

内分泌攪乱化学物質の人健康及び魚類等への影響評価の試験体系等の概況について

人健康影響に関する有害性評価

1. 基本的な考え方

平成 12 年度に優先してリスク評価に取り組む 12 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()改訂 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本検討会において了承されている。

2. 有害性評価の試験実施状況

(1) げっ歯類を用いた 1 世代試験

10 物質について

優先 12 物質のうち、アルキルフェノール類を除く 10 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いる。既に一部の物質については、パイロット試験を終了し、現在試験結果を解析中。その他の物質についても 10 月～12 月頃に随時パイロット試験が終了し、その結果により本試験を実施するかどうか検討。

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(投与期間の異なる 3 種類)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。3 種類の試験のうち、既に 2 試験は終了しており、残りの 1 試験が年内に終了する予定であるため、その結果に基づき試験系を組み立てる予定。

(2) 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。

エストロゲン様作用

優先 12 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。

アンドロゲン様作用

レポータージーンアッセイ(MDA 細胞)については、優先 12 物質のうち 8 物質及び陽性対照物質について実施・終了。また、レセプターバインディングアッセイ(RIA 法)を開発中。

当初 HepG2 細胞を用いる予定であったが、より感受性の高い MDA 細胞を用いて実施。

甲状腺ホルモン(T3、T4)様作用

現在、酵母ハイブリッド法について今年度を目途に開発し、優先 12 物質について試験を実施する予定。

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。

（３）その他のスクリーニング・試験法

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巢摘出した雌ラットに化学物質を投与して、エストロゲ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 12 物質のうち、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・終了し、ピアレビューの準備中。残りの 4 物質については実施中。

（ ）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、アンドロゲ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は、優先 12 物質について、OECD のバリデーションの手法に基づき、実施中。

（ ）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たバリデーションの結果を踏まえて、投与時期・投与経路等試験条件や観察項目等について検討中。

試験法の開発

○ DNA マイクロアレイ

化学物質による内分泌攪乱作用について詳細に評価を行うために、遺伝子レベルでの試験法の開発を行う。

既に、培養細胞（ヒト、マウス）やマウス（成獣、胎仔）を用いて、ヒトの遺伝子については約 8,400 種から約 1,000 種の、マウスの遺伝子については約 9,000 種から約 1,500 種の内分泌攪乱作用と関連すると考えられる遺伝子を選別し、DNA チップを作成しつつある。今後、作成した DNA チップを用いて優先 12 物質の遺伝子発現パターンを解析することとしている。

また、DNA チップを用いた解析データベースを構築しており、来年度を目途に公表する予定。

更に、本試験法の評価にあたり、げっ歯類を用いた子宮肥大試験を並行して進めることにより、その結果と比較し、感度や信頼性等の点について検討を行う予定。

（４）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。

魚類等に関する有害性評価

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。

また、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．有害性評価の試験実施状況

(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、現在、既に優先 8 物質について試験を実施・終了。

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、既に優先 4 物質について試験を実施・終了し、現在残りの優先 8 物質を実施中。

試験法

○ フルライフサイクル試験

少なくとも 2 世代にわたる暴露を行い、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、既にノニルフェノールについて試験が終了しており、本年度は 4-オクチルフェノール及びフタル酸ジ-n-ブチルを実施中。

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・メダカのエストロジェンレセプターバインディングアッセイ

化学物質のメダカエストロジェ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、現在、優先 8 物質について試験を実施・終了。

イ・メダカのレポータージーンアッセイ

レセプター遺伝子及びレポータージーン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ジェンレセプターへの結合後の転写活性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

超低密度リポ蛋白質 (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・終了し、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、平成13年度は、内分泌攪乱作用との関連性が指摘される()性分化・発達、()生殖機能についての基礎的研究を実施中。

試験管内 (in vitro) 試験

現在、レセプターバインディングアッセイを開発中。

また、「クロアカ試験」、「性転換試験」の開発に向けた取組も進行中。

(3) 両生類について

○ スクリーニング手法

ア・変態アッセイ

化学物質を投与し、オタマジャクシの発達と成長に伴う形態学的変化を計測

することにより、化学物質の甲状腺ホルモン様作用の有無・程度を把握する。
今年度は、アフリカツメガエル等を用いて、陽性対照物質について実施する予定。

イ．ビテロジェニンアッセイ

今年度は、アフリカツメガエルを用いて陽性対照物質について実施する予定。

試験法、試験管内試験に関しては、今後 OECD の動きを踏まえて検討する予定。

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。

暴露評価の実施状況

人健康への影響評価のための暴露量調査に関しては、本年 9 月に「暴露量調査（食事）検討会」及び「暴露量調査（室内空気）検討会」を設置し、フタル酸エステル類等を対照物質として、食事及び室内空気に関して暴露量調査を開始。その結果を踏まえて暴露評価を行う予定。

一方、魚類等への影響評価のための暴露評価に関しては、平成 10 年度から実施されている環境実態調査結果等を踏まえて随時暴露評価を実施する予定。

リスク評価について

今後、内分泌攪乱化学物質の人健康及び魚類等への影響評価に関しては、引き続き有害性評価を進めるとともに、今後行われる予定の暴露評価結果とあわせて、リスク評価を実施し、原則、リスク評価が終了した時点で、その成果を速やかに公表する予定。

なお、ノニルフェノールが魚類に与える内分泌攪乱作用に関しては、平成 13 年度第 1 回の本検討会において、そのリスク評価結果を既に報告している。また、次回のリスク評価結果に関する公表は来年度春～夏を予定。

また、環境実態調査や食事調査・室内空気調査等の結果により、暴露評価が困難である物質に関しては、その取扱について別途検討する予定。