

平成 17 年度試験対象物質を対象とした試験の進捗状況

1. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する魚類試験

平成 17 年度試験対象物質*については、平成 17 年度第 2 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会(平成 17 年 10 月 31 日開催)において、平成 17 年度は、魚類試験体系そのものの検討を行うため、受容体結合性等の評価及び情報収集のみを行うこととしていた。

今般、平成 17 年に実施した受容体結合性試験等の結果を踏まえて、今後の試験実施について検討を行った。

*4-t-ブチルフェノール、ノニルフェノールモノエトキシレート(NP1E0)、ノニルフェノールジエトキシレート(NP2E0)及びノニルフェノキシ酢酸(NP1EC)

環境省が実施した試験において、環境中の濃度を考慮した濃度で 4-ノニルフェノール(分枝型)と 4-t-オクチルフェノールがメダカに対し内分泌かく乱作用を有することが推察されたこと、ノニルフェノールと 4-オクチルフェノール以外の国内における使用実態が認められ、環境中で検出されたアルキルフェノール類について内分泌かく乱作用を有するか否かを確認する必要があること、ノニルフェノールとオクチルフェノールは、それらの前駆物質類が界面活性剤等として使用されており、環境中で検出された前駆物質類について内分泌かく乱作用を有するか否かを確認する必要があること、により試験対象物質の候補とした。

(1) 試験内容

平成 17 年度試験対象物質について、メダカエストロジェン受容体(ER α 及び ER β)結合競合阻害試験、メダカエストロジェン受容体(ER α 及び ER β)レポータージーン試験、メダカアンドロジェン受容体(AR)レポータージーン試験及びメダカ甲状腺ホルモン受容体結合試験(TR)を行った。

(2) 試験結果

試験結果を下表に示した。

いずれの物質についても、メダカエストロジェン受容体(ER α)レポータージーン試験では、ER α に対する活性は認められたが、EC₅₀ 値は得られず、メダカエストロジェン受容体(ER β)レポータージーン試験、メダカアンドロジェン受

容体レポータージーン試験及びメダカ甲状腺ホルモン受容体結合試験においては、有意な反応は認められなかった。

メダカエストロジェン受容体(ER α 及びER β)結合競合阻害試験では、エストラジオールに対する相対結合強度は、4-t-ブチルフェノールで、約1/670(ER α)及び約1/380(ER β)であり、ノニルフェノールモノエトキシレートで、約1/380(ER α)及び約1/7,700(ER β)であり、ノニルフェノールジエトキシレートで、約1/3,300(ER α)及び約1/37,000(ER β)であり、ノニルフェノキシ酢酸で、約1/29,000(ER α)であった。ノニルフェノキシ酢酸のメダカエストロジェン受容体(ER α)結合競合阻害試験では、有意な反応は認められなかった。

	エストロジェン受容体 (%)		エストロジェン受容体 (%)		アンドロジェン受容体(%)	甲状腺ホルモン受容体(%)
	結合競合阻害試験	レポータージーン試験	結合競合阻害試験	レポータージーン試験	レポータージーン試験	結合試験
17 β -イストラジオール	100	100	100	100		
ジヒドロテストステロン					100	
3,3',5-トリオードチロン						100
4-t-ブチルフェノール	0.15	n. d.	0.26	-	-	-
ノニルフェノールモノエトキシレート	0.26	n. d.	0.013	-	-	-
ノニルフェノールジエトキシレート	0.030	n. d.	0.0027	-	-	-
ノニルフェノキシ酢酸	0.0035	n. d.	-	-	-	-
4-オクチルフェノール(OP)	16	1.3	0.83	-	-	0.00101
ノニルフェノール(分岐型)(NP)	8.1	0.35	0.83	-	-	n. d.

結合競合阻害試験では陽性対象物質の活性を100とした際の相対結合親和性(%)を、レポータージーン試験では相対遺伝子転写活性(%)を示した。

- :試験した濃度範囲で活性が認められなかった。

n. d.:活性が認められたがIC₅₀値またはEC₅₀値は得られず、相対活性が計算できなかった。

(参考)

メダカエストロジェン受容体(ER α 及びER β)結合活性の
4-ノニルフェノール(分岐型)及び4-t-オクチルフェノールとの比較

	エストロジェン受容体 (%)		エストロジェン受容体 (%)	
	結合競合阻害試験		結合競合阻害試験	
	ノニルフェノール(分岐型)	4-オクチルフェノール	ノニルフェノール(分岐型)	4-オクチルフェノール
	1	1	1	1
4-t-ブチルフェノール	1/54	1/110	1/3	1/3
ノニルフェノールモノエトキシレート	1/31	1/62	1/64	1/64
ノニルフェノールジエトキシレート	1/270	1/530	1/310	1/310
ノニルフェノキシ酢酸	1/2,300	1/4,600	-	-

(3) 情報の有無

水環境中での検出状況

環境省(庁)が実施した「平成10年度環境ホルモン緊急全国一斉調査」、
「平成11年度、平成12年度環境ホルモン全国一斉調査」、「平成13年度、平成
14年度及び平成15年度環境実態調査」における検出状況は以下のとおりであ
った。

4-t-ブチルフェノールについては、平成10年度、平成11年度、平成12年
度、平成13年、平成14年度及び平成15年度にのべ852地点で測定が行われ、
142地点で検出され(検出率17%)、濃度範囲:ND(<0.01)~1.9 μ g/Lであった。

ノニルフェノールモノエトキシレートについては、平成14年度及び平成
15年度にのべ99地点で測定が行われ、11地点で検出され(検出率11%)、濃度範
囲:ND(<0.1-0.3)~2.5 μ g/Lであった。

ノニルフェノールジエトキシレートについては、平成14年度及び平成15
年度にのべ99地点で測定が行われ、17地点で検出され(検出率17%)、濃度範
囲:ND(<0.1)~11 μ g/Lであった。

ノニルフェノキシ酢酸については、平成15年度に75地点で測定が行わ
れ、57地点で検出され(検出率76%)、濃度範囲:ND(<0.05)~2.9 μ g/Lであ
った。

影響の認められた情報の有無

4-t-ブチルフェノールについては、魚類に対する内分泌かく乱作用に関連

した報告は得られていない。

ノニルフェノールモノエトキシレート及びノニルフェノールジエトキシレートの混合物について、4.97 µg/Lにおいて、雄ニジマスの血漿ビテロジェニン濃度の高値及び精巣相対重量の低値が認められたとした信頼性のある報告が得られている(Gacら、2001)。

ノニルフェノキシ酢酸について、1 µg/Lにおいて、雌ニジマスの体重の高値及び卵巣相対重量の低値が認められたとした信頼性のある報告が得られている(Ashfieldら、1998)。

最近(平成18年3月)、BalchとMetcalfは、ノニルフェノール、ノニルフェノールモノエトキシレート及びノニルフェノキシ酢酸等について、メダカの性比、二次性徴及び生殖腺組織への影響の有無について報告している**。

その結果として、ノニルフェノールについては、8.7 µg/Lにおいて、二次性徴への影響が認められ、ノニルフェノールモノエトキシレートについては、105 µg/Lにおいて、二次性徴への影響が認められ、ノニルフェノキシ酢酸等については有意な変化は認められなかったとしている。

**Balch, G. and Metcalfe, C.(2006)Developmental effects in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to nonylphenol ethoxylates and their degradation products. Chemosphere, Vol. 62, Issue 8, p1214-1223.

(4) 今後の方針

いずれの物質も、メダカエストロジェン受容体との結合強度は、4-ノニルフェノール(分岐型)及び4-t-オクチルフェノールと比較して、弱かった。

4-t-ブチルフェノールについては、一般環境中における検出状況に関する情報が得られているが、試験を実施する際の試験濃度の設定に必要な影響の認められた信頼性のある情報が得られておらず、現時点では、影響に関する情報の収集に努めることとする。

ノニルフェノールモノエトキシレート、ノニルフェノールジエトキシレート及びノニルフェノキシ酢酸については、影響の認められた信頼性のある情報が得られているが、一般環境中における検出状況に関する情報が不足しており、今後、環境実態調査の調査対象物質として、一般環境中における検出状況に関する情報情報の収集に努めることとする。

2. 魚類試験体系の合理化についての検討

(1) ビテロジェニン(VTG)mRNA 発現量を指標としたスクリーニング試験法の検討

ビテロジェニン(VTG)mRNA 発現量を指標としたスクリーニング試験法の検討を行った。その結果、mRNA 発現量と血中ビテロジェニン濃度との間に量的相関性が認められ、暴露期間を短縮することが可能である。しかしながら、既存の VTG 産生試験で得られる最小影響濃度の近傍では、mRNA の発現により VTG 産生を検出することは困難であることが明らかとなった。したがって、化学物質を高濃度で暴露して VTG 誘導をスクリーニングする場合、mRNA 発現量を指標にした本方法が適用できると考えられた。

(2) 試験体系の合理化の検討

試験の評価項目に関するこれまで実施した SPEED'98 における魚類試験結果より得られた成果としては、曝露の指標としては、雄の肝臓中ビテロジェニンの高値が有効であること、有害性の指標としては、受精率の低値が有効であること、精巣卵などの生殖腺の組織学的検査結果は、受精率の低値とは明確な相関は認められなかったこと、が得られた。

これらの成果を踏まえ、これまで実施してきたスクリーニング試験(ビテロジェニンアッセイとパーシャルライフサイクル試験)及び有害性評価のためのフルライフサイクル試験の体系を見直すために、これまでの試験結果を比較・検討中である。

なお、試験結果の比較・検討を行うなかで、受精率の低かった世代の再生産能力の把握に関する検討を行う必要が認められた。

3. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する哺乳類試験

平成 17 年度試験対象物質*については、平成 17 年度第 2 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会(平成 17 年 10 月 31 日開催)において、平成 17 年度は、4-t-ブチルフェノールについて、ラットにおける影響の信頼性が認められた報告が得られたことから、ラットを用いた改良 1 世代試験を実施することとしていた。また、試験用量については、NOEL が算定できるような曝露濃度群の設定を行うこととしていた。

(1) 試験内容

動物の種類：ラット(クローズドコロニー；Wistar Hannover)

飼料の種類：実験動物用固型飼料(CE2、日本ケア(株)、自由摂取)

用量：1 μ g/kg/day、60 μ g/kg/day、20 mg/kg/day、60 mg/kg/day、200 mg/kg/day (環境中における最大検出濃度から推定した曝露量 0.9 μ g/kg/day 及び OECD が実施したラットを用いた反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験結果から設定した)

投与経路：強制経口投与(1 μ g/kg/day 群及び 60 μ g/kg/day 群)及び混餌投与(300 ppm 群、1000 ppm 群及び 3000 ppm 群、それぞれ 20 mg/kg/day、60 mg/kg/day 及び 200 mg/kg/day に相当)

1 群あたりの動物数：妊娠動物として 12 匹/群

試験期間：馴化・交配期間を含め 17 週程度(約 120 日)

投与期間：妊娠 0 日～哺育 21 日

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

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) 実施状況

平成 18 年 3 月に試験を開始し、現在、離乳後 F1 の飼育中で、8 月に終了予定。

平成 18 年 4 月 1 日に交配開始。

平成 18 年 4 月 24 日に F1 児の出産開始。

平成 18 年 5 月 15 日に F1 児の離乳開始(母動物の剖検)。

平成 18 年 6 月 22 日に F1 児について 56 日齢の体重測定終了。

(参考) 1世代試験の概略図

