

EXTEND (2010、2016及び2022)における各種試験結果について

日本エヌ・ユー・エス株式会社

シニアアドバイザー 川嶋之雄

本報告は、環境省請負業務の「化学物質の内分泌かく乱作用に関する総合的調査・研究業務」に事務局として参画した川嶋個人の責任において各種試験結果に関する内容についてまとめたものであり、すべて公表資料を参照しています。

皆さん、こんにちは。日本エヌ・ユー・エスで今はシニアアドバイザーという職務を果たしています川嶋と申します。

私、冒頭に井口先生が環境省の取組について御紹介いただきまして、SPEED'98というのが1998年から始まっているということで、私はその1年後の1999年からこの環境省の内分泌かく乱化学物質に関するプログラムに事務局として参画してまいりました。それもあって、このEXTENDにおける各種試験結果について、枠組みについては今、山崎様からお話もありましたし、井口先生、山本先生からもお話があったと思いますが、今回は物質に注目して若干の説明を加えられればと思っています。

なお書きですが、本報告は、環境省請負業務の「化学物質の内分泌かく乱作用に関する総合的調査・研究業務」の事務局として参画した私個人の責任において公表資料を参照して行うものでございます。

目次

1. EXTENDにおける取組み
2. 各種試験法について
3. 第2段階生物試験を実施した8物質の試験結果について
4. 第1段階と第2段階の生物試験結果の比較について

2

本日の目次ですが、繰り返しになりますが、EXTENDにおける取組というのをどうやっているんだ、それから各種試験法としてはどうなっているんだと。それから、先ほど申しましたように物質に特化ということなので、山崎様からありましたように、第1段階と第2段階の生物試験について確定試験として第2段階の生物試験を実施している8物質の試験結果に注目して、さらには第1段階と第2段階の生物試験の比較についてもお話しようかと思っています。

1. 1. EXTENDにおける物質の評価の考え方(1)

■ 評価の対象生物

- ・ 水生生物：魚類、両生類及び無脊椎動物

■ 評価対象とする影響

- ・ 生殖に及ぼす影響：エストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用、アンドロゲン様作用及び抗アンドロゲン様作用
- ・ 発達（変態等）に及ぼす影響：甲状腺ホルモン様作用及び抗甲状腺ホルモン様作用
- ・ 成長に及ぼす影響：幼若ホルモン様作用及び脱皮ホルモン様作用

3

これも山崎様からお話がありましたが、この EXTEND ではなかなかヒト健康まで手が出していないというか、水生生物・魚類、両生類及び無脊椎動物に特化して評価の対象生物としています。

生殖に及ぼす影響、主にステロイドホルモン関係の影響になります。それから、発達に及ぼす影響といって甲状腺ホルモン系、あと成長ということで幼若ホルモンや脱皮ホルモンといったものを対象としています。

これら以外の作用について手を広げるかどうかというのは議論があるかと思います。欧米では肥満といったものとか糖尿病にも手を広げているようですが、さて魚類、両生類、無脊椎動物の肥満とか糖尿病はどうやるのかなというところも手の広げようの方向がまだ検討中ということでございます。

1. 1. EXTENDにおける物質の評価の考え方(2)

■ 検討対象物質の選定

- ・ 環境リスクが懸念される物質を効果的に抽出する目的
→原則として国内の環境調査で検出された物質等を母集団とする。

- 化学物質環境実態調査(平成8年度以降の調査結果を対象とする)において検出された物質(群)
- 公共用水域水質測定の「環境基準項目」(平成12年度以降を対象とする)及び「要監視項目」(平成6年度以降を対象とする)として検出された項目
- 要調査項目等存在状況調査(平成11年度以降の調査結果を対象とする)において検出された物質(群)
- 農薬残留対策総合調査(平成15年度以降の調査結果を対象とする)において検出された物質(群)
- PRTR対象物質(群)
- 米国環境保護庁(US EPA)のEDSP (Endocrine Disruptor Screening Program)、欧州化学物質庁(ECHA: European Chemicals Agency)の内分泌かく乱性(Endocrine disrupting properties)を根拠とする高懸念物質 (SVHC: Substances of Very High Concern) 等での検討対象となった物質 (群)
- 専門家から提案された物質 (群)

- ・ 有害性に着目して既存知見を整理し、内分泌かく乱作用との関連性が認められる物質を抽出する(信頼性評価)。

4

まず一番力を入れていますのが、母集団を決めて検討対象物質を選定していく。井口先生も言及されておりましたが、俗にいう「ハゲタカ論文」とまでは言い切れないかとは思いますが、再現性に乏しい報告というのが結構あって、それらは極力排除して再現性が認められるような報告を抽出する。そこで記載された作用について確定していくという作業を行っています。それが山崎様から「見づらい」というディシジョンツリーになっています。

1. 1. EXTENDにおける物質の評価の考え方(3)

■ 試験の実施と有害性評価

- ・ 2段階の試験・評価の枠組みを構築した
- ・ 第1段階として、まず試験管内試験(*in vitro*試験)を実施し、その結果等を踏まえて短期の生物試験(*in vivo*試験)を優先的に実施すべき物質を抽出する。
- ・ 第1段階の試験管内試験結果及び生物試験結果を評価し、第2段階の長期の生物試験(確定試験)を優先的に実施すべき物質を抽出する。
- ・ **このような枠組みを策定し、物質の評価を行い、その結果を公表しているのは、現時点では日本(EXTEND)と米国(EDSP)のみ。**

5

評価の考え方としては2段階の試験・評価。第1段階として試験管内試験。その結果や既存知見を踏まえて短期の生物試験を優先的に実施すべき物質を抽出して、その第1段階の試験管内と生物試験の結果を評価して第2段階の長期の生物試験（確定試験）を優先的に実施すべき物質を抽出すると。

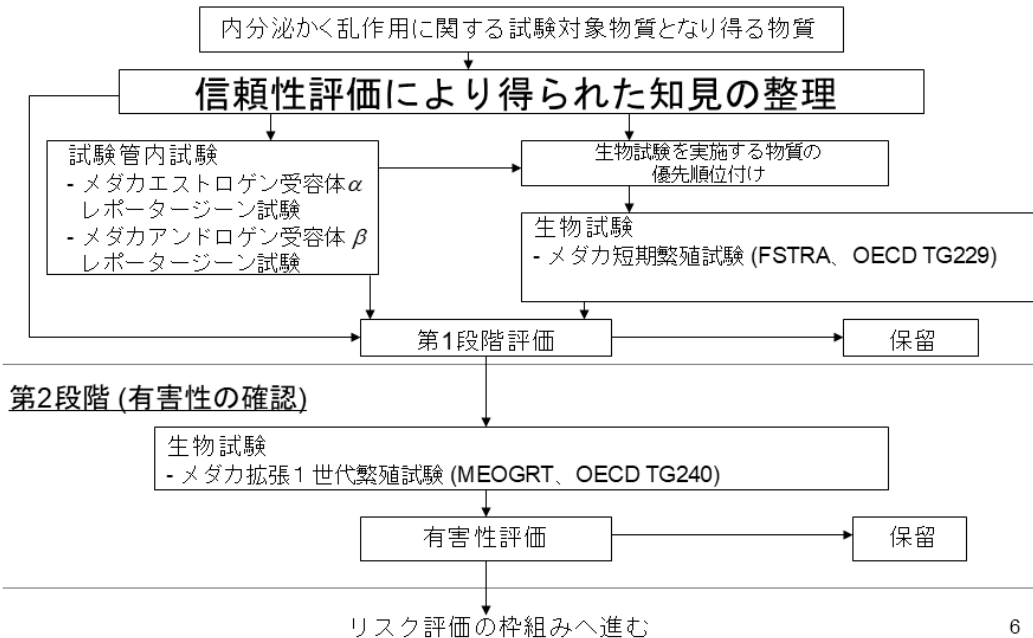
このような枠組みを策定して物質の評価を行い、その結果を公表しているのは、現時点では日本のEXTENDとアメリカEPAのEDSPというプログラムのみであります。

欧州は、先ほど山崎様からありましたように動物愛護、これは山本先生も言及されていますね。動物愛護の観点から、なかなか生物を使った試験の実施というのは積極的には行わない。米国の立場はできるだけ試験生物を減らしていったって、必要な試験は行うというような立場をとっているようです。ですが、動物愛護が非常に強い欧州と動物愛護を念頭に置いている米国とあまり配慮していない日本ということで、それは裏返すと日本の成果、先ほど山崎様が英語での発信ということも言及されていましたが、日本がせっかく予算もかけて行った試験ですから、積極的に海外に発信していったって、その結果を利用させていただくという役目を担っているのだなというふうに思っています。

1. 2. 内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み

生殖に及ぼす影響 (エストロゲン様作用、抗エストロゲン作用、アンドロゲン様作用、等)

第 1 段階 (内分泌に対する作用の有無を確認)



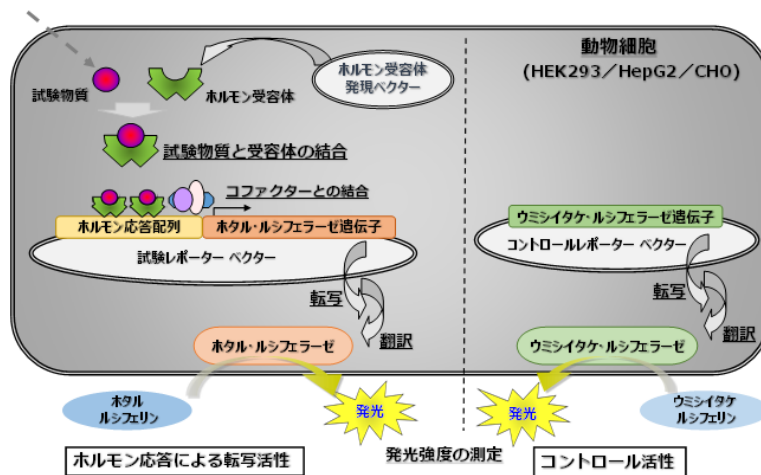
6

今回は MEOGRT という確定試験ですね。この「第 2 段階 (有害性の確認)」と書いてありますが、この試験を行ったのが全部エストロゲン様作用または抗エストロゲン作用を見る試験ですので、このような流れになっていますが、ここで注目していただきたいのは、試験管内試験もメダカのエストロゲンやアンドロゲンの受容体を使う。それから、短期の生物試験もメダカを使う。それから、長期の第 2 段階試験もメダカを使うと。この辺に生物種を限定して、そこでそれぞれの結果の比較ができるようにするというところにこだわを持っている枠組みになっております。

2. 各種試験法について

第1段階試験管内試験

メダカエストロゲン受容体 α 及びアンドロゲン受容体 β を用いるレポーター遺伝試験の概要



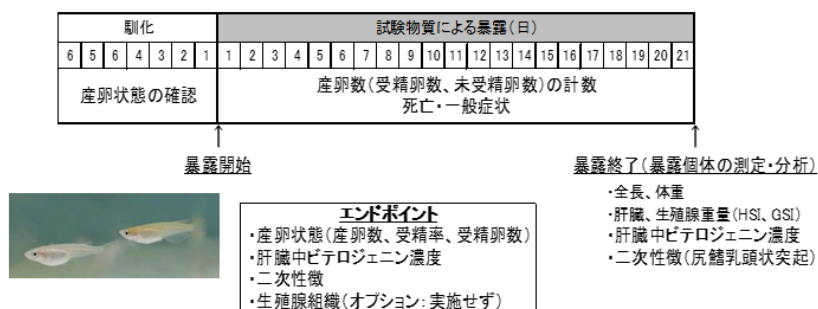
7

各種試験法に移りますが、第1段階の試験管内試験はメダカエストロゲン受容体 α 及びアンドロゲン受容体 β を用いたレポーター遺伝試験といって、試験物質が細胞にばく露されますと、受容体と結合して、そこで反応が起きますとレポーター遺伝ベクターといったもので転写で蛋白が作られて、そこで発光が起きるといったことで、その発光の強度を目安として例えばエストロゲン作用であればその物質はどれぐらい強さがあるか、また、EC50と言われる指標となるような濃度が分かるといった試験になります。

第1段階生物試験のうちOECD TG 229 Medakaの概要

メダカを用いた魚類短期繁殖試験法（FSTRA）

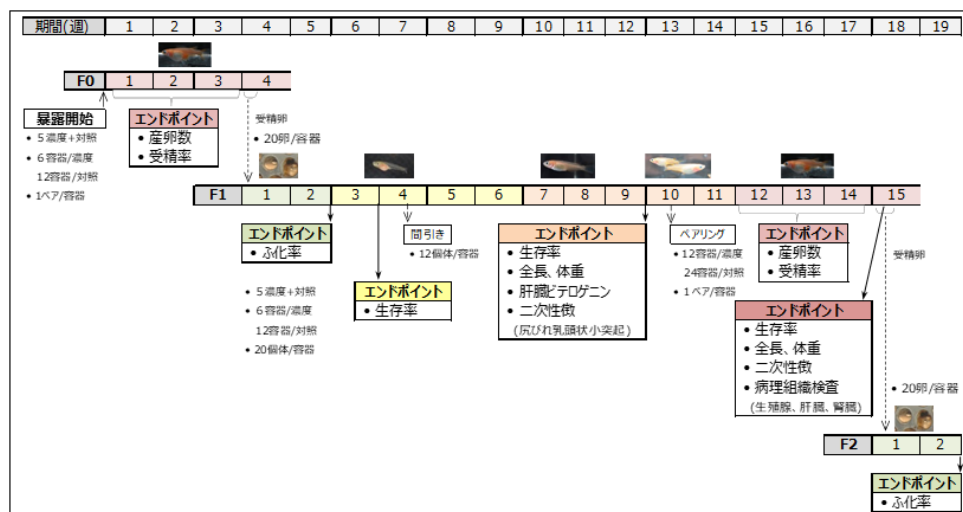
魚類短期繁殖試験(OECD TG229)は、成熟したメダカを雌雄混合で試験対象物質に21日間ばく露し、ばく露期間中の産卵状況並びにばく露終了時の生存個体の肝臓中ピテロジェニン濃度及び二次性徴を調べる試験法である。



8

それから、基本的に OECD TG229 というのは、最初はファットヘッドミノーを使ったアメリカや欧州で使っているゼブラフィッシュでの試験法だったのですが、そこにメダカを追加したので、必ず TG229 メダカという言い方をして、メダカを用いた魚類短期繁殖試験という FSTRA (Fish Short Term Reproduction Assay) というもので、このキーポイントは期間が $3 \times 7 = 21$ ですから3週間のばく露で、それは成魚だというのが1つキーポイントです。成魚でもう成熟している個体を使うので、山本先生が言及されましたが、二次性徴がもう既に確立している段階でばく露するわけですから、そうすると二次性徴の指標となる雄の尻びれの乳頭状小突起がもう既に確立されていると。ですので、JMASAと言われる、あえてその試験法を開発したのは幼若期のメダカにばく露すると。そういった特徴があるということを御理解いただきたいと思います。

第2段階生物試験のうち
メダカ拡張1世代繁殖試験（OECD TG240：Medaka Extended One
Generation Reproduction Test（MEOGRT））の概要



9

それから、これも山本先生が言及されましたが、メダカ拡張 1 世代繁殖試験で、これは先ほどの FSTRA は 3 週間だったものが延べで 19 週間で F0、F1、F2 といった全生涯をばく露して、親へのばく露、それから全生涯ばく露したものの子供への影響といったものが見られる、非常に規模の大きな難しい試験ではあるのですが、ここがポイントで、先ほどは成魚だったのが稚魚の段階というよりも卵の段階から既に F1 世代はばく露しているといったところで、様々な影響を見ることができるということになっております。

3. 第2段階生物試験を実施した8物質の試験結果について

■ 第2段階生物試験(TG240)を実施した8物質

- 17 β -エストラジオール (E2)
- エストロン (E1)
- 17 α -エチニルエストラジオール (EE2)
- 4-ノニルフェノール(分岐型) (4-NP)
- 4-*t*-オクチルフェノール (4-*t*-OP)
- ビスフェノールA (BPA)
- 4-ヒドロキシ安息香酸プロピル (プロピルパラベン、PPB)
- リン酸トリフェニル (TPP)

10

第2段階生物試験まで到達しているのが、これが進捗が早いのか遅いのか御意見はあるかと思いますが、8物質になります。

内訳は、17 β -エストラジオール、エストロン、これらが女性ホルモンになりますし、17 α -エチニルエストラジオールは合成の女性ホルモンになります。それから、先ほど二特の話がありましたが、ノニルフェノールとオクチルフェノールというアルキルフェノール類があります。それから、よく話題になってくるビスフェノール A、それからプロピルパラベンと略称されますが、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル、それからリン酸トリフェニルといったような物質の第2段階生物試験が終了しております。

第2段階生物試験(TG240)が実施された8物質の第1段階試験管内試験結果

物質名	エストロゲン作用濃度 (Mol濃度) 及び陽性対象物質との相対活性比
17 α -エチニルエストラジオール	EC ₅₀ =5.1×10 ⁻¹¹ 、(3.1)
17 β -エストラジオール	EC ₅₀ =1.6×10 ⁻¹⁰ 、(1.0)
エストロン	EC ₅₀ =5.4×10 ⁻⁹ 、(0.043)
4- <i>t</i> -オクチルフェノール	EC ₅₀ =3.5×10 ⁻⁸ 、(0.005)
4-ノニルフェノール(分岐型)	EC ₅₀ =3.6×10 ⁻⁸ 、(0.0049)
ビスフェノールA	EC ₅₀ =2.2×10 ⁻⁷ 、(0.0008)
4-ヒドロキシ安息香酸プロピル	EC ₅₀ =7.0×10 ⁻⁶ 、(0.000033)
りん酸トリフェニル	EC ₅₀ =9.7×10 ⁻⁶ 、(0.000021)

11

これは MEOGRT が実施された 8 物質の第 1 段階試験管内試験の結果で、細かくて申し訳ないのですが、括弧内が非活性ということで、17 β -エストラジオールの女性ホルモン作用を 1 としたときにエチニルエストラジオールは 3.1、かなり強い。エストロンは 0 が 1 つつく。オクチルフェノール、ノニルフェノールは 0 が 2 つつくぐらい、0.005 程度。ビスフェノール以下はさらに 0 がつくように非常に弱いといったことが分かると思います。

それから、EC50 値が得られているのがエチニルエストラジオールだと -11、-10、そこから 1 桁ずつ下がっているのです、-9、-6 までですかね。桁数で 5 桁違ってくるというような濃度で、EC50 だからマックスの反応の半分に当たる作用が見えてくるということで、こう並べてみるとなかなか面白いなと思います。

第2段階生物試験(TG240)が実施された8物質の第1段階生物試験の結果 (1)

Chemicals (μg/L)	Estrogen	Anti-estrogen	androgen	Results (Summary)
Bisphenol A 155, 826, 4670	P	N	N	TG229: Low number of eggs and fertility. High male/female mortality, male HIS and male vtg..
Estrone 0.029, 0.112, 0.272, 1.009	P	N	N	TG229: Low number of eggs, fertility and male GSI. High male/female vtg. and male HSI.
Triphenyl phosphate 2.13, 7.19, 17.1, 44.9	N	P	N	TG229: Low number of eggs, fertility, female body length, female body weight and female vtg.. High male HSI.
4-Nonylphenol (branched) 5.63, 18.8, 51.8, 170	P	N	N	TG229: Low number of eggs and fertility. High male/female vtg. and male HSI.
4-t-Octylphenol 25.3, 82.3, 250	P	N	N	TG229: High male vtg..

P : Positive
N : Negative

12

英語で恐縮ですが、第1段階の生物試験結果はどうだったのかということで、この8物質全て女性ホルモン作用、エストロジェニックだったということが試験管内試験で確認されたのですが、これで非常に困惑したのがりん酸トリフェニル (Triphenyl Phosphate) の結果が抗エストロゲン作用だったのです。雌のビテロゲニンが下がったと、試験管内試験ではエストロジェニックだったのに短期の生物試験をやったらアンチエストロジェニックだった、さあこれはなぜだろうと。

これはまだ推測の域を出ていないのですが、1つには生物体内で、つまり第1段階の試験管内試験は細胞ですので、代謝が明確ではないと。そうすると、代謝の影響とあとはホルモン生合成のほう、ステロイド産生のほうへの影響でこういう結果になったのかもしれないといったところが、この段階では疑われていました。

第2段階生物試験(TG240) が実施された 8 物質の第1段階生物試験の結果 (2)

Chemical	Estrogen	Anti-estrogen	androgen	Results (Summary)
Propylparaben 311, 926, 2940	P	N	N	TG229: Low number of eggs and fertility. High male/female vtg..
17 β -Estradiol 0.0221,0.115,0.553	P	N	N	TG229: Low number of eggs, fertility and male GSI. High male/female vtg. and male HSI.
17 α -Ethinyl estradiol 0.0178,0.0849,0.424	P	N	N	TG229: Low number of eggs and fertility. High male/female vtg. and male HSI.

P : Positive
N :Negative

13

残りの物質についてはいずれも女性ホルモン作用が確認されていて、抗エストロゲンもアンドロゲンもなかったという結果が第1段階生物試験の結果として得られています。

第2段階生物試験の結果: TG 240 MEOGRT

17β-エストラジオール(CAS No. 50-28-2)について、1.07、3.22、8.21、25.7、84.4 ng/L(実測値)のばく露濃度でメダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT: OECD TG240)を実施した。

- 17β-エストラジオールについては、エストロゲン（女性ホルモン）でありエストロゲン作用を持つことは自明である。平成29年度に実施したメダカエストロゲン受容体αレポーター遺伝子試験の結果としてEC₅₀値は、 1.6×10^{-10} Mで、17β-エストラジオールに対する相対活性比は、1.0であった。
- 今回の試験結果において、死亡(ふ化率の低値)が認められなかった濃度範囲(84.4 ng/L未満)において、エストロゲン作用を示す雄の肝臓中ビテログニン濃度には統計学的に有意な高値が認められ、メダカに対してエストロゲン作用を持つことが確認された。
- また、同年度に実施したメダカアンドロゲン受容体βレポーター遺伝子試験の結果としてアンドロゲン作用は陰性であったが、抗アンドロゲン作用は陽性(IC₅₀値は、 1.4×10^{-6} Mで、2-ヒドロキシフルタミドに対する相対活性比は、0.45であった)であった。今回の試験結果において、F1世代において雄の二次性徴の低値が認められ、抗アンドロゲン作用を持つことが疑われた。
- 8.21 ng/L以上のばく露群において総産卵数、受精卵数及び受精率並びに雌の体重には統計学的に有意な低値が認められたことから、メダカの繁殖及び成長に対する有害性を示すことが認められた。なお、過年度に第1段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(OECD TG229)では、553 ng/Lのばく露群において総産卵数、受精卵数、受精率には統計学的に有意な低値が認められていた。また、この試験結果から、17β-エストラジオールはメダカに対してエストロゲン作用を示すことが確認されたとともに、本物質がメダカの繁殖及び成長に及ぼす影響に関する最低影響濃度(LOEC)として、8.21 ng/Lが得られた。
- メダカの繁殖及び成長に対する有害性が示唆されたばく露濃度8.21 ng/Lは、令和5年度に実施された化学物質環境実態調査において測定された最高濃度15 ng/Lの約1/2倍であった。¹⁴

では、ここからたくさん字が並んでいますが、8物質の MEOGRT がどうだったのか。17β-エストラジオールは女性ホルモンそのものですから、試験管内試験でも、短期の試験でも長期の試験でもエストロゲン・女性ホルモン作用は確認できました。

ただ、雄の二次性徴の低値が認められたので、抗アンドロゲン作用もあるのかなど。この辺はいろいろホルモンの代謝であったりフィードバックであったりというのも関係しているかもしれません。まだこの段階では表層的な疑われたということになっています。

評価はナノグラムという非常に小さい単位のばく露濃度で、1.07～84.4 まであって、わざわざ真ん中に、2つ目のポツで、死亡が認められなかった濃度範囲というのは、山崎様から示された内分泌かく乱作用に関する定義に従って「インタクト」という言葉にこだわったので、こういう表現になっています。

幾つか記載がありますが、女性ホルモン作用があって繁殖や有害性が認められていて、この有害性が認められた 8.21 というのは令和5年度に黒本調査で測定された最高濃度の15ng/L でしたので、それをはるかに下回っているということで、この段階では有害性が生じる可能性のある地点があるということが分かると思います。

第2段階生物試験の結果: TG 240 MEOGRT

エストロン(CAS No. 53-16-7)について、2.68、8.54、28.5、89.1、284 ng/L(実測値)のばく露濃度でメダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT:OECD TG240)を実施した。

- エストロンについては、既存知見及び試験管内試験の結果(平成23年度に実施したメダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験の結果として EC_{50} 値は、 5.4×10^{-9} Mで、 17β -エストラジオールに対する相対活性比は、0.043であった)から、エストロゲン作用を持つことが想定された。
- 今回の試験結果において、死亡が認められなかった濃度範囲(284 ng/L以下)において、エストロゲン作用を示す雄の肝臓中ピテロゲニン濃度の統計学的に有意な高値が認められ、エストロゲン作用を持つことが確認された。
- また、284 ng/Lのばく露群において総産卵数、受精卵数及び受精率並びに雌の全長と体重の統計学的に有意な低値が認められ、89.1ng/Lのばく露群において総産卵数、受精卵数及び受精率の低値傾向が認められたことから、メダカの繁殖及び成長に対する有害性を示すことが認められた。なお、過年度に第1段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(OECD TG229)では、1,009 ng/Lのばく露群において総産卵数、受精卵数の統計学的に有意な低値が認められていた。
- また、この試験結果から、エストロンはメダカに対してエストロゲン作用を示すことが確認されたとともに、本物質がメダカの繁殖に及ぼす影響に関する最低影響濃度(LOEC)として、284 ng/Lが得られた。
- メダカの繁殖及び成長に対する有害性が示唆されたばく露濃度284 ng/Lは、令和5年度に実施された化学物質環境実態調査において測定された最高濃度200 ng/Lの約1.4倍であった。
- なお、総産卵数、受精卵数及び受精率の低値傾向が認められたばく露濃度89.1 ng/Lは、令和5年度に実施された化学物質環境実態調査において測定された最高濃度200 ng/Lの約1/2₁₅であった。

エストロンも同様です。これらについても女性ホルモン作用と繁殖に関する有害性が認められて、一番下、89.1ng/Lというのも令和5年度に実施された黒本調査の200のほぼ半分であったという結果でした。

第2段階生物試験の結果: TG 240 MEOGRT

17 α -エチニルエストラジオール(CAS No. 57-63-6)について、0.698、2.36、7.48、24.6、75.5ng/L(実測値)のばく露濃度でメダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT:OECD TG240)を実施した。

- 17 α -エチニルエストラジオールについては、既存知見及び試験管内試験の結果(平成29年度に実施したメダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験の結果としてEC₅₀値は、 5.1×10^{-11} Mで、17 β -エストラジオールに対する相対活性比は、3.1であった)から、エストロゲン作用を持つことが想定された。
- 今回の試験結果において、死亡が認められなかった濃度範囲(75.5 ng/L以下)において、エストロゲン作用を示す雄の肝臓中ビテロゲニン濃度の統計学的に有意な高値が認められ、エストロゲン作用を持つことが確認された。また、7.48 ng/L以上のばく露群において総産卵数、受精卵数及び受精率並びに雌の全長と体重の統計学的に有意な低値が認められたことから、メダカの繁殖及び成長に対する有害性を示すことが認められた。なお、過年度に第1段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(OECD TG229)では、184.9 ng/L以上のばく露群において総産卵数の統計学的に有意な低値が認められていた。
- この試験結果から、17 α -エチニルエストラジオールはメダカに対してエストロゲン作用を示すことが確認されたとともに、本物質がメダカの繁殖及び成長に及ぼす影響に関する最低影響濃度(LOEC)として、7.48 ng/Lが得られた。
- メダカの繁殖及び成長に対する有害性が示唆されたばく露濃度7.48 ng/Lは、令和5年度に実施された化学物質環境実態調査において測定された最高濃度0.21 ng/Lの約36倍であった。

16

17 α -エチニルエストラジオール、合成の女性ホルモンですが、これも女性ホルモン作用と繁殖に関する有害性が見つかって、これは非常に新たな見解というか知識なのですが、この17 α -エチニルエストラジオールはピルの成分になっています。これまで底質では見つかったのですが、水系で検出されたというのは非常にまれな物質ですが、これも令和5年度に実施された黒本調査で、かなり感度を低くしていただいた調査で0.21ng/Lでしたが、ただし有害性が示されたばく露濃度とは約40倍ぐらいの乖離があるという結果でした。

第2段階生物試験の結果: TG 240 MEOGRT

4-ノニルフェノール(分岐型)(CAS No. 84852-15-3、以下4-NP(b))について1.27、2.95、9.81、27.8、89.4 µg/L(実測値)のばく露濃度でメダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT)を実施した。

- 4-NP(b)については、既存知見及び試験管内試験の結果(平成20年度に実施したメダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験の結果として EC_{50} 値は、 3.6×10^{-8} Mで、17 β -エストラジオールに対する相対活性比は、0.0049であった)から、エストロゲン作用を持つことが想定された。なお、過年度に第1段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(TG229)では、51.8 µg/L以上のばく露群において総産卵数、受精卵数及び受精率の統計学的に有意な低値が認められていた。
- 今回の試験結果において、用量相関的には死亡が認められなかった濃度範囲(89.35 µg/L未満)において、エストロゲン作用を示す雄の肝臓中ビテログニン濃度の統計学的に有意な高値及び雄の二次性徴(尻鰭の乳頭状小突起を有する節板数)の統計学的に有意な低値が認められ、エストロゲン作用を持つことが確認された。
- また、1.27 µg/L以上のばく露群において総産卵数及び受精卵数の統計学的に有意な低値が認められたことから、メダカの繁殖に対する有害性を示すことが認められた。
- この試験結果から、4-NP(b)はメダカに対してエストロゲン作用を示すことが確認されたとともに、本物質がメダカの繁殖に及ぼす影響に関する最低影響濃度(LOEC)として、1.27 µg/Lが得られた。
- メダカの繁殖に対する有害性が示唆されたばく露濃度1.27 µg/Lは、平成27年度に実施された公共用水域水質測定において検出された最高濃度0.69 µg/L(4-NP(b)異性体合計値)の約2倍であった。

17

先ほど出てきましたノニルフェノール、これも有害性が認められて女性ホルモン作用が認められて、非常に低い濃度で有害性が認められています。ただ、先ほどお話があった二特では9.81を最低作用濃度、2.95を無影響濃度というふうに、他の知見との比較も含めてそのように採用されて、多分アセスメント係数10を採用した0.3という数字が1つの目安になっていたと思います。

一番下ですが、1.27というのは平成27年度に実施された、こちらは公共用水域水質測定ですが、約2倍だったということで、あまりばく露マージンは大きくはないということが言えると思います。

第2段階生物試験の結果: TG 240 MEOGRT

4-*t*-オクチルフェノール(CAS No. 140-66-9、4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール)について、0.926、3.21、9.91、31.1、99.2 µg/L(実測値)のばく露濃度でメダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT:OECD TG240)を実施した。

- 4-*t*-オクチルフェノールについては、既存知見及び試験管内試験の結果(平成20年度に実施したメダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験の結果としてEC₅₀値は、 3.5×10^{-8} Mで、17 β -エストラジオールに対する相対活性比は、0.005であった)から、エストロゲン作用を持つことが想定された。
- 今回の試験結果において、死亡が認められなかった濃度範囲(99.2 µg/L以下)において、エストロゲン作用を示す雄の肝臓中ビテロゲニン濃度の統計学的に有意な高値が認められ、エストロゲン作用を持つことが確認された。
- また、9.91 µg/L以上のばく露群において総産卵数及び受精卵数の統計学的に有意な低値が認められたことから、メダカの繁殖に対する有害性を示すことが認められた。
- なお、過年度に第1段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(OECD TG229)では、250 µg/Lのばく露群においても総産卵数、受精卵数及び受精率に有意な変化は認められなかった。
- また、この試験結果から、4-*t*-オクチルフェノールはメダカに対してエストロゲン作用を示すことが確認されたとともに、本物質がメダカの繁殖に及ぼす影響に関する最低影響濃度(LOEC)として、9.91 µg/Lが得られた。
- メダカの繁殖に対する有害性が示唆されたばく露濃度9.91µg/Lは、平成24年度に実施された化学物質環境実態調査において測定された最高濃度0.031µg/Lの約320倍であった。

18

オクチルフェノールですが、これは試験管内試験も含めてエストロジェニックだということは分かったのですが、短期の試験では有害性が確認できませんでした。しかし、長期の試験をやったところ、有害性が確認され、ただし、環境中の最高濃度とは 320 倍程度の濃度で作用があるということが確認できました。

第2段階生物試験の結果: TG 240 MEOGRT

ビスフェノールA(CAS No. 80-05-7、以下BPA)について、28、93、330、1,000、3,700 µg/L(実測値)のばく露濃度でメダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT)を実施した。

- BPAについては、既存知見及び試験管内試験の結果(平成20年度に実施したメダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験の結果として EC_{50} 値は、 2.2×10^{-7} Mで、 17β -エストラジオールに対する相対活性比は、0.0008であった)から、エストロゲン作用を持つことが想定された。なお、過年度に第1段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(TG229)では、4,670 µg/Lのばく露群において総産卵数、受精率の統計学的に有意な低値が認められていた。
- 今回の試験結果において、死亡が認められなかった濃度範囲(1,000µg/L以下)において、エストロゲン作用を示す雄の肝臓中ビテロゲニン濃度の統計学的に有意な高値が認められ、エストロゲン作用を持つことが確認された。
- また、1,000µg/L以上のばく露群において総産卵数及び受精卵数の統計学的に有意な低値が認められたことから、メダカの繁殖に対する有害性を示すことが認められた。
- この試験結果から、BPAはメダカに対してエストロゲン作用を示すことが確認されたとともに、本物質がメダカの繁殖に及ぼす影響に関する最低影響濃度(LOEC)として、1,000 µg/Lが得られた。
- メダカの繁殖に対する有害性が示唆されたばく露濃度1,000 µg/Lは、令和4年度に実施された化学物質環境実態調査において測定された最高濃度0.095 µg/Lの約10,500倍であった。

19

次がビスフェノール A ですが、これも作用が認められていて有害性も認められたのですが、ただし、非常に高い濃度で有害性が認められたので、環境中濃度がビスフェノール A は減少していますので、1 万倍以上の乖離があるということが分かりました。

第2段階生物試験の結果: TG 240 MEOGRT

プロピルパラベン(別名: 4-ヒドロキシ安息香酸プロピル、CAS No. 94-13-3)について、9.9、32.6、99.4、328、1,040 µg/L(実測値)のばく露濃度でメダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT:OECD TG240)を実施した。

- プロピルパラベンについては既存知見からエストロゲン作用を持つことが想定された(平成28年度に実施したメダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験の結果としてEC₅₀値は、 7.0×10^{-6} Mで、17 β -エストラジオールに対する相対活性比は、0.000033であった。抗エストロゲン作用、アンドロゲン作用、抗アンドロゲン作用は陰性であった)。なお、平成29年度に第1段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(OECD TG229)では、311 µg/L以上のばく露群において雄の肝臓中ビテロゲニン濃度(成熟個体)には統計学的に有意な高値が認められたため、エストロゲン作用を持つことが想定された。
- 今回の試験結果において、F1世代のふ化率の低値が認められなかった濃度範囲(328 µg/L未満)において、エストロゲン作用を示す雄(F0成熟個体)の肝臓中ビテロゲニン濃度には統計学的に有意な高値が認められ、エストロゲン作用を持つことが確認された。
- また、328 µg/L以上のばく露群においてF1世代のふ化率には統計学的に有意な低値が認められたことから、メダカの成長に対する有害性を示すことが認められた。なお、平成29年度に第1段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(OECD TG229)では、926 µg/Lのばく露群において受精卵数には統計学的に有意な低値が認められていた。
- また、この試験結果等から、プロピルパラベンはメダカに対してエストロゲン作用を示すことが確認されたとともに、本物質がメダカの成長に及ぼす影響に関する最低影響濃度(LOEC)として、328 µg/Lが得られた。
- メダカの成長に対する有害性が示唆されたばく露濃度328 µg/Lは、平成24年度に実施された化学物質環境実態調査において測定された最高濃度0.016 µg/Lの20,500倍であった。

20

プロピルパラベン、このパラベンも女性ホルモン作用があつて有害性も認められましたが、その有害性が認められた濃度と環境中の濃度は2万倍以上乖離があるということが分かりました。

第2段階生物試験の結果: TG 240 MEOGRT

りん酸トリフェニル(CAS No.115-86-6)について、0.501、1.62、4.54、15.2、48.4 µg/L(実測値)のばく露濃度でメダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT:OECD TG240)を実施した。

- りん酸トリフェニルについては、既存知見及び試験管内試験の結果(平成24年度に実施したメダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験の結果として EC_{50} 値は、 9.7×10^{-6} Mで、 17β -エストラジオールに対する相対活性比は、0.000021であった)から、エストロゲン作用を持つことが想定された。一方で過年度に第1段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(OECD TG229)では、7.19 µg/L以上のばく露群において雌の肝臓中ビテロゲン濃度の統計学的に有意な低値が認められたため、抗エストロゲン作用を持つことが想定された。
- 今回の試験結果において、死亡(F1胚のふ化率の有意な低値)が認められなかった濃度範囲(4.54 µg/L未満)において、抗エストロゲン作用を示す雌(F1成熟個体)の肝臓中ビテロゲン濃度の統計学的に有意な低値が認められ、抗エストロゲン作用を持つことが確認されたが、4.54 µg/L以上のばく露群ではF1胚のふ化率の有意な低値が認められ毒性を有すると考えられた。
- 48.4 µg/Lのばく露群において総産卵数、受精卵数、生存率(4週齢、雄の成熟個体)の統計学的に有意な低値が認められたことから、メダカの繁殖に対する有害性を示すことが認められた。なお、過年度に第1段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(OECD TG229)では、44.9µg/Lのばく露群において総産卵数、受精卵数、雌の全長と体重の統計学的に有意な低値が認められていた。
- この試験結果等から、りん酸トリフェニルはメダカに対して抗エストロゲン作用を示すことが確認されたとともに、本物質がメダカ胚のふ化に及ぼす影響に関する最低影響濃度(LOEC)として、4.54 µg/Lが得られた。
- メダカ胚のふ化に対する有害性が示唆されたばく露濃度4.54 µg/Lは、平成29年度に実施された化学物質環境実態調査において測定された最高濃度0.024 µg/Lの約190倍であった。

21

次がりん酸トリフェニル。これも先ほど試験管内試験と短期の試験結果に乖離があると申し上げましたが、やはり長期の試験でも抗エストロゲン作用が認められて、その認められた濃度については環境中の最高濃度とは 190 倍程度であったということでございました。

4. 第1段階と第2段階の生物試験結果の比較について

17 β -エストラジオール

ばく露濃度(ng/L)	1.07	3.22	8.21	22.1	25.7	84.4	115	553
FSTRA				V			V	V ■
MEOGRT 最小■の比:約67	V	V	V ■		V ■	V ■		

エストロン

ばく露濃度(ng/L)	2.68	8.54	28.5	29.3	89.1	112	272	284	1,009
FSTRA				○		○	V		V ■
MEOGRT 最小■の比:約3.6	V	V	V		V			V ■	

○：試験を実施したが有意な変化が認められなかった試験濃度

V：雄の肝臓中ビテログニン濃度が有意に増加した試験濃度、■：メダカの繁殖に悪影響を与えた試験濃度

22

第1段階と第2段階の生物試験の比較は、短期のFSTRAと長期で見ると、例えばVというのはビテログニンが得られたばく露濃度です。エストラジオール、エストロン、

4. 第1段階と第2段階の生物試験結果の比較について

17 α -エチニルエストラジオール

ばく露濃度(ng/L)	0.698	2.36	7.48	17.8	24.6	75.5	84.9	424
FSTRA				V			V ■	V ■
MEOGRT 最小■の比:約11	○	V	V ■		V ■	V ■		

○：試験を実施したが有意な変化が認められなかった試験濃度

V：雄の肝臓中ビテロゲニン濃度が有意に増加した試験濃度、■：メダカの繁殖に悪影響を与えた試験濃度

23

次のエチニルエストラジオールの結果も総じてみると、もちろん長期の試験のほうが低い濃度で反応が得られるのですが、ビテロゲニンが先に来て、その後にメダカの繁殖に影響を与えた試験濃度が来るといった形になります。

4. 第1段階と第2段階の生物試験結果の比較について

4-ノニルフェノール（分岐型）

ばく露濃度(μg/L)	1.27	2.95	5.63	9.81	18.8	27.79	51.8	89.35	170
FSTRA			V		V		V		V
MEOGRT 最小■の比:約41	■	■		V		V		V	

ばく露濃度(μg/L)	0.926	3.21	9.91	25.3	31.1	82.3	99.2	250
FSTRA				○		V		V
MEOGRT 最小■の比:約	○	○	■		V		V	

○：試験を実施したが有意な変化が認められなかった試験濃度

V：雄の肝臓中ビテロゲニン濃度が有意に増加した試験濃度、■：メダカの繁殖に悪影響を与えた試験濃度

24

それに比較してノニルフェノールやオクチルフェノールは、有害性のほうが先に来てビテロゲニンが上がるということが認められています。

4. 第1段階と第2段階の生物試験結果の比較について

ビスフェノールA

ばく露濃度(μg/L)	28	93	155	330	826	1,000	3,700	4,670
FSTRA			○		○			V ■
MEOGRT 最小■の比約5	V	V		V		V ■	V ■	

4-ヒドロキシ安息香酸プロピル

ばく露濃度(μg/L)	9.9	32.6	99.4	311	328	926	1,040	2,940
FSTRA				V		V ■		V ■
MEOGRT 最小■の比約3	V	V	V		V ■		V ■	

○：試験を実施したが有意な変化が認められなかった試験濃度

V：雄の肝臓中ビテロゲニン濃度が有意に増加した試験濃度、■：メダカの繁殖に悪影響を与えた試験濃度

25

ビスフェノールA、4-ヒドロキシ安息香酸プロピルは女性ホルモンと似たような傾向が認められます。

4. 第1段階と第2段階の生物試験結果の比較について

りん酸トリフェニル

ばく露濃度(μg/L)	0.501	1.62	2.13	4.54	7.19	15.2	17.1	48.4	449
FSTRA			○		V↓		V↓		V↓ ■
MEOGRT 最小■の比:約9	V↓	V↓		V↓		V↓		V↓ ■	

○：試験を実施したが有意な変化が認められなかった試験濃度

V↓：雌の肝臓中ビテロゲニン濃度が有意に減少した試験濃度、■：メダカの繁殖に悪影響を与えた試験濃度

26

りん酸トリフェニル、これは抗女性ホルモン作用になりますからビテロゲニンが下がるという印をつけてありますが、やはり同様の結果が見られました。

4. 第1段階と第2段階の生物試験結果の比較について

- 女性ホルモン類及びアルキルフェノール類以外の物質は、有害性が認められたばく露濃度以下でエストロゲン作用が確認された。
- アルキルフェノール類は、有害性が認められたばく露濃度近傍又は以上でエストロゲン作用が確認された。
- 第1段階生物試験で有害性が確認されたばく露濃度と第2段階生物試験で有害性が確認されたばく露濃度の比は、約3～約70の範囲であった。

27

次、最後になります。第1段階試験と第2段階試験の比較ですが、女性ホルモン類及びアルキルフェノール類以外の物質は、有害性が認められたばく露濃度以下でエストロゲン作用が確認されている。アルキルフェノール類は、有害性が認められたばく露近傍か、それ以上でエストロゲン作用が確認され、若干上の物質とは傾向が違っていた。

第1段階生物試験で有害性が確認されたばく露濃度と第2段階生物試験で有害性が確認されたばく露濃度の比は約3～70、言い方を変えると短期試験の約3分の1から約70分の1の低い濃度が第2段階生物試験の結果として得られるということが分かりました。



ご清聴いただき、ありがとうございました。

kawasima@janus.co.jp

28

以上、御清聴いただき、ありがとうございました。以上です。