

内分泌攪乱化学物質の人健康影響評価のための試験体系の概況

基本的な考え方

平成 12 年度に優先してリスク評価に取り組む 12 物質 及び平成 13 年度に優先してリスク評価に取り組む 8 物質 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 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)、 OECD を中心に各国がバリデーションとして進行中の()子宮肥大試験()ハーシュバガー試験()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、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。

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

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

有害性評価の実施状況

1. げっ歯類を用いた 1 世代試験

有害性評価結果(優先 12 物質のうち、アルキルフェノール類を除く 10 物質)については、資料 3 を参照

(1) 現在の試験実施状況等

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、アルキルフェノール類を除く 10 物質については、文献調査やその信頼性評価等を実施したのち、投与量・期間、エンドポイントを確認する等の目的で、一世代試験のパイロット試験を実施、終了。ただし、フタル酸ジ-n-ブチルについては追加試験を実施中。

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、終了。その結果を参考に一世代試験の試験系を組み立て、現在、実施中。

平成 13 年度に選定した 8 物質について

優先 8 物質について、文献調査やその信頼性評価等を実施したのち、投与量・期間、エンドポイントを確認する等の目的で、一世代試験のパイロット試験を実施中。

(2) 1世代試験のプロトコルの概要

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物質のパイロット試験

- 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低用量)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、パイロット試験であることから、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。

a-2 フタル酸ジ-n-ブチルの追加試験

原則としてパイロット試験のプロトコルを採用する。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)。パイロット試験で実施していた離乳時の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

妊娠中期～妊娠後期 妊娠7～18日

妊娠後期～哺育前期 妊娠18日～哺育5日

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; Wister Kyoto)
- イ. 飼料の種類 : Phytoestrogen-freeの飼料(NIH-07-PLD, 柯エン列酵母(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
0 0.01 0.03 0.1 0.3 1.0(μg/kg/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 :
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
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、精巢の精子頭部数等)、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。

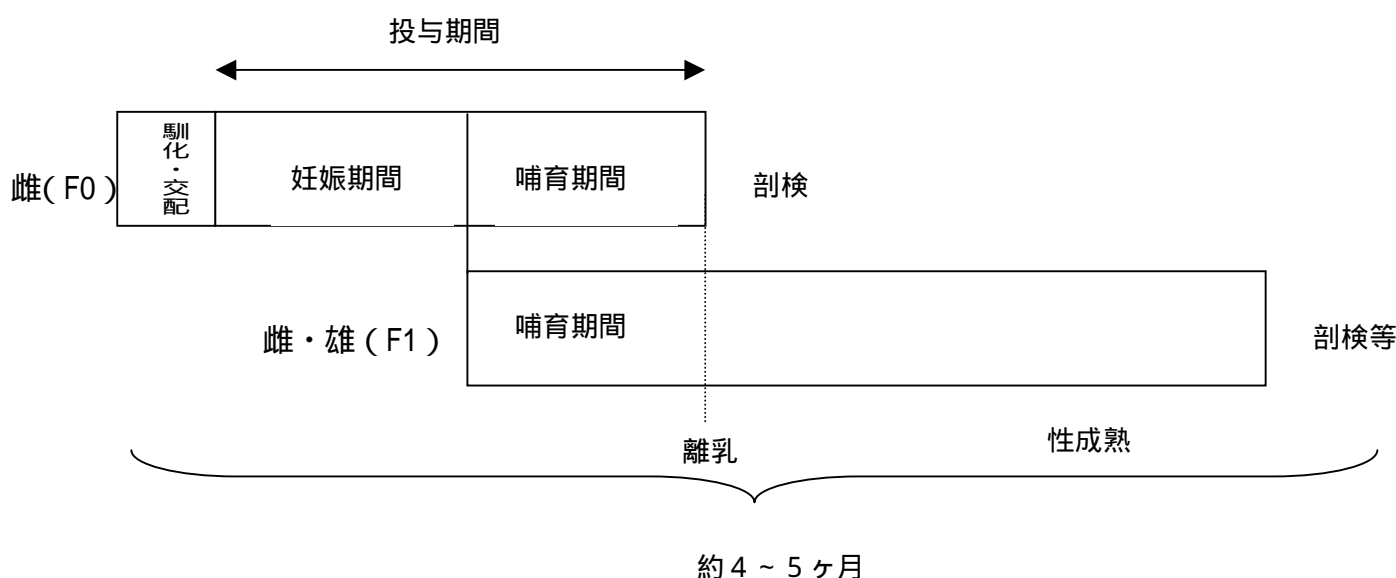
平成13年度に選定した8物質について

- 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 : 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、パイロット試験であることから、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。

なお、ビスフェノールAについては、別途、予備試験等を実施し、その結果を参考に試験の枠組みに関する総合的な検討を行う。

(3) 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。

有害性評価結果(優先12物質のうち、アルキルフェノール類を除く10物質)については、資料3を参照

(1) エストロゲン様作用

平成12年度に選定した12物質について ヒトエストロゲン受容体(ER 及び ER)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 ヒト乳がん細胞 E-screen 試験を実施、終了。

(2) アンドロゲン様作用

平成12年度に選定した12物質について 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)及び ラットアンドロゲ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年度に選定した12物質についてヒト甲状腺ホルモン受容体(TR 及び TR)

酵母試験を実施、終了。

3. その他のスクリーニング・試験法

(1) スクリーニング手法

げっ歯類による子宮肥大試験

未成熟雌ラット又は卵巣摘出した雌ラットに化学物質を投与して、エストロジェン様作用を示すかどうかを子宮重量の変化等から評価する。

経済産業省においては、優先 12 物質について、OECD のバリデーションの手法に基づき、試験を実施・終了。

げっ歯類による前立腺肥大試験(Hershberger 試験)

未成熟雄ラット又は精巣摘出した雄ラットに化学物質を投与し、アンドロジェン様作用を示すかどうかを前立腺重量や副生殖器の組織学的検査により評価する。

経済産業省においては、優先 12 物質について、OECD のバリデーションの手法に基づき、試験を実施・終了。

改訂 OECD TG407 28 日間反復経口毒性試験

28 日間毎日化学物質を投与し、内分泌攪乱作用と関連が指摘されている指標(生殖器官、精子形成状態、血中ホルモン濃度等)を評価。

現在、経済産業省、厚生労働省、農林水産省が、OECD より要請のあった被験物質について実施したバリデーションの結果を踏まえて、投与時期・投与経路等試験条件や観察項目等について検討中。

(2) 試験法の開発

DNA マイクロアレイ

化学物質による内分泌攪乱作用について詳細に評価を行うために、遺伝子レベルでの試験法の開発を行う。

平成 13 年度は、ヒト癌細胞及びマウス株化細胞に陽性対照物質を投与した際に発現した遺伝子と、ヒト正常細胞とマウス初代培養細胞に同物質を投与した際に発現した遺伝子とを比較し、共通して発現している数少ない遺伝子を発見。

また、本試験法の評価にあたっては、げっ歯類を用いた子宮肥大試験を並行して進めることにより、子宮や膣の遺伝子発現変化と組織変化との関連について評価を進め、通常組織上変化が見られない低用量において明確な遺伝子発現変化が認められた。

平成 14 年度は、これら蓄積されたデータのデータベース化を進め、WEB 上で公開を目指すとともに、標準化 DNA チップの作成に向けて、さらに細胞の種類、組織や器官などにより相違がある遺伝子を中心に検討を進める予定。

4. 評価体制

「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、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・評価を行っている。

(参考)

SPEED '98 にリストアップされている物質のリスク評価

