる影響が認められた。

ヘプタクロルについては、健康リスク初期評価が「化学物質の環境リスク評価 第1巻」において行われ、「健康リスクについては現時点では作業は必要ないと考えられる」と評価されている。

ヘプタクロルについては、既に農薬登録は失効しており(昭和50年5月)、化学物質の審査及び製造の規則に関する法律(化審法)の第一種特定化学物質に指定されている(昭和61年9月)。また、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(POPs条約)の対象物質となっている*。

*詳細については、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約に基づく国内実施

計画」(平成17年6月)を参照。

表. プロトコール概要 (ヘプタクロル)

| 被験物質 | 試験機関 | 被験動物 | 使用動物数 | 投与方法 投与期間 | 用量設定 | 試験方法の形式 | 母動物の観察項目 | 児動物の観察項目 | 備考 |
|--------|-----------------|--|---|--------------|--|---|--|---|----|
| ヘプタクロル | (財) 残留 農業研究所 | Wistar Hannover ラ ット BrlHan: WIST@Jcl (GALAS) | 購入 雄 60 匹 雌 100 匹 交尾成立 母動物 各群 12 匹 ×6 群 | 強制経口投与 | 0 0.05 0.50 5.0 µg/kg/day ADI は 0.5 µg/kg/day であるこ とから、この量を 中心に、1/10 から 10 倍量投与する。 | 哺育児数の調整 は行わない。 離乳児は群ごと の F1 雌雄が同数 となるよう離乳 した各腹から少 なくとも雌雄そ れぞれ 2 匹を無 作為に選抜して F1 動物とし、残 りは全て剖検に 供する。 | 一般状態 体重測定 体重増加量 摂餌量測定 分娩および哺育行動 ☆受胎率、出産率、 妊娠期間、着床 数 採血、剖検 器官重量測定 ☆脳、下垂体、甲状 腺、肝臓、腎臓、 脾臓、副腎、卵巣、 子宮 器官保存 ☆重量測定器官の 他、膈、肉眼的異 常部位 病理組織学的検査 (必要に応じて) | 各生育段階において 一般状態、体重測定、体重増加量、摂餌量測定 哺育児 (0~21 日齢) 出産児数、性比、生存率、AGD (4 日齢)、乳頭発達、身体発達 (耳介開展、切歯萌出、眼瞼開裂)、初期行動発達 (正向反射、 空中正向反射) 21 日齢で安楽死させる離乳児 剖検、 器官重量測定 ☆脳、胸腺、肝臓、脾臓、精巣、精巣上部、前立腺腹葉、精囊、 卵巣、子宮 器官保存 ☆重量測定器官の他、肉眼的異常部位 病理組織学的検査 ☆胸腺、肝臓、精巣、精巣上部、精囊、凝固線、前立腺腹葉、 卵巣、子宮 観察継続離乳児 性成熟 (包皮分離、膈開口)、性周期 (膈開口日から 3 週間ま たは 3 周期、ならびに交配前 2 週間)、オープンフィールド (交 配を行わない F1 雌雄 (各腹で雌雄各 1 匹)) 12 週齡<各群における約半数の雌雄は交配させ、残りは交配し ない> <u>交配終了後に安楽死させる F1 雌雄 (各腹で原則として順位の 早い雌雄それぞれ 1 匹; 雌は妊娠 14 日に安楽死させて子宮内 の受胎産物の有無を確認)</u> 剖検、 器官保存 ☆脳、下垂体、甲状腺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓、精巣、精巣 上部、精囊、凝固線、前立腺腹葉、卵巣、子宮、膈 <u>交配を行わずに安楽死させる F1 雌雄</u> 採血、剖検、 器官重量測定、器官保存 ☆脳、下垂体、甲状腺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓、精巣、精巣 上部、精囊、凝固線、前立腺腹葉、卵巣、子宮、膈 (器官保存 のみ) 精子検査: 精巣精子頭部数、精巣上部精子数、運動能、形態 病理組織学的検査 ☆下垂体、甲状腺、肝臓、副腎、精巣、精巣上部、精囊、前立 腺、卵巣、子宮、膈 | |
| | | | | 陽性対照 | 1 3 mg/kg/day ラットにおける LD50 値 (40~188 mg/kg) を参考に し、非妊娠雌動物 を用いる予備試験 (10、30 および 100 mg/kg/day で 2 ~12 日間投与: 1 および 3 mg/kg/day で 7 日 間投与を追加実 施) の結果から決 定する。 ラットの妊娠およ び哺育期間中の母 動物への被験物質 暴露による生殖毒 性兆候の情報は何 も得られていない ので、陽性対照を 2 群設けて試験を 実施する。 | | | | |

5. マイレックスの試験結果

(1) げっ歯類を用いた1世代試験

① 最高用量(2 mg/kg/day)における変化

F0 母動物の全児死亡した個体の出現頻度の高値、肝臓の病理組織学的検査における小葉中心性肝細胞肥大個体の出現頻度の高値が認められた。

F0母動物(哺育0～10日、0～14日)の体重増加量の低値及びF0母動物(哺育0～7日、0～10日、0～14日)の摂餌量の低値が認められた。

F1 児動物(生後0日、4日、21日)の生存産児数の低値及びF1 児動物(生後0日、0～4日、4～21日)の生存率及び出生率の低値が認められた。

F1 雌雄の一般状態における白内障個体の出現頻度の高値が認められた。

F1 雌雄(哺育4日)の行動発達試験における正向反射完成率の低値が認められた。

F1 雌(哺育13日)の身体発達試験における耳道開通完成率の低値が認められた。

F1 雌の性成熟試験における膈開口日の高値(遅延)が認められた。

F1 雌(3～4週齢)の体重増加量の低値が認められた。

F0 母動物の体重増加量の低値、肝臓の病理組織学的検査における小葉中心性肝細胞肥大個体の出現頻度の高値、F1 児動物の生存率及び出生率の低値、白内障個体の出現頻度の高値については信頼性の認められた既報告で報告されている。

② 低用量群(0.02、0.2、2、20 μ g/kg/day)における変化

F1 雌(11週齢)の2 μ g/kg/day 投与群において体重の高値が認められたが、10、12週齢時の体重に有意な差は認められず、一過性の変化であると考えられた。

F1 雌(12週齢)の2、20 μ g/kg/day 投与群において解剖時体重の高値が認められたが、解剖動物と交配検査動物の振り分けにより生じた偏りによるものと考えられた。

なお、絶対重量及び相対重量ともに有意差の認められた変動は得られなかったものの、その一方に有意差が認められた器官(脳を除く)は以下のとおり。

*F1 雄(3週齢)：20 μ g/kg/day 投与群において前立腺腹葉相対重量の高値

(2) 試験管内(*in vitro*)試験

ヒトエストロゲン受容体(ER α 及びER β)結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞E-Screen試験、ヒト乳がん細胞アンドロゲ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)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及びTR β)酵母試験を行った。

ヒトエストロゲン受容体(ER α 及びER β)結合競合阻害試験では、弱い活性がみられた。ヒト乳がん細胞E-Screen試験では、有意な細胞増殖は認められなかった。ヒト乳がん細胞アンドロゲ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)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及びTR β)酵母試験では、有意な反応は得られなかった。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおり、マイレックスについては、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。

また、最高用量(既報告で影響が認められた用量)においてのみ、一般毒性と考えられる

影響が認められた。

マイレックスについては、わが国では未登録の殺虫剤であるが、既に「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(POPs条約)の対象物質となっている*。

*詳細については、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約に基づく国内実施計画」(平成17年6月)を参照。

プロトコール概要 (マイレックス)

| 被験物質 | 試験機関 | 被験動物 | 使用動物数 | 投与方法 | 用量設定 | 投与量 | 試験方法の形式 | 母動物の観察項目 | 児動物の観察項目 | 備考 |
|--------|-----------------|---|---|--|--|-------------|---|--|--|----|
| マイレックス | 日本バイオアッセイ研究センター | Wistar Hannover ラット BrlHan: WIST@Jcl (GALAS) | 導入 雌100匹 雄 60匹 試験使用 雌90匹 1群15匹 (12匹の妊娠雌を確保する) | 強制経口投与 (コーン油) 妊娠0日～ 哺育20日 連続投与 | 低用量：0 0.02 0.2 2 20 µg/kg/day 1日許容摂取量(ADI)は規定されていないため、1日の推定摂取量を計算した。 <u>0.0003 µg/kg</u> (フガシティーモデルによる計算結果) <u>0.56 µg/kg</u> (過去の最高測定値による計算結果) <u>29 µg/kg</u> (米国汚染地域での計算結果) <u>0.2 µg/kg</u> (EPA-RfD) 以上の1日推定摂取量及び飼料中検出限界値(0.05 µg/kg)を考慮して設定。 高用量：2 mg/kg/day 過去の報告から、母動物の甲状腺・肝臓障害、児動物の離乳率の減少、甲状腺・肝臓・眼の障害が予測される用量を設定。 | 2mL/kg (BW) | 哺育児数の調製(間引き)は行わない。 21日齢で離乳する。 (グループ1) 各群6腹の全F1を飼育する。 (1A) 12週齢交配(6腹,雌雄各3匹) (1B) 12週齢解剖(1A以外の残り) (グループ2) 21日齢で解剖する。 (グループ1以外の腹の全F1児) | 一般状態 体重 摂餌量 分娩・哺育状態 血漿・血清凍結保存 病理学的検査 剖検 臓器重量 胸腺,副腎,下垂体,甲状腺,肝臓,腎臓, 病理組織学的検査 甲状腺,肝臓 肝臓の一部凍結保存 着床痕数 | 哺育期(雌雄全匹) 産児数・生存児数、一般状態、体重、AGD、乳頭、行動発達(正向反射,自由落下反射)、身体発達(切歯の萌出,耳道の開通,眼瞼の開裂) (グループ1) 離乳から12週齢まで(6腹,雌雄全匹) 一般状態、体重、包皮分離、膈開口、性周期 (グループ1A) 交配後(雌) (6腹,各3匹) 体重、病理学的検査(剖検,臓器保存)、帝王切開(妊娠黄体数,着床痕数,胚の生死) 交配後(雄) (6腹,各3匹) 病理学的検査(剖検,臓器保存) 交配検査の結果に応じて精子検査 (グループ1B) 12週齢(6腹,グループ1A以外の雌雄) 血漿・血清凍結保存 病理学的検査 剖検 臓器重量：胸腺,副腎,下垂体,甲状腺,肝臓,腎臓,脾臓,子宮,卵巣,精巣,精巣上部,前立腺,精囊+凝固腺 病理組織学的検査：甲状腺,肝臓 肝臓の一部凍結保存 (グループ2) 21日齢児(グループ1以外の腹の雌雄全匹) 血漿・血清凍結保存 病理学的検査 剖検 臓器重量：胸腺,副腎,下垂体,甲状腺,肝臓,腎臓,脾臓,子宮,卵巣,精巣,精巣上部,前立腺,精囊+凝固腺 病理組織学的検査：甲状腺,肝臓 肝臓の一部凍結保存 | |

6. ケルセンの試験結果

(1) げっ歯類を用いた1世代試験

① 最高用量(30mg/kg/day)における変化

F0 母動物の一般状態における流涎・軟便個体の出現頻度の高値が認められた。

F0 母動物(妊娠0～7日、0～14日)の体重増加量の低値、F0 母動物(妊娠0～7日、7～14日)の摂餌量の低値が認められた。

F0 母動物(哺育0～14日、0～21日)の体重増加量の高値が認められた。

F0 母動物の甲状腺(絶対、相対)重量及び肝臓(絶対、相対)重量の高値が認められた。

F0 母動物の卵巣絶対重量の低値が認められた。

F0 母動物の腎臓相対重量の高値が認められた。

F1 雌雄(哺育4日、7日、14日)の体重の低値が認められた。

F1 雄(3週齢)の肝臓相対重量の高値、腎臓相対重量及び精巣相対重量の低値が認められた。

F1 雌(3週齢)の肝臓相対重量の高値、腎臓相対重量の低値が認められた。

F0 母動物の一般状態における流涎個体の出現頻度の高値、肝臓(絶対、相対)重量の高値、摂餌量の低値、F1 雌雄の体重の低値については信頼性の認められた既報告で報告されている。

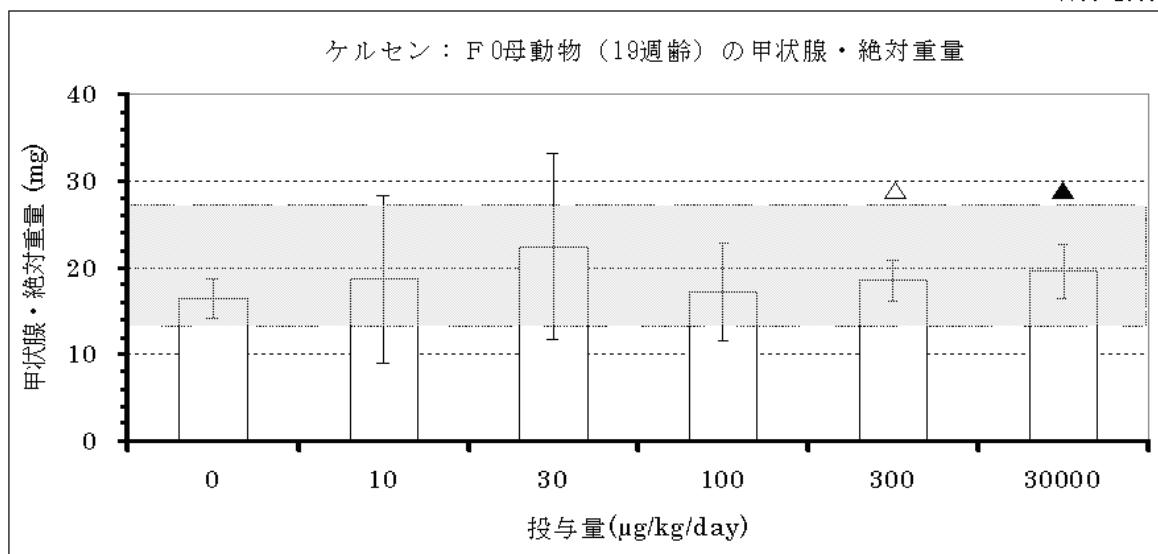
② 低用量群(10、30、100、300 μg/kg/day)における変化

F0 母動物の 300 μg/kg/day 投与群において甲状腺(絶対、相対)重量の高値(絶対重量 18.5mg、相対重量 7.39mg%)が認められたが、背景データ*(絶対重量 11.6～26.59mg、相対重量 4.1～10.95mg/%)に含まれる変化であった。

ケルセンについては投与後、甲状腺に分布するとの報告が得られており、病理組織学的検査を実施し、その結果によって評価することとする。なお、繁殖成績を含むその他の項目には有意な変化は認められなかった。

*背景データについて：ここでは、これまで環境省で実施した Wistar Hannover ラットを用いた「改良1世代試験」における対照群(被験物質無投与)の平均値の範囲を、背景データとした。

11.6-26.59

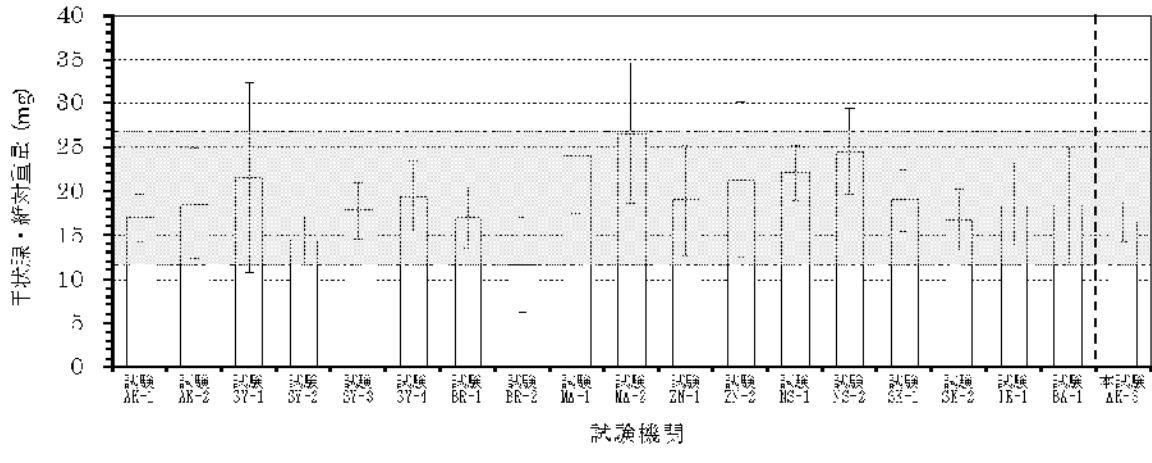


注1) ▲：統計学的に有意な高値(<0.01)

注2) △：統計学的に有意な高値(<0.05)

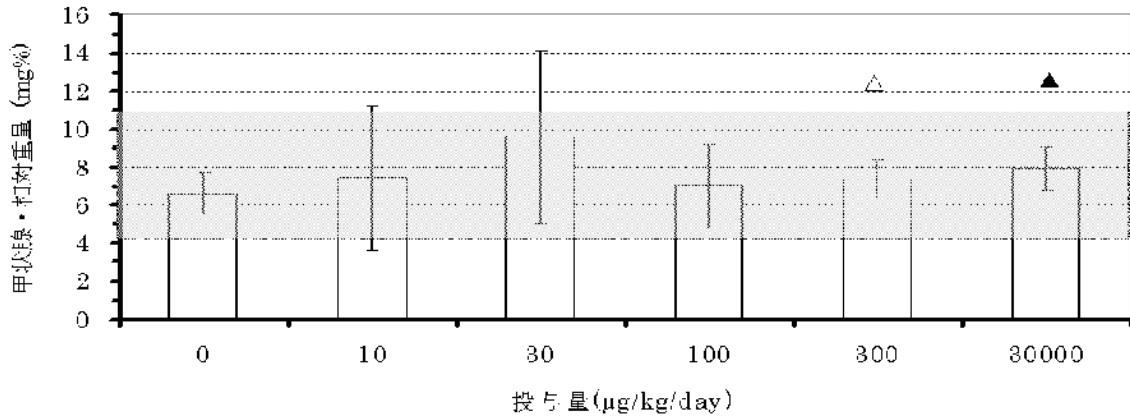
注3) 網掛部分：背景データの範囲(平均値)

試験例ごとの対照群の結果
F0母動物(哺育21日)の甲状腺・絶対重量



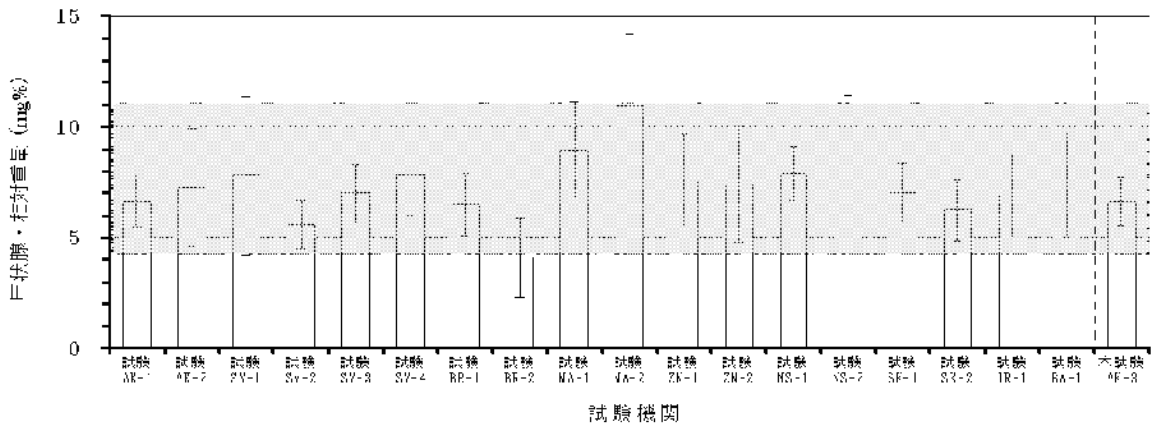
注) 網掛部分: 背景データの範囲 (平均値)

ケルセン: F0母動物(19週齢)の甲状腺・相対重量



注1) ▲: 統計学的に有意な差値 (<0.01)
 注2) △: 統計学的に有意な差値 (<0.05)
 注3) 網掛部分: 背景データの範囲 (平均値)

試験例ごとの対照群の結果
F0母動物(哺育21日)の甲状腺・相対重量



注) 網掛部分: 背景データの範囲 (平均値)

F1 雄(9週齢)の 100 μ g/kg/day 投与群において腎盂拡張個体の出現頻度の低値が認められたが、低値であり、悪影響とは考えられなかった。

なお、絶対重量及び相対重量ともに有意差の認められた変動は得られなかったものの、その一方に有意差が認められた器官(脳を除く)は以下のとおり。

*F0 母動物：30、300 μ g/kg/day 投与群において下垂体絶対重量の高値

*F0 母動物：300 μ g/kg/day 投与群において卵巣絶対重量の低値

(2) 試験管内(*in vitro*)試験

ヒトエストロゲン受容体(ER α 及びER β)結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞 E-Screen 試験、ヒト乳がん細胞アンドロゲ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)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及びTR β)酵母試験を実施中。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおりケルセンについては、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的low用量)における影響について、甲状腺の病理組織学的検査の結果を持って評価することとする。

ケルセンについては、既に農薬登録は失効しており(平成16年3月)、化学物質の審査及び製造の規則に関する法律(化審法)の第一種特定化学物質に指定されている(平成17年4月)。

プロトコール概要(ケルセン)

| 被験物質 | 試験機関 | 被験動物 | 使用動物数 | 投与方法 投与期間 | 用量設定 | 試験方法の形式 | 母動物の観察項目 | 児動物の観察項目 | 備考 |
|--|---------------------------|---|---|---|---|---|---|---|----|
| ケルセン (ジコホル) p,p'- dicofol 純度: 99.9% | 株式会社 化合物安 全性研究 所 | Wistar Hannover ラット BrlHan: WIST@Jcl (GALAS) | 購入 雄 40 匹 雌 110 匹 交尾成立 母動物 各群 13 匹 ×6 群 | 低用量域: | 0 10 30 100 300 µg/kg/day (公比約 3) | 哺育児数の調整 は行わない。 離乳児は各群 6 腹の全ての F1 児を育成児とし、 残りは全て剖検 に供する。 | 一般状態 体重測定 体重増加量 摂餌量測定 分娩および哺育行動 ☆受胎率、出産率、妊 娠期間、着床数、分 娩率 剖検、血清凍結保存、 器官重量測定 ☆脳、下垂体、甲状 腺、胸腺、肝臓、腎 臓、脾臓、副腎、卵 巣、子宮 器官保存 ☆重量測定器官の他、 膈、乳腺、肉眼的異 常部位 病理組織学的検査(必 要に応じて) | 各成育段階において 一般状態、体重測定、体重増加量、摂餌量測定 哺育児(0~21 日齢) 出産児数、性比、生存率、AGD(4 日齢)、身体発達 (耳介開展、切歯萌出、眼瞼開裂)、保存(死亡児) 21 日齢児 剖検、血清凍結保存、前立腺・子宮凍結保存 器官重量測定 ☆脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副 腎、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮 器官保存 ☆重量測定器官の他、膈、乳腺、皮膚、胸 骨、右大腿骨、脊髄、リンパ節(腸間膜、下 顎)、肉眼的異常部位 病理組織学的検査(必要に応じて) | |
| | | | | 高用量: | 30 mg/kg/day | | | | |
| | | | | コーン油に 溶解(投与容 量 1 mL/kg) 妊娠 0 日~ 哺育 20 日連 続 | 2 世代繁殖毒性試 験/催奇形性試験 /13 週間混餌投与 試験の報告から、 母動物の体重と 摂餌量、ならびに 哺育児の生存と 成長への影響が 予測される用量と する。 | | 10~12 週齢雌 性周期観察 12 または 13 週齢 剖検、血清凍結保存、前立腺・子宮凍結保存、器官重 量測定、器官保存、精子検査(精巣精子頭部数、精巣 上体精子数、運動能、形態)、病理組織学的検査(必 要に応じて) | | |

7. ペルメトリンの試験結果

(1)げっ歯類を用いた1世代試験

①最高用量(100mg/kg/day)における変化

F0 母動物の一般状態における振戦・過敏個体の出現頻度の高値が認められた。

F1 雌の下垂体(絶対、相対)重量の低値が認められた。

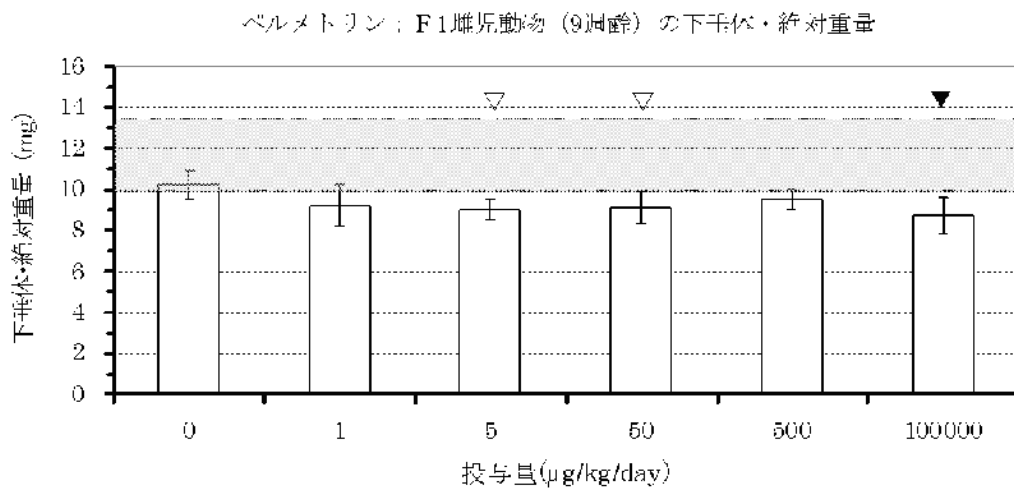
F0 母動物の一般状態における振戦・過敏個体の出現頻度の高値については信頼性の認められた既報告で報告されている。

②低用量群(0.5、5、50、500 μ g/kg/day)における変化

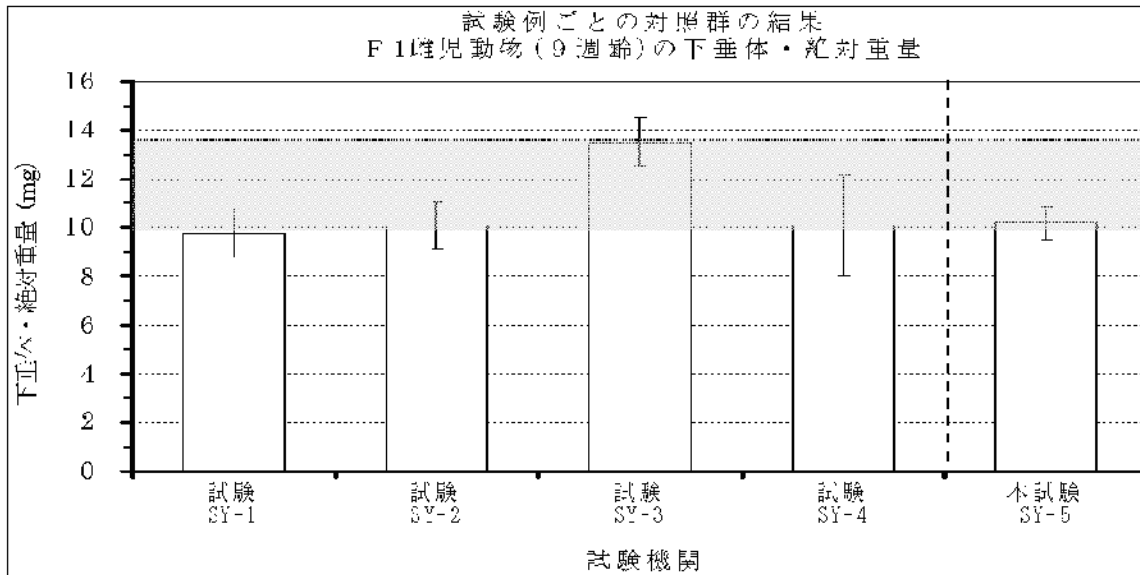
F1 雌(9週齢)の5 μ g/kg/day 投与群において下垂体(絶対、相対)重量の低値(絶対重量9.0mg、相対重量4.7mg%)が認められ、背景データ*(絶対重量9.8~13.5mg、相対重量4.8~5.5mg/%)を下回っていたが、直接投与された母動物に下垂体重量の変化は認められず、同腹兄の雄についても下垂体重量の有意な変化は認められなかった。下垂体の支配を受ける器官(体重、甲状腺、副腎、生殖器)についても、その重量に有意な変化がみられなかったことから、下垂体は、機能的な面ではペルメトリン投与の影響を受けていないと判断できる。

*背景データについて：ここでは、これまで環境省で実施したWistar Hannover ラットを用いた「改良1世代試験」における対照群(被験物質無投与)の平均値の範囲を、背景データとした。

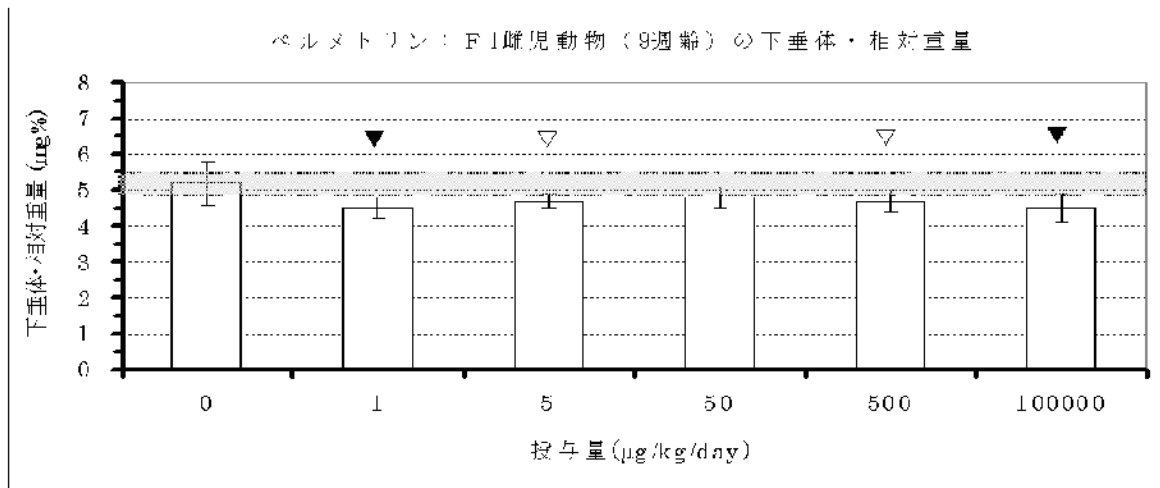
9.8-13.5



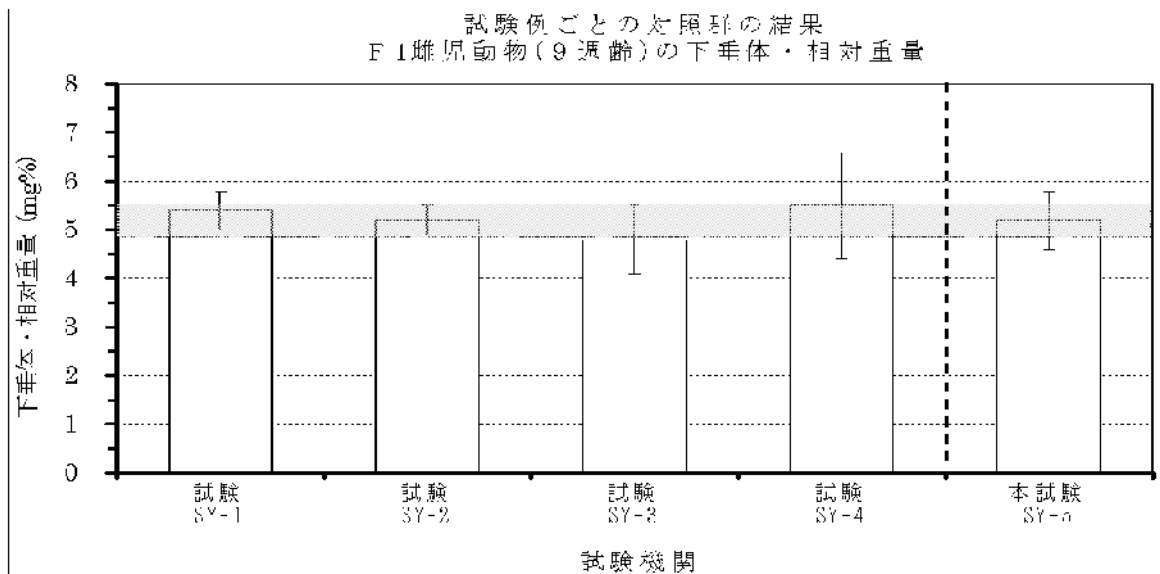
注1) ▼：統計学的に有意な低値(<0.01)
 注2) ▽：統計学的に有意な低値(<0.05)
 注3) 網掛け部分：背景データの範囲(平均値)



注) 網掛部分：背景データの範囲(平均値)



注1) ▼：統計学的に有意な低値(<0.01)
 注2) ▽：統計学的に有意な低値(<0.05)
 注3) 網掛部分：背景データの範囲(平均値)



注) 網掛部分：背景データの範囲(平均値)

なお、絶対重量及び相対重量ともに有意差の認められた変動は得られなかったものの、その一方に有意差が認められた器官(脳を除く)は以下のとおり。

*F1 雄(3週齢) : 5 μ g/kg/day 投与群において脾臓相対重量の高値

*F1 雌(9週齢) : 0.5、500 μ g/kg/day 投与群において下垂体相対重量及び 50 μ g/kg/day 投与群において下垂体絶対重量の低値

(2) 試験管内(*in vitro*)試験

ヒトエストロゲン受容体(ER α 及びER β)結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞 E-Screen 試験、ヒト乳がん細胞アンドロゲ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)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及びTR β)酵母試験を実施中。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおりペルメトリンについては、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。

また、最高用量(既報告で影響が認められた用量)においてのみ、一般毒性と考えられる影響が認められた。

ペルメトリンについては、今後、健康リスク初期評価を行う際に、今回の試験結果を参照する予定である。

プロトコール概要 (ペルメトリン)

| 被験物質 | 試験機関 | 被験動物 | 使用動物数 | 投与方法 投与期間 | 用量設定 | 投与液量 | 試験方法の形式 | 母動物の観察項目 | 児動物の観察項目 | 備考 |
|--------|------------|--|---|---|--|---|---|---|---|----|
| ペルメトリン | 食品薬品安全センター | Wistar-Hannover ラット Br1Han: WIST@Jcl(GALAS) | 購入雄50匹 雌90匹 交尾成立母動物各群14匹×6群構成 | 強制経口 コーン油に溶解(懸濁) 妊娠0日～哺育20日連続 | 低用量群 0 0.5 5 50 500 μg/kg/day 環境中濃度から算出したヒト推定暴露に近似した0.5 μg/kg/dayを最低用量とし、各用量間の公比を10とした。 | 1 mL/kg/day (cis:trans=40:60) 飼料から、ペルメトリンが3.0 μg/kg 検出された。 ↓ 飼料からの摂取量を0.5 μg/kg/dayと推定。 | 哺育児数の調整は行わない。 哺育21日に約半数腹の全児を剖検し、残り約半数腹の全児は離乳させ、継続飼育する。 | 一般状態 体重測定 摂餌量測定 分娩・哺育状態 剖検 器官重量測定 ☆脳、下垂体、甲状腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、卵巣、子宮 器官保存 ☆重量測定器官の他、膈、病変部 必要に応じて 病理組織学的検査 | 哺育児 一般観察(産児数、形態、AGD、一般状態、体重) 身体発達(耳介展開、切歯萌出、眼瞼開裂) 初期行動発達(正向反射、自由落下) 保存(死亡児、異常児) 離乳児(21日齢、半数腹の全児) 剖検 器官重量測定 ☆脳、胸腺、肝臓、脾臓、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮 器官保存 ☆重量測定器官の他、甲状腺、膈 必要に応じて 病理組織学的検査 離乳児(残り半数腹) 体重 性成熟観察(膈開口、包皮分離)、性周期観察 性成熟後剖検 器官重量の測定 ☆脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮 器官保存 ☆重量測定器官の他、膈、病変部 必要に応じて 病理組織学的検査 精子検査(運動性、形態、精子数) | |
| | | | | | 高用量群 100 mg/kg/day 雌ラットに7日間反復経口投与した結果、100 mg/kg/day以上の投与群において振戦が観察された。 | | | | | |

8. マラチオンの試験結果

(1) げっ歯類を用いた1世代試験

① 最高用量(300mg/kg/day)における変化

F0 母動物の脳内アセチルコリンエステラーゼ活性の低値が認められた。

F0 母動物の脳内アセチルコリンエステラーゼ活性の低値については信頼性の認められた既報告で報告されている。

② 低用量群(1、5、25、125 μ g/kg/day)における変化

F0 母動物(妊娠0~7日)の25 μ g/kg/dayにおいて体重増加量の低値(23g)が認められたが、妊娠0~14日、0~21日の体重増加量には有意な差は認められず、一過性の変化であると考えられた。なお、体重には有意な差は認められなかった。

F0 母動物(哺育0~21日)の5 μ g/kg/dayにおいて体重増加量の低値(35g)が認められたが、背景データ*(17~54g)の範囲内に含まれる変化であり、生理学的変動の範囲内と考えられた。なお、体重には有意な差は認められなかった。

*背景データについて：ここでは、これまで環境省で実施したWistar Hannover ラットを用いた「改良1世代試験」における対照群(被験物質無投与)の平均値の範囲を、背景データとした。

F0 母動物(哺育14~21日)の5、25、125 μ g/kg/day 投与群において摂餌量の低値(64.6、66.3、66.1g)が認められたが、背景データ*(23.2~75.2g)の範囲内に含まれる変化であり、生理学的変動の範囲内と考えられた。なお、体重には有意な差は認められなかった。

*背景データについて：ここでは、これまで環境省で実施したWistar Hannover ラットを用いた「改良1世代試験」における対照群(被験物質無投与)の平均値の範囲を、背景データとした。

なお、絶対重量及び相対重量ともに有意差の認められた変動は得られなかったものの、その一方に有意差が認められた器官(脳を除く)は以下のとおり。

*F1 雄(11週齢)：5、125 μ g/kg/day 投与群において肝臓相対重量の低値

(2) 試験管内(*in vitro*)試験

ヒトエストロゲン受容体(ER α 及びER β)結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞E-Screen試験、ヒト乳がん細胞アンドロゲ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)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及びTR β)酵母試験を実施中。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおりマラチオンについては、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。

また、最高用量(既報告で影響が認められた用量)においてのみ、一般毒性と考えられる影響が認められた。

マラチオンについては、今後、健康リスク初期評価を行う際に、今回の試験結果を参照する予定である。

プロトコール概要 (マラチオン)

| 被験物質 | 試験機関 | 被験動物 | 使用動物数 | 投与方法 投与期間 | 用量設定 | 投与量 | 試験方法の形式 | 母動物の観察項目 | 児動物の観察項目 | 備考 |
|-------|-----------|---|--|---|---|---------------------------------------|--|---|---|----|
| マラチオン | 日本生物科学研究所 | Wistar-Hanover ラット Br1Han: WIST@Jc1 (GALAS) | 購入 雄 70 匹 雌 110 匹 妊娠成立 母動物： 各群 13 匹 ×6 群 | 強制経口 コーン油 に溶解 妊娠 0 日～ 哺育 20 日 連続 | 0 1 5 25 125 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 設定理由： 飼料中に検出限界 ($2\mu\text{g}/\text{kg}$) 付近のマラチオンが含有されていたと仮定した場合、摂餌 (約 $30\text{g}/0.3\text{kg}/\text{day}$) に基づく曝露量は約 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ と算出され、ヒトにおける 1 日あたりの推定曝露量 ($0.093\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) を上回る可能性があった。よって、 $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を最低用量に設定し、公比 5 で低、中および高用量にそれぞれ 5、25 および $125\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を設定した。 最高用量 $300\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 設定理由： ラットにおける LD_{50} (経口、 $1375\sim 10000\text{mg}/\text{kg}$) と母動物の体重増加抑制、着床数、胎児数、胎児重量、脳内 AChE 活性、精子の運動性の低値が認められた用量、および投与期間を勘案して決定した。 | 1 $\text{mL}/\text{kg}/\text{day}$ | 哺育児数の調整は行わない 離乳時に 6 腹、11 週齢時に残りの腹の全動物について検査する | 一般状態 死亡の有無 体重 摂餌量 脳内 AChE 分娩及び哺育の観察 剖検および器官重量 (脳、下垂体、甲状腺 (上皮小体を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、卵巢、子宮) 肝臓凍結保存 ☆固定器官: 脳、下垂体、甲状腺 (上皮小体を含む)、胸腺、舌、気管、咽喉頭、肺 (気管支を含む)、食道、胃 (前胃+腺胃)、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、心臓、脾臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、卵巢、卵管、子宮、膈、乳腺、眼球、外涙腺、ハーダ一腺、皮膚、骨 (大腿骨+胸骨)、骨髓 (大腿骨+胸骨)、脊髄 (頸+腰膨大部)、大動脈、横隔膜、リンパ節 (腸間膜、顎下)、舌下腺、耳下腺、顎下腺、坐骨神経、骨格筋、肉眼的病変部 必要に応じて病理組織学的検査を実施 | 哺育期 (全例)： 一般状態、死亡の有無、体重、AGD (哺育 4 日)、身体発育 (切歯萌出、眼瞼開裂、耳介展開)、乳頭観察 3 週齢 (各群 6 腹の全雌雄動物)： 脳内 AChE、剖検、器官重量 (脳、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巢、子宮)、血清凍結保存 (ホルモン測定他)、肝臓凍結保存、臓器保存 (母動物と同臓器に加え、精巣、精巣上体、精囊、前立腺) 3～10 週齢 (各群 7 腹の全雌雄動物)： 一般状態、死亡の有無、体重、包皮分離 (35 日齢から)、膈開口 (21 日齢から)、性周期 (7 から 10 週齢まで) 11 週齢 (各群 7 腹の全雌雄動物)： 脳内 AChE、剖検、器官重量 (脳、下垂体、甲状腺 (上皮小体を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巢、子宮)、精子検査、血清凍結保存 (ホルモン測定他)、肝臓凍結保存、臓器保存 (母動物と同臓器に加え、精巣、精巣上体、精囊、前立腺) 必要に応じて病理組織学的検査を実施 | |

II. まとめ

平成 15 年度優先物質であるアルドリン、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、ペルメトリン及びマラチオンについて行った「げっ歯類を用いた 1 世代試験」及び「試験管内(*in vitro*)試験」の結果について取りまとめを行った。

その結果、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、ペルメトリン及びマラチオンについて、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。

また、最高用量(既報告で影響が認められた用量)においては、一般毒性と考えられる影響が認められた。

アルドリン、エンドリン、ディルドリン及びヘプタクロルについては、健康リスク初期評価が「化学物質の環境リスク評価 第 1 巻」において行われ、「健康リスクについては現時点では作業は必要ないと考えられる」と評価されている。

アルドリンについては、既に農薬登録は失効しており(昭和 50 年 2 月)、化学物質の審査及び製造の規則に関する法律(化審法)の第一種特定化学物質に指定されている(昭和 56 年 10 月)。また、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(POPs 条約)の対象物質となっている*。

エンドリンについては、既に農薬登録は失効しており(殺そ剤として昭和 48 年 6 月及び殺虫剤として昭和 50 年 12 月)、化学物質の審査及び製造の規則に関する法律(化審法)の第一種特定化学物質に指定されている(昭和 56 年 10 月)。また、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(POPs 条約)の対象物質となっている*。

ディルドリンについては、既に農薬登録は失効しており(昭和 50 年 6 月)、化学物質の審査及び製造の規則に関する法律(化審法)の第一種特定化学物質に指定されている(昭和 56 年 10 月)。また、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(POPs 条約)の対象物質となっている*。

ヘプタクロルについては、既に農薬登録は失効しており(昭和 50 年 5 月)、化学物質の審査及び製造の規則に関する法律(化審法)の第一種特定化学物質に指定されている(昭和 61 年 9 月)。また、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(POPs 条約)の対象物質となっている*。

マイレックスについては、わが国では未登録の殺虫剤であるが、既に「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(POPs 条約)の対象物質となっている*。

ペルメトリン及びマラチオンについては、今後、健康リスク初期評価を行う際に、今回の試験結果を参照する予定である。

ケルセンについては、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)における影響について、甲状腺の病理組織学的検査の結果を持って評価することとする。

ケルセンについては、既に農薬登録は失効しており(平成 16 年 3 月)、化学物質の審査及び製造の規則に関する法律(化審法)の第一種特定化学物質に指定されている(平成 17 年 4 月)。

*詳細については、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約に基づく国内実施計画」（平成17年6月）を参照。

表 哺乳類（ラット）を用いた改良1世代試験の結果

| 物質名 | 試験結果 |
|------------------|---|
| アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| アミトール | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(3用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| アルトリン | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| 塩化トリフェニルスズ | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| 塩化トリブチルスズ | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| エントリン | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| オクタクロスチレン | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| 4-t-オクチルフェノール | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| cis-クロルテン | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| ケルセン | 甲状腺の病理組織学的検査の結果を持って評価する。 |
| 2,4-ジクロロフェノール | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| デイルトリン | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| 4-ニトロトルエン | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| trans-ノナクロル | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| 4-ノニルフェノール(分岐型) | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| ビスフェノール A | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| フタル酸ジエチル | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| フタル酸ジ-2-エチルヘキシル | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| フタル酸ジシクロヘキシル | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| フタル酸ジ-n-ブチル | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(5用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| フタル酸ジプロピル | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| フタル酸ジヘキシル | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| フタル酸ジベンチル | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| フタル酸ブチルベンジル | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| β-ヘキサクロシクロヘキサシ | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| ヘキサクロベンゼン | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| ヘブタクロル | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(3用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| ヘルメトリン | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| ベンゾフェノン | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(3用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| ペンタクロロフェノール | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| マイレックス | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| マラチオン | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |

| 物質名 | 試験結果 |
|----------|---|
| p,p'-DDD | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| p,p'-DDE | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| o,p'-DDT | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |
| p,p'-DDT | 文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群で実施)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった。 |

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、メチラム及びピンクロゾリン

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低用量)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。

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低用量)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。

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

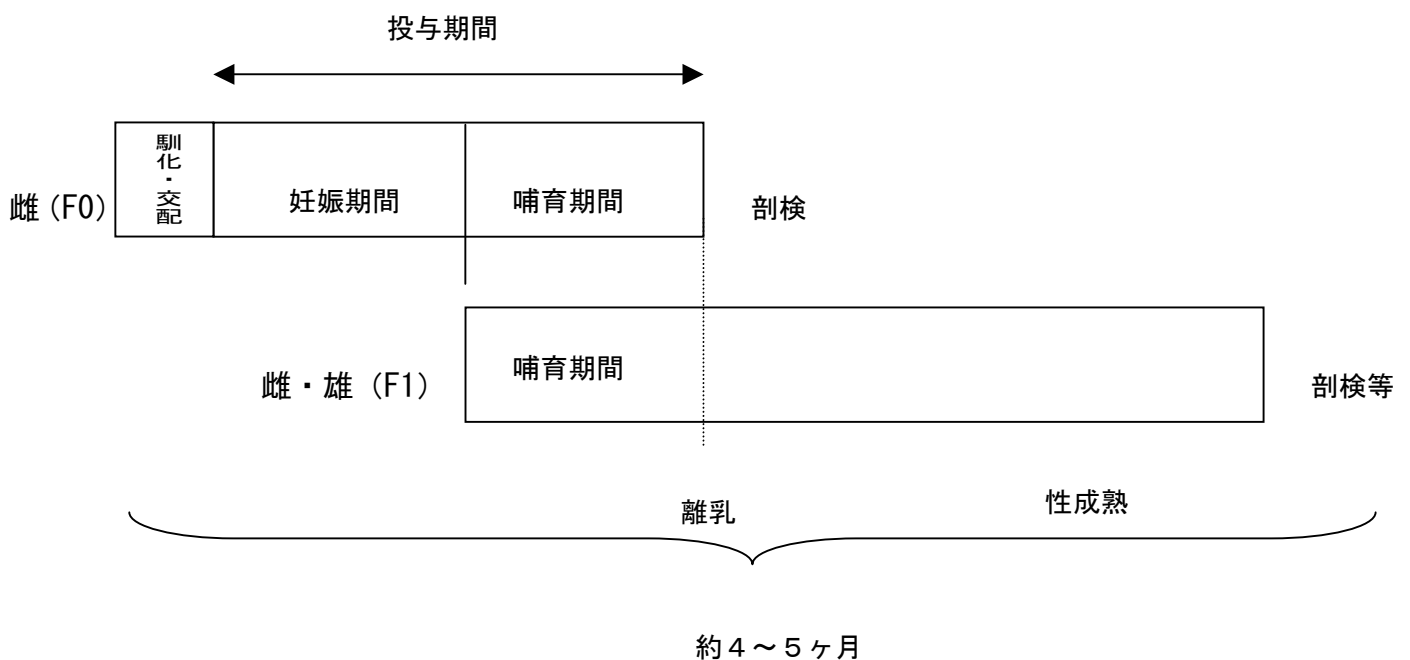
④ 平成15年度に選定した8物質*について

- 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。 |

*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) エストロゲン様作用

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、アルドリン、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
 - ・レセプター結合アッセイ
 - ・レポーター遺伝子アッセイ
 - ・E screen 等

- OECD 検証試験
 - ・子宮肥大試験
 - ・ハーシュバナー試験