

平成 29 年度第 1 段階生物試験の実施結果について（案）

1. 平成 29 年度に実施した試験結果について

試験管内試験の結果等から第 1 段階生物試験を実施する優先順位が高いと考えられた 1 物質(フタル酸ジイソブチル)について、メダカを用いた魚類短期繁殖試験(修正 TG229)を実施した(試験法の概要については p 2 参照)。

(1) フタル酸ジイソブチルの試験結果

35、184、836 $\mu\text{g/L}$ (実測値)のばく露濃度で試験を行ったところ、死亡率、全長、体重、総産卵数、受精卵数、受精率、生殖腺体指数、肝臓体指数、二次性徴、雄の肝臓中ビテロゲン濃度に統計学的に有意な変化は認められなかった。

雌の肝臓中ビテロゲン濃度は、184 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、統計学的に有意な低値が認められた。

2. 試験結果のまとめ

(1) フタル酸ジイソブチル

フタル酸ジイソブチル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が、今回の試験結果において、有意な死亡が認められない濃度範囲において、エストロゲン作用を示す雄の肝臓中ビテロゲン濃度の高値は認められなかったため、エストロゲン作用を持つことは確認できなかった。

なお、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確認するための試験管内試験を実施することとする(雌の尻鰭の乳頭状小突起数の高値が認められなかったため、アンドロゲン作用は認められないと推定された)。

メダカに対する有害性が認められなかったばく露濃度 836 $\mu\text{g/L}$ は、平成 8 年度に実施された化学物質環境実態調査(未検出)での検出下限値 0.2 $\mu\text{g/L}$ の約 4,200 倍であった。

(参考)

フタル酸ジイソブチル¹⁾

水溶解度：1.4 mg/L (25 $^{\circ}\text{C}$)、6.2 mg/L (24 $^{\circ}\text{C}$)、20.3 mg/L (20 $^{\circ}\text{C}$)

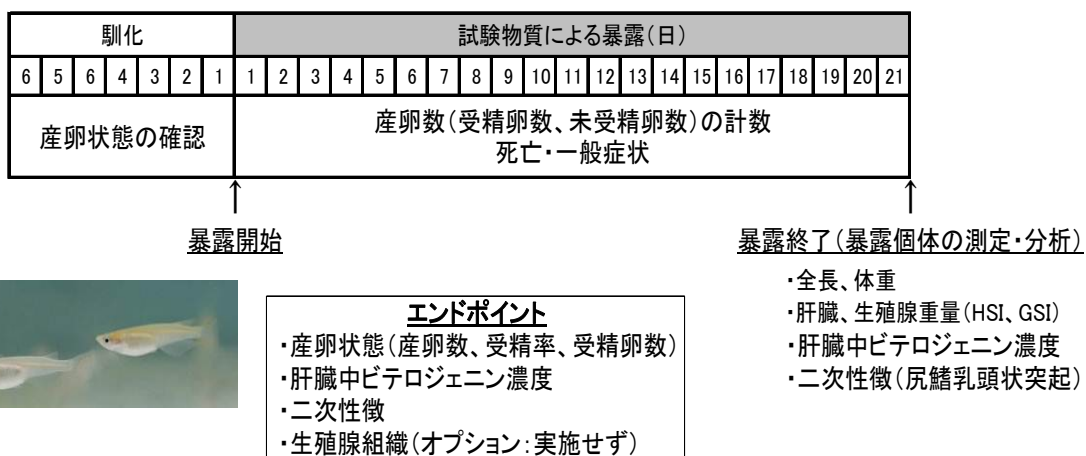
メダカへの毒性値：LC₅₀=3,040 $\mu\text{g/L}$ (死亡)

1) 環境省環境保健部環境リスク評価室(2004)化学物質の環境リスク評価、第 3 巻

(参考)

メダカを用いた魚類短期繁殖試験法

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。



第1段階生物試験結果(TG229)

フタル酸ジイソブチル

実施機関：住化テクノサービス株式会社

表 2-A 試験結果

平均濃度実測値 (μ g/L)	生存個体数		死亡率 (%)		全長(mm)		体重(mg)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区(<0.001)	24	24	0	0	32.4 \pm 1.5	32.6 \pm 1.1	345 \pm 58	395 \pm 30
助剤対照区(3)	23	24	4.2	0	32.6 \pm 1.2	32.5 \pm 1.0	367 \pm 46	395 \pm 42
35	24	24	0	0	31.9 \pm 1.2	33.6 \pm 1.5	335 \pm 39	446 \pm 48
184	24	24	0	0	31.8 \pm 1.4	32.6 \pm 1.5	329 \pm 55	405 \pm 52
836	24	24	0	0	32.4 \pm 1.7	32.6 \pm 1.4	348 \pm 62	413 \pm 61

表 2-B 試験結果(続き)

平均濃度実測値 (μ g/L)	総産卵数		受精卵数		受精率		生殖腺体指数 (%)	
	(eggs/female/day)	(eggs/female/day)	(eggs/female/day)	(eggs/female/day)	(%)	(%)	雄	雌
対照区(<0.001)	24.2 \pm 8.6	24.2 \pm 8.6	23.4 \pm 8.5	23.4 \pm 8.5	96.6 \pm 4.1	96.6 \pm 4.1	1.2 \pm 0.4	12.7 \pm 1.7
助剤対照区(3)	22.5 \pm 7.0	22.5 \pm 7.0	21.9 \pm 6.9	21.9 \pm 6.9	97.1 \pm 3.2	97.1 \pm 3.2	1.1 \pm 0.3	13.1 \pm 1.8
35	24.3 \pm 7.0	24.3 \pm 7.0	23.4 \pm 6.6	23.4 \pm 6.6	96.5 \pm 4.8	96.5 \pm 4.8	1.2 \pm 0.2	13.3 \pm 2.3
184	23.9 \pm 7.2	23.9 \pm 7.2	23.1 \pm 6.9	23.1 \pm 6.9	96.8 \pm 3.9	96.8 \pm 3.9	1.0 \pm 0.3	13.6 \pm 1.9
836	25.2 \pm 5.8	25.2 \pm 5.8	24.2 \pm 5.9	24.2 \pm 5.9	96.1 \pm 5.4	96.1 \pm 5.4	1.2 \pm 0.4	12.0 \pm 2.0

表 2-C 試験結果(続き)

平均濃度実測値 (μ g/L)	肝臓体指数 (%)		ビテロゲン濃度 (ng/mg liver)		二次性徴	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区(<0.001)	3.5 \pm 3.0	5.8 \pm 1.5	0.366 \pm 0.381	763 \pm 109	101.0 \pm 14.4	0 \pm 0
助剤対照区(3)	2.7 \pm 0.7	5.8 \pm 1.1	2.34 \pm 2.56	604 \pm 114	98.8 \pm 14.5	0 \pm 0
35	2.7 \pm 0.4	6.3 \pm 1.6	0.275 \pm 0.416	596 \pm 144	96.0 \pm 10.7	0 \pm 0
184	3.1 \pm 0.4	6.3 \pm 0.9	0.188 \pm 0.101	404 \pm 85.3*	96.3 \pm 10.1	0 \pm 0
836	3.4 \pm 0.4	5.9 \pm 1.3	2.16 \pm 3.21	421 \pm 73.1*	96.8 \pm 17.7	0 \pm 0

表 2-D 試験結果(続き)

平均濃度実測値 (μ g/L)	その他の所見
対照区(<0.001)	異常なし
助剤対照区(3)	異常なし
35	異常なし
184	異常なし
836	異常なし

結果は平均値 \pm 標準偏差.

有意差水準 (** p <0.01, * p <0.05).

ビテロゲニン濃度の検出下限値は 1 ng/mg liver

二次性徴：乳頭状小突起が発現した節板数

(添付)

H26 第 1 回 化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価作業班会議

14.11.10.

資料 2

化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の 信頼性評価結果と今後の対応(案)

1. 信頼性評価の実施

平成 26 年度に実施した 6 物質の化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価について、化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価作業班会議(平成 26 年 11 月 10 日開催、非公開)において、評価を実施し、信頼性評価のまとめと今後の対応案について検討を行った。(信頼性評価の結果は別添参照)

2. 平成 26 年度に実施した 6 物質の信頼性評価のまとめ

(1)内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る 6 物質

- *エチルベンゼン：動物試験の報告において、視床下部一下垂体—生殖腺軸への作用を示すことが示唆されたため。
- *3,4-ジクロロアニリン：動物試験の報告において、カイアシ類の変態率を低下させる作用を示すことが示唆されたため。
- *2,4-ジニトロトルエン：動物試験の報告において、視床下部一下垂体—生殖腺軸への作用を示すことが示唆されたため。
- *トリクロサン：動物試験の報告において、甲状腺ホルモン様作用、抗甲状腺ホルモン様作用、視床下部一下垂体—甲状腺軸への作用、視床下部一下垂体—生殖腺軸への作用、エストロゲン作用、プロゲステロン様作用を示すこと、試験管内試験の報告において、エストロゲン作用、抗エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用を示すことが示唆されたため。
- *フタル酸ジイソブチル：動物試験の報告において、抗アンドロゲン様作用を示すこと、試験管内試験の報告において、エストロゲン作用を示すことが示唆されたため。
- *ベノミル：動物試験の報告において、視床下部一下垂体—生殖腺軸への作用、抗エストロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用を示すこと、試験管内試験の報告において、エストロゲン作用、抗エストロゲン作用を示すことが示唆されたため。

(2)現時点では試験対象物質にしない物質

今回は、該当する物質はなかった。

V. フタル酸ジイソブチル

1. 内分泌かく乱作用に関連する報告

フタル酸ジイソブチルの内分泌かく乱作用に関連する報告として、生態影響、発達影響及びエストロゲン作用の有無に関する報告がある。

(1) 生殖影響

① Hannas ら(2011)によって、フタル酸ジイソブチル 100、300、600、900mg/kg/day を妊娠 14 日目から妊娠 18 日目まで 5 日間経口投与した SD ラットの雄胎仔への影響が検討されている。その結果として、100mg/kg/day 以上のばく露群で精巣中 CYP11a mRNA 相対発現量の低値、300mg/kg/day 以上のばく露群で精巣中 StAR mRNA 相対発現量、精巣中テストステロン濃度の低値が認められた。(8929)(評価結果の略号：×ー)

想定される作用メカニズム：抗アンドロゲン様作用

② Saillenfait ら(2008)によって、フタル酸ジイソブチル 125、250、500、625mg/kg/day を妊娠 12 日目から妊娠 21 日目まで 10 日間経口投与した SD ラットが出産した仔動物への影響が検討されている。その結果として、250mg/kg/day 以上のばく露群で 1 日齢雄 AGD(肛門生殖突起間距離)、11～12 日齢雄前立腺絶対重量の低値、500mg/kg/day 以上のばく露群で 11～12 日齢雄体重、11～12 日齢雄左及び右精巣上体絶対重量の低値、雄包皮分離日の遅延、625mg/kg/day のばく露群で 1 日齢雄及び雌体重、11～12 日齢雄左及び右精巣絶対重量の低値が認められた。(8933)(〇〇P)

想定される作用メカニズム：抗アンドロゲン様作用

③ Zhu ら(2010)によって、フタル酸ジイソブチル 100、300、500、800、1,000mg/kg/day を 21 日齢から 7 日間経口投与した雄 SD ラットへの影響が検討されている。その結果として、500mg/kg/day 以上のばく露群で精巣絶対重量の低値、精細管中精原細胞アポトーシス発生率の高値が認められた。

また、フタル酸ジイソブチル 100、300、500、800、1,000mg/kg/day を 21 日齢から 7 日間経口投与した雄 C57B1/6N マウスへの影響が検討されている。その結果として、1,000mg/kg/day のばく露群で精巣絶対重量の低値が認められた。(8930)(〇〇P)

想定される作用メカニズム：その他の作用(精巣重量低下とアポトーシス細胞増加)

※参考 生殖影響(今回評価対象としなかった文献)

④Boberg ら(2008)によって、フタル酸ジイソブチル 600mg/kg/day を妊娠 7 日目から妊娠 21 日目まで 15 日間経口投与した Wistar ラットの胎仔への影響が検討されている。その結果として、血清中インシュリン濃度(雌雄混合)、血清中レプチン濃度(雌雄混合)、雄精巢中 mRNA (SR-B1、P450sac、StAR、CYP17、ins13)相対発現量の低値、雌卵巢中アロマターゼ mRNA 発現量の高値が認められた。

また、フタル酸ジイソブチル 600mg/kg/day を妊娠 7 日目から 13 日間経口投与した Wistar ラットの胎仔への影響が検討されている。その結果として、雄精巢中 mRNA (SR-B1、P450sac、StAR、CYP17、SF1、ins13、PPAR α) 相対発現量、雄肝臓中 PPAR(ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体) α mRNA 発現量の低値が認められた。(12378)

⑤Borch ら(2006)によって、フタル酸ジイソブチル 600mg/kg/day を妊娠 7 日目から妊娠 20~21 日目まで 14~15 日間経口投与した Wistar ラットの胎仔への影響が検討されている。その結果として、雄精巢中テストステロン濃度、雄精巢テストステロン産生能、雄 AGD(生殖突起間距離)絶対値及び体重補正值の低値、雌 AGD(生殖突起間距離)絶対値及び体重補正值、雄精巢中小ライディッヒ細胞集積化発生率、雄精巢中セルトリ細胞液胞化発生率、雄精巢中原生殖細胞局在化発生率、雄精巢中多核原生殖細胞発生率、雄精巢中 StAR 低発現ライディッヒ細胞発生率、雄精巢中 P450acc 低発現ライディッヒ細胞発生率の高値が認められた。

また、フタル酸ジイソブチル 600mg/kg/day を妊娠 7 日目から妊娠 19 日目まで 13 日間経口投与した Wistar ラットの胎仔への影響が検討されている。その結果として、雄及び雌体重、雄 AGD(生殖突起間距離)絶対値の低値、雌 AGD(生殖突起間距離)相対値、雄精巢中小ライディッヒ細胞集積化発生率、雄精巢中 StAR 低発現ライディッヒ細胞発生率の高値が認められた。(8936)

⑥Oishi と Hiraga (1980)によって、フタル酸ジイソブチル 20,000ppm(餌中濃度)を 1 週間混餌投与した幼若雄 JCL:ICR マウスへの影響が検討されている。その結果として、体重、精巢中亜鉛濃度、肝臓中亜鉛濃度の低値、精巢相対重量、肝臓相対重量、腎臓相対重量の高値が認められた。なお、精巢中テストステロン濃度には影響は認められなかった。(1095)

※参考

(2) 発達影響(今回評価対象としなかった文献)

①Saillenfait ら(2006)によって、フタル酸ジイソブチル 250、500、750、

1,000mg/kg/day を妊娠 6 日目から妊娠 20 日目まで 15 日間経口投与した SD ラットへの影響が検討されている。その結果として、500mg/kg/day 以上のばく露群で母動物妊娠子宮重量、雄及び雌胎仔体重の低値、750mg/kg/day 以上のばく露群で同腹生存新生仔数の低値、着床後同腹胚消失率、同腹胚消失率、外表奇形胎仔発生率、内臓奇形胎仔発生率、骨格奇形胎仔発生率の高値が認められた。(8935)

(3) エストロゲン作用

① Harris ら(1997)によって、フタル酸ジイソブチル 0.1、1、10 μ M(=27.8、278、2,780 μ g/L)の濃度にばく露した(ばく露期間の記載なし)ヒト乳がん細胞 ZR-75 による細胞増殖試験が検討されている。その結果として、10 μ M(=2,780 μ g/L)以上の濃度で細胞増殖誘導が認められた。

また、フタル酸ジイソブチル 10 μ M(=2,780 μ g/L)の濃度に 6 日間ばく露したヒト乳がん細胞 MCF-7 による細胞増殖試験が検討されている。その結果として、細胞増殖誘導が認められた。

また、フタル酸ジイソブチル 0.5~1,000 μ M(=139~278,000 μ g/L)の濃度に 6 日間ばく露した酵母(ヒトエストロゲン受容体を発現)によるレポーターアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いた β ガラクトシダーゼ活性発現誘導)が検討されている。その結果として、EC₅₀ 値約 100 μ M(=27,800 μ g/L、原著 Figure 2A より読み取り)の濃度で β ガラクトシダーゼ活性発現誘導が認められた。(332)(Δ OP)

2. 総合的判断(案)

得られた報告について信頼性評価を実施した結果として、内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠として認められると評価された報告が得られた。

試験対象物質として選定する根拠として認められると評価された報告から、動物試験の報告において、抗アンドロゲン様作用を示すこと、試験管内試験の報告において、エストロゲン作用を示すことが示唆された。

なお、信頼性評価のまとめと今後の対応案について表 5 に示した。

表5 信頼性評価のまとめ

物質名：フタル酸ジイソブチル

区分	著者	作業班会議における信頼性評価結果			
		報告結果(Results)を証するために必要である『材料と方法(Materials and Methods)』に関する記載の有無及びその評価 ¹⁾	内分泌かく乱作用との関連の有無 ²⁾	内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠としての評価 ³⁾	
(1) 生殖影響	抗アンドロゲン様作用	①Hannas ら(2011)	×	—	—
	抗アンドロゲン様作用	②Saillenfait ら(2008)	○	○P	○
	その他の作用 (精巣重量低下とアポトーシス細胞増加)	③Zhu ら(2010)	○	○P	○
		④Boberg ら(2008) 評価未実施			
		⑤Borch ら(2006) 評価未実施			
		⑥Oishi と Hiraga (1980) 評価未実施			
(2)発達影響	①Saillenfait ら(2006) 評価未実施				
(3)エストロゲン作用	①Harris ら(1997)	△	○P	○	
今後の対応案	動物試験の報告において、抗アンドロゲン様作用を示すこと、試験管内試験の報告において、エストロゲン作用を示すことが示唆されたため内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る。				

1)○：十分に記載されている、△：一部記載が不十分である、×：記載が不十分である、—：評価を行わない

2)○：内分泌かく乱作用との関連性が認められる(P：作用が認められる、N：作用が認められない)、?：内分泌かく乱作用との関連性は不明、×：内分泌かく乱作用との関連性が

認められない、—：評価を行わない

3)○：試験対象物質として選定する根拠として認められる、×：試験対象物質として選定する根拠として認められない、—：内分泌かく乱作用との関連性が不明であるため、評価ができない

参考文献

8929: Hannas BR, Lambright CS, Furr J, Howdeshell KL, Wilson VS and Gray LE, Jr. (2011) Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene expression levels in rat testes following *in utero* exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate, diisooheptyl phthalate, and diisononyl phthalate. *Toxicological Sciences*, 123 (1), 206-216.

8933: Saillenfait AM, Sabate JP and Gallissot F (2008) Diisobutyl phthalate impairs the androgen-dependent reproductive development of the male rat. *Reproductive Toxicology*, 26 (2), 107-115.

8930: Zhu XB, Tay TW, Andriana BB, Alam MS, Choi EK, Tsunekawa N, Kanai Y and Kurohmaru M (2010) Effects of di-iso-butyl phthalate on testes of prepubertal rats and mice. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 86 (4), 129-136.

12378: Boberg J, Metzdorff S, Wortziger R, Axelstad M, Brokken L, Vinggaard AM, Dalgaard M and Nellemann C (2008) Impact of diisobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. *Toxicology*, 250 (2-3), 75-81.

8936: Borch J, Axelstad M, Vinggaard AM and Dalgaard M (2006) Diisobutyl phthalate has comparable anti-androgenic effects to di-*n*-butyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology Letters*, 163 (3), 183-190.

1095: Oishi S and Hiraga K (1980) Effect of phthalic acid esters on mouse testes. *Toxicology Letters*, 5 (6), 413-416.

- 8935: Saillenfait AM, Sabate JP and Gallissot F (2006) Developmental toxic effects of diisobutyl phthalate, the methyl-branched analogue of di-*n*-butyl phthalate, administered by gavage to rats. *Toxicology Letters*, 165 (1), 39-46.
- 332: Harris CA, Henttu P, Parker MG and Sumpter JP (1997) The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. *Environmental Health Perspectives*, 105 (8), 802-811.