

令和2年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー
2021年2月25日(木)

JANUS

EXTEND2016における作用・影響評価 の実施状況について

日本エヌ・ユー・エス株式会社

シニアフェロー 川嶋之雄

本報告は、全て川嶋個人の責任において行うものです。

日本エヌ・ユー・エス株式会社の川嶋でございます。

今日はお忙しい中、この公開セミナーに御参加頂きありがとうございます。本日は「EXTEND2016における作用・影響評価の実施状況について」ということでお話しさせていただきます。

目次

1. 内分泌かく乱化学物質の定義
2. EXTEND2016における取組み
3. 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
4. 信頼性評価の事例
5. 信頼性評価及び試験の進捗状況

本日お話しするのは、先ほど山崎様のほうからお話がありましたが、内分泌かく乱化学物質とは何ぞやと。ここが揺らいでしまうといろいろなミスリーディングが起きるのではないかと、私は考えています。

その定義を基にして、EXTEND2016における取組と、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ということで、流れ図を山崎様から御提示頂きましたが、その比較的上のほうに当たる内容になるかと思えます。

信頼性評価といってもいろいろな化学論文の信頼性評価の手法には既存の手法が幾つかあるわけですが、そういったものと、このEXTENDでの取組はどのような違いがあるのだろうかということも踏まえて、信頼性評価の事例といったこともお話しさせていただきます。

その信頼性評価を受けると、その次に試験の実施という段階になっていくわけですが、その進捗状況について。これも冒頭に山崎様から物質数については御紹介があったのですが、個々の物質の概要についてもお示したいと思えます。

1. 1. 内分泌かく乱化学物質(ED)の定義

■ 世界保健機関(WHO):

「内分泌系の機能に変化をもたらし、**その結果として未処置**生物、子孫、(準)個体群に有害な健康影響をもたらす**外因性の物質または混合物**」

An endocrine disruptor is an exogenous substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and **consequently** causes adverse health effects in an **intact** organism, or its progeny or (sub)populations.

- WHO/IPCS (2002): Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors

この内分泌かく乱化学物質の定義。世界保健機関(WHO)とIPCSが2002年に発表した「Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors」という非常に有名な本があるのですが、その中で日本語に訳しますと、「内分泌系の機能に変化をもたらし、その結果として未処置生物、子孫、(準)個体群に有害な健康影響をもたらす外因性の物質または混合物」ということで、赤くハイライトしましたが、「その結果として」consequentlyというところになるのですが、これがちょっと重い。次にintact organism、未処置というところも、さてどういうことを指しているのだろうか。

1. 2. WHOの定義に対する疑問(私見)

- **Consequently:**

「その結果として」の意味するところは、「内分泌系の機能に変化をもたらしたことが直接の原因となって生物、子孫、(準)個体群に有害な健康影響をもたらした」ことになるが、生物試験の結果として認められた悪影響をもたらしたメカニズムを知ることは困難では？

- **Intact:**

- 「未処置」の意味するところは、全身毒性や死亡が認められた濃度未満での影響を評価することを意味する？

4

これに関して、私の意見ですが、consequently、「その結果として」の意味するところは、「内分泌系の機能に変化をもたらしたことが直接の原因となって、生物、子孫、(準)個体群に有害な健康影響をもたらした」ことになると思うのですが、一般的に行われている生物試験の結果として認められた悪影響をもたらしたと言った場合、それはメカニズムを知ることは困難ではないかと思うのです。その試験結果からだけではですね。

それからintact、「未処置」の意味するところは、これが全身毒性や死亡が認められた濃度未満での影響を評価することを意味するのではないかというふうにも考えています。つまり、毒性が出たところと、最終的に内分泌かく乱化学物質だと判定するサインになるので、スクリーニングの試験の間では、こういったことは同じ濃度で毒性が現れた場合も参考意見として取り入れることはありますが、最終的な結論を出す場合には、この全身毒性や死亡が認められた濃度未満での影響を評価することを意味するのではないかと考えています。

1. 3. 環境省(庁)における定義

- SPEED'98: [1998年5月]
「外因性内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)」とは、「動物の生体内に取り込まれた場合に、本来、その生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える外因性の物質」
- →「有害性」は言及されていない。(私見)

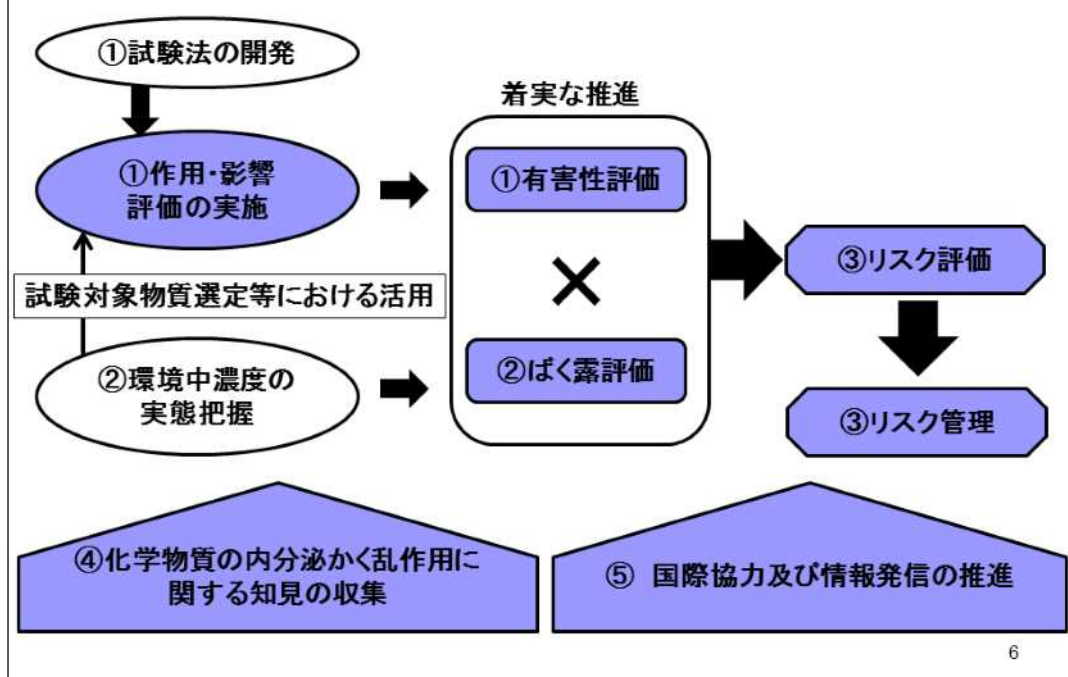
- ExTEND2005: [2005年3月]
内分泌かく乱化学物質とは、「内分泌系に影響を及ぼすことにより、生体に障害や有害な影響を引き起こす外因性の化学物質」とする政府見解(2003年5月)
- →WHO/IPCSの定義に近いが、「その結果として」ほど因果関係が強くはない。(私見)

5

では、先ほどのWHO/IPCSの定義と比べて、環境省(庁)における定義とどう違うのだろうかということで、SPEED'98、1998年、もう大分たちます、ここで定義が書かれています、「外因性内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)」とは「動物の生体内に取り込まれた場合に、本来、その生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える外因性の物質」ということで、先ほどのWHOの定義と比較しますと、有害性ということが言及されていない。当初はホルモンに異常を起こすということが非常に懸念されたというようなところにとどまっていたと考えています。

では2005年、これも大分前になりますけれども、ExTEND2005では、政府見解を引っ張っています。2003年の政府見解です。内分泌かく乱化学物質とは、「内分泌系に影響を及ぼすことにより、生体内に障害や有害な影響を引き起こす内因性の化学物質」。ここは「障害」や「有害」といった言葉が書いてあります。「内分泌系に影響を及ぼすことにより」ということで、若干consequentlyというWHOの言葉よりは因果関係は強くはないのではないかと考えています。

2. 1. EXTEND2016における取組みの概念図



この図も、何回か本日の講演で出てきていますが、作用・影響評価というのは何なのだといいところなのですが、わざわざ「作用・影響」とくっつけているのは、影響となるとこれはいい影響ももちろんあるかもしれませんが、悪影響の評価になるかとは思いますが、その前にやはり内分泌系への作用をすることが大切だろうということで、作用と影響を評価するのだという意味になっています。その後は、リスク評価、リスク管理に至る流れということになります。

2. 2. EXTEND2016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

では物質評価の考えですが、これは山崎様からございましたので、飛ばします。

2. 2. EXTEND2016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) 等での検討対象であったがEXTEND2010及びEXTEND2016では検討対象となっていなかった物質 (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)。

8

入り口なのですが、このリスト化についても山崎様からお話がありましたが、環境リスクが懸念される物質を効果的に抽出することを目的として、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。この「等」がポイントになっています。といいますのは、細かい字になりますが、上から4ポツ目まで、俗に言う黒本調査、その次は公共用水域、要調査項目、農薬残留、こういった実際に環境中での検出状況を調べたものがありますが、これら全ての調査が環境中での実態を100%網羅しているということではないだろうということの議論がだんだん進みまして、物質の範囲としてPRTR対象物質群を入れたり、米国環境保護庁のEDSP、それから欧州化学物質庁(ECHA)等で検討されている物質、または検討結果が公表されているような物質についても対象としよう。やはり国外で検討されている物質についても、日本での状況等も検討する必要があるだろうということを含めております。

また、このEXTENDの中にはいろいろ公開及び非公開の検討会や作業班があるのですが、それらに参加されている専門家の方から、近頃こういう物質について新しい知見が出ているよといったような御指摘を受けた場合には、それらも対象としようということで、若干国内での検出といったことも踏まえて範囲を広げている、母集団を増やしているという状況になります。

信頼性評価は、有害性に着目して既存知見を整理して、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ということが目的になります。

2. 2. EXTEND2016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。

9

では、試験の実施と有害性評価ですが、これもお話がありました、2段階の試験・評価の枠組みを構築しました。

第1段階として、まず試験管内試験、*in vitro*試験と言っていますが、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て、第2段階の長期の生物試験(確定試験)、先ほどからMEOGRTといったような試験法がありますが、優先的に実施すべき物質を抽出する。

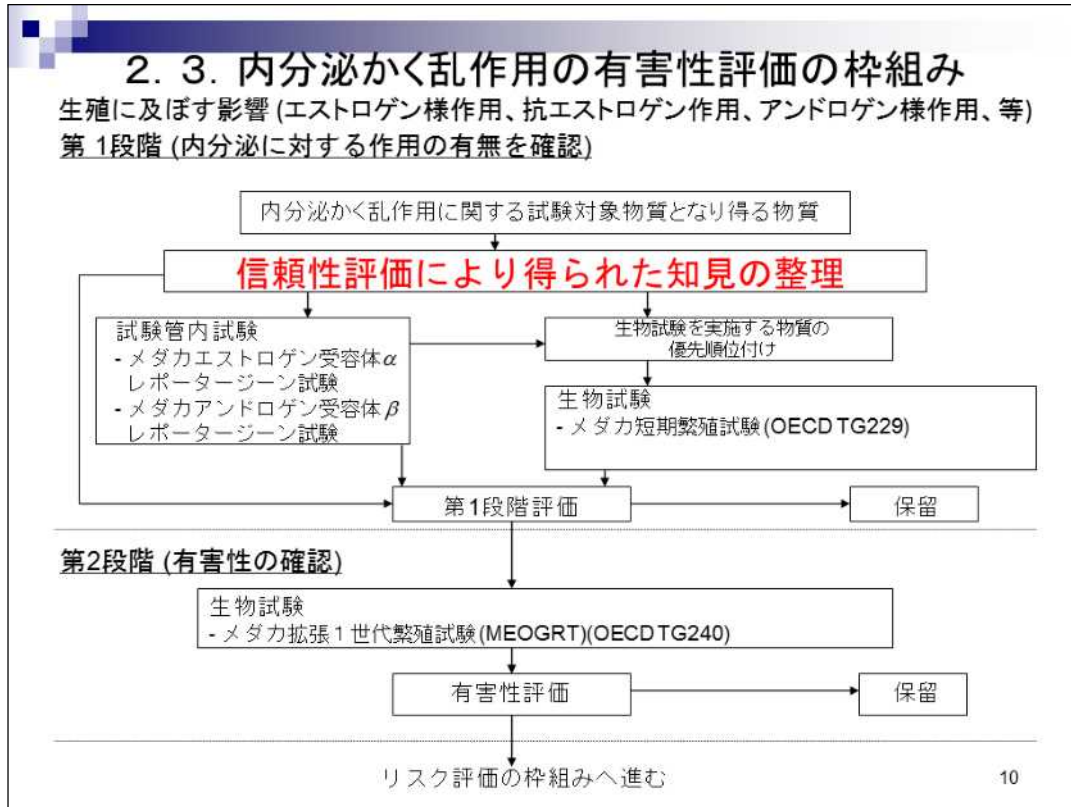
全ての物質を2段階まで行ってしまえばいいのですが、なかなか第2段階目の生物試験というのは時間と費用がかかるということもありまして、やはりこういったセレクションをいろいろかけているということになっています。

この2段階の評価について枠組みを作成して物質の評価を行って、その結果を公表しているのは、現時点では日本のEXTENDと米国のEDSPのみになります。EUも幾つかの結果を報告していますが、それらはほとんど既存文献によるものになります。

2. 3. 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)



では、有害性評価の枠組み。これも何回か出てきています。こういった形で、第2段階は内分泌系に対する作用の有無を確認し、第2段階で有害性の確認といったところでリスク評価の枠組みは進むといった流れになります。

3. 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の進め方(1)(2020年6月版)

3. 0. 信頼性評価の目的

「内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る物質」及び「試験を行って確認すべき作用」の選抜。

3. 1. 化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の検索方法

事務局(弊社)がPubMed及びJDreamIIIを使用し、キーワードを設定して報告の検索を行う。

報告の言語： 英語及び日本語

キーワード検索： 1)(物質名OR CAS番号)AND(disruption OR disruptor OR disrupter OR endocrine OR reproduction OR estrogen OR androgen OR thyroid OR hormone OR metamorphosis)

(物質名OR CAS番号) AND (かく乱 OR 内分泌 OR 生殖 OR 繁殖 OR エストロゲン OR アンドロゲン OR 甲状腺 OR ホルモン OR 変態)

11

では、信頼性評価の進め方ですが、何を行うのかというと、目的としては内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る物質、または試験を行って確認すべき作用の選抜という組合せになるわけです。この物質はエストロゲン作用を持ちそうだといったような組合せを決めていくといったこととなります。

下にあるようなキーワードを使って、主に事務局、弊社になりますが、PubMedとかJDreamIIIを使って報告の検索を行っています。英語と日本語です。近頃中国語の文献が多いというふうな報道もありますが、現時点では英語及び日本語に限っています。

3.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の進め方(2)(2020年6月版)

3. 2. 信頼性評価を実施すべき物質の選抜方法

事務局において文献検索を実施し、報告を入手する。

検索された報告のうち、化学物質の内分泌かく乱作用に関連しない報告²⁾については、信頼性評価の対象としない。

2)体内濃度または環境中濃度の測定結果のみの報告、総説、環境中での分解性に関する報告、名称が類似した別物質に関する報告、用途のみの報告、当該物質を被験物質としてではなく溶媒等として使用した報告、急性毒性に関する報告

信頼性評価を実施すべき報告について、事務局において報告ごとに要旨を作成する。

それから文献検索を実施して報告を入手して、ヒットはしたけれども直接内分泌かく乱作用に関連しない報告、下にありますが、これらについて信頼性評価の対象とはしない。

3.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の進め方(3)(2020年6月版)

3. 3. 信頼性評価を実施すべき報告の選抜方法

信頼性評価を実施すべき報告は以下のとおり。

- * 当該物質を使用した動物試験に関する報告
- * 当該物質を使用した試験管内試験に関する報告
- * 当該物質を対象とした疫学的調査に関する報告

なお、原則として、信頼性評価は、化学物質の内分泌かく乱作用が認められなかった報告も対象とする(現時点では、参考扱い)。

13

当該物質を使用した動物試験に関する報告や、試験管内試験に関する報告や、疫学的調査に関する報告等を対象としていますが、近頃医薬品等に関する検出情報がありまして、そうすると医薬品を使ったヒトへの投与結果も得られておりますので、これは少し疫学的調査とは若干異なるので、そういったものも参考にしようかなということを現在検討中です。

原則として、作用が認められなかった報告も要旨を作成して、後で述べますが、作業班には提示するのですが、一応参考扱い。ただし、作用がないよといった報告も得られていますという物質と、全くそういった情報がない物質というのは区別して考える必要があると思っています。

3. 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の進め方(4)(2020年6月版)

3. 4. 信頼性評価の実施方法

- ・専門家である委員12名で構成された「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」(以下、作業班と言う。)を設置(非公開)。

- ・入手した各報告の写しと事務局において作成した要旨を委員1名に送付し、各委員は信頼性評価シートに報告の内容と評価を記入。

- ・作業班会議(4~5回/年、2~3時間/回)において信頼性評価シートを用いて全委員により信頼性評価を実施。

- ・事務局において信頼性評価結果をとりまとめ、作業班会議において確認・検討。

- ・検討に当たっては、内分泌かく乱化学物質について、前述の「内分泌系に影響を及ぼすことにより、生体に障害や有害な影響を引き起こす外因性の化学物質」とする平成15年5月の政府見解を作業班共通の認識として評価を実施。

専門家である委員12名で構成された作業班、非公開で、ここに述べたような過程で年に大体4~5回行っていますが、専門家1人に評価を頂いて、それを委員に集まっていたら全員で討議して、この文献は妥当であるか、信頼性があるかどうか、あとは内分泌系に関連があるのかどうかといったところを評価していきます。その際には、冒頭に申しました政府見解といった定義を前提にしております。

3.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の進め方(5)(2020年6月版)

以下の評価を行い、「今後の対応案」をとりまとめる。

- ・「報告結果(Results)を検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」
- ・「内分泌かく乱作用との関連の有無」
- ・「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」

15

ではどういう評価を行っているかという、再現性といったところを重要視しています。報告にはresultsとmaterials and methodsといった記載があるのですが、ここが不十分ですと再現ができないということになります。

次に、内分泌かく乱作用との関連の有無。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といったようなことを評価軸にしております。

3. 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の進め方(6) (2020年6月版)

(1) 「報告結果(Results)を検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」を行う際の評価項目について

「材料と方法(Materials and Methods)」に関する記載については以下の項目に基づいて評価を行う。

試験の再現が可能な情報の記載の有無が重要！！！！

*** 被験物質の妥当性**(CAS No.、純度、組成、入手先、溶媒使用の記載など)

農薬等の市販製品を使用した場合は、同時に原体についても試験対象とすることが望ましい。

*** 試験濃度(用量)の妥当性**(設定濃度範囲、区数、実測の有無など)

16

先ほども申し上げましたが、materials and methodsということでは、再現性を重視して、ここに書いてありますが、例えば被験物質の妥当性(CAS No.、純度、組成、入手先、溶媒使用の記載など)。論文というのは費用がかかるものですから、あまり長々と書けないと思うのですが、ぜひこういったところは記載をしていただければと思います。

それから、農薬等の市販製品を使用した試験では、製品と同時に原体についても試験対象としていただくと比較ができるということで、時々事例としてあるのは、原体は全く作用が認められなかったのだけれども、製品になるとどうやら作用がありそうだななんていう事例もありましたので、ぜひこういったことも考慮頂けると、試験を行っていただければ、その報告について信頼性があるというふうになるとと思います。

また、試験濃度の妥当性。先ほどJMASAのところでも濃度が高過ぎると成長阻害が起きてしまって、それが実際の評価を行うエンドポイントを不明確にしてしまうということもありますので、設定濃度の範囲や区数や実測の有無などがどう記載されていたということが重要になります。

3. 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の進め方(7) (2020年6月版)

* 試験動物(細胞、受容体等を含む)の妥当性(入手先、系統、学名、成長段階の記載、試験個体数など)⇒天然で採取した動物を用いて、直ちに試験を行ったら不可

* 結果の解析方法の妥当性(試験結果に関する統計学的検討の有無、繰り返しの回数など)

* 試験方法や調査方法の妥当性(試験目的との整合性、試験期間など)

* ばく露(投与)方法の妥当性(通常のばく露(投与)経路であるかなど)

17

それから試験動物、この入手先や系統や学名、成長段階、試験個体数などといったものも記載されているかどうかをチェックします。

例えば天然で採取してきた動物を用いて直ちに試験を行ったら、これは不可で、結構いろいろなところであまりよく知らないような動物を使った試験といったものの論文が公表されているのですが、この枠組みではそういった試験は取り扱わない、信頼性が低いというふうに評価しています。

それから、結果の解析方法の妥当性。やはり統計学的検討がないと非常に採用しづらい。あと繰り返し回数が1回なんていうものだと、また非常に妥当性がないのではないかというふうに考えられます。

また、試験方法と調査方法が、目的や結果との整合性があるのかどうか。それからばく露(投与)方法の妥当性といったようなところも評価のポイントになっています。非常に細かいことをやっているということを御理解頂ければと思います。

例.ノニルフェノール(Nonylphenol:以下、NP)の異性体について

CAS Number* 英語名 化学名	論文等での表記	略号	備考
25154-52-3 nonylphenol ノニルフェノール	NP 4-NP(mixture of isomers) NP(technical mixture)	NP	多種類のNP異性体の混合物 工業製品 不純物として、オクチルフェノール、デシルフェノール等を含む
136-83-4 <i>o</i> -nonylphenol 2-ノニルフェノール	<i>ortho</i> -NP <i>o</i> -NP 2-NP	2- <i>r</i> -NP	単一製品としては製造されていない
104-40-5 4- <i>r</i> -nonylphenol <i>p</i> -ノニルフェノール	Normal-NP Linear-NP <i>r</i> -NP(mixed isomers)	4- <i>r</i> -NP	4- <i>r</i> -NPと2- <i>r</i> -NPの混合物
84852-15-3 nonylphenol 4-ノニルフェノール (分岐鎖異性体混合物)	4-NP(mixture of branched chain isomers) NP 4-NP, tech 4-NP, (99%,)mixture of isomers 4-NP, verzweit 13, 259 4-NP(mixture)	4-NP(branched)	4-NP異性体(分岐型)(>90%)の混合物で2-NP(分岐型)(<4%)を不純物として含むことがある

18

例えばノニルフェノールですが、ノニルフェノールと言ってもいろいろな異性体があります。この中で特に今日この後に川原様からお話いただくのは、この一番下の4-ノニルフェノールの分岐鎖異性体混合物といったもので、つまり単にノニルフェノールと言うと多種類の異性体の混合物ですので、そうするとそれぞれ1つの物質の作用が強かった場合、混合物を扱うと作用が隠れてしまう場合があります。ということで、ノニルフェノールについて、こういうCAS No.等が十分に記載されていないと再現性がないといった事例になります。

例. 4-ノニルフェノール(分岐型)に該当する試薬一覧
 主要試薬会社のインターネットカタログ(2015/2/24現在)において
 #84852-15-3とされているノニルフェノール類

試薬会社	試薬名	備考
関東化学	4-Nonylphenol (環境分析用)	<i>p</i> -Nonylphenolは直鎖型CAS# 104-40-5とされている
東京化成	4-Nonylphenol (mixture of branched chain isomers)	Nonylphenol試薬はこれのみと思われる
ナカライテスク	4-Nonylphenol (mixture of branched chain isomers)	
和光純薬	Nonylphenol (mixture of isomers)	
Acros Organics	4-Nonylphenol (99%, mixture of isomers)	Nonylphenol試薬はこれのみと思われる
Fluka	Nonylphenol (PESTANAL®, technical mixture)	4-NonylphenolはCAS# 104-40-5とされている
Schenectady International	<i>p</i> -Nonylphenol (high grade)又は <i>p</i> -Nonylphenol (technical grade)	Nonylphenol試薬はこれのみと思われる
Sigma-Aldrich	Nonylphenol (technical grade, mixture of ring and chain isomers)	4-Nonylphenolは直鎖型CAS# 104-40-5とされている

19

試薬としては、試薬メーカーはもう2015年ですから結構前ですが、カタログにノニルフェノール(分岐型)として書かれているのですが、その中身はいろいろ種類があるぞということを示して、どれを選んだか。要は試薬会社を記載していないと、どの物質を使ったのかが分からないということになります。

3.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の進め方(8)(2020年6月版)

評価を行う際は下記の手順で実施する。

I. 個別の報告について、上記の項目について「○：十分に記載されている」、「△：一部記載が不十分である」又は「×：記載が不十分である」と評価する。

例えば、

被験物質について、入手先と純度の一方が記載されていない報告については、「△：一部記載が不十分である」とする。

被験物質について、入手先も純度も記載されていない報告については、「×：記載が不十分である」とする。

それぞれの報告について、「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」といった評価をして、信頼性を確認しています。

3.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の進め方(9)(2020年6月版)

(2)「内分泌かく乱作用との関連性の有無」を判断する際の項目について

①「内分泌かく乱作用との関連性の有無」については下記に基づいて評価を行う。

I. 評価項目の妥当性(内分泌かく乱作用との関連性の有無など)

OECD等で開発中の化学物質の内分泌かく乱作用をスクリーニングするための評価項目(雄魚における肝臓中または血清中ビテロゲニン濃度等)を参考とする。

それから内分泌かく乱作用との関連性の有無は、OECD等で開発中の化学物質の内分泌かく乱作用をスクリーニングするための評価項目、先ほどから何遍か出てきていますが、雄の魚の肝臓中または血清中のビテロゲニン濃度等を参考としています。

3.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の進め方(10)(2020年6月版)

Ⅱ. 被験物質の内分泌かく乱作用との関連を示唆する項目となる試験結果は以下のとおり。

* 化学物質とホルモン受容体との結合性等を指標とする試験管内試験(エストロゲン作用、アンドロゲン作用、アロマターゼ活性の誘導作用及び甲状腺ホルモン作用等)の結果

* 生殖器、甲状腺、下垂体等の内分泌系への影響、生殖への影響、発達影響や内分泌系を介した免疫系や神経系への影響に関する動物試験結果及び疫学的調査結果

* 死亡や体重の低値が認められた濃度での影響は「毒性」と判断する。

被験物質の内分泌かく乱作用との関連を示唆する項目となる試験結果は、試験管内結果は非常に明らかなです。それから生殖器、甲状腺、下垂体等の内分泌系への影響、生殖への影響、発達影響や免疫系や神経系への影響に関する動物試験結果及び疫学的調査で、死亡や体重の低値が認められた濃度での影響は「毒性」と判断する場合があります。

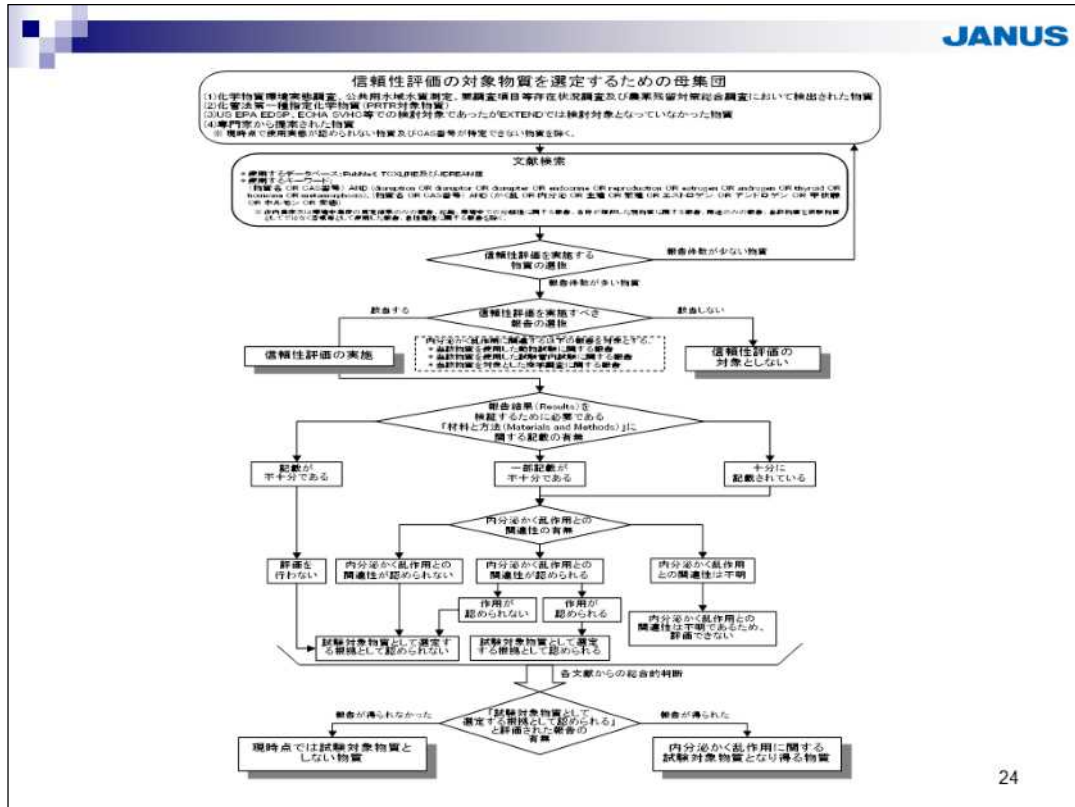
3.化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価の進め方(11)(2020年6月版)

(3) 「今後の対応案」のとりまとめを行う際の手順について
個々の文献の信頼性評価結果を踏まえ、物質ごとに総合的な判断により

- ・ 「現時点では試験対象物質としない物質」
- ・ 「内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る物質」

のいずれかに分類する。

「現時点では試験対象物質としない物質」と「試験対象物質となり得る物質」というふうに分けます。



これがその体系で、非常に細かいことをやっているということだけ御理解頂ければと思います。

4.信頼性評価の事例(1)

- ・『材料と方法(Materials and Methods)』は十分に記載されていると評価され、内分泌かく乱作用との関連性が認められると評価され、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の例(1)

- ・Aら(2004)によって、トリクロサン12.8、60.8、136.9 $\mu\text{g/L}$ (測定濃度)に21日間ばく露した成熟雌雄メダカ(*Oryzias latipes*)への影響が検討されている。その結果として、12.8及び60.8 $\mu\text{g/L}$ のばく露区で雄肝臓中ビテロゲニン濃度の高値、12.8及び136.9 $\mu\text{g/L}$ のばく露区で雌生殖腺体指数の高値、12.8 $\mu\text{g/L}$ のばく露区でF₁孵化率の低値、雌肝臓体指数の高値、60.8 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露区で雄生殖腺体指数の高値、136.9 $\mu\text{g/L}$ のばく露区で雌体長の低値、雄肝臓体指数の高値が認められた。

- ・体長の低値が認められない濃度範囲において、雄肝臓中ビテロゲニン濃度の高値が認められ、内分泌かく乱作用との関連性が認められると評価された。

- ・想定される作用メカニズム：エストロゲン作用

25

では、信頼性評価ということの形ばかりだけれども、実際はどうだろうということで、まず非常に信頼性があると認められた、著者は匿名にしていますが、トリクロサンを使ったメダカの試験ですが、孵化率の低値であるとかがあるけれども、一番高い濃度では体長の低値があった。最後にありますように、体長の低値が認められない濃度範囲で雄肝臓中ビテロゲニン濃度の高値が認められ、内分泌かく乱作用との関連が認められると評価されて、想定されるメカニズムはエストロゲン作用ということで、トリクロサンはエストロゲン作用がありそうで、その情報には信頼性があるというふうに評価を行っています。

4.信頼性評価の事例(2)

同(2)

・ B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。

・ 体重の低値が認められない用量範囲において、雄AGD、雄前立腺絶対重量の低値が認められたことから、内分泌かく乱作用との関連性が認められると評価された。

・ 想定される作用メカニズム：抗アンドロゲン様作用

26

同様に信頼性がありそうだと認められたものは、フタル酸ジイソブチルを使った文献ですが、これの中身は省きますが、体重の低値が認められていない用量範囲において、雄の肛門生殖突起間距離、雄の前立腺絶対重量の低値が認められたことから、内分泌かく乱作用との関連性が認められると評価されて、抗アンドロゲン様作用だろうと。フタル酸ジイソブチルは抗アンドロゲン様作用があるのではないかとこのように評価します。

4.信頼性評価の事例(3)

- ・『材料と方法(Materials and Methods)』は、記載が不十分であると評価され、試験対象物質として選定する根拠として認められないと評価された報告の例(1)
- ・Cら(2006)によって、フルタミド100、500、1,000 $\mu\text{g/L}$ (設定濃度)に21日間ばく露した成熟雌ファットヘッドミノー(*Pimephales promelas*)への影響が検討されている。その結果として、500 $\mu\text{g/L}$ のばく露区で血漿中ビテロゲン濃度の高値が認められた。
- ・被験物質の入手先及び純度の記載がないことから、記載が不十分であると評価された。

27

記載が不十分だという例ですが、フルタミドを使ったファットヘッドミノーの試験なのですが、フルタミドの入手先及び純度の記載がないから、これはどういうフルタミドを使ったのか分からない、再現ができないということで、根拠としては認められないという、信頼性がないというふうに評価された文献の例です。

4.信頼性評価の事例(4)

同(2)

・ Dら(1999)によって、ビスフェノールA 0.01、0.1 μ M(=2.28、22.8 μ g/L)の濃度(設定濃度)にNieuwkoop-Faber stage 38/40から12週間ばく露したアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)への影響が検討されている。その結果として、0.1 μ M(=22.8 μ g/L)のばく露区で雄性比の低値が認められた。

・ 被験物質の純度及び試験方法(餌の種類等)の詳細な記載がないことから、記載が不十分であると評価された。

28

次も同様ですが、ビスフェノールAを使ったアフリカツメガエルへの影響ですが、これも被験物質の純度、メーカーは書いてあったのですが、試験方法(餌の種類)の詳細な記載がない。つまり餌の記載がないと、餌からどういうばく露がされたか分からないということで、記載が不十分というふうに評価して信頼性は低いと考えています。

4.信頼性評価の事例(5)

同(3)

・ Eら(2013)によって、ジフェノコナゾール(Score® 25EC、Syngenta Agro、25%水溶液) 52±6、98±6ppm(餌中濃度)を1年齢以上から10日間混餌投与した鳥類アカアシワシャコ(*Alectoris rufa*)への影響が検討されている。その結果として、52ppm以上のばく露群で卵長、受精率、血漿中レチニルパルミチン酸濃度、孵化率の低値、98ppmのばく露群で産卵の卵殻厚、赤血球中スーパーオキシドディスムターゼ比活性の高値が認められた。

・ 低純度の製品を用いて実施された試験であること、試験生物の入手先が野外であり、対象物質の影響と特定できないと評価された。

29

また、ジフェノコナゾールを使ったこの文献では、25%水溶液と書いてあるように、低純度の製品を用いて実施された試験であることと、試験生物の入手先が野外であり、対象物質の影響と特定できない。野外でどういったばく露をされたか分からないということで、これも信頼性が低いと評価されている文献です。

4.信頼性評価の事例(6)

同(4)

・ Fら(1997)によって、グリホサートについて、カナダOntario Farm Family Health Studyにて1991年から1992年にかけて農場内作業従事者(夫婦1,898組、妊娠3,984件)への影響が検討されている。その結果として、男性の作物用除草剤としてのグリホサートの使用と流産17件とにリスク率13.7%(補正オッズ比1.5、95%信頼区間0.8~2.7)、男性の牧場用除草剤としてのグリホサートの使用と流産13件とにリスク率13.4%(補正オッズ比1.4、95%信頼区間0.7~2.8)、男性の作物用除草剤としてのグリホサートの使用と早産(妊娠期間37週間未満)5件とにリスク率5.1%(補正オッズ比2.4、95%信頼区間0.8~7.9)、男性の作物用除草剤としてのグリホサートの使用と未熟児(10th percentile未満)5件とにリスク率5.2%(補正オッズ比0.8、95%信頼区間0.2~2.3)が認められた。

・ **ばく露を示す指標が測定されておらず**、対象物質の影響と特定できないと評価された。

30

同様にグリホサートを使った疫学的調査の事例ですが、中身の細かいことは省きますが、ばく露を示す指標が測定されておらず、対象物質の影響と特定できない。グリホサートだけとは特定できないということで信頼性は低いと評価しています。

4.信頼性評価の事例(7)

同(5)

・ Gら(1983)によって、ベノミル(純度50%の製品)1.0、6.3、203ppm(餌中濃度)を70日間混餌投与した雄Wistarラットへの影響(投与開始45日目から5日間交配試験、投与開始60日目に精子検査)が検討されている。その結果として、1.0ppm以上のばく露群で右精巣絶対及び相対重量、左精巣絶対及び相対重量、交配試験における妊孕率の低値、203ppmのばく露群で射精液中精子数の低値が認められた。なお、交配試験における雌右黄体数、雌左黄体数、同腹仔数、胎仔体重、胎仔生存率、着床前胚消失数、胚吸収率には影響は認められなかった。

・ 被験物質の純度が50%と低く、対象物質の影響と他の添加物の影響とが区別できないため、対象物質の影響と特定できないと評価された。

31

また、今度はベノミルを使った文献ですが、被験物質の純度が50%と低く、対象物質の影響と他の添加物の影響とが区別できないため、これも特定できないということで信頼性が低いといった評価をしています。

4.信頼性評価の事例(8)

同(6)

・ Hら(2011)によって、過塩素酸アンモニウム0.006、0.34、12.75mg/kg/day(06:30、11:30、16:30に三等分とする)を15日間混餌投与した哺育期雌アカゲザルへの影響が検討されている。その結果として、0.34mg/kg/day以上のばく露群でヨウ素取り込み率の低値が認められた。

・ 各用量における試験動物数が1頭であることから、結果の統計学的検討が行えず、対象物質の影響と特定できないと評価された。

32

また、過塩素酸アンモニウムを使った報告は、各用量における試験動物数が1頭であることから、試験の統計学的検討が行えず、対象物質の影響と特定できないと評価されています。

5.信頼性評価及び試験の進捗状況 (2020年11月末時点) (1)

○信頼性評価の対象として選定した物質数

→209物質

○信頼性評価を実施した物質数

→201物質

○内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る物質とされた物質数

→156物質

<http://www.env.go.jp/chemi/end/substances.html>

33

このような評価を行って、現時点では信頼性評価の対象と選定したのは、11月の時点ですが209物質。そのうち201物質について信頼性評価が終了しています。試験対象となる物質としては156物質が選定されています。

第1段階試験管内試験の結果 (1) (chemicals listed in EDSP first list)

Chemicals	Estrogen	Anti-estrogen	Androgen	Anti-androgen	Thyroid hormone	Anti-thyroid hormone	Ecdysone
Atrazine EDSP not to go to Tier 2	N	N	N	N	N	N	N
Carbaryl EDSP to go to Tier 2	N	N	N	P		N	
Carboflan EDSP not to go to Tier 2	N	N	N	N			
Diazinon EDSP not to go to Tier 2	P	N	N	N			
2,4-Dichlorophenoxy acetic acid EDSP not to go to Tier 2	N	N	N	N		N	
Methomyl EDSP not to go to Tier 2	N	N		N			
Simazine EDSP not to go to Tier 2	N	N	N	N			

P : Positive
N : Negative

34

大西様からお話がありましたが、では次に信頼性評価を受けて、第1段階の試験管内試験になりますが、左に物質名がありますが、先ほどお話ししました米国でのEDSPとの整合性があるかということで、2~3例をお示したいと思います。

アトラジンというのが一番上にありまして、EDSPは第2段階には進まない。要は第1段階でもう評価は十分で、作用はないと言ったアトラジンになりますが、EXTENDで行ったエストロゲンからエクダイソンへの第1段階試験結果は全部ネガティブですので、EXTENDでもそれ以上は進まないというふうに整合しています。

次のカルバリルですが、EDSPでは第2段階の試験に進むと言っていて、EXTENDでも抗アンドロゲン様作用のところ試験管内試験でポジティブに出ていますので、EXTENDでも第1段階の生物試験を行おう。ただし、現時点では、まだこの試験法は開発中ということになります。

カルボフランもアトラジンと同様です。

それからダイアジノンに関しては、EDSPでは第2段階に進まないとしたのですが、EXTENDではエストロゲン作用についてポジティブであったためにここで赤くしましたが、第1段階の生物試験を行っていて、その結果として次の段階には進まない、後ほど御説明しますが、ということでこれも整合している。次の2,4-ジクロロフェノキシ酢酸も整合しています。その次の2つも同じです。

第1段階試験管内試験の結果(2) (chemicals listed in EDSP first list)							
Chemicals	Estrogen	Anti-estrogen	Androgen	Anti-androgen	Thyroid hormone	Anti-thyroid hormone	Ecdysone
Glyphosate EDSP not to go to Tier 2	N	N	N	N			
Tebuconazole EDSP to go to Tier 2	N	N	N	N	N	N	
Metolachlor EDSP not to go to Tier 2					N	N	
Propiconazole EDSP to go to Tier 2	N	N	N	N	N	N	
Chlorothalonil EDSP to go to Tier 2					N	N	N
Linuron EDSP to go to Tier 2	N	N	N	N	N	N	
Chlorpyrifos EDSP not to go to Tier 2	P	N		N	N	N	
Dimethoate EDSP to go to Tier 2	N	N	N	N	N	N	
Iprodione EDSP to go to Tier 2	N	N	N	N			

P : Positive
N : Negative

35

次に、ここでは真ん中4番目のプロピコナゾールに関しては、EXTENDでは全部ネガティブだったのですが、EDSPでは第2段階を行う。クロロタロニルもそうです。

それからリニュロンについてもそうになっている。

クロルピリホスは逆で、EXTENDでは進むといったように、いろいろ合致しない点もあります。

第1段階試験管内試験の結果(3) (chemicals listed in EDSP first list)

Chemicals	Estrogen	Anti-estrogen	Androgen	Anti-androgen	Thyroid hormone	Anti-thyroid hormone	Ecdysone
Dichlobenil EDSP to go to Tier 2	N	N	N	N			
Cypermethrin EDSP to go to Tier 2	N	N	N	N			
Pyriproxyfen EDSP not to go to Tier 2	N						
Microbutanil EDSP to go to Tier 2	N	N	N	N			
o-Phenylphenol EDSP to go to Tier 2	N	N	N	N			
Flutolanil EDSP to go to Tier 2	N	N	N	N			
Metalaxyl EDSP to go to Tier 2		N		N			

N : Negative

36

時間の関係で少々割愛します。

第1段階試験管内試験の結果(4) Positive							
Chemicals	Estrogen	Anti-estrogen	Androgen	Anti-androgen	Thyroid hormone	Anti-thyroid hormone	Ecdysone
Bisphenol A	P	N	N	P		N	
Cyanazine		P					
Diisobutyl phthalate	P	N		N			
Diuron		N		P			
Estrone	P			P			
Fenitrothion	N	N	N	P			
Fenvalerate	P	N		N	N	N	
Flutamide	N	N	N	P	N	N	N
Methylparaben	P	N					
1-Naphthol	P			N		N	
4-Nonylphenol (branched)	P		N	N	N	N	
4- <i>t</i> -Octylphenol	P			N		N	
4- <i>t</i> -Pentylphenol	P			P			
Perfluorooctanic acid	N	N	N	P		N	
Phenitoin		P	N			P	
2,4,6-Tribromophenol		N				P	
Triclosan	P	N		N	N	N	
Triphenyl phosphate	P	N		N			

P : Positive
N : Negative

第1段階試験管内試験の結果でポジティブだった物質がここにありますが、赤くした物質については全部第1段階の生物試験を行っています。

第1段階試験管内試験の結果(5) Positive

Chemicals	Estrogen	Anti-estrogen	Androgen	Anti-androgen	Thyroid hormone	Anti-thyroid hormone	Ecdysone
Procymidone	N	N	N	P	N	N	
Propylparaben	P	N					
Chlormadinone acetate	N	N	N	P			
Benomyl	N	N		P			
Tebufenozide							P
Manzeb	N	N	N	P	N	N	
Maneb	N	N	N	P	N	N	
Tonalide	N	N		P			
Benzophenone-2	P	N		P	N	P	
Pendimethalin	P						
Sulfamethoxazole	P			N			
17 β -Estradiol	P			P			
17 α -Ethinylestradiol	P			P			
2,4-Dichlorophenol	P	N	N	N			

P : Positive
N : Negative

38

ここに示したとおりです。

第1段階試験管内試験の結果(6) Positive

Chemicals	Estrogen	Anti-estrogen	Androgen	Anti-androgen	Thyroid hormone	Anti-thyroid hormone	Ecdysone
Tricresyl phosphate	P	N	N	N			
Mefenamic acid	N	P	N	N			

P : Positive
N : Negative

39

これらも同様です。

第1段階試験管内試験の結果 (7) Negative

Chemicals	Estrogen	Anti-estrogen	Androgen	Anti-androgen	Thyroid hormone	Anti-thyroid hormone	Ecdysone
Acrylamade	N	N	N	N			
Alachlor	N			N	N	N	
Carbendazim	N	N	N	N	N	N	
Decabromodiphenyl oxide(PBDE#209)	N	N		N	N	N	
Dibutylhydroxytoluene	N			N			
Dichlorobromomethane	N	N	N	N			
Dichlorvos				N			
p-Dichlorobenzene	N	N		N			
N,N-Dimetylformamide	N			N			
2,4-Dinitrophenol						N	
Fenthion	N	N	N	N			
Hydrazine	N	N	N	N			
Molinate		N	N	N			
Naphthalene			N				
Perchloric acid					N	N	
Phenobalital	N	N	N	N	N	N	
Phenol	N	N	N	N			
Tetrabromobisphenol A	N	N		N	N	N	
2,4-Toluenediamine	N			N			

N : Negative

40

それからネガティブだった物質は、もちろん第1段階の生物試験は行っていません。

第1段階試験管内試験の結果(8) Negative

Chemicals	Estrogen	Anti-estrogen	Androgen	Anti-androgen	Thyroid hormone	Anti-thyroid hormone	Ecdysone
Ethylene glycol monoethyl ether					N	N	
Carbon disulfide	N	N	N	N	N	N	
Nonylphenol ethoxylate (1-15)	N						
Nitrobenzen	N	N	N	N			
Fluoranthene	N			N	N	N	
Trichloroacetic acid	N			N			
Fipronyl				N	N	N	
Acrylnitrile	N	N	N	N			
Dibromochloromethane	N	N	N	N			
Butachlor	N	N	N	N	N	N	
2-Bromopropane		N		N			
1-Bromopropane					N	N	
Perfluorododecanoic acid					N	N	
Methyl- <i>t</i> -butyl ether	N	N			N	N	
Styrene					N	N	
<i>t</i> -Butyl alcohol					N	N	
Thiourea					N	N	
Ziram					N	N	
Melamine	N	N	N	N			

ここに上げたように、

第1段階試験管内試験の結果(9) Negative

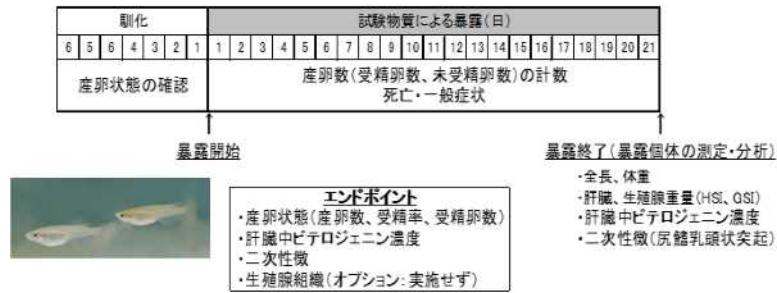
Chemicals	Estrogen	Anti-estrogen	Androgen	Anti-androgen	Thyroid hormone	Anti-thyroid hormone	Ecdysone
Pyrene	N	N	N	N			
Dibutyltin		N					
Sertraline	N	N	N	N			
p-Nitrophenol	N	N	N	N			

ネガティブなものが結構あります。

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

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ゲン濃度及び二次性徴を調べる試験法である。



43

TG229、何回かお話が出てきますが、タイムラインが今まで示されてなくて、ここでお示ししておきます。

第1段階生物試験の結果:OECD TG 229 Medaka

- 第1段階生物試験(TG229 Medaka)がこれまでに20物質について実施された。
 - エストロゲン様作用が11物質について検出された。
Estrone, 4-*t*-Pentylphenol, Methylparaben, 4-Nonylphenol (branched), 4-*t*-Octylphenol, Bisphenol A, Propylparaben, Benzophenone-2, Pendimerthalin, 17 β -Estradiol, 17 α -Ethinylestradiol
 - 抗エストロゲン様作用が2物質について検出された。
Triphenyl phosphate, Diisobutyl phthalate
 - アンドロゲン様作用が検出された物質は得られなかった。
 - 繁殖に関する有害性が16物質について認められた。
Estrone, Cyanazine, Phentoin, Diazinon, Triphenyl phosphate, 1-Naphthol, 4-*t*-Pentylphenol, Methylparaben, Triclosan, 4-Nonylphenol (branched), Bisphenol A, Propylparaben, Benzophenone-2, Pendimerthalin, 17 β -Estradiol, 17 α -Ethinylestradiol
 - Tricresyl phosphateについてTG229が実施中である。

44

これまでに、エストロゲン作用が11物質について検出されています。20物質について行ってです。抗エストロゲン作用が2物質、それから繁殖に関する有害性が16物質について認められています。

第1段階生物試験の結果 (1)

Chemicals ($\mu\text{g/L}$)	Estroge n	Anti- estrogen	androge n	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.
Methylparaben 357,1900,9750	P	N	N	TG229: Low number of eggs and fertility. High male vtg..
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

45

その結果がこれです。詳細は省略します。

第1段階生物試験の結果(2)

Chemicals (µg/L)	Estrogen	Anti-estrogen	androgen	Results (Summary)
4-t-Pentylphenol 58.4, 227, 940	P	N	N	TG229: Low number of eggs and fertility. High male/female vtg. and male HIS.
Diazinon 38, 196, 598, 952	N	N	N	TG229: Low number of eggs, fertility, male/female body weight, male/female body length, male/female HSI and male/female GSI.
Fenvalerate 0.019, 0.294, 1.30	N	N	N	TG229: No significant difference were observed.
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.
Cyanazine 110, 349, 1020	N	N	N	TG229: Low number of eggs, fertility, female GSI and male/female HSI.
Phenitoin 2250, 4760, 8720, 18510	N	N	N	TG229: Low number of eggs and fertility. High mortality, female GSI and male HSI.

P : Positive
N : Negative

46

省略します。

第1段階生物試験の結果(3)

Chemicals ($\mu\text{g/L}$)	Estrogen	Anti-estrogen	androgen	Results (Summary)
Flutamide 118,243,477,982	N	N	N	TG229: No significant difference were observed.
Diisobutyl phthalate 35,184,836	N	P	N	TG229: Low female vtg..
Triclosan 54.5,103.9,176.8,352.8	N	N	N	TG229: Low number of eggs, fertility and male vtg.. High female vtg. and mortality.
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

47

これも省略します。

第1段階生物試験の結果(4)

Chemicals (µg/L)	Estrogen	Anti-estrogen	androgen	Results (Summary)
Benzophenone-2 94.3, 939, 9530	P	N	N	TG229: Low fertility. High male vtg..
Pendimethalin 5.69, 28.8, 100	P	N	N	TG229: Low fertility. High male vtg..
1-Naphthol 80, 258, 857	N	N	N	TG229: Low number of fertilized eggs. High female vtg..
Propylparaben 311, 926, 2940	P	N	N	TG229: Low number of eggs and fertility. High male/female vtg..

P : Positive
N : Negative

48

これも省略します。

第2段階生物試験の結果: TG 240 MEOGRT

■ 第2段階生物試験(TG240)がこれまでに4物質について実施された。

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 $\mu\text{g/L}$ (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、 $3.6 \times 10^{-8} \text{M}$ で、 17β -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 $\mu\text{g/L}$ 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(9.81 $\mu\text{g/L}$ 未満)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 $\mu\text{g/L}$ 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 $\mu\text{g/L}$ 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 $\mu\text{g/L}$ 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 $\mu\text{g/L}$ (4-NP(b)異性体合計値)の約2倍であった。

49

先ほどMEOGRTの試験について、山本先生から御発表がありました。この後、川原様からもこの試験結果についてのお話があると思いますが、4-ノニルフェノール(分岐型)を使った結果については、一番最後になります。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、LOECが1.27。これは環境中で検出された濃度の約2倍ということで、個人的意見ですが、これはリスクがあるのではないかと考えます。

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 $\mu\text{g}/\text{L}$ (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、 $2.2 \times 10^{-7} \text{M}$ 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 $\mu\text{g}/\text{L}$ のばく露群において総産卵数、受精率の統計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(1,000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 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、1,000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 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 $\mu\text{g}/\text{L}$ 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 $\mu\text{g}/\text{L}$ は、平成26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0.28 $\mu\text{g}/\text{L}$ の約3,570倍であった。

50

同じようにビスフェノールAですが、一番下の行で環境中濃度との比較がありますが、3,570倍ということで、これも個人的意見ですが、ビスフェノールAはリスクは低いのかなと考えます。

ちなみにエストロン及び4-*t*-オクチルフェノールも、山本先生の御発表がありましたが、エストロンは70倍程度となるとリスクがあるのかな。4-*t*-オクチルフェノールも320倍、これもそうかなということで、1,000倍程度が一つの線引きになるのではないかと考えています。

第2段階生物試験の結果: TG 240 MEOGRT

- エストロン及び4-*t*-オクチルフェノールの試験結果は、山本先生のご発表を参照ください。
- 参考までに、
- 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、284ng/Lが得られた(LOECについては検討中)。
- メダカの繁殖に対する有害性が示唆されたばく露濃度284ng/Lは、平成28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4.1ng/Lの約70倍であった。
- 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、9.91µg/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。

51

以上で発表を終わります。

次に示した写真は、この後に井口先生から発表がある日米の会議の様子を示したもので、つなぎになればと思います。

ご清聴いただき、ありがとうございました。



kawasima@janus.co.jp

52

御清聴頂き、ありがとうございました。