

## 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の試験方法に関する一考察

環境省環境保健部環境安全課

化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験方法については、「内分泌攪乱化学物質問題検討会」のもとに設置された「内分泌攪乱作用が疑われる化学物質のリスク評価検討会」（内分泌攪乱化学物質問題検討会のための試験結果の評価案等の作成を目的とした検討会）及びそのなかの「内分泌攪乱化学物質の生態影響に関する試験法開発検討会」と「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」において助言・評価が行われている。これまでの試験結果を踏まえ、今後の試験方法について、魚類を用いた試験方法に関しては、平成 16 年 10 月 19 日に、ほ乳類を用いた試験方法に関しては、平成 16 年 9 月 21 日及び 11 月 5 日に課題の抽出及び対応案についての議論が行われた。議論の内容を踏まえた現時点での環境省の対応案は以下のとおりである。

### 1. 生態系への影響評価のための魚類を用いた試験

#### (1) これまでの試験方法

メダカを用いて、いずれもわが国において開発した、ビテロジェニンアッセイおよびパーシャルライフサイクル試験を実施し、必要に応じてフルライフサイクル試験を追加実施した。試験濃度設定等、試験方法の詳細については、被験物質ごとに専門家の意見を踏まえ、その都度選定した。試験濃度の設定にあたっては、被験物質の環境中の濃度、既存の毒性情報、物性情報を参考とした。

なお、今回実施した試験法は、OECD に設置された内分泌かく乱作用に関する魚類試験法のテストガイドライン作成グループへ報告している。

#### (2) これまでの試験結果

26 物質で試験を実施した結果、環境中の濃度を考慮した試験濃度で 4-ノニルフェノール（分岐型）と 4-t-オクチルフェノールでメダカに対し内分泌かく乱作用を有することが強く推察され、またビスフェノール A でも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。21 物質については、明らかな内分泌かく乱作用は認められないと判断した。なお、*o,p'*-DDT 及び *p,p'*-DDE についてはビテロジェニンアッセイ及びパーシャルライフ

サイクル試験の結果をもとに、フルライフサイクル試験の実施を検討中。試験結果は、表 1 のとおりである。

なお、これまでの試験結果に関しては、OECD に設置された内分泌かく乱作用に関する魚類試験法のテストガイドライン作成グループへ報告している。

### ( 3 ) 抽出された主な課題

実験動物として基礎的知見の集積が進んでいるメダカにおいても、さらに結果を評価するための関連知見の収集が必要であることや、ビテロジェニンアッセイ及びパーシャルライフサイクル試験の実施に 1 ヶ年、さらに、必要となった場合にフルライフサイクル試験の実施に 1 ヶ年を要することから、試験期間の短縮等の効率化を図ること等が課題として挙げられた。

### ( 4 ) 今後の対応案

今後の試験では、試験結果から得られる情報と必要な試験期間を勘案し、効率化を念頭に置いた試験体系について改めて検討する。

## 2 . ヒト健康への影響評価のためのほ乳類を用いた試験

### ( 1 ) これまでの試験方法

ラットを用いて、わが国において開発した改良 1 世代試験を実施した。試験方法の詳細については、被験物質ごとに専門家の意見を踏まえ、その都度方法を選定した。試験にあたっては、被験物質の環境中の濃度、ヒトの推定暴露量、既存の毒性情報、物性情報をもとに試験用量及び観察項目の設定を行った。試験用量の設定にあたっては、ヒトが暴露する用量レベルにおいて何らかの反応や非用量相関的な反応があった場合に検出することをめざして、敢えて従来型のリスク評価を目的とせず、ヒト推定暴露量を考慮した用量に原則 4 群、何らかの有害影響が既に報告されている用量に原則 1 群を設定した。

### ( 2 ) これまでの試験結果

22 物質で試験を実施した結果、いずれの物質でもヒト推定暴露量を考慮した用量では明らかな内分泌かく乱作用は認められないと判断した。試験結果は、表 2 のとおりである。

### ( 3 ) 抽出された主な課題

動物試験であるからには、飼料や飲水を試験動物に与えることになる。飼料中には、完全に除去することはできず、定量に制御することもできない物質

(例えば、植物由来のエストロジェン様作用を持つ物質やフタル酸エステル類など)が存在する(表3)。このような条件下では、現実的には何らかの作用を有する物質の暴露量がゼロであるような対照群を設定することはできない。例えば、被験物質のヒト推定暴露量を考慮した用量レベルにおけるエストロジェン様作用を検出しようとした場合、対照群の動物も植物由来などのエストロジェン様作用を持つ物質を既に摂取している。このため、試験ごとの対照群を集めて群間で観察結果(卵巣重量や子宮重量など)を比較してみると、大きなバラツキがみられる(図1、2)。ある試験で、その試験における対照群とヒト推定暴露量を考慮した用量を投与した群との間に有意な差が認められたとしても、全試験での対照群間のバラツキの範囲内に含まれてしまう可能性がある。

ヒト推定暴露量を考慮した用量レベルにおいて、今回実施した試験法を超えて、さらに精密に変化を捉え、その結果を持って対照群と比較できたとしても、さらに精密に評価することには限界があることが明らかになった。

なお、植物由来のエストロジェン様作用を持つ物質を極力減らした餌が開発されているが、そのような餌を使用した試験の結果をヒトへの影響へ外挿することについては、議論があるところである。

) エストロジェン様作用に関する *in vitro* 試験(試験管内試験)と *in vivo* 試験(動物試験)結果の相関に関しては、試験結果の一致率は現時点では 41~88%にすぎない\*。

\*経済産業省(2004)化学物質審議会管理部会・審査部会、平成16年度第1回内分泌かく乱作用検討小委員会、資料3(平成16年7月22日開催)

<http://www.meti.go.jp/committee/materials/g40722aj.html>

#### (4) 今後の対応案

)これまで、試験用量の設定にあたっては、ヒトが暴露する可能性がある用量範囲に特化していた。今後、当面は、各種の毒性評価の手法も参考とし、ヒトが暴露する可能性がある用量から、何らかの有害影響が既に報告されている用量までを包含することによって、限られた群設定のなかでも有害性評価に資する知見が得られるような用量設定方法を検討する。

)これまで、試験管内試験(*in vitro* 試験)の結果は、動物試験(*in vivo* 試験)の結果の解釈及び作用メカニズムの推定のための資料として用いてきた。*in vitro* 試験は短期間に低コストで安定した結果を得ることや特異的な作用メカニズムの解明に資する知見を得ることができるが、*in vivo* 試験の結果との一致性、生体レベルでのメカニズムの解明が十分でない現時点においては、これのみによって被験物質の評価を行うことや、スクリーニングを行うことは適当ではない。これに対し、*in vivo* 試験は広範なメカニズムを評価できる点、全

内分泌系及びそれ以外の毒性学的評価項目に対し包括的な評価が行える点、化学物質の吸収・体内分布・代謝・排泄が考慮される点、毒性試験として一般的に数十年にわたって使用されてきた点などから、今後も被験物質の評価は動物試験(*in vivo* 試験)の結果を用いて行うこととする。

表 1 生態系への影響評価のための魚類を用いた試験結果

(1) 平成 12 年度検討物質

物質名	試験結果
33.塩化トリブチルスズ	明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
34.塩化トリフェニルスズ	明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
36.4-ニルフェノール(分岐型)	魚類の女性ホルモン受容体との結合性が強く、肝臓中ピテロジェニン(卵黄タンパク前駆体)濃度の上昇、精巣卵の出現、受精率の低下が認められ、魚類に対して内分泌攪乱作用を有することが強く推察された。
36.4-t-オキシルフェノール	魚類の女性ホルモン受容体との結合性が強く、肝臓中ピテロジェニン(卵黄タンパク前駆体)濃度の上昇、精巣卵の出現、産卵数・受精率の低下が認められ、魚類に対して内分泌攪乱作用を有することが強く推察された。
38.フタル酸ジ-n-ブチル	頻度は低いものの、精巣卵の出現が確認されたが、受精率に悪影響を与えるとは考えられず、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
39.フタル酸ジベンジル	明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
40.フタル酸ジ-n-ブチル	頻度は低いものの、精巣卵の出現が確認されたが、受精率に悪影響を与えるとは考えられず、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
41.フタル酸ジシロキシル	頻度は低いものの、精巣卵の出現が確認されたが、受精率に悪影響を与えるとは考えられず、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
42.フタル酸ジエチル	明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
45.アジピン酸ジ-n-ブチル	頻度は低いものの、精巣卵の出現が確認されたが、受精率に悪影響を与えるとは考えられず、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
46.ベンゾフェノン	頻度は低いものの、精巣卵の出現が確認されたが、受精率に悪影響を与えるとは考えられず、文献情報等により得られた魚類推定曝露量を考慮した比較的低濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
48.オクタクロシリン	明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

( 2 ) 平成 13 年度検討物質

物質名	試験結果
5. $\alpha$ -ノブクロフェノール	明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
8. アミトロール	明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
37. ビスフェノール A	魚類の女性ホルモン受容体との結合性が弱いながらも認められ、肝臓中ビテロジェニン(卵黄タンパク前駆体)濃度の上昇、精巣卵の出現、孵化日数の高値(遅延)が認められ、魚類に対して内分泌攪乱作用を有することが推察された。
44. 2,4-ジクロロフェノール	明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
47. 4-ニトロトルエン	頻度は低いものの、精巣卵の出現が確認されたが、受精率に悪影響を与えるとは考えられず、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
63. フタル酸ジヘキシル	明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
64. フタル酸ジヘキシル	明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
65. フタル酸ジプロピル	明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

( 3 ) 平成 14 年度検討物質

物質名	試験結果
4. $\alpha$ -サリチルベンゼン	頻度は低いものの、精巣卵の出現が確認されたが、受精率に悪影響を与えるとは考えられず、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
12. $\alpha$ -サリチルシクロヘキサ	頻度は低いものの、精巣卵の出現が確認されたが、受精率に悪影響を与えるとは考えられず、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
14. cis-ケルデン	ビテロジェニン産生試験及び $\beta$ -シャルライサイクル試験を実施中
16. trans-ノカロール	ビテロジェニン産生試験及び $\beta$ -シャルライサイクル試験を実施中
18. p,p'-D D T	明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
18. o,p'-D D T	シャルライサイクル試験を実施する予定
19. p,p'-D D E	シャルライサイクル試験を実施する予定
19. p,p'-D D D	頻度は低いものの、精巣卵の出現が確認されたが、受精率に悪影響を与えるとは考えられず、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

表 2 ヒト健康への影響評価のためのほ乳類を用いた試験結果

(1) 平成 12 年度検討物質

物質名	試験結果
33.塩化トリブフェルス*	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
34.塩化トリフェルス*	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
36.4-ニルフェノール(分岐型)	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
36.4-t-オキルフェノール	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。
38.フタル酸ジ-2-イソヘキシル	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
39.フタル酸ジフェニル	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
40.フタル酸ジ-n-ブチル	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
41.フタル酸ジシロヘキシル	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。

物質名	試験結果
42.フタル酸ジエチル	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
45.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人推定曝露量を考慮した比較的低濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
46.ベンゾフェノン	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
48.オクタジオキシリン	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。

## (2) 平成13年度検討物質

物質名	試験結果
5.ペンタクロフェノール	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
8.アミトロール	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
37.ビスフェノールA	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。

物質名	試験結果
44.2,4-ジクロフェノール	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
47.4-ニトロトルエン	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
63.フタル酸ジベンジル	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
64.フタル酸ジヘキシル	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
65.フタル酸ジプロピル	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。

(3) 平成14年度検討物質

物質名	試験結果
4. $\alpha$ -DDE	1世代試験を実施中
12. $\beta$ -DDE	1世代試験を実施中
14. cis-DDE	1世代試験を実施中
16. trans-DDE	1世代試験を実施中
18. p,p'-DDT	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。
18. o,p'-DDT	1世代試験を実施中
19. p,p'-DDE	1世代試験を実施中
19. p,p'-DDD	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濃度での明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、既報告で影響が認められた濃度では、一般毒性と考えられる影響が認められた。

表3 試験に用いたラットの餌<sup>1)</sup>の分析結果

n=7

測定項目		最低値 mg/kg	最高値 mg/kg	平均値 mg/kg
植物エストロゲン	ダイジン	62	120	101.7
	ダイゼイン	ND(5)	19	6.3
	ゲニスチン	83	170	135.9
	ゲニステイン	ND(5)	32	8.3
	クメステロール	ND(1)	5	2.7
	合計	195	302.5	254.9
被験物質	フタル酸ジ <sup>o</sup> -2-イソヘキシル	0.13	0.38	0.27
	フタル酸ジ <sup>o</sup> -n-ブチル	ND(0.025)	0.055	0.021(0.025)
	フタル酸ジ <sup>o</sup> フェニル	ND(0.01)	0.011	0.007(0.01)
	ニルフェノール	ND(0.015)	0.022	0.014(0.015)
	p,p'-DDD	ND(0.00005)	0.00017	0.0001
	p,p'-DDT	ND(0.00005)	0.00008	0.00005

財団法人日本食品分析センター調

1) CE-2、日本クレア(株)製

2) NDは非検出。( )内の値はその際の検出下限値を指す。また、平均値算出に際してNDの場合は、( )の値は検出下限値の1/2の値を使用した。

3) 以下の物質は全ての測定例で検出されなかった。( )内はその際の検出下限値を指す。: フタル酸ジ<sup>o</sup>イソヘキシル(0.01)、フタル酸ジ<sup>o</sup>プロピル(0.01)、フタル酸ジ<sup>o</sup>-n-ペンチル(0.01)、フタル酸ジ<sup>o</sup>-n-ヘキシル(0.01)、フタル酸ジ<sup>o</sup>シクロヘキシル(0.01)、アジピン酸ジ<sup>o</sup>-2-イソヘキシル(0.01)、塩化トリブチルスズ(0.005)、塩化トリフェニルスズ(0.005)、ヘンゾフェノン(0.001)、オクタクロスチレン(0.05)、4-t-オクチルフェノール(0.005)、ペンタクロフェノール(0.005)、アミトロール(0.01)、ビスフェノールA(0.005)、2,4-ジクロロフェノール(0.005)、4-ニトロトルエン(0.001)、o,p'-DDT(0.00005)

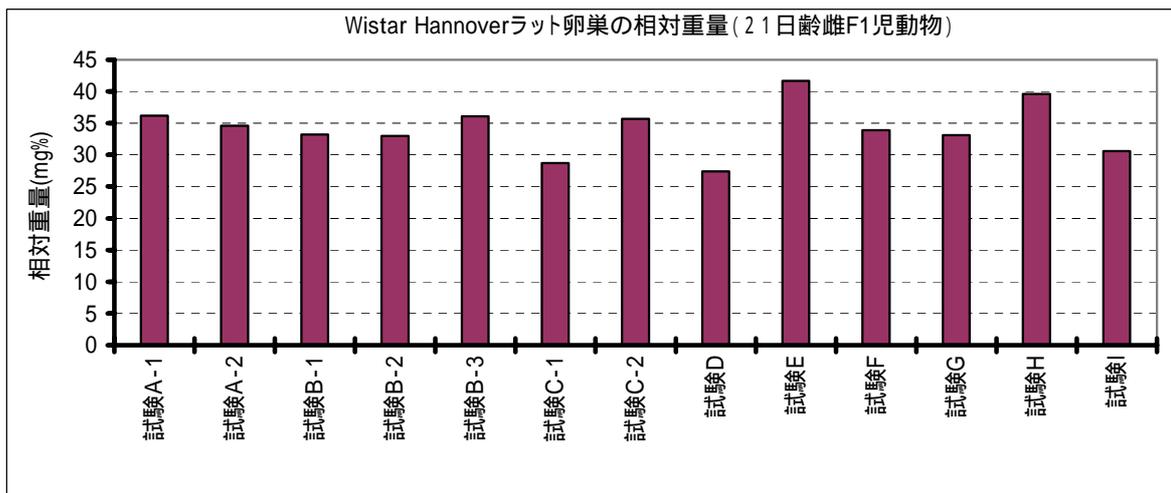
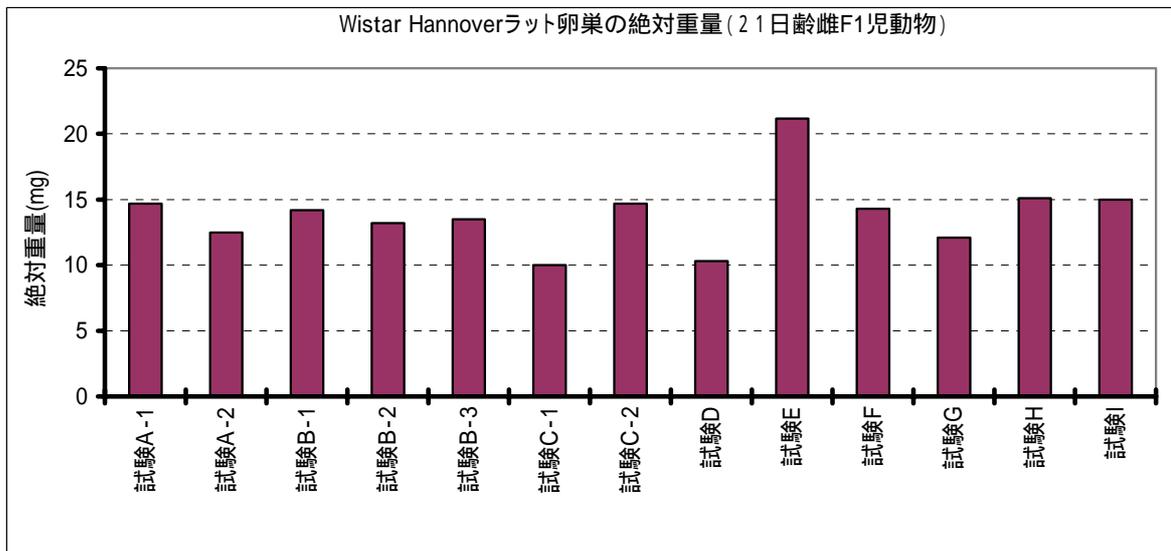


図1. 試験例ごとの対照群のF1児動物の卵巣の絶対重量と相対重量

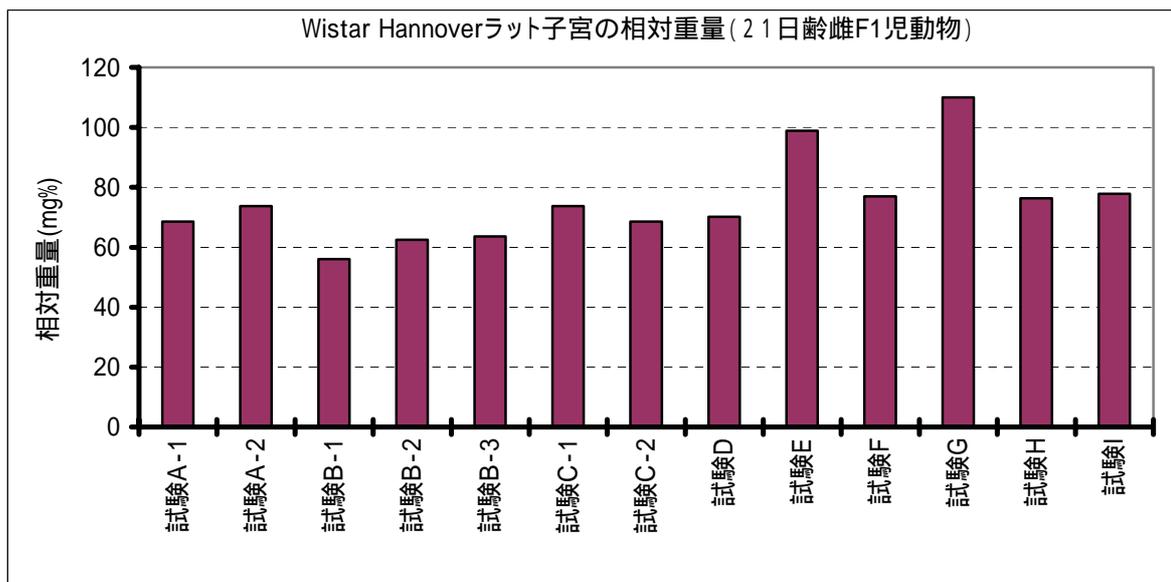
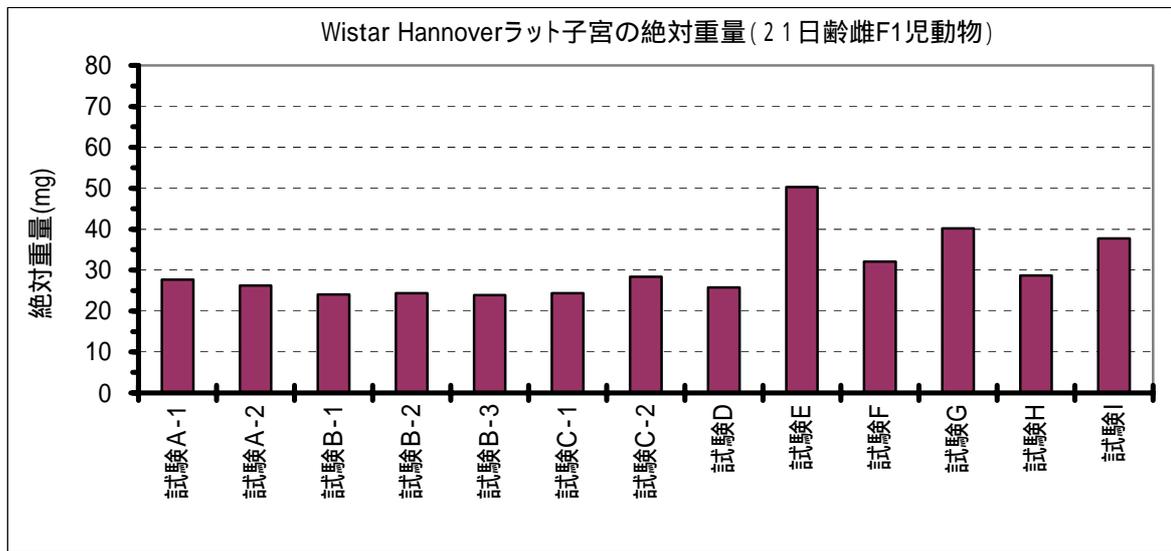


図2 . 試験例ごとの対照群の F1 児動物の子宮の絶対重量と相対重量