

平成 12 年度第 2 回内分泌攪乱化学物質問題検討会議事概要

日時：平成 12 年 10 月 31 日（金） 10 時～ 12 時

場所：ホテルフロラシオン青山

出席委員：井口 泰泉、井上 達、大島 康行、小野 勇一、鈴木 継美（座長）
住吉 好雄、高杉 暹、田中 克彦、本城 凡夫、増井 光子
松尾 昌とし、宮本 純之、村田 幸雄、森 千里、安野 正之、
若林 明子

（オブザーバー）青山 博昭

事務局：西尾環境保健部長、上田環境安全課長 他

- 議題：1 平成 11 年度内分泌攪乱化学物質にかかる全国一斉調査結果について
2 平成 12 年度に優先してリスク評価に取り組む物質の選定及びスクリーニング・試験方法について
3 平成 11 年度ヒト精巢の継続的調査及び臍帯におけるダイオキシン類等化学物質の蓄積・曝露状況調査結果について
4 その他

議事要旨

- 1 平成 11 年度内分泌攪乱化学物質にかかる全国一斉調査の結果等について説明し、調査結果について議論が行われた。
- 2 平成 12 年度に優先してリスク評価に取り組む物質として 7 月 21 日の本検討会で選定した 7 物質（トリブリス、4-オクチルフェノール、ニルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、オクタドシル、ベンゾフェノール、フタル酸ジシロキシル）にフタル酸ジ-2-エチルキシルを加え計 8 物質とすることが決定した。
なお、n-ブチルベンゼンについては、現時点では現実的なリスクが想定しがたく、現時点でリスク評価する必要はないことが了承された。
- 3 平成 11 年度ヒト精巢の継続的調査及び臍帯におけるダイオキシン類等化学物質の蓄積・曝露状況調査の結果について説明し、調査結果について議論が行われた。
- 4 1998 年 5 月に発表した環境ホルモン戦略計画 SPEED'98 に今後の環境庁としての方針やその後の取り組み状況、新しい知見等を追加・修正することについて意見等があれば 11 月上旬までに提出することとなった。

平成 12 年度に優先してリスク評価に取り組む物質の追加について

1. 経緯

内分泌攪乱作用が疑われる物質について、政府はミレニアムプロジェクトにより平成 12 年度から 3 年間で 40 物質以上についてリスク評価を実施することとなっている。

そこで、平成 12 年 7 月及び 10 月の内分泌攪乱化学物質問題検討会において、平成 12 年度に優先してリスク評価を実施する物質として 8 物質 が選定され、現在リスク評価を実施しているところである。

今般、リスク評価を加速させる観点から補正予算を獲得して新たに 4 物質についてリスク評価を実施することとなったので、内分泌攪乱化学物質問題検討会の作業グループである「内分泌攪乱作用が疑われる物質のリスク評価検討会」において、その物質の選定について検討した。

8 物質

トリブチルスズ、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、オクタクロロスチレン、ベンゾフェノン、フタル酸ジシクロヘキシル及びフタル酸ジ-2-エチルヘキシル

2. 基本的考え方

(平成 12 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会資料一部抜粋・要約(平成 12 年 7 月 21 日開催))

本問題は、国民の安全安心にかかわる重大事項であることから、速やかにリスク評価を実施し、その結果を公表するとともに、必要な行政措置を講じることが求められる。

限られた時間のなかで、予算を有効に使い効率的に実施するため、次の原則によりリスク評価を実施する。

- (1) 評価対象とする物質は、原則として、「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98 (2000 年 11 月版)において、リストアップされた物質とする。
- (2) 内分泌攪乱化学物質の概念は、当初の受容体が介在するメカニズムから、現在では体内の幅広い内分泌系に対する介入を起こすものに拡大してきているため、幅広い内分泌系への影響をエンドポイントとして、その有害性を想定し検討を加える。
- (3) 国際的に確立した評価手法がないため、文献の信頼性評価を行い、信頼できる影響を抽出し、それらの影響について必要な試験管内試験及び動物実験を行うことにより、有害性の有無を確認する。
これらの文献的評価の過程で重要な文献でありながら、信頼性等に疑念のあるものについては予備的に試験管内試験等の実施により確認を行う。
- (4) 文献の信頼性評価、予備試験の結果からリスク評価を実施する物質を選定する。実施するリスク評価のうち有害性評価については、文献等から得られた信頼できる有害性について、個別物質ごとに手法を検討し検証する。
- (5) なお、今回リスク評価に進む優先物質として選定されたとしても、単に有害性の疑いがあるにすぎず曝露評価を含めた総合的なリスク評価が終了するまでは、現実的なリスクがあるとみなされるべきではない。

3. 本検討会での選定方法

(1) 検討物質

内分泌攪乱作用が疑われる物質のうち、平成 12 年度に優先してリスク評価を実施する物質としては、これまで、「環境中濃度と内分泌攪乱作用を示すと疑われた文献調査の結果との乖離が小さい物質群」、「国会の PRTR 法審議において、内分泌攪乱作用

に関する試験を優先的に実施するなどして有害性を確認するよう要請された物質群」として、既に 8 物質選定されている。

これらの物質うち、構造や物性、用途などから物質群としてまとめられるものとして、有機スズ化合物のうち TBT、アルキルフェノール類、フタル酸エステル類が挙げられる。これらの物質群は、「用途が同一であることなどから規制等行政措置を行う際にあわせて対応する必要があること」及び「リスク評価を進めていく段階で、構造や物性、これまでの文献等から類似の作用が疑われることにより、その作用の有無・程度をあわせて評価していくことが求められてくること」の他、「時間的、実施施設上の制約」も考慮し、65 物質のうち有機スズ化合物である TPT、フタル酸エステル類である フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチル及び用途が同じであるアジピン酸ジ-2-エチルヘキシルについて、文献調査・信頼性評価等を実施し、平成 12 年度に優先してリスク評価に取り組む追加物質について検討した。

(2) 調査方法

ア．文献調査

物質ごとに文献検索データベースを利用して、文献検索を行い、有害性に関する文献を選出し、報告の整理を行った。文献検索データベースとしては、情報源が比較的広い MEDLINE、TOXLINE とした。

なお、フタル酸ブチルベンジルについては、上記文献に加えて米国 NTP (National Toxicology Program) に設置された CERHR (Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction) において人の生殖への悪影響に関する評価結果を公表した際に根拠とした文献についても、報告の整理を行った。

イ．文献の信頼性評価

4 物質について、人健康影響に関する文献、生態影響に関する文献及び試験管内試験に関する文献について専門家による信頼性評価を行った。

なお、リスク評価対象物質の選定を加速化するため、内分泌攪乱作用が疑われる反応のみられた文献にしばり、信頼性評価を実施した。

(3) 調査結果

文献調査・信頼性評価の結果は別紙 1 のとおり

4. 平成 12 年度に優先してリスク評価に取り組む追加物質 (案)

フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチル、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル、TPT については、「内分泌攪乱作用が疑われる物質のリスク評価検討会」において文献調査や信頼性評価を行った結果、以下のように判断した。

(1) フタル酸ブチルベンジル

Agarwal らの報告によると、動物実験により極めて高用量においての作用であるが、内分泌器官である精巣及び甲状腺等への影響ならびに生殖への影響が認められていることからリスク評価の対象物質とする。

(2) フタル酸ジエチル

Lamb らの報告によると、動物実験により前立腺や精子への影響、テストステロン濃度の低下、内分泌器官である下垂体への影響及び胎児への影響が認められていることからリスク評価の対象物質とする。

(3) アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル

Singh らの報告によると、動物実験により妊娠障害および胎児への影響が認められ

ていることからリスク評価の対象物質とする。

(4) トリフェニルスズ (TPT)

Ema らの報告によると、動物実験により生殖毒性、免疫毒性、インシュリンの分泌阻害及び生態影響が認められていることからリスク評価の対象物質とする。

なお、これらの物質は、あくまでも文献調査の結果等から有害性評価に進むこととなった物質であり、これらの物質の有害性の有無や程度は今後の検討で判明するものである。

内分泌攪乱作用が疑われる物質のリスク評価検討会

1. 委員

五十嵐貢一（日化協化学物質総合安全管理センター部長）
井口泰泉（岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター教授）
井上 達（国立医薬品食品衛生研究所毒性部長）
鈴木勝士（日本獣医畜産大学教授）
鈴木継美（座長：東京大学名誉教授）
竹内康浩（名古屋大学大学院医学研究科教授）
遠山千春（国立環境研究所環境健康部長）
森田昌敏（国立環境研究所地域環境研究グループ統括研究官）
若林明子（東京都環境化学研究所基礎研究部長）

2. 検討経過

平成12年4月14日：第1回開催
5月24日：第2回開催
7月10日：第3回開催
7月18日：第4回開催

（7月21日：第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会）

9月 1日：第5回開催
26日：第6回開催
10月23日：第7回開催

（10月31日：第2回内分泌攪乱化学物質問題検討会）

平成13年2月13日：第8回開催

文献調査・信頼性評価の結果

1. 文献調査結果

文献調査の実施状況を表 1 にまとめて示した。

表 1 文献調査・信頼性評価の実施状況

物質名	フタル酸ブチルベンジル	フタル酸ジエチル	アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	トリフェニルスズ
検索条件	CERHR*での評価根拠とされた人の生殖への悪影響に関する文献のうち反応のみられた7文献の信頼性評価を実施し、まとめた(いずれも信頼性が得られた)。なお、MEDLINEおよびTOXLINEで検索された生態影響に関する文献については、反応または信頼性が得られなかったため掲載しなかった。			
検索件数	28	39	128	
実施状況	作用に関する文献のうち反応のみられた11件の信頼性評価を実施し、信頼性が得られた6件についてまとめた。	作用に関する文献のうち反応のみられた3件の信頼性評価を実施し、信頼性が得られた3件についてまとめた。	作用に関する文献のうち反応のみられた3件の信頼性評価を実施し、信頼性が得られた3件についてまとめた。	作用に関する文献のうち反応のみられた19件の信頼性評価を実施し、信頼性が得られた16件についてまとめた。

*CERHR:米国の「国家毒性プログラム(U.S.A.National Toxicology Program)」に設置された

「人の生殖に係るリスク評価機関(Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction)」

2. フタル酸ブチルベンジルの有害影響に関する文献の信頼性評価結果

平成 12 年 7 月 18 日、U.S.A.National Toxicology Program(NTP国家毒性プログラム)に設置された Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction(CERHR)は、Expert Panel Review of Phthalates としてフタル酸エステル類について文献からみた人の生殖への悪影響に関する評価結果を公表した。この中で、フタル酸ブチルベンジルについては雄性生殖に対する“negligible concern”(無視し得る懸念)の評価を下している¹⁾。次いで同年 10 月に公表された報告書において、評価の根拠として、予測曝露量と無影響量の乖離が大きいことをあげているが、曝露量の予測に使用した資料および生殖影響に関する資料が不十分であることを付記している²⁾。ここでは、CERHR の評価根拠とされた生殖への悪影響に関する 7 文献 (*in vivo* 試験 3 文献、*in vitro* 試験 4 文献)を中心に信頼性評価を行った。

(1) エストロジェン様作用

Harris らによって、フタル酸ブチルベンジルについて、組み替え酵母試験およびヒト乳がん細胞 ZR-75 と MCF-7 の増殖についての検討³⁾が行われている。フタル酸ブチルベンジルは、組み替え酵母試験において $10^{-6} \sim 10^{-4}$ M の濃度で陽性反応を示したが、その活性は非常に低く、17 β -エストラジオールの反応の 0.000001 であった。また、 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ M の濃度で ZR-75 細胞の、 10^{-5} M の濃度で MCF-7 細胞の分裂・増殖を促進した。これらの結果から、弱いエストロジェン様作用を示したがこの結果を直ちに生体への影響予測に用いることはできないとしている。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Jobling らによって、フタル酸ブチルベンジルについて、ニジマス肝臓エストロジェン受容体への 17 β -エストラジオールの結合阻害、ヒト乳がん細胞 ZR-75 の増殖およびヒト乳がん細胞 MCF-7 の転写活性化についての検討⁴⁾が行われている。フタル酸ブチルベンジルは、 $10^{-7} \sim 10^{-4}$ M の濃度でエストロジェン受容体への 17 β -エストラジオールの結合を阻害し、 10^{-5} M の濃度で ZR-75 細胞の分裂・増殖を促進し、 $10^{-6} \sim 10^{-4}$ M の濃度で MCF-7 細胞での転写活性化を促進し、弱いエストロジェン作用を有すると判定されたがこの結果を直ちに生体への影響予測に用いることはできないとしている。この試験結果については文献上からみて概ね信頼性が認められた。

Zacharewski らによって、フタル酸ブチルベンジルについて、ラット子宮エストロジェン受容体との結合、ヒト乳がん細胞 MCF-7、ヒト子宮頸部がん細胞 HeLa および酵母でのエストロジェン様作用に依存した遺伝子発現についての検討⁵⁾が行われている。フタル酸ブチルベンジルは、 $10^{-6} \sim 10^{-3}$ M の濃度でラット子宮エストロジェン受容体と結合し、その IC₅₀ は 36 μ M であった。また、 10^{-5} M の濃度において MCF-7、HeLa および酵母でエストロジェン様作用に依存した遺伝子発現が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Moore は、フタル酸ブチルベンジルについて、試験管内試験結果の評価を総説している⁶⁾。このなかで、エストロジェン様作用を示す結果はフタル酸ブチルベンジルの水溶性の限界値 8.6 μ M を超えた濃度で反応がみられていると指摘している。この総説については文献上からみて信頼性が認められた。

(2) 生殖毒性

Agarwal らによって、フタル酸ブチルベンジル 447、890、1,338、1,542 mg/kg/day を 14 日間混餌投与された 12~13 週齢の雄 F344 ラットへの影響⁷⁾が検討されている。その結果として、1,338 mg/kg/day 以上の投与群において、体重・精巣重量・精巣上体重量・前立腺重量・精囊重量の低下、精巣・前立腺・精囊の萎縮、精巣上体管腔に未熟精子、精巣上体管腔の壊死、血漿中卵胞刺激ホルモン濃度と黄体形成ホルモン濃度の上昇、骨髓細胞密度の減少が認められた。また、1,542 mg/kg/day 投与群に

において、精巣上体・胸腺の萎縮、血漿中テストステロン濃度の低下が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Piersma らによって、フタル酸ブチルベンジル 250、500、1,000 mg/kg/day を雌は交配前 14 日から分娩後 6 日まで、雄は 29 日間経口投与された 10～11 週齢雌雄 SPF-derived RIVM-bred WU ラットへの影響⁸⁾が検討されている。その結果として、500 mg/kg/day 以上の投与群において出生児体重の低下、1,000 mg/kg/day 投与群において母動物の妊娠動物数の減少、同腹児数の減少、父動物で精巣毒性が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

NTP の報告によると、フタル酸ブチルベンジル 20、200、2,200 mg/kg/day を 10 週間混餌投与された雄 F344 ラットへの影響⁹⁾が検討されている。その結果として、200 mg/kg/day 以上の投与群において、精巣上体の精子濃度の低値が認められた。また、2,200 mg/kg/day 投与群において、前立腺・精巣・精巣上体重量の低値、精細管生殖上皮の退行が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

(3) 甲状腺等への影響

NTP の報告によると、フタル酸ブチルベンジル 300、600、1,200 mg/kg/day を 2 年間混餌投与された雌 F344 ラットへの影響⁹⁾が検討されている。その結果として、1,200 mg/kg/day 投与群において、甲状腺ホルモンおよび副腎皮質刺激ホルモンの低値が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

以上のように現在入手した文献の評価からは、

- ・フタル酸ブチルベンジルのエストロゲン様作用については、試験管内試験においてラット子宮エストロゲン受容体との結合試験、ニジマス肝臓エストロゲン受容体への 17 β -エストラジオールの結合阻害試験、組み替え酵母試験、細胞増殖試験、細胞転写活性化試験、エストロゲン様作用に依存した遺伝子発現試験で弱いエストロゲン様作用を示したとする信頼性のある報告が得られた。
- ・動物実験において雄で、体重・精巣重量・精巣上体重量・前立腺重量・精囊重量の低下、精巣・前立腺・精囊の萎縮、精巣上体管腔に未熟精子、精巣上体管腔の壊死、精巣上体の精子濃度の低値、精細管生殖上皮の退行、血漿中卵胞刺激ホルモン濃度と黄体形成ホルモン濃度の上昇、骨髓細胞密度の減少、精巣上体・胸腺の萎縮、血漿中テストステロン濃度の低下、精巣毒性、雌で、出生児体重の低下、妊娠動物数の減少、同腹児数の減少、甲状腺ホルモンおよび副腎皮質刺激ホルモンの低値が認められたとする信頼性のある報告が得られた。

試験管内試験により弱いエストロゲン様作用が認められた。

動物実験により極めて高用量においての作用であるが、内分泌器官である精巣および甲状腺等への影響ならびに生殖への影響が認められていることからフタル酸ブチルベンジルをリスク評価の対象物質とする。

参考文献

- 1) National Toxicology Program, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, Expert Panel Review of Phthalates (2000) Phthalate Panel Evaluation 7/18/00
- 2) Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (2000) NTP-CERHR Expert Panel on Butyl benzyl phthalate, NTP-CERHR-BBP-00
- 3) Harris, C.A., Henttu, P., Parker, M.G. and Sumpter, J.P. (1997) The estrogenic activity of phthalate ester *in vitro*. Environmental Health Perspective, 105, 8, 802-811
- 4) Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G. and Sumpter, J.P. (1995) A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. Environmental Health Perspective, 103, 6, 582-587
- 5) Zacharewski, T.R., Meek, M.D., Clemons, J.H., Wu, Z.F., Fielden, M.R. and

- Matthews, J.B. (1998) Examination of the *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicological Science*, 46, 282-293
- 6) Moore, N.P. (2000) Review. The oestrogenic potential of the phthalate esters. *Reproductive Toxicology*, 14, 183-192
- 7) Agarwal, D.K., Maronpot, R.R., Lamb, J.C. and Kluwe, W.M. (1985) Adverse effects of butyl benzyl phthalate on the reproductive and hematopoietic systems of male rats. *Toxicology*, 35, 189-206
- 8) Piersma, A.H., Verhoef, A. and Dortant, P.M. (1995) Evaluation of the OECD reproductive toxicity screening test protocol using butyl benzyl phthalate. *Toxicology*, 99, 191-197
- 9) National Toxicology Program (1997) NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis studies of butyl benzyl phthalate (Cas No. 85-68-7) in F344/N rats. NTP TR 458, 193pp

3 . フタル酸ジエチルの有害影響に関する文献の信頼性評価結果

フタル酸ジエチルの有害影響に関連するものとして、既存の文献において、エストロジェン様作用の有無および生殖毒性に関連した作用の有無に関する報告がある。これらの作用のうち反応のみられた報告について、個々の信頼性も評価し、リスク評価の対象物質に係る観点から現時点で以下のようにまとめた。

(1) エストロジェン様作用

Harris らによって、フタル酸ジエチルについて、組み替え酵母試験およびヒト乳がん細胞 ZR-75 と MCF-7 の増殖についての検討¹⁾が行われている。フタル酸ジエチルは、組み替え酵母試験において $10^{-4} \sim 10^{-3}$ M の高濃度で陽性反応を示したが、その活性は非常に低く、 17β -エストラジオールの反応の 0.0000005 であった。また、 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ M の濃度で ZR-75 細胞の、 10^{-5} M の濃度で MCF-7 細胞の分裂・増殖を促進しなかった。これらの結果から、弱いエストロジェン様作用を示したがこの結果を直ちに生体への影響予測に用いることはできないとしている。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Lutz らによって、フタル酸ジエチルについて、アフリカツメガエルの肝臓のエストロジェン受容体との結合阻害についての検討²⁾が行われている。フタル酸ジエチルは、 10^{-3} M の高濃度で 17β -エストラジオールとエストロジェン受容体の特異的結合と完全に競合し、 IC_{50} 値は 12×10^{-6} M であった。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

(2) 生殖毒性

Lamb らによって、フタル酸ジエチル 0.25、1.25、2.5 % を含む餌を交配 7 日前から 98 日間混餌投与された 6 週齢の雌雄 COBS Crl:CD-1(ICR)マウスへの影響³⁾が検討されている。その結果として、2.5 % 投与群において、親動物の体重減少、父動物の前立腺重量の低下・精子濃度の減少、母動物の肝および下垂体重量の減少、生存同腹数の減少が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Field らによって、フタル酸ジエチル 200、1,910、3,210 mg/kg/day を妊娠 6 ~ 15 日に混餌投与された雌 Crl:CD(SD)BR VAF/Plus S D ラットへの影響⁴⁾が検討されている。その結果として、1,910 mg/kg/day 以上の投与群において母動物の体重増加の抑制、3,210 mg/kg/day 投与群において母動物の体重に対する相対肝重量の増加、胎児の過剰肋骨の出現が認められており、200 mg/kg/day が母体毒性の、1,910 mg/kg/day が発生毒性の無作用量と考えられた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Oishi らによって、フタル酸ジエチル 2 % を含む餌を 1 週間混餌投与された雄 Wistar ラットへの影響⁵⁾が検討されている。その結果として、血清中および精巣中テストステロン濃度の低下が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Singh らによって、フタル酸ジエチル 500、1,000、1,500 mg/kg を妊娠 5、10、15 日に腹腔内投与された S D ラットへの影響⁶⁾が検討されている。その結果として、500 mg/kg 以上の投与群において胎児体重の減少、胎児の骨格奇形が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

以上のように現在入手した文献の評価からは、

- ・フタル酸ジエチルのエストロジェン様作用については、試験管内試験において組み替え酵母試験で弱いエストロジェン様作用を示したが、続いて行った細胞増殖試験においては細胞増殖は認めなかったとする信頼性のある報告が得られた。また、エストロジェン受容体との結合阻害を認めたとする信頼性のある報告が得られた。
- ・動物実験において体重減少、前立腺重量の低下、精子濃度の減少、テストステロン濃度

の低下、肝および下垂体重量の減少、生存同腹数の減少、胎児体重の減少、過剰肋骨の出現、骨格奇形が認められたとする信頼性のある報告が得られた。

動物実験により前立腺や精子への影響、テストステロン濃度の低下、内分泌器官である下垂体への影響および胎児への影響が認められていることからフタル酸ジエチルをリスク評価の対象物質とする。

参考文献

- 1)Harris,C.A.,Henttu,P.,Parker,M.G. and Sumpter,J.P.(1997)The estrogenic activity of phthalate ester *in vitro*.Environmental Health Perspective,105,8,802-811
- 2)Lutz,I., and Kloas,W.(1999)Amphibians as a model to study endocrine disruptors: .Environmental pollution and estrogen receptor binding.The Science of the Total Environment,225,49-57
- 3)Lamb, J.C.,Chapin,R.E.,Teague,J.,Lawton,A.D. and Reel,J.R.(1987) Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse.Toxicology and Applied Pharmacology,88,255-269
- 4)Field,E.A.,Price,C.J.,Sleet,R.B.,George,J.D.,Marr,M.C.,Myers,C.B.,Schwetz,B.A. and Morrissey,R.E.(1993)Developmental toxicity evaluation of diethyl and dimethyl phthalate in rats.Toxicology,48,33-44
- 5)Oishi,S. and Hiraga,K.(1980)Testicular atrophy induced by phthalic acid esters: Effect on testosterone and zinc concentrations.Toxicology and Applied Pharmacology,53,35-41
- 6)Singh,A.R.,Lawrence,W.H. and Autian,J.(1972)Teratogenicity of phthalate esters

4. アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルの有害影響に関する文献の信頼性評価結果

アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルの有害影響に関連するものとして、既存の文献において、エストロゲン様作用の有無および生殖毒性に関連した作用の有無に関する報告がある。これらの作用のうち反応のみられた報告について、個々の信頼性も評価し、リスク評価の対象物質に係る観点から現時点で以下のようにまとめた。

(1) エストロゲン様作用

Joblingらによって、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルについて、ニジマス肝臓エストロゲン受容体への 17 β -エストラジオールの結合阻害およびヒト乳がん細胞 ZR-75 の増殖についての検討¹⁾が行われている。アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルは、10⁻⁶ ~ 10⁻³ M の濃度でエストロゲン受容体への 17 β -エストラジオールの結合を阻害したが、10⁻⁵ M の濃度で ZR-75 細胞の分裂・増殖を促進せず、エストロゲン作用を有するとは判定されていない。この試験結果については文献上からみて概ね信頼性が認められた。

(2) 生殖毒性

Singhらによって、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル 0.5、1、5、10 ml/kg を雄に単回腹腔内投与後、無処置雌と交配させた 8-10 週齢の Harlan/ICR albino Swiss マウスへの影響²⁾およびアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル 1、5、10 ml/kg/day を妊娠 5、10、15 日に腹腔内投与された雌 SD ラットの胎児への影響³⁾が検討されている。その結果として、マウスでは、10 ml/kg 投与群と交配させた雌において妊娠率の低下、用量反応関係を伴った早期胎児死亡数の増加が認められ、雄性不妊作用が考えられた²⁾。ラットでは、5 ml/kg/day 以上の投与群において胎児重量の減少、奇形の増加が認められており、1 ml/kg/day が無作用量と考えられた³⁾。いずれの試験結果についても文献上からみて信頼性が認められた。

以上のように現在入手した文献の評価からは、

- ・アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルのエストロゲン様作用については、試験管内試験においてニジマス肝臓エストロゲン受容体と結合したが、続いて行った細胞増殖試験においては細胞増殖は認めなかったとする概ね信頼性のある報告が得られた。
- ・動物実験において妊娠率の低下、雄性不妊作用および胎児への影響が認められたとする信頼性のある報告が得られた。

動物実験により妊娠障害および胎児への影響が認められていることからアジピン酸ジ-2-エチルヘキシルをリスク評価の対象物質とする。

なお、エストロゲン様作用等については、今後、試験管内試験を行い、作用の有無について再確認を行うことが必要である。

参考文献

- 1) Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G. and Sumpter, J.P. (1995) A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environmental Health Perspective*, 103, 6, 582-587
- 2) Singh, A.R., Lawrence, W.H. and Austian, J. (1975) Dominant lethal mutations and antifertility effects of di-2-ethylhexyl adipate and diethyl adipate in male mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 32, 566-576
- 3) Singh, A.R., Lawrence, W.H. and Austian, J. (1973) Embryonic-fetal toxicity and teratogenic effects of adipic acid esters in rats. *Journal of Pharmaceutical*

5. トリフェニルスズの有害影響に関する文献の信頼性評価結果

トリフェニルスズの有害影響に関連するものとして、既存の文献において、前立腺癌細胞への影響の有無、生殖毒性に関連した作用の有無、免疫毒性に関連した作用の有無、インシュリンの分泌に関連した作用の有無および生態影響に関連した作用の有無に関する報告がある。これらの作用のうち反応のみられた報告について、個々の信頼性も評価し、リスク評価の対象物質に係る観点から現時点で以下のようにまとめた。

(1) 前立腺癌細胞への影響

Yamabe らによって、塩化トリフェニルスズについてジヒドロテストステロンの添加濃度に依存してルシフェラーゼ活性が上昇し、細胞増殖するヒト前立腺癌細胞 LNCaP への影響¹⁾が検討されている。塩化トリフェニルスズは、1 nM の濃度でジヒドロテストステロン 10 nM と同程度のルシフェラーゼ活性の上昇と細胞増殖を示した。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

(2) 生殖毒性

Ema らによって、塩化トリフェニルスズ 3.1、4.7、6.3 mg/kg/day を妊娠 0～3 日に、6.3、12.5、25.0 mg/kg/day を妊娠 4～6 日に経口投与された雌 Wistar ラットへの影響²⁾が検討されている。その結果として、妊娠 0～3 日に投与されたラットでは、3.1 mg/kg/day 以上の投与群において体重増加の抑制、摂餌量の減少、4.7 mg/kg/day 以上の投与群において着床前胚喪失率の増加、妊娠 4～6 日に投与されたラットでは、6.3 mg/kg/day 以上の投与群において体重増加の抑制、摂餌量の減少、12.5 mg/kg/day 以上の投与群において着床前胚喪失率の増加が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Ema らによって、塩化トリフェニルスズ 3.1、4.7、6.3 mg/kg/day を偽妊娠 0～3 日に経口投与された雌 Wistar ラットへの影響³⁾が検討されている。その結果として、3.1 mg/kg/day 以上の投与群において体重増加の抑制、4.7 mg/kg/day 以上の投与群において子宮重量および血清中プロジェステロンの減少が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Ema らによって、塩化トリフェニルスズ 3.1、6.3、9.4、12.5 mg/kg/day を妊娠 7～9 日に、6.3、9.4、12.5 mg/kg/day を妊娠 10～12 日または妊娠 13～15 日に、経口投与された雌 Wistar ラットへの影響⁴⁾が検討されている。その結果として、妊娠 7～9 日に投与されたラットでは、3.1 mg/kg/day 以上の投与群において体重増加の抑制、摂餌量の減少、6.3 mg/kg/day 以上の投与群において着床後胚吸収率・死亡胎児数・着床後喪失率の増加、生存胎児数の減少、妊娠 10～12 日に投与されたラットでは、6.3 mg/kg/day 以上の投与群において体重増加の抑制、摂餌量の減少、9.4 mg/kg/day 以上の投与群において着床後胚吸収率・死亡胎児数・着床後喪失率の増加、生存胎児数の減少、12.5 mg/kg/day の投与群において生存胎児体重の低値、妊娠 13～15 日に投与されたラットでは、6.3 mg/kg/day 以上の投与群において体重増加の抑制、摂餌量の減少、9.4 mg/kg/day 以上の投与群において着床後胚吸収率、生存胎児数の減少、12.5 mg/kg/day の投与群において着床後胚吸収率・死亡胎児数の増加が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Noda らによって、酢酸トリフェニルスズ 1.5、3.0、6.0、9.0、12.0 mg/kg/day を妊娠 7～17 日に経口投与された雌 Wistar ラットへの影響⁵⁾が検討されている。その結果として、6.0 mg/kg/day 以上の投与群において胚の吸収、胎児の死亡増加、9.0 mg/kg/day 以上の投与群において母動物の体重増加の抑制、摂餌量の減少、膣・口・鼻からの出血、胎児の生存数と体重の減少が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Newton らによって、塩化トリフェニルスズまたは酢酸トリフェニルスズ 20

mg/kg/day を 4、9、14、19、24 日間経口投与された雌 Holtzman albino ラットへの影響⁶⁾が検討されている。その結果として、成熟卵胞数・黄体数の減少、卵胞の大きさが対照群の約 1/2 であったことが認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Snow らによって、塩化トリフェニルスズまたは酢酸トリフェニルスズ 20 mg/kg/day を 20 日間混餌投与された雄 Holtzman albino ラットへの影響⁷⁾が検討されている。その結果として、塩化トリフェニルスズまたは酢酸トリフェニルスズ投与群で精子数の減少、塩化トリフェニルスズ投与群で精細管の発達障害が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

(3) 免疫毒性

Nishida らによって、塩化トリフェニルスズ 1.0、3.0、10 mg/kg/day を 14 日間腹腔内投与されたマウスへの影響および 0.3、1.0、3.0、10 mg/kg/day を皮下投与されたマウスの各種抗体産生への影響が検討されている⁸⁾。その結果として、腹腔内投与されたマウスでは、3.0 mg/kg/day 以上の投与群において体重に対する相対心臓重量比の減少、10 mg/kg/day 投与群において体重に対する相対胸腺重量比・相対脾臓重量比の減少が認められた。また、皮下投与されたマウスでは 3.0 または 10 mg/kg/day 投与群において T 細胞由来の免疫機能の低下が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Snoeij らによって、塩化トリフェニルスズ 15、50、150 ppm を含む餌を 2 週間混餌投与された Wistar ラットへの影響⁹⁾が検討されている。その結果として、15 ppm 以上の投与群において体重に対する相対脾臓重量の減少、50 ppm 以上の投与群において体重増加の抑制、体重に対する相対胸腺重量の減少、150 ppm 投与群において脳重量の減少、体重に対する相対肝重量の減少が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

(4) インシュリンの分泌

Manabe らによって、ふっ化トリフェニルスズ 100 mg/kg を単回経口投与された 3~5 ヶ月齢の雄日本白色ウサギへの影響¹⁰⁾が検討されている。その結果として、血漿カイロミクロン（脂肪滴）と超比重リポタンパクの増加、インシュリン・グルカゴンの分泌障害が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

(5) 生態影響

Fent らによって、塩化トリフェニルスズ 0.2、3.9、5.1、15.9 $\mu\text{g/L}$ に 3~6 日間曝露されたヨーロッパミノーの卵への影響および 6.6、14、26 $\mu\text{g/L}$ に 4 日間曝露されたヨーロッパミノーの稚魚への影響¹¹⁾が、塩化トリフェニルスズ 1.9、9.6、19.3 mg/L を単回腹腔内投与されたタイ類への影響¹²⁾が検討されている。その結果として、ヨーロッパミノーの卵では 15.9 $\mu\text{g/L}$ 曝露群において孵化率の低下が認められ、ヨーロッパミノーの稚魚では 6.6 $\mu\text{g/L}$ 以上の曝露群において骨の発達不良による遊泳行動障害が認められた。また、タイ類では 9.6 mg/L 曝露群において肝臓チトクローム P450 CYP1A1 量の減少が認められた。これらの試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Horiguchi らによって、塩化トリフェニルスズ 100、1,000、10,000 $\mu\text{g/kg}$ 体重を脚部に注射投与された雌イボニシへの影響¹³⁾が検討されている。その結果として、100 $\mu\text{g/kg}$ 以上の投与群においてインボセックスが認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Cima らによって、塩化トリフェニルスズ 39、385、3,855 $\mu\text{g/L}$ 、水酸化トリフェニルスズ 37、367、3,679 $\mu\text{g/L}$ 、酢酸トリフェニルスズ 41、409、4,090 $\mu\text{g/L}$ に曝露されたシロボヤの幼生への影響¹⁴⁾が検討されている。その結

果として、塩化トリフェニルスズでは 3,855 $\mu\text{g/L}$ 曝露群において、水酸化トリフェニルスズでは 3,679 $\mu\text{g/L}$ 曝露群において、酢酸トリフェニルスズでは 41 $\mu\text{g/L}$ 以上の曝露群において発生阻害が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Walshらによって、bis-酸化トリフェニルスズ 0.01、0.1、1 $\mu\text{g/L}$ に 4 週間曝露されたクモヒトデへの影響¹⁵⁾が検討されている。その結果として、0.1 $\mu\text{g/L}$ 以上の曝露群において腕の再生阻害が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

Strmacらによって、酢酸トリフェニルスズ 0.5、5、25、75、100 $\mu\text{g/L}$ に 96 時間曝露されたゼブラフィッシュの卵および稚魚への影響¹⁶⁾が検討されている。その結果として、卵では 15.9 $\mu\text{g/L}$ 曝露群において孵化率の低下が認められ、稚魚では 6.6 $\mu\text{g/L}$ 以上の曝露群において骨の発達不良による遊泳行動阻害が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

以上のように現在入手した文献の評価からは、

- ・試験管内試験においてヒト前立腺癌細胞の増殖が認められたとする信頼性のある報告が得られた。
 - ・動物実験において生殖毒性、免疫毒性、インシュリンの分泌阻害が認められたとする信頼性のある報告が得られた。
- また、生態影響において発生障害やインポセックスが認められたとする信頼性のある報告が得られた。

動物実験により膵臓から分泌されるホルモンであるインシュリンの分泌阻害、生殖毒性および生態影響が認められていることからトリフェニルスズをリスク評価の対象物質とする。

なお、前立腺癌細胞の増殖については、今後、試験管内試験を行い、作用の有無について再確認を行うことが必要である。

参考文献

- 1) Yamabe, Y., Hoshino, A., Imura, N., Suzuki, T. and Himeno, S. (2000) Enhancement of androgen-dependent transcription and cell proliferation by tributyltin and triphenyltin in human prostate cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 169, 177-184
- 2) Ema, M., Miyawaki, E., Harazono, A. and Ogawa, Y. (1997) Effects of triphenyltin chloride on implantation and pregnancy in rats. *Reproductive Toxicology*, 11, 2/3, 201-206
- 3) Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1999) Suppression of uterine decidualization as a cause of implantation failure induced by triphenyltin chloride in rats. *Arch. Toxicol.*, 73, 175-179
- 4) Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1999) Development toxicity of triphenyltin chloride after administration on three consecutive days during organogenesis in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62, 363-370
- 5) Noda, T., Morita, S., Yamano, T., Shimizu, M. and Yamada, A. (1991) Effects of triphenyltin acetate on pregnancy in rats by oral administration. *Toxicology Letters*, 56, 207-212
- 6) Newton, D.W. and Hays, R.L. (1968) Histological studies of ovaries in rats treated with hydroxyurea, triphenyltin acetate, and triphenyltin chloride. *J. Econ. Entomol.*, 61, 6, 1688-1689
- 7) Snow, R.L. and Hays, R.L. (1983) Phasic distribution of seminiferous tubules in rats treated with triphenyltin compounds. *Bull. Environ. Cont. Toxicol.*, 31, 658-665
- 8) Nishida, H., Matsui, H., Sugiura, H., Kitagaki, K., Fuchigami, M., Inagaki, N., Nagai, H. and Koda, A. (1990) The immunotoxicity of triphenyltin chloride in mice. *Journal of*

Pharmacobio-Dynamics,13,543-548

- 9)Snoeijs,N.J.,van Iersel,A.A.J.,Penninks,A.H. and Seinen,W.(1985)Toxicity of triorganotin compounds:Comparative *in vivo* studies with a series of trialkyltin compounds and triphenyltin chloride in male rats.Toxicology and Applied Pharmacology,81,274-286
- 10)Manabe,S. and Wada,O.(1981)Triphenyltin fluoride(TPTF)as a diabetogenic agent.TPTF induces diabetic lipemia by inhibiting insulin secretion from morphologically intact rabbit B-cell.Diabetes,30,1013-1021
- 11)Fent,K. and Meier,W.(1994)Effects of triphenyltin on fish early life stages. Archives of Environmental Contamination and Toxicology,27,224-231
- 12)Fent,K.,Woodin,B.R. and Stegeman(1998)Effects of triphenyltin and other Organotins on hepatic monooxygenase system in fish.Comparative Biochemistry and Physiology,Part C 121,277-288
- 13)Horiguchi,T.,Shiraishi,H.,Shimizu,M. and Morita,M.(1997)Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell,*Thais clevigera*.Environmental Pollution,95,1,85-91
- 14)Cima,F.,Ballarin,L.,Bressa,G.,Martinucci,G. and Burighel,P.(1996)Toxicity of organotin compounds on embryos of a marine invertebrate(*Styela plicata*; Tunicata).Ecotoxicology and Environmental Safety,35,174-182
- 15)Walsh,G.E.,McLaughlin,L.L.,Louie,M.K.,Deans,C.H. and Loes,M.(1986) Inhibition of arm regeneration by *Ophioderma brevispina*(Echinodermata, Ophiuroidea)by tributyltin oxide and triphenyltin oxide.Ecotoxicology and Environmental Safety,12,95-100
- 16)Strmac,M. and Braunbeck,T.(1999)Effects of triphenyltin acetate on survival, hatching success, and liver ultrastructure of early life stages of zebrafish(*Danio rerio*) .Ecotoxicology and Environmental Safety,44,25-39

被験物質について（案）

原則として、被験物質は市販の標準品を用いることとする。

- 1．トリフェニルスズ(TPT)については、環境中で塩化 TPT として測定されていることおよび内分泌攪乱作用を示すと疑われた水中濃度の信頼性のある報告において低濃度での反応が認められた被験物質として塩化 TPT が使用されていたことから、標準品である塩化 TPT を被験物質とする。
- 2．フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチル、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルは、標準品を被験物質とする。

内分泌攪乱化学物質の人健康影響評価のための試験体系の概況について

1. 基本的考え方

平成 12 年度に優先してリスク評価に取り組む 8 物質 にかかると人健康影響評価のための試験体系については、原則、スクリーニングとして 我が国独自で開発する「げっ歯類による 1 世代試験」(以下、1 世代試験) OECD を中心に各国がバリデーションとして進行中の()子宮肥大試験()ハーシュバーガー試験()28 日間反復投与試験を実施するとともに、作用の有無・程度や確定試験実施等の判定の際には、厚生労働省等で進められている試験結果に加え、これらの結果を補完する目的で実施する試験管内試験結果も考慮することが平成 12 年 10 月 31 日の本検討会において了承された。

新たに開発される 1 世代試験の方法については、本検討会での了承事項を踏まえ、研究的要素の高い試験法とし、文献調査やその信頼性評価等から、対象物質ごとに評価項目や投与濃度(環境中又は食事中に存在するような極低濃度)を設定するとともに、そのプロトコルや実施状況、試験結果等について、同検討会の作業グループである「内分泌攪乱作用が疑われる物質のリスク評価検討会」のうち、哺乳類の毒性の専門家からなる評価検討会において、評価・助言を行うこととする。

トリブチルスズ、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、オクタクロロスチレン、ベンゾフェノン、フタル酸ジシクロヘキシル及びフタル酸ジ-2-エチルヘキシル

2. げっ歯類を用いた 1 世代試験

(1) 現在の試験実施状況等

6 物質について

優先 8 物質のうち、アルキルフェノール類を除く 6 物質については、文献調査やその信頼性評価等を実施したのち、現在、投与量・期間、エンドポイントを確認する等の目的で、一世代試験のパイロット試験を実施しており、夏～秋頃を目途に終了予定。(その後、本試験に進むか否かを判断。)

2 物質について

2 物質(4-オクチルフェノール及びノニルフェノール)については、文献調査や試験管内試験により、エストロゲン様作用が疑われることから、陽性対照物質であるエチニルエストラジオール(EE)を使用したパイロット試験を実施し、その結果を参考に一世代試験の試験系を組み立てることとしている。

本パイロット試験は、本年夏頃を目途に終了予定であるが、ある程度評価できる段階で当該 2 物質を実施する予定。

(2) 1 世代試験のプロトコルの概要

6 物質について

- | | |
|---------|---------------------------------|
| ア．動物の種類 | ：ラット(クローズドコロニー；Wistar Imamichi) |
| イ．飼料の種類 | ：実験動物用固型飼料(CE2、日本ケア(株))(自由摂取) |
| ウ．投与経路 | ：強制経口投与(コーン油に溶解)
TBT については混餌 |
| エ．用量 | ：低濃度(一般環境中又は食事中濃度)にしほり 6 群(物 |

質ごとに検討)。

ただし、最高濃度については、パイロット試験であることから、LOEL、LOAELを参考とし、母動物あるいは児動物に何らかの影響が予測される濃度を設定。

- オ．1群あたりの動物数：妊娠動物として12匹/群
カ．試験期間：馴化・交配期間を含め17週程度(約120日)
キ．投与期間：妊娠0日～哺育21日
ク．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

(例)

- ・フタル酸エステル類：アンドロゲン拮抗作用等を考慮し、哺育児の肛門生殖突起間距離、雄哺育児の乳頭出現の有無、雄離乳時の性成熟、精子形成能、副生殖器の重量、血中ホルモン濃度等
- ・TBT：着床障害や免疫機能への影響を考慮し、母動物の妊娠率、着床数及び出産児数、離乳児の胸腺の詳細な観察等
- ・チチクロニド：甲状腺ホルモン作用を考慮し、F1動物の生後発達、学習能力、T3、T4及びTSHの血中濃度、甲状腺の詳細な形態学的観察等
- ・ベンゾフェノン：アロマターゼインヒビターを考慮し、F1動物の性成熟、肝臓における薬物代謝酵素活性、生殖器及び副生殖器の重量、血中ホルモン濃度等

- ケ．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。

エチニルエストラジオール(EE)を使用したパイロット試験

3種類の投与期間で実施

妊娠中期～妊娠後期 妊娠7～18日

妊娠後期～哺育前期 妊娠18日～哺育5日

妊娠～哺育期間 妊娠0日～哺育20日

- ア．動物の種類：ラット(近交系; Wistar Kyoto)
イ．飼料の種類：Phytoestrogen-freeの飼料(NIH-07-PLD, 利エン列酵母(株))(自由摂取)
ウ．投与経路：皮下投与(コーンオイルに溶解)
エ．用量：低濃度(ピル(経口避妊薬)としての体内濃度)を考慮した6群
0 0.01 0.03 0.1 0.3 1.0(μg/kg/day)

オ．1群あたりの動物数：妊娠動物として12匹/群

カ．試験期間：交配期間を含め17週程度(約120日)

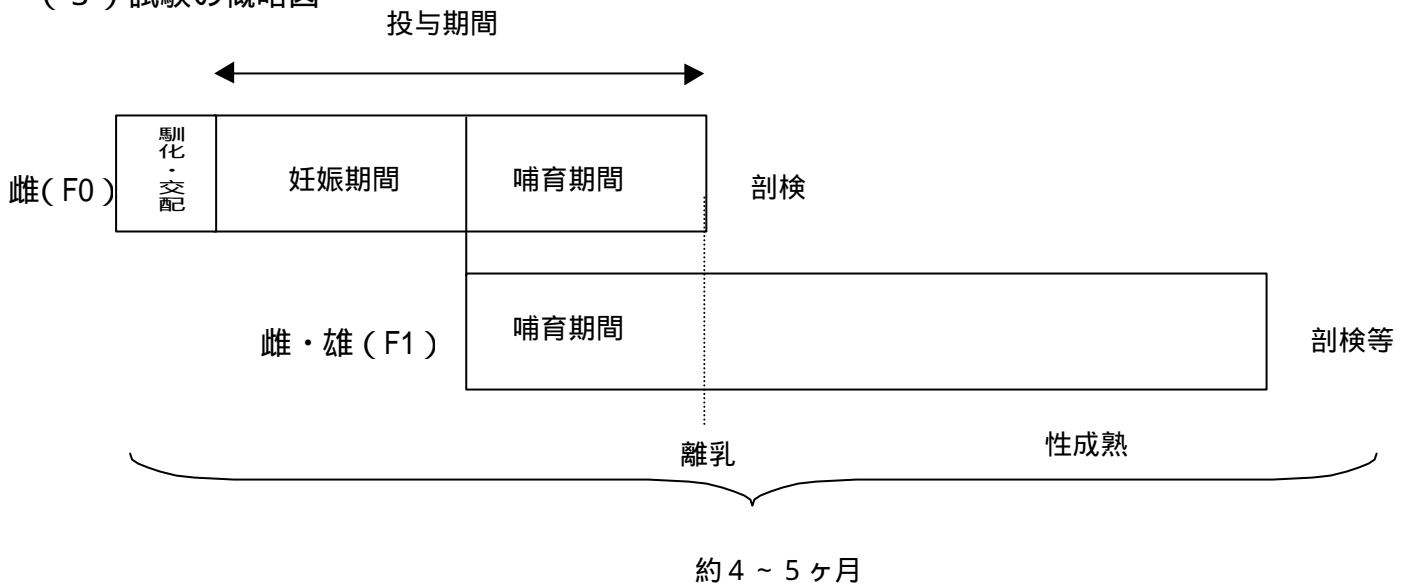
キ．観察項目：

母動物：臨床症状及び死亡、体重、体重増加量、摂餌量、飲水量、繁殖能力(受胎率、出産率、妊娠期間、着床数等)、剖検及び組織の保存等

児動物：臨床症状及び死亡、産児数、性比、肛門生殖突起間距離、生存率、体重、体重増加量、摂餌量、飲水量、身体発達、初期行動発達、繁殖能力(性成熟、発情周期、精巢の精子頭数等)、病理学的検査(剖検、臓器の重量測定及び保存、病理組織学的検査)、遺伝子

ク・分析 発現の定量的測定等
 : の6物質における分析項目に加え、飼料等の女性ホルモ
 モンも分析。

(3) 試験の概略図



3. 改訂 OECD TG407 28日間反復経口毒性試験

28日間毎日化学物質を投与し、内分泌攪乱作用と関連が指摘されている指標（生殖器官、精子形成状態、血中ホルモン濃度等）を評価。

現在、経済産業省、厚生労働省、農林水産省が、OECDより要請のあった被験物質について実施しているバリデーションの結果を踏まえて、設定濃度や観察項目について検討を行い、経済産業省と協力・分担して実施する予定。

4. 試験管内 (in vitro) 試験

in vivoの試験結果を補完し、作用機序を確認するために実施している。

(1) エストロゲン様作用

優先8物質について、レセプターバインディングアッセイ、E-screen及び酵母ハイブリッド法を実施・終了。

(2) アンドロゲン様作用

HepG2細胞法及びRIA法（放射線リガンド結合法）を現在開発中であり、その後優先8物質について試験を実施する予定（夏頃には試験が終了する予定。）

なお、各物質におけるエストロゲン様作用、アンドロゲン様作用の他、甲状腺ホルモン様作用にかかる試験管内試験結果を評価する際は、厚生労働省及び経済産業省が実施しているHTPS（ハイスループットプレスクリーニング）の結果も参考とする。

5. その他のスクリーニング・試験法

(1) スクリーニング手法

げっ歯類による子宮肥大試験

未成熟雌ラット又は卵巣摘出した雌ラットに化学物質を投与して、エストロジェ

ン様作用を示すかどうかを子宮重量の変化等から評価する。

経済産業省においては、優先 8 物質について、OECD のバリデーションの手法に基づき、試験を実施し、現在結果を評価中。

げっ歯類による前立腺肥大試験（Hershberger 試験）

未成熟雄ラット又は精巣摘出した雄ラットに化学物質を投与し、アンドロジェン様作用を示すかどうかを前立腺重量や副生殖器の組織学的検査により評価する。

経済産業省において、優先 8 物質について、OECD のバリデーションの手法に基づき、平成 13 年度に実施する予定。

（２）試験法の開発

DNA マイクロアレイ

化学物質の内分泌攪乱作用を遺伝子レベルで評価するためには、濃度、時間、細胞などに応じて遺伝子の発現がどのように変化するかを詳細に調べる必要がある。

このため、環境省では、内分泌攪乱作用と関連すると考えられる約 400 の遺伝子を便宜的にスポットした DNA チップを開発するとともに、塩基配列が確認されている約 8,000 の遺伝子をスポットした DNA チップを用い、現在、EE 及び優先 8 物質のうちの 7 物質について、ヒト・マウス培養細胞やマウス成獣・胎仔に暴露して抽出した mRNA の遺伝子発現パターンを解析している。

なお、今後はより多くの関連する遺伝子やその発現パターンを解明していきながら、内分泌攪乱作用と関連性の高い遺伝子を究明することにより、最終的には確定試験とすることを目的とする。

6．評価体制

本検討会の作業グループである「内分泌攪乱作用が疑われる物質のリスク評価検討会」のサブグループとして、「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」を設置し、各試験機関から提出された物質ごとのプロトコル及びそのプロトコルに則った実施状況や試験結果について助言・評価を行っている。これまで 6 物質及び EE のプロトコル案の検討のため、2 回開催している。

内分泌攪乱化学物質の魚類等への影響評価のための試験体系の概況について

1. 基本的な考え方

内分泌攪乱化学物質の魚類への影響評価のための試験体系については、エストロゲン及びアンドロゲン様作用を評価するものとして、スクリーニングの位置づけでFLF・d-rR メダカ試験、繁殖試験、ビテロジェニンアッセイ及びメダカを用いたパーシャルライフサイクル試験を実施するとともに、確定試験の位置づけでフルライフサイクル試験を実施することが平成12年10月31日の本検討会において了承された。

なお、文献調査等で甲状腺などに異常を与えることが示唆されれば、適宜、物質ごとに試験を追加することと、これらの試験結果を補完する目的で試験管内試験を実施することもあわせて了承された。

これらの試験の方法については、文献調査等から投与濃度を設定するとともに、これまでの生態毒性を基本とし、陽性対照物質での試験結果等も踏まえてエンドポイントを設定している。また、そのプロトコルや実施状況、試験結果等については、生態系の専門家からなる検討会において、評価・助言を行うこととする。

なお、鳥類については、日本ウズラを試験動物としたスクリーニング手法を開発するとともに、確立された手法を用いて優先8物質の評価を行う。また、確定試験としてOECDが提唱した「二世世代繁殖毒性試験」のエンドポイントを設定するため、各種基礎的研究を実施する。

2. 我が国における取り組み状況

(1) 魚類について

スクリーニング手法

ア. FLF・d-rRメダカ

胚の白色色素の有無により遺伝的な性別が判別できるFLFメダカや体色により遺伝的な性別が判別できるd-rRメダカを用いたアーリーライフステージ試験法を開発中。

イ. ビテロジェニンアッセイ

化学物質を投与し、ビテロジェニン産生能力を測定することにより、化学物質のエストロゲン様作用の有無・程度を把握する。

本アッセイについては、OECDにおいてスクリーニングとして提唱されており、我が国では陽性対照物質での検証が終了。現在、優先8物質について試験を実施し、結果を評価中。

ビテロジェニン：肝臓で合成される卵黄タンパク前駆体。繁殖期の雌成魚で特に産生される。

ウ. 繁殖試験

化学物質を成魚に投与することにより、主に繁殖機能への影響を把握する試験であり、産卵数、受精率、生殖腺異常、孵化率、孵化後の生存、性比等をエンドポイントとする。

本アッセイについては、現在、OECDにおいて陽性対照物質として提唱されている物質を用いて検証中。

エ．パーシャルライフサイクル試験

化学物質を受精から成熟期を通して投与することにより、主に性分化への影響を把握する試験であり、二次性徴、生殖腺異常、ビテロジェニン、孵化率、生存率等をエンドポイントとする。

本アッセイについては、OECDにおいて陽性対照物質として提唱されている物質を用いた検証が終了。現在、優先8物質について試験を実施し、結果を評価中。

試験法

フルライフサイクル試験

少なくとも2世代にわたる曝露を行い、生涯を通しての影響をみる試験であり、産卵数、受精率、生殖腺異常、次世代の孵化率、孵化後の生存、性比、二次性徴、ビテロジェニン、孵化率、生存率等をエンドポイントとする。

本アッセイについては、OECDに米国が確定試験として提案中であるが、メダカを用いたフルライフサイクル試験のプロトコル案を作成すべく、OECDにおいて陽性対照物質として提唱されている物質を用いて検証中。

試験管内 (in vitro) 試験

in vivo の試験結果を補完し、作用機序を確認するものとして、試験管内試験を実施。

ア．メダカのエストロゲン受容体結合アッセイ

化学物質のメダカエストロゲンレセプターへの結合能力を測定するアッセイを開発し、陽性対照物質を用いた検証ののち、現在、優先8物質について試験を実施し、結果を評価中。

イ．メダカの遺伝子転写活性アッセイ

レセプター遺伝子及びレポーター遺伝子を導入した培養細胞を用いることにより、化学物質のメダカエストロゲンレセプターへの結合能力を測定するアッセイを現在開発中。

(2) 鳥類について

スクリーニング手法

超低密度リポタンパク質 (VLDL)、ビテロジェニンを用いたアッセイを開発し、陽性対照物質を用いた検証ののち、優先8物質について試験を実施し、現在、結果の評価を行うとともに、より感度を上げた試験系を開発中。

試験法開発

「二世世代繁殖毒性試験」のエンドポイント、投与量・方法等を設定するため、内分泌攪乱作用との関連性が指摘される性分化・発達、受精機能、発生、中枢神経機能・行動についての基礎的研究を実施中。

また、「試験管内試験」、「バイオマーカー」の開発に向けた取組も進行中。

4．評価体制

生態系の専門家からなる「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」を設置し、物質ごとのプロトコル及びそのプロトコルに則った実施状況や試験結果について助言・評価を行っており、今年度は3回開催している。

