

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

基本的な考え方

優先してリスク評価に取り組む平成 12 年度に選定した 12 物質¹⁾、平成 13 年度に選定した 8 物質²⁾、平成 14 年度に選定した 24 物質のうち 8 物質³⁾及び平成 15 年度に選定した 8 物質⁴⁾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「げっ歯類を用いた 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()ハーシュパーガー試験()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、経済産業省及び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。

- 1) 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、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、オクタクロロスチレン、ベンゾフェノン、トリフェニルスズ、フタル酸ジエチル、フタル酸ブチルベンジル及びアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル
- 2) ベンタクロロフェノール、アミトロール、ビスフェノール A、2,4-ジクロロフェノール、4-ニトロトルエン、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル及びフタル酸ジプロピル
- 3) ヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサン、クロルデン、オキシクロルデン、trans-ノナクロル、DDT、DDE 及び DDD
- 4) アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、マイレックス、ケルセン、マラチオン及びペルメトリン

1. げっ歯類を用いた 1 世代試験

(1) 現在の試験実施状況等

平成 12 年度に選定した 12 物質について

a. 10 物質について

優先 12 物質のうち、4-オクチルフェノール及びノニルフェノールを除く 10 物質については、1 世代試験を実施し、平成 14 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成 14 年 6 月 14 日開催)にて結果を公表。このうち、フタル酸ジ-n-ブチルについては追加試験を実施し、平成 15 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成 15 年 6 月 12 日開催)にて結果を報告。

b. 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、終了。その結果を参考に 1 世代試験を実施し、平成 15 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成 15 年 6 月 12 日開催)にて結果を報告。

平成 13 年度に選定した 8 物質について

優先 8 物質のうちビスフェノール A を除く 7 物質について、1 世代試験を実施し、

平成 15 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成 15 年 6 月 12 日開催)にて結果を報告。

なお、ビスフェノール A については、文献調査やその信頼性評価において、生殖への影響等に関し、相反する結果が報告されていることから、特定の遺伝子座に着目し、陽性対照物質を投与したパイロット試験(子宮肥大試験及びハーシュバーガー試験)を実施。その後、1 世代試験を実施し、平成 16 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成 16 年 7 月 27 日開催)にて結果を報告。

平成 14 年度に選定した 24 物質について

平成 14 年度に選定した 24 物質のうち、人又は魚類を用いた動物試験の用量(濃度)設定の可否の観点から、8 物質について文献調査・信頼性評価の結果を参考に、物質ごとに個別にスクリーニング・試験の実施の有無及びその組み合わせを判断することとしていた。

ただし、今回の 8 物質には複数の異性体を有する物質が含まれていることから、環境実態調査*において異性体ごとに測定を実施した物質については、同調査において検出された異性体を文献調査・信頼性評価の対象とした。

ヘキサクロロベンゼン、*p,p'*-ヘキサクロロシクロヘキサン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル、*p,p'*-DDT、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDE 及び *p,p'*-DDD について、1 世代試験を実施し、*p,p'*-DDT 及び *p,p'*-DDD について、平成 16 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成 16 年 7 月 27 日開催)にて結果を報告。今回、残り 6 物質について結果を報告。

なお、この 8 物質を除く 10 物質**については、文献調査・信頼性評価について今回結果を報告。

* 環境省(庁)が実施した「平成 10 年度緊急全国一斉調査」、「平成 11 年度全国一斉調査」、「平成 12 年度全国一斉調査」、「平成 13 年度環境実態調査」及び国土交通省(建設省)が平成 10~13 年度に実施した「水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査」の水質・底質・大気・土壌・水生生物(野生生物調査のコイの結果を含む)の各調査

** 2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸、エチルパラチオン、1,2-ジブromo-3-クロロプロパン、メトキシクロル、ニトロフェン、トキサフェン、アルディカーブ、キーボン、メチラム及びピンクロゾリン

平成 15 年度に選定した 8 物質について

平成 15 年度に評価に着手する物質としては、16 物質**及び農薬取締法に基づき農薬として登録されている 20 物質があげられた。16 物質**から、人又は魚類を用いた動物試験の用量(濃度)設定の可否の観点より、5 物質(アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、マイレックス)を選定し、また 20 物質***から、人又は魚類を用いた動物試験の用量(濃度)設定の可否及び内分泌攪乱作用に関連する哺乳類及び魚類を用いた動物試験の情報量の多さの観点より、3 物質(ケルセン、マラチオン、ペルメトリン)を選定し、合計 8 物質について文献調査・信頼性評価の結果を参考に、物質ごとに個別にスクリーニング・試験の実施の有無及びその組み合わせを判断することとしていた。この 8 物質について、1 世代試験を実施中。

なお、この 3 物質(ケルセン、マラチオン、ペルメトリン)を除く 17 物質***及びベンゾ(a)ピレンについては、文献調査・信頼性評価について今回結果を報告。

*** 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、アトラジン、アラクロール、CAT、NAC、エンドスルファン、メソミル、トリフルラリン、ベノミル、マンゼブ、マンネブ、メトリブジン、シペルメトリン、エスフェンバレレート、フェンバレレート、ジネブ及びジラム

(2) 1 世代試験のプロトコールの概要

平成 12 年度に選定した 12 物質について

a . 10 物質について

a - 1 10 物質の 1 世代試験

- 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、日本クア(株))(自由摂取)
- ウ . 投与経路 : 強制経口投与(コーン油に溶解)
TBT, TPT については混餌
- エ . 用量 : 低用量(文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した比較的 low 用量)にしぼり 6 群(物質ごとに検討)。フタル酸ジ-n-ブチルについては、低用量にしぼり 7 群。
ただし、最高用量については、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用量を設定。
- 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 : 文献調査結果を参考に、物質ごとに検討。
- 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。

a - 2 フタル酸ジ-n-ブチルの追加試験

追加試験において変更した内容は以下のとおりである。

- ア . 動物の種類 : ラット(クローズドコロニー ; Wistar Hannover)
- カ . 試験期間 : 馴化・交配期間を含め 21 週程度(約 150 日)。離乳時の F1 哺育児の間引きを行わないため、試験を 2 回に分割して実施。
- ク . 観察項目 : パイロット試験において F1 哺育児の 3 週齢時、6 週齢時及び 10 週齢時に雌雄 1 匹/腹の割合で実施した病理組織学的検査を 3 週齢時及び 10 週齢時の全例実施に変更するとともに、帝王切開検査(妊娠 14 日目)、反応性検査を追加。

b . 2 物質について

b - 1 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 , 利エン外酵母(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 : 低用量(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)、遺伝子発現の定量的測定等
 ク．分析：a-1における分析項目に加え、飼料等の女性ホルモンも分析。

b - 2 4-オクチルフェノール及びノニルフェノールの1世代試験

- ア．動物の種類：ラット(クローズドコロニー; Wistar Hannover)
 イ．飼料の種類：実験動物用固型飼料(CE2、日本クア(株))(自由摂取)
 ウ．投与経路：4-オクチルフェノールについては、強制経口投与(コーン油に溶解)、ノニルフェノールについては、飲水投与。
 エ．用量：低用量(文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した比較的low用量)にしぼり5群(物質ごとに検討)。
 EEを使用したパイロット試験結果を参考にし、陽性対照群を1群設定(EEの皮下投与)。
 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：文献調査結果を参考に、物質ごとに検討。
 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。

平成13年度に選定した8物質について

a．ビスフェノールAを除く7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 Hannover)
 イ．飼料の種類：実験動物用固型飼料(CE2、日本クア(株))(自由摂取)
 ウ．投与経路：強制経口投与(コーン油に溶解)。ただし、アミトロールについては、飲水投与。
 エ．用量：低用量(文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した比較的low用量)にしぼり6群(物質ごとに検討)。
 ただし、最高用量については、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用量を設定。
 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
 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。

b．ビスフェノールAについて

- ア．動物の種類 : ラット(クローズドコロニー ; Wistar Hannover)
 イ．飼料の種類 : 実験動物用固型飼料(CE2、日本クア(株))(自由摂取)
 ウ．投与経路 : 低用量群については、飲水投与。最高用量は強制経口投与(1%CMC水溶液等に懸濁)。
 エ．用量 : 低用量(文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した比較的low用量)にしぼり6群。ただし、最高用量については、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用量を設定。
 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、検討
 ケ．分析 : 飼料、飲水、1%CMC水溶液等については、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、1%CMC水溶液等に混合した実質投与量も測定。

平成14年度に選定した24物質のうち8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 Hannover)
 イ．飼料の種類 : 実験動物用固型飼料(CE2、日本クア(株))(自由摂取)
 ウ．投与経路 : 原則として、混餌投与または強制経口投与(コーン油に溶解)。
 エ．用量 : 低用量(文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した比較的low用量)にしぼり6群(物質ごとに検討)。ただし、原則として、最高用量については、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用量を設定。
 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
 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。

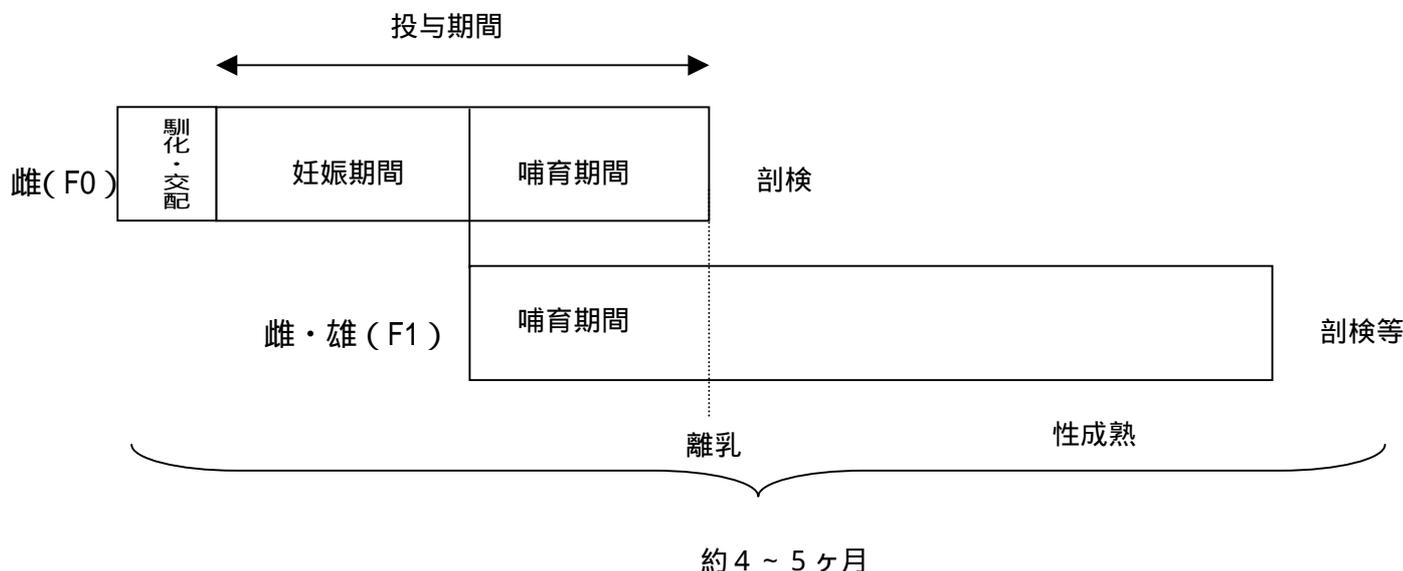
*ヘキサクロロベンゼン、 γ -ヘキサクロロシクロヘキサン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル、*p,p'*-DDT、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDE、*p,p'*-DDD

平成 15 年度に選定した 8 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 Hannover)
- イ．飼料の種類 : 実験動物用固型飼料(CE2、日本クア(株))(自由摂取)
- ウ．投与経路 : 原則として、混餌投与または強制経口投与(コーン油に溶解)。
- エ．用量 : 低用量(文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した比較的低用量)にしぼり 6 群(物質ごとに検討)。
ただし、原則として、最高用量については、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用量を設定。
- 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
- 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。

*アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、マイレックス、ケルセン、マラチオン及びベルメトリン

(3) 1 世代試験の概略図



2 . 試験管内 (*in vitro*) 試験

in vivo 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

平成 12 年度及び平成 13 年度に選定した 20 物質並びに平成 14 年度に選定した 8 物質について ヒトエストロゲン受容体(ER 及び ER)結合競合阻害試験(レセプターバインディングアッセイ)及び ヒト乳がん細胞 E -screen 試験を実施、終了。

(2) アンドロゲン様作用

平成 12 年度及び平成 13 年度に選定した 20 物質並びに平成 14 年度に選定した 8 物質について ヒト乳がん細胞アンドロジェン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト及びアンタゴニスト)及び ラットアンドロジェン受容体結合阻害試験(放射線リガンド結合法:RIA 法)を実施、終了。

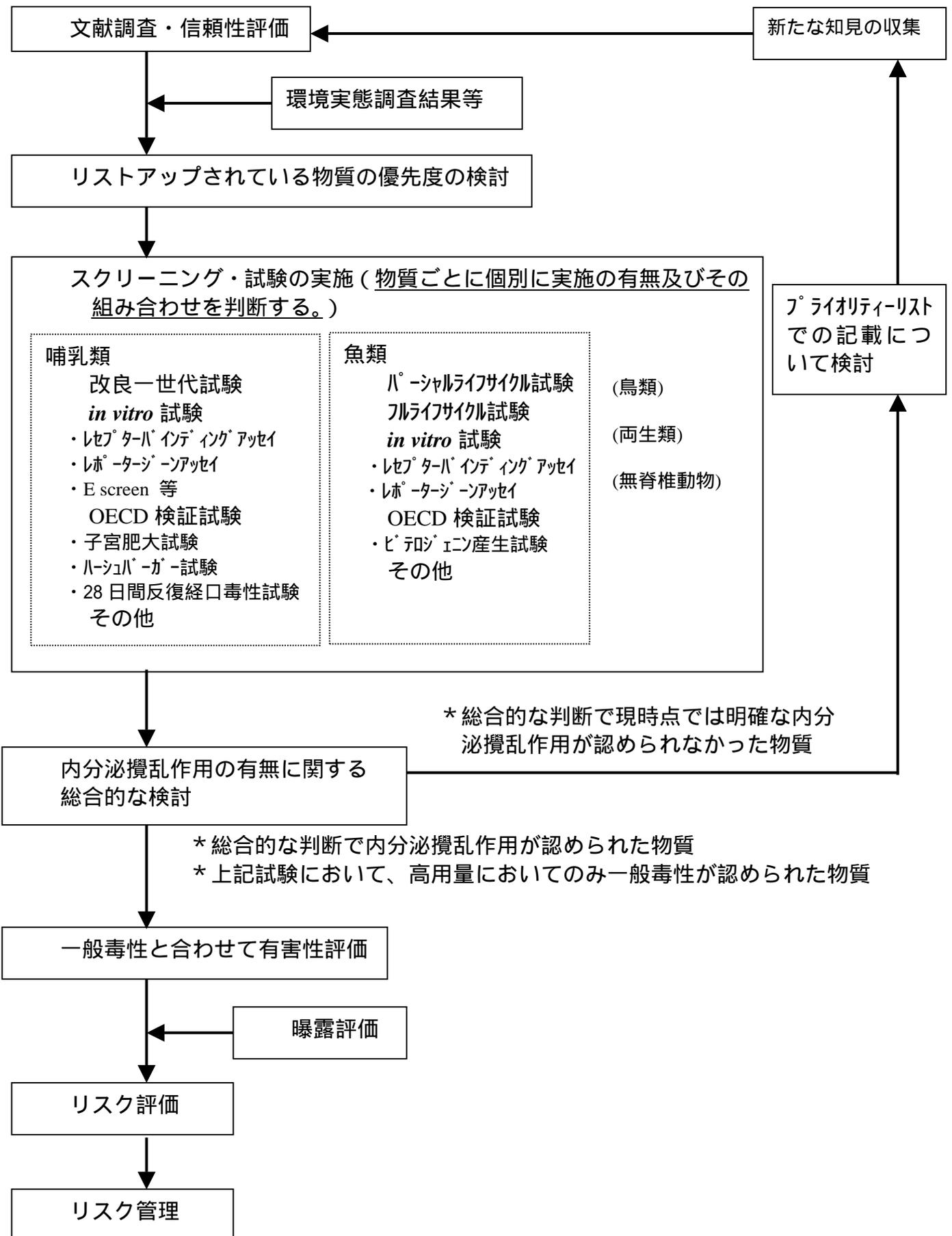
(3) 甲状腺ホルモン様作用

平成 12 年度及び平成 13 年度に選定した 20 物質並びに平成 14 年度に選定した 8 物質についてヒト甲状腺ホルモン受容体(TR 及び TR)酵母試験を実施、終了。

3. 評価体制

「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」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。

SPEED '98 にリストアップされている物質のリスク評価



哺乳類を用いた人健康への内分泌攪乱作用に関する試験結果まとめ表（案）

試験結果のまとめ表（案）に環境省及び経済産業省が実施した生体内(*in vivo*)試験及び環境省が実施した試験管内(*in vitro*)試験結果を記載した。実施中の試験については、その旨記載した。

生体内(*in vivo*)試験結果のとりまとめについて

環境省が実施した試験結果を「内分泌攪乱作用が疑われる物質のスクリーニング・試験法（哺乳類）評価検討会」の評価・助言に従い、以下の項目に分類し、投与量ごとに「A」、「B」、「C」、「D」、「S」、「P」を記載した。

「A」に分類された試験結果については、まとめ表の欄外に記載するとともに、信頼性の認められた既報告において報告されている結果については下線を付した。また、「B」、「C」、「S」、「P」に分類された試験結果については、表中に結果を記載した。

備考欄には、投与方法、投与期間について記載した。

- | |
|---|
| <p>A：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)付近で有意な所見が認められた。</p> <p>B：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められた。</p> <p>C：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められたが、生理的変動の範囲内であると考えられた。</p> <p>D：有意な反応は認められなかった。</p> <p>S：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められ、追加試験を実施中。</p> <p>P：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められたが、その意義については今後の検討課題とする。</p> |
|---|

なお、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(座長：井上 達 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター長)における審議の結果、悪影響とは考えられなかった試験結果(体重の高値等)については、統計学的に有意な反応が認められた場合においても、とりまとめに採用しなかった。

経済産業省が実施した試験結果については、同省が公表した試験結果の評価(陰性、陽性)を記載した。

試験管内 (*in vitro*) 試験結果のとりまとめについて

試験濃度範囲を記載し、試験結果欄には、 IC_{50} 値 (標識されたホルモンと受容体との結合を 50% 阻害する濃度)、 PC_{50} 値 (E2 等が誘導する化学発光強度の 50% の活性を誘導する濃度)、又は Ec_{10} 値 (バックグラウンド値の 10 倍の化学発光強度比を示す濃度) 等が得られた場合はその値を記載し、得られなかった場合は最大反応値とその濃度を示した。

ただし、有意差検定を行い、有意な反応が認められなかった場合は、「」とした。また、細胞毒性が認められた場合及び毒性影響と区別することが困難であった場合は、その旨、備考欄に記載した。

人健康への内分泌攪乱作用による影響に関する哺乳類を用いた試験結果まとめ表

試験結果のまとめ表

4. ヘキサクロロベンゼン

(1) 生体内 (*in vivo*) 試験

実施機関	試験区分	用量	μg/kg/day				mg/kg/day	備考
			0.04	0.4	4	40	40	
環境省	1世代試験	C F1 雄：精子運動機能の経路速度・進行速度の低値	C F1 雄：精子運動機能の経路速度・進行速度の低値	C F1 雄：血中リン脂質濃度・血中トリグリセライド濃度・精子運動機能の経路速度・進行速度・軌跡速度の低値 F1 雌：血中トリグリセライド濃度の低値	C F1 雄：血中リン脂質濃度・血中トリグリセライド濃度・精子運動機能の経路速度・進行速度・軌跡速度の低値 F1 雌：血中トリグリセライド濃度の低値	A	強制経口 42 日間	

注) A：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)付近で有意な所見が認められた。

B：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められた。

C：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められたが、生理的変動の範囲内であると考えられた。

D：有意な反応は認められなかった。

S：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められ、追加試験を実施中。

P：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められたが、その意義については今後の検討課題とする。

< Aで認められた所見 >

* F0 母動物：分娩状態不良(産児の放置、胎盤処理不良、哺育不良等)個体出現頻度・一般状態不良(振戦)個体出現頻度・剖検異常(乳腺の発育不全、胸腺の萎縮)個体出現頻度・肝臓小葉中心性肝細胞肥大個体出現頻度・肝臓脂肪変性個体出現頻度・肝臓単細胞壊死個体出現頻度・肝臓細胞分裂像個体出現頻度・腎臓近位尿細管脂肪変性個体出現頻度・胸腺萎縮個体出現頻度・乳腺乳汁減少個体出現頻度の高値、全哺育児の死亡(哺育 10 日まで)

* F1 児動物：生存産児数・出生率・生存率の低値

* F1 雄：体重・正向反射試験における完成個体出現頻度の低値

* F1 雌：正向反射試験における完成個体出現頻度の低値

(下線部は、報告例の得られた所見)

(2) 試験管内 (*in vitro*) 試験

実施機関	試験区分	試験結果	試験濃度範囲	備考
環境省	ER 競合阻害	$2.2 \times 10^{-7} \text{M}$ において 5 %	$10^{-11} \sim 4.5 \times 10^{-5} \text{M}$	
	ER 競合阻害	$2.2 \times 10^{-7} \text{M}$ において 5 %	$10^{-9} \sim 4.5 \times 10^{-5} \text{M}$	
	E-screen	10^{-6}M において E2(10^{-8}M)の 25%	$10^{-10} \sim 10^{-5} \text{M}$	
	AR レポーター遺伝子(アンゴニスト)	-	$3.0 \times 10^{-8} \sim 10^{-4} \text{M}$	$3.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 以上において細胞毒性
	AR レポーター遺伝子(アンタゴニスト)	-	$3.0 \times 10^{-8} \sim 10^{-4} \text{M}$	$3.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 以上において細胞毒性
	AR 親和性	-	$10^{-5} \sim 10^{-3} \text{M}$	
	TR	-	$< 2.0 \times 10^{-5} \text{M}$	
TR	-	$< 2.0 \times 10^{-5} \text{M}$		

注) IC_{50} 値(標識されたホルモンと受容体との結合を 50%阻害する濃度)、 PC_{50} 値(E2 等が誘導する化学発光強度の 50%の活性を誘導する濃度)、 Ec_{x10} 値(バックグラウンド値の 10 倍の化学発光強度比を示す濃度)等が得られた場合はその値を記載し、得られなかった場合は最大反応値とその濃度を示した。
ただし、有意差検定を行い、有意な反応が認められなかった場合は、 - とした。

試験結果のまとめ表

12. -ヘキサクロロシクロヘキサン

(1) 生体内 (*in vivo*) 試験

実施機関	試験区分	用量	μg/kg/day				mg/kg/day	備考
			0.1	0.5	2.5	12.5	5	
環境省	1世代試験	C F1雄：水迷路(直水路)1回目遊泳時間・ 肝臓(絶対、相対)重量の高値	D	D	D	A	強制経口 42日間	

注) A：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)付近で有意な所見が認められた。

B：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められた。

C：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められたが、生理的変動の範囲内であると考えられた。

D：有意な反応は認められなかった。

S：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められ、追加試験を実施中。

P：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められたが、その意義については今後の検討課題とする。

< Aで認められた所見 >

* F0 母動物：体重増加量・摂餌量の低値

* F1 児動物：離乳時生存児数・生存率の低値

* F1 雄：脳絶対重量・精巣絶対重量・前立腺(絶対、相対)重量の低値、肝臓相対重量の高値

* F1 雌：体重増加量・脳絶対重量・胸腺(絶対、相対)重量・卵巣(絶対、相対)重量の低値、膈開口発現日・初回発情期の遅延、連続発情、肝臓相対重量・下垂体相対重量・腎臓相対重量・副腎相対重量・卵巣の黄体減少個体出現頻度・子宮腺上皮扁平上皮化生個体出現頻度・子宮内膜上皮扁平上皮化生個体出現頻度・膈粘膜上皮角質化個体出現頻度の高値、子宮(絶対、相対)重量の高値または低値、体重の高値または低値

(下線部は、報告例の得られた所見)

(2) 試験管内 (*in vitro*) 試験

実施機関	試験区分	試験結果	試験濃度範囲	備考
環境省	ER 競合阻害	IC ₅₀ =2.8 × 10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁹ ~ 10 ⁻⁴ M	
	ER 競合阻害	4.5 × 10 ⁻⁵ M において 20%	10 ⁻⁹ ~ 10 ⁻⁴ M	
	E-screen	10 ⁻⁵ M において E2(10 ⁻⁸ M)の 73% 有意差あり	10 ⁻⁹ ~ 10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M において沈殿
	AR レポーター遺伝子(アゴニスト)	-	10 ⁻⁶ ~ 10 ⁻⁴ M	
	AR レポーター遺伝子(アンタゴニスト)	-	10 ⁻⁶ ~ 10 ⁻⁴ M	
	AR 親和性	-	10 ⁻⁵ ~ 10 ⁻³ M	
	TR	-	<10 ⁻⁵ M	
TR	-	<10 ⁻⁵ M		

注) IC₅₀ 値(標識されたホルモンと受容体との結合を 50%阻害する濃度)、PC₅₀ 値(E2 等が誘導する化学発光強度の 50%の活性を誘導する濃度)、Ecx₁₀ 値(バックグラウンド値の 10 倍の化学発光強度比を示す濃度)等が得られた場合はその値を記載し、得られなかった場合は最大反応値とその濃度を示した。

ただし、有意差検定を行い、有意な反応が認められなかった場合は、 とした。

試験結果のまとめ表
14. *cis*-クロルデン

(1) 生体内 (*in vivo*) 試験

実施機関	試験区分	用量	μ g/kg/day				mg/kg/day	備考
			0.1	0.5	2.5	12.5	10	
環境省	1世代試験	C F0 母動物：腎臓(絶対、 相対)重量の低値 F1 雌：副腎(絶対、相 対)重量の高値	C F1 雄：下垂体(絶対、 相対)重量の低値	C F0 母動物：摂餌量・腎臓皮 質の鉍質沈着個体出現頻 度の低値 F1 雄：下垂体(絶対、相 対)重量の低値	C F1 雄：下垂体(絶対、 相対)重量の低値	A	強制経口 42 日間	

- 注) A：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)付近で有意な所見が認められた。
B：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められた。
C：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められたが、生理的変動の範囲内であると考えられた。
D：有意な反応は認められなかった。
S：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められ、追加試験を実施中。
P：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められたが、その意義については今後の検討課題とする。

< Aで認められた所見 >

* F0 母動物：体重増加量・腎臓相対重量の低値、摂餌量の高値、全出生児の死亡(4/12例：有意差なし)

* F1 児動物：生存率の低値

* F1 雄：下垂体(絶対、相対)重量・腎臓相対重量の低値、肝臓肝細胞空胞変性個体出現頻度の高値

* F1 雌：肝臓(絶対、相対)重量・肝臓肝細胞空胞変性個体出現頻度の高値

(下線部は、報告例の得られた所見)

(2) 試験管内 (*in vitro*) 試験

実施機関	試験区分	試験結果	試験濃度範囲	備考
環境省	ER 競合阻害	$2.2 \times 10^{-5} \text{M}$ において 33%	$10^{-11} \sim 2.2 \times 10^{-5} \text{M}$	
	ER 競合阻害	$2.2 \times 10^{-5} \text{M}$ において 29%	$10^{-11} \sim 2.2 \times 10^{-5} \text{M}$	
	E-screen	10^{-9}M において E2(10^{-8}M)の 24%	$10^{-10} \sim 10^{-5} \text{M}$	10^{-6}M 以上において細胞毒性
	AR レポーター遺伝子(アゴニスト)	-	$10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-6} \text{M}$	
	AR レポーター遺伝子(アンタゴニスト)	-	$10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-6} \text{M}$	
	AR 親和性	$\text{IC}_{50} = 4.6 \times 10^{-4} \text{M}$	$10^{-5} \sim 10^{-3} \text{M}$	
	TR	-	$< 10^{-5} \text{M}$	
	TR	-	$< 10^{-5} \text{M}$	

注) IC_{50} 値(標識されたホルモンと受容体との結合を 50%阻害する濃度)、 PC_{50} 値(E2 等が誘導する化学発光強度の 50%の活性を誘導する濃度)、 Ecx_{10} 値(バックグラウンド値の 10 倍の化学発光強度比を示す濃度)等が得られた場合はその値を記載し、得られなかった場合は最大反応値とその濃度を示した。

ただし、有意差検定を行い、有意な反応が認められなかった場合は、 とした。

試験結果のまとめ表
16. *trans*-ノナクロル

(1) 生体内 (*in vivo*) 試験

実施機関	試験区分	用量				備考	
		μg/kg/day					mg/kg/day
		0.05	0.5	5	50	10	
環境省	1世代試験	D	D	C F0 母動物：体重増加量の低値 F1 雄：脳絶対重量の高値 F1 雌：脳絶対重量の高値	C F1 雄：脳絶対重量の高値	A	強制経口 42 日間

- 注) A：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)付近で有意な所見が認められた。
 B：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められた。
 C：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められたが、生理的変動の範囲内であると考えられた。
 D：有意な反応は認められなかった。
 S：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められ、追加試験を実施中。
 P：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められたが、その意義については今後の検討課題とする。

< Aで認められた所見 >

- * F0 母動物：体重増加量の低値、肝臓相対重量・肝臓小葉中心性肝細胞肥大個体出現頻度・肝臓小葉中心域の肝細胞にくもり硝子様変性個体出現頻度の高値
 * F1 雄：脳絶対重量・肝臓(絶対、相対)重量・肝臓小葉中心性肝細胞肥大個体出現頻度・肝臓中間帯細胞質空胞化個体出現頻度の高値
 * F1 雌：脳絶対重量・肝臓(絶対、相対)重量・卵巣相対重量・肝臓小葉中心性肝細胞肥大個体出現頻度・肝臓中間帯細胞質空胞化個体出現頻度の高値
 (下線部は、報告例の得られた所見)

(2) 試験管内 (*in vitro*) 試験

実施機関	試験区分	試験結果	試験濃度範囲	備考
環境省	ER 競合阻害	IC ₅₀ =10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁹ ~ 4.5 × 10 ⁻⁵ M	
	ER 競合阻害	4.5 × 10 ⁻⁵ M において 24%	10 ⁻⁹ ~ 4.5 × 10 ⁻⁵ M	
	E-screen	10 ⁻⁶ M において E2(10 ⁻⁸ M)の 39% 有意差あり	10 ⁻⁹ ~ 10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M 以上において細胞毒性、10 ⁻⁴ M において沈殿
	AR レポーター遺伝子(アゴニスト)	-	3.0 × 10 ⁻⁸ ~ 10 ⁻⁴ M	
	AR レポーター遺伝子(アンタゴニスト)	-	3.0 × 10 ⁻⁸ ~ 10 ⁻⁴ M	
	AR 親和性	IC ₅₀ =5.44 × 10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ ~ 10 ⁻³ M	
	TR	-	<10 ⁻⁵ M	
TR	-	<10 ⁻⁵ M		

- 注) IC₅₀ 値(標識されたホルモンと受容体との結合を 50%阻害する濃度)、PC₅₀ 値(E2 等が誘導する化学発光強度の 50%の活性を誘導する濃度)、Ecx₁₀ 値(バックグラウンド値の 10 倍の化学発光強度比を示す濃度)等が得られた場合はその値を記載し、得られなかった場合は最大反応値とその濃度を示した。
 ただし、有意差検定を行い、有意な反応が認められなかった場合は、 とした。

試験結果のまとめ表
18. *o,p'*-DDT

(1) 生体内 (*in vivo*) 試験

実施機関	試験区分	用量				備考
		0.2	1	5	25	
環境省	1世代試験	D	D	P	P	A
				F0 母動物：胸腺リンパ組織萎縮個体出現頻度の高値	F0 母動物：胸腺リンパ組織萎縮個体出現頻度の高値	強制経口 42 日間

- 注) A：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)付近で有意な所見が認められた。
 B：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められた。
 C：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められたが、生理的変動の範囲内であると考えられた。
 D：有意な反応は認められなかった。
 S：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められ、追加試験を実施中。
 P：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未満で有意な反応が認められたが、その意義については今後の検討課題とする。

< Aで認められた所見 >

* F0 母動物：受胎率の低値(0%)

* F1 雄：

* F1 雌：

(下線部は、報告例の得られた所見)

(2) 試験管内 (*in vitro*) 試験

実施機関	試験区分	試験結果	試験濃度範囲	備考
環境省	ER 競合阻害	IC ₅₀ =2.2 × 10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁹ ~ 2.2 × 10 ⁻⁵ M	
	ER 競合阻害	10 ⁻⁵ M 及び 2.2 × 10 ⁻⁵ M において 28%	10 ⁻⁹ ~ 2.2 × 10 ⁻⁵ M	
	E-screen	10 ⁻⁶ M において E2(10 ⁻⁸ M)の 61% 有意差あり	10 ⁻⁹ ~ 10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M において細胞毒性
	AR レポーター遺伝子(アゴニスト)	-	3.0 × 10 ⁻⁷ ~ 5.0 × 10 ⁻⁵ M	3.0 × 10 ⁻⁵ M 以上において細胞毒性
	AR レポーター遺伝子(アンタゴニスト)	IC ₅₀ =2.22 × 10 ⁻⁵ M	3.0 × 10 ⁻⁷ ~ 5.0 × 10 ⁻⁵ M	3.0 × 10 ⁻⁵ M 以上において細胞毒性
	AR 親和性	IC ₅₀ =1.64 × 10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ ~ 10 ⁻³ M	
	TR	-	<10 ⁻⁹ M	
TR	-	<10 ⁻⁵ M		

注) IC₅₀ 値(標識されたホルモンと受容体との結合を 50%阻害する濃度)、PC₅₀ 値(E2 等が誘導する化学発光強度の 50%の活性を誘導する濃度)、Ecx₁₀ 値(バックグラウンド値の 10 倍の化学発光強度比を示す濃度)等が得られた場合はその値を記載し、得られなかった場合は最大反応値とその濃度を示した。
 ただし、有意差検定を行い、有意な反応が認められなかった場合は、 とした。

試験結果のまとめ表

19. p,p'-DDE

(1) 生体内(in vivo)試験

実施機関	試験区分	μg/kg/day				mg/kg/day	備考
		0.03	0.30	3	30	50	
環境省	1世代試験	C F1 児動物：性比(雄/雄+雌)の高値 P F1 雄：前立腺 C3mRNA 発現量の低値	C F1 児動物：性比(雄/雄+雌)の高値 P F1 雄：前立腺 C3mRNA 発現量の低値	C F1 児動物：性比(雄/雄+雌)の高値 P F1 雄：前立腺 C3mRNA 発現量の低値 C F1 雌：膣開口完成日体重・摂餌量の高値	P F1 雄：前立腺 C3mRNA 発現量の低値	A	強制経口 42 日間

注) A：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)付近で有意な所見が認められた。

B：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未滿で有意な反応が認められた。

C：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未滿で有意な反応が認められたが、生理的変動の範囲内であると考えられた。

D：有意な反応は認められなかった。

S：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未滿で有意な反応が認められ、追加試験を実施中。

P：影響が既に認められている用量(LOEL, LOAEL)未滿で有意な反応が認められたが、その意義については今後の検討課題とする。

< Aで認められた所見 >

* F0 母動物：摂餌量の低値、肝臓(絶対、相対)重量・肝臓暗調化個体出現頻度の高値

* F1 雄：精巢上体絶対重量・精囊+凝固腺絶対重量・前立腺 C3mRNA 発現量・胸腺相対重量の低値、肝臓(絶対、相対)重量・肝臓小葉中心性肝細胞腫大個体出現頻度・摂餌量の高値

* F1 雌：肝臓(絶対、相対)重量・肝臓小葉中心性肝細胞腫大個体出現頻度・切歯萌出率・摂餌量の高値

(下線部は、報告例の得られた所見)

(2) 試験管内(in vitro)試験

実施機関	試験区分	試験結果	試験濃度範囲	備考
環境省	ER 競合阻害	10 ⁻⁵ M において 23%	10 ⁻¹¹ ~ 2.2 × 10 ⁻⁵ M	
	ER 競合阻害	10 ⁻⁵ M 及び 2.2 × 10 ⁻⁵ M において 13%	10 ⁻¹¹ ~ 10 ⁻⁴ M	
	E-screen	10 ⁻⁵ M において E2(10 ⁻⁸ M)の 35% 有意差あり	10 ⁻⁹ ~ 10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M において細胞毒性
	AR レポーター遺伝子(アゴニスト)	10 ⁻⁵ ~ 3.0 × 10 ⁻⁵ M において作用が認められた	10 ⁻⁷ ~ 1.5 × 10 ⁻⁴ M	
	AR レポーター遺伝子(アンタゴニスト)	IC ₅₀ =6.7 × 10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ ~ 1.5 × 10 ⁻⁴ M	
	AR 親和性	IC ₅₀ =7.26 × 10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ ~ 10 ⁻³ M	
	TR	-	<10 ⁻³ M	
	TR	-	<10 ⁻³ M	

注) IC₅₀ 値(標識されたホルモンと受容体との結合を 50%阻害する濃度)、PC₅₀ 値(E2 等が誘導する化学発光強度の 50%の活性を誘導する濃度)、Ecx₁₀ 値(バックグラウンド値の 10 倍の化学発光強度比を示す濃度)等が得られた場合はその値を記載し、得られなかった場合は最大反応値とその濃度を示した。

ただし、有意差検定を行い、有意な反応が認められなかった場合は、 とした。

人健康への内分泌攪乱作用による影響に関する

哺乳類を用いた試験結果と今後の方針（案）

・平成 14 年度優先物質の試験結果について

1. ヘキサクロロベンゼンの試験結果

(1) げっ歯類を用いた 1 世代試験

最高用量(40mg/kg/day)における変化

F0 母動物の分娩状態不良(産児の放置、胎盤処理不良、哺育不良等)個体出現頻度・一般状態不良(振戦)個体出現頻度・剖検異常(乳腺の授乳期間に見合わない未発達、胸腺の萎縮)個体出現頻度・病理組織学的検査における胸腺萎縮個体出現頻度・肝臓小葉中心性肝細胞肥大個体出現頻度・肝臓脂肪変性個体出現頻度・肝臓単細胞壊死個体出現頻度・肝臓細胞分裂像個体出現頻度・腎臓近位尿管脂肪変性個体出現頻度・乳腺乳汁減少個体出現頻度の高値及び全哺育児の死亡(哺育 10 日まで)が認められた。

F1 児動物の出生率・生存産児数・生存率の低値が認められた。

F1 雌雄の正向反射試験における完成個体出現頻度の低値が認められた。

F1 雄の体重の低値が認められた。

F1 児動物の出生率の低値及び F1 雄の体重の低値については信頼性の認められた既報告で報告されている。

低用量群(0.04、0.4、4、40 µg/kg/day)における変化

3 週齢の F1 雄の 4、40 µg/kg/day 投与群での血液生化学的検査におけるリン脂質濃度及びトリグリセライド濃度の低値、3 週齢の F1 雌の 4、40 µg/kg/day 投与群での血液生化学的検査におけるトリグリセライド濃度の低値が認められたが、低値であり、悪影響とは考えられなかった。また、12 週齢での検査結果では有意な差は認められず、一過性の変化であると考えられた。なお、脂質代謝に関する他のパラメータに有意な差は認められなかった。

(参考)試験結果の解釈に関する専門家の意見要旨

* F1 雄の血液生化学的検査におけるリン脂質濃度の低値について：肝臓や腎臓への影響が認められたとする報告が得られたことから、その影響が血液検査結果に反映されると想定し、測定を実施した。コレステロール代謝に関わる総コレステロール濃度には有意な差は認められておらず、また、12 週齢での検査結果では有意な差は認められなかった。肝臓の重量や病理組織学的検査にも有意な差は認められなかった。これらのことから判断すると、偶発的に有意な差が認められたと考えるべきであろう。

F1 雄の 0.04、0.4、4、40 µg/kg/day 投与群での精子検査における精子運動機能の経路速度、進行速度の低値及び 4、40 µg/kg/day 投与群での精子検査に

おける精子運動機能の軌跡速度の低値が認められたが、精子密度・精巣重量・精巣上体重量には有意な差は認められなかった。なお、精巣及び精巣上体の病理組織学的検査においても有意な差は認められなかった。また、交配検査における受胎率にも有意な差は認められなかった。

なお、絶対重量及び相対重量ともに有意差の認められた変動は得られなかったものの、その一方に有意差が認められた器官(脳を除く)は以下のとおり。

* F1 雌(12 週齢) : 0.4 µg/kg/day 投与群での副腎相対重量の低値

(2) 試験管内(*in vitro*)試験

ヒトエストロゲン受容体(ER 及び ER)結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞 E-Screen 試験、ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト及びアンタゴニスト)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR 及び TR)酵母試験を行った。

その結果、ヒトエストロゲン受容体(ER 及び ER)結合競合阻害試験及びヒト乳がん細胞 E-Screen 試験では、弱い活性がみられた。ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト及びアンタゴニスト)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR 及び TR)酵母試験では、有意な反応は認められなかった。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおりヘキサクロロベンゼンについては、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

また、最高用量(既報告で影響が認められた用量)においてのみ、一般毒性と考えられる影響が認められた。

本物質については、健康リスク初期評価が「化学物質の環境リスク評価 第1巻」において行われ、「健康リスクについては現時点では作業は必要ないと考えられる」と評価されており、今回の調査結果においても、既存の知見の範囲内であったことから、早急に新たな調査に着手する必要性は低いと考えられた。

プロトコール概要 (ヘキサクロロベンゼン)

被験物質	試験機関	被験動物	使用動物数	投与方法	用量設定	投与量	試験方法の形式	母動物の観察項目	児動物の観察項目	備考
ヘキサクロロベンゼン (HCB)	日本バイオアッセイ研究センター	Wistar Hannover ラット BrlHan: WIST@Jcl(GALAS)	導入 雌 100 匹 雄 60 匹 試験使用 雌 90 匹 (1 群 15 匹交配で、12 匹の妊娠雌を確保)	強制経口投与 (コーン油) 妊娠 0 日 ~ 哺育 20 日連続投与	0 0.04 0.4 4 40 40 μg/kg/day 40 mg/kg/day	5 mL/kg (BW) 5 mL/kg (BW)	哺育児数の調整 (間引き)は行わない。 (グループ 1) 各群 6 腹の全 F ₁ 児を離乳(21 日齢)する。 (グループ 1A) 12 週齢交配(雌雄各 3 匹) (グループ 1B) 12 週齢解剖 (グループ 2) 離乳の 6 腹を除く全 F ₁ 児を 21 日齢で解剖する。	一般状態 体重 摂餌量 分娩・哺育状態 血液生化学的検査 総コレステロール, リン脂質, GOT, GPT, LDH, -GTP 血漿・血清の凍結保存 病理学的検査 剖検 臓器重量 胸腺, 副腎, 下垂体, 甲状腺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 膵臓, 子宮, 卵巣 病理組織学的検査 臓器重量測定臓器 肝臓の一部凍結保存 着床痕数	哺育期(雌雄全匹) 産児数・生存児数、一般状態、体重、AGD、乳頭、行動発達(正向反射, 自由落下反射)、身体発達(歯牙の萌出, 耳道の開通, 眼瞼の開裂) (グループ 2) 21 日齢解剖(6 腹以上, 雌雄全匹) 血液生化学的検査(雌雄各 3 匹) 総コレステロール, リン脂質, GOT, GPT, LDH, -GTP 血漿・血清の凍結保存 病理学的検査 剖検, 臓器重量(胸腺, 副腎, 下垂体, 甲状腺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 子宮, 卵巣, 精巣, 精巣上部, 前立腺, 精嚢+凝固腺), 病理組織学的検査(臓器重量測定臓器), 肝臓の一部凍結保存 (グループ 1) 離乳から 12 週齢まで(6 腹, 雌雄全匹) 一般状態、体重、陰開口、包皮分離、性周期、交配 (グループ 1B) 12 週齢解剖(6 腹, 雌雄各 3 匹以上) 血液生化学的検査 総コレステロール, リン脂質, GOT, GPT, LDH, -GTP 血漿・血清の凍結保存 病理学的検査 剖検, 臓器重量(胸腺, 副腎, 下垂体, 甲状腺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 子宮, 卵巣, 精巣, 精巣上部, 前立腺, 精嚢+凝固腺), 病理組織学的検査(臓器重量測定臓器), 肝臓の一部凍結保存 精子検査(運動機能, 精子数) (グループ 1A) 交配後(雌)(6 腹, 各 3 匹) 体重 病理学的検査(剖検, 臓器保存) 帝王切開(妊娠黄体数, 着床痕数, 胚の生死) 交配後(雄)(6 腹, 各 3 匹) 病理学的検査(剖検, 臓器保存)	

2. -ヘキサクロロシクロヘキサンの試験結果

(1) げっ歯類を用いた1世代試験

最高用量(5 mg/kg/day)における変化

F0 母動物の体重増加量・摂餌量の低値が認められた。

F1 雌雄の生存児数・生存率・脳絶対重量の低値及び肝臓相対重量の高値が認められた。

F1 雄の精巣絶対重量・前立腺(絶対、相対)重量の低値が認められた。

F1 雌の下垂体相対重量・肝臓相対重量・腎臓相対重量・副腎相対重量・病理組織学的検査における卵巣の黄体減少個体出現頻度・子宮の子宮腺上皮扁平上皮化生個体出現頻度・内膜上皮扁平上皮化生個体出現頻度・腔粘膜上皮角質化個体出現頻度の高値、体重増加量・胸腺(絶対、相対)重量・卵巣(絶対、相対)重量・脳(絶対、相対)重量の低値、体重・子宮(絶対、相対)重量の高値または低値、腔開口発現日・初回発情期の遅延、連続発情が認められた。

F1 雌雄の肝臓相対重量の高値、F1 雄の精巣絶対重量の低値、F1 雌の子宮(絶対、相対)重量・下垂体相対重量・腎臓相対重量・副腎相対重量・病理組織学的検査における卵巣の黄体減少個体出現頻度の高値、体重・胸腺(絶対、相対)重量の低値については信頼性の認められた既報告で報告されている。

低用量群(0.1、0.5、2.5、12.5 µg/kg/day)における変化

F1 雄の0.1 µg/kg/day 投与群での行動検査における水迷路(直水路)1回目遊泳時間の高値が認められたが、同試験の他の試行においては有意な差は認められなかったため、偶発的な変化であると考えられた。

(参考)試験結果の解釈に関する専門家の意見要旨

* F1 雄の行動検査における水迷路(直水路)1回目遊泳時間の高値について：行動検査の結果については、検査を繰り返すごとに減少していくとか、遊泳能力それ自体に影響があるとか、結果全体で見る必要がある。結果全体で見て、変動が大きくないという結果からすると、たまたまこの試行の際に出た変化と考えるしか説明がつかない。水迷路試験においては、遊泳を停止して、浮かんでいる個体の取り扱いが結果に影響するので、平均値を算出する際には除外する(今回の試験結果でも除外して計算を行っている)。

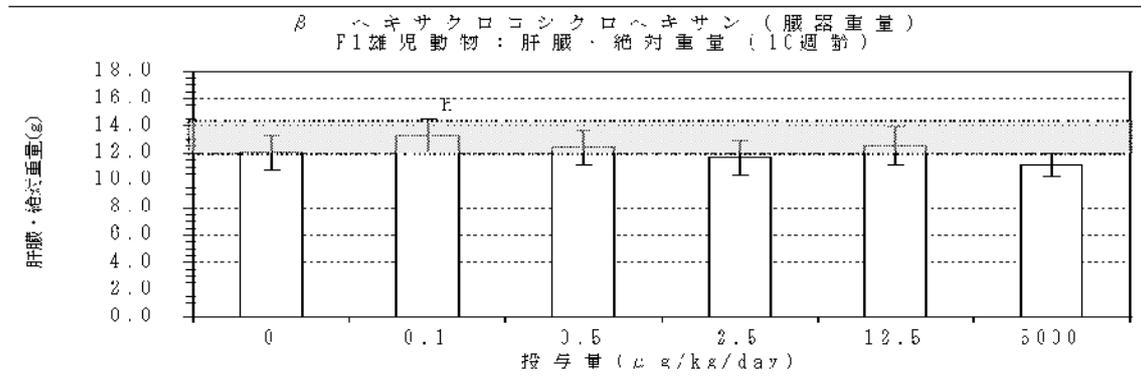
F1 雄の0.1 µg/kg/day 投与群での肝臓(絶対、相対)重量の高値(絶対重量13.301g、相対重量4.114g/100gBW)が認められたが、背景データ*(絶対重量11.69~14.20g、相対重量3.42~4.04g/100gBW)の範囲内にほぼ含まれる変化であり、生理学的変動の範囲内と考えられた(添付図参照)。なお、病理組織学的検査においても有意な差は認められなかった。また、雌では有意な差は認められなかった。

* 背景データについて：ここでは、これまで環境省で実施したWistar Nannover ラットを用いた「改良1世代試験」における対照群(被験物質無投与)の平均

値の範囲を、背景データとした。

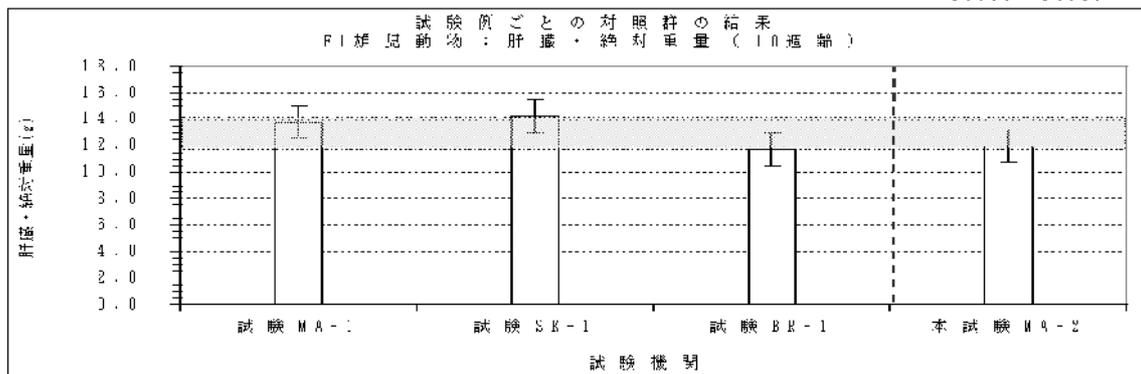
- ヘキサクロロシクロヘキサン

11.149 ~ 11.901



注1) b: 統計学的に有意な差 (P < 0.05)
注2) 網掛部分: 背景データの範囲 (平均値)

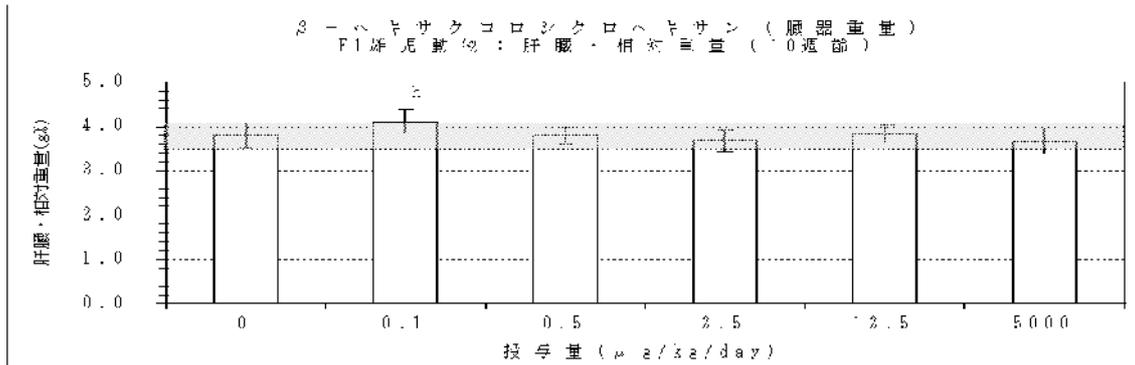
11.30 ~ 14.20



注) 網掛部分: 背景データの範囲 (平均値)

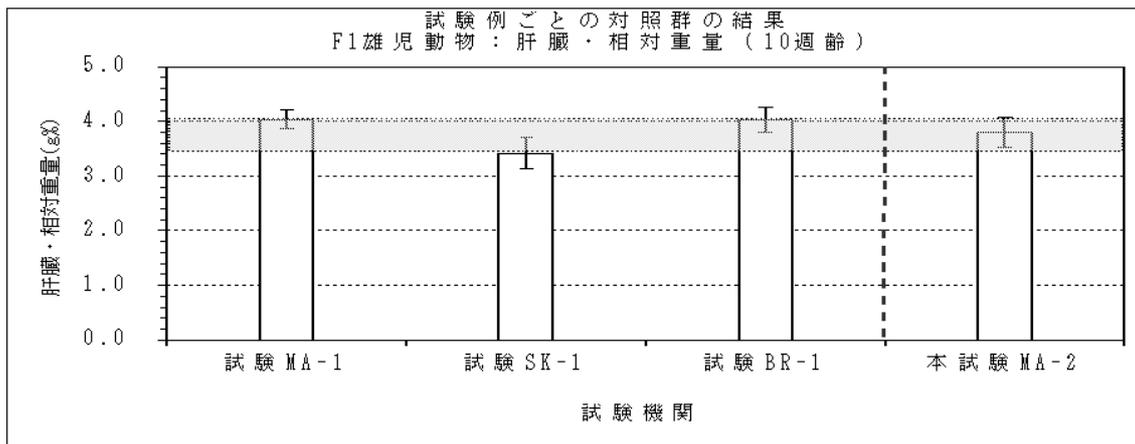
- ヘキサクロロシクロヘキサン

3.670 ~ 4.114



注1) 1: 統計学的に有意な差 (P < 0.05)
注2) 網掛部分: 背景データの範囲 (平均値)

3.420 ~ 4.040



注) 網掛部分: 背景データの範囲 (平均値)

なお、絶対重量及び相対重量ともに有意差の認められた変動は得られなかったものの、その一方に有意差が認められた器官(脳を除く)は以下のとおり。

*F1 雄(3週齢)：12.5 μg/kg/day 投与群での精巣上体相対重量の高値

*F1 雄(10週齢)：0.1 μg/kg/day 投与群での下垂体相対重量の低値

(2) 試験管内 (*in vitro*) 試験

ヒトエストロゲン受容体(ER_α 及び ER_β) 結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞 E-Screen 試験、ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験 (アゴニスト及びアンタゴニスト)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR_α 及び TR_β) 酵母試験を行った。

その結果、ヒトエストロゲン受容体(ER_α) 結合競合阻害試験では、IC₅₀ 値(2.8 × 10⁻⁵M)が得られた。ヒトエストロゲン受容体(ER_β) 結合競合阻害試験では、

活性がみられた。ヒト乳がん細胞 E-Screen 試験では、 10^{-5} M において有意な細胞増殖が認められた。ヒト乳がん細胞アンドロジェン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト及びアンタゴニスト)、ラットアンドロジェン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及び TR β)酵母試験では、有意な反応は認められなかった。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおり、 α -ヘキサクロロシクロヘキサンについては、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

また、最高用量(既報告で影響が認められた用量)においてのみ、一般毒性と考えられる影響が認められた。

本物質については、今後、健康リスク初期評価を行う際に、今回の試験結果を参照する予定である。

プロトコール概要 (-ヘキサクロロシクロヘキサン)

被験物質名	試験機関名	使用動物数	投与方法	用量設定	投与量	試験方法の形式	母動物の観察項目	児動物の観察項目	備考
-ヘキサクロロシクロヘキサン	(株)三菱化学安全科学研究所	<p>1. 系統 Wistar-Hannover GALAS</p> <p>2. 群構成 14 匹/群×6 群(対照群, 低用量群 4 群, 毒性用量群)</p>	<p>1. 経路 強制経口投与(媒体: コーン油)</p> <p>2. 期間 妊娠 0 日~ 離乳を経て剖検前日まで</p>	<p>1. 低用量群 -HCH のヒトにおける推定摂取量に関する情報を参考に決定した。すなわち, ドイツにおけるヒトの 1 日平均摂取量は 0.03 µg/kg 相当で, その上限値は 1 µg/kg, 血中濃度は 0~4.8 µg/L との情報がある (Greves ら, 1977, Bertram ら, 1983)。一方, 日本人における血中濃度は 38~94 µg/L とドイツ人に比べ, 8~20 倍の高値を示す (Yamaguchi ら, 1976)。これらの知見から算出したおおよその日本人の 1 日平均摂取量は約 0.24~0.6 µg/kg, 最大暴露量は 7.2~18 µg/kg (中央値 12.6 µg/kg) と推察される。また, 日本における環境中濃度から算出した推定暴露量は 0.68 µg/kg とされている。これらの情報を基に, 低用量群には, 日本人の 1 日あたりの摂取量および最大暴露量と推測される 0.5 および 12.5 µg/kg を含む 0.1, 0.5, 2.5 および 12.5 µg/kg を設定する。</p> <p>2. 毒性用量群 -HCH の予備試験 (用量: 0, 1, 5, 10, 20mg/kg) の結果, 10mg/kg 以上では, 顕著な出生児死亡がみられたため, 本試験の投与期間を考慮し, 5 mg/kg を設定する。</p>	<p>0 µg/kg 0.1 µg/kg 0.5 µg/kg 2.5 µg/kg 12.5 µg/kg (公比 5)</p> <p>5mg/kg</p>	<p>1. 児数調整 実施しない。</p> <p>2. 離乳後検査 離乳時に雌雄各 3 匹/腹を選抜し, 以下の検査に供する。一部は生殖機能検査後分娩を経て, 哺育 4 日まで観察する。この他の児動物は離乳時に剖検する。</p> <p>【離乳後検査への対応】 No.1: 生殖機能検査動物 剖検時期: 生後 17 週以降 体重, 性成熟, 性周期(10 週齢から 2 週間), 精子検査, 生殖機能, 分娩, 哺育機能(哺育 4 日まで) 毒性用量群は無処置動物と交配</p> <p>No.2: 10 週齢剖検動物 剖検時期: 生後 10 週以降 体重, 性成熟, 性周期(膈開口から 3 サイクル), 剖検, 器官重量, 病理組織検査</p> <p>No.3: 行動検査動物 剖検時期: 生後 13 週以降 行動検査(情動性, 学習能), 剖検, 血中ホルモン濃度*, mRNA* *: 10 週齢剖検で異常が認められた場合</p> <p>離乳時剖検動物 剖検時期: 生後 3 週 剖検, 器官重量(雌雄各 2 匹)</p>	<p>1. 一般検査 一般状態, 体重, 摂餌量, 受胎率, 分娩状態, 妊娠期間, 着床数, 出産率, 出生率, 哺育状態</p> <p>2 病理学的検査 以下の器官を採材し, 必要に応じて組織検査を実施する(下線: 器官重量測定)。 脳, 下垂体, 甲状腺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 卵巣, 子宮, 膈, 乳腺, 肉眼的異常部位</p>	<p>1. 離乳前検査 出産児数(生存, 死亡), 性比, 生存率(出生時生存率, 4 日生存率, 離乳率), 外表異常, 一般状態, 体重, AGD(生後 4 日), 乳頭発育(生後 12 日), 生後形態分化(耳介展開, 切歯萌出, 眼瞼開裂), 反射反応性(平面正向反射, 耳介反射, 瞳孔反射, 聴覚性驚愕反応, 疼痛反応, 空中正向反射)</p> <p>2. 離乳後検査 体重, 性成熟(膈開口, 包皮分離), 行動検査(オープンフィールドテスト, 水迷路), 性周期, 精子検査, 生殖機能(交尾率, 受胎率), 分娩・哺育機能(妊娠期間, 黄体数, 着床数, 出産率, 出生率, 出産児数, 出生時生存率, 4 日生存率)</p> <p>3. 病理学的検査 以下の器官を採材し, 10 週齢剖検動物について組織検査を実施する(下線: 器官重量測定) 1) 3 週齢: 脳, 胸腺, 肝臓, 脾臓, 精巣, 精巣上体, 精囊(凝固腺), 前立腺(腹葉), 卵巣, 子宮, 膈, 肉眼的異常部位 2) 10 週齢: 脳, 下垂体, 甲状腺, 胸腺, 肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓, 精巣, 精巣上体, 精囊(凝固腺), 前立腺(腹葉), 卵巣, 卵管, 子宮, 膈, 肉眼的異常部位 全群の雌雄生殖器, 対照および毒性用量群の下垂体の組織検査実施 3) 行動検査: 10 週齢時に異常が認められた場合, 追加検討を実施する(試験計画書変更書) 4) 生殖機能: 精巣, 精巣上体, 精囊(凝固腺), 前立腺(腹葉), 卵巣, 卵管, 子宮, 膈, 肉眼的異常部位</p> <p>4. その他(必要なら追加検査) 血中ホルモン濃度および mRNA* *: 雌についてホルモン測定用の血清保存, mRNA 用に卵巣および子宮を保存</p>	

注: 試験方法の形式には, 間引きの有無を記載する。備考には被験物質固有の特記事項を記入する

3 . cis-クロルデンの試験結果

(1)げっ歯類を用いた1世代試験

最高用量(10mg/kg/day)における変化

F0母動物の体重増加量・腎臓相対重量の低値、摂餌量の高値、全出生児の死亡(4/12例：有意差なし)が認められた。

F1雌雄の生存率の低値、病理組織学的検査における肝臓肝細胞空胞変性個体出現頻度の高値が認められた。

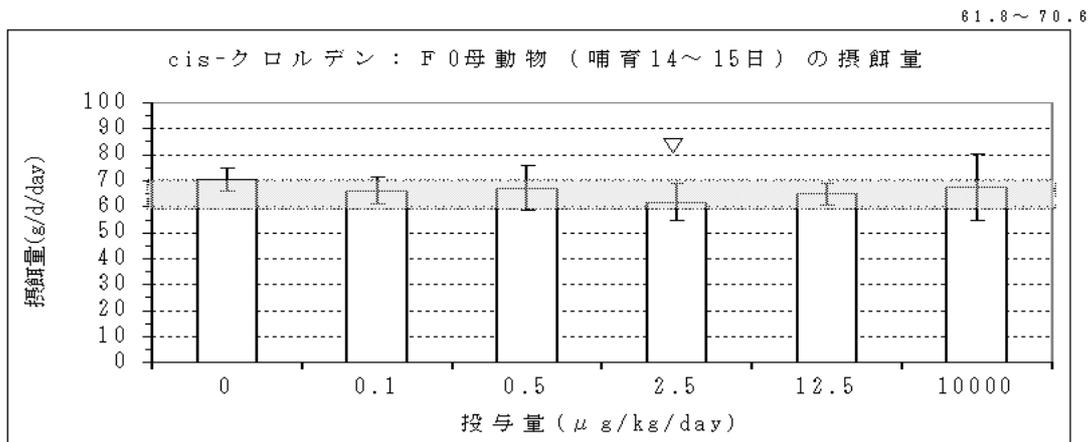
F1雄の下垂体(絶対、相対)重量・腎臓相対重量の低値が認められた。

F1雌の肝臓(絶対、相対)重量の高値が認められた。

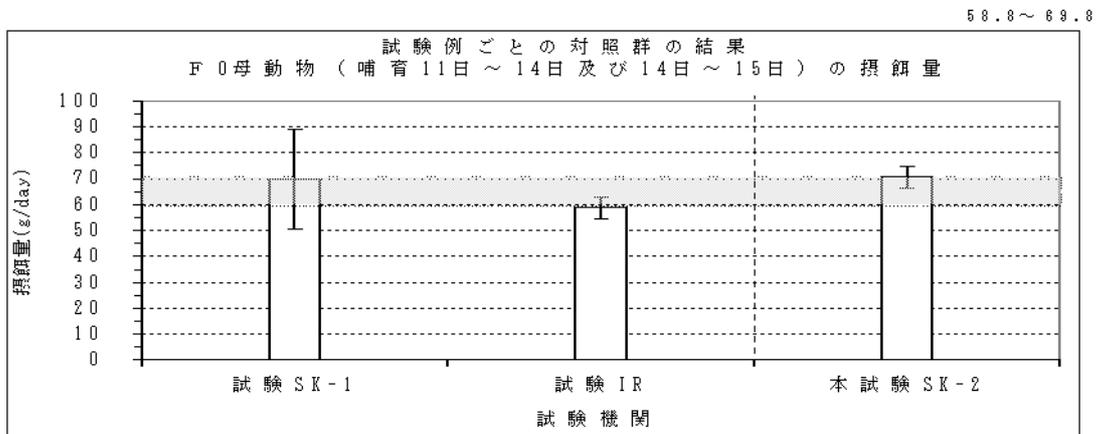
低用量群(0.1、0.5、2.5、12.5 μg/kg/day)における変化

F0母動物の2.5 μg/kg/day投与群での摂餌量の低値(61.8g)が認められたが、背景データ*(58.8~69.8g)の範囲内に含まれる変化であり、生理学的変動の範囲内と考えられた(添付図参照)。なお、体重増加量に有意な差は認められなかった。

cis-クロルデン



注1) ▽：統計学的に有意な低値 (P < 0.05)
 注2) 網掛部分：背景データの範囲 (平均値)

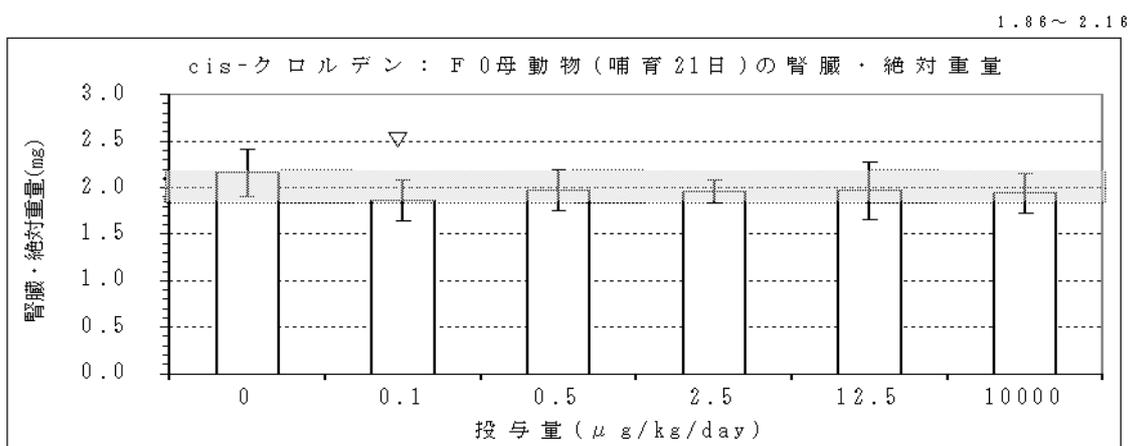


注1) 1日当たりの平均摂餌量 (平均期間)：試験SK (14日～15日)、試験IR (11日～14日)
 注2) 網掛部分：背景データの範囲 (平均値)

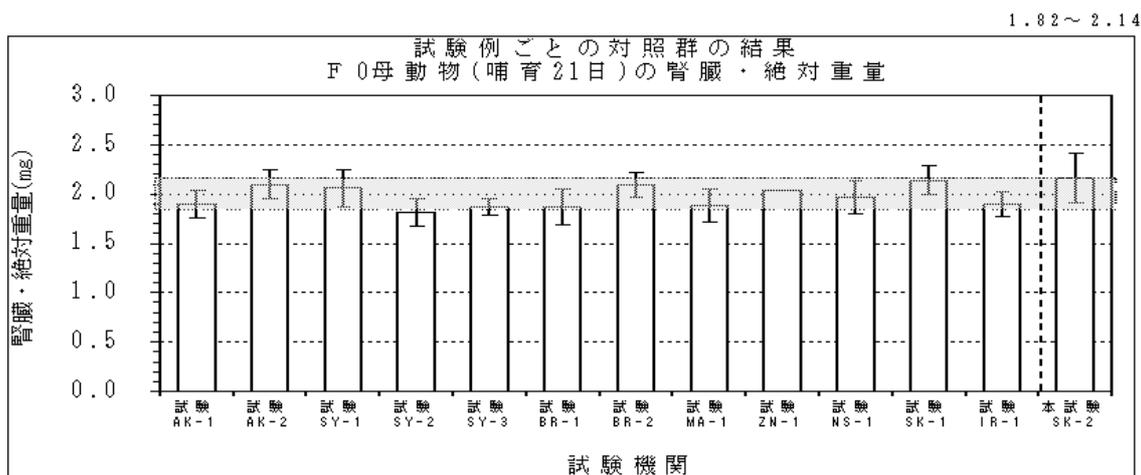
F0母動物の2.5 μg/kg/day 投与群での病理組織学的検査における腎臓皮質の鉍質沈着個体出現頻度の低値が認められたが、低値であり、悪影響とは考えられなかった。なお、腎臓の重量については有意な差は認められなかった。

F0母動物の0.1 μg/kg/day 投与群での腎臓(絶対、相対)重量の低値(絶対重量 1.86g、相対重量 0.71%)が認められたが、背景データ*(絶対重量 1.82~2.14g、相対重量 0.70~0.82%)の範囲内に含まれる変化であり、生理学的変動の範囲内と考えられた(添付図参照)。なお、病理組織学的検査においても有意な差は認められなかった。

cis-クロルデン



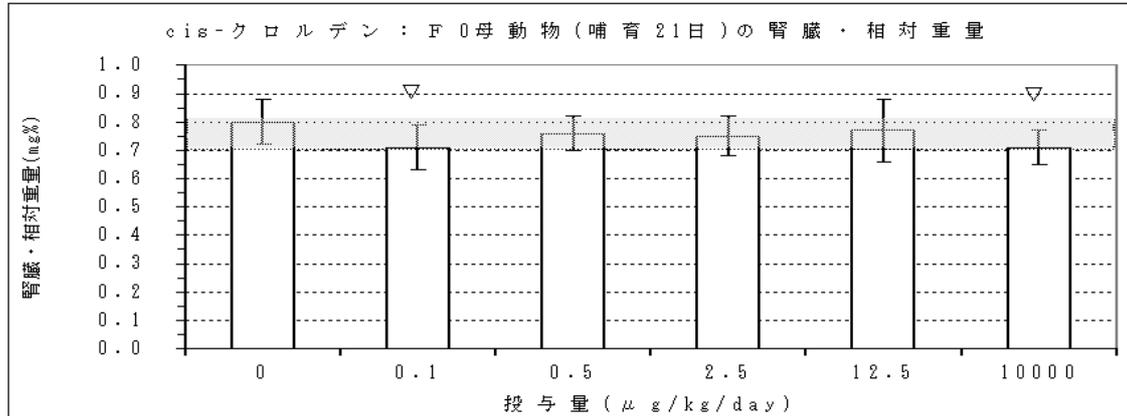
注1) ▽：統計的に有意な低値 (P < 0.05)
 注2) 網掛部分：背景データの範囲 (平均値)



注1) 試験ZN-1は両側性の臓器の左右の重量の平均値が表示されているので、他施設のデータと比較するために、その2倍の値を算出した。
 注2) 網掛部分：背景データの範囲 (平均値)

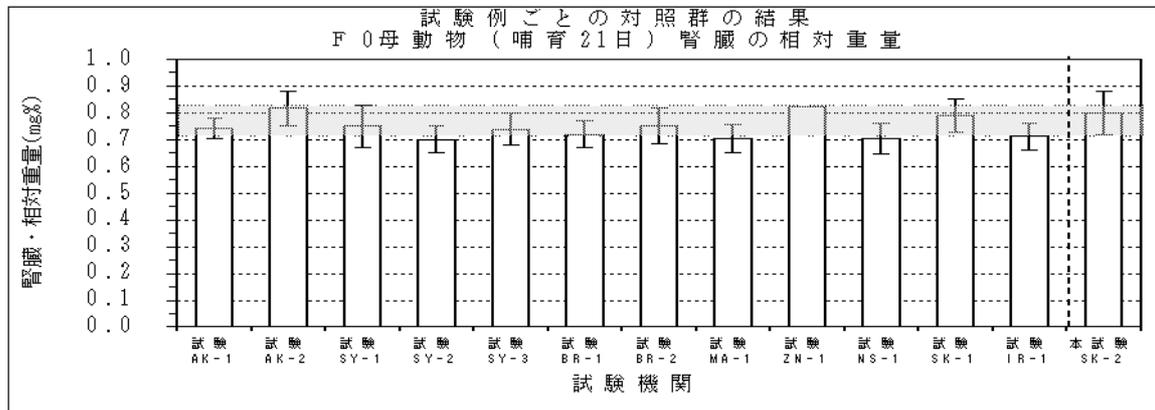
cis-クロルデン

0.71 ~ 0.80



注1) △：統計学的に有意な低値 (P < 0.05)
 注2) 網掛部分：背景データの範囲 (平均値)

0.70 ~ 0.82



注1) 試験ZN-1は両側性の臓器の左右の重量の平均値が表示されているので、他施設のデータと比較するために、その2倍の値を算出した。

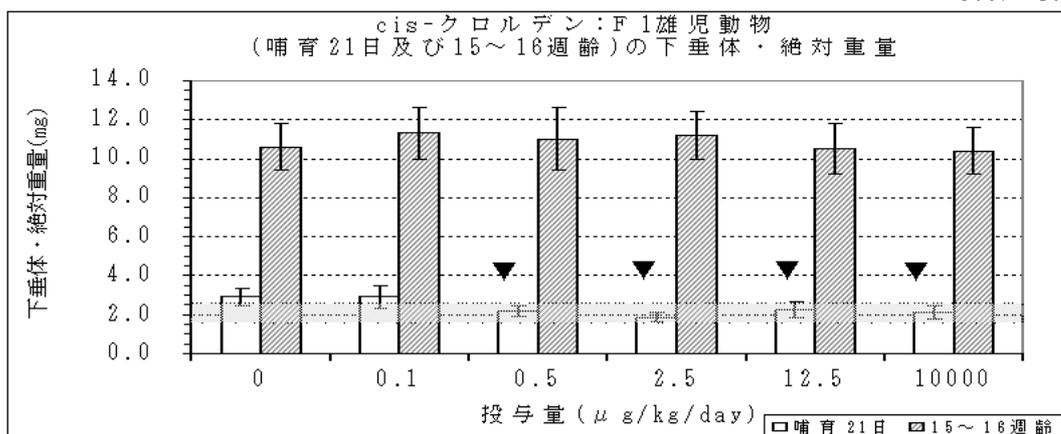
3週齢のF1雄の0.5、2.5、12.5 μg/kg/day 投与群での下垂体(絶対、相対)重量の低値(絶対重量 2.19、1.87、2.25mg、相対重量 5.14、4.81、5.24mg%)が認められたが、背景データ* (絶対重量 1.5~2.2mg、相対重量 3.7~5.6mg%)の範囲内にほぼ含まれる変化であり、生理学的変動の範囲内と考えられた(添付図参照)。なお、病理組織学的検査においても有意な差は認められなかった。また、15~16週齢時には有意な差は認められなかった。

(参考)試験結果の解釈に関する専門家の意見要旨

*F1雄の下垂体(絶対、相対)重量の低値について：絶対重量の低値については、被験物質の投与による変化の可能性、微小な臓器の重量を測定する際の技術的な測定誤差の可能性(試料の乾燥防止対策や試料を測定する順番など)、検査動物の選抜に起因する可能性の3つの可能性が考えられる。毒性学的な意味を認定するに至る根拠に達していないとの解釈になる。相対重量は背景データの範囲内にあり、絶対重量の低値は、生理学的変動の幅を大きく外れるものではない。

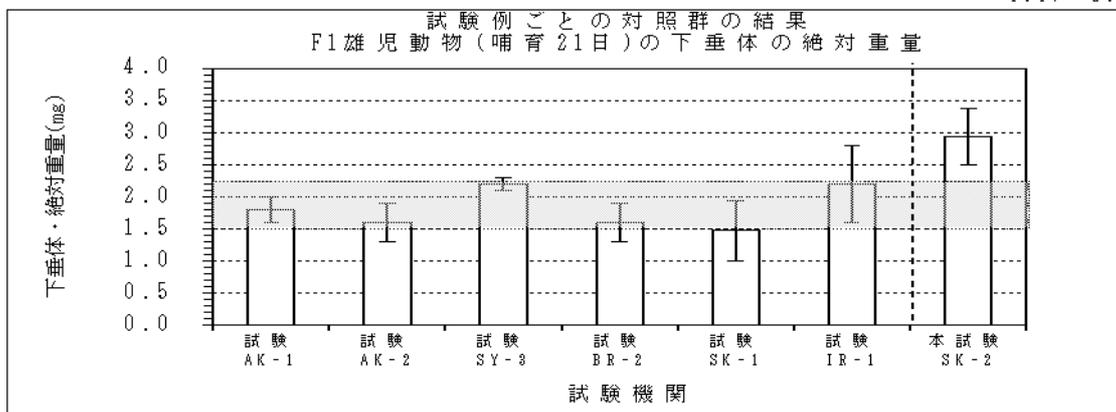
cis-クロルデン

1.87~2.93



注1) ▼ : 統計学的に有意な低値 (P < 0.01)
 注2) 網掛部分 : 背景データの範囲 (平均値)

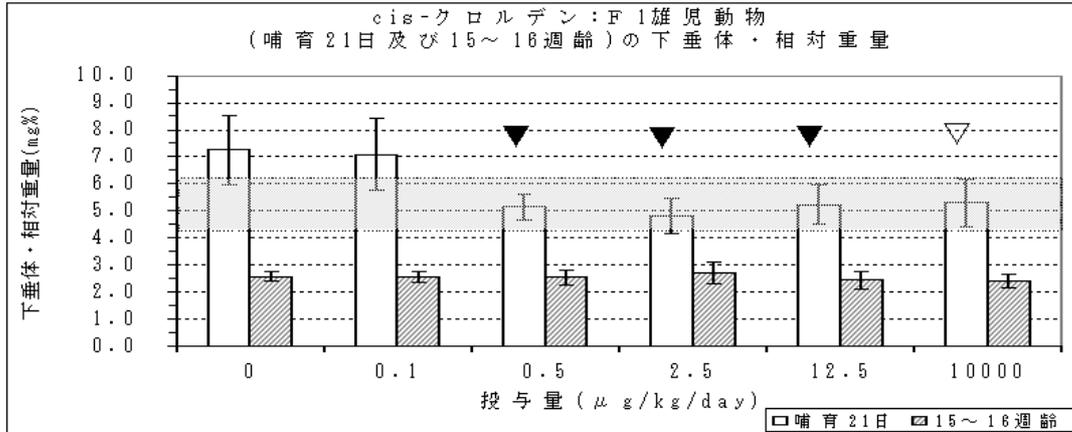
1.47~2.2



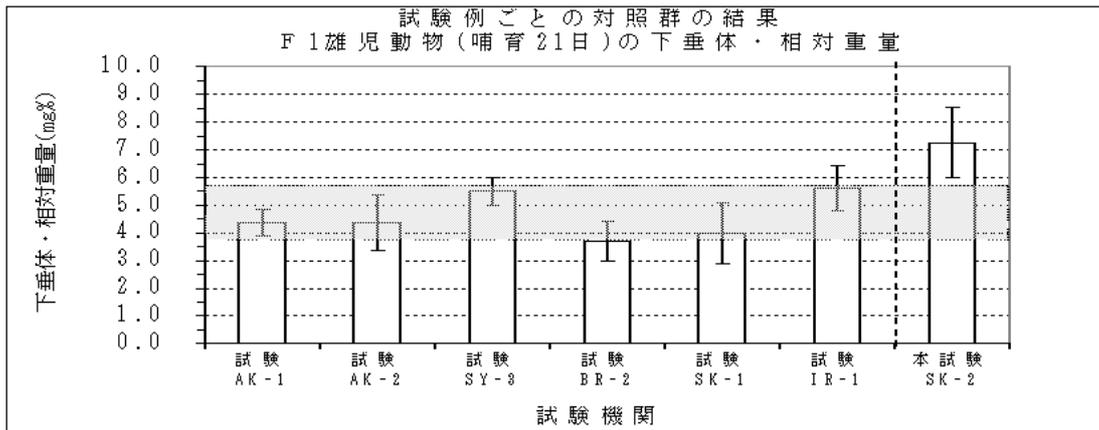
注) 網掛部分 : 背景データの範囲 (平均値)

cis-クロルデン

4.81 ~ 7.25



3.70 ~ 5.63



3週齢のF1雌の0.1 μg/kg/day 投与群での副腎(絶対、相対)重量の高値(絶対重量 18.2mg、相対重量 43.7mg%)が認められたが、15～16週齢時には有意な差は認められず、一過性的変化であると考えられた(添付図参照)。なお、病理組織学的検査において有意な差は認められなかった。背景データ*は、絶対重量 11.6～15.3mg、相対重量 33.4～40.5mg/%である。

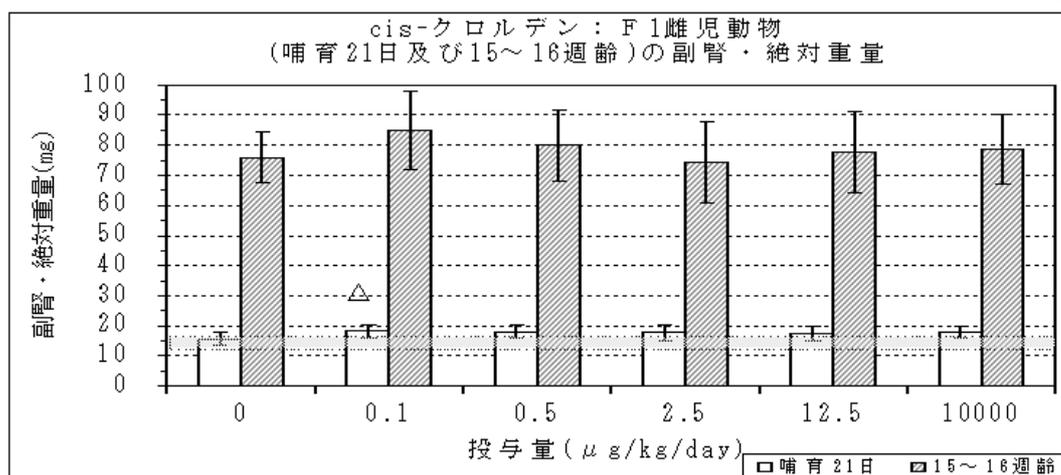
*背景データについて：ここでは、これまで環境省で実施したWistar Nannover ラットを用いた「改良1世代試験」における対照群(被験物質無投与)の平均値の範囲を、背景データとした。

(参考)試験結果の解釈に関する専門家の意見要旨

*F1雌の副腎(絶対、相対)重量の高値について：背景データの範囲が広く(絶対重量 1.5～2.2mg、相対重量 3.7～5.6mg%)、生理的変動の幅を大きく外れるものではない。

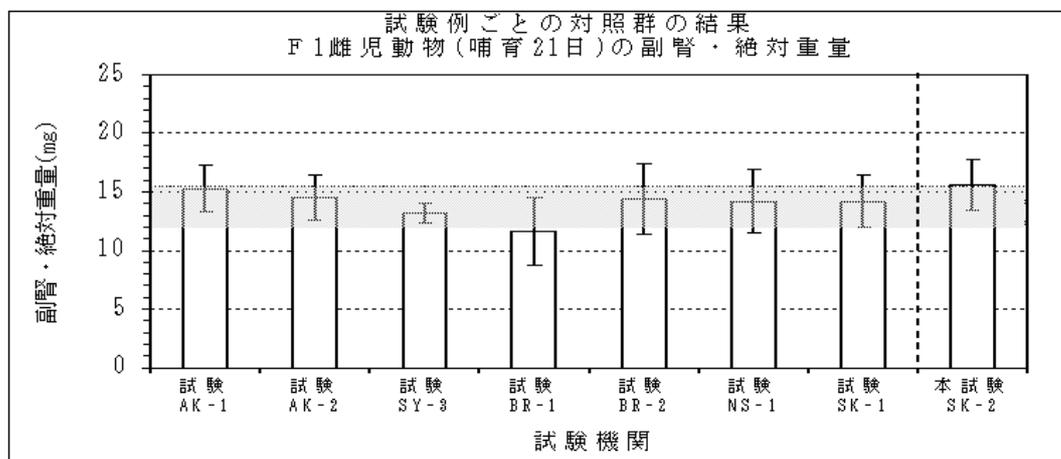
cis-クロルデン

15.6～18.2



注1) △：統計学的に有意な高値 (P < 0.05)
注2) 網掛部分：背景データの範囲 (平均値)

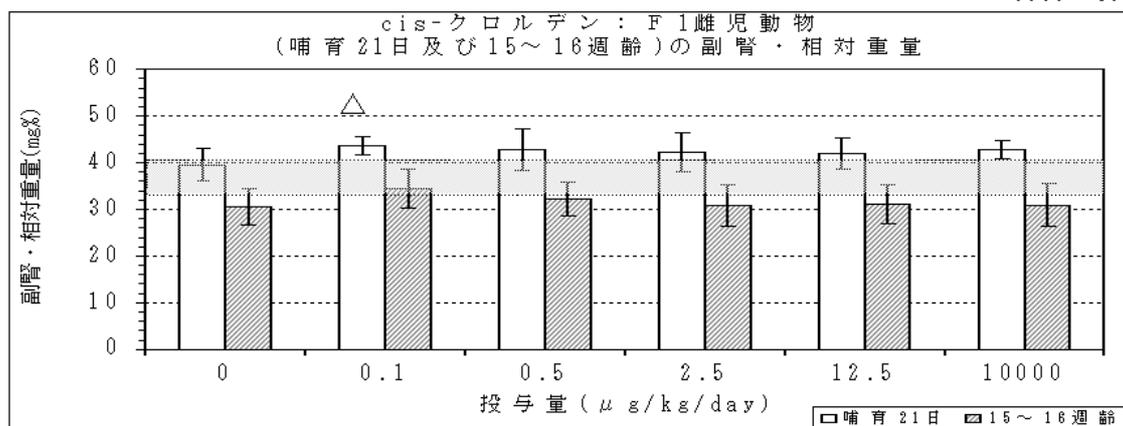
11.6～15.3



注) 網掛部分：背景データの範囲 (平均値)

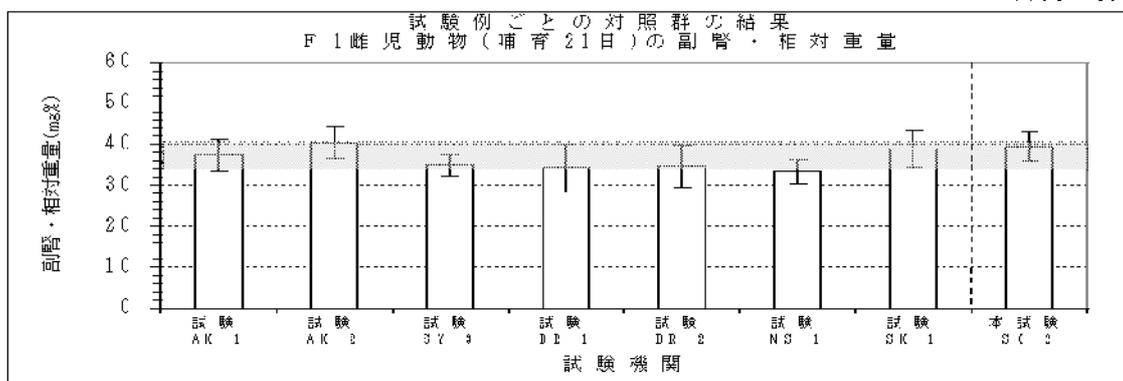
cis-クロルデン

39.6 ~ 43.7



注1) △：統計学的に有意な高値 (P < 0.05)
注2) 網掛部分：背景データの範囲 (平均値)

39.4 ~ 40.5



注) 網掛部分：背景データの範囲 (平均値)

なお、絶対重量及び相対重量ともに有意差の認められた変動は得られなかったものの、その一方に有意差が認められた器官(脳を除く)は以下のとおり。

- *F1 雄(哺育21日)：0.1 µg/kg/day 投与群での精囊絶対重量の高値
- *F1 雄(15~16週齢)の2.5、12.5 µg/kg/day 投与群での肝臓相対重量の低値
- *F1 雌(哺育21日)の0.1 µg/kg/day 投与群での甲状腺絶対重量の高値

(2) 試験管内(*in vitro*)試験

ヒトエストロゲン受容体(ER_α 及び ER_β)結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞 E-Screen 試験、ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト及びアンタゴニスト)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR_α 及び TR_β)酵母試験を行った。

その結果、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験では、IC₅₀ 値(4.6 × 10⁻⁴M)が得られた。ヒトエストロゲン受容体(ER_α 及び ER_β)結合競合阻害試験では、活性がみられた。ヒト乳がん細胞 E-Screen 試験では、細胞毒性を示す濃度未満において活性がみられた。ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト及びアンタゴニスト)及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR_α 及び TR_β)酵母試験では、有意な反応は認められなかった。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおり、*cis*-クロルデンについては、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

また、最高用量(既報告で影響が認められた用量)においてのみ、一般毒性と考えられる影響が認められた。

本物質については、今後、健康リスク初期評価を行う際に、今回の試験結果を参照する予定である。

プロトコール概要 (cis-クロルデン)

被験物質	試験機関	被験動物	使用動物数	投与方法 投与期間	用量設定	投与容量	試験方法の形式	母動物の観察項目	児動物の観察項目	備考
cis-クロルデン	株式会社新日本科学	Wistar-Hannover ラット BrIHan: WIST@Jcl (GALAS)	購入 雄 30 匹 雌 100 匹 交尾成立 母動物 各群 12 匹 × 6 群	強制経口	0 0.1 0.5 2.5 12.5 μg/kg/day 被験物質の1 日許容摂取量 は 0.5 μg/kg/day . 環境濃度測定 結果から試算 した ヒトの推定暴 露は0.1 μg/kg/day であ ることから低用 量は 0.1 μg/kg/day とした.	1 mL/kg/day	哺乳児数の調 整は行わない. 離乳児は各腹 12 匹のみを実 験に採用する. 雌雄各 2 匹:離乳時に 器官重量を 測定. 雌雄各 4 匹 を育成. 6 週齢時に雌 雄各 1 匹の 肝臓重量を 測定. 雌雄各 1 匹:兄妹交配 を避け、同群 内交配. 雌 1 匹:性周 期観察.	一般状態 体重測定 摂餌量測定 分娩状況 着床回数 全例剖検 器官重量測 定、固定保 存 脳、下垂 体、甲状 腺、胸腺、 肝臓、副 腎、腎臓、 脾臓、卵 巣 肝臓の病 理組織学 的検査 肝臓の一 部を凍結 保存す る。(肝 臓の P450 含量等の 測定が必 要な場合 は試験計 画書を変 更する).	哺乳児 生存率、離乳率、一般状態、体重、AGD(生後4日)、身体発達(耳 介展開、切歯萌出、眼瞼開裂)、初期行動発達(正向反射、背地走性、 瞳孔反射、プレイヤー反射、痛覚反応)、保存(死亡児、異常児) 離乳児(各腹の雄2匹、雌2匹) 器官重量測定、固定保存 脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、副腎、腎臓、脾臓、精巣、精 巣上体、精囊、前立腺腹葉、卵巣、子宮 肝臓、生殖器(精巣、精巣上体、精囊、前立腺腹葉、卵巣及び 子宮)及び内分泌器官(下垂体、甲状腺、副腎)の病理組織学的 検査 異常部位はSDの判断で全群全例の同一器官を採取 肝臓の一部を凍結保存する. 6 週齢児(各ポイントで各腹の雄1匹、雌1匹) 肝臓の一部を凍結保存する. 3 週齢(離乳時)、6 週齢及び最終剖検時に雌雄 6 例/群。(肝臓の P450 含量等の測定が必要な場合は試験計画書を変更する). 剖検時に採血し、必要に応じてコレステロール等の血液生化学的検 査を行う. 育成児(各腹の雄2匹、雌2匹) 一般状態、包皮分泌腺開口、膣開口、性周期 剖検、器官重量測定、固定保存(非交配も含めすべて) 脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、副腎、腎臓、脾臓、精巣、精 巣上体、精囊、前立腺腹葉、子宮、卵巣 同群内交配(各腹雄1匹、雌1匹) 肝臓、生殖器(精巣、精巣上体、精囊、前立腺腹葉、卵巣及び子宮) 及び内分泌器官(下垂体、甲状腺、副腎)の病理組織学的検査、交 尾率、受胎率、妊娠 13 日剖検(着床率、胚生存率)	比 重 約 1.57~1.63(15.5、工業用クロルデン)
				強制経口	最高用量群 10 mg/kg/day 着床数の低 下、卵巣重量 等の生殖毒性 が予想される 10 mg/kg/day とした.	1 mL/kg/day	肝臓の一部 を凍結保存 する。(肝 臓の P450 含量等 の測定が 必要な 場合は 試験計 画書を変 更する).			

4 . *trans*-ノナクロルの試験結果

(1)げっ歯類を用いた1世代試験

最高用量(10mg/kg/day)における変化

F0 母動物の体重増加量の低値、肝臓相対重量・病理組織学的検査における肝臓小葉中心性肝細胞肥大個体出現頻度・肝臓小葉中心域の肝細胞にくもり硝子様変性個体出現頻度の高値が認められた。

F1 雌雄の脳絶対重量・肝臓(絶対、相対)重量・病理組織学的検査における肝臓小葉中心性肝細胞肥大個体出現頻度・肝臓中間帯細胞質空胞化個体出現頻度の高値が認められた。

F1 雌の卵巣相対重量の高値が認められた。

低用量群(0.05、0.5、5、50 µg/kg/day)における変化

哺育0～7日のF0 母動物の5 µg/kg/dayでの体重増加量の低値が認められたが、哺育0～14日及び哺育0～21日の体重増加量には有意な差は認められず、一過性の変化であると考えられた。なお、体重には有意な差は認められなかった。

3週齢のF1雄の5、50 µg/kg/day投与群での脳絶対重量の高値(1.43、1.40g)及び3週齢のF1雌の5 µg/kg/day投与群での脳絶対重量の高値(1.37g)が認められたが、背景データ*(雄1.36～1.47g、雌1.33～1.42g)の範囲内に含まれる変化であり、生理学的変動の範囲内と考えられた(添付図参照)。また、脳相対重量には有意な差は認められなかった。なお、離乳後(雄11週齢、雌9週齢)の脳絶対重量には有意な差は認められなかった。

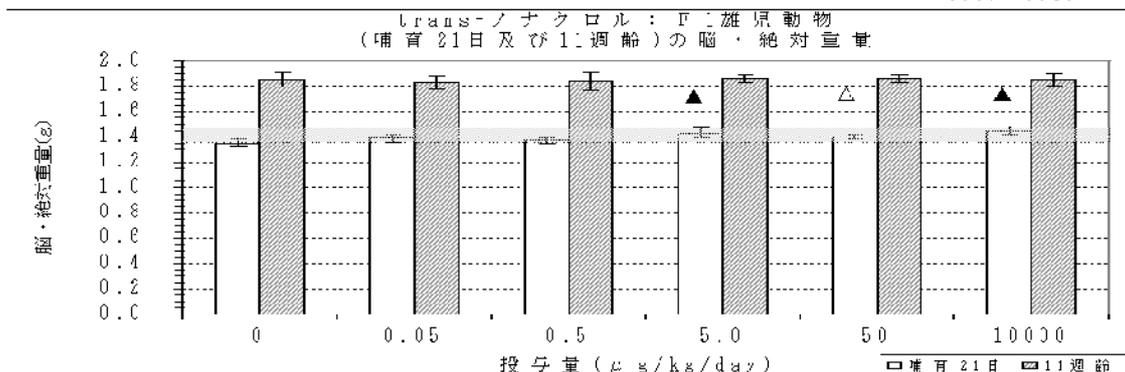
*背景データについて：ここでは、これまで環境省で実施したWistar Nannoverラットを用いた「改良1世代試験」における対照群(被験物質無投与)の平均値の範囲を、背景データとした。

(参考)試験結果の解釈に関する専門家の意見要旨

*F1 雌雄の脳絶対重量の高値について：体重の変化を反映している結果で、相対重量では有意差は認められていないため、意味がある変化ではない。

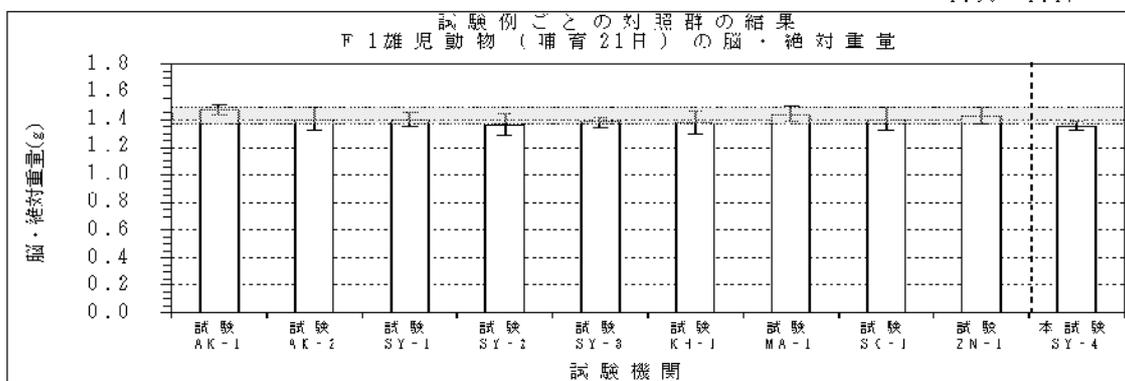
trans-ノナクロール

1.35 ~ 1.4E



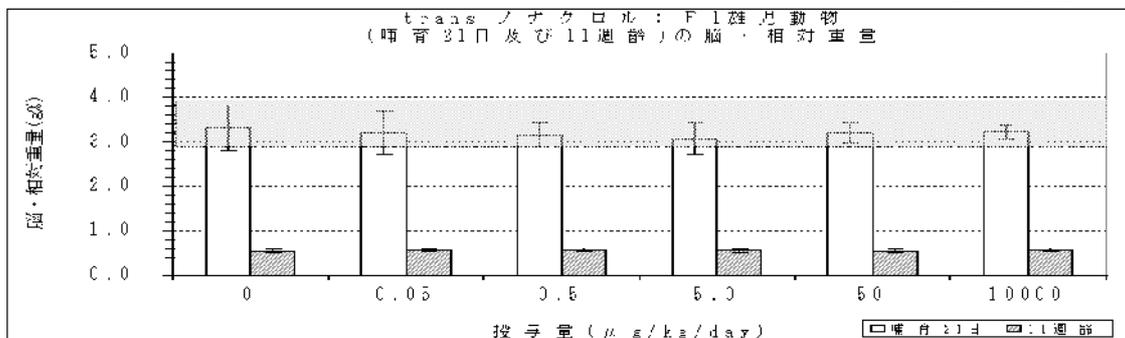
1) ▲ : 統計学的に有意な差を示す (P < 0.01)
 2) △ : 統計学的に有意な差を示す (P < 0.05)
 3) 網掛部分 : 背景データの範囲 (平均値)

1.36 ~ 1.47



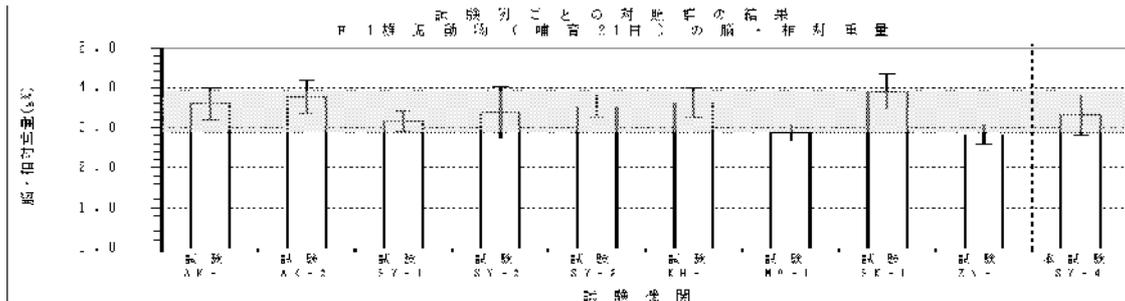
注) 網掛部分 : 背景データの範囲 (平均値)

3.08 ~ 3.9E



注) 網掛部分 : 背景データの範囲 (平均値)

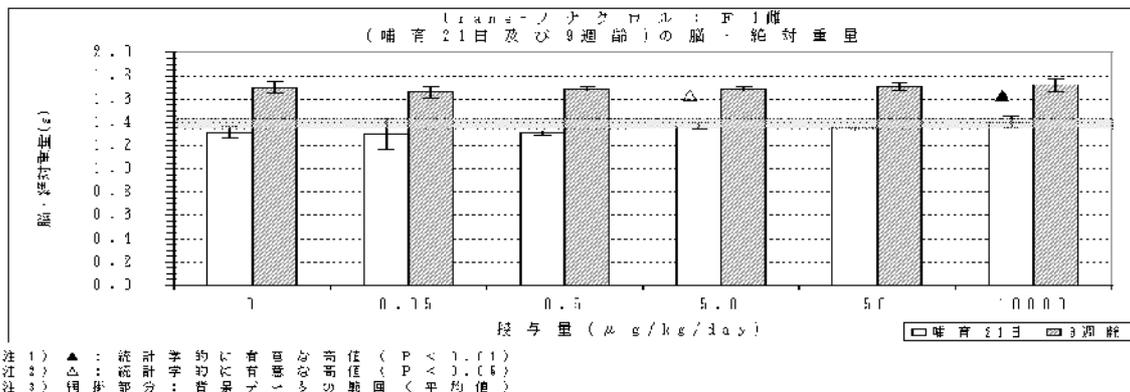
2.84 ~ 3.80



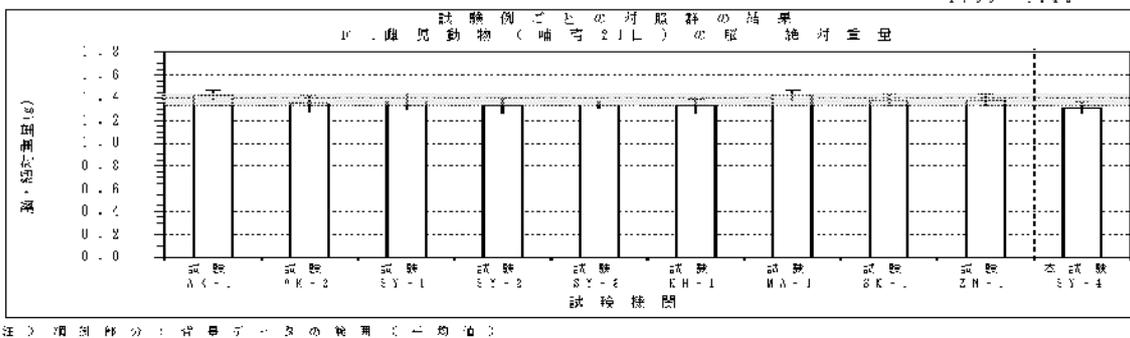
注) 網掛部分 : 背景データの範囲 (平均値)

trans-ノナクロル

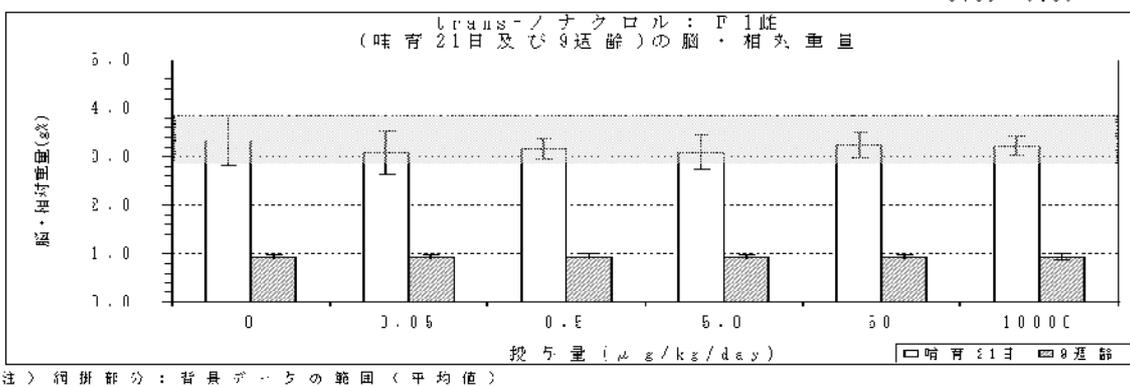
1.30 ~ 1.41



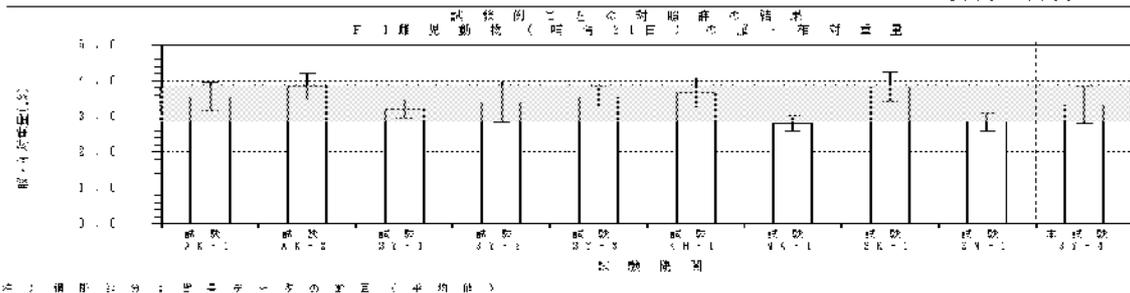
1.88 ~ 1.93



2.03 ~ 2.22



2.81 ~ 3.11



なお、絶対重量及び相対重量ともに有意差の認められた変動は得られなかったものの、その一方に有意差が認められた器官(脳を除く)は以下のとおり。

*F1 雄(11 週齢)：5、50 µg/kg/day 投与群での前立腺腹葉相対重量の低値

(2) 試験管内(*in vitro*)試験

ヒトエストロゲン受容体(ER α 及び ER β)結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞 E-Screen 試験、ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト及びアンタゴニスト)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及び TR β)酵母試験を行った。

その結果、ヒトエストロゲン受容体(ER α)結合競合阻害試験では、IC₅₀ 値(10⁻⁵M)が得られた。ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験では、IC₅₀ 値(5.44 × 10⁻⁴M)が得られた。ヒト乳がん細胞 E-Screen 試験では、細胞毒性を示す濃度未満の 10⁻⁶M において有意な細胞増殖が認められた。ヒトエストロゲン受容体(ER β)結合競合阻害試験では、活性がみられた。ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト及びアンタゴニスト)及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及び TR β)酵母試験では、有意な反応は認められなかった。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおり、*trans*-ノナクロルについては、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

また、最高用量(既報告で影響が認められた用量)においてのみ、一般毒性と考えられる影響が認められた。

本物質については、今後、健康リスク初期評価を行う際に、今回の試験結果を参照する予定である。

プロトコール概要 (トランスノナクロル)

被験物質	試験機関	被験動物	使用動物数	投与方法 投与期間	用量設定	投与量	試験方法の形式	母動物の観察項目	児動物の観察項目	備考
トランスノナクロル	食品薬品安全センター	Wistar-Hannover ラット Br1Han: WIST@Jc l(GALAS)	購入 雄 40 匹 雌 160 匹 交尾成立 母動物 各群 14 匹 × 6 群構成	強制経口	0 0.05 0.50 5.0 50.0 μg/kg/day	1 mL/kg/day	哺育児数の調整は行わない。 交尾は 4 週に分けて実施し、前半と後半で、それぞれ各群 4 匹および 3 匹の交尾成立動物を作成する。	一般状態 体重測定 摂餌量測定 分娩状況 着床痕数 全例剖検 器官重量測定 脳、下垂体、甲状腺、胸腺、副腎、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮 器官固定保存 重量測定 器官の他、膣、乳腺、病変部 病理組織学検査 肝臓、甲状腺 必要に応じ肝臓の P450 活性等を測定するため、肝臓の一部を凍結保存。	哺育児 出生率、生存率、離乳率、一般状態、AGD (生後 4 日)、体重、身体発達 (耳介展開、切歯萌出、眼瞼開裂)、初期行動発達 (正向反射、自由落下) 保存 (死亡児、異常児) 離乳児 (21 日齢、約半数の腹) 剖検 器官重量測定 脳、下垂体、甲状腺、胸腺、副腎、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮 器官固定保存 重量測定 器官の他、膣 病理組織学検査 肝臓、甲状腺及び生殖器 (精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣及び子宮) P450 測定用 肝臓の一部を凍結保存 育成児 (残り半数の腹) 一般状態、体重、性成熟観察 (膣開口、包皮分離)、性周期、性成熟後剖検 器官重量の測定 脳、甲状腺、肝臓、腎臓、下垂体、脾臓、副腎、胸腺、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮 器官固定保存 測定器官の他、膣、子宮頸部、病変部 病理組織学検査 肝臓、内分泌器官 (下垂体、副腎、甲状腺) および生殖器 (精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮、膣) P450 測定用 肝臓の一部を凍結保存 精子検査 (精子運動能解析装置)	
				強制経口	最高用量群 10 mg/kg/day	1 mL/kg/day				

5 . o,p ' -DDTの試験結果

(1)げっ歯類を用いた1世代試験

最高用量(50mg/kg/day)における変化

F0 母動物の受胎率の低値(0%)が認められた。

F0 母動物の受胎率の低値については信頼性の認められた既報告で報告されている。

低用量群(0.2、1、5、25 µg/kg/day)における変化

特になし。

なお、絶対重量及び相対重量ともに有意差の認められた変動は得られなかったものの、その一方に有意差が認められた器官(脳を除く)は以下のとおり。

* F0 母動物(哺育21日) : 5 µg/kg/day 投与群での胸腺相対重量の低値

* F1 雄(3週齢) : 5 µg/kg/day 投与群での脾臓絶対重量の低値

* F1 雄(3週齢) : 5、25 µg/kg/day 投与群での精巣上体相対重量の高値

* F1 雄(12週齢) : 1 µg/kg/day 投与群での副腎相対重量の低値

* F1 雄(12週齢) : 25 µg/kg/day 投与群での下垂体絶対重量の低値

有意差のある反応が得られたが、その毒性学的な意義については今後の検討課題とした結果

* F0 母動物(哺育21日) : 5、25 µg/kg/day 投与群での病理組織学的検査における胸腺リンパ組織萎縮個体出現頻度の高値

(2)試験管内(*in vitro*)試験

ヒトエストロゲン受容体(ER 及び ER)結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞 E-Screen 試験、ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト及びアンタゴニスト)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR 及び TR)酵母試験を行った。

その結果、ヒトエストロゲン受容体(ER)結合競合阻害試験では、IC₅₀ 値(2.2 × 10⁻⁶M)が得られた。ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アンタゴニスト)では、IC₅₀ 値(2.22 × 10⁻⁶M)が得られた。ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験では、IC₅₀ 値(1.64 × 10⁻⁵M)が得られた。ヒト乳がん細胞 E-Screen 試験では、細胞毒性を示す濃度未満の 10⁻⁶M において有意な細胞増殖が認められた。ヒトエストロゲン受容体(ER)結合競合阻害試験では、活性がみられた。ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト)及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR 及び TR)酵母試験では、有意な反応は認められなかった。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおり、*o,p'*-DDTについては、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

また、最高用量(既報告で影響が認められた用量)においてのみ、一般毒性と考えられる影響が認められた。また、その毒性学的な意義については今後の検討課題とした有意差のある反応が得られた。

本物質については、今後、健康リスク初期評価を行う際に、今回の試験結果を参照する予定である。

プロトコール概要 (o,p'-DDT)

被験物質	試験機関	被験動物	使用動物数	投与方法 投与期間	用量設定	投与量	試験方法の形式	母動物の観察項目	児動物の観察項目	備考
o,p'-DDT	日本生物科学研究所	Wistar-Hanover ラット BrIHan: WIST@JcI (GALAS)	購入 雄 70 匹 雌 110 匹 妊娠成立 母動物： 各群 12 匹 × 6 群	強制経口 コーン油 に溶解 妊娠 0 日 ~ 哺育 20 日 連続	0 0.2 1 5 25 μg/kg/day	1 mL/kg/day	哺育児数の調整は行わない 離乳後： 同腹児を各種 検査に割り当てる	一般状態 死亡の有無 体重 摂餌量 分娩及び哺育の観察 剖検および器官重量(下垂体、甲状腺(上皮小体を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、卵巣、子宮) 病理組織学的検査 固定器官：脳、下垂体、甲状腺(上皮小体を含む)、胸腺、舌、気管、咽喉頭、肺(気管支を含む)、食道、胃(前胃+腺胃)、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、心臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、卵巣、卵管、子宮、膣、乳腺、眼球、外涙腺、ハーダ腺、皮膚、骨(大腿骨+胸骨)、骨髓(大腿骨+胸骨)、脊髄(頸+腰膨大部)、大動脈、横隔膜、リンパ節(腸間膜、顎下)、舌下腺、耳下腺、顎下腺、坐骨神経、骨格筋、肉眼的病変部 検査器官：下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、卵巣、卵管、子宮、膣、肉眼的病変部	哺育期(全例)： 一般状態、死亡の有無、体重、AGD(哺育4日)、身体発育(切歯萌出、眼瞼開裂、耳介展開)、乳頭観察 3週齢(各群雄2匹、雌2匹)： 剖検、器官重量(肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮)、病理組織学的検査(母動物と同項目に加え、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺)血清保存(ホルモン測定他)前立腺・子宮保存(mRNA) 3~12週齢(各群雄4匹、雌4匹)： 一般状態、死亡の有無、体重、包皮分離(35日齢から)、膣開口(21日齢から)、性周期(膣開口から11週齢まで) 12週齢(各群雄2匹、雌2匹)： 剖検、器官重量(下垂体、甲状腺(上皮小体を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮)、病理組織学的検査(母動物と同項目に加え、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺)血清保存(ホルモン測定他)前立腺・子宮保存(mRNA) 12週齢から交尾後(各群雄2匹、雌2匹)： 一般状態、体重、生殖機能検査(交尾率、受胎率、着床率、胎児生存率)、精子検査(交尾終了後)、帝王切開(妊娠14日後、黄体数、着床数、死胚数)、剖検、臓器保存	
					50 mg/kg/day					

6. *p,p'*-DDEの試験結果

(1) げっ歯類を用いた1世代試験

最高用量(50mg/kg/day)における変化

F0 母動物の摂餌量の低値、肝臓(絶対、相対)重量・肝臓暗調化個体出現頻度の高値が認められた。

F1 雌雄の肝臓(絶対、相対)重量・病理組織学的検査における肝臓小葉中心性肝細胞腫大個体出現頻度の高値が認められた。

F1 雄の精巣上体絶対重量・精嚢 + 凝固腺絶対重量・胸腺相対重量・前立腺 C3mRNA 発現量の低値、摂餌量の高値が認められた。

F1 雌の摂餌量・身体発達における切歯萌出率の高値が認められた。

F0 母動物の肝臓(絶対、相対)重量の高値、F1 雄の精巣上体絶対重量・精嚢 + 凝固腺絶対重量・前立腺 C3mRNA 発現量の低値については信頼性の認められた既報告で報告されている。

低用量群(0.03、0.3、3、30 µg/kg/day)における変化

哺育32日のF1雌の3 µg/kg/day 投与群での膈開口完成日体重の高値が認められたが、4、5週齢時の体重に有意な差は認められず、偶発的な変化であると考えられた。

F1 雌の3 µg/kg/day 投与群での摂餌量の高値が認められたが、体重及び体重増加量に有意な差は認められず、一過性の変化であると考えられた。

(参考)試験結果の解釈に関する専門家の意見要旨

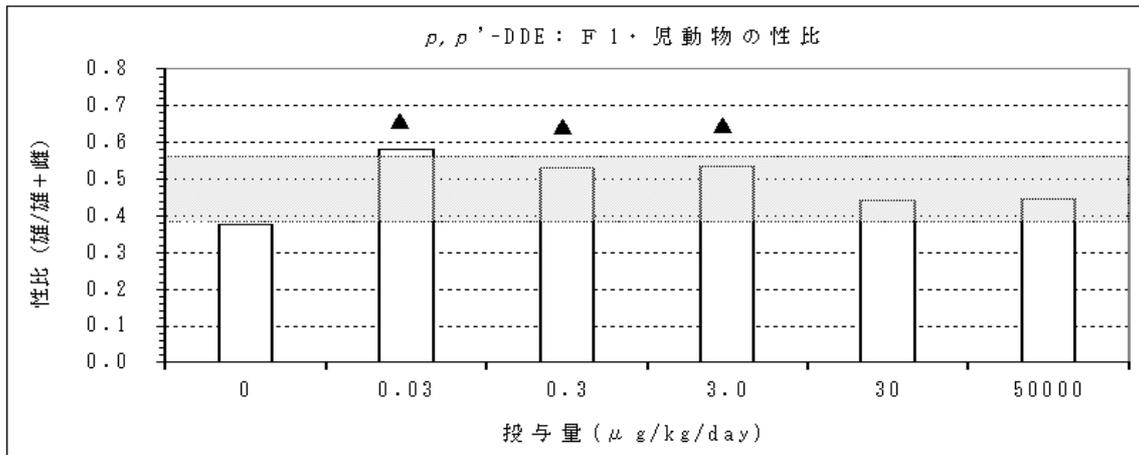
*F1 雌の膈開口完成日体重の高値と摂餌量の高値について：いずれも同腹児数が最も小さい群である。少しずつ体重が大きく、摂餌量も多かった群でたまたまある時期に有意差が偶然見られたという解釈となる。

F1 児動物の0.03、0.3、3 µg/kg/day 投与群での性比(雄/雄 + 雌)の高値(0.583、0.533、0.535)が認められたが、性比の期待値を1:1として二乗検定を行うと、対照群の値(0.377)が期待値から有意に偏っていた($p=0.045$)ものの、0.03、0.3及び3 µg/kg 投与群における値はいずれも1:1とみなし得るものであった(0.03、0.3、3 µg/kg 投与群における p 値は、それぞれ0.193、0.646、0.635)ため、対照群の値が低値であったことにより認められた有意差であると考えられた(添付図参照)。なお、背景データ*は0.379~0.559。(実施機関における背景データは0.443~0.511)。

*背景データについて：ここでは、これまで環境省で実施したWistar Nannover ラットを用いた「改良1世代試験」における対照群(被験物質無投与)の平均値の範囲を、背景データとした。

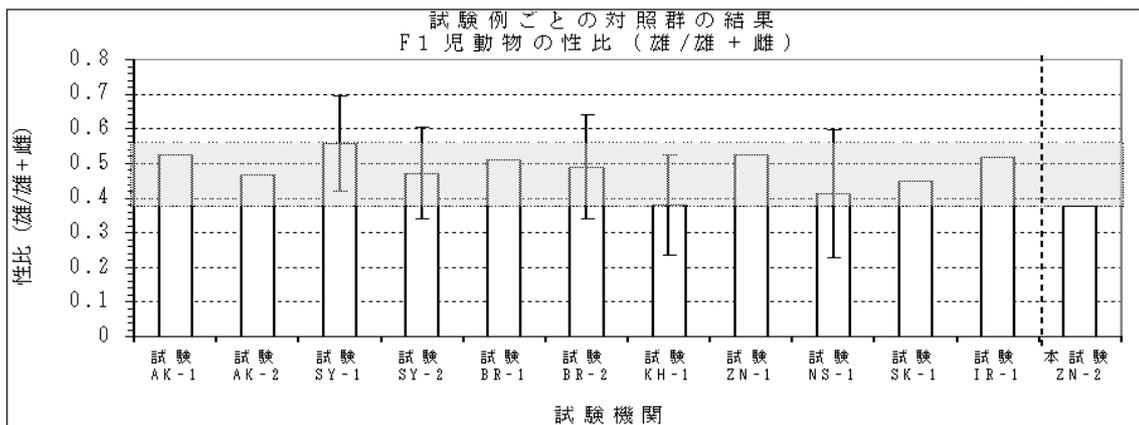
p,p'-DDE

0.377 ~ 0.583



注1) ▲: 統計学的に有意な高値 ($P \leq 0.01$)

0.377 ~ 0.559



Wistar-Hannover ラットの背景データ(試験実施機関)

データ	妊娠雌数/交配雌数	出産児(生存胎児)数			性比
		雄数	雌数	合計	
1	23/24	122	136	258	0.473
2	24/24	129	150	279	0.462
3	24/24	132	165	297	0.444
4	23/24	145	139	284	0.511
5	23/24	135	135	270	0.500
6	24/24	150	160	310	0.484
7	19/24	90	113	203	0.443
8	23/24	135	148	283	0.477
9	24/24	132	149	281	0.470
10	22/24	151	147	298	0.507
11	23/24	133	144	277	0.480
DDE 対照区	11/12	55	91	146	0.377

DDE 試験の対照区において性比が 1:1 (73:73)になる確率:P=0.06592

DDE 試験の対照区で今回の性比が得られる確率:P=0.000767

DDE 試験の対照区で性比が 0.377 より偏る確率 (Fisher の直接確率計算) :P=0.02238

DDE 試験の対照区で得られた性比が 1:1 とみなせるかの検定(カイ二乗検定):

$\chi^2 = 4.02, P < 0.05$ (棄却限界値 = 3.841)

なお、絶対重量及び相対重量ともに有意差の認められた変動は得られなかったものの、その一方に有意差が認められた器官(脳を除く)は以下のとおり。

* F1 雄(12 週齢) : 30 μ g/kg/day 投与群での精囊 + 凝固線相対重量の低値

有意差のある反応が得られたが、その毒性学的な意義については今後の検討課題とした結果

* F1 雄(哺育 21 日) : 0.03、0.3、3、30 μ g/kg/day 投与群での前立腺 C3mRNA 発現量及び F1 雄(12 週齢) : 30 μ g/kg/day 投与群での前立腺 C3mRNA 発現量の低値

(参考)試験結果の解釈に関する専門家の意見要旨

* F1 雄の前立腺 C3mRNA 発現量の低値について : DDE の高用量投与で C3mRNA 発現量が低下するという報告がある。本試験の高用量群でも有意に低値であり、低用量群においてもわずかとはいえ有意に低値である。蛋白質に翻訳され、機能する段階までの変化は現れていないが、動物が反応している可能性は否定できず、有意差のある反応が得られたが、その毒性学的な意義については今後の検討課題とする。

(2) 試験管内 (*in vitro*) 試験

ヒトエストロゲン受容体(ER α 及び ER β) 結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞 E-Screen 試験、ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト及びアンタゴニスト)、ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験及びヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及び TR β) 酵母試験を行った。

その結果、ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アンタゴニスト) では、IC₅₀ 値(6.7×10^{-6} M)が得られた。ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験では、IC₅₀ 値(7.26×10^{-4} M)が得られた。ヒト乳がん細胞 E-Screen 試験では、細胞毒性を示す濃度未満の 10^{-6} M において有意な細胞増殖が認められた。ヒトエストロゲン受容体(ER α 及び ER β) 結合競合阻害試験では、活性がみられた。ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験(アゴニスト)では、作用が認められた。ヒト甲状腺ホルモン受容体(TR α 及び TR β) 酵母試験では、有意な反応は認められなかった。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおり *p,p'*-DDE については、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

また、最高用量(既報告で影響が認められた用量)においてのみ、一般毒性と考えられる影響が認められた。また、その毒性学的な意義については今後の検討課題とした有意差のある反応が得られた。

本物質については、今後、健康リスク初期評価を行う際に、今回の試験結果を参照する予定である。

表. プロトコル概要 (p,p'-DDE)

被験物質	試験機関	被験動物	使用動物数	投与方法 投与期間	用量設定	試験方法の形式	母動物の観察項目	児動物の観察項目	備考
p,p'-DDE	(財) 残留 農薬研究所	Wistar Hannover ラ ット BrlHan: WIST@Jcl (GALAS)	購入 雄 60 匹 雌 100 匹 交尾成立 母動物 各群 13 匹 × 6 群	強制経口投与	0 0.03 0.30 3.0 30µg/kg/day	哺育児数の調整 は行わない。 離乳児は各群 6 腹の全ての F1 児 を育成児とし、残 りは全て剖検に 供する。	一般状態 体重測定 体重増加量 摂餌量測定 分娩および哺育行動 受胎率、出産率、 妊娠期間、着床 数、分娩率 剖検 器官重量測定 脳、下垂体、甲状 腺、胸腺、肝臓、 腎臓、脾臓、副腎、 卵巣、子宮 器官保存 重量測定器官の 他、膣、肉眼的異 常部位 病理組織学的検査 (必要に応じて)	各生育段階において 一般状態、体重測定、体重増加量、摂餌量測定 哺育児 (0~21 日齢) 出産児数、性比、生存率、AGD (4 日齢) 乳頭発達、身 体発達 (耳介開展、切歯萌出、眼瞼開裂) 初期行動発達 (正向反射、背地走性、空中正向反射) 21 日齢で屠殺した離乳児 剖検、前立腺凍結保存 器官重量測定 脳、胸腺、肝臓、脾臓、副腎、精巣、精巣上体、前立腺 腹葉、精囊、卵巣、子宮 器官保存 重量測定器官の他、肉眼的異常部位 病理組織学的検査 胸腺、肝臓、副腎、精巣、精巣上体、精囊、凝固線、前 立腺腹葉、卵巣、子宮、膣 遺伝子発現 前立腺における TRPM および C3 発現 観察継続離乳児 性成熟 (包皮分離、膣開口) 性周期 (膣開口日から 3 週 間または 3 周期以上) 12 週齢 剖検、前立腺凍結保存 器官重量測定、器官保存、病理組織学的検査、遺伝子発現 : 21 日齢児と同じ 精子検査 : 精巣精子頭部数、精巣上体精子数、運動能、形 態	
				陽性対照	50 mg/kg/day				

・まとめ

平成14年度優先物質であるヘキサクロロベンゼン、 γ -ヘキサクロロシクロヘキサン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル、*o,p'*-DDT及び*p,p'*-DDEについて行った「げっ歯類を用いた1世代試験」及び「試験管内(*in vitro*)試験」の結果について取りまとめを行った。

その結果、全物質について、今回の試験結果において、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)においては、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

なお、一部の物質については、有意差は認められたが、明らかな内分泌攪乱作用とは判断できない変化が認められ、現時点において、その毒性学的な意義を明らかにすることが困難であるため、今後の検討課題とすることとした。

また、最高用量(既報告で影響が認められた用量)においては、一般毒性と考えられる影響が認められた。

ヘキサクロロベンゼンについては、健康リスク初期評価が「化学物質の環境リスク評価 第1巻」において行われ、「健康リスクについては現時点では作業は必要ないと考えられる」と評価されており、今回の調査結果においても、既存の知見の範囲内であったことから、早急に新たな調査に着手する必要性は低いと考えられた。

γ -ヘキサクロロシクロヘキサン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル、*o,p'*-DDT及び*p,p'*-DDEについては、今後、健康リスク初期評価を行う際に、今回の試験結果を参照する予定である。