

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
(平成 12 年度第 3 回内分泌攪乱化学物質問題検討会資料(平成 13 年 3 月 14 日))

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)にしぼり 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：着床阻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
- ・チチロキシロン：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, 柯エンテ酵母(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)

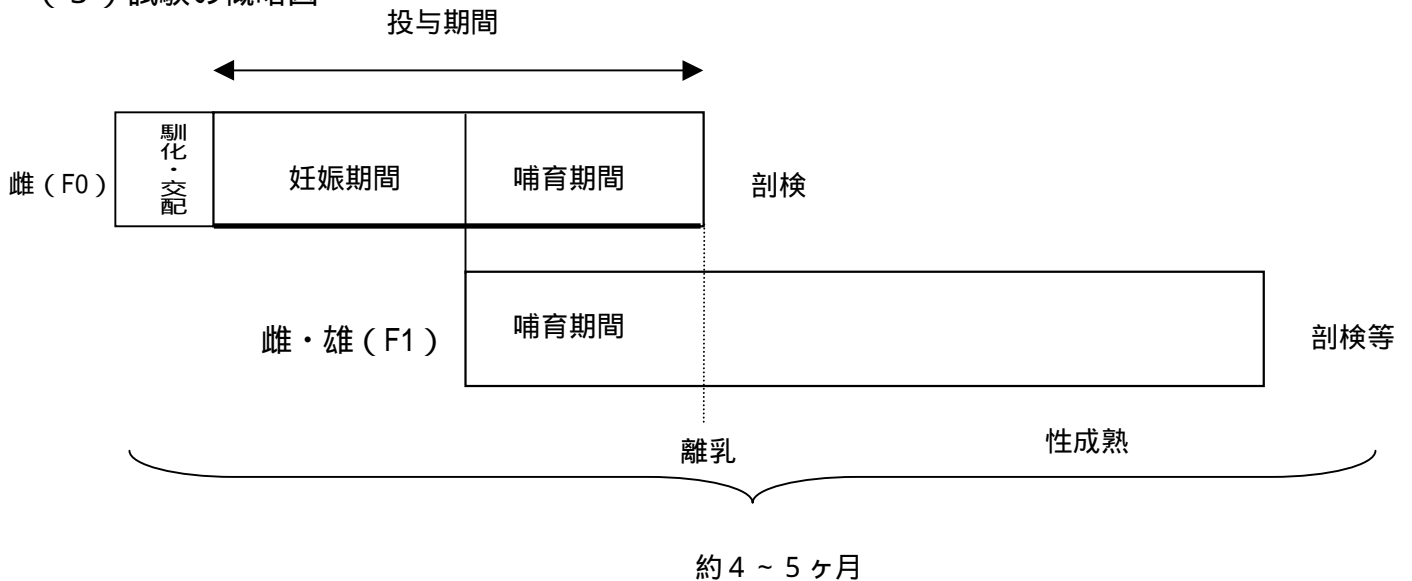
キ．観察項目：

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、精巣の精子頭部数等)、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

ク．分析 伝子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ール及びそのプロトコー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 のプロトコール案の検討のため、2 回開催している。