

化学物質審議会管理部会・審査部会
内分泌かく乱作用検討小委員会
中間報告書

平成18年8月

目 次

I. はじめに.....	1
II. 内分泌かく乱作用検討分科会及び内分泌かく乱作用検討小委員会.....	2
1. 内分泌かく乱作用検討分科会委員名簿.....	2
2. 内分泌かく乱作用検討小委員会委員名簿.....	2
3. 開催実績.....	4
III. 有害性評価の概要.....	8
1. 経緯.....	8
2. 15物質の有害性評価.....	9
2-1. オクタクロロスチレンの有害性評価.....	10
2-2. スチレンダイマー、スチレントリマーの有害性評価.....	12
2-3. n-ブチルベンゼンの有害性評価.....	15
2-4. フタル酸ジシクロヘキシルの有害性評価.....	17
2-5. ベンゾフェノンの有害性評価.....	20
2-6. ポリ臭化ビフェニルの有害性評価.....	23
2-7. 2, 4-ジクロロフェノールの有害性評価.....	26
2-8. フタル酸ジエチルの有害性評価.....	29
2-9. フタル酸ブチルベンジルの有害性評価.....	32
2-10. 4-ニトロトルエンの有害性評価.....	35
2-11. アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)の有害性評価.....	38
2-12. フタル酸ジ-n-ブチルの有害性評価.....	41
2-13. フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)の有害性評価.....	44
2-14. ノニルフェノールの有害性評価.....	47
2-15. ビスフェノールAの有害性評価.....	50
3. まとめ.....	53
4. 参考文献.....	54
IV. 試験法開発の概要.....	56
1. 経緯.....	56
2. 事業成果の概要と今後の課題.....	58
2-1. 三次元構造活性相関手法(QSAR).....	58
<i>in vitro</i> 試験法	
2-2. 受容体結合試験法.....	69
2-3. レポーター遺伝子アッセイ.....	78
2-4. 受容体結合試験法とレポーター遺伝子アッセイの関係.....	95

2-5. アロマターゼ・アッセイ	102
2-6. 開発途上にある試験法	112
2-6-1. 甲状腺ホルモン受容体 (TR) への受容体結合試験法	112
2-6-2. 甲状腺ホルモン受容体 (TR) へのレポーター遺伝子アッセイ	119
2-6-3. 甲状腺ホルモン合成系への作用物質検出法	126
2-6-4. Ah受容体へのアゴニスト様作用物質の検出法	129
2-6-5. 性ステロイドホルモン生合成系への作用物質検出法	131
<i>in vivo</i> 試験法	
2-7. 子宮増殖アッセイ	134
2-8. ハーシュバーガーアッセイ	145
2-9. 改良28日間反復投与毒性試験法	153
2-10. 二世世代繁殖毒性試験法	159
2-11. 妊娠期・授乳期投与試験法	171
3. 試験法開発全般にわたる課題と今後の取組み	183
4. まとめ	187
 V. おわりに	 188

I. はじめに

内分泌かく乱物質問題に関する社会的関心の高まりを背景に、平成11年7月に経済産業省化学品審議会試験判定部会に「内分泌かく乱作用検討分科会」が設置された。

同分科会においては、環境庁（当時）のとりまとめた「環境ホルモン戦略計画SPEED'98」において優先的に調査すべきとされた67物質（後に65物質に変更）のうち、我が国において使用実態がないとされる物質を除く40物質について、用途、生産量、有害性、規制状況等について概要を整理し、特に有害性情報が不足している9物質^{注1)}を対象に既存の知見を評価するとともに、内分泌かく乱物質問題に関する今後の課題の整理を行った中間報告書を平成12年1月にとりまとめた。

さらに、同分科会（平成12年度より化学物質審議会管理部会・審査部会内分泌かく乱作用検討小委員会）での議論を踏まえ、平成12年度から始まったミレニアム事業においては、上記の9物質を含む15の物質^{注2)}について、新たに実施した二世世代繁殖毒性試験等の結果を踏まえて、人の健康影響を中心に有害性評価を進めるとともに、関係省庁と連携して内分泌かく乱作用に係る試験法の開発とOECDにおける国際協力への貢献を進めてきた。

このような取り組みについては、順次、その成果を公表してきたところであるが、平成16年度をもってミレニアム事業が終了したことに鑑み、内分泌かく乱作用検討分科会及び内分泌かく乱作用検討小委員会における内分泌かく乱物質問題への今までの取り組みの成果をとりまとめるとともに、今後の課題と取り組みの方針について明らかにすることとする。

注1) 国内法での規制がない6物質及び海洋汚染防止法対象3物質。具体的には、オクタクロロスチレン、スチレンダイマー・トリマー、n-ブチルベンゼン、フタル酸ジシクロヘキサシ、ベンゾフェノン、ポリ臭化ビフェニル（PBB）、2,4-ジクロロフェノール、フタル酸ジエチル、フタル酸ブチルベンジル

注2) 上記9物質に4-ニトロトルエン、アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)、ノニルフェノール、ビスフェノールAの6物質を加えた15物質

II. 内分泌かく乱作用検討分科会及び内分泌かく乱作用検討小委員会

1. 内分泌かく乱作用検討分科会委員（11年度第1回～12年度第5回）

氏名 所属機関及び役職

- 宮本 純之 国際純正応用化学連合(IUPAC)化学と環境部前部会長
- 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安全性生物試験研究センター長
- 川合真一郎 神戸女学院大学人間科学部人間科学科教授
- 白井 智之 名古屋市立大学医学部病理学第一講座教授
- 白石 寛明 国立環境研究所化学環境部計測管理研究室長
- 徳留 信寛 名古屋市立大学医学部公衆衛生学講座教授
- 松本 和子 早稲田大学理工学部教授
- 山下 敬介 広島大学医学部解剖学第一講座助教授

(○：分科会長)

2. 内分泌かく乱作用検討小委員会委員

(1) 12年度第1回～14年度第2回

氏名 所属機関及び役職

- 宮本 純之 国際純正応用化学連合(IUPAC)化学と環境部前部会長
- 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安全性生物試験研究センター長
- 川合真一郎 神戸女学院大学人間科学部人間科学科教授
- 白井 智之 名古屋市立大学医学部病理学第一講座教授
- 白石 寛明 国立環境研究所化学環境部計測管理研究室長
- 徳留 信寛 名古屋市立大学医学部公衆衛生学講座教授
- 松本 和子 早稲田大学理工学部教授
- 山下 敬介 広島大学医学部解剖学第一講座助教授

(○：小委員長)

(2) 14年度第3回

氏名 所属機関及び役職

- 宮本 純之 国際純正応用化学連合(IUPAC)環境問題上級科学顧問
- 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安全性生物試験研究センター長
 川合真一郎 神戸女学院大学人間科学部人間科学科教授
 小山 次朗 鹿児島大学水産学部海洋資源環境教育研究センター教授
 白井 智之 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学教授
 白石 寛明 国立環境研究所化学物質環境リスク研究センター曝露評価研究室長
 鈴木 勝士 日本獣医畜産大学獣医生理学教室教授
 徳留 信寛 名古屋市立大学大学院医学研究科健康増進・予防医学教授
 松本 和子 早稲田大学理工学部教授
 三森 国敏 東京農工大学農学部獣医学科家畜病理学教授
 山下 敬介 広島大学大学院医歯薬学総合研究科解剖学・発生生物学研究室助教授
 (○：小委員長)

(3) 15年度第1回～第3回

氏 名	所属機関及び役職
○高橋 道人	昭和大学薬学部客員教授
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安全性生物試験研究センター長
川合真一郎	神戸女学院大学人間科学部人間科学科教授
小山 次朗	鹿児島大学水産学部海洋資源環境教育研究センター教授
白井 智之	名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学教授
白石 寛明	国立環境研究所化学物質環境リスク研究センター曝露評 価研究室長
鈴木 勝士	日本獣医畜産大学獣医生理学教室教授
徳留 信寛	名古屋市立大学大学院医学研究科健康増進・予防医学教授
西原 力	大阪大学薬学部教授
三森 国敏	東京農工大学農学部獣医学科家畜病理学教授
山下 敬介	広島大学大学院医歯薬学総合研究科解剖学・発生生物学研究室助教授

(○：小委員長)

(3) 16年度第1回～第2回

氏 名	所属機関及び役職
○高橋 道人	昭和大学薬学部客員教授
井口 泰泉	自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター教授
川合真一郎	神戸女学院大学人間科学部人間科学科教授

菅野 純 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毒性部長
 小山 次朗 鹿児島大学水産学部海洋資源環境教育研究センター教授
 白井 智之 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学教授
 白石 寛明 国立環境研究所化学物質環境リスク研究センター曝露評価研究室長
 徳留 信寛 名古屋市立大学大学院医学研究科健康増進・予防医学教授
 西原 力 大阪大学大学院薬学研究科教授
 三森 国敏 東京農工大学大学院共生科学技術研究部教授
 山下 敬介 広島大学大学院医歯薬学総合研究科助教授

(○：小委員長)

(4) 平成17年第1回

氏名 所属機関及び役職

○高橋 道人 昭和大学薬学部客員教授
 井口 泰泉 自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター教授
 川合真一郎 神戸女学院大学人間科学部人間科学科教授
 菅野 純 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毒性部長
 小山 次朗 鹿児島大学水産学部海洋資源環境教育研究センター教授
 白井 智之 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学教授
 白石 寛明 国立環境研究所化学物質環境リスク研究センター長
 徳留 信寛 名古屋市立大学大学院医学研究科健康増進・予防医学教授
 西原 力 大阪大学名誉教授
 三森 国敏 東京農工大学大学院共生科学技術研究部教授
 山下 敬介 広島大学大学院医歯薬学総合研究科助教授

(○：小委員長)

3. 開催実績

化学品審議会試験判定部会内分泌かく乱作用検討分科会

平成11年度第1回：平成11年8月24日

- ・分科会の公開について
- ・分科会開催の主旨について
- ・過去の検討成果
- ・試験法の現状報告
- ・その他

平成11年度第2回：平成11年10月6日

- ・個別物質（9物質）の文献評価について
- ・試験法開発の進め方について
- ・その他

平成11年度第3回：平成11年11月2日

- ・個別物質（9物質）についての文献調査のとりまとめについて
- ・中間報告の目次案について
- ・その他

平成11年度第4回：平成11年12月21日

- ・内分泌かく乱作用検討分科会中間報告書案について
- ・その他

平成12年度第1回：平成12年4月10日

- ・新たな個別物質の評価について
- ・その他

平成12年度第2回：平成12年5月30日

- ・個別物質の評価について
- ・その他

平成12年度第3回：平成12年7月31日

- ・個別物質の評価について
- ・その他

平成12年度第4回：平成12年9月28日

- ・個別物質の評価について
- ・その他

平成12年度第5回：平成12年12月19日

- ・個別物質の評価について
- ・その他

管理部会・審査部会内分泌かく乱作用検討小委員会

平成12年度第6回：平成13年3月21日

- ・化学物質審議会管理部会・審査部会内分泌かく乱作用検討小委員長の互選について
- ・個別物質の評価について
- ・その他

平成13年度第1回：平成13年8月24日

- ・内分泌かく乱作用に関する試験法開発について
- ・個別物質（15物質）の評価について
- ・内分泌かく乱物質問題に関する今後の取組みについて
- ・その他

平成13年度第2回：平成13年11月26日

- ・個別物質（15物質）の評価について
- ・内分泌かく乱作用に関する試験法開発状況について
- ・内分泌かく乱物質問題に関する今後の取組みについて
- ・その他

平成13年度第3回：平成14年3月18日

- ・「内分泌かく乱作用を有すると疑われる」と指摘された化学物質の個別物質有害性評価書（案）に対するパブリックコメントについて
- ・化学物質の内分泌かく乱作用評価スキームの考え方について
- ・その他

平成14年度1回：平成14年4月19日

- ・「内分泌かく乱作用を有すると疑われる」と指摘された化学物質の個別物質有害性評価書（案）に対するパブリックコメントについて
- ・「内分泌かく乱作用を有すると疑われる」と指摘された化学物質の個別物質有害性評価書の公表
- ・内分泌かく乱物質に関するOECD スペシャルセッションの対応について
- ・その他

平成14年度第2回：平成14年6月10日

- ・内分泌かく乱作用に関する試験法開発事業の成果について
- ・「内分泌かく乱作用を有すると疑われる」と指摘された化学物質の個別物質有害性評価書（英訳版）の公表
- ・内分泌かく乱物質に関するOECD スペシャルセッションの対応について
- ・その他

平成14年度第3回：平成14年11月13日

- ・内分泌かく乱作用に関する試験法開発事業の成果について
- ・OECD/EDTA6（第6回内分泌かく乱物質の試験及び評価に関するタスクフォース会合）の報告
- ・内分泌かく乱物質問題に関する今後の検討事項
- ・その他(SCOPE/IUPAC 内分泌活性物質プロジェクト及び国際シンポジウム)

平成15年度第1回：平成15年7月1日

- ・内分泌かく乱作用に関する試験法開発事業の成果について
- ・内分泌かく乱物質問題に関する今後の取組について
- ・OECDにおける内分泌かく乱物質問題に関する国際的取組について
- ・(SCOPE/IUPAC 内分泌活性物質国際シンポジウムでの検討結果について)
- ・その他

平成15年度第2回：平成15年9月2日

- ・内分泌かく乱作用に関する試験法開発事業の成果について（平成14年度報告）
- ・内分泌かく乱作用に関する試験法開発事業の実施体制について
- ・その他

平成15年度第3回：平成16年3月15日

- ・内分泌かく乱作用に関する経済産業省の取組について
- ・内分泌かく乱作用に関する試験法開発状況について（平成14年度報告）
- ・三次元構造活性相関手法(3D-QSAR)による結合性予測システム開発の進捗（平成15年度中間報告）
- ・*in vitro* 試験と *in vivo* スクリーニング試験結果の相関性に関する考察（平成15年度中間報告）
- ・平成16年度事業計画（案）について
- ・内分泌かく乱作用に関する経済産業省における取組の成果について
- ・その他

平成16年度第1回：平成16年7月22日

- ・平成15年度事業成果（速報）について
- ・平成16年度事業計画について
- ・有害性評価書の改訂について
- ・その他

平成16年度第2回：平成17年2月9日

- ・有害性評価書の改訂について
- ・平成17年度以降の内分泌かく乱化学物質対策事業の進め方（案）について
- ・OECDにおける内分泌かく乱物質問題に関する国際的取組について
- ・その他

平成17年度第1回：平成17年5月30日

- ・中間報告書（案）について
- ・平成17年度事業計画（案）について
- ・その他

Ⅲ. 有害性評価の概要

1. 経緯

内分泌かく乱物質（いわゆる環境ホルモン）問題については、国際的にも科学的不確実性が多く指摘されているのが現状であり、人の健康や生態系への影響を正確に把握するためにも、科学的な検討評価を積み重ねる必要がある。また、内分泌かく乱作用の有無にかかわらず、化学物質によってもたらされる有害影響（毒性）に対しては、適切なリスク評価に基づいた効果的な対応をとることが必要である。

こうしたリスク評価に必要な科学的知見の充実を図るため、化学物質審議会審査部会・管理部会内分泌かく乱作用検討小委員会において内分泌かく乱作用に関するさまざまな科学的情報の収集とともに、人の健康影響を中心に有害性評価が進められてきた。

同小委員会では、1998年に環境庁（当時）がとりまとめた「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」において、内分泌かく乱作用を有する疑いがあるとしてリストアップされた 67 物質群（後に 65 物質に変更）のうち、わが国において生産・使用実態がないとされた物質群、農薬登録物質やダイオキシン等の各種対策が進められている物質群を除いた下記の 15 物質群について、有害性評価書を作成し、2002 年 4 月に経済産業省ホームページ上に公表した。

(http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/03kanri/e_1_yuugaisei.htm)

- | | | |
|-------------------|--------------------|--------------|
| ①オクタクロロスチレン | ②スチレンダイマー・トリマー | ③n-ブチルベンゼン |
| ④フタル酸ジシクロヘキシル | ⑤ベンゾフェノン | ⑥ポリ臭化ビフェニル |
| ⑦2,4-ジクロロフェノール | ⑧フタル酸ジエチル | ⑨フタル酸ブチルベンジル |
| ⑩4-ニトロトルエン | ⑪アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル) | ⑫フタル酸ジ-n-ブチル |
| ⑬フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) | ⑭ノニルフェノール | ⑮ビスフェノール A |

この時点で、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)、ノニルフェノール及びビスフェノールAの 4 物質については、リスク評価を行うために必要な有害性情報が得られており、内分泌かく乱作用の有無に関わらず、従来知見で生殖・発生毒性による影響がみられることから、有害性評価や暴露評価を踏まえてリスク評価を実施し、適切なリスク管理のあり方について検討すべきとされた。これを受け、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)、ノニルフェノール及びビスフェノールAの 3 物質については、産業技術総合研究所において詳細リスク評価を行うとともに、製品評価技術基盤機構 (NITE) で個々にリスク評価管理研究会を設けて検討を行ってきており、これらの結果は、順次公表されている (<http://www.safe.nite.go.jp/risk/kenkyukai.html>)。また、フタル酸ジ-n-ブチルについては、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の委託事業で製品評価技術基盤機構 (NITE) 及び化学物質評価研究機構 (CERI) が実施しているPRTR対象物質の初期リスク評価の中でリスク評価が行われた。また、3 物質群（オクタクロロスチレン、スチレンダイマー・トリマー、ポリ臭化ビフェニル）については、製造・輸入の実態から当面の暴露の懸念が低く、緊急な対応の必要がないと判断された。これら 7 物質を除いた 8 物質については、二世代繁殖毒性試験など内分泌・生殖器系への影響評価のための試験が 2000 年から開始されており、得られた試験結果と新たな文献的知見を含めて有害性評価の見直しを行うこととした。すなわち、2002 年に公表した 15 物質のうち、「リスク評価等今後必要な対応」で更なる知見・情報に

基づいて判断するとされた 8 物質について、経済産業省で実施した試験結果及び内分泌・生殖系への影響に関する新たな文献知見（文献検索時期：2003 年 2 月¹⁾）を加えて、平成 16 年度内に有害性評価書を改訂し、内分泌かく乱作用検討小委員会での審議・承認を経て、2005 年 4 月に経済産業省ホームページ上に公開した。

2002 年 4 月に公表され、その後改訂を行っていない物質群

- ①オクタクロロスチレン ②スチレンダイマー・トリマー ⑥ポリ臭化ビフェニル
⑫フタル酸ジ-n-ブチル ⑬フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) ⑭ノニルフェノール
⑮ビスフェノール A

平成 16 年度内に改訂し、2005 年 4 月に公開した物質群

- ③n-ブチルベンゼン ④フタル酸ジシクロヘキシル ⑤ベンゾフェノン
⑦2,4-ジクロロフェノール ⑧フタル酸ジエチル ⑨フタル酸ブチルベンジル
⑩4-ニトロトルエン ⑪アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)

2. 15 物質の有害性評価

個別物質の有害性評価にあたっては、内分泌かく乱物質の定義を「生物個体の内分泌系に変化を起こさせ、その個体またはその子孫に健康障害を誘発する外因性物質」（1996 年 12 月 EU/WHO/OECD ワークショップ見解）とし、内分泌系をかく乱した結果として発現する健康障害を評価することが重要であると認識したうえで、人の健康に対する影響を中心とする有害性の確認に重点をおいて検討を行った。

以下に示す各有害性評価結果は、内分泌かく乱作用検討小委員会における承認時の記述内容であり、物質ごとに同小委員会の開催時期は異なる。

また、1. 経緯で示した通り、2003 年 2 月に文献検索を行った物質のうち①オクタクロロスチレン、②スチレンダイマー・トリマー、⑥ポリ臭化ビフェニル、については二世世代繁殖毒性試験など内分泌・生殖器系への影響評価のための試験を実施していないため改訂を行っていない。したがって、これら 3 物質については 2003 年 2 月の検索時に得られた内分泌系及び生殖系への影響に関する知見を反映していないため、今回これを脚注に追記した。また、改訂を行った 8 物質についても 2003 年 2 月検索時に得られた一般毒性に関する知見については改訂時に反映していないため、今回合わせて脚注に追記した。

さらに、新たな情報が得られた部分（下線部）については、2006 年 2 月現在の状況について説明を加えた。

以下に各物質の有害性評価書の結論部分を掲載する（全文については上記経済産業省ホームページで公開）。

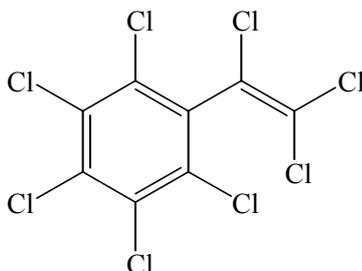
¹⁾ 実際には試験をした 8 物質に、オクタクロロスチレン、スチレンダイマー・トリマー、ポリ臭化ビフェニルを含めた 11 物質について、追加情報を収集するため文献検索した。後者 3 物質では、製造・輸入実態に変化はなく、有害性評価書の改訂は行わなかった。検索範囲はCAplus (STN)、Toxline (Web)、Medline (Web) とした。

2-1. オクタクロロスチレン [CAS No. 29082-74-4] の有害性評価

本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表され、平成 16 年度の改訂を行っていないため、以下に示す記述内容は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）承認時の内容である。ただし、製造・輸入量については経済産業省による平成 13 年度実態調査での値に更新し、下線部については 2006 年 2 月現在の状況について説明を加えた。また、2003 年 2 月の文献検索時に得られた知見も脚注に追記した。

(1) 化学物質の同定情報

名	称：	オクタクロロスチレン	
別	名：	ペンタクロロ(トリクロロエテニル)ベンゼン、OCS	
分	子	式：	C_8Cl_8
分	子	量：	379.71
構	造	式：	



(2) 物理化学的性状

外	観：	報告なし		
融	点：	報告なし		
沸	点：	報告なし		
比	重：	報告なし		
蒸	気	圧：	0.0018 Pa (25°C) ¹⁾	
分	配	係	数：	Log Pow = 6.29 (計算値) ¹⁾
分	解	性：	加水分解性	報告なし
			生分解性	報告なし
溶	解	性：	水	0.00174 mg/L (25°C) (計算値) ²⁾
			有機溶媒	報告なし

(3) 一般情報

製	造	量	等：	平成 13 年度 製造、輸入実績なし ³⁾
用	途：	塩化マグネシウムから熔融塩電解法でマグネシウム単体を精錬する高温製造過程の副産物として、また塩素ガスの電解法製造、アルミニウムのヘキサクロロエタンによる精錬・脱気の過程で得られる副生成物 ¹⁾		
適	用	法	令：	該当法令なし

¹⁾ HSDB, 2001; ²⁾ PHYSPROP, 2000; ³⁾ 経済産業省, 2003a

(4) 現時点での有害性評価^{注1)}

ヒトの内分泌系、生殖器系への影響に関する報告はない。

本物質の内分泌系への影響として、ラットの単回から12ヵ月長期暴露までの種々の実験が実施され、甲状腺に対する影響が示唆されている。しかしながら、甲状腺ホルモンを含め血清ホルモンレベルに対する影響については報告がない。また、エストロゲン受容体結合に関する*in vitro*試験及び幼若ラットを用いた子宮増殖アッセイでエストロゲン作用はみられないとの報告があるが、アンドロゲン受容体を介する作用については報告がなく、現時点で性腺や性ホルモン受容体を介する生殖影響に関しては十分な科学的知見があるとはいえないⁱⁱ⁾。また、本物質は肝臓において薬物代謝酵素を誘導することが示されているが、それによる内分泌系への関与の有無については情報が無い。

なお、本物質の有害性に関連する情報として、OCSは有機塩素系化合物製造過程などから副生成される物質で、ヒトでは、疫学調査により脂肪組織や母乳などから本物質が検出された例が報告されている。動物実験では、反復投与毒性で、甲状腺に加えて、肝臓、腎臓、造血系への影響がみられている。変異原性、発がん性に関しては十分な情報はない。ヒトの発がん性に関しては評価されていない。

(5) リスク評価等今後必要な対応^{注1), 注2)}

今後はアンドロゲン受容体を介する作用の検討（受容体結合活性、ハーシュバーガーアッセイ）や、本物質の甲状腺に対する作用、代謝酵素誘導による内分泌系への作用を含めて検討する必要があると考えられる。^{注3)}しかし、さらなる追加試験実施の可否は、本物質の排出形態が限定的であることから、上記の試験結果や環境への暴露状況等を踏まえて検討することが適当であると考えられる。

注1) 平成14年度第1回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002年4月）における承認時の記述内容。

ii) 2003年2月検索時の追加知見：[オクタクロロスチレンは蛍光標識エストラジオールを用いた競合結合試験で、ヒトエストロゲン受容体 α への結合性を示し、また、ヒトアンドロゲン受容体競合結合試験で、ヒトアンドロゲン受容体への結合性を示した (Satoh et al., 2001)。]

注2) 環境省は、「内分泌かく乱作用に関する今後の環境省の対応方針について (ExTEND 2005)」において、これまでの取組みを整理し、オクタクロロスチレンについては、ラット改良1世代試験の結果、本物質は、「文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった」と公表している。

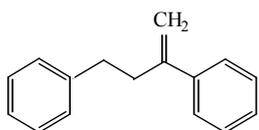
注3) アンドロゲン受容体への結合性を調べる*in vitro*受容体結合試験において弱い結合性を示した (RBA=0.008) がレポーター遺伝子アッセイでは陰性であった (経済産業省, 2003b)。ハーシュバーガー試験では抗アンドロゲン作用が認められた(経済産業省, 2002)。

2-2. スチレンダイマー、スチレントリマー [CAS No. 25247-68-1, 28213-80-1] の有害性評価

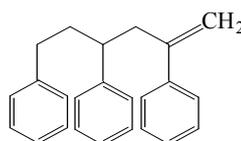
本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表され、平成 16 年度の改訂を行っていないため、以下に示す記述内容は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）承認時の内容である。また、2003 年 2 月の文献検索時に得られた知見を脚注に追記した。

(1) 化学物質の同定情報

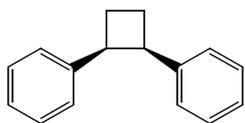
名	称：	スチレンダイマー	スチレントリマー
別	名：	多くの化合物があるため省略	
分	子	式：	$C_{16}H_{16}$
分	子	式：	$C_{24}H_{24}$
構	造	量：	208.2
		量：	312.3
	式：	同定可能な構造異性体の種類は不明であるが、本評価書ではダイマー異性体 4 種、トリマー異性体 7 種、トリマー混合物 2 種を中心に有害性評価を行った。	
		構造式としてその一部を記載する。	



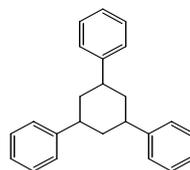
2,4-ジフェニル-1-ブテン



2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン



1,2-ジフェニルシクロブタン



1,3,5-トリフェニルシクロヘキサン

(2) 物理化学的性状

外	観：	報告なし	報告なし
融	点：	報告なし	報告なし
沸	点：	報告なし	報告なし
比	重：	報告なし	報告なし
蒸	気	圧：	報告なし
分	配	係	数：
分	解	性：	加水分解性 報告なし
			生分解性 報告なし
溶	解	性：	水 報告なし
			有機溶媒 報告なし

(3) 一般情報

製造量等： 特定の用途がないため製造はなし。ポリスチレン製の各種容器の材質中に、スチレンダイマー、トリマー合せて、760 - 21,430 $\mu\text{g/g}$ (平均 9,590 $\mu\text{g/g}$) が検出されたとの報告がある²⁾。

用途： スチレンダイマー及びスチレントリマーは、ポリスチレン樹脂を合成する時に生ずる副生成物であり^{3) 4)}、特定の用途はない。

適用法令： 該当法令なし

¹⁾ HSDB, 2001 ; ²⁾ 河村ら, 1998; ³⁾ Mayo, 1968; ⁴⁾ Kurze et al., 1970.

(4) 現時点での有害性評価^{注4)}

スチレンダイマー、トリマーの暴露によるヒトの健康影響に関する報告はない。

4 量体を主成分とするスチレンオリゴマーの混合物で、エストロゲン作用を示す報告があるが、混合物として含有されているスチレンダイマー、トリマーの影響によるものかは不明である。1998年以降には、特にポリスチレン容器から溶出するスチレンダイマー、トリマーのヒトへの暴露を考慮した実験や、ポリスチレン容器から溶出するスチレンダイマー、トリマーの化学合成品を使用した実験が実施されているが、いずれの試験においてもエストロゲンあるいは抗アンドロゲン作用はみられていない。ラットに妊娠6日から分娩後21日まで経口投与した実験では、母動物及び出生仔に影響はみられていない。また、血清プロラクチン濃度の上昇は、合成されたスチレンダイマー、トリマーを投与されたラットではみられていないⁱⁱⁱ⁾。

さらに、*in vitro*におけるエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体への結合試験、ヒト乳がん細胞MCF-7を用いたエストロゲン様作用の有無を検討する実験や精巣の細胞を用いたテストステロン生合成の阻害の有無を検討する実験において、いずれも陰性の結果が示されている。スチレンダイマー、トリマーの合成品 1-10 μM のMCF-7細胞増殖試験では、ヒト乳がん細胞の増殖が認められ、ヒトエストロゲン受容体 α に結合するとの結果が報告されているが、それらが示すエストロゲン様作用は、 17β -エストラジオールと比べて、1/68,000以下と弱い^{iv)}。

注4) 平成14年度第1回内分泌かく乱作用検討小委員会(2002年4月)における承認時の記述内容。

ⁱⁱⁱ⁾ 2003年2月検索時の追加知見：[幼若雌Wistarラット(18~20日齢)に、スチレンダイマーとトリマー混合物3種(ダイマー投与量+トリマー投与量: 40 $\mu\text{g/kg/day}$ +580 $\mu\text{g/kg/day}$ 、20 $\mu\text{g/kg/day}$ +290 $\mu\text{g/kg/day}$ 、4 $\mu\text{g/kg/day}$ +58 $\mu\text{g/kg/day}$)を4日間強制経口投与した子宮増殖アッセイで、いずれの混合物でも子宮重量に変化はみられなかった(Prinsen and Gouko, 2001)。

幼若雌SDラット(21日齢)に、スチレンダイマー、トリマー10種各々0、0.2、2、20、200 mg/kg を3日間皮下投与した子宮増殖アッセイで、いずれも子宮重量に変化はみられなかった(Ohno et al., 2003)。

雄マウスに、スチレントリマー(1a-Phenyl-4e-(1'-phenylethyl)tetralin)0、0.01、0.1、1、10、100、1000 $\mu\text{g/kg/day}$ を生後1~14日に5日/週の頻度で皮下投与した試験で、0.01及び1000 $\mu\text{g/kg/day}$ で精巣絶対重量の減少、0.1 $\mu\text{g/kg/day}$ で精巣上体重量の増加がみられたが、精巣、精巣上体及び前立腺に組織学的変化はみられなかった(Sakamoto et al., 2001)。]

^{iv)} 2003年2月検索時の追加知見：[スチレンダイマー、トリマー10種について、3種類のエストロゲン受容体結合試験の比較を行った報告では、放射性同位体標識エストラジオールとの競合結合試験、また蛍光標識エストラジオールとの競合結合を蛍光偏光の変化で測定する試験では、ERとの結合性はみられなかった(Ohno et al., 2003)。一方、Ohyamaら(Ohyama et al., 2001)が用いた、マイクロプレートに固相化したヒトエストロゲン受容体へ、被験物質と蛍光標識エストラジオールを競合反応させ、固相化ヒトエストロゲン受容体に結合している蛍光エストラ

(5) リスク評価等今後必要な対応^{エラー! ブックマークが定義されていません。注5)}

スチレンダイマー、トリマーの内分泌かく乱作用について評価を行うための *in vitro* の各種スクリーニング試験は既に実施されており、高純度の合成化学品であるスチレンダイマー、トリマーでエストロゲン様活性は否定されている。一部エストロゲン様作用がみられるとの報告例もあるが、その活性は弱い。さらに、ラットを用いた *in vivo* の実験で、エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用は認められていない。従って、これまでに実施された試験結果からは、スチレンダイマー及びトリマーに明確な内分泌かく乱作用があるとの証拠は見出せないことから、当面特別な対応をとる必要性はないものと判断される。

ジオール量を蛍光検出する試験では、いずれのスチレンダイマー及びトリマーも溶解度を越えた高濃度で結合性がみられた。しかし、この試験方法では、溶解せず沈殿した被験物質によりエストロゲンの特異性が低下することが判明している。

ヒトエストロゲン受容体を用いた酵母レポーター遺伝子アッセイ及び MCF7 を用いたレポーター遺伝子アッセイで、スチレンダイマーの一種である *trans*-1,2-diphenylcyclobutane そのものはエストロゲン応答配列 (ERE) 依存的な遺伝子の転写活性化を示さなかったが、3-methylcholanthrene を投与した SD ラットの肝ミクロソームを添加すると ERE を介した転写活性化能を示した。同様に、*cis*-1,2-diphenylcyclobutane、1,3-diphenylpropane 及び 2,4-diphenyl-1-butene もラット肝ミクロソーム添加により ERE を介した転写活性化能を示すようになった。このように、ある種のスチレンダイマーの代謝生成物は転写活性化能をもつことが示された (Kitamura et al., 2003)。ヒトアンドロゲン受容体結合性試験でスチレンダイマー、トリマー10種のうち、3種のダイマーと4種のトリマーに結合がみられた (Sato et al., 2001)。]

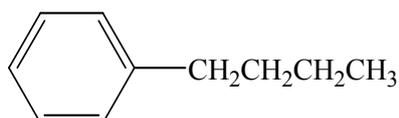
^{注5)} スチレンダイマー・トリマーについては、環境省において2000年7月に開催された平成12年度第1回「内分泌攪乱化学物質問題検討会」で審議された結果、「スチレン2量体・3量体を構成する化学物質は包括的に現時点でリスクを算定することは技術的にみて現実的でないとともにその必要性はない。」と位置づけられた。その見解に基づき、その後環境省は1998年5月の「SPEED'98」のプライオリティーリストからスチレン2量体・3量体を削除した。

2-3. n-ブチルベンゼン [CAS No. 104-51-8] の有害性評価

本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表された後改訂を行い、平成 16 年度第 2 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2005 年 2 月）において審議、承認され、2005 年 4 月に公表された。以下に示す記述内容は、平成 16 年度第 2 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2005 年 2 月）承認時の内容である。また、2003 年 2 月の文献検索時に得られた一般毒性に関する知見も脚注に追記した。

(1) 化学物質の同定情報

名	称：	n-ブチルベンゼン	
別	名：	1-フェニルブタン、n-BB	
分	子	式：	C ₁₀ H ₁₄
分	子	量：	134.22
構	造	式：	



(2) 物理化学的性状

外	観：	報告なし		
融	点：	-87.9°C ¹⁾		
沸	点：	183.3°C ¹⁾		
比	重：	報告なし		
蒸	気	圧：	141 Pa (25°C) ¹⁾	
分	配	係	数：	Log Pow = 4.38 (実測値) ¹⁾
分	解	性：	加水分解性	報告なし
			生分解性	報告なし
溶	解	性：	水	11.8 mg/L (25°C) ¹⁾
			有機溶媒	報告なし

(3) 一般情報

製	造	量	等：	平成 13 年度 製造、輸入実績なし ²⁾
用	途：	合成中間体及び液晶製造用原料		
適	用	法	令：	海洋汚染防止法

¹⁾ PHYSPROP, 2000; ²⁾ 経済産業省, 2003a

(4) 現時点での有害性評価^{注6)}

ヒトの内分泌系、生殖器系への影響に関する報告はない。

本物質の内分泌系への影響として、*in vitro* 試験系ではエストロゲン受容体及びアンドロゲン受容体に対して結合性を示さず、レポーター遺伝子アッセイでは、ヒトエストロゲン受容体やヒトアンドロゲン受容体を介した遺伝子の転写活性化は認められていない。また、酵母ツーハイブリッドアッセイにおいても転写活性化は認められていない。*in vivo* 試験系では、卵巣摘出ラットや幼若ラットを用いた子宮増殖アッセイで、子宮重量に対する影響はみられず、n-BBはエストロゲン作用及び抗エストロゲン作用がないと考えられる。また、去勢ラットを用いたハーシュバーガーアッセイでは雄性副生殖器に対する影響はみられず、n-BBはアンドロゲン作用及び抗アンドロゲン作用は乏しいものと考えられる。従って、これらの性ホルモン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いものと考えられる。

生殖・発生毒性については、ラットの2世代生殖毒性試験が実施されており、親動物では肝臓や腎臓に対する一般毒性学的影響がみられたが内分泌系、生殖能に影響はみられていない。仔動物に対する影響については、300 mg/kg/dayの用量で離乳時に胸腺重量の増加がみられたがその他の影響はみられず、その後の成長にも影響はみられておらず、n-BBが重篤な生殖毒性を惹起する物質である可能性は低いと考えられる。

本物質の有害性に関連する情報として^{v)}、実験動物では急性毒性は弱く、変異原性・遺伝毒性では、*in vitro*で陰性、陽性両方の報告がある。また、*in vivo*試験は実施されていない。

(5) リスク評価等今後必要な対応^{注6), 注7)}

n-BBは、性ホルモン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いと考えられ、また、2世代試験においても内分泌系・生殖系への影響、次世代に対する明確な有害性影響を示していないことから、現時点で、新たな調査に着手する必要性は低いと考えられる。

^{注6)} 平成16年度第2回内分泌かく乱作用検討小委員会(2005年2月)における承認時の記述内容。

^{v)} 2003年2月検索時の追加知見: [C3H/Heマウスから得た脾臓リンパ球B細胞のマイトゲンLPS(細胞壁リポ多糖)による幼若化、及びBALB/Cマウスから得た脾臓リンパ球T細胞のマイトゲンCon A(Concanavalin A)による幼若化をいずれも阻害せず、細胞性免疫、液性免疫のいずれにも影響しないというスクリーニング試験の報告がある(Sakazaki et al., 2001)。]

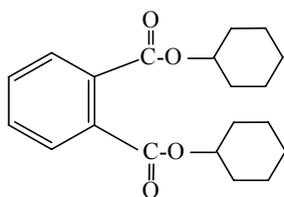
^{注7)} n-ブチルベンゼンについては、環境省において2000年10月に開催された平成12年度第2回「内分泌攪乱化学物質問題検討会」で審議された結果、「現時点では現実的なリスクが想定しがたいと判断されるべきものであり、数万以上ともいわれる多くの化学物質のなかで取り立てて、内分泌かく乱作用を現時点で評価する必要はないと考えられる。」と位置づけられた。その見解に基づき、その後環境省は1998年5月の「SPEED'98」のプライオリティリストからn-ブチルベンゼンを削除した。

2-4. フタル酸ジシクロヘキシル [CAS No. 84-61-7] の有害性評価

本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表された後改訂を行い、平成 16 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2004 年 7 月）において審議、承認され、2005 年 4 月に公表された。以下に示す記述内容は、平成 16 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2004 年 7 月）承認時の内容である。ただし、下線部については 2006 年 2 月現在の状況について説明を加え、2003 年 2 月の文献検索時に得られた一般毒性に関する知見も脚注に追記した。

(1) 化学物質の同定情報

名 称： フタル酸ジシクロヘキシル (DCHP)
別 名： ジシクロヘキシルフタレート、1,2-ベンゼンジカルボン酸ジシクロヘキシル
エステル、DCHP
分 子 式： $C_{20}H_{26}O_4$
分 子 量： 330.42
構 造 式：



(2) 物理化学的性状

外 観： 白色粉末¹⁾
融 点： 66°C ¹⁾
沸 点： 222-228°C ¹⁾
比 重： $d^{20}=1.383$ ¹⁾
蒸 気 圧： 0.093 Pa (115°C) ¹⁾
分 配 係 数： Log Pow = 6.2 (計算値) ¹⁾
分 解 性： 加水分解性：報告なし
生分解性：易分解 (BOD=68.5%, 28 日間) ²⁾
溶 解 性： 水 4 mg/L (24°C) ¹⁾
有機溶媒 多くの有機溶媒に可溶 ¹⁾

(3) 一般情報

製 造 量 等： 平成 13 年度 約 100 t ³⁾
用 途： ニトロセルロース、エチルセルロース、酢酸ビニル、塩化ビニル
樹脂等の可塑剤¹⁾
適 用 法 令： 該当法令なし

¹⁾HSDB, 2001; ²⁾通商産業公報, 1977; ³⁾ 化学工業日報社, 2003

(4) 現時点での有害性評価^{注8)}

ヒトの内分泌系、生殖器系への影響に関する報告はない。

本物質の内分泌系への影響を調べるための *in vitro* 試験系において、ヒト ER を用いた結合試験及びヒト ER 応答性酵母増殖アッセイにおいて、弱い受容体結合性 (E2 の 1/480–1/960,000、DES の 1/3,600) 及びエストロゲン様作用が認められているが、酵母ツーハイブリッドアッセイ及びレポーター遺伝子アッセイではエストロゲン様作用は認められていない。ヒト AR を用いた結合性試験では弱い受容体結合性 (ジヒドロテストステロンの 1/22,000、ミボレロンの <1/11,000) が認められているが、ヒト AR レポーター遺伝子アッセイではアンドロゲン様作用は認められていない。また、子宮増殖アッセイ及びハーシュバーガーアッセイでもエストロゲン作用、アンドロゲン作用は検出されておらず、これらの性ホルモン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いと考えられる。

動物実験における内分泌系及び生殖系に対する影響として、反復投与毒性試験では高用量 (2,500 または 4,170 mg/kg/day) でラットの精細管の萎縮、精子形成の減少がみられている。その他の臓器への影響として、肝臓において重量増加と酵素誘導がみられている。

また、生殖・発生毒性試験に関して、2 世代生殖毒性試験、4 世代試験が実施されており、2 世代試験では親動物に 1,200ppm (雄で 80 から 90 mg/kg/day 相当、雌で 104 から 108 mg/kg/day 相当) 以上で影響がみられ、体重増加抑制、摂餌抑制、肝細胞肥大、甲状腺ろ胞上皮細胞の肥大、雄で前立腺重量減少、精細管萎縮、精巣の精子数減少、雌で発情期間隔のわずかな延長がみられたが生殖能に影響はみられていない。また、仔動物では 1,200 ppm 以上の雄で AGD の短縮、並びに乳輪の発現、6,000 ppm で体重増加抑制がみられている。このように、親動物、仔動物ともに 100mg/kg/day 前後の用量で、本物質の内分泌系への影響を示唆する変化が認められた。

本物質については、*in vitro* 試験系及び *in vivo* 試験系の ER あるいは AR いずれの受容体介在性の作用もみられていないことから 2 世代試験で雄仔動物にみられた AGD の短縮、乳輪の発現は、DEHP (フタル酸ジ-2-エチルヘキシル)、DBP (フタル酸ジ-n-ブチル) 等でみられる雄仔動物の AGD の短縮、乳頭遺残、尿道下裂等の種々の奇形と類似していることから、テストステロン生合成系の阻害によるアンドロゲン受容体を介さない抗アンドロゲン作用による可能性が考えられる。

一方、低用量 (5 mg/kg/day) で実施した 4 世代試験では影響がみられないとの報告がある。

なお、本物質の有害性に関連する情報として^{vi)}、変異原性・遺伝毒性では復帰突然変異試験で陰性の結果が示されているが、*in vivo* 試験の報告はない。ヒト及び実験動物での発がん性については報告がない。

注8) 平成 16 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会 (2004 年 7 月) における承認時の記述内容。

vi) 2003 年 2 月検索時の追加知見: [ヒトリンパ球をフタル酸ジシクロヘキシルで処理した実験で、コンカナバリン A (Con A) に対するリンパ球増殖反応及びインターロイキン 2 (IL-2) 産生の抑制がみられた (Yamazaki et al., 2000)。]

(5) リスク評価等今後必要な対応^{注8)}、^{注9)}

本物質については、性ホルモン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いものと考えられるが、多世代にわたる試験において特に雄性生殖器に毒性がみられており、観察された影響はDEHP、DBP等のフタル酸エステル類で報告されている作用と類似している。2世代生殖毒性試験で、DCHPは100mg/kg/day前後の用量から親動物、仔動物のいずれにおいても、テストステロン生合成系の阻害による、アンドロゲン受容体を介さない抗アンドロゲン作用によると考えられる所見が主に雄性生殖器等に認められ、生殖・発生毒性として次世代への影響が認められた。その他、高用量の親動物に甲状腺ろ胞上皮細胞の肥大がみられることから甲状腺ホルモンに何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。なお、ろ胞上皮細胞肥大の機序としてフタル酸エステルでみられる肝臓における酵素誘導との関連も考えられたが明らかではない。今後は暴露実態を調査してリスク評価を実施していくのが望ましいと考えられる。^{注10)} なお、環境省では平成14年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会において、現時点での有害性評価として既報告で影響が報告されている高用量(500 mg/kg/day)では影響が認められたが、低用量(50 µg/kg/day以下; 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)での明らかな内分泌かく乱作用は認められないとの見解を示している。ただし、現時点では内分泌かく乱作用との関連は明らかではないものの低用量で有意差の有る変化が認められており今後の知見集積の中で注視する必要があるとしている。^{注11)}

^{注9)} 環境省は、「内分泌かく乱作用に関する今後の環境省の対応方針について (ExTEND 2005)」において、これまでの取組みを整理し、フタル酸ジシクロヘキシルについては、ラット改良1世代試験の結果、本物質は、「文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した用量(4用量群)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった」と公表している。

^{注10)} 有害性評価に加えて暴露調査を踏まえ、独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構(以下NEDOと略記)の委託事業で製品評価技術基盤機構(NITE)及び化学物質評価研究機構(CERI)において初期リスク評価実施中。

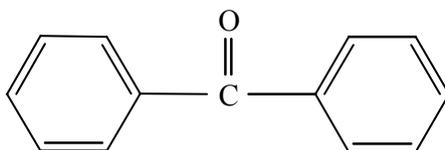
^{注11)} この記述は、平成14年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会の資料6からの引用である。一方、同検討会の資料3では「低用量で有意差のある反応が得られたが、今後の検討課題とする」としている。

2-5. ベンゾフェノン [CAS No. 119-61-9] の有害性評価

本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表された後改訂を行い、平成 16 年度第 2 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2005 年 2 月）において審議、承認され、2005 年 4 月に公表された。以下に示す記述内容は、平成 16 年度第 2 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2005 年 2 月）承認時の内容である。また、2003 年 2 月の文献検索時に得られた一般毒性に関する知見も脚注に追記した。

(1) 化学物質の同定情報

名 称： ベンゾフェノン
別 名： ジフェニルメタン、ジフェニルケトン、ベンゾイルベンゼン、BZP
分 子 式： $C_{13}H_{10}O$
分 子 量： 182.22
構 造 式：



(2) 物理化学的性状

外 観： 白色の結晶¹⁾
融 点： 48.5 °C¹⁾
沸 点： 305.4 °C (1.013×10^3 Pa)¹⁾
比 重： $d_4^{18} = 1.1108$ ¹⁾
蒸 気 圧： 1.33×10^2 Pa (108.2 °C)¹⁾
分 配 係 数： Log Pow = 3.18 (実測値)²⁾
分 解 性： 加水分解性 報告なし
生分解性 難分解 (BOD = 0%, 14 日間)³⁾
溶 解 性： 水 137 mg/L (25 °C) (実測値)²⁾
有機溶媒 アセトン、ベンゼンに可溶¹⁾

(3) 一般情報

製 造 量 等： 平成 13 年度 (非公表)
用 途： 医薬品、殺虫剤の合成原料。保香剤、紫外線吸収剤⁴⁾
適 用 法 令： 該当法令なし

¹⁾ HSDB, 2001; ²⁾ PHYSPROP, 2000; ³⁾ 通商産業公報, 1980; ⁴⁾ US.NTP, 2000.

(4) 現時点での有害性評価^{注12)}

ヒトの内分泌系、生殖器系への影響に関する報告はない。

本物質の内分泌系への影響を調べるための *in vitro* 実験の結果、本物質はエストロゲン受容体結合試験においてヒトエストロゲン受容体に結合しないという報告と弱い結合性を示すとの報告があるが、レポーター遺伝子アッセイではヒトエストロゲン受容体を介する遺伝子の転写活性化は示されず、ヒト乳ガン細胞である MCF-7 細胞の増殖活性を示さないとの報告がある。また、ヒトアンドロゲン受容体に対しても結合しないという報告と弱い結合性を示すという報告があるが、レポーター遺伝子アッセイではヒトアンドロゲン受容体を介する遺伝子の転写活性化もみられていない。一方、代謝により生成する本物質の 4-ヒドロキシ体などの誘導体は、ヒトエストロゲン受容体への結合を示し、エストロゲン受容体を介した転写活性化とヒト乳ガン細胞 MCF-7 細胞の増殖を生ずる。このほか、BZP 自体、*in vitro* でテストステロンからのエストロゲン生成に関与するアロマターゼの活性を拮抗的に阻害する。

BZP の *in vivo* 試験の結果、子宮増殖アッセイにおいてエストロゲン作用及び抗エストロゲン作用を示すとの結果と、エストロゲン作用を示さないとの結果が得られている。また、ハーシューバーガーアッセイではアンドロゲン作用、抗アンドロゲン作用のいずれもみられていない。BZP の代謝産物である 4-ヒドロキシベンゾフェノンの未成熟ラットの子宮増殖アッセイではエストロゲン作用がみられている。

以上の結果から、BZP はエストロゲン作用及び抗エストロゲン作用をもつが、アンドロゲン作用及び抗アンドロゲン作用を有さないことが示唆される。このエストロゲン作用は、BZP 自体による作用ではなく、BZP の代謝産物によっているものと思われる。また、BZP がアロマターゼの活性を阻害することから、生体内でエストロゲン産生量の減少を生じる可能性が考えられるが、子宮増殖アッセイで認められた抗エストロゲン作用との関連は現時点では不明である。

生殖発生毒性試験においては、ラットの 2 世代生殖毒性試験では、親動物に対しては、100 ppm (雄で 6.445~7.785 mg/kg/day、雌で 8.379~8.776 mg/kg/day 相当)以上で肝臓に対する影響、450 ppm (雄で 29.01~34.60 mg/kg/day、雌で 38.15~40.52 mg/kg/day 相当)以上で体重増加抑制、摂餌量の低値、腎臓に対する影響がみられたが内分泌系への影響及び生殖への影響はみられていない。また、仔動物に対しては 2,000 ppm (雄で 130.0~159.4 mg/kg/day、雌で 166.5~179.2 mg/kg/day 相当) で体重増加抑制がみられている。

なお、本物質の有害性に関連する情報として^{vii)}、反復投与毒性試験では、げっ歯類において

注12) 平成 16 年度第 2 回内分泌かく乱作用検討小委員会 (2005 年 2 月) における承認時の記述内容。

vii) 2003 年 2 月検索時の追加知見：[Hartley系雌モルモット (6 匹/群) を用いた皮膚感作性試験 (Adjuvant-Strip法、感作濃度 40%) で、誘発濃度 5%では陰性であったが、10%では 6 匹中 3 匹に陽性反応がみられた (Sugiura et al., 2002)。Hartley系雌モルモット (3 匹/群) の背部皮膚にベンゾフェノン 5、10、20、40%アセトン溶液を塗布後、紫外線を照射し、4 日間観察した光毒性 (光刺激性) 試験で、10%以上の濃度で陽性反応がみられた (Sugiura et al., 2002)。Hartley系雌モルモット (6 匹/群) を用いた皮膚感作性試験 (Adjuvant-Strip法、感作濃度 40%) で、感作後に紫外線照射を行い、5%アセトン溶液で誘発した光感作性試験で、全例で陽性反応がみられた (Sugiura et al., 2002)。ネズミチフス菌 TA98 及び TA100 を用いた復帰突然変異試験で、S9 添加の有無に関わらず陰性であった (Kubo et al., 2002)。

ネズミチフス菌 TA1535/pSK1002 を用いた umu テストで、ベンゾフェノンはヒトシトクローム P450 添加条件下で陽性であった (Takemoto et al., 2002)。

C3H/He マウスから得た脾臓リンパ球 B 細胞のマイトゲン LPS (細胞壁リポ多糖) による幼若化、及び BALB/C マウスから得た脾臓リンパ球 T 細胞のマイトゲン Con A (Concanavalin A) による幼若化をいずれも阻害せず、細胞性免疫、液性免疫のいずれにも影響しないというスクリーニング試験の報告がある (Sakazaki et al., 2001)。]

主に肝臓、腎臓への影響がみられている。変異原性・遺伝毒性では、*in vitro*で陰性、陽性両方の報告があり、*in vivo*では陰性と報告されている。発がん性に関しては、ヒトでの報告はなく、実験動物では皮膚への塗布試験で腫瘍の発生率の増加は認められていない。

(5) リスク評価等今後必要な対応^{注12)}、^{注13)}

本物質については、*in vivo*スクリーニング試験でエストロゲン作用及び抗エストロゲン作用を示す結果が得られた。エストロゲン作用については本物質の代謝物によると考えられるが、抗エストロゲン作用が代謝物によるものであるか否かは不明である。しかし、2世代繁殖毒性試験の結果からは内分泌系への影響、生殖能に対する影響はみられていないことから、現時点で新たな調査に着手する必要性は低いと考えられる。

なお、環境省では平成14年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会において、「げっ歯類を用いた1世代試験」及び「試験管内 (*in vitro*)試験」結果等を取りまとめて、哺乳類を用いた人健康への内分泌かく乱作用に関する試験結果としては既報告で影響が報告されている高用量(20、500 mg/kg/day)においてのみ一般毒性が認められたが、低用量(50 µg/kg/day以下；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)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかったとしている。ただし、現時点では内分泌かく乱作用との関連は明らかではないものの低用量で有意差のある変化が認められており、今後の知見集積の中で注視する必要があるとしている。^{注14)}

^{注13)} 環境省は、「内分泌かく乱作用に関する今後の環境省の対応方針について(ExTEND 2005)」において、これまでの取組みを整理し、ベンゾフェノンについては、ラット改良1世代試験の結果、本物質は、「文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した用量(3用量群)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった」と公表している。

^{注14)} この記述は、平成14年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会の資料6からの引用である。一方、同検討会の資料3では「低用量で有意差のある反応が得られたが、今後の検討課題とする」としている。

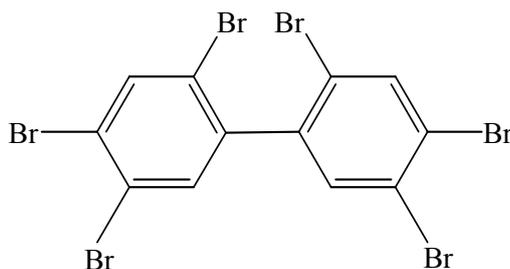
2-6. ポリ臭化ビフェニルの有害性評価

本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表され、前述の平成 16 年度の改訂を行っていないため、以下に示す記述内容は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）承認時の内容である。また、2003 年 2 月の文献検索時に得られた知見も脚注に追記した。

ポリ臭化ビフェニル (PBB)には臭素数が 1-10 のものがあり、各々の臭素数に対して臭素の置換位置により異性体が合計 209 存在する。物理化学性状としては、2,4,5,2',4',5'-ヘキサブロモビフェニル (CAS 番号： 59080-40-9) の内容を記載する。

(1) 化学物質の同定情報

名 称： 2,4,5,2',4',5'-ヘキサブロモビフェニル
別 名： HBB
分 子 式： $C_{12}H_4Br_6$
分 子 量： 627.59
構 造 式：



(2) 物理化学的性状

外 観： 白色の固体¹⁾
融 点： 72 °C¹⁾
沸 点： 報告なし
比 重： 2.6 g/cm³ (25 °C)¹⁾
蒸 気 圧： 0.01 Pa (90 °C)¹⁾
分 配 係 数： Log Pow = 7 以下 (計算値)¹⁾
分 解 性： 加水分解性 報告なし
生分解性 報告なし
溶 解 性： 水 11 µg/L (25°C)¹⁾
有機溶媒 アセトン、ベンゼンに可溶¹⁾

(3) 一般情報

製 造 量 等： PBB の国内の製造・輸入は、現在行われていない。
用 途： PBBは、ABS樹脂、ポリウレタンフォームなどの難燃剤として用いられてきた¹⁾。
適 用 法 令： 労働安全衛生法

¹⁾ HSDB,2001.

(4) 現時点での有害性評価^{注15)}

PBB に関する有害性情報は、臭素数が 6 以上の混合物に関するものが大半であり、代表的なものに、臭素数が 5-8 の PBB の混合物である FM BP-6、FM FF-1 がある。ヒトに関する情報は、米国における家畜用飼料への PBB 混入事故による消費者暴露からもたらされている。

ヒトの内分泌系への影響として、DBB 又は DBB オキシド製造工場の従業員で、雇用期間の長さに関連した卵胞刺激ホルモン (FSH) 濃度の上昇、甲状腺機能の低下及び甲状腺の結節が認められている。一方、PBB 暴露を受けた一般人では、精子の数、運動性及び形態に異常はないと報告されている。また、ヒトの生殖、次世代への影響も研究されたが、PBB 暴露との関連は明らかにされていない。

動物実験では、主にラットに PBB 混合物 (ファイアマスター) を投与した実験で、甲状腺ホルモン (T3,T4) の低下と、TSH の上昇が、一部の実験で甲状腺腫の発生が認められており、ヒトでの影響と符合する。また、雌のサルに FM を長期投与した実験で、総量約 10mg/匹の用量で、月経周期の延長、流産、血清プロゲステロン値の低下等が報告されている。

また、PBB 混合物 (主に FM) はマウス、ラットによる妊娠期暴露実験で、数 mg/kg/day の低用量から、胎仔毒性、新生仔奇形を発現することが知られている。ラットを用いた 3 世代繁殖試験で、PBB 混合物が次世代の成長及び肝機能に影響をもたらす。しかし、影響は世代を重ねるごとに軽減することが報告されている。なお、OBB では、妊娠ラットの実験で母動物に毒性発現する用量まで増量しても、胎仔毒性、奇形を誘発しないと報告されている。

なお、本物質の有害性に関連する情報は以下のとおりである。

PBB 暴露を受けたヒトでは T 細胞及び B 細胞の機能低下、リンパ球比率の変動、高 IgG 血症、連鎖球菌感受性の亢進等の所見が報告されている。また、皮膚への影響 (ハロゲン坐瘡) がみられている。

動物実験では、PBB の急性毒性は、臭素数 6-10 の PBB ではいずれも弱い。反復投与毒性では、マウス及びラットで、FM 投与により、肝臓への影響 (重量増加、肝細胞の肥大、巣状壊死、脂肪沈着等)、血液系への影響 (赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値、並びに血小板数の減少) に加え、胸腺重量の減少がみられている。イヌの実験では、骨髄における造血抑制、脾臓に髄外造血亢進、白脾髄及び種々のリンパ節におけるリンパ球著減がみられた。これらの変化は、げっ歯類、イヌいずれも、数 mg/kg/day の用量から発現することが示されている。なお、OBB、NBB でもラット又はマウスの実験で同様の変化が認められる。しかし、DBB は 13 週間混餌投与で、500ppm の濃度まで毒性変化を生じず、他の PBB に比して明らかに毒性が弱い。

ラットにおける神経行動学的な実験で、1-6 mg/kg/day の用量で、FM を 20 日間経口投与したが、ラットの学習能に影響はみられなかったが、条件提示に対する応答回数に、低用量 (1 mg/kg/day) で増加、高用量 (6 mg/kg/day) で減少傾向がみられたとの報告がある。また、FM の 0.2-2 mg/kg/day の低用量を妊娠ラットに投与した実験で、母動物に毒性兆候がみられないにもかかわらず、F₁ の成長遅延、行動検査で行動抑制が観察されたと報告されている。これらは、ヒトで記憶力、集中力の減退、抑うつ等、また、小児における知能低下、発育不全の懸念が高まったため、検討された動物実験であるが、広範な臨床研究の結果、ヒトの神経系、精神機能に対

注15) 平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会 (2002 年 4 月) における承認時の記述内容。

し、懸念された影響は客観的な検査では、大部分の例で異常がなく、統計学的にPBB暴露との関係は立証できていない。

変異原性・遺伝毒性に関しては、PBB 混合物の FM では、*in vitro* 及び *in vivo* の実験で、陰性の結果がほとんどである。発がん性に関しては、PBB 混合物 (FM) でマウス及びラットに、NBB でマウスに肝臓腫瘍発生率の有意な増加が認められている。国際機関による発がん性評価では、臭素数 6-10 の PBB に対して、IARC が 2B (ヒトに対して発がん性がある可能性がある物質) に、NTP が R (合理的にヒト発がん性があることが予想される物質) にそれぞれ分類している。

実験動物においても、免疫系に対する影響がみられ、末梢血、骨髄、脾臓等リンパ系諸臓器において、リンパ球数の減少、機能低下 (T 及び B 細胞のマイトジェン刺激応答性の低下、抗体産生の低下) を生じ、一部の実験で、細菌由来のエンドトキシン感受性の亢進、リステリア感染に対する死亡率増加 (感受性の亢進)、遅延型過敏反応の抑制等、総じて免疫抑制の所見が認められており、ヒトでの影響を裏付ける。

(5) リスク評価等今後必要な対応

PBBの内分泌系への影響として、受容体結合等メカニズムに関連する知見はない^{viii)}。ヒトでの影響は不明確な部分も多いが、動物実験では、PBBが甲状腺、生殖器官に影響を及ぼし、次世代にも悪影響を及ぼすとの証拠が十分にある。また、肝臓、免疫系への影響の報告も豊富であり、臭素数6以上のPBBに関しては有害性の評価は既に十分になされていると言える。臭素数5のPBBに関しては十分な情報がなく、さらに臭素数4以下のPBBに関しては有害性に関する情報は現状ではほとんどない。

PBB については、製造、輸入、使用の実態がないことから、緊急対応の必要性はないものと考えられる。なお、臭素数 6-9 の PBB は国内では化学物質審査規制法における新規化学物質であり、届出がない限り製造、輸入を行えない。また、臭素数 5 以下及び臭素数 10 の PBB は既存化学物質であるが、現時点では製造、輸入、使用の実態はない。

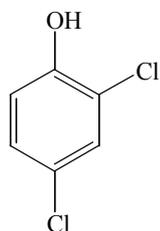
^{viii)} 2003 年 2 月検索時の追加知見：[ポリ臭化ビフェニルは、マウス肝臓がん細胞にアリル炭化水素 (Ah) 受容体のコントロール下にあるルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポーター遺伝子アッセイ (CALUXアッセイ) で、Ah受容体を介したレポーター遺伝子の転写活性化を誘導した (Brown et al., 2001)。]

2-7. 2,4-ジクロロフェノール [CAS No. 120-83-2] の有害性評価

本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表された後改訂を行い、平成 16 年度第 2 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2005 年 2 月）において審議、承認され、2005 年 4 月に公表された。以下に示す記述内容は、平成 16 年度第 2 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2005 年 2 月）承認時の内容である。なお、2003 年 2 月の文献検索時に得られた一般毒性に関する知見を脚注に追記した。

(1) 化学物質の同定情報

名	称：	2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP)	
別	名：	4-ヒドロキシ-1,3-ジクロロベンゼン、2,4-DCP	
分	子	式：	$C_6H_4Cl_2O$
分	子	量：	163.0
構	造	式：	



(2) 物理化学的性状

外	観：	無色、白色あるいは僅かに黄色の結晶 ¹⁾		
融	点：	45°C ¹⁾		
沸	点：	210.0°C ¹⁾		
比	重：	$d_{25}^{60} = 1.383$ ¹⁾		
蒸	気	圧：	16 Pa (25°C) ¹⁾	
分	配	係	数：	Log Pow = 3.06 (計算値) ¹⁾
分	解	性：	加水分解性	報告なし
			生分解性	難分解 (BOD=0%、4 週間) ²⁾
溶	解	性：	水	4.5 g/l (20°C) ¹⁾
			有機溶媒	四塩化炭素、エタノール、ベンゼン、エチルエーテル、アルカリ水溶液に可溶 ¹⁾

(3) 一般情報

製	造	量	等：	平成 13 年度 製造、輸入実態なし ³⁾
用			途：	染料及び除草剤の合成中間体 ¹⁾
適	用	法	令：	水道法、海洋汚染防止法

¹⁾ HSDB, 2001; ²⁾ 通商産業公報, 1982; ³⁾ 経済産業省, 2003a

(4) 現時点での有害性評価^{注16)}

ヒトの内分泌系、生殖系に及ぼす影響に関する報告はない。

本物質の内分泌系への影響を調べるための実験において、本物質はエストロゲン受容体及びアンドロゲン受容体に対する結合性はみられず、レポーター遺伝子アッセイにおいてもエストロゲン受容体及びアンドロゲン受容体を介した遺伝子転写活性を示さないという報告がある。一方、酵母ツーハイブリッドアッセイにおいて E2 の 1/130,000 程度の弱いエストロゲン受容体を介した転写活性を示すとの報告と、ヒト乳がん細胞増殖アッセイで弱い細胞増殖を示すことが報告されている。いずれにせよ、*in vivo* 試験の子宮増殖アッセイ及びハーシュバーガーアッセイが陰性であったことから、性ホルモン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いと考えられる。

また、本物質の生殖系に及ぼす影響に関する試験において、同腹仔数の減少や仔の臓器重量の増加など母動物毒性による胎仔への影響あるいは、胎仔毒性があるとする報告がある。ラットを用いた 2 世代生殖毒性試験の結果、生殖能力及び仔動物への影響は主に雌親動物、雌仔動物にみられている。最高投与量である 8,000 ppm (雄: 543 mg/kg/day、雌: 768 mg/kg/day) で雌親動物に性成熟の早期化、着床数の有意な低下及び出産仔数の有意な低下がみられ、雌雄の仔動物で発育遅延、雌仔動物で子宮重量の有意な増加がみられており、比較的高用量で生殖能力及び仔動物への影響があるものと考えられる。

なお、本物質の有害性に関連する情報として^{ix)}、溶解あるいは高温の 2,4-DCP の皮膚暴露を受けると、ヒトが死亡することがあると警告されている。動物実験では、経口反復投与毒性試験において、特に肝臓への影響、造血系及び免疫系への影響が認められている。変異原性試験では、細菌を用いた復帰突然変異試験系で陰性であるが、他の試験系では陽性の報告も多い。発がん性に関しては、国際機関では評価がされていない。

(5) リスク評価等今後必要な対応^{注16)、注17)}

本物質については、性ホルモン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いものと考えられるが、多世代にわたる繁殖能力及び仔の発達への影響については、比較的高用量 (雄: 543 mg/kg/day、雌: 768 mg/kg/day) で親動物及び仔動物への影響がみられ生殖・発生毒性として次世代への影響が認められた。

現時点では製造・輸入実態が無いため緊急対応の必要はないと考えるが、今後、製造・輸入が生じた場合にはその他の有害性情報調査の必要性について検討する。

なお、環境省では平成 15 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会において、「げっ歯類を用いた 1 世代試験」及び「試験管内 (*in vitro*) 試験」結果等を取りまとめ、哺乳類を用いた人健康への内分泌かく乱作用に関する試験結果としては既報告で影響が報告されている最高

注 16) 平成 16 年度第 2 回内分泌かく乱作用検討小委員会 (2005 年 2 月) における承認時の記述内容。

ix) 2003 年 2 月検索時の追加知見: [2,4-ジクロロフェノールは、C3H/He マウスから得た脾臓リンパ球 B 細胞のマイトゲン LPS (細胞壁リポ多糖) による幼若化の弱い阻害を示し、液性免疫に影響を及ぼすというスクリーニング試験の報告がある (Sakazaki et al., 2001)。]

注 17) 環境省は、「内分泌かく乱作用に関する今後の環境省の対応方針について (ExTEND 2005)」において、これまでの取組みを整理し、2,4-ジクロロフェノールについては、ラット改良 1 世代試験の結果、本物質は、「文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量 (4 用量群) での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった」と公表している。

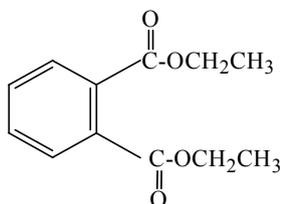
用量 (400 mg/kg/day) においてのみ一般毒性が認められたが、低用量 (文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量) では明らかな内分泌かく乱作用は認められなかったとしている。ただし、現時点では内分泌かく乱作用との関連は明らかではないものの低用量で有意差のある反応が得られたが、今後の検討課題とするとしている。また、健康リスク初期評価を行なう際に、これらの知見を活用するとしている。

2-8. フタル酸ジエチル [CAS No. 84-66-2] の有害性評価

本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表された後改訂を行い、平成 16 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2004 年 7 月）において審議、承認され、2005 年 4 月に公表された。以下に示す記述内容は、平成 16 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2004 年 7 月）承認時の内容である。なお、2003 年 2 月の文献検索時に得られた一般毒性に関する知見を脚注に追記した。

(1) 化学物質の同定情報

名	称：	フタル酸ジエチル
別	名：	ジエチルフタレート、1,2-ベンゼンジカルボン酸ジエチルエステル、DEP
分	子	式： $C_{12}H_{14}O_4$
分	子	量：222.24
構	造	式：



(2) 物理化学的性状

外	観：	無色あるいは白色油状液体 ¹⁾
融	点：	-40.5°C ¹⁾
沸	点：	298°C ¹⁾
比	重：	$d_4^{25} = 1.120$ ¹⁾
蒸	気	圧：0.28 Pa (25°C) ¹⁾
分	配	係数：Log Pow = 2.47 (計算値) ¹⁾
分	解	性：加水分解性：報告なし 生分解性：易分解 (BOD=88%、4 週間) ²⁾
溶	解	性：水 1,000 mg/L (25°C) ¹⁾ 有機溶媒 ケトン、エステル、アルコール、エーテル、ベンゼン、アセトン、 芳香族炭化水素に可溶 ¹⁾

(3) 一般情報

製	造	量	等：	平成 13 年度 100~1,000 t ³⁾
用	途：	酢酸セルロース、メタクリル酸、酢酸ビニル、ポリスチレン樹脂等の 可塑剤、香料の保留剤 ¹⁾		
適	用	法	令：	労働安全衛生法、海洋汚染防止法

¹⁾ HSDB, 2001; ²⁾ 通商産業公報, 2000; ³⁾ 経済産業省, 2003a

(4) 現時点での有害性評価^{注18)}

ヒトの内分泌系、生殖器系への影響に関する報告はない。

本物質の内分泌系に及ぼす影響を調べるための *in vitro* の実験において、エストロゲン受容体及びアンドロゲン受容体に対する結合性はみられず、レポーター遺伝子アッセイでは E2 の 1/2,000,000 程度のエストロゲン受容体を介した弱い遺伝子転写活性を示したとの 1 報告を除きエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体を介した遺伝子転写活性化はみられていない。また、*in vivo* 試験の子宮増殖アッセイ及びハーシュバーガーアッセイでもエストロゲン作用、アンドロゲン作用は検出されておらず、これらの性ホルモン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いものと考えられる。

生殖器系への影響として、本物質は精巣及び副生殖器に影響を及ぼさないとの報告が複数ある。今回追加実施した改良 28 日間反復投与毒性試験においても、1,000mg/kg/day まで用量をあげても精巣及び雄性副生殖器官に影響は認められていない。また甲状腺への影響もみられなかった。

生殖・発生毒性試験においては、マウスを用いた連続交配試験では親動物に明らかな毒性影響 (F0 世代の親動物に体重の低値及び死亡、F1 世代の親動物に体重の低値、雄親動物で前立腺重量の増加、精子濃度の低下、雌親動物で下垂体重量の減少) を及ぼす用量である 3,742 mg/kg/day 相当という極めて高用量においても生殖能力に影響はみられておらず、仔動物に対しても出生時体重や性比に影響はみられていない。ラットの 2 世代生殖毒性試験では、210 mg/kg/day 以上の用量で雄親動物で、血清テストステロン値の減少がみられたが 1,083 から 1,336 mg/kg/day 相当という高用量においても親動物の生殖能力に影響を及ぼすほどの変化ではなかった。仔動物に対しては 210 から 261 mg/kg/day 相当以上で離乳時に雌の副腎及び子宮重量の減少がみられているがその後の成長や生殖能には影響はみられず、1,083 から 1,336 mg/kg/day 相当で哺育期間中の体重増加抑制、離乳時の肝臓重量の増加、胸腺、脾臓、前立腺重量の減少が認められているが重篤な毒性はみられていない。

本物質の有害性に関連する情報として^{x)}、DEP蒸気はヒトの眼、呼吸器粘膜に対して刺激性を示し、感作性を示唆する報告がある。実験動物では急性毒性は弱く、反復投与毒性では経口、経皮により主に肝臓、腎臓に影響がみられている。変異原性試験は復帰突然変異試験、DNA修復試験、染色体異常試験で陰性である。発がん性試験ではマウスに肝細胞腺腫/癌の発生が報告されているが、用量相関はみられていない。ヒトの発がんに関する報告はない。

(5) リスク評価等今後必要な対応^{注18)、注19)}

DEP は性ホルモン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いものと考えられる。また、多世代にわたる生殖能力及び仔の発達への影響も重篤な影響はないものと考えられ、2 世代試験において、内分泌系への影響として、雄で性ホルモンの変動が認められたものの、軽

^{注18)} 平成 16 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会 (2004 年 7 月) における承認時の記述内容。

^{x)} 2003 年 2 月検索時の追加知見: [DEPは、BALB/Cマウスから得た脾臓リンパ球T細胞のマイトゲンCon A (Concanavalin A) による幼若化の弱い阻害を示し、細胞性免疫に影響を及ぼすというスクリーニング試験の報告がある (Sakazaki et al., 2001)。]

^{注19)} 環境省は、「内分泌かく乱作用に関する今後の環境省の対応方針について (ExTEND 2005)」において、これまでの取組みを整理し、フタル酸ジエチルについては、ラット改良 1 世代試験の結果、本物質は、「文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量 (4 用量群) での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった」と公表している。

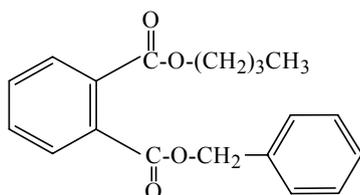
度な変化で生殖性に影響を及ぼすものではない。すなわち、公表論文の調査と経済産業省が独自に行った試験結果を併せて判断した結果、フタル酸ジエチル (DEP)は 1,000 mg/kg/day を上回るような高用量下においてさえ、内分泌系・生殖系へ明確な有害性影響を示さず、生殖能力及び次世代の発生・発達を指標とする内分泌かく乱性は有さないと結論される。なお、環境省では平成 14 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会において、「げっ歯類を用いた 1 世代試験」及び「試験管内 (*in vitro*)試験」結果等を取りまとめて、哺乳類を用いた人健康への内分泌かく乱作用に関する試験結果としては既報告で影響が報告されている最高用量 (2,000 mg/kg/day)においてのみ一般毒性が認められたが、低用量 (50 μ g/kg/day 以下；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)での明らかな内分泌かく乱作用は認められないとの見解を示している。

2-9. フタル酸ブチルベンジル [CAS No. 85-68-7] の有害性評価

本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表された後改訂を行い、平成 16 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2004 年 7 月）において審議、承認され、2005 年 4 月に公表された。以下に示す記述内容は、平成 16 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2004 年 7 月）承認時の内容である。ただし、下線部については 2006 年 2 月現在の状況について説明を加えた。

(1) 化学物質の同定情報

名	称：フタル酸ブチルベンジル
別	名：ブチルベンジルフタレート、フタル酸ブチルベンジルエステル、 1,2-ベンゼンジカルボン酸ブチルベンジルエステル、BBP
分	子 式： $C_{19}H_{20}O_4$
分	子 量：312.4
構	造 式：



(2) 物理化学的性状

外	観：透明の油状液体 ¹⁾
融	点： -35°C ¹⁾
沸	点： 370°C ¹⁾
比	重： $d_{25}^{25} = 1.113 - 1.121$ ¹⁾
蒸	気 圧： $1.15 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ (20°C) ¹⁾
分	配 係 数： $\text{Log Pow} = 4.91$ (実測値) ¹⁾
分	解 性：加水分解性：報告なし 生分解性：易分解 (BOD=81%, 14 日間) ²⁾
溶	解 性：水 0.71 mg/L ¹⁾ 有機溶媒 報告なし

(3) 一般情報

製	造 量 等：平成 13 年度 100~1,000 t ³⁾
用	途：塩化ビニル及びニトロセルロース樹脂の可塑剤 耐油性、耐磨耗性に優れるため、電線被覆として使用 ¹⁾
適	用 法 令：化学物質排出把握管理促進法、海洋汚染防止法

¹⁾HSDB, 2001; ²⁾通商産業公報, 1975; ³⁾経済産業省, 2003a

(4) 現時点での有害性評価^{注20)}

ヒトの内分泌系、生殖器系への影響に関して、本物質暴露との関連が明確にされている報告はない。

本物質の内分泌系への影響を調べるための*in vitro*実験において、本物質はエストロゲン受容体に対して弱い結合性(E2の1/28,000-1/80,000)及びエストロゲン受容体を介する弱い遺伝子転写活性、ヒト乳ガン細胞に対して細胞増殖応答を示すなどエストロゲン作用を示すものの、*in vivo*試験の子宮増殖アッセイでエストロゲン作用は検出されていない。一方、*in vitro*実験において、本物質はアンドロゲン受容体に対して弱い結合性(ジヒドロテストステロンの1/6,000程度)を示すもののレポーター遺伝子アッセイではアンドロゲン受容体を介する遺伝子の転写活性化はみられていない。しかしながら、*in vivo*試験のハーシュバーガーアッセイの抗アンドロゲン作用検出系で、副生殖器官の重量の減少(用量相関性が不明瞭)がみられ、また妊娠雌ラットに高用量(750mg/kg/day)を経口投与した試験で、F₁雄の生殖器系に対する影響がみられることから、BBPは抗アンドロゲン作用を有する可能性が示唆される。

この他、本物質の生殖器系への主な影響として、反復投与毒性試験では、1,000 mg/kg/day相当以上の高用量で雄ラットの精巣及び副生殖器重量の減少と変性がみられている。生殖・発生毒性試験では、100 mg/kg/day以上で仔動物の体重減少、375 mg/kg/day相当以上で仔動物の生存仔数の減少がみられたとの報告があるが、受胎率の低下、吸収胚の増加、生存仔数及び仔生存率の減少や胎仔の外表、骨格及び内臓奇形等がみられたとの報告の多くは、概ね高用量(654~1,640 mg/kg/day)でみられている。また、1世代生殖毒性試験の結果、2,200 mg/kg/day相当の高用量で雄親動物の生殖器系への影響に関連したと考えられる不妊率の増加がみられている。

また、2世代生殖毒性試験の結果、雄親動物、雄仔動物に主に影響がみられ、雄親動物では100 から 750 mg/kg/dayの用量で精巣の萎縮や精子数の減少がみられ、生殖能力に対する影響は500 mg/kg/dayで影響がみられないとの報告があるが、400 mg/kg/dayや750 mg/kg/day相当で不妊率の増加がみられるとの報告があり、概ね高用量(400~750 mg/kg/day)で生殖能力に対する影響があるものと考えられる。また、仔動物に対する影響は100 mg/kg/dayの用量から出生仔体重の低値がみられるものと考えられ、100 から 500 mg/kg/dayの用量で雄仔動物にAGDの減少、750 mg/kg/dayで尿道下裂がみられている。

なお、本物質の有害性に関連する情報として、ヒトにおいて皮膚刺激性を有するという報告、皮膚刺激性及び感作性を有さないという報告がある。動物実験では反復投与では経口、経皮の経路により主に肝臓、膵臓、腎臓に影響がみられている。遺伝毒性は*in vitro*試験では、全て陰性である。また、*in vivo*試験においても、染色体異常試験では弱い陽性を示す結果もみられるが、明らかな変化とは言いがたく総じて陰性と判断される。

発がん性試験では、ラットの雄で膵臓腺房細胞の腺腫あるいはがん腫の発生率の増加、雌で膀胱移行上皮細胞乳頭腫あるいはがん腫の増加がみられており、ラットに対しては何らかの要因が関与した催腫瘍性が示唆された。なお、フタル酸 n-ブチルベンジルでは、他のフタル酸エステル(フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル)と異なり肝臓腫瘍の発生は認められていない。

^{注20)} 平成16年度第1回内分泌かく乱作用検討小委員会(2004年7月)における承認時の記述内容。

(5) リスク評価等今後必要な対応^{注20)}、^{注21)}

本物質については、BBPは*in vitro* でアンドロゲン受容体と弱い結合性を示し（遺伝子転写活性化試験では陰性）、*in vivo* のハーシュバーガー試験、妊娠期暴露試験で抗アンドロゲン作用を有する可能性が示唆された。生殖発生毒性試験は、従来^{注20)}の報告に加えて、経済産業省が独自に行った2世代試験においても、雄の親動物及び仔動物の雄性生殖器を中心に影響が観察されており、一部は抗アンドロゲン作用によると考えられる変化が認められた。すなわち、BBPは抗アンドロゲン作用を有し、主に雄動物に対してそれによると考えられる有害性影響を発現する（ほぼ100mg/kg/day以上で影響が発現し、400～750mg/kg/day以上では生殖能力に悪影響あるいは奇形の誘発を及ぼす可能性がある）と考えられる。従って、BBPは高用量暴露では、抗アンドロゲン作用によると考えられる雄性生殖器への影響が認められ、生殖・発生毒性として次世代への影響が認められた。今後は暴露実態を調査して、リスク評価を実施することが望ましい。^{注22)} なお、環境省では平成14年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会において、「げっ歯類を用いた1世代試験」及び「試験管内 (*in vitro*)試験」結果等を取りまとめて、哺乳類を用いた人健康への内分泌かく乱作用に関する試験結果としては既報告で影響が報告されている最高用量 (500 mg/kg/day) においてのみ一般毒性が認められたが、低用量 (300 μg/kg/day以下；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^{注23)}低用量)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかったとしている。ただし、現時点では内分泌かく乱作用との関連は明らかではないものの低用量で有意差の有る変化が認められており今後の知見集積の中で注視する必要があるとしている。^{注23)}

^{注21)} 環境省は、「内分泌かく乱作用に関する今後の環境省の対応方針について (ExTEND 2005)」において、これまでの取組みを整理し、フタル酸ブチルベンジルについては、ラット改良1世代試験の結果、本物質は、「文献情報等により得られたヒト推定曝露量を考慮した用量 (4用量群)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった」と公表している。

^{注22)} 有害性評価に加えてPRTRデータに基づく暴露調査を踏まえ、NEDOの委託事業で製品評価技術基盤機構 (NITE) 及び化学物質評価研究機構 (CERI) において初期リスク評価 (平成17年度) 実施中。

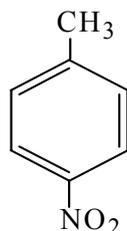
^{注23)} この記述は、平成14年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会の資料6からの引用である。一方、同検討会の資料3では「低用量で有意差のある反応が得られたが、今後の検討課題とする」としている。

2-10. 4-ニトロトルエン [CAS No. 99-99-0] の有害性評価

本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表された後改訂を行い、平成 16 年度第 2 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2005 年 2 月）において審議、承認され、2005 年 4 月に公表された。以下に示す記述内容は、平成 16 年度第 2 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2005 年 2 月）承認時の内容である。また、2003 年 2 月の文献検索時に得られた一般毒性に関する知見を脚注に追記した。

(1) 化学物質の同定情報

名	称：	4-ニトロトルエン	
別	名：	<i>p</i> -ニトロトルエン、 <i>p</i> -メチルニトロベンゼン、 1-メチル-4-ニトロベンゼン、4-NT	
分	子	式：	C ₇ H ₇ O ₂ N
分	子	量：	137.14
構	造	式：	



(2) 物理化学的性状

外	観：	無色あるいは黄色の結晶 ¹⁾		
融	点：	53-54°C ¹⁾		
沸	点：	238.3°C (1.013×10 ⁵ Pa) ¹⁾		
比	重：	$d_4^{75} = 1.1038$ ¹⁾		
蒸	気	圧：	13.3 Pa (20°C) ¹⁾	
分	配	係	数：	Log Pow = 2.37 (実測値) ¹⁾
分	解	性：	加水分解性：報告なし 生分解性：難分解 (BOD=0.8%, 14 日間) ²⁾	
溶	解	性：	水	442 mg/L (30°C) ¹⁾
		有機溶媒	アルコール、エーテル、ベンゼン、クロロホルム、アセトン等に可溶 ¹⁾	

(3) 一般情報

製	造	量	等：	平成 13 年度 (非公表)
用	途：	染料、顔料、医薬、農薬の基幹原料である <i>p</i> -トルイジン、スチルベン、ジニトロトルエン、 <i>p</i> -ニトロベンズアルデヒド、 <i>p</i> -ニトロ安息香酸等の合成中間体 ¹⁾ 。		
適	用	法	令：	労働安全衛生法、海洋汚染防止法

¹⁾ HSDB, 2001; ²⁾ 通商産業公報, 1976

(4) 現時点での有害性評価^{注24)}

ヒトの内分泌系、生殖器系への影響に関する報告はない。

本物質の内分泌系への影響を調べるための *in vitro* 実験において、エストロゲン受容体及びアンドロゲン受容体に対する結合性はみられず、酵母ツーハイブリッドアッセイでもエストロゲン様活性は認められていない。レポーター遺伝子アッセイにおいても、エストロゲン受容体やアンドロゲン受容体を介した遺伝子転写活性はみられていない。また、*in vivo* 試験の子宮増殖アッセイ及びハーシュバーガーアッセイにおいても、エストロゲン作用、アンドロゲン作用は認められていない。従って、本物質がこれらの性ホルモン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いものと考えられる。

一方、生殖器系への影響として、マウスでは影響はみられていないが、ラットに 723 mg/kg の高用量で 13 週間混餌投与した試験において、雄では精巣の精細管の変性を含む組織変化、精子数の減少、精子運動性の低下が、雌では子宮重量の増加、性周期の延長及び消失が、ラットを用いた 1 世代生殖毒性試験では、400 mg/kg/day の高用量で F₀ の雄で精巣への影響が報告されている。生殖・発生毒性に関しては、ラットを用いた 1 世代生殖毒性試験で生殖能力及び胎仔に対する影響はみられていない。また、2 世代生殖毒性試験においては、親動物では最低用量である 40 mg/kg/day 以上で肝臓及び腎臓重量増加、160 mg/kg/day で死亡、仔動物では 80 mg/kg/day 以上で体重増加抑制、160 mg/kg/day で生存率の低下といった一般毒性としての影響はみられたが、160 mg/kg/day の用量においても生殖能力や内分泌系に対する影響はみられていない。

なお、本物質の有害性に関連する情報として^{xi)}、ヒトでは、急性影響としてメトヘモグロビン血症がみられている。実験動物においても、内分泌系への影響が発現する用量又はそれ以下の用量で、メトヘモグロビン血症が発生し、さらに肝臓、腎臓、脾臓への影響が認められている。変異原性・遺伝毒性では *in vitro* 試験のいくつかで陽性の結果が示されているが、*in vivo* の試験では陽性の報告はない。ヒトでの発がん性については報告がなく、実験動物では NTP テクニカルレポートで、雌ラットで発がん性の証拠が示されたが、雄ラット及び雌雄マウスでは発がん性の確実な証拠はないと報告されている。

(5) リスク評価等今後必要な対応^{注24)}、^{注25)}

本物質については、性ホルモン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いと考えられる。また、多世代にわたる生殖能力及び仔の発達に影響を及ぼす可能性も低いことから、現時点で、新たな調査に着手する必要性は低いと考えられる。

なお、環境省では平成 15 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会において、「げっ歯類を用いた 1 世代試験」及び「試験管内 (*in vitro*) 試験」結果等を取りまとめ、哺乳類を用いた人健康への内分泌かく乱作用に関する試験結果としては既報告で影響が報告されている最高

^{注24)} 平成 16 年度第 2 回内分泌かく乱作用検討小委員会 (2005 年 2 月) における承認時の記述内容。

^{xi)} 2003 年 2 月検索時の追加知見：[4-ニトロトルエンは、C3H/He マウスから得た脾臓リンパ球 B 細胞のマイトゲン LPS (細胞壁リポ多糖) による幼若化を阻害し、また BALB/C マウスから得た脾臓リンパ球 T 細胞のマイトゲン Con A (Concanavalin A) による幼若化の弱い阻害がみられたことから、液性免疫、細胞性免疫のいずれにも影響を及ぼすというスクリーニング試験の報告がある (Sakazaki et al., 2001)。]

^{注25)} 環境省は、「内分泌かく乱作用に関する今後の環境省の対応方針について (ExTEND 2005)」において、これまでの取組みを整理し、4-ニトロトルエンについては、ラット改良 1 世代試験の結果、本物質は、「文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量 (4 用量群) での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった」と公表している。

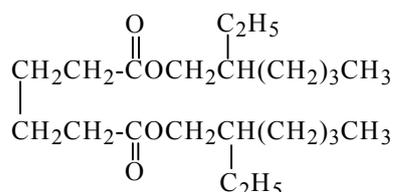
用量 (100 mg/kg/day) においてのみ一般毒性が認められたが、低用量 (文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量) では明らかな内分泌かく乱作用は認められなかったとしている。ただし、現時点では内分泌かく乱作用との関連は明らかではないものの低用量で有意差のある反応が得られたが、今後の検討課題とするとしている。また、健康リスク初期評価を行なう際に、これらの知見を活用するとしている。

2-11. アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル) [CAS No. 103-23-1] の有害性評価

本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表された後改訂を行い、平成 16 年度第 2 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2005 年 2 月）において審議、承認され、2005 年 4 月に公表された。以下に示す記述内容は、平成 16 年度第 2 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2005 年 2 月）承認時の内容である。なお、2003 年 2 月の文献検索時に得られた一般毒性に関する知見を脚注に追記した。

(1) 化学物質の同定情報

名 称： アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)
別 名： アジピン酸ビス(2-エチルヘキシル)、ビス(2-エチルヘキシル)アジパート、
DEHA
分 子 式： $C_{22}H_{42}O_4$
分 子 量： 370.57
構 造 式：



(2) 物理化学的性状

外 観： 無色又は非常に薄い琥珀色の液体¹⁾
融 点： -67.8°C ¹⁾
沸 点： 214°C (666 Pa)¹⁾
比 重： $d_4^{25} = 0.922$ ¹⁾
蒸 気 圧： 1.0×10^{-4} Pa (20°C)¹⁾
分 配 係 数： $\text{Log Pow} = 6.11$ (計算値)²⁾
分 解 性： 報告なし
生分解性： 易分解 (BOD=67-74%, 28 日間)³⁾
溶 解 性： 水： 0.78 mg/L (22°C)¹⁾
有機溶媒：多くの溶媒に易溶、ただしグリセリン、グリコールには難溶¹⁾

(3) 一般情報

製 造 量 等： 平成 13 年度 1,000~10,000 t⁴⁾
用 途： 塩化ビニル樹脂の可塑剤（レザー、フィルム、シート、ホース、靴、工業用手袋）、合成ゴム用の軟化剤（ホース、シール剤）、合成潤滑剤（基油、添加剤）として用いられている⁵⁾。
適 用 法 令： 化学物質排出把握管理促進法、海洋汚染防止法

¹⁾HSDB, 2001; ²⁾PHYSPROP, 2000; ³⁾通商産業公報, 1990; ⁴⁾ 経済産業省, 2003a ; ⁵⁾ 日本化学工業協会, 2001

(4) 現時点での有害性評価^{注26)}

ヒトの内分泌系、生殖器系への影響に関する報告はない。

本物質の内分泌系への影響を調べるための *in vitro* 実験において、エストロゲン受容体及びアンドロゲン受容体に対する結合性はみられず、酵母ツーハイブリッドアッセイにおいてもエストロゲン様活性はみられていない。さらに、レポーター遺伝子アッセイにおいても、エストロゲン受容体やアンドロゲン受容体を介した遺伝子転写活性はみられていない。内分泌系への影響を調べる *in vivo* スクリーニング試験の子宮増殖アッセイ及びハーシュバーガーアッセイにおいても、エストロゲン作用、アンドロゲン作用はみられていない。さらに、本物質の内分泌かく乱作用を含む毒性影響を検討するために、雌雄のラットを用いた改良 28 日間反復経口投与試験が行なわれ、1,000 mg/kg/day 群の雌で性周期の異常、卵巣の矮小化、閉鎖卵胞の増加が認められたが、血清ホルモンに変化は認められず、甲状腺に対する影響もみられていない。従って、本物質はこれらのホルモン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いと考えられる。

本物質の生殖器系への影響に関しては、生殖・発生毒性に関する実験がいくつかなされており、妊娠ラットに DEHA を腹腔内投与した場合、920 mg/kg/day では影響がみられなかったが、4,600 mg/kg/day では胎仔体重の減少等が報告されている。また、雄のマウスに DEHA を単回腹腔内投与した後に雌と交配させた試験では、9,200 mg/kg/day で妊娠率の低下がみられている。一方、妊娠ラットに DEHA を混餌投与した実験において、1,080 mg/kg/day では母動物に体重減少、胎仔に尿管奇形、骨格異常等がみられており、170 mg/kg/day でも胎仔の尿管奇形がみられている。

なお、本物質の有害性に関連する情報として^{xii)}、動物実験では、げっ歯類の反復投与毒性試験で、肝ペルオキシソームの増生、血中脂質の低下がみられている。変異原性・遺伝毒性では、*in vitro* 試験は全て陰性であるが、*in vivo* 試験は陰性、陽性双方の結果報告がある。複製DNA合成試験ではマウスで肝細胞増殖の亢進が認められているが、ラットでは認められていない。発がん性試験ではマウスにおいてのみ肝細胞腫瘍の発生率の増加が認められている。しかし、げっ歯類でみられるペルオキシソームの増生が霊長類ではみられないこと、関連するヒトの疫学データが無いことから、IARCはDEHAをグループ 3 (ヒトに対する発がん性については分類できない物質) に分類している。

(5) リスク評価等今後必要な対応^{注26)、注27)、注28)}

^{注26)} 平成 16 年度第 2 回内分泌かく乱作用検討小委員会 (2005 年 2 月) における承認時の記述内容。

^{xii)} 2003 年 2 月検索時の追加知見：[アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)は、C3H/Heマウスから得た脾臓リンパ球B細胞のマイトゲンLPS (細胞壁リポ多糖) による幼若化の阻害はみられなかったが、BALB/Cマウスから得た脾臓リンパ球T細胞のマイトゲンCon A (Concanavalin A) による幼若化の弱い阻害がみられたことから、細胞性免疫に影響を及ぼすというスクリーニング試験の報告がある (Sakazaki et al., 2001)。]

^{注27)} 環境省は、「内分泌かく乱作用に関する今後の環境省の対応方針について (ExTEND 2005)」において、これまでの取組みを整理し、アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)については、ラット改良 1 世代試験の結果、本物質は、「文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量 (4 用量群) での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった」と公表している。

^{注27)} 環境省は、「内分泌かく乱作用に関する今後の環境省の対応方針について (ExTEND 2005)」において、これまでの取組みを整理し、アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)については、ラット改良 1 世代試験の結果、本物質は、「文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量 (4 用量群) での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった」と公表している。

本物質については、内分泌かく乱作用を有する可能性は低いと考えられる。本物質の初期リスク評価は現在進められており、現時点で、新たな調査に着手する必要性は低いと考えられる。

なお、環境省では平成 14 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会において、「げっ歯類を用いた 1 世代試験」及び「試験管内 (*in vitro*) 試験」結果等を取りまとめて、哺乳類を用いた人健康への内分泌かく乱作用に関する試験結果としては既報告で影響が報告されている最高用量 (600 mg/kg/day) においてのみ一般毒性が認められたが、低用量 (15,000 μ g/kg/day 以下; 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) での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかったとしている。

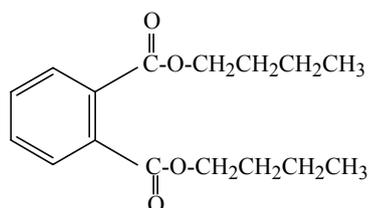
注²⁸⁾ 有害性評価に加えてPRTRデータに基づく暴露調査を踏まえ、NEDOの委託事業で製品評価技術基盤機構 (NITE) 及び化学物質評価研究機構 (CERI) において初期リスク評価実施中。

2-12. フタル酸ジ-n-ブチル [CAS No. 84-74-2] の有害性評価

本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表され、前述の平成 16 年度の改訂を行っていないため、以下に示す記述内容は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）承認時の内容である。ただし、製造・輸入量については経済産業省による平成 13 年度実態調査での値に更新し、さらに下線部については 2006 年 2 月現在の状況について説明を加えた。

(1) 化学物質の同定情報

名 称： フタル酸ジ-n-ブチル
別 名： n-ブチルフタレート、1,2-ベンゼンジカルボン酸ジブチルエステル、ベンゼン-1,2-ジカルボン酸ジブチル、DBP
分 子 式： $C_{16}H_{22}O_4$
分 子 量： 278.34
構 造 式：



(2) 物理化学的性状

外 観： 無色または非常に薄い黄色の粘性液体 ¹⁾
融 点： -35°C ¹⁾
沸 点： 340°C ¹⁾
比 重： $d^{20}=1.0465$ ¹⁾
蒸 気 圧： $2.68 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ (25°C) ¹⁾
分 配 係 数： $\text{Log Pow} = 4.9$ (計算値) ¹⁾
分 解 性： 加水分解性：報告なし
生分解性：易分解 (BOD=69%, 14 日間) ²⁾
溶 解 性： 水： 11.2 mg/L (20°C) ¹⁾、 13 mg/L (25°C) ¹⁾
有機溶媒：アルコール、エーテル、ベンゼン、アセトン等に易溶¹⁾

(3) 一般情報

製 造 量 等： 平成 13 年度 1,000~10,000 t³⁾
用 途： 塩化ビニル、酢酸ビニル、ニトロセルロース、メタクリル酸等の樹脂の可塑剤として用いられている¹⁾。
適 用 法 令： 化学物質排出把握管理促進法、労働安全衛生法、海洋汚染防止法

¹⁾ HSDB, 2001; ²⁾ 通商産業公報, 1975; ³⁾ 経済産業省, 2003a

(4) 現時点での有害性評価^{注28)}

ヒトの内分泌系、生殖器系への影響に関して、本物質暴露との関連が明確にされている報告はない。

本物質の内分泌系への影響を調べるための*in vitro*実験において、エストロゲン受容体との結合性及び遺伝子転写活性化はみられないとする報告と天然エストロゲンと比較して、弱い結合性(E2 の 1/28,000–1/36,000)を有するとしている報告がある。*in vivo*試験では、高用量 (2,000 mg/kg/day) を投与しても子宮増殖アッセイで影響は認められていない。これらの結果からDBPがエストロゲン作用を有する可能性は低いものと考えられる。ハーシュバーガー試験では、DBPは抗アンドロゲン作用を示す成績もあるものの、明らかな再現性が得られていない。しかし、雄性ラットを用いた思春期甲状腺アッセイでは包皮分離の遅延がみられ、妊娠期及び授乳期投与試験ではF₁雄に乳頭遺残、AGDの短縮がみられており、これらの影響は抗アンドロゲン作用による可能性が考えられている。また、本物質の生殖系への影響に関して、反復投与毒性試験では、250 mg/kg/day相当以上で精巣毒性がみられる。生殖・発生毒性試験では概ね 100 mg/kg/day相当以上で影響がみられ、250 mg/kg/day相当以上で雄出生仔の精巣及び副生殖器官への影響、吸収胚の増加、産仔数減少、種々の奇形の誘発がみられたという報告が多数あることから、DBP投与は主に雄に生殖機能異常を誘発するといえる。

NTPのCERHR (Center for Evaluation of Risks to Human Reproduction) のエキスパート・パネルの評価文書によると、妊娠ラットにDBPを経口投与した場合に、F₁雄にみられる種々の奇形はアンドロゲン受容体を介する作用ではなく、テストステロン生合成系の阻害によるものと報告されている。

この他、本物質の内分泌系への影響として、反復経口 (混餌) 投与毒性試験で甲状腺ホルモン(T3)の減少が報告されているが、高用量 (雄 688 mg/kg/day、雌 816 mg/kg/day) でみられた変化である。当該試験において、本物質投与に関連すると考えられる主たる影響は肝臓への影響 (肝ペルオキシソームの増生、肝細胞脂質の減少) 及び貧血であり、甲状腺には組織学的変化が認められていない。また、神経系への影響に関しても、広範な機能検査及び組織学的検査で検出されていない。すなわち、甲状腺ホルモンの減少との関連性を疑うべき特異的な毒性兆候は明らかではない。

なお、本物質の有害性に関連する情報として、ヒトにおいて、DBPの10gの誤飲による腎炎発症例の報告がある。また、DBPを含む製品の使用で感作性が認められている。

実験動物では、反復投与毒性で主に肝臓、腎臓に影響がみられている。変異原性試験では、一部で陽性の報告があるが多くは陰性の結果が得られている。ラットを用いた発がん試験では陰性と報告されている。ヒトの発がん性に関する報告はない。

^{注28)} 平成14年度第1回内分泌かく乱作用検討小委員会(2002年4月)における承認時の記述内容。

(5) リスク評価等今後必要な対応^{注28)}、^{注29)}

DBP がエストロゲン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いと考えられるが、概ね 100 mg/kg/day以上の用量を経口投与した試験で生殖・発生毒性が認められる。特に雄性生殖器系への影響に関しては、抗アンドロゲン作用による可能性が残されており、また CERHRがアンドロゲン受容体を介さない抗アンドロゲン作用（テストステロン生合成系の阻害）によるものと示唆している。現在アンドロゲン受容体との結合性を明らかにするための *in vitro*試験及びハーシュバーガーアッセイを行っており、DBPの抗アンドロゲン作用の有無やアンドロゲン受容体への関与について検証する必要があると考えられる。^{注30)}

一方、DBPは、内分泌かく乱作用の有無に関わらず、従来の知見で生殖・発生毒性による影響がみられることから、有害性評価や暴露評価を踏まえてリスク評価を実施し、適切なリスク管理のあり方について検討すべきと考える。^{注31)}

^{注29)} 環境省は、「内分泌かく乱作用に関する今後の環境省の対応方針について（ExTEND 2005）」において、これまでの取組みを整理し、フタル酸ジ-n-ブチルについては、ラット改良1世代試験の結果、本物質は、「文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量（5用量群）での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった」と公表している。

^{注30)} アンドロゲン受容体への結合性を調べる*in vitro*試験（受容体結合試験及びレポーター遺伝子アッセイ）は陰性であった（経済産業省, 2003b）。また、ハーシュバーガー試験結果も陰性であり、アンドロゲン受容体を直接介する作用は認められなかった（経済産業省, 2002）。

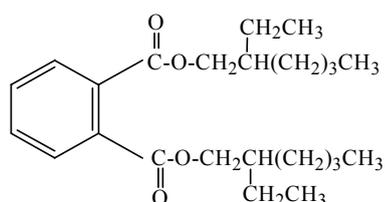
^{注31)} 有害性評価に加えてPRTRデータに基づく暴露調査を踏まえ、NEDOの委託事業で製品評価技術基盤機構（NITE）及び化学物質評価研究機構（CERI）において初期リスク評価実施済。

2-13. フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) [CAS No. 117-81-7] の有害性評価

本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表され、前述の平成 16 年度の改訂を行っていないため、以下に示す記述内容は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）承認時の内容である。ただし、製造・輸入量については経済産業省による平成 13 年度実態調査での値に更新し、下線部については 2006 年 2 月現在の状況について説明を加えた。

(1) 化学物質の同定情報

名 称： フタル酸ジ-(2-エチルヘキシル)
別 名： フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)、フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)
エステル、DEHP
分 子 式： $C_{24}H_{38}O_4$
分 子 量： 390.56
構 造 式：



(2) 物理化学的性状

外 観： 無色の油状液体¹⁾
融 点： -55°C ¹⁾
沸 点： 230°C (666 Pa)¹⁾
比 重： $d_{20}^{20} = 0.9861$ ¹⁾
蒸 気 圧： $9.64 \times 10^{-6} \text{ Pa}$ (25°C)¹⁾
分 配 係 数： $\text{Log Pow} = 7.60$ (実測値)¹⁾
分 解 性： 加水分解性：報告なし
生分解性：良分解 (BOD=29%, 14 日間 BOD=69%, 28 日間)²⁾
溶 解 性： 水 0.285 mg/L (24°C)¹⁾
有機溶媒 鉱物油、ヘキサンに可溶、四塩化炭素に僅かに溶解¹⁾

(3) 一般情報

製 造 量 等： 平成 13 年度 100,000~1,000,000 t³⁾
用 途： 塩化ビニル、ニトロセルロース、メタクリル酸等の樹脂、塩化ゴム等の樹脂を軟化させるのに最も広く使用されている可塑剤。塗料、顔料、接着剤、潤滑油の添加剤¹⁾。
適 用 法 令： 化学物質排出把握管理促進法、労働安全衛生法、海洋汚染防止法

¹⁾HSDB, 2001, ²⁾通商産業公報, 1975; ³⁾経済産業省, 2003a

(4) 現時点での有害性評価^{注 32)}

ヒトの内分泌系、生殖器系への影響に関して、本物質暴露との関連が明確にされている報告はない。

本物質の内分泌系への影響を調べるための *in vitro* 実験において、エストロゲン受容体に対する結合性及び受容体結合を介して起こる応答性は、ほとんどの試験において弱いか陰性であるという結果が示されている。すなわち、エストロゲン受容体を介する内分泌かく乱作用についての可能性は低いものと考えられる。

一方、動物実験における内分泌系及び生殖系に対する主たる影響としては、反復投与毒性試験では、375 mg/kg/day 相当以上の用量での精巣重量の減少と精巣の萎縮が挙げられる。また、生殖・発生毒性試験では、胎仔の生存率の減少や成長の低下、外表及び内臓奇形の誘発などがみられている。なお、胎仔毒性が発現する母動物への投与量は 91 mg/kg/day 相当以上の用量である。

NTPのCERHR (Center for Evaluation of Risks to Human Reproduction)のエキスパート・パネルの評価文書によると、妊娠ラットにDEHPを経口投与した場合、F₁雄に肛門-生殖突起間距離 (AGD) の短縮、乳頭遺残、尿道下裂等の種々の奇形や異常が認められること、また、尿道下裂等の奇形の誘発機序に関して、テストステロン生合成系の阻害によるもので、アンドロゲン受容体を介さない抗アンドロゲン作用によるものであると報告されている。

なお、本物質の有害性に関連する情報として、ヒトに関しては大量経口摂取による消化器症状が報告されている。動物実験では、反復投与によりげっ歯類ではペルオキシソームの増生など肝臓への影響がみられている。変異原性試験では、一部に陽性の報告はあるものの、全体としては陰性と考えられる。発がん性試験では、マウス、ラットともに肝細胞腺腫/癌の発生が報告されている。しかし、げっ歯類でみられるペルオキシソームの増生が霊長類ではみられないこと、また、ヒトの肝臓から単離した培養肝細胞を用いた数多くの *in vitro* 実験で、ペルオキシソーム増生に関連する反応がみられないことから、IARCは2000年2月にDEHPをグループ2B (ヒトに対して発がん性がある可能性がある物質)からグループ3 (ヒトに対する発がん性については分類できない物質)に変更している。

^{注 32)} 平成14年度第1回内分泌かく乱作用検討小委員会 (2002年4月)における承認時の記述内容。

(5) リスク評価等今後必要な対応^{注32)}、^{注33)}

DEHPがエストロゲン受容体を介する内分泌かく乱作用を有する可能性は低いと考えられるが、概ね 91 mg/kg/day以上の用量を経口投与した試験で生殖・発生毒性が認められる。生殖・発生毒性、特に雄性生殖器系への影響に関しては、CERHRがアンドロゲン受容体を介さない抗アンドロゲン作用によるものと示唆している。現在行っているアンドロゲン受容体との結合性を明らかにするための *in vitro*試験及びハーシュバーガーアッセイの結果により、DEHPの抗アンドロゲン作用の有無やアンドロゲン受容体への関与について検証する必要があると考えられる。^{注34)}

一方、DEHPは、内分泌かく乱作用の有無に関わらず、従来の知見で生殖・発生毒性による影響がみられることから、有害性評価や暴露評価を踏まえてリスク評価を実施し、適切なリスク管理のあり方について検討すべきと考える。^{注35)}

^{注33)} 環境省は、「内分泌かく乱作用に関する今後の環境省の対応方針について (ExTEND 2005)」において、これまでの取組みを整理し、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)については、ラット改良1世代試験の結果、本物質は、「文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった」と公表している。

^{注34)} アンドロゲン受容体への結合性を調べる*in vitro*試験(受容体結合試験及びレポーター遺伝子アッセイ)は陰性であった(経済産業省, 2003b)が、ハーシュバーガー試験では抗アンドロゲン作用が認められており、本物質がアンドロゲン受容体を介さない抗アンドロゲン作用を有する可能性が示唆された(経済産業省, 2002)。

^{注35)} 有害性評価に加えてPRTRデータに基づく暴露調査を踏まえ、NEDOの委託事業で製品評価技術基盤機構(NITE)及び化学物質評価研究機構(CERI)において初期リスク評価実施済。さらに、製品評価技術基盤機構(NITE)にフタル酸エステル類リスク評価管理研究会が設置され、本物質のリスク管理のあり方について検討され、2005年1月にNITEよりフタル酸ビス(2-エチルヘキシル)のリスク管理の現状と今後のあり方が公表されている。また、産業技術総合研究所により作成された詳細リスク評価書が2005年1月に丸善より出版されている。

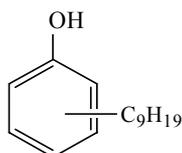
2-14. ノニルフェノール [CAS No. 25154-52-3] の有害性評価

本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表され、前述の平成 16 年度の改訂を行っていないため、以下に示す記述内容は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）承認時の内容である。ただし、製造・輸入量については経済産業省による平成 13 年度実態調査での値に更新し、下線部については 2006 年 2 月現在の状況について説明を加えた。

(1) 化学物質の同定情報

ノニルフェノール(NP)はノニル基の分岐や置換位置の違いにより、異性体が多数存在し、ノニル基の分岐による構造異性体だけで理論上 211 種類になる (Robinson et al., 1976)。本評価書では特に断りが無い限り、異性体混合物を指す。

名	称：	ノニルフェノール	
別	名：	4-ノニルフェノール、NP	
分	子	式：	$C_{15}H_{24}O$
分	子	量：	220.35
構	造	式：	



(2) 物理化学的性状

外	観：	無色あるいは淡い黄色の液体 ¹⁾		
融	点：	-10°C ¹⁾		
沸	点：	293-297°C ¹⁾		
比	重：	$d_4^{20}=0.950$ ¹⁾		
蒸	気	圧：	0.0032 Pa ¹⁾	
分	配	係	数：	Log Pow = 5.99 (計算値) ²⁾
分	解	性：	加水分解性：	報告なし
			生分解性：	難分解 (BOD=0%, 14 日間) ³⁾
溶	解	性：	水	6.35 mg/L (25°C) ²⁾
			有機溶媒	ベンゼン、塩素系溶媒、アニリン、ヘプタン、脂肪族アルコール、エチレングリコールに可溶 ¹⁾

(3) 一般情報

製	造	量	等：	平成 13 年度 10,000~100,000 t ⁴⁾
用	途：	界面活性剤 (アニオン活性剤、非イオン界面活性剤)、エチルセルロース樹脂の安定剤、油溶性フェノール樹脂、エステル類等。		

加工品として、洗剤、油性ワニス、ゴム助剤及び加硫促進剤、石油製品の酸化防止剤及び腐食防止剤、石油類のスラッジ生成防止剤等⁵⁾。

適 用 法 令： 化学物質排出把握管理促進法、水道法、水質汚濁防止法、海洋汚染防止法、下水道法

¹⁾HSDB, 2001; ²⁾PHYSPROP, 2000; ³⁾ 通商産業公報, 1976; ⁴⁾ 経済産業省, 2003a; ⁵⁾ 化学工業日報社, 2000

(4) 現時点での有害性評価^{注36)}

ヒトの内分泌系、生殖器系への影響に関する報告はない。

本物質の内分泌系への影響を調べるための *in vitro* 実験において、本物質は弱いエストロゲン作用 (受容体結合性は E2 の 1/680–1/71,000 及び転写活性化能は E2 の 1/670 以下) を有し、直鎖型 NP に比して分枝型 NP の方が親和性が高い傾向がある。また、NP は *in vivo* 試験では未成熟又は卵巣摘出ラットによる子宮増殖アッセイで弱いエストロゲン作用 (経口投与では 50 mg/kg/day 以上の用量で作用がみられている) を示す。さらに、雄の新生仔 SD ラットに NP とエストロゲン受容体アンタゴニストを腹腔内投与する試験でもエストロゲン受容体を介した影響がみられている。

生殖系への影響として、SDラットの4世代繁殖試験で650 ppm (30-100 mg/kg/day相当) 以上の用量でF₂の精巣上体精子数の減少やF₁-F₃の腔開口日齢の早期化などの影響がみられている。SDラットの2世代繁殖試験でも50 mg/kg/dayの用量でF₀雌の卵巣重量減少、F₁雌雄の生存率低下、F₁雌の卵巣重量減少、腔開口早期化、着床数及び生存仔 (F₂) 数の減少がみられ、50 mg/kg/day 前後から本物質の生殖・発生毒性による影響がみられている。

なお、本物質の有害性に関連する情報として、NP はヒトの眼、皮膚、呼吸系に対して強い刺激性がある。ラットの反復投与毒性試験において、肝臓や腎臓に影響がみられている。変異原性については *in vitro* では陰性と報告されているが、*in vivo* 試験の報告はない。ヒトでの発がん性に関しては報告がなく、実験動物を用いた発がん性試験も実施されていない。なお、本評価書作成に際し使用した報告うち、ほとんどが4-NPを主成分とする混合物であり、これらの異性体に関する情報が少ないため、異性体ごとの影響を必ずしも明らかにすることはできなかった。

(5) リスク評価等今後必要な対応^{注36)}、^{注37)}

本物質は弱いエストロゲン作用(受容体結合性は E2 の 1/680–1/71,000、転写活性化能は E2 の 1/670 以下、子宮増殖アッセイは 50 mg/kg 以上の用量で陽性)を有する。また、概ね 50 mg/kg/day 以上の用量で生殖・発生毒性が認められる。混合物としての NP の内分泌系、生殖系への影響を評価する上での科学的知見は *in vitro*、*in vivo* 試験データともに既に十分得られており、今後追加試験等の実施を検討する必要性はないと判断される。

一方、NPは、内分泌かく乱作用の有無に関わらず、従来の知見で生殖・発生毒性による影響がみられることから、有害性評価や暴露評価を踏まえてリスク評価を実施し、適切なリスク管理のあり方について検討すべきと考える。^{注38)}

^{注36)} 平成14年度第1回内分泌かく乱作用検討小委員会(2002年4月)における承認時の記述内容。

^{注37)} 環境省は、「内分泌かく乱作用に関する今後の環境省の対応方針について(ExTEND 2005)」において、これまでの取組みを整理し、ノニルフェノールについては、ラット改良1世代試験の結果、本物質は、「文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量(4用量群)での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった」と公表している。

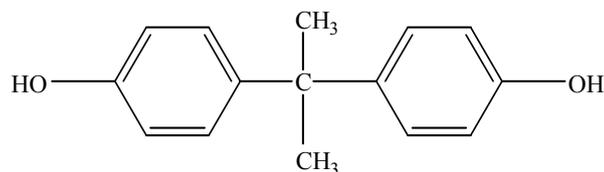
^{注38)} 有害性評価に加えてPRTRデータに基づく暴露調査を踏まえ、NEDOの委託事業で製品評価技術基盤機構(NITE)及び化学物質評価研究機構(CERI)において初期リスク評価実施済。さらに、製品評価技術基盤機構(NITE)にノニルフェノールリスク評価管理研究会が設置され、本物質及び同エトキシレートのリスク管理のあり方について検討され、2004年10月にNITEよりノニルフェノール及びノニルフェノールエトキシレートのリスク管理の現状と今後のあり方が公表されている。また、産業技術総合研究所により作成された詳細リスク評価書が2004年5月から産業技術総合研究所のHP上で公開(<http://unit.aist.go.jp/crm/>)されている。

2-15. ビスフェノール A [CAS No. 80-05-7] の有害性評価

本物質の有害性評価書は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）において審議、承認、公表され、前述の平成 16 年度の改訂を行っていないため、以下に示す記述内容は、平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）承認時の内容である。ただし、製造・輸入量については経済産業省による平成 13 年度実態調査での値に更新し、下線部については 2006 年 2 月現在の状況について説明を加えた。

(1) 化学物質の同定情報

名 称： ビスフェノール A
別 名： 2,2-ビス(p-ヒドロキシフェニル)プロパン、4,4'-(1-メチルエチリジン)ジフェノール、4,4'-イソプロピリデンジフェノール、BPA
分 子 式： $C_{15}H_{16}O_2$
分 子 量： 228.29
構 造 式：



(2) 物理化学的性状

外 観： 白色の薄片¹⁾
融 点： 150-155 °C ¹⁾
沸 点： 220 °C (533 Pa) ¹⁾
比 重： $d_{25}^{25} = 1.195$ ¹⁾
蒸 気 圧： 5.3×10^{-6} Pa (25 °C) ¹⁾
分 配 係 数： Log Pow = 3.32 (実測値) ¹⁾
分 解 性： 加水分解性：報告なし
生分解性：難分解 (BOD = 0%, 14 日間) ²⁾
溶 解 性： 水： 120 mg/L (25°C) ¹⁾
有機溶媒：アセトン、エタノール、エーテル、ベンゼン、アルカリ水溶液に可溶、四塩化炭素に僅かに溶解¹⁾

(3) 一般情報

製 造 量 等： 平成 13 年度 100,000~1,000,000 t ³⁾
用 途： エポキシ樹脂、ポリカーボネート樹脂の原料。フェノール樹脂、酸化防止剤などの原料。 ¹⁾
適 用 法 令： 化学物質排出把握管理促進法

¹⁾ HSDB, 2001; ²⁾ 通商産業公報, 1977; ³⁾ 経済産業省, 2003a

(4) 現時点での有害性評価^{注39)}

ヒトの内分泌系、生殖器系への影響に関する報告はない。

本物質の内分泌系への影響を調べるための試験として、*in vitro* 実験、*in vivo* 試験（子宮増殖アッセイ）が数多くなされ、それらの結果から BPA がエストロゲン作用を有することが示されている。しかしながら、*in vitro* 実験では、BPA のエストロゲン受容体を介した作用は弱い（受容体結合性は E2 の 1/500－1/15,000 及び転写活性化能は E2 の 1/600－1/130,000）。

また、生殖器系への影響としては、OECDガイドラインに則ったスクリーニング試験の一つである改良 28 日間反復投与毒性試験（改訂TG407）において、200 mg/kg/day以上の群で、種々の毒性学的な変化が、さらに 1,000 mg/kg/dayでは内分泌かく乱作用を示唆する性周期の異常がみられている。生殖・発生毒性または繁殖毒性試験でも 1 世代繁殖試験から 3 世代繁殖試験までの報告がある。ラット 1 世代繁殖試験で 50 mg/kg/dayでF₁に体重低下がみられているが、繁殖毒性はみられていない。マウス 2 世代繁殖試験では 437 mg/kg/day以上でF₁に精囊重量減少等がみられている。0.015、0.3、4.5、75 ppm (0.001、0.02、0.3、5 mg/kg/day相当)の低用量と 750、7,500 ppm (50、500 mg/kg/day相当)の高用量を設定して行われたラット 3 世代繁殖毒性試験において、50 mg/kg/day相当群では各世代の親動物に体重増加抑制がみられているが、親動物の繁殖能及び仔動物発生・発達に異常はみられていない。500 mg/kg/day相当群では生殖・発生毒性が認められている。なお、低用量の各群にはBPA投与による影響はみられていない。現状では生殖・発生毒性または繁殖毒性試験の無毒性量（NOAEL）は 50 mg/kg/dayと推定されている。

一方、BPA の毒性に関する問題点は一部の動物実験で報告されている妊娠期間の投与における胎仔、出生仔への影響である。陽性の報告では経口投与で 0.002 mg/kg/day、飲水投与で 1 ppm とかなり低用量で変化がみられている。しかし、投与期間、投与量、使用動物数、検査項目を多くした再現性試験ではいずれも陰性の報告が得られている。

2000年10月に行われたNTP低用量ピアレビューの最終報告書(2001年5月14日公表)の中で、BPAの前立腺等への低用量作用に関しては、陽性、陰性、いずれのデータも提出されたデータには信頼性があるとした上で、パネルは前立腺等への低用量作用には確かな証拠があるとした。しかし、この作用は現時点ではかなり限定的な実験条件下で観察される現象であり、普遍化した現象とは考えがたいと結論している。また、低用量作用があるとしても、それが有害作用を示すものかどうかは現在の知見では立証できない。

なお、本物質の有害性に関連する情報として、ヒトにおいて軽度の皮膚刺激、アレルギー性皮膚炎が報告されている。皮膚炎の患者は、BPA とともにホルムアルデヒドにもアレルギー陽性反応を示しているため、両物質の相互作用を含め、原因物質については特定されていない。

動物実験では経口反復投与毒性として、主に大腸、盲腸、肝臓、腎臓に影響がみられ、貧血もみられている。なお、ラットを用いた 2 年間の混餌投与による慢性毒性試験の結果で、50 mg/kg/day 以上の用量で体重減少がみられており、EPA は 50 mg/kg/day を最小毒性量(LOAEL)と推定している。

BPA の変異原性は総じて陰性であり、発がん性も陰性である。ヒトの発がんに関する報告はない。

^{注39)} 平成 14 年度第 1 回内分泌かく乱作用検討小委員会（2002 年 4 月）における承認時の記述内容。

(5) リスク評価等今後必要な対応^{注39)}、^{注40)}

本物質は弱いエストロゲン作用（受容体結合性は E2 の 1/500－1/15,000 及び転写活性化能は E2 の 1/600－1/130,000）を有し、概ね 500 mg/kg/day 以上の高用量を経口投与した試験で生殖・発生毒性が認められている。BPA のヒトへの内分泌系、生殖系への影響を評価する上での実験動物についての科学的知見は既に十分得られており、今後追加試験等の実施を検討する必要性はないと考えられる。

また、BPA を代表例とする、いわゆる低用量作用問題に関しては、現時点ではかなり限定的な実験条件下で観察される現象であり、普遍化した現象であるのかについて、今後も学術的な観点から情報収集等を行う必要があるものの、現時点では、それ以外の特別な対応をとる必要性はないと判断される。

一方、BPAは、内分泌かく乱作用の有無に関わらず、生殖・発生毒性による影響がみられることから有害性評価や暴露評価を踏まえてリスク評価を実施し、適切なリスク管理のあり方について検討すべきと考える。^{注41)}

^{注40)} 環境省は、「内分泌かく乱作用に関する今後の環境省の対応方針について（ExTEND 2005）」において、これまでの取組みを整理し、ビスフェノールAについては、ラット改良1世代試験の結果、本物質は、「文献情報等により得られたヒト推定暴露量を考慮した用量（4用量群）での明らかな内分泌かく乱作用は認められなかった」と公表している。

^{注41)} 有害性評価に加えてPRTRデータに基づく暴露調査を踏まえ、NEDOの委託事業で製品評価技術基盤機構（NITE）及び化学物質評価研究機構（CERI）において初期リスク評価実施済。さらに、製品評価技術基盤機構（NITE）にビスフェノールAリスク評価管理研究会が設置され、本物質のリスク管理のあり方について検討され、2005年11月にNITEよりビスフェノールAのリスク管理の現状と今後のあり方が公表されている。また、産業技術総合研究所により作成された詳細リスク評価書が2005年11月に丸善より出版されている。

3. まとめ

1998年に環境庁（当時）がとりまとめた「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」において、内分泌かく乱作用を有する疑いがあるとしてリストアップされた物質群のうち、わが国において生産・使用実態がないとされた物質群、農薬登録物質やダイオキシン等の各種対策が進められている物質群を除いた15物質群について、内分泌かく乱作用に関するさまざまな科学的情報を収集するとともに、人の健康影響を中心に有害性評価書を作成した。このうち、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)、ノニルフェノール及びビスフェノールAの5物質については既存知見や経済産業省が実施した動物試験で内分泌系への影響がみとめられており、内分泌かく乱作用との関係は明確ではないが、生殖発生毒性の認められる物質であるとの観点から、リスク評価を行うべきと判断された。また、フタル酸ブチルベンジルについては高用量におけるホルモン様（抗アンドロゲン）作用によると考えられる次世代への影響が二世世代繁殖毒性試験で認められたことからリスク評価が必要であると判断された。この6物質のうち、4物質については初期リスク評価を実施済みであり、うち3物質については詳細リスク評価も実施済みである。残り2物質についても現在、初期リスク評価を実施中である。一方、ベンゾフェノンにはホルモン様作用が検出されたが、二世世代繁殖毒性試験では内分泌系への影響は認められず、n-ブチルベンゼン、フタル酸ジエチル、4-ニトロトルエンの3物質も二世世代繁殖毒性試験まで実施した結果、後二者においては極めて高用量で若干の影響が散見されたものの、問題とすべき内分泌系への有害性影響は認められなかったことから、これら4物質は内分泌かく乱作用を有する可能性は低く、新たな対応の必要はないと判断された。また、アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)に関しては、*in vitro* 及び *in vivo* のホルモン作用を評価する試験、改良28日間反復投与毒性試験を実施した限りにおいて、内分泌かく乱作用を有する可能性は低いと考えられたが、PRTR対象物質の観点からリスク評価を実施中である。残り4物質群、オクタクロロスチレン、スチレンダイマー・トリマー、ポリ臭化ジフェニル及び2,4-ジクロロフェノールのうち、ポリ臭化ジフェニルは既存知見で内分泌系への影響が明確に認められており、他の3物質群も既存知見や経済産業省が実施した試験結果から内分泌系への影響なしとは結論できないが、いずれの物質も製造・輸入実態から当面の暴露の懸念が低く、緊急対応の必要はないと判断されている。

4. 参考文献

- Brown, D.J., Van Overmeire, I., Goeyens, L., Denison, M.S. and Clark, G.C. (2001) Analysis of brominated flame retardants and brominated dibenzodioxines and biohenyls for Ah receptor activation using the CALUX bioassay. *Organohalogen Compounds*, 54, 12-15.
- HSDB (2001) Hazardous Substances Data Bank, National Library of Medicine, (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).
- Kitamura, S., Ohmegi, M., Sanoh, S., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N. and Ohta, S. (2003) Estrogenic activity of styrene oligomers after metabolic activation by rat liver microsomes. *Environ. Health Perspect.*, **111**, 329-334.
- Kubo, T., Urano, K. and Utsumi, H. (2002) Mutagenicity characteristics of 255 environmental chemicals. *J. Health Sci.*, 48, 545-554.
- Kurze, V.J., Stein, D.J., Simak, P., and Kaiser, R. (1970) Über die Konstitution der styrololigomeren aus der thermischen Polymerisation. *Angew. Makromol. Chem.*, 12, 25-41.
- Mayo, F.R. (1968) The dimerization of styrene. *J. Amer. Chem. Soc.*, 90, 1289-1295.
- Ohno, K., Azuma, Y., Date, K., Nakano, S., Kobayashi, T., Nagao, Y. and Yamada, T. (2003) Evaluation of styrene oligomers eluted from polystyrene for estrogenicity in estrogen receptor binding assay, reporter gene assay, and uterotrophic assay. *Food. Chem. Toxicol.*, **41**, 131-141.
- Ohyama, Ken-ichi; Nagai, Fumiko; Tsuchiya, Yoshiteru. (2001) Certain styrene oligomers have proliferative activity on MCF-7 human breast tumor cells and binding affinity for human estrogen receptor α , *Environmental Health Perspectives*, 109, 699-703.
- PHYSPROP (2000) Syracuse Research Corporation Physical Properties Database, (<http://esc.syrres.com/interkow/PhysProp.htm>).
- Prinsen, M.K. and Gouko, N. (2001) Determination of the oestrogenic (uterotrophic) activity of extracts of 'general purpose polystyrene (GPPS)' using immature female rats. *J. Appl. Toxicol.* **21**, 235-239.
- Sakamoto, Y., Ando, H., Kubo, Y., Nagasawa, A., Takahashi, H., Yano, N., Yoshida, S., Yuzawa, K., Aoki, N. and Ogata, A. (2001) Low-dose effects of styrene trimer of the reproductive system of suckling male mice. *Environmental Sciences: an International Journal of Environmental Physiology and Toxicology*, **8**, 241-242.
- Sakazaki, H., Ueno, H., Umetani, K., Utsumi, H. and Nakamuro, K. (2001) Immunotoxicological evaluation of environmental chemicals utilizing mouse lymphocyte mitogenesis test. *J. Health Sci.*, **47**, 258-271.
- Satoh, K., Nagai, F. and Aoki, N. (2001) Several environmental pollutants have binding affinities for both androgen receptor and estrogen receptor α . *J. Health Sci.*, 47, 495-501.
- Sugiura Mariko; Hayakawa Ritsuko; Xie Zhenlin; Sugiura Keiji; Hiramoto Keiichi; Shamoto Mikihiro (2002) Experimental study on phototoxicity and the photosensitization potential of ketoprofen, suprofen, tiaprofenic acid and benzophenone and the photocross-reactivity in guinea pigs, *PHOTODERMATOLOGY, PHOTOIMMUNOLOGY AND PHOTOMEDICINE*, 18, 82-89.

- Takemoto, K., Yamazaki, H., Nakajima, M. and Yokoi, T. (2002) Genotoxic activation of benzophenone and its two metabolites by human cytochrome P450s in SOS/*umu* assay. *Mutation Research*, 519, 199-204.
- US.NTP (2000) NTP technical report on the toxicity studies of benzophenone (CAS No. 119-61-9) administered in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. NTP Toxicity Report Series 61.
- Yamazaki, T., Okada, Y., Hisamitsu, Y., Kubota, S. and Kayama, F. (2000) Effect of endocrine disrupting chemicals on lymphocyte responses. *Organohalogen Compounds*, 49, 394-396.
- 化学工業日報社 (2000) 13901 の化学商品.
- 化学工業日報社 (2003) 14303 の化学物質, 1151.
- 河村葉子、河村麻衣子、武田由比子、山田隆 (1998) 食品用ポリスチレン製品中のスチレンダイマー及びトリマーの分析. *食品衛生学雑誌*, 39, 199-205.
- 経済産業省 (2002) 環境ホルモン効果に関する評価・試験法開発報告書, 平成 13 年度経済産業省 環境対応技術開発等委託調査研究
- 経済産業省 (2003a) 平成 13 年度既存化学物質の製造・輸入量に関する実態調査.
- 経済産業省 (2003b) 環境ホルモン効果に関する評価・試験法開発報告書, 平成 14 年度経済産業省 環境対応技術開発等委託調査研究
- 通商産業公報 (1975).
- 通商産業公報 (1976).
- 通商産業公報 (1977).
- 通商産業公報 (1980).
- 通商産業公報 (1982).
- 通商産業公報 (1990).
- 通商産業公報 (2000).
- 日本化学工業協会 (2001) PRTR物質リストデータベース (<http://www.jcia-net.or.jp/prtr/jcia.html>) .

IV. 試験法開発の概要

1. 経緯

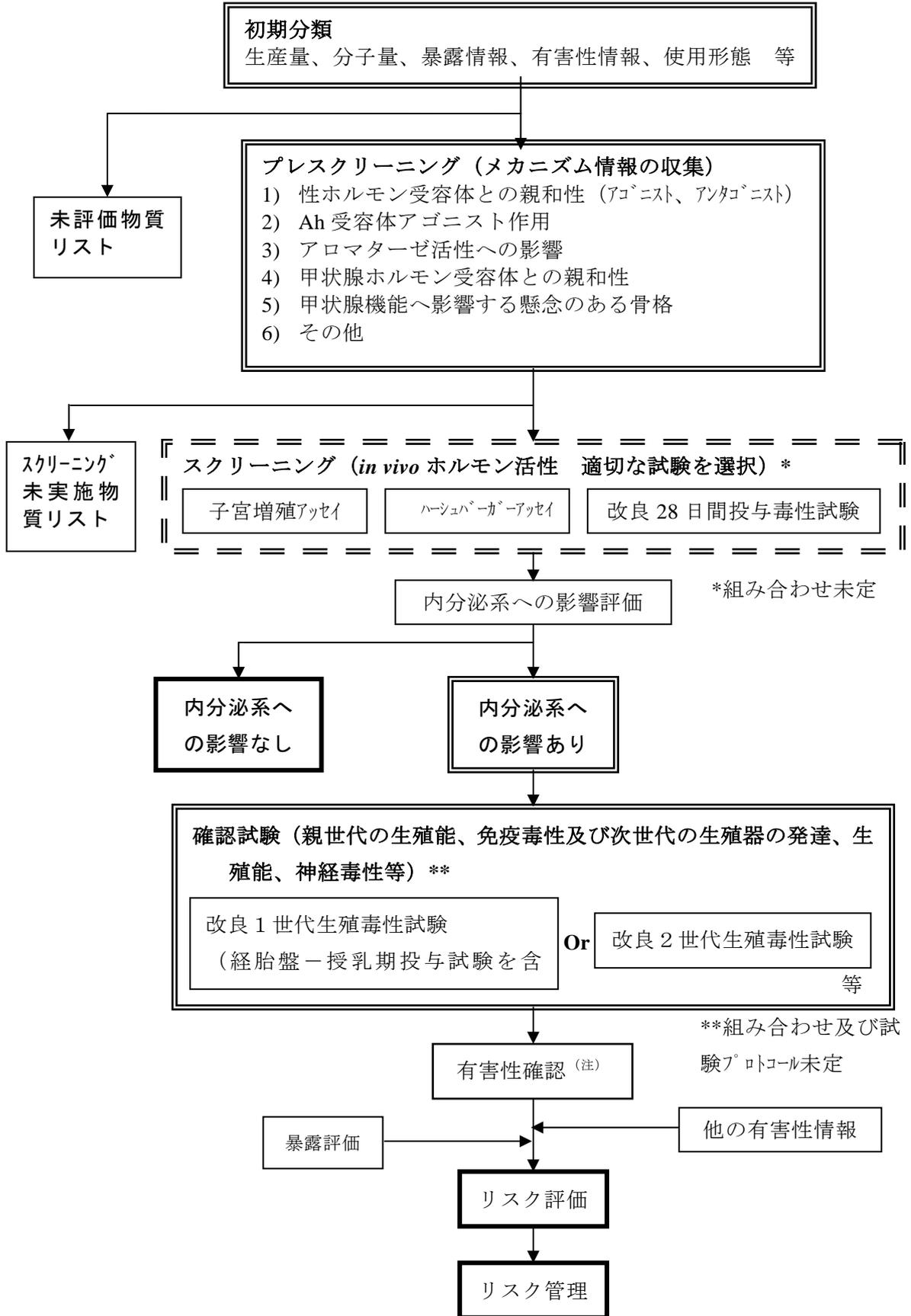
経済産業省における内分泌かく乱作用の試験法開発は、「内分泌かく乱作用問題への対応のためには、内分泌かく乱作用を有するおそれのある化学物質を膨大な化学物質から選別し、選別された化学物質に対し、内分泌かく乱作用によってもたらされる有害影響を評価していくことが必要である」との認識のもとに開発が進められた。

具体的には、コンピュータを用いたスクリーニング試験として、3次元構造活性相関手法（3D-QSAR）の開発、*in vitro* スクリーニング試験として、レポーター遺伝子アッセイ、受容体結合試験の開発を行っている。また、*in vivo* スクリーニング試験として、OECDによる国際的なバリデーションスタディ（実証研究）へ参画しつつ、ほ乳動物を使った試験法（子宮増殖アッセイ、ハーシュバーガーアッセイ、改良28日間反復投与毒性試験（改訂TG407））の開発を行うとともに、確定試験にも利用可能な試験として、2世代繁殖毒性試験の改良、経胎盤・経乳汁暴露試験の開発も行った。

また、内分泌かく乱作用のリスク評価を行うための試験・評価体系の枠組みに関しては、米国EPA（環境保護庁）の諮問機関であるEDSTACが1998年にTier方式の試験評価のスキームを提唱し、OECDでも2000年の第4回EDTA（Endocrine Disrupters Testing and Assessment Task Force）会議において概念的枠組み（Conceptual Framework）が議論された。このような国際的な動きを受け、2001年11月に財団法人化学物質評価研究機構の中に設置された（仮称）化学物質評価スキーム検討会（高橋道人座長）において学識経験者による検討が行われ、2002年4月に開催された内分泌かく乱作用検討小委員会で検討された「EDTAスペシャルセッション Thought Starter」における「内分泌かく乱物質試験評価スキーム（案）」として承認された（図1）。このスキームは、2002年6月に東京で開催された第6回EDTA会議に提出されている。

また、個別の試験法と試験評価スキームの検証を行う観点から、2003年度以降、試験法の開発とともに、市場に流通する多種多様な化学物質も含めた試験データの取得を行った。試験法の開発と検証のために取得されたデータは、当該化学物質に関する情報として広く公開されているが、当該データの解釈においては、「内分泌かく乱物質試験評価スキーム（案）」における位置づけが、*in vitro* 試験法についてはメカニズム情報の収集、*in vivo* 試験法の子宮増殖アッセイ、ハーシュバーガーアッセイ、改良28日間反復投与毒性試験についてもスクリーニングレベルであることに留意する必要がある。

(図1) 内分泌かく乱物質試験評価スキーム (案)



2. 事業成果の概要と今後の課題

2-1. 三次元構造活性相関手法 (QSAR)

(1) 目的

化学物質の内分泌かく乱作用の有力なメカニズムである性ホルモン受容体への結合に着目し (Fang et al., 2003; Nishikawa et al., 1999; Yamasaki et al., 2002)、膨大な化学物質の中からヒトエストロゲン受容体 (hER)・ヒトアンドロゲン受容体 (hAR) へ結合する物質を三次元構造活性相関手法により選別する方法を確立する。

(2) 原理

化学物質の受容体への結合親和性は、タンパク質と化学物質複合体の安定性に起因するものである。この複合体の安定性がタンパク質と化学物質の結合に関与する各種エネルギー項の線形結合で表されると仮定して、結合に寄与するエネルギー項の重み (係数) を相対結合強度 (RBA) の実測値に対する回帰分析等により求め、得られた予測式から結合結合性を予測する。

(3) 方法

化学物質の受容体に対する結合性を予測するシステムの流れを図 2-1-1 に示す。

本手法では、まず、受容体及び化学物質の三次元構造を用いてコンピューター上での自動ドッキング計算を実施し、得られた受容体-化学物質の複合体モデルに構造最適化計算を実施した。得られた複合体構造から算出した受容体と化学物質間の相互作用などの各種エネルギー値を独立変数、*in vitro* 受容体結合試験 (2-2 参照) から得られた RBA の対数値を従属変数として結合性の予測式を構築した。

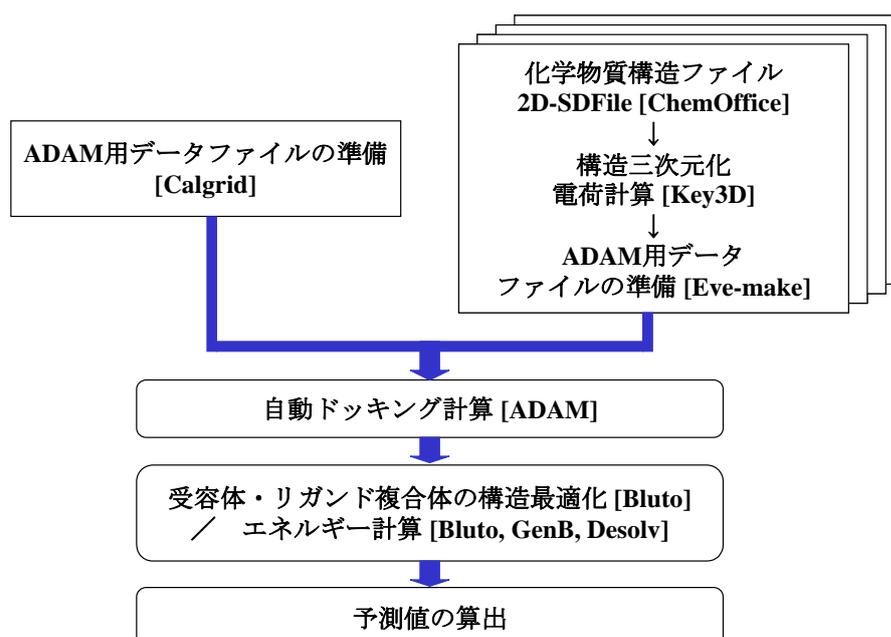


図 2-1-1 化学物質の受容体に対する結合性を予測するための基本的な計算手順
[]内：使用プログラムあるいはソフト名

① 化学物質データの準備

まず、化学物質のChemFinder^Rファイルから、化学構造情報をSDF形式のファイルにエクスポートした後、得られたSDFファイルからプログラムKey3D（旧名Olive）（中村ら, 2000）により立体構造に変換し、電荷分布・原子タイプ等を付与して三次元構造を計算した。次に、プログラムEve-make（Mizutani and Itai, 2004）を用いて、この構造に回転可能結合・ヘテロ原子の水素結合タイプ等の情報を付与し、自動ドッキング用の三次元構造データファイルを作成した。

② タンパク質データの準備

自動ドッキング計算に用いる受容体タンパク質構造（例えば、X線結晶構造）に化学物質を含む場合には、化学物質を取り除いた後に、化合物がドッキングする領域（ドッキング対象領域）を指定し、ドッキング対象領域内で、自動ドッキング計算の際に化学物質との相互作用計算に用いる格子点データをプログラム Calgrid（Tomioka and Itai, 1994）により計算した。

③ 自動ドッキング計算及び受容体-化学物質複合体構造の最適化

①及び②で準備した化学物質と受容体タンパク質の三次元構造を自動ドッキングプログラム ADAM（Mizutani et al., 1994; Mizutani and Itai, 2004）で自動ドッキングさせた後、受容体-化学物質複合体の最適構造をプログラム Bluto により計算した。Bluto による複合体最適化では、化学物質結合部位の近傍 7Å以内にあるアミノ酸側残基の側鎖と化学物質分子を可動範囲として指定した。受容体の分子内エネルギーと分子間相互作用については AMBER 力場パラメータを用い、化学物質の分子内エネルギーについては MMFF 力場パラメータを基に、Key3D により AMBER 力場関数系に変換したものをを用いた。

④ 各種エネルギー項の算出

プログラム Bluto、GenB（Takamatsu and Itai, 1998）及び Desolv により以下の結合自由エネルギー項を計算した。

- ・ 分子間静電相互作用エネルギー（GBelc；プログラム GenB より）
- ・ 分子間非極性相互作用（GBrep；プログラム GenB より）
- ・ 化学物質の配座自由度束縛効果（GBconf；プログラム GenB より）
- ・ 化学物質の脱溶媒和効果（GBsole；プログラム GenB より）
- ・ タンパク質の脱溶媒和効果（GBsolb；プログラム GenB より）
- ・ 化学物質分子内エネルギー変化（Dlig；プログラム Bluto による）
- ・ タンパク質の分子内エネルギー変化（Dpro；プログラム Bluto による）
- ・ タンパク質・化学物質の水素結合性官能基の脱溶媒和数（Dsl；プログラム Desolv より）

⑤ 結合強度予測式の導出

in vitro の受容体結合試験によって得られた相対結合親和性 RBA の対数值（logRBA）を従属変数、算出した各エネルギー項を独立変数として、重回帰分析あるいは判別分析を行ない、それぞれ結合性予測式を得た。

(4) 結果

① ヒトエストロゲン受容体 α (hER α) に対する結合性予測システム構築

a. ドッキング計算に関する検討

自動ドッキングプログラム ADAM では、タンパク質側の水素結合性官能基に対して水素結合の相手となる位置にダミー原子を配置し、ダミー原子間の距離と化学物質分子中の水素結合性ヘテロ原子間の距離を比較することで、結合ポケット中で安定に存在し得る化学物質分子の水素結合性部分の配座と配置を推定する。しかし、内分泌かく乱作用が疑われる物質の中には、受容体のドッキング対象領域と水素結合しうるヘテロ原子が存在しない、あるいは、水素結合の形成が困難な位置にヘテロ原子が存在する化合物も多く、従来のシステムでは計算できない化学物質構造が多かった。そこで、計算できる化学物質の範囲を広げるために、受容体のリガンド結合部位の水素結合性官能基に加えて、内分泌かく乱作用が疑われる物質に多く見られるフェノール性芳香環中心にもダミー原子を配置してドッキング計算を実施することとし、表 2-1-1 に示す 5 種のテンプレートをドッキング対象とした検討を行なった。この結果、表 2-1-1 に示すように、いずれのテンプレートにおいてもフェノール性芳香環中心をダミー原子として加えることで、より多くの化学物質について結合様式の推定が可能となった。

表 2-1-1 498 化合物のうち hER α -LBD への結合様式が推定できた化学物質数

PDB ¹⁾ ID	Ligand	改良前	改良後
1ERE	17 β -Estradiol (E ₂)	327	442
3ERD	Diethylstilbestrol (DES)	324	441
3ERD-2 ²⁾	Diethylstilbestrol (DES)	331	443
1ERR	Raloxifene (RAL)	339	460
3ERT	4-Hydroxytamoxifen(OHT)	339	458

¹⁾: PDB ; Protein Data Bank

²⁾: 3ERD-2 は、結晶構造 3ERD についてリガンド結合ポケット中の側鎖が動きやすい残基である Met421 の側鎖配座を変更して作製

b. 受容体テンプレートに関する検討

○ 構造が既知の受容体テンプレート

hER α のリガンド結合ドメイン (hER α -LBD) の立体構造は、表 2-1-1 に示した 1ERE (Brzozowski et al., 1997)、3ERD (Shiau et al., 1998)、1ERR (Brzozowski et al., 1997) 及び 3ERT (Shiau et al., 1998) の 4 種が明らかとなっている。そこで、hER α への結合性予測においていずれのテンプレートを用いるかを検討するために、多様な化学構造を有する物質に対して一つの予測式で予測するための回帰式を受容体テンプレート毎に求め、実測値と予測値の相関係数 r 及びドッキング計算可能物質数を比較した。この結果、3ERT の r が最良であり、計算可能物質数も多いことから、以降の検討における X 線構造解析から得られた受容体テンプレートとしては 3ERT を用いることとした。

○ シミュレーションにより構築した受容体テンプレート

hER α -LBD は強い結合性を示すアゴニストあるいはアンタゴニストと複合体を形成することで構造変化を起こすことが X 線構造解析により明らかとなっている (Brzozowski et al., 1997; Shiau et al., 1998)。しかし、化学物質が結合していない状態 (アポ体) や、内分泌かく乱作用が疑われる物質の多くにみられるような弱い結合しか示さない化合物 (weak binders) が結合した場合、タンパク質構造にどのような構造変化が起こるのかは未知である。つまり、現在使用している受容体テンプレートは強い結合性物質が結合していたときのタンパク質構造であり、結合性の弱い物質との結合様式を推定する目的には適切ではなく、本方法の予測値と実測値との差を生じる一因となると考えられ、化学物質が結合する前のアポ型のタンパク質構造を受容体テンプレートとすることで予測能が改善されることが期待された。アポ型のタンパク質構造は、1ERE、3ERD、1ERR 及び 3ERT の 4 種の hER α -LBD 構造に加え、アポ型として X 線構造解析されているレチノイド X 受容体 (RXR) (PBD : 1LBD (Bourguet et al., 1995)) をもとにしたホモロジーモデリング手法により構築し、3ERT を受容体テンプレートとしたときの予測結果と比較した。その結果、3ERT が与える r 値をアポ型のタンパク質構造が著しく改善することはなかったが、3ERT をテンプレートとした場合と遜色のない結果を与えたことから、結合性予測において X 線構造が明らかではない受容体、あるいは受容体構造に制約がある場合においてシミュレーションによって構築した受容体構造が有用であることが示唆された。

c. 結合性予測法の確立

in vitro の受容体結合試験の結果から多様な化学構造を有する物質の結合性を推定する一つの予測式では、定量的な予測精度が低かった。この理由としては、結合する物質によって、受容体のタンパク質構造は大きく異なるコンフォメーションを取ることが報告されているが (Brzozowski et al., 1997; Shiau et al., 1998)、現在のドッキング計算及び構造最適化においてはタンパク質構造の計算上の可動範囲に限界があるために、物質によっては受容体との相互作用している本来の状態が十分に反映されず、結合性と各エネルギー項の寄与が異なる可能性が考えられた。そこで、物質を構造ごとに分類することで予測精度を向上させることができると考えられることから、化学物質を構造分類し、各構造群について結合性を予測するための予測式を導出することとした。また、RBA が算出されない物質については受容体結合試験における検出限界近傍の-3.5 暫定値として構築したために、偽陽性が多いという問題があったことから「結合しない」という定性的な情報をより正確に予測式へと導入するために判別分析を行ない、結合性があると予測された物質については定量的な結合性予測を行なう「Two-Step model」を考案した (Akahori et al., in press)。さらに、これまでに取得したデータを解析することにより、結合性がない、あるいは非常に弱いと推定される構造を見出し、図 2-1-2 に示す結合性予測フローを構築した。なお、このフロー作成において、子宮増殖アッセイの結果から子宮重量に影響を与えた最小の RBA 値が 0.0023% (p-tert-Butylphenol) であったことから、RBA が 0.002% 以上の物質を結合性物質 (Binders)、0.002% 未満の物質を非結合性物質 (Non-binder) として扱った。

この結果、エストロゲン受容体への結合を介した内分泌かく乱作用が懸念される多くの構造の結合予測が可能となり、フローチャート構築に用いたデータセットに対する予測の一致率は90.2% (664/736)、偽陰性率は10.3% (22/213) と良好な予測が可能となった (表 2-1-2)。さらに、フローチャート構築に用いていないデータセット (外部データセット) を用いて結合性予測システムの検証を行った結果、予測の一致率は84.0% (415/494)、偽陰性率は66.7% (8/12) であった。このとき偽陰性と予測された物質のRBAは0.04%以下であったことから、0.04%以上の結合性を有する物質の結合性を予測できるシステムであるといえる (表 2-1-3)。

表 2-1-2 フローチャート構築に用いたデータセットに対する予測性

		予測		計
		P	N	
実測	B	191	22	213
	NB	50	473	523
計		241	495	736

一致率	90.2%	(191+473)/736
偽陰性率	10.3%	22/213
偽陽性率	11.5%	50/523
陽性予測率	79.3%	191/241
陰性予測率	95.9%	473/495

表 2-1-3 外部データセットによるフローチャートの検証結果

外部データ		予測		計
		P	NB	
実測	B	4	8	12
	NB	71	411	482
計		75	419	494

一致率	84.0%	(4+411)/494
偽陰性率	66.7%	8/12
偽陽性率	14.7%	71/482
陽性予測率	5.3%	4/75
陰性予測率	99.4%	411/419

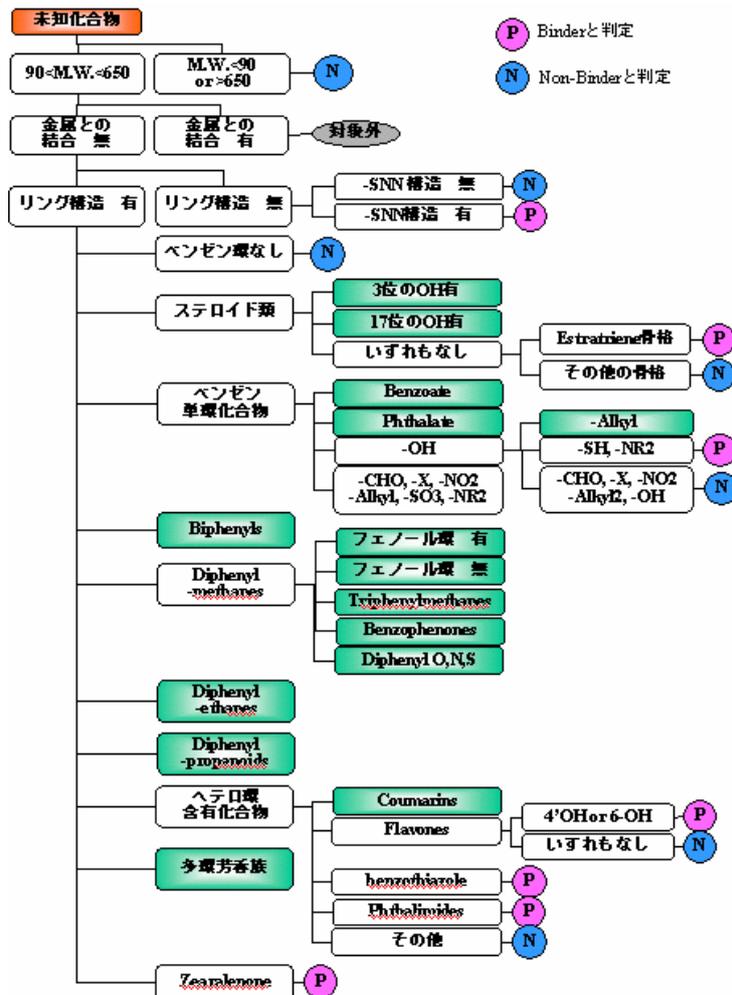


図 2-1-2 結合性予測フロー

 : Two-Step モデルによる予測が可能

② ヒトアンドロゲン受容体 (hAR) に対する結合性予測システム構築の検討

a. ドッキング計算及び受容体テンプレートに関する検討

hAR に対する結合性予測システム構築に用いるタンパク質の立体構造として、2 種類の受容体テンプレートを用いた。ひとつは、*in vitro* 受容体結合試験の対象とされた hAR のリガンド結合ドメインに強いアゴニストである Metribolone (R1881) が結合した複合体の X 線結晶構造 (PDB ID : 1E3G) (Matias et al., 2000) であり、もう一方は 1E3G 及び RXR をもとにしてホモロジーモデリングにより構築したアポ型のタンパク質構造である。

ドッキング計算を行なう際に水素結合性のみをドッキングの手掛かりとしていたのでは、評価不能の化合物が多数出てしまうことが ER の予測システム構築でわかっていたことから AR においても、水素結合性のみではなく、対象物質の環の中心に発生させた疎水性ポイントに対して、タンパク質上に配置した疎水性のダミー原子を対応させてドッキングさせることとした。自動ドッキング計算を行なう際、化合物側の水素結合性ヘテロ原子、疎水性ポイントに対応させるタンパク質側の水素結合性、疎水性のダミー原子としては、1E3G 結晶構造については、R1881 の 17 位水酸基付近に発生した水素結合性ダミー原子、及び A 環の中心に置いた

疎水性ダミー原子を用いることにした。アポ型モデル構造を用いる場合には、17位水酸基の付近には水素結合性領域が発生しなかったため、代わりに3位酸素付近の水素結合性ダミー原子とA環の中心の疎水性ダミー原子を採用した。受容体テンプレートにおけるダミー原子の配置を図2-1-3に示す。これらのダミー原子を用いてR1881のドッキングを試みたところ、いずれの受容体テンプレートでも妥当なドッキングモデルが得られることを確認した。

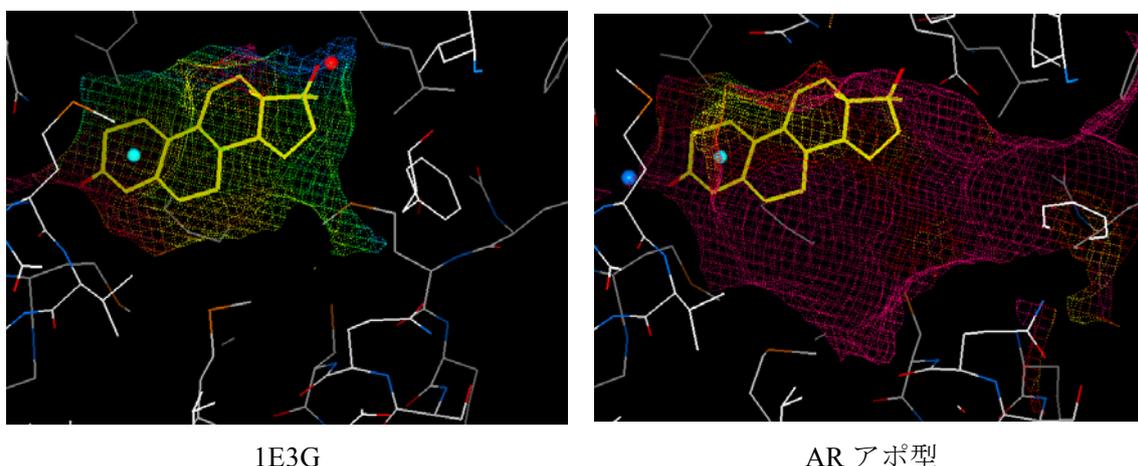


図 2-1-3 ダミー原子の設定

赤：H-donor、青：H-acceptor、水色：Hydrophobic。カゴ状の表示は化学物質分子の炭素原子が存在できる領域を示す。ポケット中にある分子は結晶構造中の R1881 である。

b. 結合性予測法の確立

1E3G 及び AR アポ型に対してそれぞれ表 2-1-4 に示す結合性強度の分布をもつ 150 物質のトレーニングデータセットを用いて、自動ドッキング計算及び構造最適化計算を行なった後に、8 種のエネルギー項 ((3) ④参照) を算出し、ER の初期の検討と同様に多様な化合物の結合性を一つの予測式で推定するためのアプローチを行なった。

まず、自動ドッキング計算により結合様式が推定できた化学物質数の比較を行なったところ、1E3G では図 2-1-3 に示すようにアゴニストが結合していた受容体であるため化学物質が結合する結合ポケットが小さく、計算可能物質数は 150 物質中 120 物質にとどまった。一方、AR アポ型は、ポケットサイズが大きく、多くの化合物を許容することができることから、150 物質中 149 物質が計算可能であった。

結合性を一つの予測式で推定した結果を図 2-1-4 に示す。1E3G 及びアポ型による予測値と実測値との関係はいずれも弱いながらも相関があるものの、 r はそれぞれ 0.39 及び 0.34 であり、強い結合性物質 ($\log RBA$ (Obs.) が 0~2) の物質の結合性が弱く予測された。この原因として、トレーニングデータセットに含まれる結合性強度の分布が結合性の弱い物質に偏っていること、結合性の強い物質についてはステロイド類に限定されることなどが考えられた。

予測式算出に用いなかった 232 物質のデータセット (外部データセット) に対する予測結果を図 2-1-5 に示した。この結果、結合性が弱い物質と結合しない物質を区別することはできないものの、実測による結合性が $\log RBA$ で -1 (RBA では 0.1%) 以上の物質については、結合性物質として判別することができることがわかったが、予測の定量性が低いことなどから hAR

に対する結合性予測については更に改良が必要であると考えられた。

表 2-1-4 hAR の結合性予測式算出に用いたトレーニングデータセットの結合強度分布

logRBA実測値	2.0以上	1.0~2.0	0.0~1.0	-1.0~0.0	-2.0~-1.0	-2.0未満
化合物数	1	11	14	19	61	44

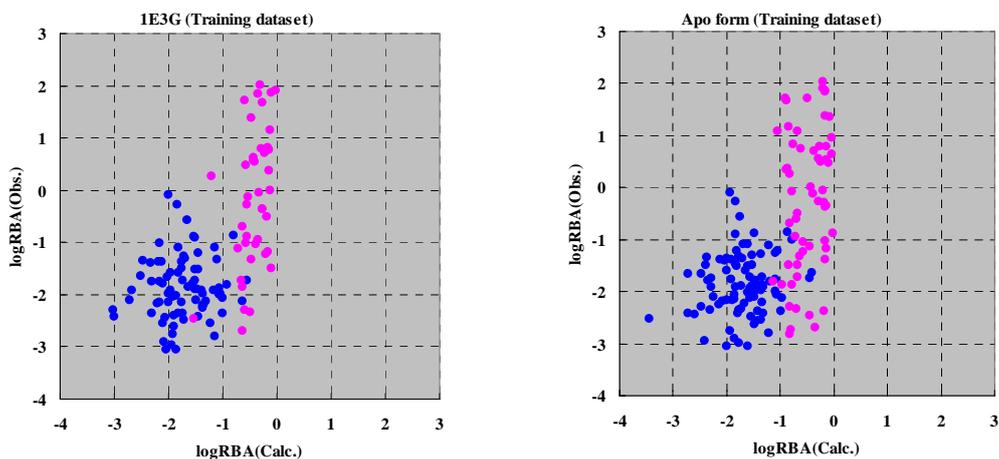


図 2-1-4 トレーニングデータセットの予測値と実測値の関係

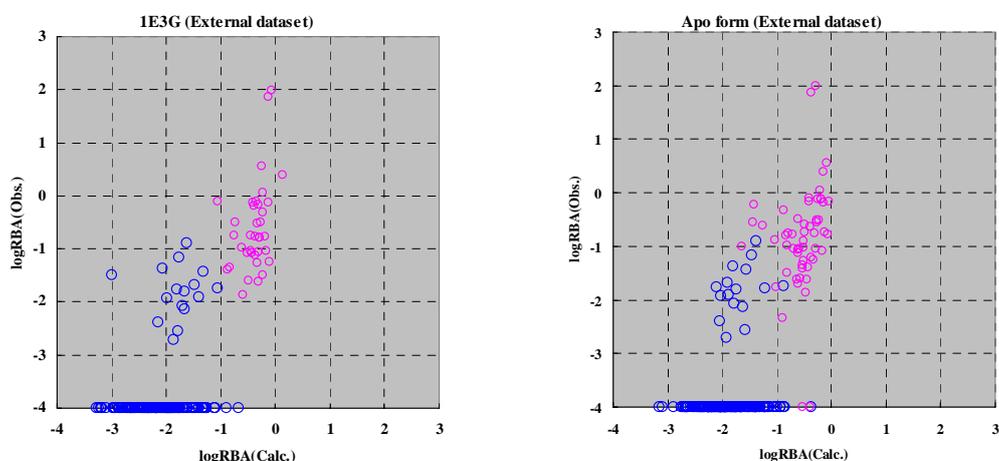


図 2-1-5 外部データセットの予測値と実測値の関係

(5) 結果のまとめ

hERα に対する結合性については、構造分類、判別分析及び重回帰分析を行なうことで定性的あるいは定量的に予測するシステムを構築し、外部データによる検証の結果、RBA が 0.04% 以上の結合性を有する物質については予測可能となった。また、hAR に対する結合性については、予測値と実測値の間の相関は弱いものの、RBA が 0.1% 以上の結合性を有する物質については予測可能である。しかしながら、予測の定量性が低いことなどから hAR に対する結合性予測については更に改良が必要であると考えられた。

(6) 手法としての評価

① 手法検証の状況

実際の予測対象となる製造輸入量のある物質を含めた外部データを用いた検証を行なった結果、hER α に対する結合性については予測可能であると考えられた。AR については、ER で行なったような予測式の改良や予測フロー構築を行っていないため、検証する段階には至っていない。

② OECD 等における海外技術動向

米国においては構造活性相関手法が試験の優先順位付け (Prioritization) やランキングのための重要なツールとして検討が続けられており、特にCoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) 手法やCOREPA (Common REactivity PAtern) 手法による検討が行なわれている。他にも、分子の構造類似性に基づくインデックスを活用したCoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis) 手法、同じくSimilarity Matrix (類似性マトリックス) 手法、分子の慣性モーメントや双極子、四極子を用いるCoMMA (Comparative Molecular Moment Analysis) 手法、¹³C-NMRスペクトルなどを用いるSDAR (Spectroscopic Data-Activity Relationship) 手法などがあり、学習用化合物 (構造) の適切な選択とシステムの透明性や検証が充分であれば、予測手法として認知されるべきものと考えられている (ICCA Workshop, 2002; OECD, 2003)。また、構造活性相関手法は経済協力開発機構 (OECD) の内分泌かく乱作用を有する物質を試験及び評価するための構想 (OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) における試験フレームで*in vitro*試験法と並んでメカニズムデータを提供する「レベル2」に明記されその重要性が謳われている (OECD, 2002)。現在、OECDのVMG-NA (Validation Management Group for Non-Animal Testing) のもと、QSAR Task Groupが設置され、内分泌かく乱作用を有する物質を評価するための (Q) SARに必要な考え方・アプローチ・利用可能なQSARなどについて話し合われている。なお、第2回及び3回VNG-NA会議ならびにQSAR Task Groupにおいて、日本のQSAR開発状況について報告している。

③ 試験法としての評価

内分泌かく乱作用は種々の機序によって生じるが、特に有力なメカニズムとされている ER への結合を介したメカニズムを有する物質のスクリーニングに利用できる構造活性相関システムを構築した。現時点ではRBAが0.04%以上の物質について結合性を予測できるが、RBAが0.04%未満の物質については十分な予測ができるとはいえない。構造分類を必要とするために構造分類が行えない物質については予測することができず、定性的予測に頼らざるを得ない構造群があることが問題として挙げられる。しかし、これらの問題は近年の計算科学の発展により十分に改善することが見込まれる。

(7) 今後の課題と展望

これまでに内分泌かく乱作用の主要なメカニズムとして考えられている ER に対する結合性を予測する三次元構造活性相関手法の基本ソフト (プロトタイプ) を開発し、多くの化合物の

結合性を予測することが可能となった。しかし、結合性が弱い物質の予測精度についてはまだ充分とはいえ、子宮増殖アッセイでは現在予測可能結合性 (RBA が 0.04%以上) よりも弱い結合性を有する物質でも陽性と判定される物質があることから、このような結合性の弱い物質についても結合性を予測する必要がある、より高精度のシステムを構築する必要がある。また、現行システムでは、構造分類を行なうために予測可能な化合物の範囲が限られており、予測できる構造範囲を拡大する必要がある。計算科学は飛躍的に進歩しており、これまでの技術蓄積の上に、最新計算技術の導入を図ることで、現プロトタイプよりも性能の高い結合性予測システムの開発を行なうことが可能であると考えられる。そこで、計算精度の向上及び予測可能範囲の拡大を行なうためには、フラグメント分子軌道 (Fragment Molecular Orbital, FMO) 法を採用したプログラム ABINIT-MP など新しい計算科学的手法による受容体結合性予測システムの研究開発が必要である。

(8) 参考文献

- Akahori, Y., Nakai, M., Yakabe, Y., Takatsuki, M., Mizutani, M., Matsuo, M. and Shimohigashi, Y. Two-Step models to Predict Binding Affinity of Chemicals to Human Estrogen Receptor α by Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships (3D-QSAR) using Receptor-Ligand Docking Simulation. SAR and QSAR in Environ. Res. (in press).
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995) Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature*, **375**, 377-382.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A. and Carlquist, M. (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, **389**, 753-758.
- Fang, H., Tong, W., Branham, W.S., Moland, C.L., Dial, S.L., Hong, H., Xie, Q., Perkins, R., Owens, W. and Sheehan, D.M. (2003) Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 1338-1358.
- ICCA Workshop (2002) (Q)SARS for human health and the environment: workshop on regulatory Acceptance.; March 4-6, Setubal, Portugal.
- Matias, P.M., Donner, P., Coelho, R., Thomaz, M., Peixoto, C., Macedo, S., Otto, N., Joschko, S., Scholz, P., Wegg, A., Basler, S., Schafer, M., Egner, U. and Carrondo, M.A. (2000) Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations. *J.Biol.Chem.*, **275**, 26164-26171.
- Mizutani, M.Y. and Itai, A. (2004) Efficient method for high-throughput virtual screening based on flexible docking: discovery of novel acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.*, **47**, 4818-4828.
- Mizutani, M.Y., Tomioka, N. and Itai, A. (1994) Rational automatic search method for stable docking models of protein and ligand. *J. Mol. Biol.*, **243**, 310-326.
- Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M. and Nishihara, T. (1999) New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **154**, 76-83.

- OECD (2002) OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals [<http://www.oecd.org/dataoecd/17/33/23652447.doc>]
- OECD (2003) Meeting of the Ad hoc Expert Group on (Q)SARs: March 31-April 2, 2003, Ispra, Italy.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D. A. and Greene, G.L. (1998) The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, **95**, 927-937.
- Takamatsu, Y. and Itai, A. (1998) A new method for predicting binding free energy between receptor and ligand. *PROTEINS: Struc. Funct. Genet.*, **33**, 62-73.
- Tomioka, N. and Itai, A. (1994) A method for fast energy estimation and visualization of protein-ligand interaction. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **8**, 347-366.
- Yamasaki, K., Takeyoshi, M., Yakabe, Y., Sawaki, M., Imatanaka, N. and Takatsuki, M. (2002) Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. *Toxicology*, **170**, 21-30.
- 中村健介、富岡伸夫、板井昭子 (2000) 低分子の三次元構造発生法. *JCPE Journal*, **12**, 177-184.

2-2. 受容体結合試験法

(1) 目的

ヒトエストロゲン受容体 (hER) 及びヒトアンドロゲン受容体 (hAR) 結合性物質を検出するために、受容体競争結合試験系を構築し、化学物質の受容体結合強度を測定する。また、本試験で得られる数値データは 2-1. QSAR 開発における実測値データとして使用することも重要な目的としている。

(2) 原理

図 2-2-1 に示した原理を用いて競争結合試験を行った (Nakai et al., 1999; 中井ら, 2000)。

- ① エストロゲン受容体 (あるいはアンドロゲン受容体)、標準リガンド ($[^3\text{H}]$ エストラジオールあるいは $[^3\text{H}]$ ジヒドロテストステロン) 及び試験物質を混合する。
- ② 試験物質が受容体結合能をもつ場合、標準リガンドと競合し、その結合力に依存して受容体の結合部位の一部を占有する。
- ③ デキストラン被膜活性炭懸濁液を添加し、遊離のリガンドを除く。
- ④ 上清に受容体が残存する。
- ⑤ 受容体に結合している標準リガンドの放射能を測定し、試験物質の添加による標準リガンドの受容体からの脱離を定量する。

ここで、標準リガンドの受容体結合率 B/B_0 (%) は以下の式で表される。

$$B/B_0 (\%) = \frac{(\text{試験物質存在下での標準リガンドの結合量} - \text{非特異的結合量})}{(\text{試験物質非存在下での標準リガンドの最大結合量} - \text{非特異的結合量})} \times 100$$

ここで、非特異的結合量は大過剰の非放射リガンド存在下で得られる値であり、実施した全ての試験において測定した。

(3) 方法

以下の方法で、エストロゲン受容体及びアンドロゲン受容体に対する結合試験を行った。

① エストロゲン受容体

組換えヒトER、トリチウム標識エストラジオール及び被験物質を 96 ウェルプレートで混合し (100 μL)、25°C で 1 時間放置した。各ウェルに 100 μL の 0.4% デキストラン被覆活性炭 (DCC) を添加、混合し、氷上で 10 分間放置した。それぞれの反応液をろ過し、ろ液 (100 μL) の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。非特異的結合は 1 μM の非放射標識エストラジオール存在下で測定した。得られた数値を GraphPad Prism[®] Ver 3.0 (GraphPad Software) を用いて解析した。

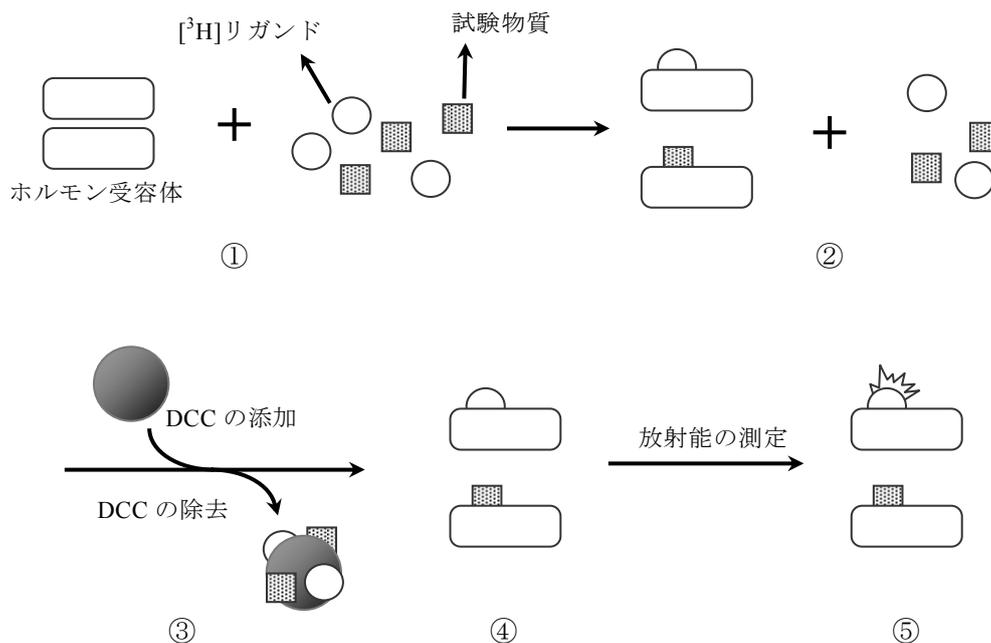


図 2-2-1 結合試験の原理

② アンドロゲン受容体

組換えヒトAR（東洋紡社製）（Matsui et al., 2002）、トリチウム標識ジヒドロテストステロンを用いて、ERと同様の操作で競争結合試験を行った。非特異的結合は1 μMの非放射標識ジヒドロテストステロン存在下で測定した。得られた数値をGraphPad Prism[®] Ver 3.0（GraphPad Software）を用いて解析した。

(4) 試験物質

本試験で得られる数値データは 2-1. で述べた QSAR 開発における実測値データ（トレーニングデータ及び外部データ）として使用することも重要な目的としているため、QSAR システム構築に有効なデータが得られるよう、多岐にわたる化学構造をもつ化学物質を選定した。

各構造群の年度別試験物質数を表 2-2-1 に示した。

表 2-2-1 構造群別に見た試験物質数

構造群	ER	AR
脂肪族（カルバメート等）	70	39
ステロイド（天然・合成ステロイド等）	130	127
ベンゼン単環化合物（アルキルフェノール、フタル酸エステル等）	493	224
非縮合多環化合物（ジフェニルメタン、ビフェニル等）	344	142
縮合多環化合物（フラボン、多環芳香族等）	128	41
その他（ヘテロ環化合物等）	292	192
計	1457	765

(5) 結果

結合試験の陽性及び陰性の判定基準は以下のとおりである。以下の解析では、N.D. 及び N.B. はいずれも陰性として取り扱った。

陽性： logistic式を用いた解析により、 IC_{50} 値が算出できた試験物質。エストラジオールの IC_{50} との比較により、相対結合強度（RBA）を算出した。

N.D.： logistic式を用いた解析により、 IC_{50} 値が算出できなかったが、最大試験濃度において、標準リガンドの受容体からの脱離が20%以上であった試験物質。

N.B.： logistic式を用いた解析により、 IC_{50} 値が算出できず、最大試験濃度において、標準リガンドの受容体からの脱離が20%未満であった試験物質。

① エストロゲン受容体

ER については 1,457 物質の結合性を測定した。表 2-2-2 に、各構造群別の結合性物質数、結合性を示さなかった物質数をまとめた。結合性を示した物質のうち、相対結合強度（RBA）が 0.1 より大きかった物質数及び 0.01 より大きかった物質数も表示した。さらに、それぞれの構造群における結合性物質及び結合性を示さなかった物質の割合を算出し、表 2-2-3 にまとめた。ER に対して結合性を示したのは 346 物質であった。そのうち、エストラジオールに対する相対結合強度が 0.01%より大きかった物質は 179 物質、0.1%より大きかった物質は 86 物質であり、それぞれ、全体の約 12%及び 5.9%であった。

表 2-2-2 各構造群における ER に対する結合性を示した物質数及び結合性を示さなかった物質数

構造群	結合性を示した物質数	結合性を示した物質のうち RBA > 0.1	結合性を示した物質のうち RBA > 0.01	結合性を示さなかった物質数	計
脂肪族	9	3	8	61	70
ステロイド	55	36	46	75	130
ベンゼン単環	71	6	17	422	493
非縮合多環	133	29	71	211	344
縮合多環	45	4	21	83	128
その他	33	8	16	259	292
計	346	86	179	1,111	1,457

表 2-2-3 各構造群における ER に対する結合性を示した物質及び結合性を示さなかった物質の割合

構造群	結合性を示した物質の割合	結合性を示した物質のうち RBA > 0.1	結合性を示した物質のうち RBA > 0.01	結合性を示さなかった物質の割合
脂肪族	12.9	4.29	11.4	87.2
ステロイド	42.3	27.7	35.4	57.7
ベンゼン単環	14.4	1.22	3.45	85.6
非縮合多環	38.7	8.43	20.6	61.3
縮合多環	35.2	3.13	16.4	64.9
その他	11.3	2.74	5.48	88.7
計	23.8	5.90	12.3	76.3

② アンドロゲン受容体

AR については 765 物質の結合性を測定した。ER と同様に、表 2-2-4 に、各構造群別の結合性物質数、結合性を示さなかった物質数を、表 2-2-5 にそれぞれの物質の割合をまとめた。

AR に対して結合性を示したのは 254 物質であった。そのうち、ジヒドロテストステロンに対する相対結合強度が 0.01% より大きかった物質は 190 物質、0.1% より大きかった物質は 83 物質であり、それぞれ、全体の約 25% 及び 11% であったが、結合性を示した物質の多くはステロイド化合物であった (114 物質)。

表 2-2-4 各構造群における AR に対する結合性を示した物質数及び結合性を示さなかった物質数

構造群	結合性を示した物質数	結合性を示した物質のうち RBA>0.1	結合性を示した物質のうち RBA>0.01	結合性を示さなかった物質数	計
脂肪族	4	1	2	35	39
ステロイド	114	72	106	13	127
ベンゼン単環	34	3	18	190	224
非縮合多環	61	5	41	81	142
縮合多環	14	0	8	27	41
その他	27	2	15	165	192
計	254	83	190	511	765

表 2-2-5 各構造群における AR に対する結合性を示した物質及び結合性を示さなかった物質の割合

構造群	結合性を示した物質の割合	結合性を示した物質のうち RBA>0.1	結合性を示した物質のうち RBA>0.01	結合性を示さなかった物質の割合
脂肪族	10.3	2.56	5.13	89.7
ステロイド	89.8	56.7	83.5	10.2
ベンゼン単環	15.2	1.34	8.04	84.8
非縮合多環	43.0	3.52	28.9	57.0
縮合多環	34.2	0	19.5	65.9
その他	14.1	1.04	7.81	85.9
計	33.2	10.9	24.8	66.8

③ ER/AR 両受容体に対する結合性

いずれの受容体に対しても結合試験を実施した物質は 756 物質であり、いずれかの受容体に対して結合性を示した物質は 299 物質であった。これらのうち、両受容体に対して結合性を示した物質は 130 物質、ER に対して特異的に結合した物質は 51 物質、AR に対して特異的に結合した物質は 118 物質であった。非縮合多環化合物は結合性を示した物質数は試験物質数に対して 50%を超え、そのなかでいずれの受容体に対しても結合性を示した物質数が多かったことから、ジフェニルメタンのような骨格はそれぞれの受容体結合性に共通する重要な構造要因であることが示唆された。また、ベンゼン単環化合物には各受容体に対して特異的に結合した物質数が比較的多かったことから、置換基の違いが、受容体特異性に大きく寄与していることが考えられた。

さらに、それぞれの受容体に対して特異的に結合した物質が存在したことから、いずれの試

験系も実施する必要性があると考えられた。

表 2-2-6 両受容体に対する結合試験を行った物質と結合の特異性

構造群	試験物質数	結合性を示した物質数	両受容体に結合性を示した物質数	ERに特異的に結合した物質数	ARに特異的に結合した物質数
脂肪族	39	6	3	2	1
ステロイド	121	111	44	3	64
ベンゼン単環	224	53	16	19	18
非縮合多環	140	77	47	16	14
縮合多環	41	17	7	3	7
その他	191	35	13	8	14
計	756	299	130	51	118

(6) 結果のまとめ

① エストロゲン受容体

1,457 物質のうち、ER に対して結合性を示したのは 346 物質であった。構造別では、ER 結合性を示した物質の割合が多かったのは、ステロイド類を除くと縮合多環化合物及び非縮合多環化合物であった。

② アンドロゲン受容体

AR については 765 物質の結合性を測定し、そのうち、結合性を示したのは 254 物質であった。構造別では、AR 結合性を示した物質の割合が多かったのは、ER と同様に、ステロイド類を除くと縮合多環化合物及び非縮合多環化合物であった。

③ ER/AR 両受容体に対する結合性

いずれの受容体に対しても結合試験を実施した物質は 756 物質であった。ER 及び AR に対して特異的に結合した物質は、それぞれ 51 物質及び 118 物質存在しており、作用メカニズムに基づいたスクリーニングのためには両受容体を用いた試験を実施する必要性があると考えられた。

(7) 試験法としての評価

① *in vivo* スクリーニング試験法との相関性

a. 子宮増殖アッセイとの比較

表 2-2-6 に 2 分割表による ER 結合試験と幼若ラットを用いた子宮増殖アッセイ（3 日間皮下投与）の比較結果をまとめた。結合試験と子宮増殖アッセイの一致率は約 66%であった。偽陰性率は約 14%であった。子宮重量増加を示した物質のなかで、最も ER 結合性が弱かった

物質は 4-t-ブチルフェノールであり、その RBA 値は 0.00233 であった。偽陰性と判定された 5 物質のうち、2 物質はアンドロゲン誘導体であり、生体内での代謝が考えられた。また、さらに、偽陽性と判定された 17 物質のうち、10 物質の RBA 値は 0.002 未満であり、弱い結合性物質であった。また、残りの 7 物質はいずれもレポーター遺伝子アッセイでは陰性であった。

表 2-2-7 2 分割表による ER 結合試験と子宮増殖アッセイの比較

		ER 結合試験		計
		結合性物質数	非結合性物質数	
子宮増殖 アッセイ ^a	陽性物質数	30	5	35
	陰性物質数	17	13	30
計		47	18	65

^a原則的に子宮重量について統計学的有意差の有無を評価指標とし、用量相関性、体重変動を考慮して総合的に評価した。

b. ハーシュバーガーアッセイとの比較

表 2-2-7 に 2 分割表による AR 結合試験と去勢ラットを用いたハーシュバーガーアッセイ (10 日間経口投与) の比較結果をまとめた。結合試験とハーシュバーガーアッセイの一致率は 50% と比較的低かった。偽陰性率は約 19% であった。偽陰性と判定された 5 物質のうち、2 物質はフタル酸エステル類であり、AR 結合を介在しない作用の可能性がある。偽陽性と判定された 35 物質のうち、30 物質は ER に対する結合性を示している。ハーシュバーガーアッセイのエンドポイントとしている副生殖器 (腹葉前立腺、精囊、肛門挙筋+球海綿体筋、陰茎亀頭及び尿道球腺) には ER が発現しており、これらの化学物質は ER に対しても結合し、AR 介在作用に対して干渉作用を及ぼしたものと考えられた。

表 2-2-8 2 分割表による AR 結合試験とハーシュバーガーアッセイの比較

		AR 結合試験		計
		結合性物質数	非結合性物質数	
ハーシュバーガー アッセイ ^a	陽性物質数	21	5	26
	陰性物質数	35	19	54
計		56	24	80

^a原則的に副生殖器重量について統計学的有意差の有無を評価指標とし、背景値、変動のみられた副生殖器の種類及び数を考慮して総合的に評価した。

② 試験法検証の状況

米国代替法評価調整委員会 (ICCVAM) において、試験法検証のために推奨されている化学

物質 (ICCVAM, 2003) の結合性と本試験で得られた ER 結合性を 22 物質について比較したところ、18 物質の結果が一致した。偽陰性率は 21%であった。偽陰性となった物質はいずれも RBA 値が 0.001%未満の非常に弱い結合性を示しており、また、背景データ数も少ないことから、確実な陽性物質とはいえない可能性がある。以上の結果から、本試験法の適用性が確認されたと判断された。

さらに、AR 結合性についても 19 物質について同様の比較を行ったところ、16 物質の結果が一致した。偽陰性は 12%であった。偽陰性となった 2 物質のうち、1 物質は ICCVAM の報告で 4 試験中 2 試験では陰性と判定されており、試験系の違いによって結果にあいまいさが残るため、確実な陽性物質とはいえない可能性がある。その他の 1 物質の RBA 値は 0.0001%未満の非常に弱い結合性を示しており、また、背景データ数も少ないことから、これらについても、確実な陽性物質とはいえない可能性がある。以上の結果から、本試験法の適用性が確認されたと判断された。

③ OECD 等における海外技術動向

現在、OECD では *in vitro* 試験法の検証作業が行われており、受容体結合試験は米国環境保護庁 (US EPA) 主導のもと、US EPA/ECVAM/日本 (経済産業省) の間で、プロトコルの至適化や数種の試験物質を用いた検証作業が進められている。第 3 回 VMG-NA 会議が 2005 年 12 月 14-15 日に開催され、検証作業の進捗状況が US EPA から報告された。日本からは第 2 回会議で報告した結合試験と *in vivo* スクリーニング試験との関係について、さらに蓄積されたデータをもとに解析した結果を報告した。

④ 試験法としての評価

②のように、試験検証用の化学物質の受容体結合性をほぼ的確に測定できたことから、本試験で得られた結果は信頼性のあるデータといえる。また、*in vitro* 試験は生体への作用をスクリーニングすることが目的であるが、①で述べたように、受容体結合試験は偽陰性物質が少なく、スクリーニングに適していることが示唆された。ER 結合試験については、*in vivo* 試験との相関が比較的良好であったことから、その適用性が十分に確認できたと考えられる。また、AR 結合試験についても、ER 介在性物質の予測性は比較的低かったが、その他の試験物質については、良好な一致性を示し、スクリーニング法として適用可能だと考えられた。

(8) 今後の課題と展望

in vivo 試験との相関の定量的解析と相関から外れる物質の生体内での動態を含む構造的要因の解析が重要である。このために、S9 による代謝系を組み合わせた受容体結合試験法の開発も課題のひとつとして挙げられる。受容体結合性と *in vivo* 試験における検出限界の関係を明らかにすることで作用メカニズムに基づいたカットオフ値を設定することが可能になると考えられる。この解析から、実際の評価スキームのなかにおけるスクリーニング法としての結合試験の位置づけをより明確にすることが可能である。受容体結合試験のスクリーニング法としての適用性が示されたことから、生産・輸入量の多い化学物質の評価スキームによる実際の検証が期待される。QSAR の予測精度の向上と予測可能な構造範囲を拡大するための受容体結合性デー

タ集積が今後も必要である。

(9) 参考文献

- ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods For Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays. (2003) NIH Publication No. 03-4503.
- Matsui, K., Ishibashi, T. and Oka, M. (2002) Double evaluations of chemicals using a cocktail of fused recombinant receptors. *Anal. Biochem.*, **307**, 147–152.
- Nakai, M., Tabira, Y., Asai, D., Yakabe, Y., Shinmyozu, T., Noguchi, M., Takatsuki, M. and Shimohigashi, Y. (1999) Binding characteristics of dialkyl phthalates for the estrogen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**, 311-314.
- 中井誠、下東康幸 (2000) 無細胞系受容体結合試験, 内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法 (井上達監修) シュプリンガー・フェアラーク東京, pp3-9.

2-3. レポーター遺伝子アッセイ

(1) 目的

エストロゲン受容体 (ER) あるいはアンドロゲン受容体 (AR) を介して、(抗) 女性ホルモン様作用ないし (抗) 男性ホルモン様作用を発現する化学物質を効率的に検出するため、レポーター遺伝子アッセイ法を確立するとともに、ER または AR への化学物質の結合性に関する基礎的なデータを取得する。

(2) 原理

各種ホルモンは内分泌腺より分泌されたのち、受容体 (Receptor) と呼ばれる蛋白質と結合することによってその作用を発現する。受容体は細胞膜上または細胞質 (核) 内に存在し、成長ホルモンやインスリン等の水溶性リガンドは膜上の受容体を介して、ステロイドホルモンや甲状腺ホルモンなどの脂溶性リガンドは細胞質内及び核内に浸透し、受容体と結合したのち、その作用を発揮する。

内分泌かく乱化学物質の重要な作用点としてステロイドホルモン受容体や甲状腺ホルモン受容体があげられており、これらの核内受容体を介したシグナル伝達への影響がその有害作用発現の原点となる。核内受容体を介したシグナル伝達は標的遺伝子の発現を制御する役割を担っており、この点から遺伝子の発現調節の解析手段として繁用されているレポーター遺伝子アッセイの手法は核内受容体を介したシグナル伝達のかく乱の検出手段に応用することが可能である。ある種の遺伝子はその構造遺伝子 (蛋白質をコードする領域) の上流あるいは下流にその遺伝子の転写量を調節する領域 (調節領域またはシス領域) が存在する。核内受容体を介した転写制御はそれぞれのホルモン応答性遺伝子のシス領域にリガンドと受容体の複合体が結合することによって応答性遺伝子産物の転写量が増減し、結果としてそのホルモンの生理活性が発現することとなる。ステロイドホルモン受容体や甲状腺ホルモン受容体はリガンドと結合し、二量体を形成したのち、各ホルモン応答性遺伝子のシス領域に結合し、その遺伝子の転写を促進する。レポーター遺伝子アッセイは各ホルモン応答性遺伝子のシス領域の下流にホタルルシフェラーゼ (Luciferase)、 β -Galactosidase 等の通常、その細胞では発現していない酵素等の遺伝子を人為的に組み込んだプラスミドを細胞内に導入し、導入された遺伝子産物の量 (酵素活性) を化学発光法や比色法によって検出し、シス領域の転写活性を推定する方法である。

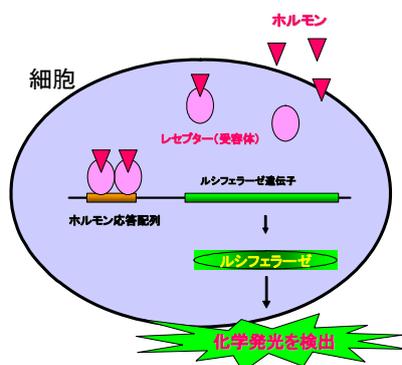


図 2-3-1 レポーター遺伝子アッセイの原理

(3) 方法

① エストロゲン受容体

住友化学株式会社より入手したエストロゲン受容体 (ER) 発現プラスミドとアフリカツメガエル由来ビテロゲニン由来の ER 応答エレメント (ERE) をルシフェラーゼ遺伝子の upstream に安定的に組み込んだ hER-HeLa-9903 安定形質転換細胞株を用いて以下の手順に従ってアッセイした。

細胞を測定用の 96wellプレートに播種 (10^4 /well)

↓

化合物の添加 (終濃度 10 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM、100 pM、10 pM 及び DMSO)

↓

CO₂インキュベータ内で培養 (20-24 時間)

↓

培地の除去及び PBS による洗浄 (100 μ L \times 2 回)

↓

細胞溶解剤の添加

↓

発光基質の添加

↓

ルミノメータによる発光量測定

なお、化合物は終濃度が 10 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM、100 pM 及び 10p M となるように添加し、各濃度区で得られた発光強度の平均値を陰性対照区の平均値で除し、転写活性化倍率 (Transcriptional activity) を求めた。化学物質のレポーター遺伝子アッセイの活性は、陽性対照区の最大転写活性化倍率 (E2 の活性化倍率) の 50% の値を与える濃度 (PC50) により比較した (Takeyoshi et al., 2002)。

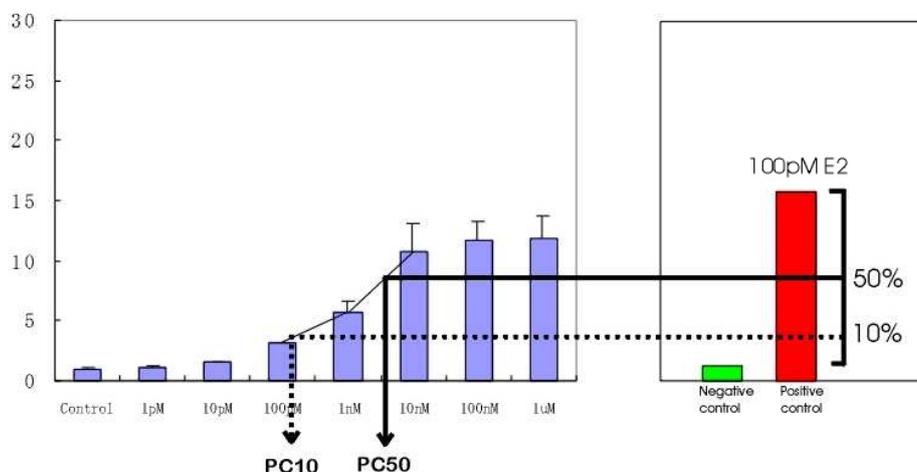


図 2-3-2 DATA 処理法模式図 (PC10 及び PC50 の定義)

アンタゴニストアッセイにおいては、予め 2.5×10^{-10} M となるように E2 を添加した培地中で、前述の終濃度となるように被験物質を添加後、同様にアッセイを行い、E2 のエストロゲン活性の 30% あるいは 50% 阻害活性を基に検討を行った。なお、細胞毒性を検出するために、定常的にレポーター遺伝子産物 (Luciferase) を発現するよう設計されたコントロール細胞を同時に使用した。

さらに、ヒトエストロゲン受容体 α 及び β のアゴニスト活性の違いに関する検討をヒト ER α coding cDNA 及びヒト ER β coding cDNA 全長を哺乳動物細胞用発現ベクター pcDNA3.1 (Invitrogen) に導入し作製した hER α /pcDNA3.1 及び hER β /pcDNA3.1 及び Rat α_{2u} -globulin (AUG) 遺伝子のプロモーター配列の一部アフリカツメガエルビテロゲニン由来 ERE を連結した ERE-AUG-Luc+ レポーターベクター (Takeyoshi et al., 2002) を用いた一過性発現系細胞を用いて同様のアッセイを行い、PC10 あるいは PC50 値の相違を基に検討した。

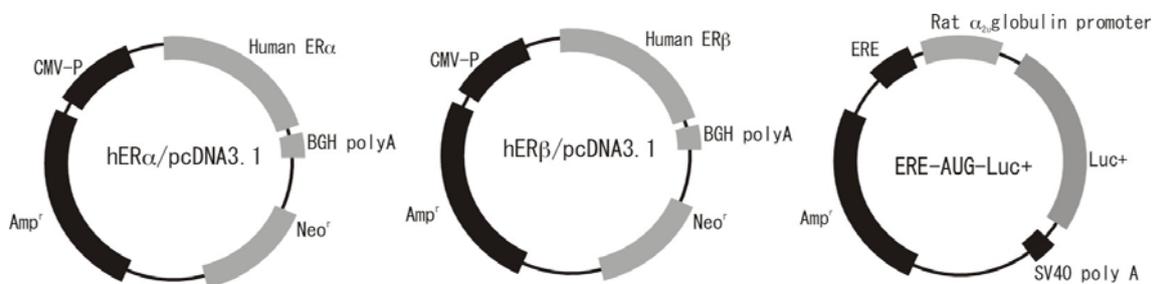


図 2-3-3 ヒト ER α /ER β の反応性検討用受容体発現プラスミド及びレポータープラスミド

② アンドロゲン受容体

アンドロゲン受容体 (Androgen Receptor : AR) を発現ベクターにクローニングしたプラスミド (pZeoSV2AR) と、AR 応答エレメント (C3 gene 由来 ARE) をルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入したプラスミド pIND ARE B-10 を作製した (Kojima et al., 2003, 2004)。さらに pZeoSV2AR と pIND ARE B-10 をチャイニーズハムスター卵巣細胞株 (CHO) に遺伝子導入して得られた安定発現細胞株 (Satoh et al., 2004) 及び human AR coding cDNA 全長を哺乳動物細胞用発現ベクター pcDNA3.1 (Invitrogen) に導入して作製した AR/pcDNA3.1 及び Rat α_{2u} -globulin (AUG) 遺伝子のプロモーター配列の一部を PGV-B vector (東洋インキ株式会社) に導入し、更に mouse mammary tumor virus (MMTV) 由来 ARE をプロモーター配列の上流に組み込み作製した ARE-AUG-Luc+ を用いた一過性発現系 (Takeyoshi et al., 2003) を用いて以下の方法でアッセイを行った。

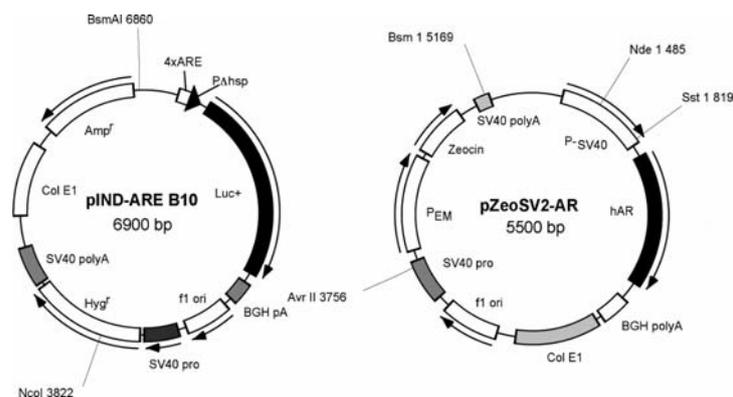


図 2-3-4 安定形質株作製に使用したプラスミドベクター

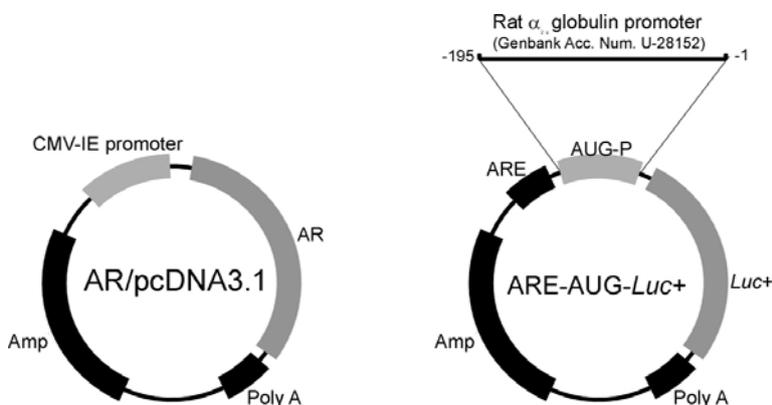


図 2-3-5 一過性発現系に用いたプラスミドベクター

実験手順

細胞を測定用の 96wellプレートに播種 ($0.9-1.0 \times 10^4$ /well)

↓

化合物の添加 (終濃度 10 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM、100 pM、10 pM 及び DMSO)

↓

CO₂インキュベータ内で培養 (20-24 時間)

↓

発光基質の添加

↓

ルミノメータによる発光量測定

なお、化合物は終濃度が 10 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM、100 pM 及び 10 pM となるように添加し、各濃度区で得られた発光強度の平均値を陰性対照区の平均値で除し、転写活性化倍率 (Transcriptional activity) を求めた。化学物質のレポーター遺伝子アッセイの活性は、ER アゴニストアッセイと同様に陽性対照区の最大転写活性化倍率 (DHT の活性化倍率) の 50% の値を与える濃度 (PC50) により比較した。

アンタゴニストアッセイにおいては、細胞を培養している培養液の終濃度が 5×10^{-10} M となる

ように添加する被験物質にあらかじめDHTを加えた。翌日、ルシフェリン溶液 (Steady-Glo™: Promega) を加え、ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。発光測定はARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。なお、対照としてNegative Control (バックグラウンド算出のための溶媒コントロール)、反応性を見るためのPositive Control (実際の計算には使わない)、Toxicity Control (1 µg/mLサイクロヘキシミド: CHX) を設けた。

(4) 試験物質

① エストロゲン受容体

エストロゲン受容体への結合性が報告されている化学物質等に共通な化学構造を骨格構造とした一連の化学物質に加え、エストロゲン受容体と同様に内分泌かく乱作用の主要メカニズムと考えられているアンドロゲン受容体及び甲状腺ホルモン受容体への結合性を有する化学物質とそれらの類似化学物質等を広範囲に 948 物質選定してレポーター遺伝子アッセイを行い、本試験法の検証及び三次元構造活性相関手法開発用の基礎資料とした。これらの物質の中でエストロゲン活性が認められた物質を中心に 300 物質を選定し、ヒトエストロゲン受容体 α 及び β のアゴニスト活性の違いに関する検討を行うとともに ER α アンタゴニスト検出系の検証にはレポーター遺伝子アッセイで陰性、受容体結合試験陽性の物質の内、結合親和性の高いもの及び EPA core chemical の内、ER 結合性を有すると報告されている物質に分類されているものを包括するように 250 物質を選定し実験に用いた。

② アンドロゲン受容体

アンドロゲンへの結合性を有する化学物質とそれらの類似化学物質等を中心に 250 物質選定して一過性発現系及び安定形質株によるレポーター遺伝子アッセイを実施して両手法の比較を行い、更に生産量等を考慮して約 500 物質を選定し、安定形質株によるスクリーニング実験を実施した。

(5) 結果

① エストロゲン受容体

a. ER アゴニスト検出系開発のためのデータ収集

ER α アゴニスト検出系の確立のため実験に供した 948 試験物質の内、PC10 値が測定できた物質は 351 物質、PC50 値が測定できた物質は 203 物質であり、それぞれの測定物質全体に対する割合は 37%及び 21.4%であった。

表 2-3-1 ER アゴニスト検出系試験法開発のためのデータ収集結果

構造分類	試験物質数	PC10 算出 物質数	PC10 算出 物質数 (%)	PC50 算出 物質数	PC50 算出 物質数 (%)
脂肪族	38	2	5.3	0	0.0
ステロイド類	128	65	50.8	52	40.6
ベンゼン単環	303	82	27.1	38	12.5
非縮合ベンゼン多環	278	122	43.9	71	25.5
縮合ベンゼン多環	101	56	55.4	30	29.7
その他	100	24	24.0	12	12.0
合計	948	351	37.0	203	21.4

b. ER アンタゴニスト検出系

今回試験した 250 物質のうち、13 物質で IC50 が算出された。しかしながら、これら 13 物質のうち、4 物質では IC50 が算出される濃度域において明らかな細胞毒性、即ち、Control 細胞のルシフェラーゼ活性低下が観察された。このことから、今回の試験の結果認められた hER α -HeLa-9903 細胞に対するルシフェラーゼ活性阻害作用は細胞毒性に伴うものであり、エストロゲン受容体に対するアンタゴニスト作用ではないものと考えられた。なお、他の 11 物質はいずれも Control 細胞に対して明白な細胞毒性を示さなかったことから、これらの物質はエストロゲン受容体に対するアンタゴニスト作用を有するものと推察された。今回の実験で検出されたエストロゲンアンタゴニストの中では Nafoxidine が最もアンタゴニスト作用が強く 1.15×10^{-9} M で 25 pM の E2 のエストロゲン活性を 50% 阻害した。次いで 4-Hydroxy-tamoxifen の IC50 が 3.45×10^{-9} M と推定され、いずれも強いエストロゲンアンタゴニストであることが確認された。

表 2-3-2 ER アンタゴニスト検出系測定結果

構造分類	試験物質数	IC30 算出 物質数	IC30 算出 物質数 (%)	IC50 算出 物質数	IC50 算出 物質数 (%)
脂肪族	7	3	42.9	2 (1) *	28.6
ステロイド類	39	5	12.8	3	7.7
ベンゼン単環	57	6	10.5	1 (1) *	1.8
非縮合ベンゼン多環	102	8	7.8	4 (2) *	3.9
縮合ベンゼン多環	30	5	16.7	3	10.0
その他	15	1	6.7	0	0.0
合計	250	28	11.2	13	5.2

* () 内は細胞毒性による偽陽性と判断される物質数。

c. ヒトエストロゲン受容体 α 及び β のアゴニスト活性の違い

300 物質の測定結果から hER β のみに対して PC 値が算出されたものを hER β に対して極めて

選択性の高い化合物群 ($hER\beta \gg hER\alpha$: 領域 A)、 $hER\alpha$ 及び $hER\beta$ のいずれに対しても PC 値が算出され且つ $hER\beta$ に対する PC 値と $hER\alpha$ に対する PC 値の間に 5 倍以上の相違があるものを $hER\beta$ に対して選択性の高い化合物群 ($hER\beta > hER\alpha$: 領域 B) とし、 $hER\alpha$ に対して選択性のある物質群に関しても同様の基準で ($hER\alpha > hER\beta$: 領域 D)、極めて選択性の高い化合物群 ($hER\alpha \gg hER\beta$: 領域 E) とした。その結果、両者 PC 値が算出された化合物は 169 物質であり、それぞれ領域 B ($hER\beta > hER\alpha$) : 27 物質、領域 C ($hER\beta = hER\alpha$) : 99 物質、領域 D ($hER\beta < hER\alpha$) : 43 物質に分類された。また、 $hER\alpha$ あるいは $hER\beta$ のいずれかのみで PC 値が算出された化合物は計 50 物質であり、領域 A ($hER\beta \gg hER\alpha$) : 12 物質、領域 E ($hER\beta \ll hER\alpha$) : 38 物質にそれぞれ分類された。両者 PC 値が算出されなかった陰性の化合物は 81 物質であった。本研究においても植物エストロゲン (Genistein、Coumestrol 等) は領域 B に属し $hER\beta$ に選択性を示すことが確認された (図 2-3-6)。その他、多くのアルキルフェノール類 (4-n-Amylphenol、4-Dodecyl-phenol、4-Cyclohexylphenol 等) や非縮合多環芳香族化合物では 4-alpha-Cumylphenol、4-(4-Fluorophenylethynyl) phenol 等が領域 A あるいは領域 B に分類され、 $hER\beta$ に対して選択性を有することが示された。また、17alpha-Estradiol、Estrinol 3-methyl ether、Estrone 3-methyl ether、Estrinol 3-benzyl ether、2-Hydroxyestradiol、Methoxy-beta-estradiol、4-Hydroxyestradiol などのエストロゲン誘導体の多く、Di-sec-octyl phthalate、Mono-n-butylphthalate、Butylbenzyl phthalate、Diphenyl isophthalate、Dibutyl phthalate 等のフタル酸類は $ER\alpha$ に選択性を持つ物質群 (領域 D あるいは領域 E) に分類された。5 倍未満ではあるが 3 倍以上 $ER\alpha$ に選択性を示すものとしてエストロゲン誘導体である 6beta-Hydroxyestradiol-17beta、Estradiol dipropionate、beta-Estradiol 17-enanthate の 3 物質が挙げられた。加えて、ER に対するアンタゴニストである RU-486、Tamoxifen、4-Hydroxytamoxifen、Nafoxidine がいずれも $hER\alpha$ に極めて高い選択性を有する物質群 (領域 E) に分類された点が注目された。本研究により植物エストロゲン以外の化学物質、特にアルキルフェノール類の多くが $hER\beta$ に対して高い選択性を示、一方で、フタル酸誘導体や代表的な ER アンタゴニストが $hER\alpha$ に高い選択性を有することが示された。このように特定の物質群が特徴的な受容体に対する選択性の違いを示すことは、 $ER\alpha$ 及び $ER\beta$ に対する選択性の違いが物質の構造に依存していることを示唆していると考えられる。このような化合物による ER の選択性の違いが生体においてどのような生理的作用の相違を生み、毒性学的意義を持つものかについては現時点では明白な示唆は得られていない。こうした点に関しては今後、 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ の生理学的意義の解明とともにリガンドのこれらに対する反応性の違いと毒性影響との関連性について検討することが必要と思われる。

化学物質がホルモン作用を有するかどうかを評価するためのスクリーニング試験法 (陽性、陰性のみの判断) として、 $ER\beta$ の試験系の必要性を考えたときに $ER\alpha$ の試験系と比較して問題になるのは、 $ER\beta$ のみに対して PC 値が算出される化合物群 (図 2-3-6 の領域 A) であると考えられる。図 2-3-6 の領域 A には 300 物質中 12 物質が分類されているが、この内 10 物質は、 $ER\alpha$ の安定形質株の試験系では PC 値が算出される事が既にわかっている。以上のことから $ER\alpha$ の試験系のみで陽性 219 物質中 217 物質 (99.1%) をカバーできることがわかった。しかしながら、残りの 2 物質 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavone 及び 2,3,4-Trihydroxybenzophenone については、 $ER\beta$ の試験系でのみ PC 値が算出されており、 $ER\beta$ の毒性学的意義が明白でない現時点では、注意が必要であると考えられる。

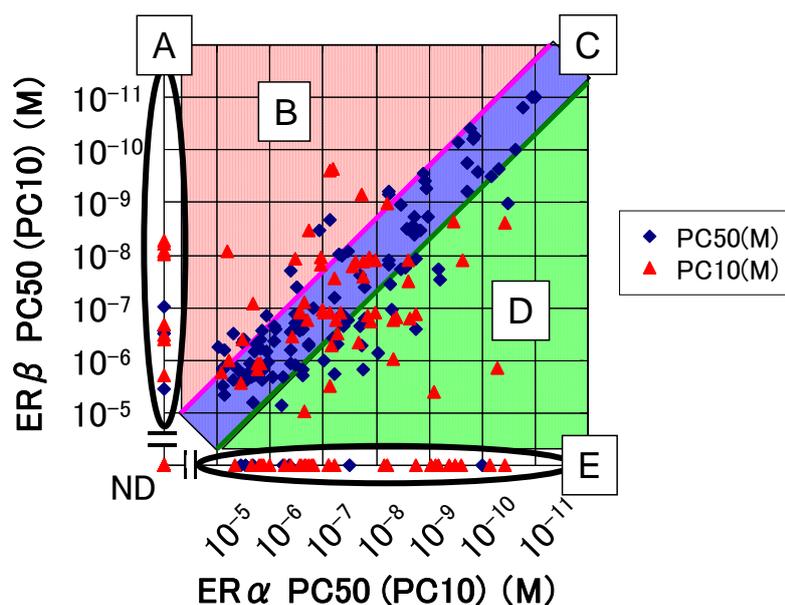


図 2-3-6 ヒトエストロゲン受容体 α 及び β のアゴニスト活性の違い

d. 製造・輸入実績を考慮して選定した化学物質の試験データ収集：

開発した $ER\alpha$ を介するレポーター遺伝子アッセイ法を行って、平成 11 年度もしくは平成 13 年度の国内における製造・輸入実績が 10 トン以上の一般化学物質を中心に化学構造分類の分布を反映する形で選定された 509 物質のエストロゲン様作用のスクリーニングを実施したところ、63 物質において $ER\alpha$ アゴニスト活性が検出され、これらの物質は、エストロゲン様作用を有するものと考えられた。また、 $ER\alpha$ アゴニスト活性陰性のものは、446 物質であった。

表 2-3-3 製造・輸入実績を考慮して選定した化学物質の試験結果 (ER アゴニスト)

構造分類	試験物質数	PC10 算出 物質数	PC10 算出 物質数 (%)	PC50 算出 物質数	PC50 算出 物質数 (%)
脂肪族	32	2	6.3	0	0.0
ステロイド類	2	1	50.0	1	50.0
ベンゼン単環	189	6	3.2	3	1.6
非縮合ベンゼン多環	67	29	43.3	5	7.5
縮合ベンゼン多環	32	6	18.8	3	9.4
その他	187	19	10.2	3	1.6
合計	509	63	12.4	15	2.9

② アンドロゲン受容体

a. 一過性発現系と安定形質株の比較：

約 250 物質の化合物について大塚製薬にて開発された CHO 細胞を基に作製した男性ホルモン様活性検出用の安定形質転換株 (CHO-Luc) と化学物質評価研究機構にて開発した男性ホルモン様活性検出用レポータープラスミド (ARE-AUG-Luc+) を用いた一過性発現系での反応性の比較を行った。

まず、両測定系の相違点下記に示す。

表 2-3-4 一過性発現系と安定形質転換株のコンストラクトの比較

	一過性発現系 (ARE-AUG-Luc+)	安定形質転換株 (CHO-Luc)
発現受容体	human AR	human AR
宿主細胞	CV-1	CHO
宿主細胞の由来	african green monkey	chinese hamster
Enhancer の由来	MMTV ARE ×3	C3 ARE ×4
Promoter	Alpha 2u globulin	Thymidine Kinase
Promoter の由来	Rat	Herpes simplex virus
レポーター遺伝子	Luc+	Luc+

実験に供した 251 物質のうち、安定形質転換株、一過性発現株共に陽性と判定された物質は 47 物質であり、共に陰性と判定されたものは 168 物質であった。また、安定形質転換株のみで陽性と判定された化合物は 28 物質、一過性発現系のみで陽性と判定された化合物は 8 化合物であった。

表 2-3-5 安定形質転換株及び一過性発現系実験結果のまとめ

		一過性発現系 (AR-AUG-Luc+)		計
		陽性	陰性	
安定形質転換株 (CHO-Luc)	陽性	47	28	75
	陰性	8	168	176
計		55	196	251

いずれか一方のみで陽性と判定された物質のうち、一過性発現系のみで PC50 が算出された 4-Pregnene-17alpha, 20beta-diol-3-one の 1 化合物及び安定形質転換株のみで PC50 が算出された Dehydroepiandrosterone の 1 化合物に関しては両方で明らかな反応性の違いがみられたが、これらの以外は PC10 のみが算出されたものであり、一方で全く反応がみられず、他方で強い活性誘導 (PC50) が得られたのはそれぞれ前述の 1 物質のみであったことから、今回比較した 2 種類の測定系に関しては双方の反応性選択性に大きな差異はないものと結論される。したがって、製造・輸入実績を考慮して選定した化学物質の試験データ収集に関しては安定形質株を採用することとした。

b. 製造・輸入実績を考慮して選定した化学物質の試験データ収集：

開発した AR を介するレポーター遺伝子アッセイ法を行って、平成 11 年度もしくは平成 13 年度の国内における製造・輸入実績が 10 トン以上の一般化学物質を中心に化学構造分類の分布を反映する形で選定された 514 物質のアンドロゲン様作用及び抗アンドロゲン作用を有する物質のスクリーニングを実施したところ、アゴニスト作用としては 1 物質にアゴニスト活性が検出され、他の 513 物質は陰性と判定された。また、抗アンドロゲン作用としては 26 物質が陽性となり、抗アンドロゲン作用を有するものと判定されたが、他の 488 物質は陰性と判定された。

表 2-3-6 製造・輸入実績を考慮して選定した化学物質の試験結果 (AR アゴニスト)

構造分類	試験物質数	PC10 算出 物質数	PC10 算出 物質数 (%)	PC50 算出 物質数	PC50 算出 物質数 (%)
脂肪族	30	0	0.0	0	0.0
ステロイド類	2	1	50.0	1	50.0
ベンゼン単環	187	0	0.0	0	0.0
非縮合ベンゼン多環	88	7	8.0	0	0.0
縮合ベンゼン多環	34	4	11.8	0	0.0
その他	108	5	4.6	0	0.0
合計	514	17	3.3	1	0.2

表 2-3-7 製造・輸入実績を考慮して選定した化学物質の試験結果 (AR アンタゴニスト)

構造分類	試験物質数	IC30 算出 物質数	IC30 算出 物質数 (%)	IC50 算出 物質数	IC50 算出 物質数 (%)
脂肪族	30	0	0.0	0	0.0
ステロイド類	2	0	0.0	0	0.0
ベンゼン単環	187	6	3.2	5	2.7
非縮合ベンゼン多環	88	15	17.0	8	9.1
縮合ベンゼン多環	34	0	0.0	0	0.0
その他	108	5	4.6	5	4.6
合計	514	26	5.1	18	3.5

③ 結果のまとめ

試験管レベルでの試験法を用いて多数の化学物質を短期間に評価する手法の一つとしてレポーター遺伝子アッセイ法の開発を試み、ヒト ER α 、ヒト ER β 、ヒト AR を介する試験系の開発に成功した。開発した方法も用いてヒト ER α 及びヒト AR を介するアゴニスト作用及び AR に対するアンタゴニスト作用について、製造・輸入実績を考慮して選定した合計 509 物質のスクリーニングを行った。その結果、一部の化学物質がヒト ER α 及びヒト AR を介するアゴニスト作用あるいは AR に対するアンタゴニスト作用を有する物質として選別することが可能であった。

これらの手法を用いることで、性ホルモン受容体を介してヒトの内分泌系に作用する化学物質を効率的に検出する上で、極めて有用な試験法となることが明らかとなった。

(6) 試験法としての評価

① *in vivo* スクリーニング試験法との相関性

子宮増殖アッセイを実施した物質を対象にヒト ER α に対するレポーター遺伝子アッセイ（アゴニスト検出系及びアンタゴニスト検出系）の結果を比較した。

in vitro 試験結果と *in vivo* の子宮増殖アッセイの結果の相関において、アゴニスト作用に関しては良好に相関するものの、アンタゴニスト作用が認められた物質に関して、レポーター遺伝子アッセイによるアンタゴニスト活性検出系では、その一部についてのみアンタゴニスト活性を検出するに留まった。すなわち、ER α に対するアンタゴニスト検出系において、現時点ではレポーター遺伝子アッセイが有効と判断出来る状況にはないと結論される。アンタゴニスト活性検出系のアッセイ条件の最適化について再検討すると同時にアンタゴニスト活性に関しては対照臓器に存在する複数の受容体あるいは受容体を介さない経路の存在も示唆されるため (Takeyoshi et al., 2002)、アンタゴニスト活性の発現メカニズムについて更なる研究が必要と考えられた。

ハーシュバーガーアッセイにおいてアンタゴニスト検出系で明らかな作用を示した物質は Cyproterone acetate、Spironolactone、Progesterone, medroxy であったが、これらはレポーター遺伝子アッセイではアゴニスト及びアンタゴニスト活性の両方或いはアゴニスト活性のみが認められている。*in vivo* 試験ではアンタゴニスト作用のみが認められているのもかわらずおり、レポーター遺伝子アッセイではアゴニスト及びアンタゴニスト活性の両方或いは逆の作用のみが認められていることに関しても、今後データを詳細に検討する必要がある。

② 試験法検証の状況

a. エストロゲン受容体アゴニスト及びアンタゴニスト検出系

内因性の女性ホルモンである 17 β -Estradiol (E2) によるレポーター遺伝子転写活性化の阻害を指標とした抗エストロゲン作用（アンタゴニスト活性）検出系について、検証試験を実施した。このバリデーション試験では、アゴニスト活性検出系では、既に ER アンタゴニスト作用の判明している 3 種の化学物質を用いた測定の再現性を、また、アンタゴニスト活性検出系については、阻害対象となる E2 の最適濃度について、既に ER アンタゴニスト作用の判明している 4 種の化学物質を用いた測定の再現性について、更に既に ER アンタゴニストではないことが判明している 2 種の化学物質も含めて文献での結果と比較を行い、測定系の妥当性について検証を行った。

アゴニスト検出系に関しては E2、Testosterone、Bisphenol A の 3 物質について 13 回の繰り返し実験を行い、その再現性を検討した結果、EC50 は E2 のみで算出されたが、その平均 EC50 \pm 標準偏差は 7.73 \pm 3.63 pM、95%信頼区間は 5.76 - 9.70 pM、変動係数は 47%であった。

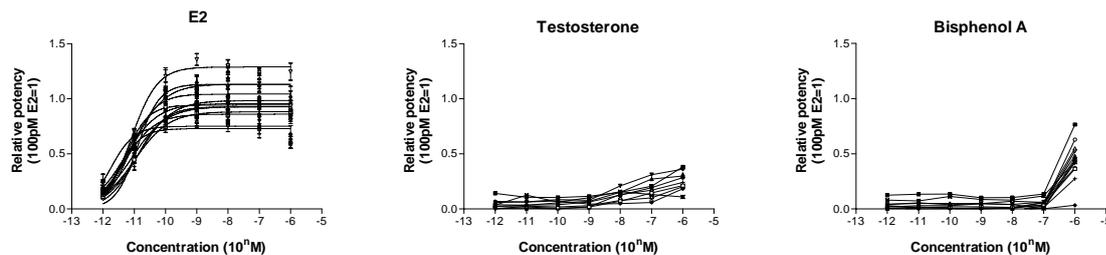


図 2-3-7 ER アゴニスト検出系の再現性に関する実験結果

更に既にER アゴニスト及びアゴニスト活性を持たないことが知られている 22 物質について文献での結果と比較を行い、測定系の妥当性評価について検証を行った。

その結果、本試験系による EC50 値及び ICCVAM の資料に記載された EC50 値はほぼ一致し、本試験系は精度良く化学物質のエストロゲンアゴニスト作用の予測が可能であることが示された。

表 2-3-8 ER α アゴニスト検出系の精度

Chemical	Cas No.	EC50(M) in CER1	Reference EC50 (M)*
Ethynyl Estradiol	57-63-6	(1.00E-11)	1.10E-11
Diethylstilbestrol	56-53-1	2.40E-11	1.89E-11
Alpha-Estradiol	57-91-0	6.04E-10	4.60E-11
Beta-Estradiol	50-28-2	(1.00E-11)	1.00E-10
Estriol	50-27-1	1.91E-11	7.10E-10
Estrone	53-16-7	4.89E-10	3.20E-09
Zearalenone	17924-92-4	9.05E-10	3.43E-09
17alpha-Methyltestosterone	58-18-4	(4.11E-06)	1.08E-08
Beta-Zearalenol	71030-11-0	4.79E-09	1.50E-08
Coumestrol	479-13-0	6.05E-08	1.50E-08
4-Tert-Octylphenol	140-66-9	1.01E-07	5.00E-08
Genistein	446-72-0	(2.45E-08)	6.20E-08
4-Nonylphenol	84852-15-3	4.91E-07	9.45E-08
Testosterone,19-Nor	434-22-0	5.91E-08	2.12E-07
Daidzein	486-66-8	4.99E-06	2.90E-07
Phloretin	60-82-2	(4.95E-06)	3.00E-07
Levonorgestrel	797-63-7	-	3.30E-07
Bisphenol A	1980-5-7	4.55E-07	3.99E-07
Naringenin	480-41-1	(1.48E-06)	1.00E-06
Methoxychlor	72-43-5	-	8.85E-06
Progesterone	57-83-0	-	-
Atrazine	1912-24-9	-	-

*: Reference EC50 (M) are quoted from "Current status of test methods for detecting endocrine disruptors: in vitro estrogen receptor transcriptional activation assays. NIEHS, 2002".

-: Negative response or EC values could not be calculated.

The EC values in the parenthesis indicates PC50 value in stead of EC50, because the response curve was flattened or non-sigmoidal one.

アンタゴニスト系に関しては、阻害対象となる E2 の最適濃度について、終濃度 10 nM~1 pM の範囲で検討した結果、E2 自身の応答性が飽和しておらず、阻害のダイナミックレンジも狭くないと考えられる 60 pM~6 pM の範囲に E2 濃度の最適化条件が含まれるものと推察された。これら 2 つの条件を考慮して、本試験系で採用している E2 自身の応答曲線から算出された EC80 相当の 25 pM は妥当なものと結論された。

再現性の評価としては算出された 9 回分の $\text{Log}_{10}[\text{IC}_{50}(\text{M})]$ 結果から、4 物質において、それらの標準偏差 (SD) は、0.15~0.27 となり、変動計数 (CV) は 2.6~3.8% と良好な結果が得られた。

表 2-3-9 ヒト ER α を介したレポーター遺伝子アッセイ結果一覧 (アンタゴニスト活性)

化合物名	$\text{Log}_{10}[\text{IC}_{50}(\text{M})]$										平均 ($\text{IC}_{50}(\text{M})$)	SD	2SD	CV(%)
	n													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9					
4-Hydroxytamoxifen	-9.51	-9.86	-9.49	-9.70	-9.14	-9.33	-9.49	-9.17	-9.85	-9.51	(3.12×10^{-10})	0.26	0.53	2.8
Nafoxidine	-7.51	-7.82	-7.54	-7.77	-7.57	-7.21	-7.49	-7.11	-7.54	-7.51	(3.11×10^{-8})	0.23	0.46	3.1
4,4'-(Octahydro-4,7-methano-5H-inden-5-ylidene)	-7.74	-7.29	-7.30	-7.18	-7.02	-6.99	-6.96	-6.86	-6.99	-7.15	(7.10×10^{-8})	0.27	0.54	3.8
RU-486	-5.75	-5.99	-5.89	-5.87	-5.83	-5.53	-5.84	-5.59	-5.69	-5.77	(1.68×10^{-6})	0.15	0.30	2.6

また既報により ER アンタゴニスト作用の判明している 3 種の化学物質、ER アンタゴニストではないことが判明している 2 種の化学物質を用いて測定を行い、文献での結果と比較した結果、既報での結果と本測定系での結果は一致しており、本測定系は ER アンタゴニスト活性検出系として妥当なものと結論される。

表 2-3-10 ER アンタゴニスト陽性、陰性結果比較

化合物名	CAS No.	文献	本測定
4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	陽性 ¹⁾	陽性
RU-486	84371-65-3	陽性 ²⁾	陽性
Nafoxidine	1847-63-8	陽性 ³⁾	陽性
Bisphenol A	80-05-7	陰性 ¹⁾	陰性
Daidzein	486-66-8	陰性 ¹⁾	陰性

1) ICCVAM, 2003.

2) Zou A. et al, 1999.

3) Meyers, F.H. et al, 1980.

更に本試験系について、手法の国際的標準化に向けての検証目的のため、国内の 4 機関で共通のプロトコールで再現性及び技術移転難易度確認のための検証試験を実施した。その結果、技術移転も容易であり、いずれの施設においても高い再現性が確認されたことから、国際的標準化を進めるに当たり、分析法として十分な性能を有していると結論された。

b. アンドロゲン受容体アゴニスト及びアンタゴニスト検出系

検証試験として、既に AR のアゴニスト及びアンタゴニストとして報告されている 40 個の被験化合物について独立した 3 回の試行を行い、ラボ内日間再現性について検討し、更に、同時再現性試験、細胞株の 3 ヶ月間安定性試験を実施し、プロトコールの信頼性及び妥当性評価を行った (Araki et al., 2005)。その結果、DHT を用いたアゴニストアッセイの同時再現性は、シ

グナル値が小さい低濃度域でばらつきが大きくなる傾向があるが、CV 値は 0.40-8.82% (平均 CV=4.35%)、Hydroxyflutamide を用いたアンタゴニストアッセイは、CV 値は 2.17-9.30% (平均 CV=5.51%) と、非常に高い同時再現性を示すことがわかった。また、独立した 3 回の試行を行った日間再現性試験については、Linuron や Corticosterone など弱く反応する物質の CV 値は 30%以上であったが、DHT、R1881、Testosterone、Methyltestosterone の EC50 値の CV 値は、30%以下であった。EC50 値の日間 CV 値の平均値は 40.72%、PC50 値では、36.6%であった (Araki et al., 2005)。また、IC50 値の平均 CV 値は、37.2%であった。これらの結果から、シグナルが弱い化合物は日間での EC50、IC50 値のばらつきが大きくなる傾向があるが、実用的に十分な再現性が認められることが確認された。

AR レポーター遺伝子アッセイ系の信頼性及び妥当性に関して、これまで文献で報告されている測定データ (ICCVAM, 2003) を基準として specificity (特異性)、sensitivity (感度)、accuracy (精度)、false-positive rate (偽陽性率)、false-negative rate (偽陰性率) を算出し評価した。その結果、アゴニスト検出試験に関しては、特異性 94%、感度 89%、精度 91%、偽陽性率 6%、偽陰性率 11%であった。アンタゴニスト検出試験に関しては、特異性 100%、感度 94%、精度 96%、偽陽性率 0%、偽陰性率 6%であった。

更に本試験系について、手法の国際的標準化に向けての検証目的のため、国内の 4 機関で共通のプロトコールで再現性及び技術移転難易度確認のための検証試験を実施した。その結果、技術移転も容易であり、いずれの施設においても高い再現性が確認されたことから、国際的標準化を進めるに当たり、分析法として十分な性能を有していると結論された。

c. OECD における海外技術動向

OECDでは2003年に非動物試験法検証管理グループ会議(Non-animal Validation management group、VMG-NA)が組織され、レポーター遺伝子アッセイを含む、*in vitro*試験の検証が進められている。VMG-NAでは我が国で進められているER α 及びAR系のレポーター遺伝子アッセイの他、米国でLUMI-CELL™を用いるER系レポーター遺伝子アッセイの検証作業が進められており、MDA-kb2細胞を用いるAR系レポーター遺伝子アッセイ、ER-CaLUX、AR-CaLUX、PALM細胞を用いた試験系が紹介されており、今後、試験法の検証が進められる予定。第3回VMG-NA会議が2005年12月14-15日に開催され、我が国で進められているAR系のレポーター遺伝子アッセイの検証作業の進捗状況を報告した。第2回VMG-NA会議で報告したER α 系のレポーター遺伝子アッセイの検証作業について、今後、追加検証試験等が必要かどうかの評価が行われる予定である。

③ 試験法としての評価

a. ER α アゴニスト検出系

hER α -HeLa-9903 (住友化学)を用いる安定形質株による試験系である。この試験系は再現性及び試験精度を評価するプレバリデーション試験及び複数試験施設による再現性、技術移転難易度の評価等を既に実施し、非常に良好な結果が得られている。また、既に1000物質を超えるデータの蓄積を有していることから、本試験系は十分に検証され、実用に耐える試験系として

確立したと判断される。

b. ER α アンタゴニスト検出系

hER α -HeLa-9903（住友化学）を用いる安定形質株による試験系である。この試験系は再現性及び試験精度を評価するプレバリデーション試験を終了し、非常に良好な結果が得られている。また、既に 250 物質のデータの蓄積を有しているが、動物実験（子宮増殖アッセイ）との比較において、アンタゴニスト作用検出系において結果の相違がみられることから、結果の相違を生じるメカニズムの解析を含めた更なる検証作業が必要と判断される。

c. ER α / β アゴニスト検出系

HeLa 細胞（CCL-2）及び hER α /pcDNA3.1、hER β /pcDNA3.1 及び ERE-AUG-Luc を用いた一過性発現系である。本試験系により、ER α /ER β アゴニスト作用の相違を評価することが可能であるが、化合物による ER の選択性の違いが生体においてどのような生理的作用の相違を生み、毒性学的意義を持つものかについては現時点では明白な示唆は得られていない。こうした点に関しては今後、ER α 、ER β の生理学的意義の解明とともにリガンドのこれらに対する反応性の違いと毒性影響との関連性について検討することが必要と思われる。

d. AR アゴニスト検出系

AR Eco-screen（Otsuka Pharmaceutical）を用いる安定形質株による試験系である。この試験系は再現性及び試験精度を評価するプレバリデーション試験及び複数試験施設による再現性、技術移転難易度の評価等を既に実施し、非常に良好な結果が得られている。また、既に 500 物質を超えるデータの蓄積を有していることから、本試験系は十分に検証され。実用に耐える試験系として確立したと判断される。

e. AR アンタゴニスト検出系

AR Eco-screen（Otsuka Pharmaceutical）を用いる安定形質株による試験系である。この試験系は再現性及び試験精度を評価するプレバリデーション試験及び複数試験施設による再現性、技術移転難易度の評価等を既に実施し、非常に良好な結果が得られている。また、既に 500 物質を超えるデータの蓄積を有していることから、本試験系は十分に検証され。実用に耐える試験系として確立したと判断される。

(7) 今後の課題と展望

① エストロゲン受容体

ER α アゴニスト検出系に関してはこれまでの検証結果を基に国際貢献として OECD でのテストガイドライン化に向けた作業を進める必要がある。また、本実験系に関しては Genistein 等にみられる通常、天然リガンド（E2）によって引き起こされるアゴニスト作用を遙かに超える反応、アンタゴニスト作用において *in vivo* 試験との相違を生じるメカニズム、特に複数の受容体が存在する条件下での挙動、ER α /ER β 測定系に関しては化学物質のこれらの受容体に対する反応性の違いと毒性影響との関連性等を明らかにし、本実験系の意義を明白にする必要がある。

② アンドロゲン受容体

AR レポーター遺伝子アッセイ系に関しても、これまでの検証結果を基に国際貢献として OECD でのテストガイドライン化に向けた作業を推進する必要がある。

一方、高生産量化学物質を対象として基礎データ収集を行った過程で、アンタゴニストアッセイを行った際に、4-Hydroxy-4'-nitrostilbene をはじめとする多くの化合物でルンフェラーゼの転写活性が標準物質である DHT の最大レベルを大きく超える物質が存在することがわかった。これらの物質はアゴニストアッセイでも検出されているが、単独での転写活性の上昇はわずかである。DHT と共存したときのみ現れるこれらの協同的な活性上昇は、GR と反応する物質にこの現象が多く見られことから、CHO が内在性に発現している GR もしくは他の共役因子を介して何らかのクロストークを起こして生じた現象と考えられる。今後は、このような現象の分子的作用メカニズムの解明についても検討を加える必要があると考えられる。

(8) 参考文献

- Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR). (1998) Toxicological Profile for 3, 3'-dichlorobenzidine.
- Araki, N., Ohno, K., Takeyoshi, M. and Iida, M. (2005) Evaluation of a rapid *in vitro* androgen receptor transcriptional activation assay using AR-EcoScreen™ cells. *Toxicology in vitro*, **19**, 335-352.
- Colborn, T. (1995) Environmental estrogens: health implications for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* **103**, Suppl 7, 135-136.
- Daston, G.P., Cook, J.C. and Kavlock, R.J. (2003) Uncertainties for endocrine disruptors: our view on progress. *Toxicological Sciences*, **74**, 245-252.
- Iba, M.M. (1989) Activation of 3,3'-dichlorobenzidine: enzymic basis and toxicological consequences. *Drug Metab. Rev.*, **21**, 377-400.
- Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (2003) ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods For Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays. NIH Publication No. 03-4503. May 2003.
- Kelce, W.R., Stone, C.R., Laws, S.C., Gray, L.E., Kemppainen, J.A. and Wilson, E.M. (1995) Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, **375**, 581-585.
- Kojima, H., Iida, M., Katsura, E., Kanetoshi, A., Hori, Y. and Kobayashi, K. (2003) Effects of a diphenyl ether-type herbicide, chlornitrofen, and its amino derivative on androgen and estrogen receptor activities. *Environ Health Perspect*, **111**, 497-502.
- Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K. and Kobayashi, K. (2004) Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by *in vitro* reporter gene assays using chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect*, **112**, 524-531.
- Lambright, C., Ostby, J., Bobseine, K., Wilson, V., Hotchkiss, A.K., Mann, P.C. and Gray, L.E., Jr. (2000) Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide

- that produces reproductive malformations in male rats. *Toxicological Sciences*, **56**, 389-399.
- National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) 2002, Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Transcriptional Activation Assays, Prepared by The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)
- Ma, R., Cotton, B., Lichtensteiger, W. and Schlumpf, M. (2003) UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicological Sciences*, **74**, 43-50.
- Maness, S.C., McDonnell, D.P. and Gaido, K.W. (1998) Inhibition of androgen receptor-dependent transcriptional activity by DDT isomers and methoxychlor in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **151**, 135-142.
- Meyers, F.H., Jawetz E. and Goldfin A.. (1980). *In: Review of Medical Pharmacology*, 7th edition, Maruzen Asian
- Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., Dakeyama, F., Saito, K., Imagawa, M., Takatori, S., Kitagawa, Y., Hori, S. and Utsumi, H. (2000) Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay. *J. Health Sci.* **46**, 282-298.
- Satoh, K., Ohyama, K., Aoki, N., Iida, M. and Nagai, F. (2004) Study on anti-androgenic effects of bisphenol a diglycidyl ether (BADGE), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives using cells stably transfected with human androgen receptor, AR-EcoScreen. *Food Chem Toxicol* **42**, 983-993.
- Takeyoshi, M., Kuga, N. and Yamasaki, K. (2003) Development of a high-performance reporter plasmid for detection of chemicals with androgenic activity. *Arch. Toxicol.* **77**, 274-279.
- Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Sawaki, M., Nakai, M., Noda, S. and Takatsuki, M. (2002) The efficacy of endocrine disruptor screening tests in detecting anti-estrogenic effects downstream of receptor-ligand interactions. *Toxicol. Lett.*, **126**, 91-98.
- Wilson, V.S., Lambright, C., Ostby, J. and Gray, L.E., Jr. (2002) *In vitro* and *in vivo* effects of 17 β -trenbolone: a feedlot effluent contaminant. *Toxicological Sciences* **70**, 202-211.
- Zou, A, Marschke K.B., Arnold, K.E., Berger, E.M., Fitzgerald, P., Mais, D.E. and Allegretto, E.A. (1999) Estrogen receptor beta activates the human retinoic acid receptor alpha-1 promoter in response to tamoxifen and other estrogen receptor antagonists, but not in response to estrogen. *Mol Endocrinol.* **13**, 418-430.

2-4. 受容体結合試験法とレポーター遺伝子アッセイの関係

(1) エストロゲン受容体に対する性能比較

これまでに、1,457物質について、ヒトER α リガンド結合ドメインを用いた結合試験及びヒトER α を用いたレポーター遺伝子アッセイ（アゴニスト活性検出系）を実施した。なお、250物質についてはアンタゴニスト活性も測定したが、これらのうち、結合性及びアゴニスト活性を示さず、アンタゴニスト活性のみ示した物質は1物質のみであり、また、アンタゴニスト活性の検出感度が低かったことから、アゴニスト活性検出系について議論を行った。受容体結合試験及びアゴニスト活性検出レポーター遺伝子アッセイで得られた結果を表2-4-1に2分割表としてまとめた。結合試験の陽性は両試験の一致率は82%であった。さらに、両試験系で陽性と判定された試験物質について、定量的な比較を行った（図2-4-1）。ここで、ERレポーター遺伝子アッセイの試験条件上、非常に強い転写活性化を誘導する試験物質については、PC₁₀を定量することができないため、便宜的に最小濃度区の 1×10^{-11} MをPC₁₀値とした。図2-4-1のように、両者の関係はほぼ正の比例関係にあったが、RBA値が0.1%より低い領域では、PC₁₀値の変化が小さくなり、全体的に「J」型の相関がみられた。

両試験系で陽性と判定された244物質から、相関から外れる物質を除いて定量的に解析可能だった210物質について相関解析を行ったところ、相関係数 r^2 は0.68、分散 s は0.26という結果が得られた。相関性は比較的良好であったが、表2-4-1のように、それぞれの試験系のみでは検出されない化学物質が多く存在したことから、ERを介した内分泌かく乱作用が疑われる化学物質のスクリーニングには、両試験系を実施することが重要であると考えられる。

表2-4-1 2分割表によるER結合試験とレポーター遺伝子アッセイの比較

		レポーター遺伝子アッセイ ^b		計
		陽性	陰性	
結合試験 ^a	陽性	244	99	343
	陰性	170	944	1,114
計		414	1,043	1,457

^a IC₅₀値が算出できた試験物質を陽性と判定した。

^b PC₁₀値が算出できた試験物質を陽性と判定した。

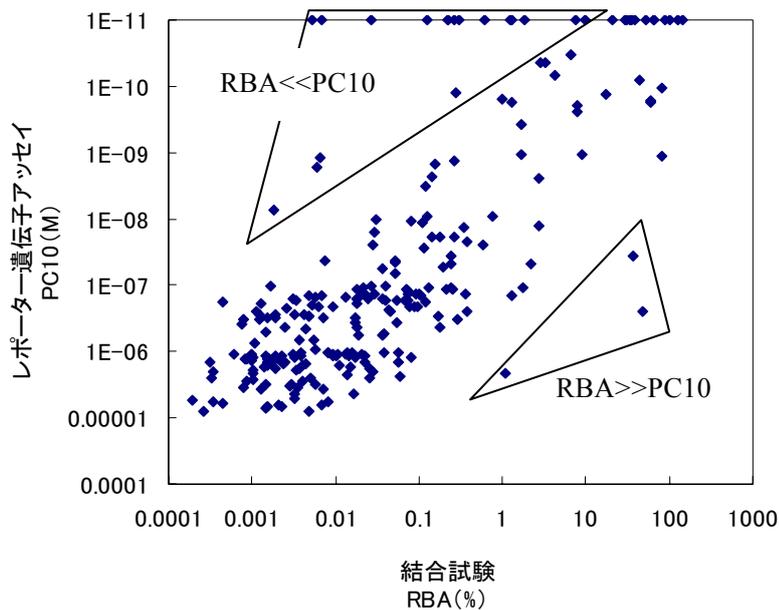


図 2-4-1 結合試験とレポーター遺伝子アッセイの関係

図 2-4-1 において、両試験の関係から大きく外れた試験物質群（結合性>>転写活性可能あるいは結合性<<転写活性可能）について、その構造から原因を考察した。

① 結合性>>転写活性化能（図 2-4-1、 $RBA \gg PC_{10}$ の領域）

この領域に含まれた 3 物質のうち、2 物質は ER アンタゴニストの特徴的的化学構造であるトリフェニルエチレン骨格をもっていた。

② 結合性<<転写活性化能（図 2-4-1、 $RBA \ll PC_{10}$ の領域）

この領域に含まれた 16 物質のうち、11 物質は分子内にエステル結合をもっていた。これらの予想加水分解産物は特徴的なエストロゲン骨格を有しており、細胞内での加水分解によって活性な構造になったことが推測された。

さらに、結合性のみ測定された物質（99 物質）及び転写活性化のみ測定された物質（170 物質）について考察を行った。

③ 結合性のみ測定された物質（99 物質）

a. RBA 値が 0.01%以下の物質（67 物質）

上述のように、RBA 値が 0.1%より小さくなると、結合性と転写活性可能の間の直線性が乏しくなる。特に、 PC_{10} のRBA値 0.01%との交点はレポーター遺伝子アッセイの最大試験濃度である 10 μ Mに相当するため、RBA 値が 0.01%以下の物質はレポーター遺伝子アッセイの検出下限以下である可能性があることが原因と考えられる。

b. RBA 値が 0.01%より大きい物質 (32 物質)

32 物質のうち、10 物質はアンタゴニスト活性が認められており、アゴニスト活性が検出されなかった点に問題はなかった。また、残りの 22 物質にはジフェニルメタン骨格を有する試験物質が 8 物質含まれていた。これらのなかには比較的かさ高い試験物質が多く含まれており、転写活性化に必要な転写活性化因子との結合に至適な受容体構造変化を誘起できなかった可能性がある。

これらの他に、有機スズ化合物 1 物質とカーバメート系農薬 2 物質が含まれていた。有機スズ化合物は非常にタンパク質変性作用が強く、また、カーバメート系農薬はもともとコリンエステラーゼ阻害剤として作用することから、得られた RBA 値が、リガンド結合部位への特異的な結合によるものなのか、あるいは受容体タンパク質への非特異的な作用によるものなのか、現段階では不明である。

その他、フラボン誘導体が 2 物質含まれていたほかに特徴的な共通の構造要因はみられなかった。

④ 転写活性化のみ測定された物質 (170 物質)

ここで、結合試験では IC_{50} が算出できた化学物質を陽性とし、レポーター遺伝子アッセイでは PC_{10} (エストラジオールによる最大活性化倍率の 10%を与える試験物質濃度) が算出できた化学物質を陽性としたため、陽性及び陰性の判定基準が両者で異なっている。そこで、結合性を示したが、 IC_{50} 値が算出できなかった物質 (45 物質) を除き、なおかつ、 PC_{10} が 1 μ M以上の非常に弱い転写活性可能しか示さなかった物質は結合試験においても検出下限付近である可能性が高いため、それら 81 物質を除いた 43 物質について構造的な特徴を考察した。

これらのうち、14 物質はエステル結合の加水分解等の代謝反応により、活性な化学構造への変化が生じたことが予想された。また、フラボン、イソフラボンの誘導体が 5 物質含まれていた。その他の化学物質については、特徴的な共通の構造要因はみられなかった。フラボン誘導体は「結合性のみ測定された」あるいは「転写活性化のみ測定された」物質群のいずれにも属していることがわかった。これらの構造的な特徴として、結合性のみ認められた 2 物質にのみ、B 環 4'位にヒドロキシ基が存在していた。

(2) アンドロゲン受容体に対する性能比較

これまでに、765 物質について、ヒト AR を用いた結合試験及びレポーター遺伝子アッセイ (アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性検出系) を実施した。これらの *in vitro* 試験で得られた結果を表 2-4-2 の 2 分割表にまとめた。レポーター遺伝子アッセイについては、アゴニスト活性あるいはアンタゴニスト活性のいずれかが検出された物質を陽性とした。両試験の一致率は 82%であった。さらに、両試験系で陽性と判定された試験物質について、定量的な比較を行った (図 2-4-2 及び図 2-4-3)。両者の関係はほぼ正の比例関係にあったが、RBA 値が約 0.03%より小さい化学物質はレポーター遺伝子アッセイでほとんど検出されておらず、結合試験における RBA 値 0.001~0.01%付近がレポーター遺伝子アッセイの検出下限であると予想された。また、ER と同様に、それぞれの試験系のみでは検出されない化学物質が多く存在したことから、AR を介した内分泌かく乱作用が疑われる化学物質のスクリーニングについても

両試験系を実施することが重要であると考えられる。

図2-4-2及び図2-4-3において、両試験の関係から大きく外れた試験物質群（結合性>>転写活性可能、結合性<<転写活性可能、結合性<<転写阻害能）について、その構造的特徴などを考察した。

表2-4-2 2分割表によるAR結合試験とレポーター遺伝子アッセイの比較

		レポーター遺伝子アッセイ ^b		計
		陽性	陰性	
結合試験 ^a	陽性	150	104	254
	陰性	37	474	511
計		187	578	765

^aIC₅₀値が算出できた試験物質を陽性と判定した。

^bPC₁₀値あるいはIC₃₀値が算出できた試験物質を陽性と判定した。

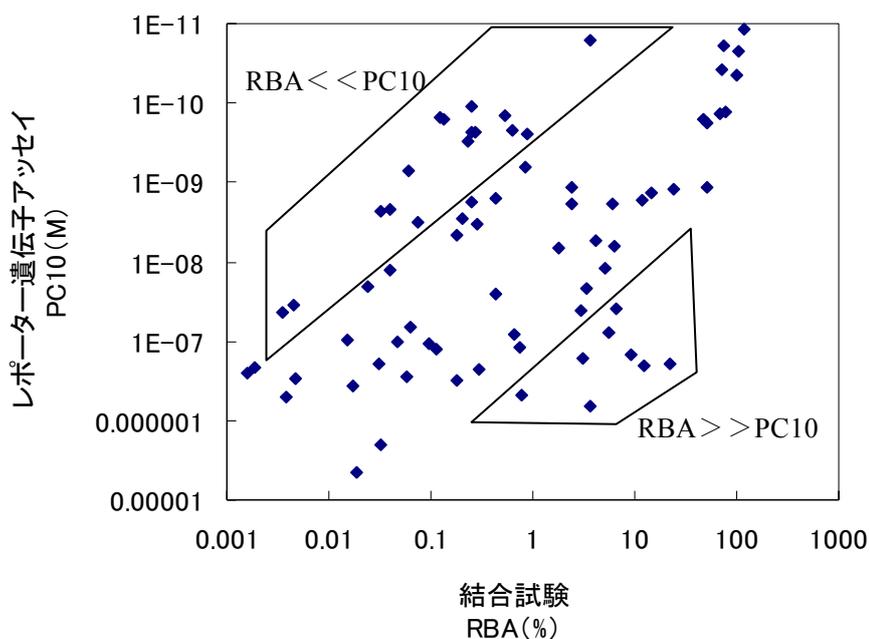


図2-4-2 結合試験とアゴニスト活性の関係

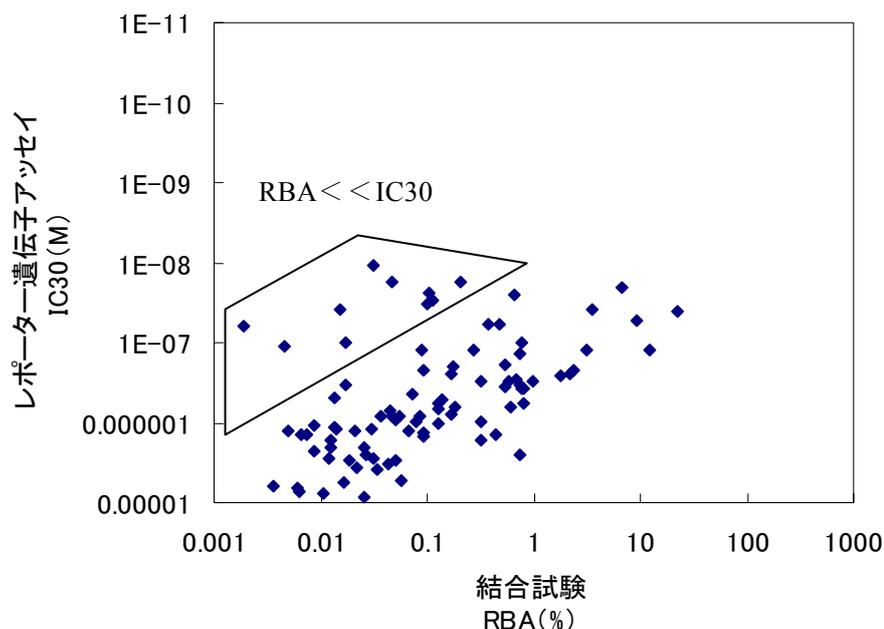


図 2-4-3 結合試験とアンタゴニスト活性の関係

① 結合性 >> アゴニスト活性 (図 2-4-2、RBA >> PC₁₀ の領域)

この領域に含まれた 8 物質のうち、7 物質はアンタゴニスト活性を示していた。残りの 1 物質は 17 位グルクロン酸抱合体であった。

② 結合性 << アゴニスト活性 (図 2-4-2、RBA << PC₁₀ の領域)

この領域に含まれた 16 物質はすべてステロイド類であった。9 物質は分子内にエステル結合を有しており、細胞内での加水分解によって活性な構造になったことが推測された。残りの 7 物質のうち、4 物質はいずれも 17-ケト基が存在していた。また、残りの 3 物質はいずれもコルチゾール骨格であり、分子内にフッ素原子が存在していた。

③ 結合性 << アンタゴニスト活性 (図 2-4-3、RBA << IC₃₀ の領域)

この領域に含まれた 10 物質のうち、9 物質はステロイド類であり、残りの 1 物質は多環芳香族であった。9 物質のステロイド類のうち、8 物質はエストロゲン骨格を、1 物質はプロゲステロン骨格を有していた。エストロゲン骨格をもっていた 8 物質のうち、6 物質は分子内にエステル結合を有していた。

さらに、結合性のみ測定された物質 (104 物質) 及びアゴニスト活性あるいはアンタゴニスト活性のみ測定された物質 (37 物質) について考察を行った。

④ 結合性のみ測定された物質 (104 物質)

a. RBA 値が 0.01% 以下の物質 (50 物質)

上述のように、RBA 値が 0.01% より小さくなると、レポーター遺伝子アッセイで検出される化学物質はほとんどないことから、検出下限値以下である可能性が考えられた。

b. RBA 値が 0.01%より大きい物質 (54 物質)

この分類に含まれた試験物質の間には明確な構造的特徴はなかった。

⑤ レポーター遺伝子アッセイにおいてのみ検出された物質 (37 物質)

a. アゴニスト活性アンタゴニスト活性いずれも測定された物質 (1 物質)

アゴニスト活性アンタゴニスト活性いずれも測定された物質は 1 物質(エストロゲン誘導体)のみであり、分子内にエステル結合をもっていたため、細胞内での代謝活性化が生じたことが予想された。

b. アゴニスト活性のみ測定された物質 (18 物質)

結合性を示さず、アゴニスト活性のみが測定された 18 物質のうち、3 物質は結合試験において結合性を示したが、 IC_{50} 値が算出できなかった物質であったため、本考察から除外した。レポーター遺伝子アッセイからみた結合試験の検出下限はほぼ $1 \mu M$ であり、残り 15 物質のうち、 PC_{10} が $1 \mu M$ 以下の物質 (8 物質) は結合試験で検出されない可能性がある。その他の 7 物質のうち、1 物質について、エステル結合の加水分解による代謝活性化が予測された。また、2 物質がアゾ化合物、2 物質がトランススチルベン骨格をもつ化学物質であった。残りの 2 物質については、構造的な特徴はみられなかった。

c. アンタゴニスト活性のみ検出された物質 (18 物質)

結合性を示さず、アンタゴニスト活性のみが測定された 18 物質のうち、3 物質は結合試験において結合性を示したが、 IC_{50} 値が算出できなかった物質であったため、本考察から除外した。15 物質のうち、エステル結合の加水分解等の代謝が予想されたのは 3 物質であった。残りの 12 物質のうち、4 物質には分子内にメチルエーテル (メトキシ基) が存在していた。また、3 物質は直鎖アルキル基をもつアルキルフェノールであった。その他の 5 物質については、構造的な特徴はみられなかった。

(3) ER/AR を標的とする化学物質のスクリーニング目的への組合せ利用

(1) 及び (2) において、受容体結合試験とレポーター遺伝子アッセイの関係を検討した。結合試験とレポーター遺伝子アッセイの一致率は ER 及び AR いずれの受容体に対しても約 82%と良好な関係があった。両試験系で一致しなかった物質の多くは、それぞれの試験系での検出下限値付近あるいは細胞内での代謝による構造変化が予測された物質であり、82%という一致率は、化学物質の受容体結合を介した作用をスクリーニングする試験法として非常に高く、いずれの試験もスクリーニング試験法としての適用性が確認されたと考えられる。

ER に関して、結合性及びアゴニスト活性を示さず、アンタゴニスト活性のみが検出された試験物質は 250 物質中 1 物質しかなかった。このことは、結合試験とアゴニスト活性を測定することで、ER を介した作用を示す可能性のあるほとんどの化学物質をスクリーニングすることが可能であることを示唆している。

一方、AR に関しては、結合性及びアゴニスト活性を示さず、アンタゴニスト活性のみが検

出された試験物質、ならびに結合性及びアンタゴニスト活性を示さず、アゴニスト活性のみが検出された試験物質はいずれも 765 物質中 18 物質存在したため、結合性の測定とともに、アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性の測定は重要であると考えられた。また、結合試験のみで陽性と検出された試験物質が 765 物質のうち 104 物質存在し、そのうち、RBA 値が 0.01%より大きい物質が 54 物質存在した。これらの物質群の結合性が培養細胞を利用した試験で陰性となった原因は不明であるが、無細胞系での試験結果と *in vivo* 試験との結果を比較することで、*in vitro* 試験間の違いが妥当であるかどうか検討することが可能であると考えられる。

また、これまでに *in vitro* 試験を実施した試験物質のうち、ER 及び AR いずれの試験系も実施した物質は 756 物質であった。受容体結合性に関して、表 2-4-3 のように、それぞれの受容体に対する結合性をまとめた。ER あるいは AR に対してのみ結合性を示した試験物質はそれぞれ 51 物質及び 118 物質存在しており、結合性の受容体特異性が存在することが明らかとなった。さらに、ER/AR いずれの受容体に対しても結合性を示した 130 物質の結合性特異性を調べるために、それぞれの結合試験で得られた RBA 値に着目し、同一試験物質について、いずれかの受容体に対して 5 倍以上大きい RBA 値を示した物質数を算出したところ、ER に特異的に結合した物質は 60 物質、AR に特異的に結合した物質は 40 物質存在していることがわかった。以上の結果から、化学物質の受容体結合の特異性には受容体間差があることが明らかとなり、受容体結合を介した作用を示すと考えられる化学物質のスクリーニングには ER 及び AR いずれも必要であることが示唆された。

表 2-4-3 試験物質の ER/AR に対する結合性の比較

結合の特異性	物質数		結合の特異性	物質数
ER/AR いずれも陽性	130	/	ER 結合性 >> AR 結合性	60
ER のみ陽性	51		ER 結合性 = AR 結合性	30
AR のみ陽性	118		ER 結合性 << AR 結合性	40
ER/AR いずれも陰性	457			
計	756			

2-5. アロマトラーゼ・アッセイ

(1) 目的

ホルモン合成酵素の一種であるアロマトラーゼの活性を変動させ、性ホルモン量の変動を介して内分泌作用に影響を及ぼす可能性のある化学物質を簡便にスクリーニングする方法を確立するため、放射活性を用いない大量処理可能な測定法を開発するとともに、基礎的なデータを取得する。

(2) 原理

アロマトラーゼは上述のように、男性ホルモンを女性ホルモンに可逆的に変換する酵素である。ヒト卵巣顆粒細胞癌患者由来の組織から樹立したクローン化ヒト卵巣顆粒膜細胞株である KGN 細胞はこのアロマトラーゼ活性を有している細胞株である。この KGN 細胞は機能的 FSH 受容体の発現や cAMP によるアロマトラーゼの調節機構を有する点で、正常卵巣顆粒膜細胞によく類似しているとともに、ホルモン合成酵素である 17α -hydroxylase の活性が欠損または非常に低いという性質を有しており、アンドロステンジオンやテストステロンを外部より添加しない限り E1 及び E2 をほとんどホルモン生合成できないという特徴を持ち合わせていた(図 2-5-1 参照)。我々はこの KGN 細胞の性質に着目し、アンドロステンジオンを細胞に添加しホルモン生合成する E1 の濃度を測定することによってアロマトラーゼ活性を評価する方法を開発した。E1 の測定には大量スクリーニングに適応するため ELISA 法を採用し、同時に AlamarBlue 試薬により細胞毒性の測定を行った。

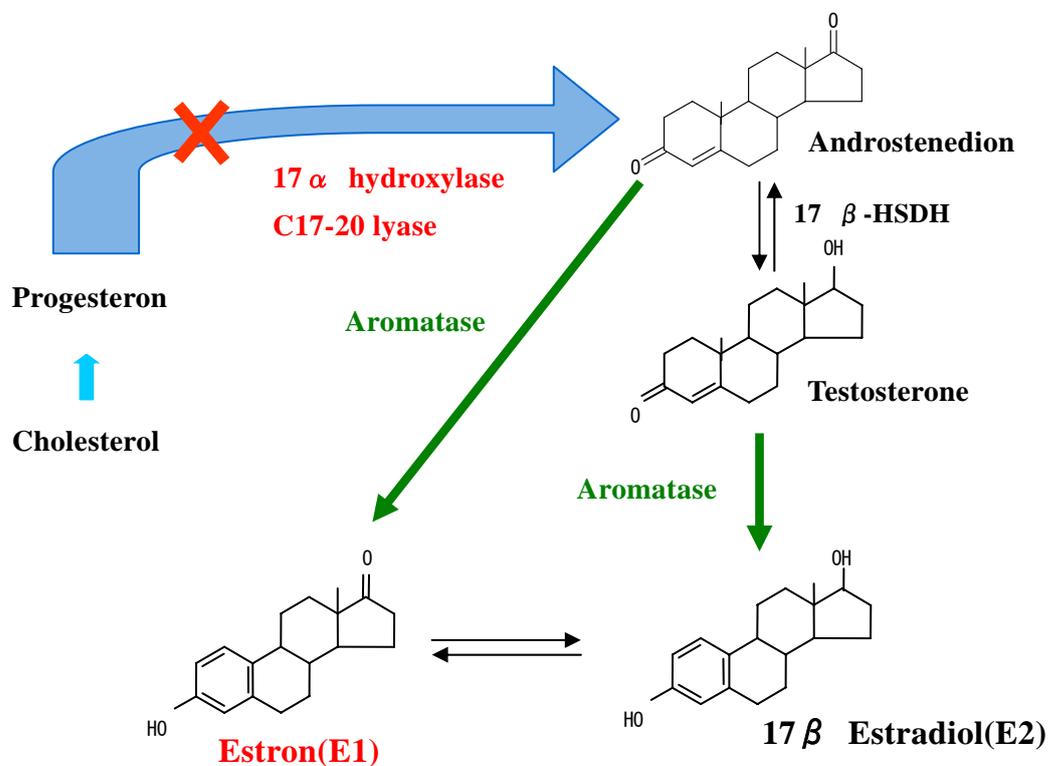


図 2-5-1 本測定法の原理図 (KGN 細胞の特徴)

(3) 方法

本測定方法の概念図を図 2-5-2 に示し、以下にその概要を簡潔に説明する。

① KGN 細胞の培養方法及びアッセイプレートの作製

KGN細胞の培養には 175cm²フラスコ (Nunc社製) を用い、培養液には 5% (v/v) FBS (JRH社製) を含むDMEM/F-12 Medium (Gibco社製) を用いて 37℃、5% CO₂ 条件下で培養を行った。およそ 3~4 日に一度の頻度でフラスコが 60~80%コンフルエントの状態、継代を行った。継代方法は 5%トリプシンによる処理を行い、培養液で懸濁し、これを 1,000rpmで 5 分間遠心した後に上清みを捨て、培養液で再懸濁した。またアッセイ用プレート作成には、細胞をトリプシン処理にて剥離した後に 5% (v/v) c-FCS (デキストランをコートし、かつ、チャコール処理した市販のFBS, Hyclone社) を含むD-MEM/F-12 培養液 (フェノールレッド非添加) で懸濁し、この細胞懸濁液を 180μl/wellの量で細胞培養用 96 ウェルプレート (黒色、Nunc社) に調製した。作製したアッセイプレートは同じく 37℃、5% CO₂ 条件下で培養した。

② 被験物質の調製

各々の被験物質について、最終濃度が 100mM (一部の物質については 10mM) になるように DMSO で溶解し、そのストック溶液は-20℃にて冷凍保存した。基質であるアンドロステンジオンのストック液は同様に調製し 10mM とした。

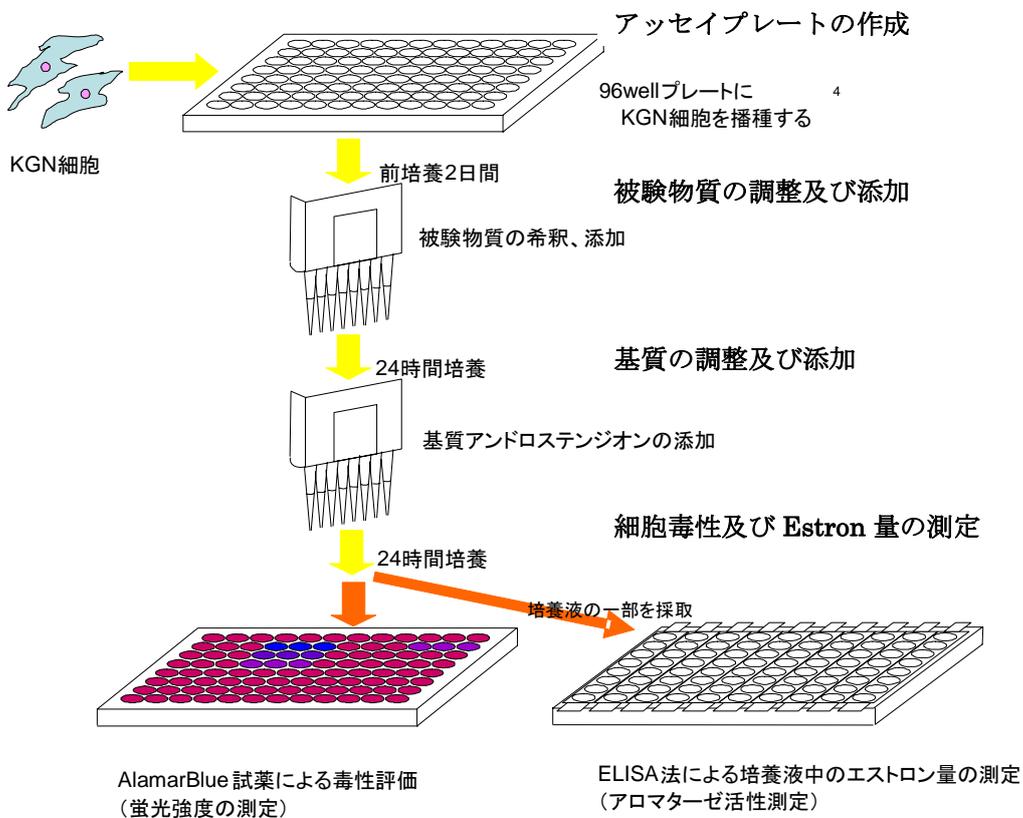


図 2-5-2 本測定方法の概念図

③ 被験物質の希釈方法及び添加

被験物質は Nunc 社のポリプロピレン製 96 ウェルプレートを使用し、DMSO で列方向に被験物質の希釈系列を作成し、次に血清を含まない DMEM/F-12 培養液にて 10 倍希釈し、その後さらに血清を含まない DMEM/F-12 培養液で 5 倍希釈する。以上の操作で調製した被験物質溶液を、180 μ l で培養していたプレートに 8 連ピペットを用いて 10 μ l ずつ添加する（基質を加えると最終的に 10 倍希釈、かつ DMSO 濃度 0.15%）。本アッセイは三重測定（あるいは二重測定）とした。これらの被験物質の希釈系列を培養液に添加し、さらに 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養する。

④ 基質の調製及び添加

基質であるアンドロステンジオンは、使用する時に 10mM ストック溶液から、DMSO を用いて適宜希釈し、さらに血清を含まない培養液を用いて 100 倍希釈して DMSO 濃度を 1% としておく。この方法で調製した基質を、被験物質を既に添加しておいたアッセイプレートに 10 μ l 添加する（DMSO 最終濃度は被験物質の添加分を含め 0.15%）。基質を加えた後、さらに 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下で適宜培養する。

⑤ 培養液の回収及び細胞毒性の測定

被験物質及び基質を添加した後の培養液中に含まれるエストロン量を ELISA で測定するために、8 連ピペットを用いて 120 μ l/ウェルの量の培養液を別のポリプロピレン製マイクロプレートに移す。すぐに ELISA 測定を行わない場合はプレートを密閉して、-20 $^{\circ}$ C にて保管する。残った培養液については被験物質の及ぼす細胞毒性を調べるため、培養液残量の 10% 容量である 8 μ l/ウェル量の AlamarBlue 試薬（Soretect 社）を添加し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下で 3~4 時間培養する。3~4 時間後、マルチプレートリーダー（Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンター）にて蛍光強度を測定した（励起波長:544nm 蛍光波長:590nm 0.1 秒間測定）。蛍光強度の単位は CPS。

⑥ Estrone ELISA での測定

回収した培養液中に含まれるエストロン濃度は Estrone ELISA を用いて測定した（回収した培養液を凍結保存した場合、あらかじめ室温に戻してから測定）。測定方法はキットに添付された操作書に従って行ったが、発色反応には添付の ODP 錠を用いた発色方法ではなく市販の高感度 TMB 溶液（ScyTek 社）を用いて発色反応を行った。発色反応後、反応を停止液で停止させてから、ただちにマルチプレートリーダー（Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンター）にて 450nm の吸光度を測定した。また吸光度から Estrone 濃度の算出には、Molecular Devices 社の吸光度測定器に付属された SOFTmax Pro を用いて算出した。エストロン濃度の単位は pg/ml である。

⑦ アロマターゼ活性の評価

アロマターゼ活性は、被験物質添加のないコントロールにおけるエストロン濃度値と各々の濃度における値の比率を計算し、評価した。本アッセイでアロマターゼ阻害作用を検出した化

合物については、コントロールに対するアロマターゼ比率の値から、解析ソフトである GraphPad PRISM (version4) を用いて IC50 を算出した (近似曲線には Sigmoidal dose response [variable slope] の関数を用いた)。

⑧ 測定系の最適化

本測定法の性能を左右する主なパラメーターとして、a. 基質濃度、b. 前培養時間、c. 基質との培養時間及び細胞濃度が考えられた。そのためこれらのパラメーターの最適化を行いより感度のよい測定系の構築を図った。

a. 基質濃度の検討

アンドロステンジオンの K_m 値は *in vitro* のミクロソームを用いた実験から約 40nM であると報告されており、これを参考とし最適な基質濃度の設定を行った。アッセイプレートに 1.8×10^4 cell/well の KGN 細胞を播種し、2 日後に最終濃度が 10 μ M から 100pM までになるように 10 倍希釈系列の基質 (アンドロステンジオン) を培養液に添加し、1、2、3、6、12、24 時間後のそれぞれの培養液中に含まれるエストロン量を Estrone ELISA を用いて測定した。

b. 前培養時間

アンドロステンジオン添加までの培養時間について、検討を行った。細胞を 1.8×10^4 cell/well で播種し 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下で培養する。それから 1 日後、2 日後、3 日後、4 日後に最終濃度が 5nM のアンドロステンジオンを添加し、基質添加から 24 時間後に培養液を回収し、Estrone ELISA を用いて培養液中のエストロン濃度を測定した。

c. 基質との培養時間及び細胞数

さらに基質の量、また基質との培養時間及び細胞数の条件検討を行った。

(4) 試験物質

① 検証試験に用いた物質

本測定系の妥当性を探るため、他の *in vitro* 実験法で報告された文献からアロマターゼかく乱作用を疑われている 21 化合物を選択し、本測定での検討を行った。21 化合物の分類はフラボノイド類、殺虫剤、農薬類、入手できる医薬品類である。

② スクリーニング試験の実施

(財) 化学物質評価研究機構より供与された 168 物質 (付録) を被験物質とした。各々の化合物について、最終濃度が 100mM になるように DMSO で溶解し、そのストック溶液は -20 $^{\circ}$ C にて冷凍保存した。(一部の物質は最終濃度が 10mM となった。)

(5) 結果

① 測定系の最適化

a. 基質濃度の検討

結果を図2-5-3に示す。この結果より、10 μ M~10nMまでのアンドロステンジオン量の添加ではホルモン生合成されるエストロン量はほぼ変わらずV_{max}の濃度であることが推測され、基質濃度が1nM、100pMと次第にエストロンホルモン生合成量が減少する。K_m値はv=1/2V_{max}を与える基質濃度であることから、本研究の阻害作用の検出におけるアンドロステンジオン量は反応速度がV_{max}のおよそ50%付近と推測される最終濃度5nMで測定することとした(5nMアンドロステンジオン添加した時の別の結果をグラフに重ねて示してある)。

b. 前培養時間

24回繰り返しCV値を算出したところ、2日後以降はCV値がほぼ一定になることを確認し、2回の試行で同様の傾向が見られた事から、2日目に被験物質及び基質の添加を行うこととした(表2-5-1参照)。

c. 基質との培養時間及び細胞数

エストロンELISAの検量線のグラフから20~100pg/mlの領域で最もばらつきが少ないことが予想される。このことより5nMのアンドロステンジオンの場合培養時間は24時間とし、また上昇活性をより明確に検出できると推測される基質濃度が100倍高い500nMの場合培養時間を3時間と短くして、それぞれの場合のエストロン濃度のばらつきをCV値で評価した(表2-5-2参照)。またこれらの条件に、1ウェルあたりの細胞数を1.8 \times 10⁴cellと0.9 \times 10⁴cellとした場合の検討も同時に行った。これも2回の試行をおこなったが、2回とも0.9 \times 10⁴cell/wellの細胞量、基質濃度5nM、培養時間24時間の時のCV値が一番低いことからこの条件で行うこととした。

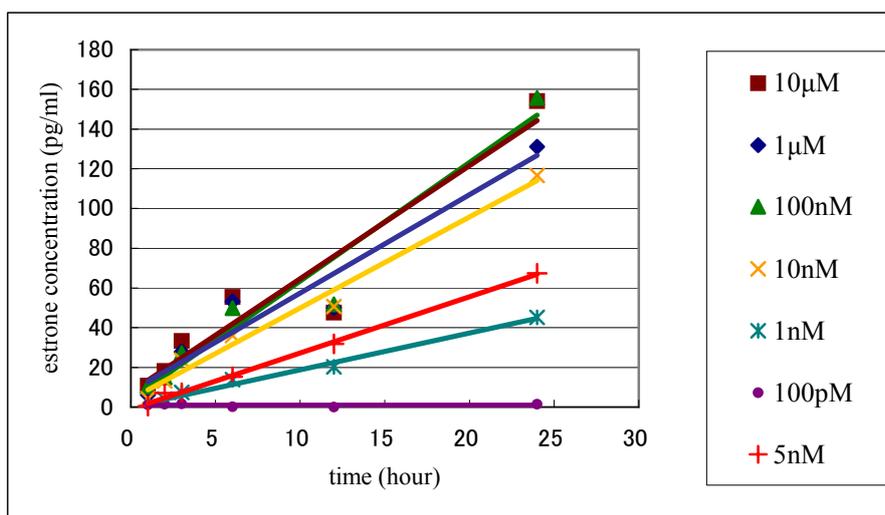


図2-5-3 アンドロステンジオン濃度と時間経過によるエストロン生成量の変化
KGN細胞を1.8 \times 10⁴cell/wellで播種して2日後にそれぞれの濃度のアンドロステンジオンを添加する。
それらを添加から1,2,3,6,12,24時間後に回収しエストロン量をELISAを用いて測定した。(n=2)
5nMアンドロステンジオンの測定結果は別個に行い、それ以外の濃度の結果と合わせて表示した。

表 2-5-1 前培養時間の検討

前培養時間	1日	2日	3日	4日
平均エストロン濃度A (n=64)	40.00 pg/ml	152.37 pg/ml	225.81pg/ml	241.35 pg/ml
CV 値 (n=64)	47.43%	22.25%	23.69%	18.68%

*条件：1.8×10⁴cell/well(number of cells) 5nM(アンドロステンジオンの最終濃度)

表 2-5-2 細胞数及び基質との培養条件の検討

	細胞数 (cell/well)	アンドロステンジオン濃度 (nM)	培養時間 (hour)	エストロン濃度 (pg/ml)	CV 値 (%)
試行1	0.9×10 ⁴	500	3	37.44	24.73
試行2	1.8×10 ⁴	500	3	24.15	24.15
試行3	0.9×10 ⁴	5	24	118.94	10.71
試行4	1.8×10 ⁴	5	24	209.78	16.66

*n=24 (all conditions)

これら条件の検討を行った結果を以下にまとめる。KGN細胞を 96 ウェルプレートに 0.9×10⁴cell/mlで播種する。これに約 2 日後に被験物質を添加し、24 時間培養し暴露させる。次に 24 時間後に基質であるアンドロステンジオンを最終濃度 5nMで添加し、さらに 24 時間の培養を行う。基質添加から 24 時間後に 120μlの培養液を回収し、これをEstrone ELISAキットにて培養液中に含まれるエストロン量を測定する。残った細胞と培養液にはAlamarBlue試薬を添加してさらに 3、4 時間培養し、細胞毒性を調べることにした。

② 検証試験

今回、本試験法の有効性の検証試験に用いた 21 物質の物質名及び結果は既に文献で報告されている IC₅₀ 値とともに表 2-5-3 に示した。IC₅₀ 値は、ヒトのミクロソーム分画を用いた *in vitro* 法での結果と、JEG3 細胞（ヒト絨毛性癌細胞）や H295R 細胞（ヒト副腎由来癌細胞）など培養細胞を用いた方法での結果とを別個に示した。

既に報告されている培養細胞を用いたアロマターゼ活性測定法の結果と比べると、亢進、阻害作用の結果に相違があるものは 4 つあった（o,p'-DDT, Atrazine, Diclobutrazol, Vinclozolin）。特に Diclobutrazole は H295R 細胞を用いた実験でアロマターゼの上昇活性があると報告されているが、本研究においては弱い阻害活性が検出され、細胞毒性も見受けられなかった。また同一の報告で o,p'-DDT は阻害活性、Atrazine, Vinclozolin は上昇活性を示したとの結果が導き出されているが、本研究においては、阻害や上昇作用は見受けられなかった。これら 4 化合物はすべて H295R 細胞の報告であり、卵巣顆粒細胞である KGN 細胞とはアロマターゼ転写機構の違いなどが考えられ、その事に起因するものではないかと推測される。

また阻害作用を検出した化合物で IC₅₀ 値が以前の報告と 100 倍以上違っていたものは 1 つあ

った (Imazalil)。これはH295R細胞を用いた報告や、ヒト胎盤由来ミクロソームを用いた*in vitro* 実験の報告よりもそれぞれ 400 倍、130 倍近い低い値となった。これは、それら以前の報告と比較して基質濃度が低いことも原因の一つと考えられる。

上記 4 化合物以外の化合物はおよそ 10 倍前後の違い (主に以前の報告よりも低い) だったため、ほぼ同じ結果が得られると考えられる。

表 2-5-3 既知の 21 化合物の IC50 値と本測定法による IC50 値

化合物	CAS No.	IC50 (microsome assay)	IC50 (cell based assay)	最高濃度 (in this assay)	結果 (in this assay)	IC50 (in this assay)
α -Naphthoflavone	604-59-1	0.007 μ M (f)		10 μ M	inhibitor	0.412 μ M
Flavone	525-82-6	10 μ M (g)	>100 (d)	10 μ M	weak inhibitor	-
7-Hydroxyflavone	6665-86-7	0.5 μ M (g)	0.35 μ M (d)	10 μ M	inhibitor	5.31 μ M
Chrysin	480-40-0	0.7 μ M (h)	0.5 μ M (d)	50 μ M	inhibitor	1.89 μ M
Flavanone	487-26-3	8 μ M (g)		10 μ M	weak inhibitor	-
Apigenin	520-36-5	2.9 μ M (h)	0.18 μ M (d)	50 μ M	inhibitor	2.58 μ M
Naringenin	480-41-1	9.2 μ M (h)	1.4 μ M (d)	100 μ M	inhibitor	2.42 μ M
7-Methoxyflavanone	21785-09-1	3.2 μ M (h)		10 μ M	inhibitor	1.18 μ M
Fenarimol	60168-88-9	10 μ M (c)	2 μ M (c)	10 μ M	inhibitor	2.00 μ M
Triadimefon	43121-43-3	32 μ M (c)		50 μ M	inhibitor	3.59 μ M
Imazalil	35554-44-0	0.04 μ M (c)	0.1 μ M (a)	50 μ M	inhibitor	0.00444 μ M
Propiconazole	60207-90-1	6.5 μ M (c)	5 μ M (a)	10 μ M	inhibitor	0.968 μ M
o,p'-DDT	789-02-6	no value	no value (a)	10 μ M	no effect	
p,p'-DDD	72-54-8	no value	no value (b)	10 μ M	inhibitor	7.87 μ M
4-Hydroxy androstenedione (Formestane)	566-48-3	0.6 μ M (i)	0.08 (e)	10 μ M	inhibitor	0.00115 μ M
DL-Aminoglutethimide	125-84-8	1.2 μ M (j)	15.8 μ M (e)	100 μ M	inhibitor	2.25 μ M
Atrazine	1912-24-9		++ (a)	10 μ M	no effect	
Diclobutrazol	75736-33-3		++ (a)	10 μ M	weak inhibitor	-
Vinclozolin	50471-44-8		++ (a)	10 μ M	no effect	
Benomyl	17804-35-2		++ (b)	10 μ M	inducer	
Forskolin	66575-29-9		+++ (a,b)	100 μ M	inducer	

a, Hayes et al., 2002; b, Morinaga et al., 2003; c, Vinggaard et al., 2000; d, Saarinen et al., 2001; e, Yue et al., 1997; f, Kelis et al., 1998; g, Ibrahim A. R. and Abul-Hajj Y. J., 1990; h, Le Bail et al., 1998; i, Njar et al., 1995; j, Le Bail et al., 2001

③ スクリーニング試験の実施

本アッセイ法を用いて 168 の化学物質についてアロマターゼ活性に及ぼす作用を測定した結果、阻害あるいは亢進作用が認められた物質をまとめて図 2-5-4 に示す。今回のスクリーニングではアロマターゼ阻害剤として医薬品として使用されている 4-Hydroxy androstenedione (IC50 = 1.15 x 10⁻⁹ M) に匹敵する強い阻害作用を有する物質はなかったが、図 2-5-4 に示すように 8 物質に比較的弱い阻害作用が、また 8 物質に亢進作用が検出された。

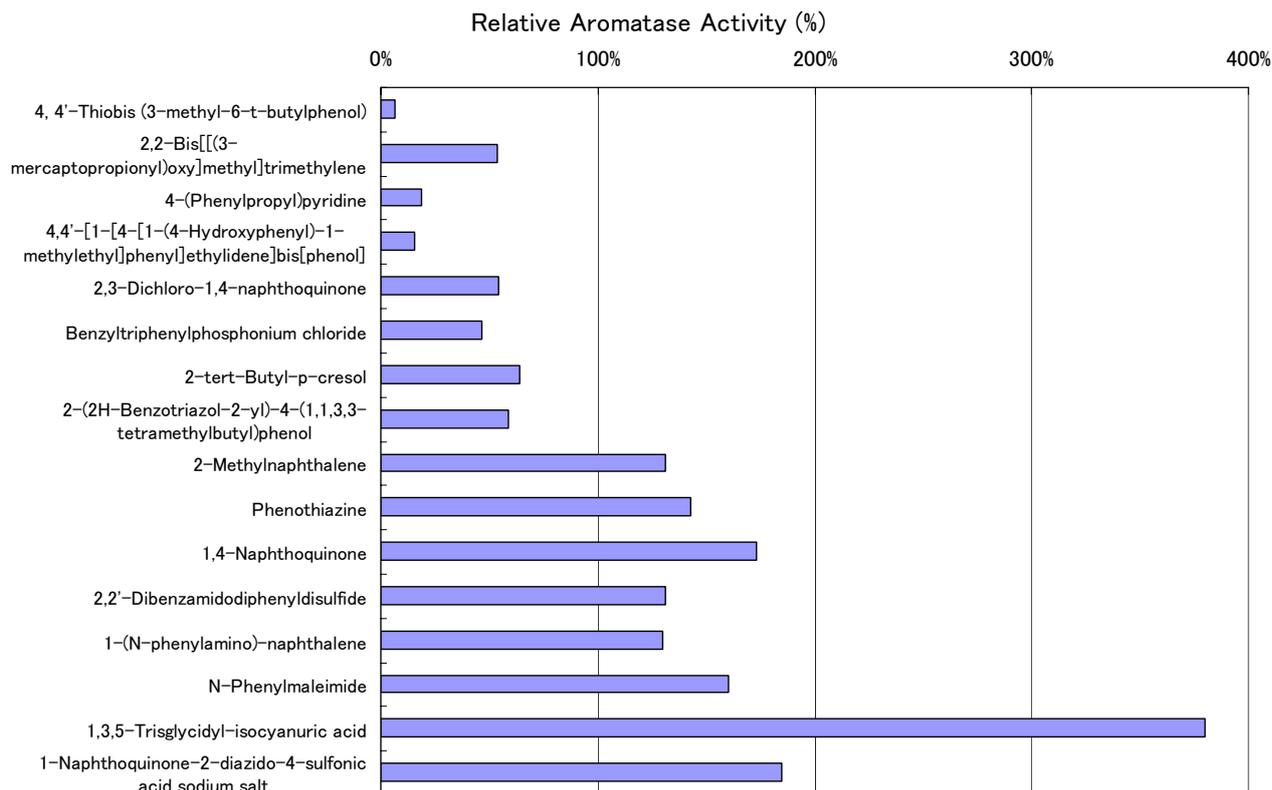


図 2-5-4 アロマトラーゼ阻害あるいは亢進作用を示した物質とその相対的アロマトラーゼ活性

阻害作用を示した 8 物質の中で IC₅₀ 値が算出されたものが 3 物質あった。このうち、4-(Phenylpropyl)pyridine が今回の結果の中でもっとも強い阻害作用を示した (IC₅₀ = 8.6 × 10⁻⁷ M)。この他、4, 4'-Thiobis (3-methyl-6-t-butylphenol) (IC₅₀ = 7.6 × 10⁻⁶ M) 及び 4,4'-[1-[4-[1-(4-Hydroxyphenyl)-1-methylethyl]phenyl]ethylidene]bis[phenol] (IC₅₀ = 1.4 × 10⁻⁵ M) で IC₅₀ 値が算出された。

一方、アロマトラーゼ亢進作用を示した物質として、1,3,5-Trisglycidyl-isocyanuric acid が最も強く、その他 1-Naphthoquinone-2-diazo-4-sulfonic acid sodium salt や 1,4-Naphthoquinone などのナフトキノン類で亢進作用があった。

(6) 結果のまとめ

アロマトラーゼ活性に影響を及ぼす化学物質のスクリーニング方法の確立を目的として検討を行った結果、KGN 細胞を使用した簡便な非 RI 法による測定系を開発することができた。

既存の測定法と比較した結果、使用する細胞種の性質の違いによると考えられる違いが若干あったが概ね同等の結果を得ることができ、本測定法の有用性を確認した。

本法により、これまでに 168 物質についてアロマトラーゼ活性に及ぼす影響を試験した結果、阻害活性または亢進活性を示した物質がそれぞれ 8 物質みられた。

(7) 今後の課題と展望

本測定法は、アロマトラーゼ活性を変動させてホルモン作用に影響を及ぼす可能性のある化学

物質をスクリーニングするための方法である。これまでの研究で手法としては確立したものと考えているが、今後は、米国環境保護庁 (US EPA)、経済開発協力機構 (OECD) 等の海外機関とも情報交換し、本法の有用性を国際的に認知させることが重要であると考え。また、アロマターゼ活性評価法自体の意義を高めるために、多種多様な化学物質でのスクリーニング試験を継続的に実施し、データを集積すること、また、試験管内で作用の認められた物質が *in vivo* でどのような影響をもたらすのかの *in vivo* 試験*データの蓄積を図り、アロマターゼ阻害物質あるいは亢進作用物質の有害性に関する情報収集を行っていく必要があるものと考え。

*注) 候補としては、アロマターゼ阻害剤が OECD 検証試験で実施された改良 28 日間反復投与毒性試験が考えられる。

(8) 参考文献

- Ohno, K., Araki, N., Yanase, T., Nawata, H. and Iida, M. (2004). A Novel Nonradioactive Method for Measuring Aromatase Activity Using a Human Ovarian Granulosa-Like Tumor Cell Line and an Estrone ELISA. *Toxicological Sciences*, **82**, 443-450.
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C. and Vonk, A. (2002). Herbicides: feminization of male frogs in the wild. *Nature*, **419**, 895-896.
- Inouye, K., Saito, A., Orita, M., Tonomura, B., Imaishi, H. and Ohkawa, H. (2000) Inhibitory effects of 1,4-naphthoquinone derivatives on rat cytochrome P4501A1-dependent monooxygenase activity in recombinant yeast microsomes. *J. Biochem.* **127(6)**, 1041-1046.
- Ibrahim, A. R., and Abul-Hajj, Y. J. (1990). Aromatase inhibition by flavonoids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **37**, 257-260.
- Kellis, J. T., Jr., and Vickery, L. E. (1984). Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones. *Science*. **225**, 1032-1034.
- Le Bail, J. C., Laroche, T., Marre-Fournier, F., and Habrioux, G. (1998). Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids. *Cancer Lett.* **133**, 101-106.
- Le Bail, J. C., Pouget, C., Fagnere, C., Basly, J. P., Chulia, A. J., and Habrioux, G. (2001). Chalcones are potent inhibitors of aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities. *Life Sci.* **68**, 751-761.
- Morinaga, H., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Harada, N. and Nawata, H. (2003). A Benzimidazole Fungicide, Benomyl and Its Metabolite Carbendazim Induce Aromatase Activity in Human Ovarian Granulosa-Like Tumor Cell Line (KGN). *Endocrinology* **22**, 22.
- Bettin, C., Oehlmann, J., and Stroben, E. (1996). TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgoländer*
- Njar, V. C., Gruen, G., and Hartmann, R. W. (1995). Evaluation of 6,7-aziridiny steroids and related compounds as inhibitors of aromatase (P-450arom). *J. Enzyme Inhib.* **9**, 195-202.
- Saarinen, N., Joshi, S.C., Ahotupa, M., Li, X., Ammala, J., Makela, S. and Santti, R. (2001). No evidence for the *in vivo* activity of aromatase-inhibiting flavonoids. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* **78**, 231-239.

- Vinggaard, A.M., Hnida, C., Breinholt, V. and Larsen, J.C. (2000). Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity *in vitro*. *Toxicol. In Vitro*, **14**, 227-234.
- Yue, W. and Brodie, A.M. (1997). Mechanisms of the actions of aromatase inhibitors 4-hydroxyandrostenedione, fadrozole, and aminoglutethimide on aromatase in JEG-3 cell culture. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **63**, 317-328.
- Concise International Chemical Assessment Document (2001)

2-6. 開発途上にある試験法

2-6-1. 甲状腺ホルモン受容体 (TR) への受容体結合試験法

(1) 目的

これまで、性ホルモン受容体 (エストロゲン受容体及びアンドロゲン受容体) を介した内分泌かく乱作用を検出する試験法及び評価法を中心に開発が進められてきたが、性ホルモン受容体以外の核内受容体を介したメカニズムや受容体を介さないメカニズムで内分泌系をかく乱する作用も報告されている (Miyazaki et al., 2004; Morinaga et al., 2004)。本研究ではそれらのメカニズムの中で細胞の分化や成長、物質の代謝等に重要な役割を担っている甲状腺ホルモン受容体に着目し、甲状腺ホルモン受容体への結合を介した内分泌かく乱作用を安価で簡便に検出するための *in vitro* 試験系の研究開発を行う。

(2) 原理

2-2. 受容体結合試験法参照

(3) 方法

① ヒト甲状腺ホルモン受容体 (hTR) 結合試験系の構築

a. hTR cDNA のクローニング

hTR α 1、 α 2 及び β 1 の塩基配列はすでに明らかになっているため (Kawai et al., 2004; Nakai et al., 1988a,b)、遺伝子特異的なプライマーを用いて、hTR α 1 及び α 2 についてはヒト肝がん由来培養細胞 HepG2 から抽出した mRNA を cDNA に逆転写したものを、 β 1 についてはヒト骨格筋由来 cDNA ライブラリーを鋳型として PCR を行った。

b. hTR α 1、 α 2 及び β 1 発現系の構築

PCR によって得られた hTR α 1、 α 2 及び β 1 cDNA を挿入した発現プラスミド pGEX-4T1 を大腸菌 DH5 α に導入し、グルタチオン S-トランスフェラーゼ融合ヒト甲状腺ホルモン受容体 (GST-hTR) α 1、 α 2 及び β 1 を発現させた。発現させた受容体はグルタチオンセファロースを用いてアフィニティ精製した。

c. hTR α 1、 α 2 及び β 1 結合試験系の構築

トリチウム標識した 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine ($[^3\text{H}]\text{T3}$) を標準リガンドとして、この放射リガンドが発現受容体に特異的に結合することを確認するために、放射リガンド濃度を一定にしたときの受容体濃度依存的な飽和結合と受容体濃度を一定にしたときの放射リガンド濃度依存的な結合を確認した。

② hTR α 1 及び β 1 競争結合試験

3,5,3'-Triiodo-L-thyronine (T3) を用いて競争結合試験を実施し、結合試験系の有効性を確認

した。TR の 2 つ種類のアイソフォーム (α 、 β) はノックアウトマウスを用いた研究などから異なる機能を持つことが考えられている (Gauthier et al., 1999)。そこで hTR α 1 と hTR β 1 のアイソフォーム間での応答性の差異について検討するため、これまでの本研究において hTR への結合性が認められた物質や結合性が報告されている物質ならびにそれらの誘導体及び類似構造を持つ物質の中から 50 物質を試験物質として選定し、それぞれの受容体に対する結合性を測定した。

(4) 結果

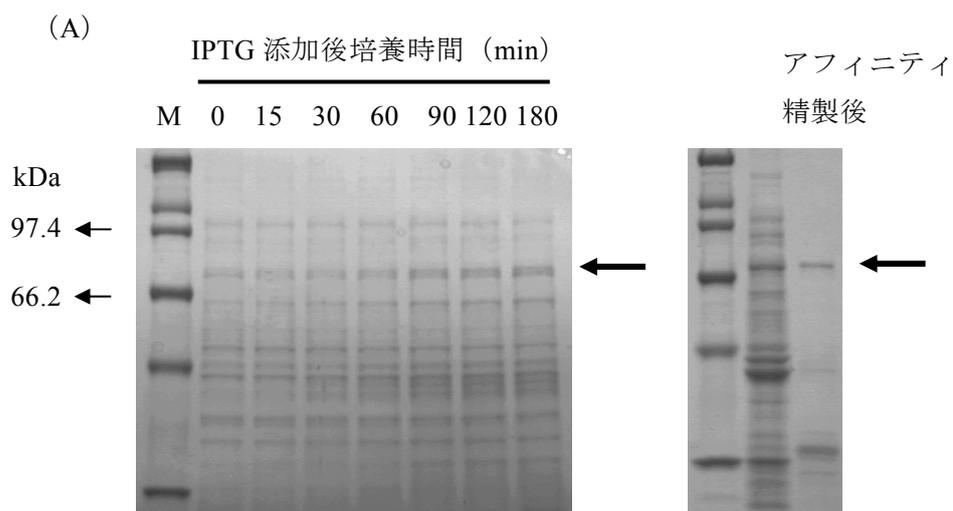
① hTR 結合試験系の構築

a. hTR cDNA のクローニング

既報の hTR α 1、 α 2 及び β 1 の塩基配列を基に設計した遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR を行い、得られた DNA フラグメントの塩基配列を解析したところ、既報の配列と同一であることが確認された。

b. hTR α 1、 α 2 及び β 1 発現系の構築

PCR によって得られた hTR α 1、 α 2 及び β 1 を挿入した発現プラスミド pGEX-4T1 を大腸菌 DH5 α に導入し、GST-hTR α 1、 α 2 及び β 1 の発現を行った。発現産物の SDS-PAGE プロファイルを図 2-6-1-1 に示す。それぞれの目的分子量 (α 1 : 約 73 kDa、 α 2 : 約 81 kDa、 β 1 : 約 70 kDa) のバンド (矢印) が発現誘導された。そこで、それぞれの受容体を大量発現し、グルタチオンセファロースを用いてアフィニティ精製したところ、目的分子量にバンドが確認された。しかし、 α 1 と β 1 では誘導された発現産物の分解産物と考えられるバンドも確認された。



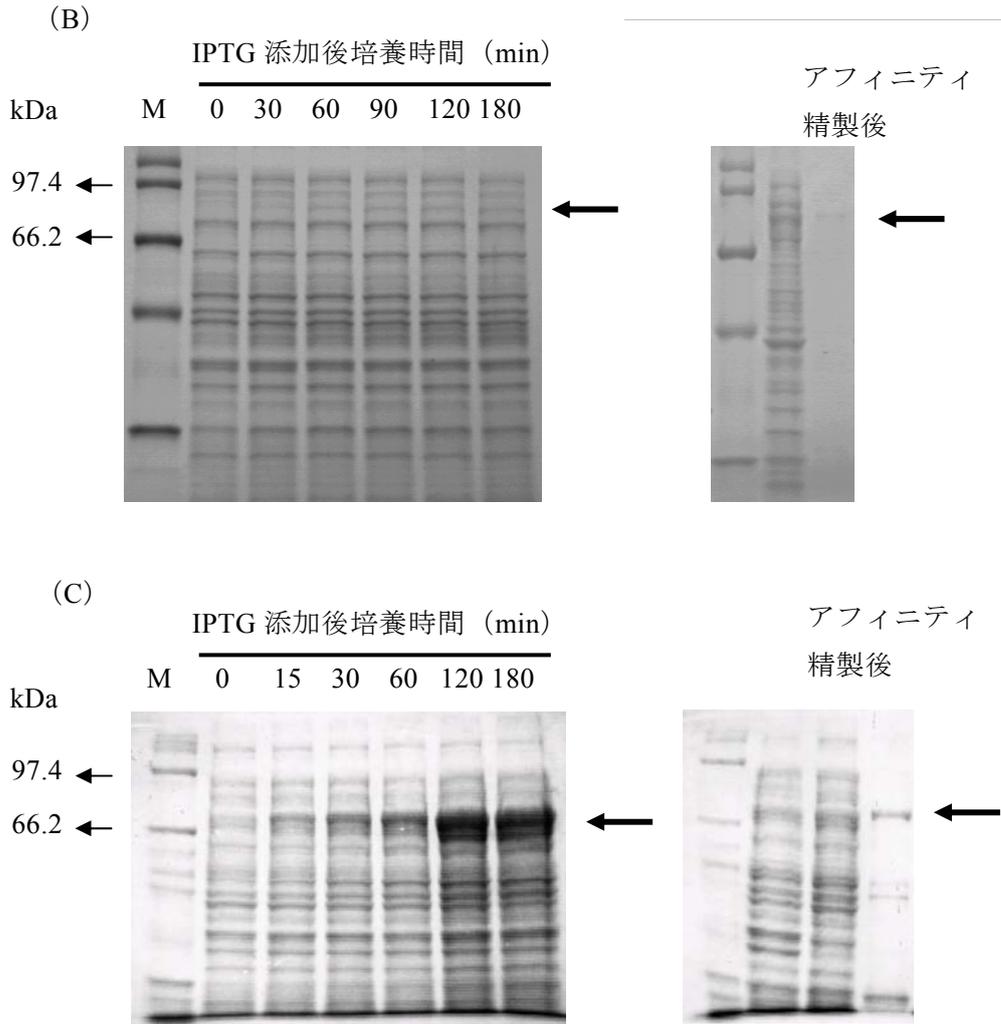


図 2-6-1-1 hTR α 1 (A) 及び α 2 (B)、 β 1 (C) 発現産物の SDS-PAGE による確認
(左：時間依存的発現誘導の確認、右：発現産物の精製、M：分子量マーカー)

c. hTR α 1、 α 2 及び β 1 結合試験系の構築

○ 放射リガンド濃度一定条件下での受容体濃度依存的なリガンド結合

発現が確認された hTR α 1、 α 2 及び β 1 について放射リガンド ($[^3\text{H}]\text{T3}$) 濃度一定 (1.0 nM) の条件下における受容体濃度依存的なリガンド結合の飽和性を測定した結果を図 2-6-1-2 に示す。受容体にリガンド結合性がある場合は受容体濃度依存的に放射能が増加し、一定量以上の受容体量になると放射能の増加が飽和に達する。hTR α 1 及び β 1 は受容体濃度依存的に放射能が増加し、一定量以上の受容体量で放射能の上昇が飽和に達したことから、T3 は本研究で発現した TR α 1 及び β 1 へ特異的に結合することが示唆された。一方、hTR α 2 については受容体非存在下と受容体存在下での放射能に違いが確認されず、リガンド結合性が認められなかった。これは TR α 2 には T3 が結合しないという既報の結果 (Koenig et al., 1989) と一致した。

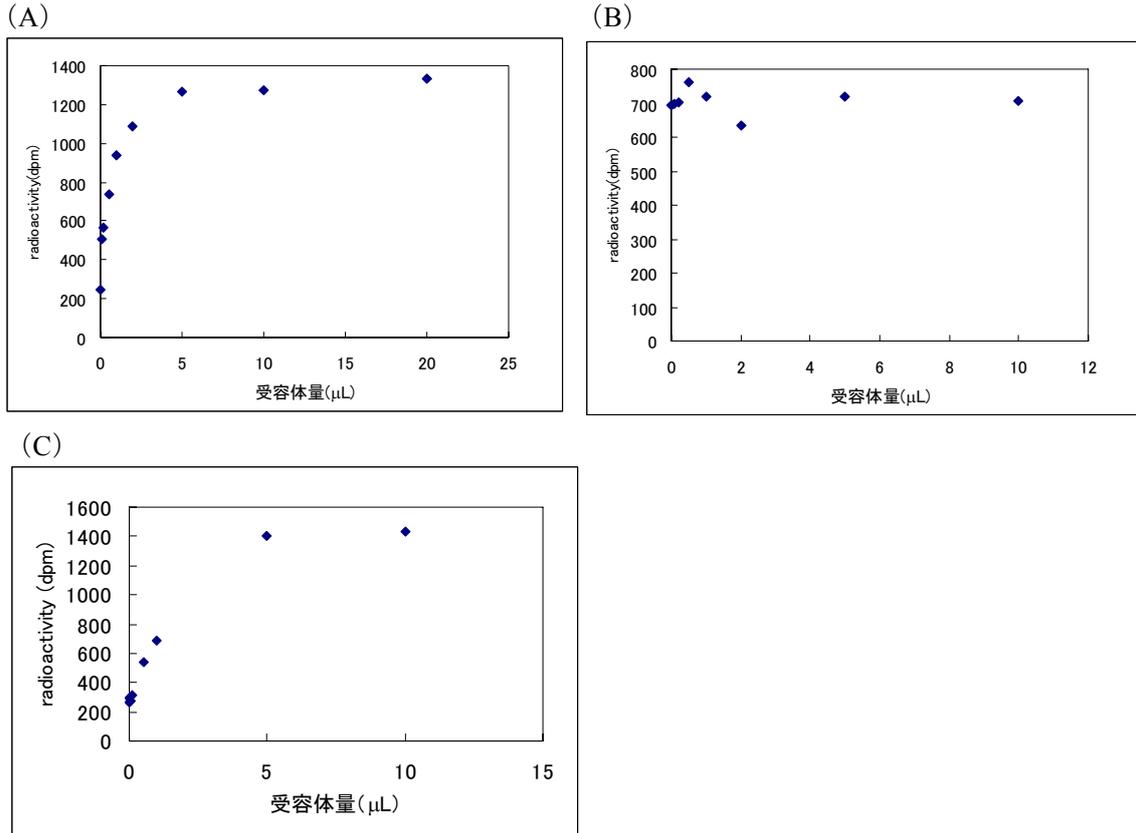


図 2-6-1-2 hTRα1 (A) 及び α2 (B)、β1 (C) の受容体濃度依存的なリガンド結合

○ 受容体濃度一定条件下での放射リガンド濃度依存的なリガンド結合

T3 の特異的な結合が示唆された TRα1 及び β1 について受容体量一定の条件下で放射リガンド濃度依存的なリガンドの全結合曲線を得た。さらに、大過剰の非放射 T3 (1 μM) を共存させることにより、非特異的結合を測定した。全結合量から非特異的結合を差し引き、特異的結合を算出した。測定結果を図 2-6-1-3 に示す。いずれの受容体についても非特異的な結合が多いものの、濃度依存的な特異的結合の飽和曲線が得られ、発現受容体に対するリガンド結合は特異的であることが確認された。

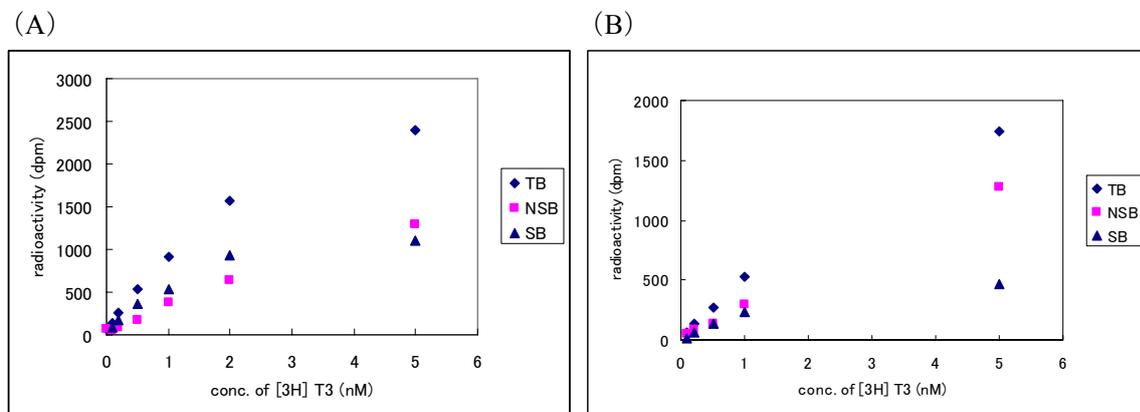


図 2-6-1-3 hTRα1 (A) 及び β1 (B) の放射リガンド濃度依存的な結合飽和曲線 (TB: 全結合、SB: 特異的結合、NSB: 非特異的結合)

② hTR α 1 及び β 1 競争結合試験

T3 を用いた競争結合試験の結果を図 2-6-1-4 に示す。hTR α 1 及び β 1 の放射リガンドの受容体からの脱離曲線がいずれも T3 濃度依存的なシグモイド型であったため、本発現受容体を用いた競争結合試験系が有効に機能していることが確認された。

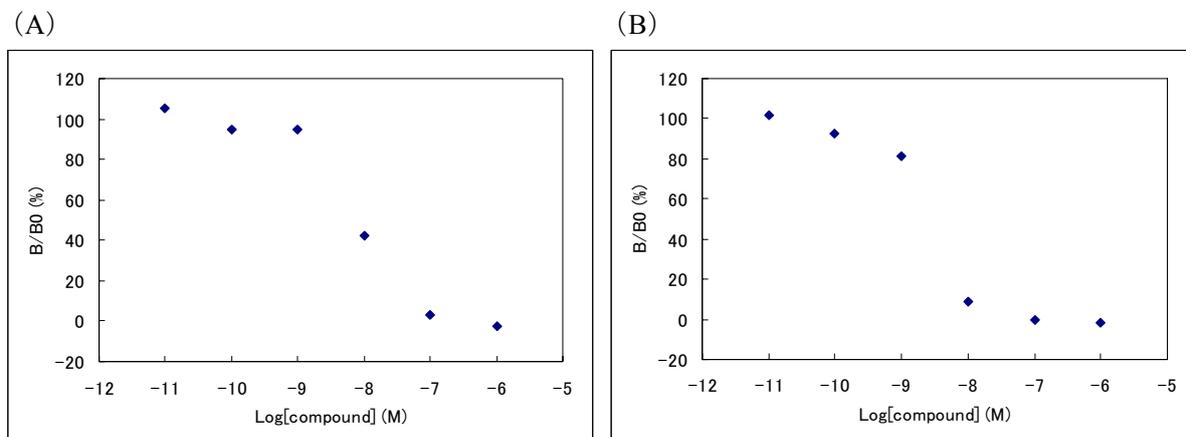


図 2-6-1-4 T3 濃度依存的な標準リガンドの hTR α 1 (A) 及び β 1 (B) からの脱離曲線

選定した 50 物質のそれぞれの受容体に対する結合性を測定した。hTR α 1 に対して結合性を示した物質は 9 物質あり、そのうちの 8 物質が T3 とその類似構造を持つ化合物であった。一方、hTR β 1 に対して結合性を示した物質は 10 物質あり、T3 とその類縁構造を持つ化合物は 7 物質であった。

hTR α 1 に対して特異性を示した物質は 3,5-Diiodo-D-tyrosine で hTR β 1 に対しては結合性を示さなかった。hTR β 1 に対して特異性を示した物質は D-Thyroxine、Diethylstilbestrol、及び 4-(2-Pyridylazo)resorcinol であり、この 2 物質は hTR β 1 のみに対して結合性が認められた。また、両受容体に対して結合性を示した試験物質について T3 に対する相対結合強度 (RBA) を用いて結合強度を比較したところ、3,3',5-Triiodothyroacetic acid は hTR β 1 への結合強度が hTR α 1 に比べ約 5 倍であった。また、その他の試験物質はアイソフォーム間の結合の特異性は認められなかった (表 2-6-1-1)。

表 2-6-1-1 アイソフォーム間の結合の特異性

化合物名	CAS No.	RBA (%) ^{※1}		RBAの比 (β 1/ α 1)
		hTR α 1 ^{※2}	hTR β 1 ^{※2}	
3,5,3'-Triiodo-L-thyronine	6893-02-3	84.8	107	1.3
L-3,3',5'-Triiodothyronine	5817-39-0	0.137	0.115	0.84
3,3',5-Triiodothyropropionic acid	51-26-3	12.1	38.2	3.2
L-3,5,3',5'-Tetraiodothyroacel	67-30-1	0.0411	0.153	3.7
L-Thyroxine	51-48-9	2.63	1.87	0.71
3,3',5-Triiodothyroacetic acid	51-24-1	8.23	45.3	5.5
D-Thyroxine	51-49-0	3.50	1.46	0.42

化合物名	CAS No.	RBA (%) ^{※1}		RBAの比 ($\beta 1/\alpha 1$)
		hTR $\alpha 1$ ^{※2}	hTR $\beta 1$ ^{※2}	
Diethylstilbestrol	56-53-1	N.B.	0.00870	—
4-(2-Pyridylazo)resorcinol	1141-59-9	N.D.	0.00336	—
3,5-Diiodo-D-tyrosine		0.00179	N.B.	—
4,4'-Thiobis(3-methyl-6-t-butylphenol)	96-69-5	0.00340	0.0107	3.1

^{※1}T3 のIC50 (放射リガンドの結合を 50%阻害する試験物質濃度) を 100 としたときの試験物質の相対結合強度

^{※2}N.B.: 結合性がみられなかった、あるいは、20%以下の受容体結合しか示さなかった物質 N.D.: 結合性がみられたが、IC50 値が算出できなかった物質を示す

(5) 今後の課題と展望

本研究で構築した hTR $\alpha 1$ 及び $\beta 1$ 競争結合試験系は化学物質の TR に対する結合性を簡便かつ迅速に測定できる有用な試験系である。しかし、本研究で構築した競争結合試験では結合性を示さなかった Bisphenol A や Tetrabromobisphenol A (TBBPA)、Tetrachlorobisphenol A (TCBPA) が細胞破碎液を用いた競争結合試験では TR に対し結合性を示したという報告がある (Moriyama et al., 2002; Kitamura et al., 2005)。また、レポーター遺伝子アッセイでは TBBPA、TCBPA が TR に対しアンタゴニスト活性を持つという報告もある (Moriyama et al., 2002; Kitamura et al., 2002)。このように、既知見と異なる結果が得られた原因として、既報の試験では細胞内の TR 以外の因子が受容体結合性に影響を及ぼしている可能性が考えられる。また、TR はレチノイド X 受容体 (RXR) とヘテロダイマー (異種二量体) を形成し機能を発現するが、RXR 及びそのリガンド共存下で、T3 による転写活性が変化することが示唆されている (Li et al., 2004)。しかし、化学物質の TR 結合性に対する RXR の関与は不明である。従って、本研究で構築した hTR $\alpha 1$ 及び $\beta 1$ 競争結合試験の試験条件の検討として RXR 共存下での試験系の構築が今後の課題として挙げられる。

(6) 参考文献

- Gauthier, K., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Legrand, C., Pain, B., Rousset, B., Weiss, R., Trouillas, J. and Samarut, J. (1999) Different functions for the thyroid hormone receptors TR α and TR β in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J.*, **18**, 623-631.
- Kawai, K., Sasaki, S., Morita, H., Ito, T., Suzuki, S., Misawa, H. and Nakamura, H. (2004) GenBank Accession No. NM_000461.
- Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S., Kuroki, H. and Fujimoto, N. (2002) Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun.*, **293**, 554-559.
- Kitamura, S., Kato, T., Iida, M., Jinno, N., Suzuki, T., Ohta, S., Fujimoto, N., Hanada, H., Kashiwagi, K. and Kashiwagi, A. (2005) Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sci.*, **76**, 1589-1601.

- Koenig, R.J., Lazar, M.A., Hodin, R.A., Brent, G.A., Larsen, P.R., Chin, W.W. and Moore, D.D. (1989) Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature*, **337**, 659-661.
- Li, D., Yamada, T., Wang, F., Vulin, A.I. and Samuels, H.H. (2004) Novel Roles of Retinoid X Receptor (RXR) and RXR Ligand in Dynamically Modulating the Activity of the Thyroid Hormone Receptor/RXR Heterodimer. *J. Biol. Chem.*, **279**, 7427-7437.
- Miyazaki, W., Iwasaki, T., Takeshita, A., Kuroda, Y. and Koibuchi, N. (2004) Polychlorinated Biphenyls Suppress Thyroid Hormone Receptor-mediated Transcription through a Novel Mechanism. *J. Biol. Chem.*, **279**, 18195-18202.
- Morinaga, H., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Harada, N. and Nawata, H. (2004) A Benzimidazole Fungicide, Benomyl, and Its Metabolite, Carbendazim, Induce Aromatase Activity in a Human Ovarian Granulosa-Like Tumor Cell Line (KGN). *Endocrinology*, **145**, 1860-1869.
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H. and Nakao, K. (2002) Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab.*, **87**, 5185-5190.
- Nakai, A., Sakurai, A., Bell, G.I. and DeGroot, L.J. (1988a) GenBank Accession No. M24748.
- Nakai, A., Seino, S., Sakurai, A., Szilak, I., Bell, G.I. and DeGroot, L.J. (1988b) GenBank Accession No. J03239.

2-6-2. 甲状腺ホルモン受容体 (TR) へのレポーター遺伝子アッセイ

(1) 目的

甲状腺機能に影響を及ぼす可能性のある化学物質を簡便に検出するため、甲状腺ホルモン受容体 (TR) に対するレポーター遺伝子アッセイ法を確立する。

(2) 原理

TR response element (TRE) の下流に発光タンパク質ルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を挿入したレポータープラスミドと TR タンパク質発現用プラスミドを CHO 細胞に共トランスフェクションし、その細胞に添加した化合物の TR に対する反応性を、TR 活性依存的に細胞内発現する Luc の発光を通して評価するシステム (図 2-6-2-1)。

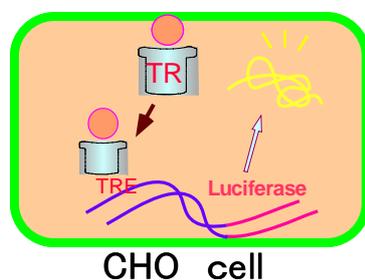


図 2-6-2-1 TR レポーターアッセイの概念図

(3) 方法

TR レポーター遺伝子アッセイ系の開発に際して、まず以下のベクターの構築を行った。

受容体発現ベクターとして

- pZeo-TR α
- pZeo-TR β
- pRXR+TR α
- pRXR+TR β

応答性エレメントを持つレポーターベクターとして

- pIND-TRE pal
- pIND-TRE DR4
- pIND-TRE Lap

pZeo-TR α と pZeo-TR β は TR のそれぞれのサブタイプを単独発現させるためのベクターであり、pRXR+TR α と pRXR+TR β は TR と RXR の共発現用ベクターである。TR は生体内で RXR とヘテロダイマーを形成して機能するという報告があることからこのような共発現ベクターも作製した (Yen, 2001; Zhang and Laxar, 2000)。また、ノックアウトマウス等の解析から、TR はサブタイプごとに異なる機能をもつことが示唆されているため (Forrest and Vennstrom, 2000)、 α と β の両サブタイプに関して発現ベクターを作製した。一方、レポーターベクターのうち、TREpal は塩基間隔がゼロの AGGTCA の inverted repeat (IR0)、TREDR4 は塩基間隔 4 の

AGGTCA の direct repeat (DR4)、TRELap は塩基間隔 6 の AGGTCA の Everted repeat (ER6) の TR 応答配列を Luc 遺伝子の上流にもつ (下図 2-6-2-3 参照)。IR0、ER6 は TR ホモダイマーの応答配列、DR4 は RXR と TR のヘテロダイマーの応答配列であると考えられている。これらのプラスミドを用いて、以下に記す方法で TR アッセイを行った。

CHO-K1 細胞を 1×10^5 cells/ml の濃度に調製し、96 ウェルプレートに 84 μ l/well で播種した。このときの培養メディウムは Phenol Red Free D-MEM/F12 (GibcoBRL)、5% Charcoal Dextran treated FCS (Hyclone) を用いた。翌日、TR アゴニストアッセイにはプレート 1 枚あたり、受容体発現プラスミド (pZeo-TR α 、pZeo-TR β 、pTR β +RXR など) 3.1 μ g、レポータープラスミド (pIND-TREpal、pIND-TREDR4 等。下図参照) 3.1 μ g を希釈トランスフェクション試薬 (FuGene (ロッシュ) 18.6 μ l を Medium (血清無添加) 620 μ l で希釈したもの) に加え 96 ウェルプレート各列にマルチチャンネルピペットで 6 μ l ずつ添加し、CO₂ インキュベーターで培養した。TR アнтаゴニストアッセイには受容体発現プラスミド 3.1 μ g、レポータープラスミド 3.1 μ g、Cell viability 確認用プラスミド (phRL - TK または pEGFP) 3.1 μ g のプラスミド Mix を同様に用いた。培養 3 時間後にサンプル、標準物質ならびに各コントロール物質をプレートフォーマット (下図 2-6-2-2 参照) にしたがって各ウェルに 10 μ l ずつ加え CO₂ インキュベーターでさらに培養した。終濃度が 5×10^{-8} M または 1×10^{-8} M (この濃度は最大活性の約 70% に相当) になるように T3 を添加しておき、その T3 の活性をどの程度阻害するかで対象サンプルの TR アнтаゴニスト活性を評価した。翌日、蛍ルシフェリン及びウミシイタケルシフェリン基質溶液 (アゴニストアッセイは Steady-Glo™、アンタゴニストアッセイは Dual-Glo™: Promega) をマニュアルにしたがって加えて約 10 分間振とう混和して細胞を溶解し、各ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。

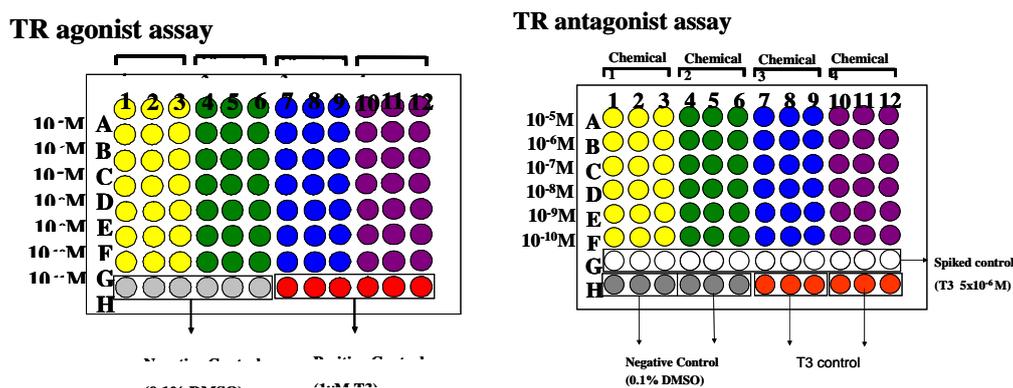


図 2-6-2-2 TR レポーターアッセイ 96 ウェルプレートフォーマット

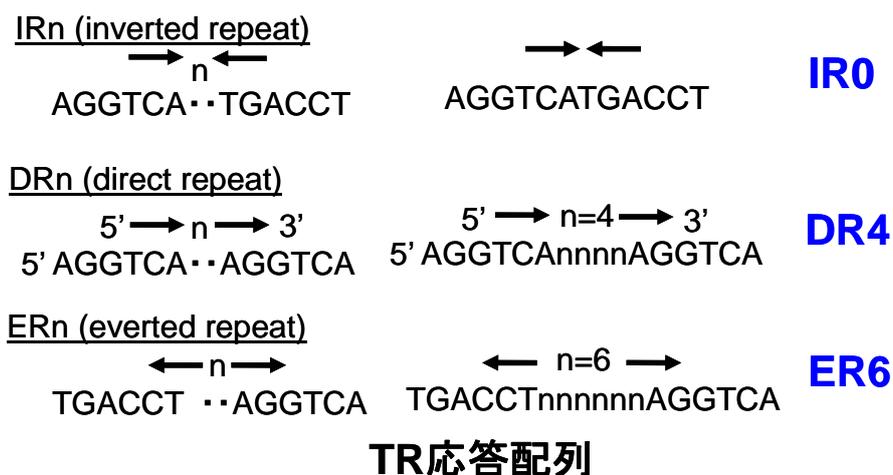


図 2-6-2-3 TR 応答配列

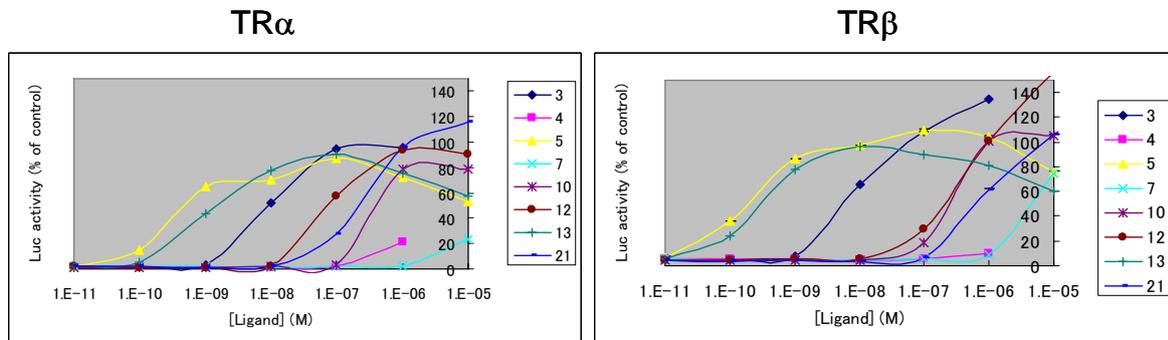
(4) 結果

まず、構築した TR 発現ベクター (pZeo-TR α , pZeo-TR β , pRXR+TR α , pRXR+TR β) 及びレポーターベクター (pIND-TREpal, pIND-TREDR4, pIND-TRELap) のうち、TR スクリーニングに適するものはどれかということ、内在性リガンド T3 を用いた実験で検討した。TR 単独発現系において 3 種のレポーターベクターの応答を調べた実験では、AGGTCA の Inverted repeat である pIND-TREpal が最も高い Luc 活性を示すことが確認された。また、TR と RXR の共発現系においても同様に pIND-TREpal が 3 種のレポーターベクターの中で最も高い Luc 活性を示した。従って、レポーターベクターとしては pIND-TREpal を用いることが測定系として適当であると思われた。一方、TR 発現用ベクターとしては TR 単独発現系、TR-RXR 共発現系とも大きな違いは確認できなかった。しかしながら、検討を重ねるうちに、RXR との共発現系は RXR のみに反応する化合物 (例えば RXR の内在性リガンドである 9-cis レチノイン酸など) にも応答してしまうということが明らかになった。このことから、TR 特異的に応答する化合物をスクリーニングするという目的には、RXR との共発現系は適さないという結論に至った。従って、本研究の TR レポーターアッセイには、レポーターベクターに pIND-TREpal、TR 発現ベクターに pZeo-TR α または pZeo-TR β を用いることとした。以下にこれらのプラスミドベクターを用いてアッセイシステムを評価した実験について記述する。

① TR アゴニストアッセイ測定系評価

TR α と TR β の単独発現ベクターと pIND-TREpal を用いて、50 化合物のスクリーニングを行った。アゴニスト活性評価においては、50 化合物中 8 化合物がポジティブであった図 2-6-2-4 に濃度反応曲線、図 2-6-2-5 にそれらの化学構造を示した。(ポジティブ化合物の内いくつかのものは、 10^{-6} M 程度の濃度で Luc 活性が減少するものもみられたが、これは化合物の細胞毒性に由来するものである。) この中には内在性リガンドである T3 や T4 も含まれており、それらの化合物も正確に検出できていた。従って、この方法はより多くの化合物の中から TR アゴニスト活性をもつものをスクリーニングすることに十分利用可能であるといえる。また、これらの

アゴニスト活性がポジティブ化合物の中には、12や21のようにTRの各サブタイプ（TR α またはTR β ）に対して反応性が異なるものが存在することが明らかとなったため、片方だけでなく両方のサブタイプに対して応答を調べる必要があることが示唆された。



TRアゴニスト化合物の濃度反応曲線

ここには何回かの実験のうちの典型例を示した。
T3濃度 1×10^{-6} MにおけるLuc活性を100とした時の相対活性で表した。

図 2-6-2-4 TR アゴニスト化合物の濃度反応曲線

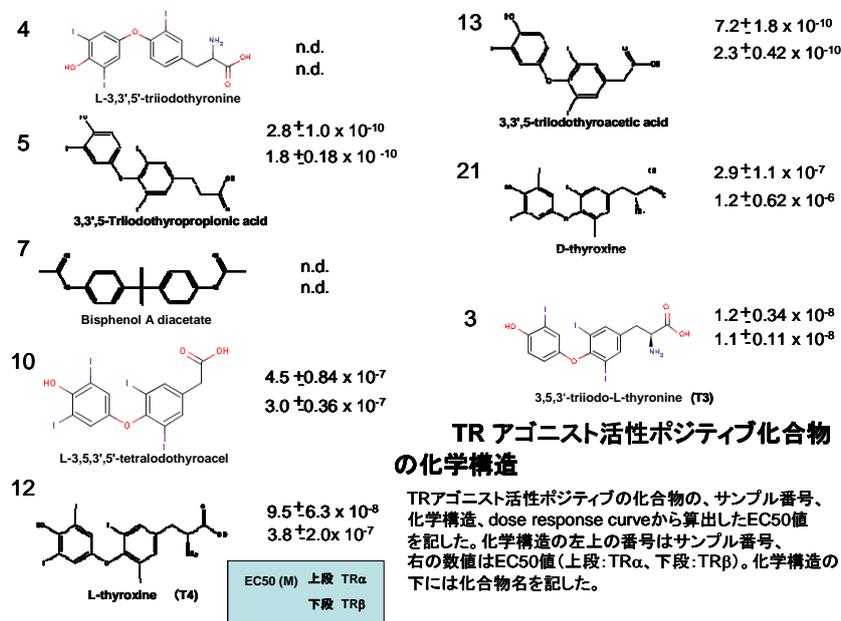


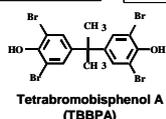
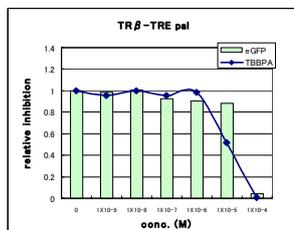
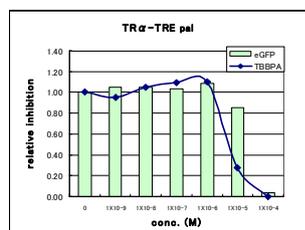
図 2-6-2-5 TR アゴニスト化合物の化学構造

② TR アンタゴニストアッセイ測定系評価

TRE-palのレスポンスエレメントとCell viability確認用プラスミドpEGFPを用いたTRアンタゴニストアッセイ測定系の評価を行った。TetrachlorobisphenolA (TCBPA) と TetrabromobisphenolA

(TBBPA) はTRアンタゴニスト活性をもつという報告があるため (Kitamura et. al., 2002)、これらの物質を用いて評価を行った。結果は、図 2-6-2-6 に示したように、T3 で活性化されたTR (α と β) のLuc活性が、いずれの化合物でも 10^{-5} M程度の濃度において阻害されることが確認された。

アンタゴニスト活性 (TR α or TR β -TRE pal)



アンタゴニスト活性 (TR α or TR β -TRE pal)

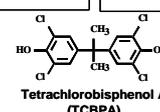
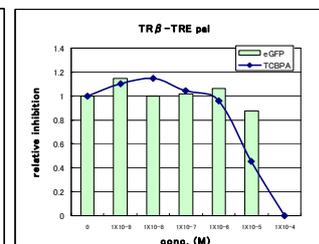
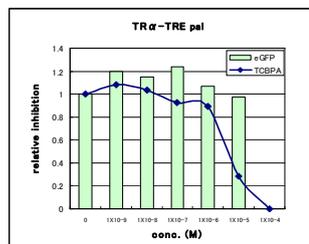


図 2-6-2-6 TR antagonist assay の濃度反応曲線

図には示さないが、これらの化合物 TCBPA と TBBPA は、上述したアゴニスト活性測定時に用いた 50 化合物中にも存在しており、これら 50 物質を用いたアンタゴニスト活性スクリーニングからも両化合物を TR アンタゴニスト活性をもつ化合物として抽出することができた。このように、我々の開発した TR レポーター遺伝子測定系は、TR アゴニスト活性化合物のみならず TR アンタゴニスト活性をもつ化合物のスクリーニングにも応用できることが示された。そこでさらに、このアッセイ法を用いて新規の TR への作用物質を選定するパイロット実験も試みた。それを以下に記す。

③ 水酸化 PCB の TR への作用の検討

水酸化PCB (OH-PCB) はTRに対してアンタゴニスト作用をもつということが報告されている。そこで、25 種類の水酸化PCBを新たに合成し、それぞれに対してTR単独発現系を用いたアゴニスト、アンタゴニストアッセイを行いOH-PCBのTRへの作用を検討した。その結果、25 物質中 3 種類にアンタゴニスト作用が認められた (図 2-6-2-7)。4-OH-3,3',4',5-tetrachlorobiphenylは 1.6×10^{-8} Mからアンタゴニスト作用が現れ、細胞viabilityが少し低下しているが 1.6×10^{-6} Mでは相対活性で 60%の阻害がみられた。4-OH-3,3',4',5,5'-pentachlorobiphenylは 4×10^{-6} Mでアンタゴニスト作用が現れ、相対活性で 50%の阻害がみられた。4,4'-(OH)2-3,3',5,5'-tetrachlorobiphenylは 4×10^{-6} Mでアンタゴニスト作用が現れ、相対活性で 40%の阻害がみられた。このように、構築したTRレポーターアッセイ系を用いて、25 種類の物質の中からTRアンタゴニスト活性を持つ新規化合物を抽出することができた。以上のことから、本研究により開発したレポーター遺伝子アッセイ法は、TRへのアゴニストまたはアンタゴニスト作用をもつ化学物質の簡便なスクリーニング法として十分機能し得るということが示された。

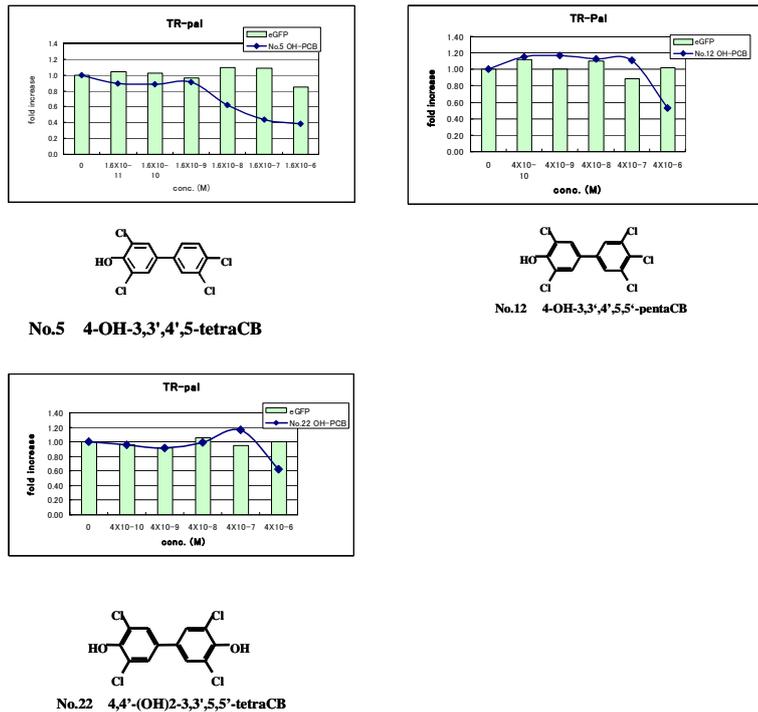


図 2-6-2-7 水酸化 PCB 類の TR レポーターアッセイ結果

(5) 今後の課題と展望

内在性TRリガンドを含む50物質のスクリーニングにおいて、これまでに開発したTRレポーター遺伝子アッセイ法を用いることで、内在性リガンド (T3、T4) 及びその他いくつかのアゴニスト活性ポジティブ化合物を選択することができた。また、TRアンタゴニスト作用をもつとされるTetrachlorobisphenolA (TCBPA) とTetrabromobisphenolA (TBBPA) に対しては、 10^{-5} M程度においてT3-刺激によるLuc活性の減少が明確に観測され、この方法でTRアンタゴニスト活性をもつ化合物のスクリーニングも行うことができることが示された。さらに、新たに合成した25種類の水酸化PCBの中から、TRアンタゴニスト活性を示す3種類の新規化合物を選択することができた。このように、これまでに開発したTRレポーター遺伝子アッセイ系は、TRへのアゴニストまたはアンタゴニスト作用を持つ化学物質のスクリーニングに十分対応できるものとする。今回の実験ではCHO細胞を用いているが、実際の転写の活性化には共役因子等の複雑なタンパク質複合体が関与していると考えられるため、同じ物質でも使用する細胞でTRに対する応答が異なる可能性も考えられる。すなわち、今後は種々のヒト由来細胞を用いる検討が必要となるかもしれない。また、生体中において、TRのサブタイプやホモダイマーかヘテロダイマーかといった受容体の発現・存在様式に関する情報を収集し、できるだけヒトの体内に主として存在する形式に近い測定条件を探索することが重要であると思われる。

(6) 参考文献

Forrest, D. and Vennstrom, B. (2000) Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid*, **10**, 41-52.

Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S., Kuroki, H. and Fujimoto, N. (2002) Thyroid hormonal activity of the

flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 554-559.

Yen, P.M. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.*, **81**, 1097-1143.

Zhang, J. and Laxar, M.A. (2000) The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.*, **62**, 439 – 466.

2-6-3. 甲状腺ホルモン合成系への作用物質検出法

(1) 目的

甲状腺機能に影響を与える化学物質には、作用メカニズムとして、甲状腺ホルモンの合成、放出段階に影響を及ぼす、あるいは末梢血中の甲状腺ホルモンや甲状腺刺激ホルモンの量を変動させる、甲状腺ホルモン受容体レベルで作用するなど多様なメカニズムが想定される。このうち、甲状腺ホルモンの細胞での合成から遊離までのいずれかの過程を阻害するなどホルモン産生系に影響を及ぼす可能性のある化学物質を簡便に検出する方法は、これまでのところ確立されていない。本研究では、甲状腺ホルモン産生系に影響を及ぼす化学物質をスクリーニングするための手法の開発を目的として検討した。

(2) 原理

甲状腺ホルモンとしては T3、T4 及びリバース T3 が知られている。血中から甲状腺細胞内に入ったヨウ素は甲状腺ペルオキシダーゼ (Thyroid peroxidase, TPO) の作用で遊離ヨウ素となり、モノヨードチロシン (MIT) またはジヨードチロシン (DIT) として取り込まれる。MIT 及び DIT からサイログロブリン (Thyroglobulin) 結合型 T3 あるいは T4 が合成され、濾胞中に分泌されたのち、腺細胞に再吸収され、ライソゾーム中のプロテアーゼの作用で T3 あるいは T4 が遊離される (図 2-6-3-1)。本法は甲状腺ホルモンを *in vitro* で産生すると報告 (Patwardhan, N.A. et al., 1991) されているラット甲状腺由来培養細胞 (FRTL-5) を用いて甲状腺へ影響を甲状腺刺激ホルモン刺激下での T3 及び T4 産生量、甲状腺ホルモン産生過程において必須の TPO 活性ならびに Thyroglobulin 産生への影響を基に検討しようとするものである。

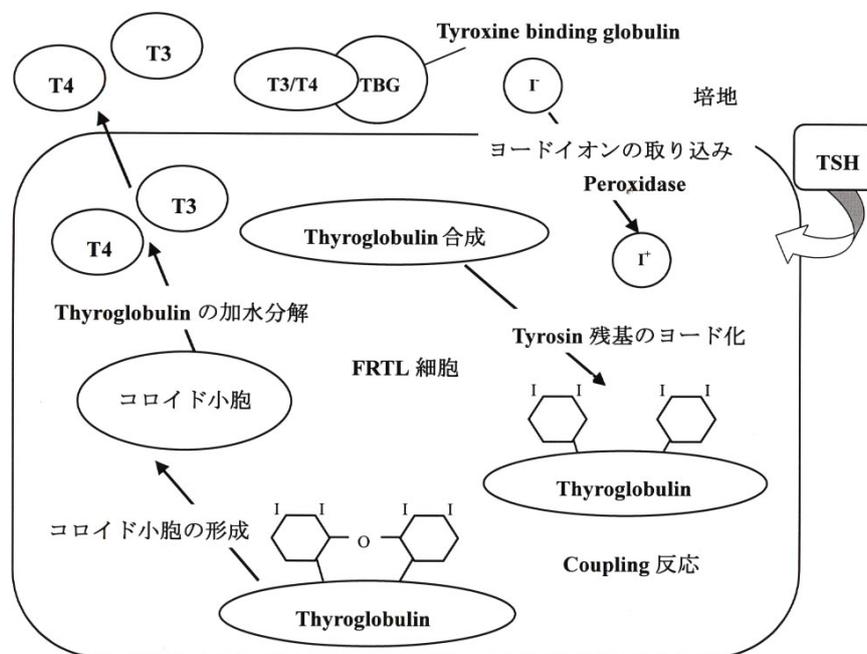


図 2-6-3-1 FRTL 細胞における甲状腺ホルモンの産生及び遊離の模式図 (予想図)

(3) 方法

群馬大学生体調節研究所、岡島研究室から分与されたラット甲状腺由来細胞 FRTLの派生細胞株 (FRTL5-K, FRTL5-OK, FRTL5-S, FRTL5-F1S) を実験に使用した。培地に終濃度として 1 mU/mL Thyroid stimulating hormone (TSH)、0.001 mg/mL Insulin、0.005 mg/mL Transferrin及び 5% Fetal Bovine Serumを添加し、37℃、5%CO₂気相下で維持培養した細胞の上清を得て、産生された甲状腺ホルモン量を測定するための試料とし、免疫蛍光法 (免疫蛍光測定装置 mini VIDAS、bioMeriux sa, France) 及びELISA法 (Rodent T3, T4 ELISA Test Kit, ENDOCRINE TECHNOLOGIES, INC, USA) を用いて測定した。また、TPO活性測定にはsubconfluentまで培養した細胞に対してペルオキシダーゼの特異的発色基質を添加することにより測定し、Thyroglobulin遺伝子の発現量は培養した細胞からTotal RNAを抽出してRT-PCR法によりmRNAの発現量を測定した。

(4) 結果

① 測定結果

FRTL 細胞及びその派生株はいずれも TSH 存在下でも明らかな甲状腺ホルモン産生はみられず、これらの細胞を用いた *in vitro* 甲状腺ホルモン産生評価法の開発は困難と思われる。しかしながら、FRTL 派生細胞株について甲状腺ホルモン産生時に無機ヨウ素の有機化に関与する甲状腺 peroxidase 活性 (TPO)、甲状腺ホルモンの輸送蛋白となる Thyroglobulin の遺伝子発現の検討を行ったところ、いずれの細胞においても有意な TPO 活性が認められ、FRTL5-F1S に関して比較的高い Thyroglobulin mRNA 発現が認められた。FRTL 派生細胞株についての同様の検討としては、FRTL-5 の細胞内で TPO、Thyroglobulin を共に mRNA レベルで発現していることが報告 (Lonigro, R, et al., 2000) がされている。これらの結果は FRTL 系細胞を用いた TPO 活性、Thyroglobulin 産生への影響評価系構築の可能性を示唆するものである。

② FRTL-5 細胞の生理機能のまとめ

図 2-6-3-2 に示すように FRTL-5 はヨウ素の有機化能、Thyroglobulin 産生能、Thyroglobulin 結合型 T3/T4 の取り込み及び分解遊離能は有するものの、Thyroglobulin 結合型 T3/T4 を形成するまでの何らかの機能を欠損しているため、FSH 刺激下で T3/T4 の分泌することは出来ない。

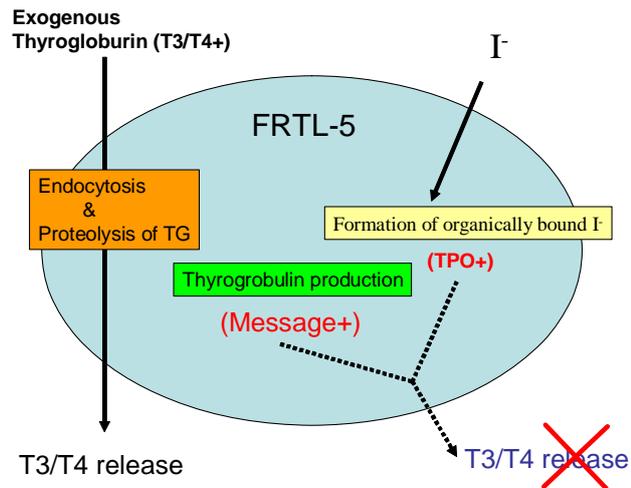


図 2-6-3-2 FRTL-5 細胞における甲状腺ホルモン産生過程の保持機能の模式図
(実際には途中の段階で反応が停止するものと考えられる)

(5) 今後の課題と展望

本研究で検討した実験系においては、甲状腺ホルモンの分泌をエンドポイントとして甲状腺への影響を評価することができないことが明らかになったものの、TPO活性及びThyroglobulin産生能をエンドポイントとした試験系を開発する可能性が確認された。このため、既知の甲状腺機能阻害剤などを用いて、本細胞を用いる試験系の有用性、適応範囲の広さと限界を今後、明らかにすることが重要であると考えられる。

(6) 参考文献

Patwardhan, N.A. and Lombardi, A. (1991) Effect of tumor necrosis factor on growth and function in FRTL5 cells. *Surgery*, **110**:972-977.

Lonigro, R., Donnini, D., Fabbro, D., Perrella, G., Damante, G., Ambesi Impiombato, F. S. and Curcio, F. (2000) Thyroid-Specific Gene Expression Is Differentially Influenced by Intracellular Glutathione Level in FRTL-5 Cell. *Endocrinology*, **141**:901-909.

2-6-4. Ah 受容体へのアゴニスト様作用物質の検出法

(1) 目的

AhR (アリル炭化水素受容体) アゴニスト活性を有する物質を検出するための *in vitro* スクリーニング試験法を構築する。

(2) 原理

AhR (Arylhydrocarbon Receptor : アリル炭化水素受容体 ; いわゆるダイオキシン受容体) リガンドのAhRへの結合を介した転写活性化機構を図 2-6-4-1 に示した。

リガンドと結合していないAhRは細胞質内に存在し、hsp90 (heat shock protein 90) などのタンパク質と複合体を形成している。例えばダイオキシン類などのAhRリガンドが細胞内に取り込まれると、リガンド-AhR複合体を形成して核内に移行し、AhR核輸送因子 (ARNT; AhR Nuclear Translocator) と呼ばれる転写因子とヘテロ二量体を形成する。そして、この二量体がDRE (Dioxin Responsive Element, ダイオキシン応答配列あるいは異物応答配列XRE; Xenobiotics Responsive Elementとも呼ばれる) に結合し、標的タンパク質の発現が誘導される。AhRを介して発現が制御されている代表的なタンパク質として、薬物代謝反応に関わるCYP1A1 が知られている。AhRへのアゴニスト様作用物質の検出法には、AhRとARNTの複合体が結合するDREの下流領域にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞を使用したレポーター遺伝子アッセイを用いる。被験物質を暴露することで誘導されるルシフェラーゼ量をルシフェリンとの反応により生じる発光を測定し、化学物質のAhRアゴニスト活性を推定する。

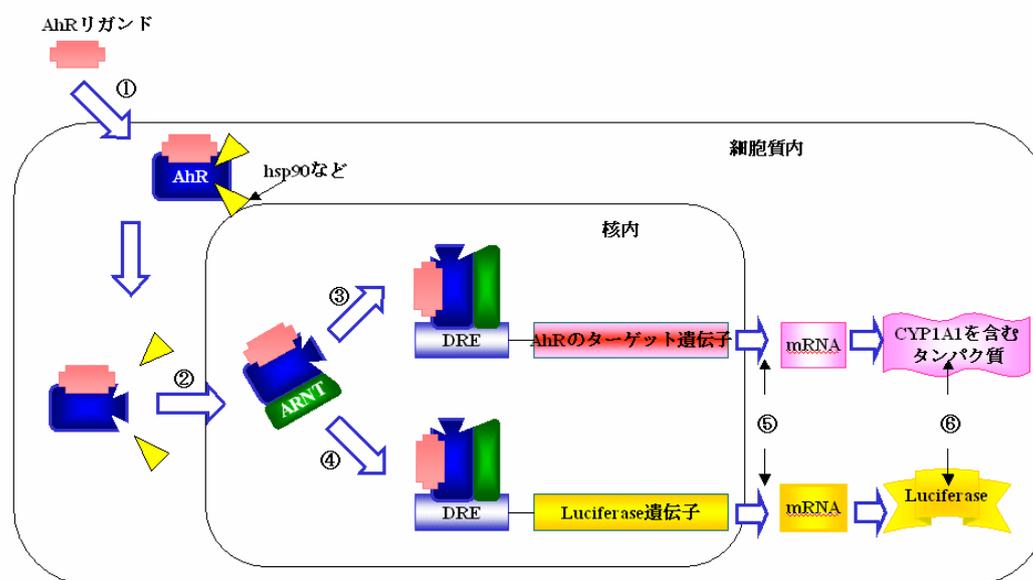


図 2-6-4-1 AhR を介した転写活性化機構

① AhR への結合, ② 核内への輸送及び ARNT との複合体形成, ③④ DRE への結合, ⑤ 転写, ⑥ 翻訳

(3) 方法

内因性のAhRを発現するラット肝がん細胞H4IIEにDREを含んだレポーター遺伝子pGudLuc1.1を導入した安定形質転換株H4IIE-Lucに目的濃度の被験物質を含む培地を暴露し、生成されたレポーター遺伝子産物（ホタルルシフェラーゼ）の酵素活性を化学発光として検出する（DR-CALUX[®]; Dioxin-Responsive Chemical Activated Luciferase Expression）。

(4) 検討状況

DR-CALUX[®]アッセイのAhRアゴニスト活性スクリーニング法としての有用性評価について以下の検討を行なった。

- ① 暴露時間の最適化
 - a. 暴露時間の違いによる活性への影響
 - b. 再現性の確認
- ② 他の細胞系との比較
ヒト肝がん細胞を用いた DR-CALUX アッセイとの比較
- ③ EROD アッセイとの比較
- ④ 反応メカニズムに関する確認

(5) 今後の課題と展望

これまでに取得したデータに基づいて、H4IIE-Luc 細胞を用いた DR-CALUX アッセイのAhRアゴニスト活性スクリーニング手法としての有用性を評価していく。

また、近年、化学物質のAhRへの結合がAhRアゴニスト活性としての作用だけでなく、化学物質が結合したAhRがエストロゲン受容体(ER)とクロストークすることによってエストロゲン様作用を示すことが明らかとなった(Ohtake et al., 2003)。このような機序による内分泌かく乱作用も考えられることから、このような作用を評価する手法について検討を行なう必要があると考えられる。

(6) 参考文献

Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. (2003) Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, **423**, 545-550.

2-6-5. 性ステロイドホルモン生合成系への作用物質検出法

(1) 目的

性ホルモン受容体への結合を介した応答を検出する *in vitro* の試験法がこれまでに開発されてきている。しかし、性ホルモン受容体への結合を介さない機序として、コレステロールからエストロゲン（女性ホルモン）あるいはアンドロゲン（男性ホルモン）を合成する性ホルモン生合成系への影響が考えられることから、このような作用機序を有する化学物質をスクリーニングする試験法を開発する。

(2) 原理

性ホルモン生合成系には、CholesterolをPregnenoloneに変換するコレステロール側鎖切断酵素（P450_{scc}あるいはCYP11A1）、17 α 位水酸化酵素（P450_{c17}あるいはCYP17）、3 β 位水酸基脱水素酵素（3 β -HSD）、17 β 位水酸基脱水素酵素（17 β -HSD）及び3位のカルボニル基を水酸基に変換してAndrostenedioneをEstrone、あるいはTestosteroneを17 β -Estradiolに変換する芳香化酵素（アロマターゼあるいはCYP19）などの複数の酵素が関与する多段階の反応過程が存在しており（図2-6-5-1）、これらの反応過程に化学物質が与える影響を評価する必要がある。また、化学物質が性ホルモン生合成系に与える影響には、酵素活性の阻害あるいは亢進作用による影響と酵素発現量の変化による影響が考えられることから、これらを区別するための評価手法が必要である。そこで、性ホルモン合成に関与する酵素を発現しているヒト副腎皮質由来H295R細胞を用いて、化学物質が性ホルモン合成酵素群の活性に与える影響を評価するために、酵素反応の生成物を酵素反応の生成物を液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)法で定量する。また、化学物質が性ホルモン合成酵素群の発現量に与える影響を評価するために、定量的Real-Time PCRによる各酵素の遺伝子発現量を定量する。

(3) 方法

性ホルモン合成に関連する酵素を発現しているヒト副腎皮質由来のH295R細胞を用いて、培地中の各酵素の反応生成物をLC/MSにより定量した。また、化学物質による酵素発現量への影響を評価するために細胞内に発現している各酵素のmRNA量を定量的Real-Time PCR法により定量した。

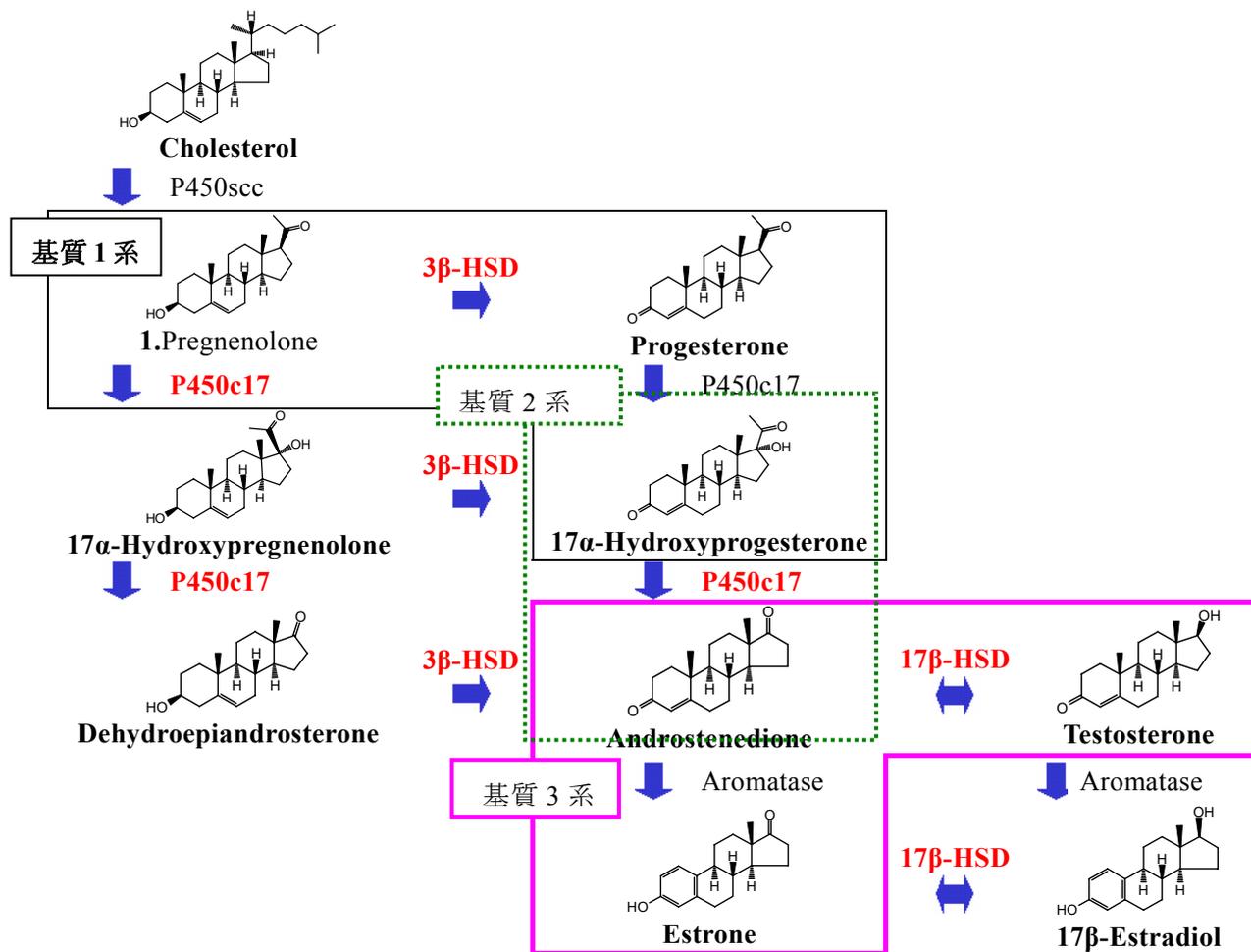


図 2-6-5-1 性ホルモン合成経路

(4) 検討状況

① LC/MS による生成物定量法の構築

培地中に放出されたステロイド代謝物は、酢酸エチルによる液-液抽出法で抽出し、LC/MS を用いて検出した。内部標準物質として Methyltestosterone を添加した。

LC/MSはWaters社製四重極型LC-MS ZQを使用した。分析カラムはL-column ODS (150 mm x 2.1 mm i.d.、5 μm化学物質評価研究機構製)を用い、移動相組成は、0.08%ぎ酸溶液/0.08%ぎ酸含有アセトニトリル (50/50) とした。流量は 0.2 mL/minとし、試料注入量は 5 μLとした。測定はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法ポジティブモードで行い、イオン源温度 120℃、Desolvation温度 350℃とした。測定モードは、選択イオン検出 (Selected Ion Monitoring : SIM) で行った。これらの方法によって Pregnenolone、Progesterone、17α-Hydroxyprogesterone、Androstenedione、Testosterone及びEstroneをLC/MSにより定量する方法を構築した。

なお、生成物を定量する際に、H295R 細胞が内因的に産生した 17α-Hydroxyprogesterone や Androstenedione が検出され、化学物質による酵素活性への影響を評価する上でノイズとなると考えられた。そこで、より正確に反応生成物を定量するために、重水素化体の Pregnenolone、17α-Hydroxyprogesterone 及び Androstenedione を基質として添加し、その代謝物を定量する3つの評価系を構築した (図 2-6-5-1、基質1系~基質3系)。

② 定量的 Real-Time PCR による関連酵素発現量定量の構築

Hilscherova ら (2004) の設計したプライマーを用いてハウスキーピング遺伝子である β -actin ならびに性ホルモン合成に関与している P450scc、P450c17、 3β -HSD、Aromatase 及び 17β -HSD を定量する方法を構築した。使用したプライマー及び増幅産物のサイズを表 2-6-5-1 に示す。

表 2-6-5-1 Real-Time PCR に用いたプライマー及び増幅産物のサイズ

Gene	プライマー		product size (bp)
b-actin	F-	CACTCTTCCAGCCTTCCTTCC	100
	R-	AGGTCTTTGCGGATGTCCAC	
P450scc	F-	GAGATGGCACGCAACCTGAAG	137
	R-	CTTAGTGTCTCCTTGATGCTGGC	
3β -HSD2	F-	TGCCAGTCTTCATCTACACCAG	95
	R-	TTCCAGAGGCTCTTCTTCGTG	
P450c17	F-	AGCCGCACACCAACTATCAG	134
	R-	TCACCGATGCTGGAGTCAAC	
P450arom	F-	AGGTGCTATTGGTCATCTGCTC	128
	R-	TGGTGAATCGGGTCTTTATGG	
17β -HSD4	F-	TGCGGGATCACGGATGACTC	121
	R-	GCCACCATTCTCCTCACAACTC	

F- : Forward Primer, R- : Reverse Primer

(5) 今後の課題と展望

性ホルモン合成系に関与する各酵素の活性及び mRNA 量をそれぞれ LC/MS 及び定量的 Real-Time PCR により測定することが可能となった。今後、性ホルモン生合成系への影響が既知の化学物質を用いて、本試験法の有用性を検証していくとともに、試験法の最適化を進める。なお、H295R 細胞を用いて基質非添加条件下で産生されるホルモン量変化を検出する試験法については、米国の環境保護庁 (US EPA) 主導のもと、US EPA/デンマーク/日本 (経済産業省) 間でプロトコルの最適化や数種の試験物質を用いた検証作業が進められているところである。この進捗については 2005 年 12 月 14-15 日に開催された OECD の第 3 回 VMG-NA において US EPA より報告された。

(6) 参考文献

Hilscherova, K., Jones, P.D., Gracia, T., Newsted, J.L., Zhang, X., Sanderson, J.T., Yu, R.M., Wu, R.S. and Giesy, J.P. (2004) Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR .Toxicol Sci., **81** 78-89.

2-7. 子宮増殖アッセイ

(1) 目的

古くからエストロゲン様作用の検出に用いられている子宮増殖アッセイを改良し、化学物質がエストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン作用を有するか否かをほ乳動物を用いてスクリーニングする系を確立することを目的とした。また、確立したアッセイを用いての基礎的知見の取得も目的とした。

(2) 原理

子宮増殖アッセイは、エストロゲンによって雌動物の子宮が肥大することを利用して化学物質がエストロゲン様作用を有するか否か検出する試験法である。成熟した個体では内因性のエストロゲンが存在するため、ホルモン様物質を投与しても視床下部-下垂体-卵巣フィードバック系が働くため子宮の肥大を生じ難い。そのため、内因性のエストロゲンが著しく低下した個体を利用してホルモン様物質に対する反応性を高めている。内因性エストロゲンを低下させる方法として、卵巣摘出動物を用いる方法と卵巣機能の開始前の幼若動物を用いる方法とがある。

また、内因性のエストロゲンをなくした状態の雌動物に外因性のエストロゲン様物質を加えて体内のエストロゲン量を人為的に調節し子宮を肥大させた状態で、抗エストロゲン作用を有する化学物質を作用させることにより子宮重量の増加抑制が生じることを利用して、化学物質の抗エストロゲン作用も検出することができる (菅野純, 2000)。

① 卵巣摘出ラット法

成熟ラットの卵巣を摘出することにより視床下部-下垂体-卵巣フィードバック系を働かないようにする方法である。卵巣を摘出することにより内因性のエストロゲンが減少し子宮が縮小する、この状態のラットに外因性のエストロゲン様物質を投与すると子宮が肥大することを利用する方法である。卵巣摘出ラット法では、卵巣の摘出手術が必要であり、術後管理、卵巣が完全に除去されていることを確認する膣垢検査も必要である。また、子宮の退縮が完了するまで術後 3~4 週間が必要である (菅野純, 2000)。

② 幼若ラット法

生後 20 日から 27 日頃までの幼若動物では、内因性のエストロゲンである 17β -エストラジオール(E2)の血中濃度が低く保たれており、子宮は未発達であるがエストロゲン受容体が発現しており、外因性のエストロゲンに対して反応し肥大する。したがって、幼若ラット法では、卵巣を摘出していない正常動物を用いることが可能であり、動物に侵襲を与えないという動物倫理の観点に加え、手術、術後管理、卵巣が完全に除去されていることを確認する膣垢検査が不要なことなど、作業性の点でも有利である。ただし、試験期間は、離乳可能な生後 18 日 (出生日を 0 日とする) から卵巣が機能を開始する生後 27 日ごろまでに限定される。多くは生後 18 日から生後 20 日に投与を開始し投与期間は 3 日間である (菅野純, 2000)。

(3) 方法

① スクリーニング系の確立

エストロゲン様作用または抗エストロゲン作用のスクリーニング系の確立のために OECD におけるスクリーニング試験法開発検証試験へ参加した。また、主に幼若ラットを用いる試験にかかわる諸条件（雌性生殖器の発達に関する知見の収集、投与経路の比較、幼若ラット法と卵巣摘出ラット法の感度の比較、被験物質の投与期間、使用動物の日齢及び体重制限、飼料中の植物エストロゲンの影響等）の基礎的検討を行った。

② 基礎的知見取得のための試験の実施

OECD が提案している試験法（案）（OECD, 1999）に準じ、子宮重量の変化を指標とした子宮増殖アッセイを下記化学物質について適用した。

- a. 内分泌かく乱作用の観点で科学的評価・検証を早急に行うべきと判断された物質(個別評価物質)
- b. OECD の参照物質を含むホルモン様作用を有すると考えられる 25 の化学物質
- c. 主に *in vitro* 試験を実施した化学物質から選定した 66 の化学物質

(4) 結果

① スクリーニング系の確立

- a. OECD におけるスクリーニング試験法開発検証試験への参加

○ Phase 1 試験

強力なエストロゲン様作用物質 (17 α -Ethinyl estradiol) と抗エストロゲン作用を有するとされる物質 (ZM189.154) を用いて、幼若または卵巣摘出成熟ラットを用いる各プロトコール(表 2-7-1)の妥当性の検証、検出感度及び試験機関間での再現性確認等を実施した。

Phase 1 試験の結果、子宮増殖アッセイによって強いエストロゲン様作用物質及び抗エストロゲン作用物質を検出することが可能であることが確認された。プロトコール A (幼若ラットに経口投与) では、他の試験プロトコールと比較して感度が若干低いことが示され、その理由は投与経路であると考えられている。

卵巣摘出成熟ラットのプロトコールでは、限定されたデータではあるが、3 日間投与 (プロトコール C) より 7 日間投与 (プロトコール C') の方が感度があがる傾向が示された。

表 2-7-1 Phase 1 試験のプロトコール

プロトコール A	幼若雌ラットを用いた 3 日間経口投与
プロトコール B	幼若雌ラットを用いた 3 日間皮下投与
プロトコール C	卵巣摘出成熟ラットを用いた 3 日間皮下投与
プロトコール C'	卵巣摘出成熟ラットを用いた 7 日間皮下投与

○ Phase 2 試験

弱いエストロゲン様作用を有するとされる物質 (Methoxychlor, Bisphenol A, Genistein, o,p'-DDT, Nonylphenol の 5 物質) とエストロゲン様作用を示さないと考えられる物質 (Dibutyl phthalate) を用いて、

1 用量または 5 用量 (用量-反応法)で幼若または卵巣摘出成熟ラットを用いる各プロトコールの妥当性の検証、検出感度及び試験機関間での再現性等を実施した。Phase 2 に用いるプロトコールは、Phase 1 で用いたプロトコールに幼若ラットの投与開始日齢の範囲を 18 日齢～20 日齢 (出生日を 0 日齢) とし、卵巣摘出後の成獣の馴化期間を最低 7 日から最低 14 日に延長するといった極僅かな修正を加えたプロトコールで実施した。

Phase 2 試験の結果、いずれのプロトコールでも、十分量が投与された場合には、5 つの弱いエストロゲン物質を検出可能であった。

4 つのプロトコールのうちで、特に秀でたものはなかった。幼若ラットと卵巣摘出ラットの比較では、Bisphenol A では卵巣摘出成熟ラットの方が幼若ラットよりも感度が高く、Genistein や Methoxychlor では逆に幼若ラットの方が卵巣摘出成熟ラットよりも感度が高い傾向がみられている。投与経路については、Methoxychlor と o,p'-DDT では経口投与が感度がよく、Bisphenol A と Genistein では皮下投与の方が感度がよく、Nonylphenol では皮下投与の方が若干感度が高いとの結果であった。卵巣摘出成熟ラットの投与期間については、7 日間投与と 3 日間投与では検出感度において大きな差が無いことが判った。

試験機関内及び試験機関間での再現性が確認された。

b. 試験法確立のための基礎的条件検討

主に幼若ラットを用いる試験にかかわる諸条件 (雌性生殖器の発達に関する知見の収集、投与経路の比較、幼若ラット法と卵巣摘出ラット法の感度の比較、被験物質の投与期間、使用動物の日齢及び離乳時期、飼料中の植物エストロゲンの影響等) の検討を行った。

○ 最適な投与期間を決定する目的で、雌性生殖器の発達に関する知見の収集として 21～37 日齢までの正常発育ラットの子宮の組織学的変化を調べた結果、31 日齢以降に子宮の粘膜上皮細胞の高さが増加した。さらに粘膜上皮細胞に変性がみられ、膣においては膣開口が 34 日齢から出現しそれに伴い膣の形態学的変化が認められた。このことにより、投与を 31 日齢以前に終了する必要がある、それ以降では正常発育ラットの変化が試験物質のエストロゲン作用による変化を妨害する可能性がでてくることが示唆された (Sawaki, M. et al., 2000)。

○ Ethinylestradiol (EE) を用いて強制経口投与と皮下投与との投与経路による比較を行った結果、強制経口投与と皮下投与のいずれにおいてもエストロゲン様作用、抗エストロゲン作用が検出できた。しかし、検出感度については、EE のエストロゲン様作用については皮下投与の方が強制経口投与よりも高感度に検出できた。幼若ラットと卵巣摘出ラットの比較では感度の差は認められなかった。

○ 投与期間の検討では、強いエストロゲン作用物質である Diethylstilbestrol (DES) 及び EE においては 7 日間より 3 日間投与の方が検出感度が高く、投与期間を長くしても検出感度は向上せず、幼若ラットを用いた子宮増殖アッセイ法では、3 日間投与という OECD 案は妥当であるとの結論を得た (Yamasaki, K., et al., 2000)。

○ 使用動物の日齢、離乳日齢の差による影響を調べた結果、20 日齢離乳の 21 日齢投与開始が子

宮増殖の検出に適しているとの結果を得た (Yamasaki, K., et al., 2001)。

○ 飼料中の Genistein、Daidzein などの植物エストロゲンが子宮増殖アッセイの検出感度に対して及ぼす影響を調べた結果、子宮重量の増加には飼料の違いによる差がみられず、幼若ラットを用いた子宮増殖アッセイでは飼料中の植物エストロゲン量は子宮重量に影響しないとの結論を得た (Yamasaki, K., et al., 2002)。

② 基礎的知見取得のための試験の実施

a. かく乱作用の観点で科学的評価・検証を早急に行うべきと判断された物質(個別評価物質)

1998年に環境庁(当時)が公表した「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」において、今後の調査・研究の対象としてリストアップされた「内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質」(67物質群)のうち、我が国での生産・使用実態がないとされた物質群、農薬登録物質やダイオキシン等の各種対策が進められている物質群を除いた15物質群に関して、科学的評価・検証を早急に行うべきとの社会的要請に応えるため、緊急的な対応として有害性評価を行った。これらの有害性評価書で内分泌かく乱作用の確認のための2世代繁殖毒性試験の実施が必要とされた7物質について確認試験を行うとともに性ホルモン受容体介在性の影響の知見を補うためにスクリーニング試験を実施した。

このスクリーニング試験の試験条件は試験条件以下のとおりである。

表 2-7-2 試験条件

使用動物	投与期間及び投与経路	化学物質
幼若雌ラット	3日間皮下投与	Butylbenzyl phthalate
		4-Nitrotoluene
卵巣摘出雌ラット	7日間皮下投与	Diethylphthalate
		n-Butyl benzene、Benzophenone
	3日間強制経口投与	2,4-Dichlorophenol
	7日間強制経口投与	Dicyclohexyl phthalate

その結果、Benzophenone にエストロゲン様作用及び抗エストロゲン作用が認められた。他の物質では、エストロゲン様作用、または抗エストロゲン作用は検出されなかった。Benzophenone 自体はエストロゲン受容体に結合しないが、その代謝物がエストロゲン受容体に結合し、エストロゲン様作用を発現することが知られている。

b. OECD の参照物質を含むホルモン様作用を有すると考えられる 25 の化学物質

内分泌かく乱作用を有すると疑われ、優先的評価の対象となっている物質(平成12年度環境省連携評価対象8物質)及びその異性体等関連物質のほか、ヒト、植物の天然ホルモン、人工ホルモン等の代表的な物質を中心とした25物質を対象とした。

子宮増殖アッセイは、幼若ラットに3日間皮下投与を行ないエストロゲン様作用の検出のみを検出した。なお、用量は固定用量で実施した。また、in vitro 試験としてエストロゲン受容体結合試験、レポーター遺伝子アッセイもあわせて実施した。

その結果、25物質のうち15物質で子宮増殖アッセイにおいてエストロゲン様作用が確認された。
(表2-7-3)

その中で、子宮増殖アッセイの参照物質6物質のうち、強いエストロゲン様物質である Ethynyl estradiol 及び弱いエストロゲン様物質のうち Methoxychlor 以外の物質でエストロゲン様作用が検出できた。また、陰性物質である Dibutyl phthalate はエストロゲン様作用がない物質として判定された。なお、Methoxychlor については、皮下投与よりも経口投与の方が感度よく検出される物質であることが知られている (Odum, J., et al., 1997)。

表2-7-3 OECDの参照物質を含むホルモン様作用を有すると考えられる
25の化学物質の結果

試験物質番号	化合物名	Cas No.	子宮増殖アッセイ	hER α 受容体結合性試験	hER α レポーター遺伝子アッセイ
			エストロゲン様作用	結合性	アゴニスト活性
1-045	Tributylchlorostannane	1461-22-9	—	+	—
2-002	17 α -Estradiol	57-91-0	+	+	+
2-003	Estrone	53-16-7	+	+	+
2-005	Ethynyl estradiol*	57-63-6	+	+	+
2-041	Equilin	474-86-2	+	+	+
2-044	17-hydroxy-androstan-3-one	521-18-6	+	+	+
2-046	Norethindrone	68-22-4	+	+	+
2-048	Levonorgestrel	797-63-7	+	+	—
3-008	4-Octylphenol	1806-26-4	—	N.D.	+
3-015	Nonylphenol (mixture) *	25154-52-3	+	+	+
3-016	4-n-Nonylphenol	104-40-5	—	N.D.	—
3-017	4-tert-Octylphenol	140-66-9	+	+	+
3-161	Dibutyl phthalate*	84-74-2	—	N.D.	—
3-176	Dicyclohexyl phthalate	84-61-7	—	+	+
3-232	Octachlorostyrene	29082-74-4	—	N.B.	—
4-024	4,4'-Dihydroxydiphenylmethane	620-92-8	+	+	+
4-026	4- α -Cumylphenol	599-64-4	+	+	+
4-027	Bisphenol A*	80-05-7	+	+	+
4-028	2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-butane	77-40-7	+	+	+
4-060	Methoxychlor*	72-43-5	—	+	+
4-102	Benzophenone	119-61-9	—	N.B.	—
5-002	Daidzein	486-66-8	—	+	+
5-048	Hematoxylin	517-28-2	—	+	—

試験物質番号	化合物名	Cas No.	子宮増殖アッセイ	hER α 受容体結合性試験	hER α レポーター遺伝子アッセイ
			エストロゲン様作用	結合性	アゴニスト活性
6-001	Zearalenone	17924-92-4	+	+	+
6-007	Genistein*	446-72-0	+	+	+

*.: OECD 参照物質；強いエストロゲン様物質(Ethynyl estradiol)、弱いエストロゲン様物質 (Bisphenol A、Nonylphenol、Genistein、Methoxychlor)、陰性物質 (Dibutyl phthalate)

+ : 陽性、- : 陰性

N.D. : 試験濃度範囲で、IC50 値が算出できなかったが、最大試験濃度において、標準リガンドの受容体からの脱離が 20%以上であった試験物質。

N.B. : 試験濃度範囲で、IC50 値が算出できず、最大試験濃度において、標準リガンドの受容体からの脱離が 20%未満であった試験物質。

c. 主に *in vitro* 試験を実施した化学物質から選定した 66 種類の化学物質

ヒト ER α レポーター遺伝子アッセイで陽性を示す物質、ヒト ER α 受容体結合試験で結合性が異なり、また様々な構造カテゴリー、エストロゲン受容体介在性以外のメカニズムが考えられている種々の参照物質 (性ホルモン受容体非介在性と考えられる物質、抗アンドロゲン作用物質)等である 66 の化学物質を選定した。1 物質 (Triphenyltin chloride) については *in vitro* 試験は実施していない。

子宮増殖アッセイは、幼若ラットに 3 日間皮下投与を行なう OECD のプロトコール B に準じ、エストロゲン様作用を調べるための予備試験を基に算出された被験物質の最大耐量を高用量として以下中用量、低用量の 3 用量と媒体対照群のほか、抗エストロゲン作用を調べるために上記用量に EE を併用する群(抗エストロゲン作用検出)、抗エストロゲン作用の陽性対照として Tamoxifen (TMX) と EE を併用する群を設け、3 日間皮下投与した。

子宮増殖アッセイの結果及び *in vitro* 試験の結果は表 2-7-4 に示した。

表 2-7-4 主に *in vitro* 試験を実施した化学物質から選定した 66 種類の化学物質
の子宮増殖アッセイの結果

試験物質番号	化合物名	Cas No.	子宮増殖アッセイ		hER α 結合性試験	hER α レポーター遺伝子アッセイ	
			エストロゲン様作用	抗エストロゲン作用	結合性	アゴニスト活性	アンタゴニスト活性
1-011	Bis(2-ethylhexyl)adipate (= Di(2-ethylhexyl) adipate)	103-23-1	-	-	N.B.	-	N.E.
1-020	Disulfiram	97-77-8	-	+	+	-	+
2-043	17 α -Methyltestosterone	58-18-4	+	-	N.D.	+	-
2-049	Testosterone enanthate	315-37-7	+	-	N.B.	+	-
3-005	4-n-Amylphenol	14938-35-3	+	-	+	+	-
3-009	4-Dodecyl-phenol	104-43-8	+	-	+	+	-

試験物質番号	化合物名	Cas No.	子宮増殖アッセイ		hERα結合性試験	hERαレポーター遺伝子アッセイ	
			エストロゲン様作用	抗エストロゲン作用	結合性	アゴニスト活性	アンタゴニスト活性
3-013	p-(tert-Butyl)phenol	98-54-4	+	+	+	+	-
3-014	p-(tert-Amyl) phenol	80-46-6	+	+	+	+	-
3-019	4-Cyclohexylphenol	1131-60-8	+	-	+	+	-
3-020	4-(1-Adamantyl)phenol	29799-07-3	+	-	+	+	-
3-030	2,4-Di-tert-butylphenol	96-76-4	-	-	+	+	N.E.
3-041	p-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	-	-	N.B.	-	N.E.
3-042	Ethyl-p-hydroxybenzoate	120-47-8	-	-	N.D.	+	-
3-046	2-Ethylhexyl-4-hydroxybenzoate	5153-25-3	+	+	+	+	-
3-062	4-tert-Butylcatechol	98-29-3	+	+	+	-	-
3-103	p-Dichlorobenzene	106-46-7	-	-	N.B.	+	-
3-136	Pentachloro-phenol	87-86-5	-	-	N.B.	-	N.E.
3-159	Diethyl phthalate	84-66-2	-	-	N.B.	-	N.E.
3-160	Di-n-propylphthalate	131-16-8	-	-	N.D.	-	N.E.
3-162	Di-n-pentyl phthalate	131-18-0	-	-	+	+	-
3-163	Di-n-hexyl phthalate	84-75-3	-	-	+	-	N.E.
3-164	Diheptyl phthalate	3648-21-3	-	-	+	-	N.E.
3-173	Diisononyl phthalate	28553-12-0	-	-	+	+	N.E.
3-174	1,2-Benzenedicarboxylic acid diisodecyl ester	26761-40-0	-	-	+	+	N.E.
3-175	Di-sec-octyl phthalate (= Di(2-ethylhexyl) phthalate)	117-81-7	-	-	+	-	-
3-193	Diallyl terephthalate	1026-92-2	-	-	N.B.	+	-
3-212	Flutamide	13311-84-7	-	-	N.B.	-	N.E.
3-345	4-Diethylaminobenzaldehyde	120-21-8	+	-	N.B.	-	N.E.
4-011	4,4-Dihydroxydiphenyl	92-88-6	+	+	+	+	-
4-018	4'-Hydroxy-4-biphenylcarbonitrile	19812-93-2	-	-	+	+	-
4-019	3,3',5,5'-Tetramethyl-(1,1'-biphenyl)-4,4'-diol	2417-04-1	-	-	+	+	-
4-023	4-(Phenylmethyl)-phenol	101-53-1	+	+	+	+	-
4-024	4,4'-Dihydroxydiphenylmethane	620-92-8	+	+	+	+	-
4-029	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-n-pentane	6807-17-6	+	+	+	+	-
4-033	4,4'-(Hexafluoroisopropylidene)diphenol	1478-61-1	+	+	+	+	-

試験 物質 番号	化合物名	Cas No.	子宮増殖アッセイ		hERα結合性 試験	hERαレポーター遺伝子 アッセイ	
			エストロゲ ン様作用	抗エストロ ゲン作用	結合性	アゴニスト 活性	アンタゴ ニスト活性
4-034	4,4'-Cyclohexylidenebisphenol	843-55-0	+	+	+	+	—
4-035	4,4'-(Octahydro-4,7-methano-5H-inde n-5-ylidene) bisphenol	1943-97-1	+	+	+	+	+
4-041	4,4'-(1,3-Phenylenediisopropylidene) bisphenol	13595-25-0	+	+	+	+	—
4-044	4,4'-Sulfonyldiphenol	80-09-1	+	+	+	+	—
4-054	1,1,3-Tris(2-methyl-4-hydroxy-5-tert- butylphenyl)butane	1843-03-4	—	—	+	—	—
4-061	4,4'-Dimethoxytriphenylmethane	7500-76-7	—	—	N.D.	—	N.E.
4-103	4-Hydroxybenzophenone	1137-42-4	+	+	+	+	—
4-106	4,4'-Dihydroxybenzophenone	611-99-4	+	+	+	+	—
4-107	2,4-Dihydroxybenzophenone	131-56-6	+	+	+	+	—
4-108	2,4,4'-Trihydroxybenzophenone	1470-79-7	+	+	+	+	—
4-111	4,4'-Dimethoxybenzophenone	90-96-0	—	—	N.B.	+	N.E.
4-112	2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	131-55-5	+	+	+	+	—
4-114	4-Fluoro-4'-hydroxybenzophenone	25913-05-7	+	—	+	+	—
4-115	2,3,4-Trihydroxybenzophenone	1143-72-2	+	+	+	—	+
4-137	4-Hydroxyazobenzene	1689-82-3	+	—	+	+	—
4-144	3,3,3',3'-Tetramethyl-1,1'-spirobisind ane-5,5',6,6'-tetrol	77-08-7	—	+	+	+	—
4-147	4,4'-Thiobis-phenol	2664-63-3	+	+	+	+	—
4-150	Diphenyl-p-phenylenediamine	74-31-7	+	—	+	+	N.E.
4-172	Clomiphene citrate (cis and trans mixture)	50-41-9	+	+	+	+	+
4-408	3,3'-Dichlorobenzidine dihydrochloride	612-83-9	—	—	+	+	N.E.
5-021	2-Naphthol	135-19-3	—	—	+	+	N.E.
5-136	Benzoanthrone	82-05-3	—	+	N.B.	+	N.E.
6-008	Atrazine	1912-24-9	—	+	N.B.	—	N.E.
6-026	Amitrol	61-82-5	—	—	N.B.	—	N.E.
6-032	Benomyl	17804-35-2	—	—	N.B.	—	N.E.
6-067	Captafol (ISO) (= 1,2,3,6-Tetrahydro-N-(1,1,2,2- tetrachloroethylthio)phthalimide)	2425-06-1	—	—	+	—	—

試験物質番号	化合物名	Cas No.	子宮増殖アッセイ		hER α 結合性試験	hER α レポーター遺伝子アッセイ	
			エストロゲン様作用	抗エストロゲン作用	結合性	アゴニスト活性	アンタゴニスト活性
6-071	N-Cyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide	95-33-0	—	—	+	—	N.E.
6-072	2,2'-Dithiobis[benzothiazole]	120-78-5	—	—	+	—	N.E.
6-074	2-Benzothiazolethiol	149-30-4	—	—	+	—	N.E.
6-087	Hexachlorocyclopentadiene	77-47-4	—	—	+	—	—
—	Triphenyltin chloride	639-58-7	—	+	N.E.	N.E.	N.E.

N.E. : 試験未実施

N.D. : 試験濃度範囲で、IC50値が算出できなかったが、最大試験濃度において、標準リガンドの受容体からの脱離が20%以上であった試験物質。

N.B. : 試験濃度範囲で、IC50値が算出できず、最大試験濃度において、標準リガンドの受容体からの脱離が20%未満であった試験物質。

○ 子宮増殖アッセイの結果

試験に供した 66 物質のうち、エストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン作用のいずれかを有していたものは 36 物質、いずれの作用も有さないものは 30 物質であった。

子宮増殖アッセイで影響のみられた 36 物質中、エストロゲン様作用を有するものが 31 物質、抗エストロゲン作用を有するものが 26 物質で、両方の作用を有するものが 21 物質、エストロゲン様作用のみは 10 物質、抗エストロゲン作用のみを有するものは 5 物質であった。(表 2-7-5)

表 2-7-5 66 種類の化学物質の子宮増殖アッセイの結果

	抗エストロゲン作用 (陽性)	抗エストロゲン作用 (陰性)	計
エストロゲン様作用 (陽性)	21	10	31
エストロゲン様作用 (陰性)	5	30	35
計	26	40	66

この子宮増殖アッセイの結果については、ER 受容体試験や ER レポーター遺伝子アッセイが化学物質の生体に対する (抗) エストロゲン様作用のスクリーニングに適しているか否かの解析に用いた。

(5) 試験法としての評価

① OECDにおける検証試験の状況

OECD の検証試験の Phase 1 において、OECD が提案した 4 つのプロトコールでは、いずれのプロ

トコールでも強いエストロゲン様物質及び抗エストロゲン物質による影響を検出できた。これをうけ、次の段階として実施した Phase 2 では弱いエストロゲン様物質の影響を検出することもできた。また、試験機関内及び試験機関間で再現性がある結果が得られた。

OECD では予定されていた検証試験は終了し、ピアレビューパネルによるピアレビューが実施された。

このピアレビューパネルによる報告書草案において①試験計画書が十分でない。②再現性が十分でない。③予測性の検討がされていない。④物質数と物質選択に疑問がある。⑤統計学的手法に疑問がある。⑥試験をした試験施設と使用動物数が多すぎる。などの指摘があった。

2005年1月の第8回内分泌かく乱物質の試験及び評価に関するタスクフォース会合（OECD 8th Meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment： EDTA8）において、これらの問題の多くは解決できることが示され、結論として、本アッセイの検証は十分にできていることが確認され、試験法ガイドライン化に向けて進むことが合意された。

② 試験法としての評価

OECD が提案したプロトコールでの（抗）エストロゲン作用の検出精度が確認され、試験機関内及び試験機関間での再現性が確認されたことにより、本アッセイは化学物質が有する（抗）エストロゲン作用の生体を用いた検出系として有用であることが確認された。

また、*in vitro* 試験を実施した物質の内約 100 物質について、子宮増殖アッセイの知見を得ており、両方の相関をみることで *in vitro* 試験のプレスクリーニング法としての有用性を検討するために重要な情報を提供することができた。

子宮増殖アッセイは、化学物質が生体に対して（抗）エストロゲン作用を及ぼすか否かをほ乳動物を用いてスクリーニングする系として最も重要なアッセイであり、スクリーニング法として利用できるだけでなく、その他の確認試験の結果とともに、この子宮増殖アッセイの知見ならびに *in vitro* 試験での知見を加えて総合的に判断することにより、生体に対する（抗）エストロゲン物質の影響の機序解明に寄与するものと考えられる。

(6) 今後の課題と展望

（抗）エストロゲン様作用の検出目的での単独のスクリーニング試験法としては、試験法プロトコールを含め、確立されたと考えられる。しかし、試験評価スキームの開発を考えた場合には、*in vitro* 試験と動物試験結果との関連性に関する知見を更に集積し、両者の相関性や化学構造との関係など詳細な解析を行う必要があるものと考えられる。

今後、子宮増殖アッセイ法のガイドライン化までに追加的な対応措置が生じた場合は優先的に実施する。

(7) 参考文献

Connor, K., Howell, J., Chen, I., Liu, H., Berhane, K., Sciarretta, C., Safe, S. and Zacharewski, T. (1996) Failure of chloro-s-triazine-derived compounds to induce estrogen receptor-mediated responses in vivo and in vitro. *Fundam. Appl. Toxicol.* **30**, 93-101

Gibson, M.K., Nemmers, L.A., Beckman, W.C., Davis, V.L., Curtis, S.W. and Lorach, K.S. (1991) The mechanism of ICI-614,384 antiestrogenicity involves rapid loss of estrogen receptor in uterine

- tissue. *Endocrinology* **129**, 2000-2010.
- Jordan, V.C. (1984) Biochemical pharmacology and antiestrogen action. *Pharmacol. Rev.* **36**, 245-276.
- OECD (1999). OECD guidance and protocol for the prevalidation of the rat uterotrophic screening assay. ENV/JM/TG/EDTA(99)2/ANN1. Paris:Joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals.
- Odum, J., Lefevre, P.A., Tittensor, S., Paton, D., Routledge, E.J., Beresford, N.A., Sumper, J.P. and Ashby, J. (1997) The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* **25**, 176-188
- Reel, J.R., Lamb, IV J.C. and Neal, B.H. (1996) Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundament. Appl. Toxicol.* **34**, 288-35
- Sawaki, M., Yamasaki, K., Hoshuyama, S., Shinoda, M., Kato, F. and Shiraishi, K. (2000) Genital Tract Development in Peripubertal Female CD IGS Rats. *Comparative Med.*, **50**, 284-287.
- Stack G., Korach K.S., and Gorski J. (1988) Relative mitogenic activities of various estrogens and antiestrogens. *Steroids* **54**, 227-243.
- Tennant M.K., Hill D.S., Eldridge J.C., Wetzel L.T., Breckenridge C.B., and Stevens J.T. (1994 a) Chloro-s-triazine antagonism of estrogen action: limited interaction with estrogen receptor binding. *J. Toxicol. Environ. Health* **43**, 197-211.
- Tennant M.K., Hill D.S., Eldridge, J.C., Wetzel L.T., Breckenridge C.B., and Stevens J.T. (1994 b) Possible antiestrogenic properties of chloro-s-triazines in rat uterus. *J. Toxicol. Environ. Health* **43**, 183-196.
- Tran D.Q., Kow K.Y., McLachlan J.A., and Arnold S.F. (1996) The inhibition of estrogen receptor-mediated responses by chloro-s-triazine-derived compounds is dependent on estradiol concentration in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 140-146.
- Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S. Muroi, T. and Maekawa, A. (2000) Immature Rat Uterotrophic Assay of Diethylstilbestrol, Ethynyl Estradion and Atrazine. *J. Toxicol. Pathol.*, **13**, 145-0.
- Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S. and Takatsuki, M. (2001) Effects of Age and Weaning on the Immature Rats Uterotrophic Assay Using Ethynylestradiol. *Exp. Anim.*, **50**, 87-89.
- Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S. Wada, T., Hara, T. and Takatsuki, M. (2002) Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.*, **76**, 613-620.
- 菅野純 (2000) 子宮肥大試験およびハーシュバーガー試験, 内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法 (井上達監修) シュプリンガー・フェアラーク東京, pp49-75.

2-8. ハーシュバーガーアッセイ

(1) 目的

古くからアンドロゲン様作用の検出に用いられているハーシュバーガーアッセイをもとに改良を加え、化学物質が生体に対してアンドロゲン様作用あるいは抗アンドロゲン作用を及ぼすか否かをほ乳動物を用いてスクリーニングする系を確立することを目的とした。また、確立したアッセイを用いての基礎的知見の取得も目的とした。

(2) 原理

ハーシュバーガーアッセイはアンドロゲンによって雄動物の副生殖器（前立腺、精囊等）が肥大することを利用して化学物質がアンドロゲン様作用を有するかを検出する試験法である。成熟した個体ではホルモン様物質を投与しても内因性のアンドロゲンが存在し、視床下部-下垂体-精巣フィードバック系が働くため副生殖器の肥大を生じ難い。そのため、精巣を摘出して内因性のアンドロゲンを低下させ、フィードバックをなくした個体を利用してホルモン様物質に対する反応性を高めている。

また、内因性のアンドロゲンをなくした状態の雄動物に既知量の外因性のアンドロゲン様物質（Testosterone propionate や Methyltestosterone）を投与し、副生殖器を肥大させた状態で、抗アンドロゲン作用を有する化学物質を作用させることにより副生殖器重量の増加抑制が生じることを利用して、化学物質の抗アンドロゲン作用も検出することができる。（抗）アンドロゲン効果をみるために重量測定される副生殖器は前立腺、精囊腺、凝固腺、球海綿体筋、精巣上体、クーパー腺、陰茎（亀頭）等であり、各標のごとに若干異なる特性を有している。（菅野純, 2000）。

(3) 方法

① スクリーニング系の確立

スクリーニング系の確立のために OECD におけるスクリーニング試験法開発検証試験への参加及び試験にかかわる諸条件（去勢ラットを用いたハーシュバーガーアッセイと非去勢（幼若）ラットを用いたハーシュバーガーアッセイの比較、経口投与と皮下投与の比較、ラット系統間の感度の比較、去勢後の投与開始時期、最終投与後の解剖時期等）の検討を行った。

② 基礎的知見取得のための試験の実施

OECD が提案している試験法（案）に準じ、副生殖器重量の変化を指標としたハーシュバーガーアッセイを下記化学物質について適用した。

- a. かく乱作用の観点で科学的評価・検証を早急に行うべきと判断された物質(個別評価物質)
- b. ホルモン様作用を有すると考えられる物質あるいは *in vitro* 試験を実施した化学物質から選定した 81 の化学物質

(4) 結果

① スクリーニング系の確立

a. OECDにおけるスクリーニング試験法開発検証試験への参加

○ Phase 1 試験

強力なアンドロゲン様作用物質 (Testosterone propionate) と抗アンドロゲン作用を有するとされる物質 (Flutamide) を用いて試験を行い、プロトコルの妥当性、検出感度及び試験機関間での再現性確認等を実施した。

○ Phase 2 試験

アンドロゲン様作用を有するとされる物質 (Methyltestosterone 及び Trenbolone の 2 物質) と抗アンドロゲン作用を示すとされる物質 (Vinclozolin、Procymidone、Linurone、p,p'-DDE、Finasteride の 5 物質) を用いて、プロトコルの妥当性の検証、検出感度及び試験機関間での再現性確認等を実施した。

○ Phase 3 試験

Phase 3 は Phase 2 の結果が出ていないが、OECD より実施の指示が出された。Phase 3 試験はコード化したサンプル物質で試験を行うブラインド試験と去勢ラットとの比較のための非去勢ラットの試験を実施した。

b. 基礎的検討事項

去勢ラットを用いたハーシュバーガーアッセイと非去勢 (幼若) ラットを用いたハーシュバーガーアッセイの比較、経口投与と皮下投与の比較、ラット系統間の感度の比較、去勢後の投与開始時期に関する検討、最終投与後の解剖時期の検討等を行った。

その結果、去勢ラットを用いたハーシュバーガーアッセイの方が非去勢ラットを用いたハーシュバーガーアッセイよりも感受性が高いこと、皮下投与の方が経口投与より感受性が高いことが示された (Yamasaki et al., 2000)。去勢ラットを用いたハーシュバーガーアッセイでは、F344 より SD、Wistar 系ラットの感受性が高いとの知見を得た (Yamasaki et al., 2001a)。また、投与は去勢の 8 日後以降に開始し (Yamasaki et al., 2001b)、解剖は最終投与の 24 時間後に行うのが良いとの知見を得た。

② 基礎的知見取得のための試験の実施

a. 内分泌かく乱作用の観点で科学的評価・検証を早急に行うべきと判断された物質(個別評価物質)

1998 年に環境庁 (当時) が公表した「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」において、今後の調査・研究の対象としてリストアップされた「内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質」(67 物質群) のうち、我が国での生産・使用実態がないとされた物質群、農薬登録物質やダイオキシン等の各種対策が進められている物質群を除いた 15 物質群に関して、科学的評価・検証を早急に行うべきとの社会的要請に応えるため、緊急的な対応として有害性評価を行った。これらの有害性評価書で内分泌かく乱作用の確認のための 2 世代繁殖毒性試験の実施が必要とさ

れた7物質について確認試験を行うとともに性ホルモン受容体介在性の影響の知見を補うためにスクリーニング試験を実施した。

その結果、Butylbenzyl phthalate で抗アンドロゲン作用が認められたが、他のフタル酸エステル（Diethyl phthalate または Dicyclohexyl phthalate）及び他4物質ではアンドロゲン様作用及び抗アンドロゲン作用はみられなかった。

b. ホルモン様作用を有すると考えられる物質及び *in vitro* 試験を実施した化学物質から選定した81の化学物質

内分泌かく乱作用を有すると疑われ、優先的評価の対象となっている物質（平成12年度環境省連携評価対象8物質）及びその異性体等の関連物質のほか、ヒト、植物の天然ホルモン、人工ホルモン等の代表的な物質、及び *in vitro* 試験を実施した化学物質から選定した81物質を対象とした。

試験結果を表2-8-1及び表2-8-2に示した。

表2-8-1 ホルモン様作用を有すると考えられる物質あるいは *in vitro* 試験を実施した化学物質から選定した81種類の化学物質についての結果

試験物質番号	化合物名	Cas No.	ハーシュバークアッセイ		hAR受容体結合性試験	hARレポーター遺伝子アッセイ	
			アンドロゲン様作用	抗アンドロゲン作用	結合性	アゴニスト活性	アンタゴニスト活性
1-011	Bis(2-ethylhexyl)adipate (= Di (2-ethylhexyl) adipate)	103-23-1	—	—	N.B.	—	—
1-045	Tributylchlorostannane (= Tributyltin-chloride)	1461-22-9	—	+	+	—	+
1-071	2,2-Bis[[3-mercaptopropionyl]oxy]methyl]trimethylene bis[3-mercaptopropionate]	7575-23-7	—	—	+	—	—
2-001	17beta-Estradiol	50-28-2	—	—	+	+	+
2-002	17alpha-Estradiol	57-91-0	—	—	+	—	+
2-003	Estrone	53-16-7	—	—	+	+	+
2-005	Ethynyl estradiol	57-63-6	—	—	+	—	+
2-041	Equilin	474-86-2	+	—	+	—	+
2-043	17alpha-Methyltestosterone	58-18-4	+	—	+	+	—
2-044	5alpha-Dehydrotestosterone (= 17-Hydroxy-androstan-3-one)	521-18-6	+	—	+	+	—
2-045	Norethynodrel	68-23-5	+	—	+	+	+
2-046	Norethirindrone	68-22-4	—	—	+	+	—
2-047	Androstenedione (= 4-Androstene-3,17-dione)	63-05-8	+	—	+	+	—

試験 物質 番号	化合物名	Cas No.	ハーシュパーガーアッセイ		hAR受容体 結合性試験	hARレポーター遺伝子 アッセイ	
			アンドロゲン 様作用	抗アンドロ ゲン作用	結合性	アゴニスト 活性	アンタゴニス ト活性
			2-048	Levonorgestrel	797-63-7	+	-
2-049	Testosterone enanthate	315-37-7	+	-	+	+	-
2-050	Androsterone	53-41-8	+	-	+	+	+
2-053	Progesterone	57-83-0	-	-	+	+	+
2-054	Corticosterone =((11beta)-11,21-Dihydroxypreg n-4-ene-3,20-dione)	50-22-6	-	-	+	+	-
2-057	Cyproterone acetate	427-51-0	-	+	+	+	+
2-071	Progesterone, medroxy	520-85-4	-	+	+	+	-
2-091	Spironolactone	52-01-7	-	+	+	+	+
2-093	Ethisterone	434-03-7	+	-	+	+	+
2-096	Hydroxyprogesterone caproate	630-56-8	-	-	+	-	+
3-005	4-n-Amylphenol	14938-35-3	-	-	N.B.	-	+
3-008	4-Octylphenol	1806-26-4	-	-	N.B.	-	+
3-009	4-Dodecyl-phenol	104-43-8	-	-	+	-	+
3-014	p-(tert-Amyl) phenol	80-46-6	-	-	+	-	-
3-015	Nonylphenol (mixture)	25154-52-3	-	-	+	-	+
3-016	4-n-Nonylphenol	104-40-5	-	-	N.B.	-	-
3-017	4-tert-Octylphenol	140-66-9	-	-	+	-	+
3-019	4-Cyclohexylphenol	1131-60-8	-	-	+	-	+
3-020	4-(1-Adamantyl)phenol	29799-07-3	-	-	+	-	+
3-136	Pentachlorophenol	87-86-5	-	-	N.B.	-	-
3-159	Diethylphthalate	84-66-2	-	-	N.B.	-	-
3-160	Di-n-propylphthalate	131-16-8	-	-	N.B.	-	-
3-161	Dibutyl phthalate	84-74-2	-	-	N.D.	-	-
3-162	Di-n-pentyl phthalate	131-18-0	-	+	N.D.	-	-
3-163	Di-n-hexyl phthalate	84-75-3	-	-	N.B.	-	-
3-175	Di-sec-octyl phthalate (= Di (2-ethylhexyl) phthalate)	117-81-7	-	+	N.B.	-	-
3-232	Octachlorostyrene	29082-74-4	-	+	+	-	-
3-315	2-Nitro-5-acetamidobenzotrifluor ide	393-12-4	-	+	+	-	+

試験 物質 番号	化合物名	Cas No.	ハーシュパーガーアッセイ		hAR受容体 結合性試験	hARレポーター遺伝子 アッセイ	
			アンドロゲン 様作用	抗アンドロ ゲン作用	結合性	アゴニスト 活性	アンタゴニス ト活性
			3-345	4-Diethylaminobenzaldehyde	120-21-8	—	+
3-356	2,4,6-Trichlorophenylhydrazine	5329-12-4	—	+	N.D.	—	+
4-023	4-(Phenylmethyl)-phenol	101-53-1	—	—	+	—	—
4-024	4,4'-Dihydroxydiphenylmethane	620-92-8	—	—	+	—	—
4-026	4-alpha-Cumylphenol	599-64-4	—	—	+	—	+
4-027	Bisphenol A	80-05-7	—	—	+	—	+
4-028	2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-butan e	77-40-7	—	—	+	—	+
4-029	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-met hyl-n-pentane	6807-17-6	—	—	+	—	+
4-033	4,4'-(Hexafluoroisopropylidene) diphenol	1478-61-1	—	—	+	—	Luc<<cell 10-6
4-035	4,4'-(Octahydro-4,7-methano-5H -inden-5-ylidene) bisphenol	1943-97-1	—	—	N.B.	—	—
4-060	Methoxychlor	72-43-5	—	—	+	—	—
4-061	4,4'-Dimethoxytriphenylmethane	7500-76-7	—	—	N.D.	—	—
4-063	Dichlorodipenyldichloroethane (=p,p'-DDD)	72-54-8	—	+	+	—	—
4-091	Diethylstilbestrol	56-53-1	+	—	+	—	+
4-092	Tamoxifen	10540-29-1	—	—	+	—	—
4-103	4-Hydroxybenzophenone	1137-42-4	—	—	+	—	—
4-106	4,4'-Dihydroxybenzophenone	611-99-4	—	—	+	—	—
4-108	2,4,4'-Trihydroxybenzophenone	1470-79-7	—	—	+	—	+
4-111	4,4'-Dimethoxybenzophenone	90-96-0	—	—	N.B.	—	—
4-112	2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophen one	131-55-5	—	—	+	—	+
4-134	TYR-PHE	17355-11-2	—	—	N.B.	—	—
4-137	4-Hydroxyazobenzene	1689-82-3	—	—	N.D.	—	—
4-138	4-(2-Pyridylazo)resorcinol	1141-59-9	—	+	+	—	—
4-144	3,3,3',3'-Tetramethyl-1,1'- spirobisindane-5,5',6,6'-tetrol	77-08-7	—	—	+	—	—
4-147	4,4'-Thiobis-phenol	2664-63-3	—	—	+	—	+
4-150	Diphenyl-p-phenylenediamine	74-31-7	—	—	N.B.	—	—

試験物質番号	化合物名	Cas No.	ハーシュパーガーアッセイ		hAR受容体結合性試験	hARレポーター遺伝子アッセイ	
			アンドロゲン様作用	抗アンドロゲン作用	結合性	アゴニスト活性	アンタゴニスト活性
4-309	o,o'-Dihydroxyazobenzene	2050-14-8	—	—	N.B.	—	—
4-326	4-Hydroxy-4'-dimethylaminoazobenzene	2496-15-3	—	—	N.B.	+	—
4-358	2,2-Bis(4-cyanophenyl)propan	1156-51-0	—	+	N.B.	—	+
4-370	4, 4'-Thiobis(3-methyl-6-t-butylphenol)	96-69-5	—	—	+	—	—
4-408	3,3'-Dichlorobenzidine dihydrochloride	612-83-9	—	+	+	—	+
5-048	Hematoxylin	517-28-2	—	—	+	—	—
5-067	6-Hydroxyflavone	6665-83-4	—	—	+	+	—
5-126	1,4-Naphthoquinone	130-15-4	—	—	+	—	—
5-135	1,4-Dihydroxyanthraquinone	81-64-1	—	—	+	—	—
5-136	Benzoanthrone	82-05-3	—	+	+	+	—
6-008	Atrazine	1912-24-9	—	—	N.B.	—	—
6-026	Amitrol	61-82-5	—	—	N.B.	—	—
6-154	4-(Phenylpropyl)pyridine	2057-49-0	—	+	N.B.	—	+
—	Triphenyltin chloride	639-58-7	—	+	N.E.	N.E.	N.E.

+ : 陽性、— : 陰性

N.D. : 試験濃度範囲で、IC50 値が算出できなかったが、最大試験濃度において、標準リガンドの受容体からの脱離が20%以上であった試験物質。

N.B. : 試験濃度範囲で、IC50値が算出できず、最大試験濃度において、標準リガンドの受容体からの脱離が20%未満であった試験物質。

N.E. : 試験未実施

Luc<<cell: 細胞生存率が90%を割ったものの、細胞生存率と転写活性の差が40%以上。後述の数値は試験最高濃度

81物質のうち、アンドロゲン様作用あるいは抗アンドロゲン作用のいずれかを有していたものは27物質、いずれの作用も有さないものは54物質であった。

影響のみられた27物質中アンドロゲン様作用を有するものが10物質、抗アンドロゲン作用を有するものが18物質で、両方の作用を有するものが1物質、アンドロゲン様作用のみは9物質、抗アンドロゲン作用のみを有するものは17物質であった。(表2-8-2)

表 2-8-2 81 種類の化学物質におけるハーシュバーガーアッセイの結果

	抗アンドロゲン作用（陽性）	抗アンドロゲン作用（陰性）	計
アンドロゲン様作用（陽性）	1	9	10
アンドロゲン様作用（陰性）	17	54	71
計	18	63	81

ハーシュバーガーアッセイでアンドロゲン様作用を示した物質の中には、Equilin や Diethylstilbestrol のように強いエストロゲン様作用物質も含まれていた。これらの物質ではアンドロゲン受容体よりもエストロゲン受容体との結合性が強く、また、精嚢や前立腺にはエストロゲン受容体が存在することが確認されているが、その機能については明らかとなっていない (Saunders et al., 1997) などの知見から、Equilin や Diethylstilbestrol でみられたアンドロゲン様作用は、これらの物質が雄性副生殖器に存在するエストロゲン受容体に作用した可能性も考えられた。しかし、これら 2 物質よりもエストロゲン受容体との親和性が強い Estradiol (17beta-Estradiol, 17alpha-Estradiol)、Estrone、Ethinyl estradiol は、アンドロゲン受容体に対し、Equilin や Diethylstilbestrol よりも強い結合性を示すが、ハーシュバーガーアッセイにおいてアンドロゲン様作用は示さない。さらなる検討は必要であるが、現時点ではハーシュバーガーアッセイはアンドロゲン受容体を介して作用する化学物質への特異性が高いと考えられる。

現在、このハーシュバーガーアッセイの結果のうち、*in vitro* 試験を実施した 80 物質の結果を基に、AR 受容体試験や AR レポーター遺伝子アッセイなどの *in vitro* 試験が化学物質の生体に対する（抗）アンドロゲン様作用を検出するためのスクリーニング法として適しているか否かの解析を行っている。

(5) 試験法としての評価

① OECDにおける検証試験の状況

OECD の検証試験の Phase 1 において、OECD が提案したプロトコールでは、強いアンドロゲン様物質及び抗アンドロゲン物質による影響を検出できた。これらの結果をうけ、次の段階として実施した Phase 2 ではさらにアンドロゲン様物質と抗アンドロゲン物質を追加検査し、また、5 α 還元酵素阻害剤についても試験が行われた。

② 試験法としての評価

OECD が提案したプロトコールでの（抗）アンドロゲン作用の検出感度及び試験機関間での再現性は確認された。本アッセイは化学物質が有する（抗）アンドロゲン作用の生体を用いた検出系として有用であるものと考えられる。

in vitro 試験を実施した物質の内約 90 物質について、ハーシュバーガーアッセイの知見を得ており、両方の相関をみることで *in vitro* 試験のプレスクリーニング法としての有用性を検討す

るために重要な情報を提供することができた。

ハーシュバーガーアッセイは、化学物質が生体に対して（抗）アンドロゲン作用を及ぼすか否かをほ乳動物を用いてスクリーニングする系として最も重要なアッセイであり、スクリーニング法として利用できるだけでなく、その他の確認試験の結果とともに、このハーシュバーガーアッセイの知見ならびに *in vitro* 試験での知見を加えて総合的に判断することにより、生体に対する（抗）アンドロゲン物質の影響の機序解明に寄与するものと考えられる。

(6) 今後の課題と展望

単独のスクリーニング試験としては確立されたと考えられる。しかし、試験スキームの開発を考えた場合には、*in vitro* 試験と動物試験結果との関連性に関する知見を更に集積し、両者の相関性や化学構造との関係等詳細な解析を行う必要があるものと考えられる。

(7) 参考文献

- Saunders, P.T.K., Fisher, J.S., Sharp, R.M. and Millar, M.R. (1997) Expression of oestrogen receptor beta (ER β) in multiple rat tissues visualized by immunohistochemistry. *J. Endocrinol.* **154**, R13-R16
- Yamasaki, K., Ashby, J., Lefevre, P.A. and Sawaki, M. (2000) Comparison of Reproductive Tissue Weights in the Enhanced Hershberger Assay of 17 α -Methyltestosterone between Peripubertal and Castrated Rats. *J. Toxicol. Pathol.*, **13**, 173-178.
- Yamasaki, K., Sawaki, M. and Takatsuki, M. (2001a) Strain sensitivity differences in the Hershberger assay. *Reprod. Toxicol.*, **15**, 437-440.
- Yamasaki, K., Sawaki, M., Muroi, T. and Takatsuki, M. (2001b) Changes in the Weight of the Accessory Sex Organs in male CD/IGS Rats (*Rattus norvegicus*) after Castration. *Topics in Lab. Animal Sci.*, **40**, 25-26.
- 菅野純 (2000) 子宮肥大試験およびハーシュバーガー試験, 内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法 (井上達監修) シュプリンガー・フェアラーク東京, pp49-75.

2-9. 改良 28 日間反復投与毒性試験法

(1) 目的

目的は、現行のげっ歯類における 28 日間反復投与毒性試験（OECD テストガイドライン No.407 : OECD TG407）を基礎として、新たな内分泌関連の検査項目を追加したガイドライン（案）（以下改良 OECD TG407（enhanced TG407）と略す）により、ホルモン様作用を有することが明らかにされている代表的な化学物質の主として内分泌系への影響がとらえることができるかを検討する。

(2) 原理

化学物質を成熟ラットに 28 日間経口投与し、一般状態の観察、機能検査、体重推移、摂餌量測定、血液学的検査、血液化学的検査、血中ホルモン測定、精子検査、性周期検査、病理学的検査などを実施し、投与した化学物質が内分泌系への影響を示すかどうかを検査する。

(3) 方法

改良 OECD TG407 は、現行の OECD TG407 に表 2-9-1 で示すような新たに検索項目である血中ホルモン測定、精子検査、性周期検査、さらには詳細な生殖器官、副生殖器官に対する重量測定、病理組織学的検査を追加した試験法で、内分泌作用の明らかな、あるいは疑わしい物質を選択し、改良 OECD TG407 に準拠して以下の試験を実施した。試験は、1) OECD が主催する試験法開発のためのバリデーションプログラムへの参加と 2) その他の改良 OECD TG407 試験に分けられる。

OECD が主催する試験法開発のためのバリデーションプログラムでは、改良 OECD TG407 に準拠して、順次 Phase 1、2 試験が実施された。Phase 1 試験では Ethynylestradiol、Methyltestosterone、Flutamide、6-n-Propyl-2-thiouracil などの代表的な内分泌作用物質を選択し、まずは本試験法の有用性について検討した。その結果、Phase 1 試験において本試験法の有用性が確認されたことから、Phase 2 試験では（抗）エストロゲン作用、（抗）アンドロゲン作用、甲状腺機能阻害作用、アロマターゼ阻害作用を有する新たな試験物質を加え試験を実施した。Phase 2 は、改良 OECD TG407 試験法によりそれぞれの試験物質が有する内分泌系への影響をとらえることができるか、改良 OECD TG407 で提案されている内分泌関連の検査項目が適切であるのか、試験動物数を減らすことが可能かなどを検討し、さらには 1 試験物質に対し 2 試験機関が同じ物質を試験し、試験機関間での再現性についても検討した。

表 2-9-1 OECD テストガイドライン No.407 と改良 OECD テストガイドライン No.407 の比較

検査項目	OECD テストガイドライン No.407	改良 OECD テストガイドライン No.407
器官重量測定	肝臓、腎臓、副腎、精巣（左右同時に測定）、精巣上体、胸腺、脾臓、脳、心臓	肝臓、腎臓、副腎、精巣（ <u>左右別々に測定</u> ）、精巣上体、 <u>精囊＋凝固腺</u> 、 <u>前立腺</u> 、 <u>卵巣</u> 、 <u>子宮</u> 、 <u>甲状腺</u> 、胸腺、脾臓、脳、心臓
病理組織学的検査	脳、脊髄、胃、腸、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、心臓、胸腺、気管、肺、生殖器官、副生殖器官（子宮、前立腺など）、膀胱、リンパ節、末梢神経、骨髄、肉眼的異常器官	脳、脊髄、胃、腸、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、心臓、胸腺、甲状腺、気管、肺、 <u>下垂体</u> 、 <u>卵巣</u> 、 <u>子宮</u> 、 <u>陰</u> 、 <u>精巣（片側）</u> 、 <u>精巣上体（片側）</u> 、 <u>精囊＋凝固腺</u> 、前立腺、 <u>乳腺</u> 、膀胱、リンパ節、末梢神経、骨髄、肉眼的異常器官
甲状腺関連ホルモン検査	検査せず	<u>T3</u> 、 <u>T4</u> 、 <u>TSH</u>
精子検査	検査せず	<u>精子数</u> 、 <u>精巣上体尾部での精子の形態</u>
性周期検査	検査せず	<u>性周期</u>

下線を付記した器官/組織、検査項目は TG407 試験には含まれていない

(4) 試験物質

① OECD 試験法開発への参加

Phase 1 試験では Ethynylestradiol、Methyltestosterone、Flutamide、6-n-Propyl-2-thiouracil について試験が実施され、日本はすべての物質を対象に試験を行った。また、Phase 2 試験で実施された物質を表 2-9-2 に記載するが、それら 10 物質のうち日本は 6 物質（Ethynylestradiol、Genistein、CGS18320B、Flutamide、*p,p'*-DDE、Thyroxine）について試験を行った。

表 2-9-2 OECD テストガイドラインプログラム Phase 2 試験物質

化学物質	CAS No.	作用
Ethynylestradiol	57-63-6	エストロゲン作用物質
Genistein	446-72-0	弱いエストロゲン作用物質
Nonylphenol	25154-52-3	弱いエストロゲン作用物質
Tamoxifen	不明	抗エストロゲン作用物質
CGS 18320B	不明	アロマトラーゼ阻害物質
Methyl testosterone	58-18-4	アンドロゲン作用物質
Flutamide	1311-84-7	抗アンドロゲン作用物質

<i>p,p'</i> -DDE	72-55-9	弱い抗アンドロゲン作用物質
Propylthiouracil	51-52-5	甲状腺機能阻害物質（甲状腺ホルモン合成に必要な酵素阻害物質）
Thyroxine	6106-07-6	甲状腺ホルモン

② その他の試験

OECDでの試験法開発バリデーションプログラムとは別に、以下の3物質について改良 OECD TG407 に準拠して試験を実施した。

Bisphenol A、Diethylphthalate、Di(2-ethylhexyl)adipate

物質の選定理由： Bisphenol A は代表的な弱いエストロゲン物質であることから、弱いエストロゲン物質による作用が enhanced TG407 でとらえることができるか検討する目的で選択した。

Diethylphthalate、Di(2-ethylhexyl)adipate の2物質に関しては、有害性評価を目的として試験を実施した。すなわち、1998年に当時の環境庁が「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」において、今後の調査・研究の対象としてリストアップされた「内分泌かく乱作用を有すると疑われる物質（67物質群）」のうち、我が国での生産量が高いものの中からこの2物質を選択した。

(5) 結果

① OECD 試験法開発バリデーションプログラム

Phase 1 試験

代表的な内分泌作用を有する物質を用いて実施した試験では、いずれも想定される内分泌への影響が検出され、本試験の有用性が確認された。この結果から Phase 2 へ進むことになった。

Phase 2 試験

（抗）エストロゲン作用物質、（抗）アンドロゲン作用物質、甲状腺機能阻害物質、甲状腺ホルモン、アロマターゼ阻害物質を用いて実施した結果、エストロゲン作用物質の Ethynylestradiol、抗エストロゲン作用物質の Tamoxifen、アンドロゲン作用物質の Methyl testosterone、抗アンドロゲン作用物質の Flutamide、アロマターゼ阻害物質の CGS 18320B、甲状腺機能作用物質の Propylthiouracil、甲状腺ホルモンの Thyroxine では作用が検出できた。しかし、弱いエストロゲン作用物質である Genistein、Nonylphenol については、Genistein ではかろうじて作用を検出することが可能であったが Nonylphenol では作用が検出できなかった。また、弱い抗アンドロゲン作用物質である *p,p'*-DDE では作用が検出できなかった。検査項目については、精子数、精子形態については検査結果にバラツキが大きくその感度も精巣の病理組織学的検査よりも低いことが確認された。

平成 18 年になり、OECD 事務局に動物試験の専門家が加わり、事務局が中心に Phase 2 試験報告書草案が作成され、2 月には各国に配布された。

② その他の試験

a. Bisphenol A

Bisphenol A を SD ラットに 0、40、200、1,000 mg/kg/day の用量で投与した。1,000 mg/kg 群の雄で投与 1 週間目に強い毒性症状を伴う死亡が発現したため、2 週間後から当用量を 600 mg/kg/day に減じた。内分泌系への影響として、高用量群において性周期の異常が観察された。これが弱いエストロゲン作用を反映したものかどうかは明らかでないが、性周期検査で Bisphenol A の内分泌系への影響を検出し得た。その他に内分泌系への影響を示唆する変化は認められなかった(Yamasaki et al, 2002)。

b. Diethylphthalate

Diethylphthalate を SD ラットに 0、40、200、1,000 mg/kg/day の用量で投与した結果、内分泌系への影響は認められなかった。従って、この試験においては Diethylphthalate の内分泌系への影響はないものと考えられた (Shiraishi et al., 2005)。

c. Di(2-ethylhexyl)adipate

Di(2-ethylhexyl)adipate を SD ラットに 0、40、200、1,000 mg/kg/day の用量で投与した結果、1,000 mg/kg/day 群で、内分泌系への影響として性周期の異常と閉鎖卵胞の増数が観察された (Miyata et al., 2005)。

(6) 結果のまとめ

OECD 試験法開発バリデーションプログラムに参加して、Phase 1 試験では代表的な内分泌作用物質を選択し試験を行い、その有効性を確認した (OECD, 2000)。Phase 2 試験では様々の作用を示す試験物質を加え試験を実施した。

一方、既に国内で実施していた改良 OECD TG407 試験法の検討では、弱いエストロゲン物質である Bisphenol A 投与により、性周期の異常がみられたが、エストロゲン作用との関連は明らかではない。また、Di(2-ethylhexyl)adipate 投与により、卵巣の異常を伴った性周期の異常（ホルモン作用との関連性は不明である）が認められたが、Diethylphthalate について内分泌への影響は観察されなかった。以上、作用メカニズムとの関連性は明らかにできないが、性周期、性腺の病理組織検査などの追加検査項目により、内分泌系への有害性影響を検出できることが示された。

(7) 試験法としての評価

改良 OECD TG407 試験法に関する文献は、OECD 試験法開発バリデーションプログラムにおける Phase 1、Phase 2 試験に関して主に報告されている (Toyoda et al., 2000; Andrews et al., 2001; Okazaki et al., 2001; Okazaki et al., 2002a, b; Yamasaki et al., 2002a, b; Kennel et al., 2003; Mellert et al., 2003; Wason et al., 2003; Kunimatsu et al., 2004; Shiraishi et al., 2005; Miyata et al., 2006)。これらの文献でも Phase 2 試験の報告書草案と同様に、強い（抗）エストロゲン作用、（抗）アンドロゲン作用、及び甲状腺機能障害作用を有する物質については内分泌系への影響の検出が可能であることが示されている。一方、経済産業省が独自に実施した試験としては、Bisphenol A を含めてわずか 3 物質での検討であるが、その範囲でも追加したエンドポイントで内分泌系への有害性影響を検出可能であった。すなわち、従来の TG407 法に比較して、改良 TG407 試験法

は内分泌系・生殖器系への有害性影響を検出する能力をかなり補強した試験法であると考えられる。

(8) 今後の課題と展望

内分泌系・生殖器系への影響評価も含めた有害性影響評価を目的とする試験法としての本試験法の有効性と利用の意義を明らかにするため、*in vitro* 試験結果等により作用メカニズムがある程度明らかな物質を被験物質として本試験法に適用し、作用メカニズム、エンドポイントの有効性等の観点から引き続き調査検討を行う。

(9) 参考文献

- Andrews, P., Freyberger, A., Hartmann, E., Eiben, R., Loof, I., Schmidt, U., Temerowski, M. and Becka, M. (2001) Feasibility and potential gains of enhancing the subacute rat study protocol (OECD test guideline no. 407) by additional parameters selected to determine endocrine modulation. A pre-validation study to determine endocrine-mediated effects of the antiandrogenic drug flutamide. *Arch. Toxicol.*, **75**, 65-73.
- Gelpke, H.P., Kayser, M. and Poole, A. (2004) OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology*, **205**, 17-25.
- Kennel, P., Pallen, C., Barale-Thomas, E., Espuna, G. and Bars, R. (2003) Tamoxifen: 28-day oral toxicity study in the rat based on the enhanced OECD test guideline 407 to detect endocrine effects. *Arch. Toxicol.*, **77**, 487-489.
- Kunimatsu, T., Yamada, T., Miyata, K., Yabushita, S., Seki, T., Okuno, Y. and Matsuo, M. (2004) Evaluation for reliability and feasibility of the draft protocol for the enhanced rat 28-day subacute study (OECD guideline 407) using androgen antagonist flutamide. *Toxicology*, **200**, 77-89.
- Mellert, W., Deckardt, K., Walter, J., Gfatter, S. and van Ravenzwaay, B. (2003) Detection of endocrine-modulating effects of the antithyroid acting drug 6-propyl-2-thiouracil in rats, based on the “enhanced OECD test guideline 407”. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **38**, 368-377.
- Miyata, K., Shiraishi, K., Houshuyama, S., Imatanaka, N., Umano, T., Minobe, Y., and Yamasaki, K. (2006). Subacute oral toxicity study of di(2-ethylhexyl)adipate based on the draft protocol for the “Enhanced OECD Test Guideline no. 407”. *Arch. Toxicol.*, (in press).
- OECD. (2000) OECD protocol for investigating the efficacy of the enhanced TG407 test guideline (phase 2), rationale for the investigation, and description of the protocol, OECD, Paris.
- OECD. (2003) Status report on the data analysis and interpretation of the phase 2 work on the enhanced TG 407, OECD, Paris.
- Okazaki, K., Imazawa, T., Nakamura, H., Furukawa, F., Nishikawa, A. and Hirose, M. (2002a) A repeated 28-day oral dose toxicity study of 17α -methyltestosterone in rats, based on the ‘enhanced OECD test guideline 407’ for screening endocrine-disrupting chemicals. *Arch. Toxicol.*, **75**, 635-642.
- Okazaki, K., Okazaki, S., Nakamura, H., Kitamura, Y., Hatayama, K., Wakabayashi, S., Tsuda, T.,

- Katsumata, T., Nishikawa, A. and Hirose, M. (2002b) A repeated 28-day oral dose toxicity study of genistein in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals. *Arch. Toxicol.*, **76**, 553-559.
- Okazaki, K., Okazaki, S., Nishimura, S., Nakamura, H., Kitamura, Y., Hatayama, K., Nakamura, A., Tsuda, T., Katsumata, T., Nishikawa, A. and Hirose, M. (2001) A repeated 28-day oral dose toxicity study of methoxychlor in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals. *Arch. Toxicol.*, **75**, 513-521.
- Shiraishi, K., Miyata, K., Houshuyama, S., Imatanaka, N., Umamo, T., Minobe, Y., and Yamasaki, K. (2005). Subacute oral toxicity study of diethylphthalate based on the draft protocol for "Enhanced OECD Test Guideline no. 407". *Arch. Toxicol.*, (in press).
- Toyoda, K., Shibuntani, M., Tamaru, T., Koujitani, T., Uneyama, C. and Hirose, M. (2000) Repeated dose (28 days) oral toxicity study of flutamide in rats, based on the draft protocol for the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening for endocrine-disrupting chemicals. *Arch. Toxicol.*, **74**, 127-132.
- Wason, S., Pohlmeier-Esch, G., Pallen, C., Palazzi, X., Espina, G. and Bars, R. (2003) 17 α -methyltestosterone: 28-day oral toxicity study in the rat based on the "enhanced OECD test guideline 407" to detect endocrine effects. *Toxicology*, **192**, 119-137.
- Yamasaki, K., Tago, Y., Nagai, K., Sawaki, M., Noda, S. and Takatsuki, M. (2002a) Comparison of toxicity studies based on the draft protocol for the "enhanced OECD test guideline no. 407" and the research protocol of "pubertal development and thyroid function in immature male rats" with 6-n-propyl-2-thiouracil. *Arch. Toxicol.*, **76**, 495-501.
- Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S., Imatanaka, M. and Takatsuki, M. (2002b) Subacute oral toxicity study of ethynyl estradiol and bisphenol A based on the draft protocol for the "enhanced OECD test guideline no. 407". *Arch. Toxicol.*, **76**, 65-74.

2-10. 二世世代繁殖毒性試験法

(1) 目的

有害性評価の一環として、7物質について内分泌かく乱作用の有無（生殖・内分泌系への影響）を確認するための試験として本試験を実施した。同時に内分泌かく乱作用があるとしたら、どのエンドポイントでの評価が可能かについても検討した。

(2) 原理

試験物質を雌雄の2世代にわたって投与する。P世代の雄に対しては、成長段階と精子形成への影響の有無が判断できるよう、少なくとも1回の精子形成周期を含む期間投与し、精子への影響の有無を判断するために精子検査と詳細な組織学的検査を実施する。P世代の雌に対しては、成長段階と性周期への影響の有無が判断できるよう、数度の性周期を含む期間投与する。具体的には、試験物質を、P世代の成長期間、交配期間、妊娠期間、及びF1世代の離乳までの哺育期間投与する。F1世代に対しては、離乳後から投与を開始し、その後は成長段階、交配期間、妊娠期間、及びF2世代の離乳までの哺育期間投与し、P世代と同じように検査を実施する。雌雄動物の生殖系に対する毒性について、特に注意しながら、一般状態、病理学的検査を実施する。

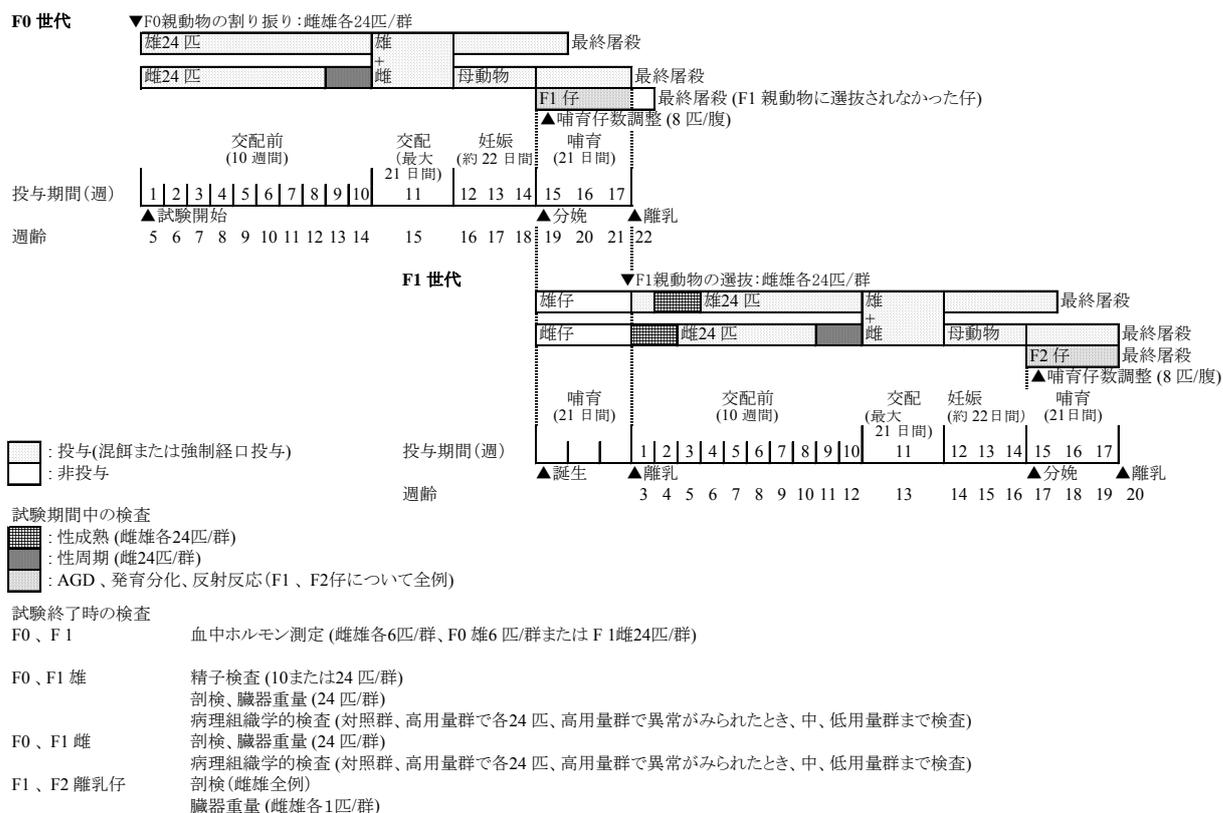


図 2 二世世代繁殖毒性試験のタイムスケジュール

(3) 方法

試験法の概要は表 2-10-1 に示した。

従来の二世世代繁殖毒性試験の方法に加え、以下の項目を追加した。

追加項目：精子検査、ホルモン測定、性周期検査、肛門-生殖突起間距離（AGD）測定、生殖器分化（包皮分離、膣開口）検査、生殖器の重量測定及び組織学的検査

(4) 試験物質

EPA は、1996 年に、内分泌かく乱化学物質を検出するためのスクリーニングや試験のプログラムをデザインする上でのアドバイスをを行う委員会として、Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) を組織した。この EDSTAC は、1998 年に公表した最終報告書 (EDSTAC, 1998) において、内分泌かく乱作用を確認する最終的な試験として位置付けているティア 2 試験として二世世代繁殖毒性試験を推奨している。また、環境庁（当時）が 1998 年に公表した「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」において、内分泌かく乱作用の疑いがあるとされた 67 物質のうち、経済産業省において、農薬を除外し、工業的に重要と判断された 15 物質を選定し、その有害性評価を実施した。本プロジェクトでは、この有害性評価結果に基づき、生殖毒性等の有害性知見が不足していると判断された以下の 7 物質について、EDSTAC が推奨している二世世代繁殖毒性試験を用いることにより、その内分泌かく乱作用の有無を確認することとした。

実施 7 物質：

フタル酸ブチルベンジル(BBP)、フタル酸ジシクロヘキシル(DCHP)、2,4-ジクロロフェノール(2,4-DCP)、フタル酸ジエチル(DEP)、n-ブチルベンゼン(n-BB)、4-ニトロトルエン(4-NT)、ベンゾフェノン(BZP)

(5) 結果（表 2-10-2、2-10-3）

陽性対照物資としての 17β エストラジオール（エストロゲン作用）、タモキシフェン（抗エストロゲン作用）、テストステロンプロピオネート（アンドロゲン作用）及びフルタマイド（抗アンドロゲン作用）についての既知知見を表 2-10-2 に、各物質についての既知知見と今回の結果の概要を表 2-10-3 に示した(Aoyama et al., 2005; Aso et al., 2005; Izumi et al., 2005; Fujii et al., 2005; Hoshino et al., 2005)。

7 物質のうち、4 物質について、生殖・内分泌系への影響を以下のように検出した。

- ① BBP：受胎率低下、精巣軟化、小精巣・小精巣上体、精巣上体奇形、雄AGD短縮、雌AGD伸長、包皮分離遅延、精巣上体・精のう重量減少、ライディッヒ細胞過形成、精細管萎縮、精巣上体管腔精子減少（抗アンドロゲン作用）
- ② DCHP：精子数減少、雄 AGD 短縮、前立腺重量減少、精細管萎縮（非受容体介在、内在性アンドロゲン合成抑制）
- ③ 2,4-DCP：着床数・産児数減少、児体重減少、膣開口早期化、子宮重量増加（非受容体介在エストロゲン作用）
- ④ DEP：児体重減少、雄血清テストステロン低下、膣開口遅延、子宮・前立腺重量減少（非受容体介在、内在性エストロゲン合成抑制又は分解促進）
- ⑤ n-BB：影響なし

- ⑥ 4-NT：影響なし
- ⑦ BZP：影響なし

なお、4-NTについては、既知知見についても検出できなかった。これは、本試験では母動物に対してストレスのかかる妊娠期、周産期、授乳期妊娠期間をとおして投与することから、その有する一般毒性影響が増強して出現するため、既報の試験での投与量より低用量しか投与できなかったことによると考えられた。

(6) 試験法としての評価

今回影響を検出できた4試験の結果から、試験法及び追加項目について評価を行った。

(表 2-10-4)

① 試験法の評価

- ・ 陽性対照物質に比べ受容体結合性の低い物質の影響を検出できた(1試験)。
- ・ 性ホルモン受容体非介在性が考えられる影響を検出できた(3試験)。
- ・ 既知以外の新たな知見が得られた(3試験)。

これらのことから、EDSTAC 推奨のように、本試験法の検出力は高く、その有効性を確認できたと考えられた。

- ・ その他

従来の二世世代繁殖毒性試験法も検出力は高かった(3/4 検出)。

② 追加項目についての評価

a. 検出力

追加項目の検出力については、以下のようであった。

重量測定(4/4) > 生殖器分化検査(3/4) > AGD、組織学的検査(2/4) > ホルモン測定(1/4)
> 性周期検査(0/4)

b. 精子検査

組織学的検査で関連する変化がみられても、本検査では変化を検出できないことがあり、本検査の検出力は低いのではないか。

(7) 今後の課題と展望

本試験は、リスク評価の一環として実施したものであり、本試験の有効性を確認することができた。また、追加項目については、従来方法では影響の確認できなかったものについて確認できた。

(8) 参考文献

- Aoyama, H., Hojo, H., Takahashi, K.L., Shimizu, N., Araki, M., Harigae, M., Tanaka, N., Shirasaka, N., Kuwahara, M., Nakashima, N., Yamamoto, E., Saka, M. and Teramoto, S. (2005) A two-generation reproductive toxicity study of 2,4-dichlorophenol in rats. *J. Toxicol. Sci.*, **30** Special Issue, 59-78.
- Aso, S., Miyata, K., Ehara, H., Hoshuyama, S., Shiraishi, K., Umamo T. and Minobe, Y. (2005) A two-generation reproductive toxicity study of 4-nitrotoluene in rats. *J. Toxicol. Sci.*, **30** Special Issue, 117-134.
- Aso, S., Ehara, H., Miyata, K., Hoshuyama, S., Shiraishi, K., Umamo T. and Minobe, Y. (2005) A two-generation reproductive toxicity study of butyl benzyl phthalate in rats. *J. Toxicol. Sci.*, **30** Special Issue, 39-58.
- Biegel, L.B., Flaws, J.A., Hirshfield, A.N., O'Connor, J.C., Elliott, G.S., Ladics, G.S., Silbergeld, E.K., Van Pelt, C.S., Hurtt, M.E., Cook, J.C. and Frame, S.R. (1998) 90-day feeding and one-generation reproduction study in CrI:CD BR rats with 17 beta-estradiol. *Toxicol. Sci.*, **44**, 116-142.
- Branham, W.S., Fishman, R., Streck, R.D., Medlock, K.L., De George, J.J. and Sheehan, D.M. (1996) ICI 182,780 inhibits endogenous estrogen-dependent rat uterine growth and tamoxifen-induced developmental toxicity. *Biol. Reprod.*, **54**, 160-167.
- Brown, A.P., Morrissey, R.L., Crowell, J.A. and Levine, B.S. (1999) Difluoromethylornithine in combination with tamoxifen in female rats: 13-week oral toxicity study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **44**, 475-483.
- Cook, J.C., Johnson, L., O'Connor, J.C., Biegel, L.B., Krams, C.H., Frame, S.R. and Hurtt, M.E. (1998) Effects of dietary 17 beta-estradiol exposure on serum hormone concentrations and testicular parameters in male CrI:CD BR rats. *Toxicol. Sci.*, **44**, 155-168.
- Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) (1998) Final report. <http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/edspoverview/finalrpt.htm>
- Fujii, S., Yabe, K., Furukawa, M., Hirata, M., Kiguchi, M. and Ikka, T. (2005) A two-generation reproductive toxicity study of diethyl phthalate (DEP) in rats. *J. Toxicol. Sci.*, **30** Special Issue, 97-116.
- Goto, K., Koizumi, K., Takaori, H., Fujii, Y., Furuyama, Y., Saika, O., Suzuki, H., Saito, K. and Suzuki, K. (2004) Effects of flutamide on sex maturation and behavior of offspring born to female rats treated during late pregnancy. *J. Toxicol. Sci.*, **29**, 517-534.
- Gray, L.E., Ferrell, J.M. and Ostby, J.S. (1985) Alteration of behavioral sex differentiation by exposure to estrogenic compounds during a critical neonatal period: effects of zearalenone, methoxychlor, and estradiol in hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 127-136.
- Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Cooper, R.L. and Kelce, W.R. (1999) The estrogenic and antiandrogenic pesticide methoxychlor alters the reproductive tract and behavior without affecting pituitary size or LH and prolactin secretion in male rats. *Toxicol. Ind. Health.*, **15**, 37-47.

- He, H., Zhang, W. and Zhu, J. (2004) A mouse model of hypospadias induced by flutamide. *Zhonghua. Nan. Ke. Xue.*, **10**, 172-174.
- Hoshino, N., Tani, E., Wako, Y. and Takahashi, K. (2005) A two-generation reproductive toxicity study of benzophenone in rats. *J. Toxicol. Sci.*, **30** Special Issue, 5-20.
- Hoshino, N., Iwai, M. and Okazaki, Y. (2005) A two-generation reproductive toxicity study of dicyclohexyl phthalate in rats. *J. Toxicol. Sci.*, **30** Special Issue, 79-96.
- Izumi, H., Kimura, E., Ota, T. and Shimazu, S. (2005) Two-generation reproductive toxicity study of n-butylbenzene in rats. *J. Toxicol. Sci.*, **30** Special Issue, 21-38.
- Kim, H.S., Shin, J.H., Moon, H.J., Kim, T.S., Kang, I.H., Seok, J.H., Kim, I.Y., Park, K.L. and Han, S.Y. (2002) Evaluation of the 20-day pubertal female assay in Sprague-Dawley rats treated with DES, tomoxifen, testosterone, and flutamide. *Toxicol. Sci.*, **67**, 52-62.
- Kunimatsu, T., Yamada, T., Miyata, K., Yabushita, S., Seki, T., Okuno, Y. and Matsuo, M. (2004) Evaluation for reliability of the draft protocol for the enhanced rat 28-day subacute study (OECD Guideline 407) using androgen antagonist flutamide. *Toxicology*, **200**, 77-89.
- Martinez, E.M. and Swartz, W.J. (1991) Effects of methoxychlor on the reproductive systems of the adult female mouse. I. Gross and histologic observations. *Reprod. Toxicol.*, **5**, 139-147.
- McIntyre, B.S., Barlow, N.J., Wallace, D.G., Maness, S.C., Gaido, K.W. and Foster, P.M. (2000) Effects of in utero exposure to linuron on androgen-dependent reproductive development in the male Crl:CD(SD) BR rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **167**, 87-99.
- Miyata, K., Yabushita, S., Sukata, T., Sano, M., Yoshino, H., Nakanishi, T., Okuno, Y. and Matsuo, M. (2002) Effects of perinatal exposure to flutamide on sex hormones and androgen-dependent organs in F1 male rat. *J. Toxicol. Sci.*, **27**, 19-33.
- Stoker, T.E., Robinette, C.L. and Cooper, R.L. (1999) Perinatal exposure to estrogenic compounds and the subsequent effects on the prostate of the adult rat: evaluation of inflammation in the ventral and lateral lobes. *Reprod. Toxicol.*, **13**, 463-472.
- Swartz, W.J. and Corkern, M. (1992) Effects of methoxychlor treatment of pregnant mice on female offspring of the treated and subsequent pregnancies. *Reprod. Toxicol.*, **6**, 431-437.
- Taguchi, O. and Nishizuka, Y. (1985) Reproductive tract abnormalities in female mice treated neonatally with tamoxifen. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **151**, 675-678.
- Taguchi, O. (1987) Reproductive tract lesions in male mice treated neonatally with tamoxifen. *Biol. Reprod.*, **37**, 113-118.
- Vancutsem, P.M. and Roessler, M.L. (1997) Neonatal treatment with tamoxifen causes immediate alterations of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area and medial preoptic area in male rats. *Teratology*, **56**, 220-208.
- Wolf, C.J., LeBlanc, G.A. and Gray, L.E. Jr. (2004) Interactive effects of vinclozolin and testosterone propionate on pregnancy and sexual differentiation of the male and female SD rat. *Toxicol. Sci.*, **78**, 135-143.
- Wolf, C.J., Hotchkiss, A., Ostby, J.S., LeBlanc, G.A. and Gray, L.E. Jr. (2002) Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose-response

study. *Toxicol. Sci.*, **65**, 71-86.

Yamasaki, K., Noda, S., Muroi, T., Mitoma, H., Takakura, S. and Sakamoto, S. (2005a) Effects of in utero and lactational exposure to flutamide in SD rats: comparison of the effects of administration period. *Toxicology*, **209**, 47-54.

Yamasaki, K., Noda, S., Muroi, T., Mitoma, H., Takakura, S. and Sakamoto, S. (2005b) Effects of in utero and lactational exposure to tamoxifen in SD rats. *Toxicol. Lett.*, **156**, 289-296.

Yu, W.J., Lee, B.J., Nam, S.Y., Ahn, B., Hong, J.T., Do, J.C., Kim, Y.C., Lee, Y.S. and Yun, Y.W. (2004) Reproductive disorders in pubertal and adult phase of the male rats exposed to vinclozolin during puberty. *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 847-853.

表 2-10-1. 試験法の概要

世代	期間 (週間)	作業手順	試験項目
F0	育成 (10)		動物の一般状態を毎日観察。 体重及び摂餌量を週 1 回測定。 (混餌投与の場合, 摂餌効率を算出)
	交配 (2 または 3)	雌雄を 1:1 で同居。膣栓または膣垢中の精子の有無により交尾を確認。交尾確認日を妊娠 0 日とした。	交配前 2 週間各群雌 24 匹の膣垢観察をすることにより, 性周期を観察。
	妊娠 (3)		体重 (妊娠 0, 7, 14 及び 20 日) 及び摂餌量 (妊娠 0-7, 7-14 及び 14-20 日または 1, 4, 7, 14, 20 日) を測定。 (混餌投与の場合, 摂餌効率を算出)
	出産	出産確認日を哺育 0 日とした。	出産仔, 生存仔及び死産仔の性と数を記録。
	哺育 (3)	哺育 4 日に, 各腹の哺育仔数を 8 匹 (可能な限り雄 4 匹, 雌 4 匹) に調整。同腹仔数が 8 匹に満たない場合はそのまま飼育。	体重 (哺育 0, 4, 7, 14 及び 21 日) 及び摂餌量 (哺育 0-4, 4-7, 7-14 及び 14-21 日または 1, 4, 7, 14, 21 日) を測定。 (混餌投与の場合, 摂餌効率を算出) 生存仔数を記録。 哺育仔体重を, 哺育 0, 4, 7, 14 及び 21 日に測定。 哺育仔について, AGD、発育分化として哺育仔の耳介開展, 切歯萌出, 眼瞼開裂の観察と反射反応性検査を実施。

世代	期間 (週間)	作業手順	試験項目
F0/F1	離乳	仔動物は、各腹雌雄 1 匹を親動物に選抜。	<p>全ての親動物の剖検及び臓器重量測定 (脳, 下垂体, 甲状腺及び上皮小体, 肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓, 精巣, 精巣上体 (全体及び尾部), 前立腺 (腹葉), 精囊 (凝固腺を含む), 卵巣及び子宮。</p> <p>親動物の生殖器官, 下垂体, 甲状腺, 副腎, 肝臓, 腎臓などの病理組織学的検査。</p> <p>各群雌雄各 6 匹または雄 6 匹を用いて血中ホルモンレベル (テストステロン, FSH, LH, エストラジオールなど) を測定。</p> <p>親動物の雄は各群 10 または 24 匹を用いて精子検査 (精子運動率, 精巣の精子数, 精巣上体尾部の精子数, 異常形態精子の出現率)。</p> <p>仔動物は各腹雌雄各 1 匹の臓器重量測定 (脳, 胸腺, 脾臓など)。</p>
F1	育成 (10)		<p>動物の一般状態を毎日観察。</p> <p>体重及び摂餌量を週 1 回測定。</p> <p>(混餌投与の場合, 摂餌効率を算出)</p> <p>性成熟の指標として, 雄は包皮分離、雌は膣開口を各群各 24 匹観察。</p>
	交配 (2 または 3)	雌雄を 1:1 で同居。膣栓または膣垢中の精子の有無により交尾を確認。交尾確認日を妊娠 0 日とした。	交配前 2 週間各群雌 24 匹の膣垢観察をすることにより, 性周期を観察。
	妊娠 (3)		<p>体重 (妊娠 0, 7, 14 及び 20 日) 及び摂餌量 (妊娠 0-7, 7-14 及び 14-20 日または 1, 4, 7, 14, 20 日) を測定。</p> <p>(混餌投与の場合, 摂餌効率を算出)</p>
	出産	出産確認日を哺育 0 日とした。	出産仔, 生存仔及び死産仔の性と数を記録。

世代	期間 (週間)	作業手順	試験項目
F1	哺育 (3)	哺育 4 日に, 各腹の哺育仔数を 8 匹 (可能な限り雄 4 匹, 雌 4 匹) に調整。同腹仔数が 8 匹に満たない場合はそのまま飼育。	<p>体重 (哺育 0, 4, 7, 14 及び 21 日) 及び摂餌量 (哺育 0-4, 4-7, 7-14 及び 14-21 日または 1, 4, 7, 14, 21 日) を測定。 (混餌投与の場合, 摂餌効率を算出)</p> <p>生存仔数を記録。</p> <p>哺育仔体重を, 哺育 0, 4, 7, 14 及び 21 日に測定。</p> <p>哺育仔について, AGD、発育分化として哺育仔の耳介開展, 切歯萌出, 眼瞼開裂の観察と反射反応性検査を実施。</p>
F1/F2	離乳	仔動物は全例を哺育 21 日に安楽死。	<p>全ての親動物の剖検及び臓器重量測定 (脳, 下垂体, 甲状腺, 肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓, 精巣, 精巣上体 (全体及び尾部), 前立腺, 精嚢 (凝固腺を含む), 卵巣及び子宮。</p> <p>親動物の生殖器官, 下垂体, 甲状腺, 副腎, 肝臓, 腎臓などの病理組織学的検査。</p> <p>各群雌雄各 6 匹または雌 24 匹を用いて血中ホルモンレベル (テストステロン, FSH, LH, エストラジオールなど) を測定。</p> <p>親動物の雄は各群 10 または 24 匹を用いて精子検査 (精子運動率, 精巣の精子数, 精巣上体尾部の精子数, 異常形態精子の出現率)。</p> <p>仔動物は各腹雌雄各 1 匹の臓器重量測定 (脳, 胸腺, 脾臓など)。</p>

表 2-10-2 陽性対照物質での既知知見概要 (生殖・内分泌系について)

	受容体結合試験(含レポーターアッセイ)	子宮増殖&ハーシュバーガーアッセイ	<i>in vivo</i> 試験知見 (含改良 TG407 試験)
17β エストラジオール (エストロゲン)	+ :エストロゲンR + :アンドロゲンR	未実施 : 子宮増殖 - : ハーシュバーガー	性周期異常(含持続発情)、妊娠率低下、妊娠期間延長、児体重減少、小(萎縮)精巣、小(萎縮)精のう、小(萎縮)精巣上体、黄体数減少、下垂体肥大、精子数減少、精子運動能低下、血清 FSH・LH 低下、血清プロラクチン・T3 増加、血清テストステロン低下、包皮分離遅延、膣開口遅延・早期化、精巣・精巣上体・前立腺重量減少、卵巣重量減少、雄乳腺女性化、雌乳腺肥大、のう胞卵胞増加、子宮粘膜上皮肥厚、精細管間質細胞萎縮、精細管腔内生殖細胞残渣、精細管上皮変性等 (反復投与[Gray et al., 1999; Martinez and Swartz, 1991]、器官形成期投与[Swartz and Corkern, 1992]、新生児期投与[Gray et al., 1985]、一世代[Biegel et al., 1998; Cook et al., 1998])
タモキシフェン (抗エストロゲン)	+ :エストロゲンR + :アンドロゲンR	+ :子宮増殖 - : ハーシュバーガー	性周期異常、包皮分離遅延、膣開口早期化、精巣低形成、停留精巣、子宮低形成、雌クレフトファラス、血清 E2・TSH・T3 増加、卵巣・子宮重量減少、前立腺重量減少、卵巣・膣・子宮・卵管の組織学的変化、排卵異常、雄性的二型核(SDN-POA)での神経細胞数減少、のう胞精巣上体、無黄体等 (反復投与[Brown et al., 1999]、周産期投与[Stoker et al., 1999]、新生児期投与[Branham et al., 1996; Taguchi 1987; Taguchi and Nishizuka, 1985; Vancutsem and Roessler, 1997]、子宮内投与[Yamasaki et al., 2005b])
テストステロンプロピオネート (アンドロゲン)	± :エストロゲンR + :アンドロゲンR	未実施 : 子宮増殖 + : ハーシュバーガー	性周期異常、分娩異常、産児数減少、雌クレフトファラス、血清 TSH・T3 増加、血清 T4 低下、卵巣重量・子宮重量減少、児体重減少、雄 AGD 短縮、雌 AGD 伸長、雌乳輪・乳頭数減少、膣發育不全(膣不開口)、膣子宮留水症、無排卵、雌での前立腺・精のう・尿道球腺・肛門挙筋 等 (妊娠後期投与[Wolf et al., 2002 and 2004])
フルタマイド (抗アンドロゲン)	- :エストロゲンR + :アンドロゲンR	- : 子宮増殖 + : ハーシュバーガー	性周期異常、分娩異常、死産児増加、雄 AGD 短縮、包皮分離遅延、膣開口早期化、ペニス奇形、雄乳頭・乳輪遺残、精子数減少、血清テストステロン低下、血清 TSH・T3 増加、停留精巣、精巣上体低形成(含部分的低形成)、前立腺・精のう欠損、精巣萎縮、雄尿道下裂、雄性行動異常、精巣・前立腺・精巣上体・精のう重量減少、卵巣重量減少、精細管変性、精子形成低下、精のう・前立腺低形成と炎症、ライディッシュ細胞過形成、精細管腔内生殖細胞残渣 等 (反復投与[Kim et al., 2002; Miyata et al., 2002; Yu et al., 2004]、改良 TG407[Kunimatsu et al., 2004]、器官形成期投与[He et al., 2004]、妊娠後期投与[Goto et al., 2004; McIntyre et al., 2000]、子宮内投与[Yamasaki et al., 2005a])

+ : 反応性あり、- : 反応性なし
R : 受容体

表 2-10-3 二世世代繁殖毒性試験の結果概要（生殖・内分泌系について）

	受容体結合試験 (含レポーターアッセイ)	子宮増殖 &ハーシュバーガーアッセイ	既知 <i>in vivo</i> 試験知見 (含改良 TG407 試験)	本試験結果
BBP	±:エストロゲンR +:アンドロゲンR	-:子宮増殖 +:ハーシュバーガー	受胎率低下、産児数減少、児体重減少、精巣・精巣上体・前立腺・精嚢萎縮、生殖器奇形(尿道下裂、停留精巣)、精子数減少、精子運動能低下、血清テストステロン低下、雄 AGD 短縮、包皮分離遅延、精巣・精巣上体・精のう・前立腺重量減少、卵巣重量減少、ランディッヒ細胞過形成、精細管上皮細胞壊死（反復投与、周産期投与、二世世代試験）	受胎率低下、精巣軟化、小精巣・精巣上体、精巣上体奇形、雄AGD短縮、雌AGD伸長、包皮分離遅延、精巣上体・精のう重量減少、ライディッヒ細胞過形成、精細管萎縮、精巣上体管腔精子減少（抗アンドロゲン作用）
DCHP	±:エストロゲンR ±:アンドロゲンR	-	精細管萎縮、精子形成低下（反復投与試験）	精子数減少、雄 AGD 短縮、前立腺重量減少、精細管萎縮（非受容体介在、内在性アンドロゲン合成抑制）
2,4-DCP	±:エストロゲンR -:アンドロゲンR	-	児生存率低下、児体重減少（修正一世代、器官形成期投与試験）	着床数・産児数減少、児体重減少、膈開口早期化、子宮重量増加（非受容体介在エストロゲン作用）
DEP	±:エストロゲンR -:アンドロゲンR	-	生存児数減少、児体重減少、精子数減少、雄血清エストロゲン低下、下垂体重量減少（改良 407、一世代、妊娠期間投与試験）	児体重減少、雄血清テストステロン低下、膈開口遅延、子宮・前立腺重量減少（非受容体介在、内在性エストロゲン合成抑制又は分解促進）
n-BB	-:エストロゲンR -:アンドロゲンR	-	報告なし	-
4-NT	-:エストロゲンR -:アンドロゲンR	-	精巣萎縮、精子数減少、精子運動能低下、性周期異常、精巣・精巣上体重量減少、精細管変性・壊死（反復投与試験）	-#
BZP	+:エストロゲンR ±:アンドロゲンR	+:子宮増殖 -:ハーシュバーガー	-	-

#：一般毒性影響のため、既報試験より低用量しか投与できず、既知知見を検出できず

+: 反応性あり、-: 不検出又は反応性なし

R: 受容体

表 2-10-4 二世世代繁殖毒性試験の評価

		BBP	DCHP	2,4-DCP	DEP
試験結果		+	+	+	+
従来二世世代試験(TG416)		+	-	+	+
追加項目	精子検査	-	+	-	-
	ホルモン測定	-	-	-	+
	性周期検査	-	-	-	-
	AGD測定	+	+	-	-
	生殖器分化検査	+	-	+	+
	生殖器重量測定	+(雄：変化あり)	+(雄：前立腺低下のみ)	+(雄：変化なし)	+(雄：前立腺低下のみ)
	生殖器組織学的検査	+(雄：変化あり)	+(雄：変化あり)	-	-

+：検出、-：不検出

2-11. 妊娠期・授乳期投与試験法

(1) 目的

現在、内分泌かく乱作用を有する化学物質の有害性評価のための試験として OECD 及び EPA は（多世代）繁殖毒性試験を候補に挙げている。また、この他に 3 節試験、ICH ガイドライン 対応試験等もその候補として考えられる。しかしながら、何れも多く動物数、時間、経費、労力を要する試験法である。従って、エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用または抗甲状腺ホルモン作用を示す物質をより簡便（小規模、短期間且つ安価）に有害性を評価するための試験法の開発が急務である。内分泌攪乱物質における重要な問題は、成体よりも細胞の急速な増殖及び分化の起こっている胎児、新生児において化学物質への感受性が高くなることである。これらのことから、本研究では母ラットの妊娠期から授乳期にかけて化学物質を投与する妊娠期・授乳期投与試験が、内分泌かく乱作用を有する化学物質が次世代に及ぼす影響を評価するための試験として有用であるかを検討する。

各種生殖発生毒性試験における検出項目の差の概要を表 2-11-1 に示す。

表 2-11-1 各種生殖・発生毒性試験における検出項目の比較

世代	項目	妊娠・授乳期投与試験						
		多世代繁殖試験	3 節試験	ICH 対応試験	催奇形性試験	RACB	併合試験	
P	配偶子形成	-	+	+	+	-	+	+
P	性周期	-	+	+	+	-	+	+
P	排卵	-	+	+	+	-	+	+
P	交尾行動	-	+	+	+	-	+	+
P F1	受精(受胎)	-	+	+	+	-	+	+
P F1	着床	+	±	+	+	-	-	+
P F1	胚・胎児死亡	+	±	+	+	+	-	-
P F1	催奇形性	+	±	+	+	+	+	+
P F1	出産	+	+	+	+	-	+	+
P F1	離乳	+	+	+	+	-	+	-
F1	生後発達	+	+	+	+	-	-	±
F1	機能発達	+	±	+	+	-	-	-

ICH, The international Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
RACB, Reproductive Assessment by Continuous Breeding

(2) 原理

ラットの妊娠期から授乳期にかけて試験物質を母動物に投与する。P 世代に関しては、着床、妊娠維持、分娩、哺育といった生殖機能に対する影響を評価する。また、F1 世代については、胚・胎児の発生、出生仔の発育、性分化、生殖能力へ及ぼす影響について評価する。特に、エストロゲン作用物質、抗アンドロゲン作用物質については、F1 世代の内部、外部生殖器の形態学的変化に注目し詳細に観察する。また、抗甲状腺ホルモン作用物質については F1 世代の発育分化、反応性、行動に及ぼす影響について検査する。これらの指標を検索することにより、内分泌かく乱作用を有する化学物質の有害性評価が可能となると考えられる。

(3) 方法

ラットの受精直後(妊娠0日)または着床後(妊娠6日)から授乳期にかけて試験物質を強制経口投与し、母動物及び出生仔に現れる影響の違いの有無について観察した。母動物の全例について、妊娠0日(交尾確認日=妊娠0日)から哺育状態も含めて分娩後21日(分娩0日=分娩日)まで観察し、妊娠動物は自然分娩させた。交尾が確認された全動物は分娩21日に剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行った。

得られた出生仔は、生後4日に肛門-生殖突起間距離を測定後、生後21日に離乳した。離乳後、雌は膣開口観察及び性周期検査、雄は包皮分離検査を実施した。雌雄の出生仔が10週齢に達した時点で剖検し、器官重量を測定後、器官・組織の肉眼的観察を行った。以前、本事業の一環として2度実施したEEを用いた妊娠期・授乳期投与試験で雌出生仔外性器に形態異常(cleft phallus、即ち尿道開口部の過剰な開裂、外陰部正中皮膚の不完全な癒合)がみられた(Sawaki et al., 2003a,b)。このような変化は、DES暴露(Henry and Miller 1986; Henry et al., 1998)のみならず、2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (Gray et al., 1997)や Testosterone propionate による暴露 (Wolf et al., 2002)でもみられており、必ずしもエストロゲン暴露に特異的な現象ではないが、外性器の形成時期に性ホルモンがかく乱された結果である可能性も考えられることから、cleft phallus の程度を数値化し、客観的に判断する目的で、尿道開口部スリット長、ファラス先端-尿道開口部間距離、尿道開口部-膣開口部間距離を指標とした雌外性器形態計測検査法を導入し、この本検査項目を本事業における出生仔の主たる観察項目とした。また、適切な観察項目を検索するため、その他の観察項目を個々の試験に追加した。

(4) 試験物質

現在、内分泌かく乱作用の中で高い関心が向けられているのはエストロゲン作用、抗アンドロゲン作用、抗甲状腺ホルモン作用である。また、本事業で実施した子宮増殖アッセイにおいて、エストロゲン作用と同時に抗エストロゲン作用を示す化学物質が多く存在することが示された(2-7参照)。従って、エストロゲン作用物質、エストロゲン/抗エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用物質又は抗甲状腺ホルモン作用物質として以下の4物質を用いた。

- ・Ethinylestradiol (EE): エストロゲン作用物質
- ・Tamoxifen (TMX): 選択的抗エストロゲン作用物質
- ・Flutamide (FLT): 抗アンドロゲン作用物質
- ・6-n-Propyl-2-thiouracil (PTU): 抗甲状腺ホルモン作用物質

(5) 結果

① EE

雌ラットに5、50 µg/kg/dayの用量で gestation day (GD) 0、1又は7から分娩20日後まで強制経口投与した。胚・胎仔へ及ぼす影響を詳細に検討するため、各群約2/3の母動物を帝王切開し、残りの母動物は自然分娩させた。出生仔は生後4日に各腹雌雄4匹ずつとなるよう個体数調整し、生後21日に離乳した。出生仔は10週齢時に剖検した。

帝王切開日の検査では、GD0投与開始50 µg/kg群で総早期吸収胚の増加がみられたが、GD1、GD7投与開始群で異常はみられなかった。出生仔でみられた明らかな変化として、雌出生仔に

において、全ての EE 投与群で cleft phallus がみられ、雌外性器の形態計測検査においても全ての EE 投与群で統計学的に有意な変化がみられた。

以上の結果、投与開始時期の違いによる明らかな差としては、母動物においては GD0 投与開始 50 µg/kg 群で総早期吸収胚数の増加がみられた。一方、出生仔においては、EE 5 µg/kg/day 以上の群の雌で cleft phallus がみられたが、その頻度、程度には投与開始時期の影響はみられなかった。結果の概要を表 2-11-2 に示す。

表 2-11-2 EE を用いた妊娠期・授乳期投与試験結果の概要

投与期間	GD 0 – PPD20		GD 1 – PPD20		GD 7 – PPD20	
	5 µg 群	50 µg 群	5 µg 群	50 µg 群	5 µg 群	50 µg 群
観察項目*						
母動物帝王切開群 吸収胚数増加	-	+	-	-	-	-
母動物分娩群	-	-	-	-	-	-
出生仔 雄	-	-	-	-	-	-
出生仔 雌 膣開口日齢	-	+	+	-	-	+
外性器形態計測	+	+	+	+	+	+

GD, gestation day; PPD, Postpartum day.

-, 異常なし; +, 異常所見又は統計学的有意差あり

*その他の検査項目に明確な異常なし。

② TMX

雌ラットに TMX を GD 0 又は 6 から分娩 20 日後まで強制経口投与した。投与量は、GD 6 投与開始試験では 0、1.2、6、30、150 µg/kg/day、GD 0 投与開始試験では 0、1.2、6、30 µg/kg/day とし、各々の試験は独立して実施した。出生仔は生後 4 日に各腹雌雄 4 匹ずつとなるよう個体数調整し、生後 21 日に離乳した。雌雄出生仔の半数/腹は 10 週齢時に剖検し、器官重量測定、雌外性器の形態計測検査を実施した。残りの雌雄出生仔の半数/腹については同用量群内の雌雄組み合わせによる生殖能力検査を実施した。

GD 6 投与開始試験では、30 µg 以上の群の母動物において、明らかな分娩障害がみられ、150 µg 群では離乳仔を得ることができなかった。出生仔では 6 µg 以上の群の雌で cleft phallus が出現し、雌外性器の形態計測検査では 1.2 µg 以上の群で有意な変化がみられた(Yamasaki et al., 2005b)。

GD 0 投与開始試験では、6 µg 以上の群の母動物において、明らかな分娩障害がみられ、150 µg 群では離乳仔を得ることができなかった。出生仔では 6 µg 以上の群の雌で cleft phallus が出現し、雌外性器の形態計測検査では 6 µg 以上の群で有意な変化がみられた。

以上の結果、母動物への影響は妊娠 0 日投与開始群でより強く現れた。出生仔では TMX 投与試験の雌外性器形態計測検査で妊娠 6 日投与開始試験の方が高感度であったものの、その他

の検査項目に明らかな差はみられなかった。結果の概要を表 2-11-3 に示す。

表 2-11-3 TMX を用いた妊娠期・授乳期投与試験結果の概要

投与開始妊娠日	GD 6- PPD20				GD 0- PPD20		
観察項目*	1.2 µg 群	6 µg 群	30 µg 群	150 µg 群	1.2 µg 群	6 µg 群	30 µg 群
母動物	—	—	+	+	—	+	+
				(生存仔 なし)			
出生仔							
雄 器官重量	—	—	+	nd	—	—	nd
雌 外性器形 態計測	+	+	+	nd	—	+	nd

GD, gestation day; PPD, Postpartum day.

—, 異常なし; +, 異常所見又は統計学的有意差あり; nd, 検査せず

*その他の検査項目に明確な異常なし。

③ FLT

投与用量は GD 6 投与開始試験で 0、0.4、2、10 mg/kg/day、GD 0 投与開始試験で 0、0.1、0.4、2 mg/kg/day とし、各々の試験は独立して実施した。妊娠期・授乳期投与と比較し妊娠期から離乳後継続投与によって特異的な変化を引き起こす可能性が示唆されたことから(Staub et al., 2002)、GD 6 投与開始試験で離乳後継続投与群を設定した(Yamasaki et al., 2005a)。なお、GD 6 投与開始試験では、個体数調整は実施せず、離乳前日である生後 20 日に一腹あたり最大 8 匹の雄離乳仔を得た。また、媒体対照群及び 10 mg/kg 群について、一腹あたり 1 匹の雌出生仔を予備的に観察した。先に実施した、GD 6 投与開始試験において、雌出生仔の外性器に奇形が観察されたため、GD 0 投与開始試験では個体数調整は実施せず、生後 20 日に一腹あたり原則として雌雄各 4 匹の雄離乳仔を得て観察し、雌雄出生仔の生殖能力検査を追加した。

GD 6 投与開始試験の雄では、包皮分離検査において離乳後継続投与した 10 mg/kg 群で包皮分離は観察されず、0.4、2mg/kg 群で分離日齢が遅延した。離乳後非投与群では 10 mg/kg 群で包皮分離が完了しなかったが、0.4、2 mg/kg 群で異常はみられなかった。器官重量では、離乳後継続投与した 2 mg/kg 以上の群で、離乳後非投与群では 10 mg/kg 群で異常がみられた。剖検では離乳後継続投与した群、離乳後非投与群ともに 2 mg/kg 以上で外性器、内部生殖器の形態異常がみられた。ホルモン測定では離乳後継続投与した 10 mg/kg 群のみでテストステロンの高値がみられた。離乳後継続投与した群、離乳後非投与群の同用量群間における比較では、包皮分離検査では離乳後継続投与 0.4、2 mg/kg 群で離乳後非投与の同用量群と比較し包皮分離日齢の有意な遅延、器官重量では離乳後投与 2 mg/kg 群で離乳後非投与 2 mg/kg 群と比較し精巣上体、精囊重量の減少、離乳後投与 10 mg/kg 群で離乳後非投与 10 mg/kg 群と比較し精巣上体、腹葉前立腺、精囊、陰茎龟头重量の減少、下垂体重量の増加、ホルモン測定では離乳後投与

10 mg/kg 群で離乳後非投与 10 mg/kg 群と比較し LH 及びテストステロン値の有意な増加がみられた。一方、10 mg/kg 群の雌出生仔で cleft phallus がみられ、FLT の子宮内・系乳汁曝露によって雌出生仔の外部生殖器に形態異常が誘導されることが明らかとなった。

GD 0 投与開始試験では、雄出生仔の 2 mg/kg 群で副生殖腺重量の有意な変化、剖検において精巣、陰茎に異常がみられた。雌出生仔の膣開口検査において、2 mg/kg 群で膣開口日齢の早期化がみられ、膣開口日体重の低値がみられた。10 週齢剖検時に実施した雌外性器の形態計測検査では、0.4 mg/kg 以上の群で有意な変化がみられた。出生仔の生殖能力検査において、2 mg/kg 群の雄 1 例で交尾が確認されなかったため、無処置雌を用いた生殖能力の再検査を行ったが、交尾は成立しなかった。なお、本動物の剖検の結果、尿道の奇形がみられた。

以上の結果、GD 6 投与開始試験において離乳後の出生仔への継続投与の効果について検討したところ、雄出生仔の内、外性器への奇形に関しては離乳後継続投与による差は殆どみられなかったが、包皮分離日齢は大きく影響を受けることが明らかとなった。一方、投与開始時期の相違による母動物への影響、出生仔への影響については明確な差はみられなかった。結果の概要を表 2-11-4 に示す。

表 2-11-4 FLT を用いた妊娠期・授乳期投与試験結果の概要

投与開始 妊娠日	GD 6 - PPD 20			GD 6 - PPD 20 +PND 23-69			GD 0 - PPD 20		
	0.4 mg 群	2 mg 群	10 mg 群	0.4 mg 群	2 mg 群	10 mg 群	0.1 mg 群	0.4 mg 群	2 mg 群
母動物	-	-	+	/	/	/	-	-	-
雄 出生仔	-	-	+	/	/	/	-	-	-
AGD	-	-	+	/	/	/	-	-	-
包皮分離	-	-	+	+	+	+	-	-	-
器官重量	-	-	+	-	+	+	-	-	+
ホルモン測定	-	-	-	-	-	+	-	-	-
剖検	-	+	+	-	+	+	-	-	+
生殖能力	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	+
雌 出生仔	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	+
膣開口	nd	nd	+	nd	nd	nd	-	-	+
外性器 形態計測	nd	nd	+	nd	nd	nd	-	+	+

GD, gestation day; PPD, Postpartum day; PND, Postnatal day.

-, 異常なし; +, 異常所見又は統計学的有意差あり; nd, 検査せず

*その他の検査項目に明確な異常なし。

④ PTU

抗甲状腺ホルモン作用物質の次世代に及ぼす有害性影響を検出する試験法としての可能性について検討するため、妊娠ラットのGD7からPPD18に3.2、16、80及び400 µg/kg/dayのPTUを投与した。出生仔の耳介展開、背部毛生、下顎切歯萌出、眼瞼開裂、全身痛覚反射、背地走性、聴覚驚愕反射、空中落下反射、Open-field検査、水迷路検査を実施した。出生児はPND40で剖検し、器官重量を測定した。

母動物では、剖検、病理組織学的検査において400 µg/kg群で異常がみられた。

出生仔では、400 µg/kg群の雌雄で発育分化検査、反応性検査、器官重量に異常がみられた。さらに、400 µg/kg群の雌では水迷路検査で学習能力の低下を疑わせる変化がみられた。また、出生仔の病理組織学的検査において、80 µg/kg以上の群の雄で甲状腺に組織学的変化がみられた (Noda *et al.*, 2005)。結果の概要を表2-11-5に示す。

表2-11-5 PTUを用いた妊娠期・授乳期投与試験結果の概要

観察項目*	3.2 µg 群	16 µg 群	80 µg 群	400 µg 群
母動物				
剖検				
甲状腺	—	—	—	+
病理組織検査				
甲状腺	—	—	—	+
出生仔				
体重	—	+(雌)	—	+(雌雄)
下顎切歯萌出	—	—	—	+(雌雄)
聴覚驚愕反射	—	—	—	+(雌雄)
水迷路検査	—	—	—	+(雌)
器官重量	—	—	—	+(雌雄)
病理組織検査				
甲状腺	nd	nd	+(雄)	+(雄)

GD, gestation day; PPD, Postpartum day.

—, 異常なし; +, 異常所見又は統計学的有意差あり; nd, 検査せず

*その他の検査項目に明確な異常なし。

(6) 結果のまとめ

EE、TMX、FLUの3物質に共通した変化として、雌出生仔外性器の形態異常(cleft phallus)がみられた。

各々の物質に特徴的にみられた変化として、TMXでは母動物の分娩、FLTでは雄出生仔の内、外性器の形態異常、PTUでは出生仔の発育分化、反応性、学習能力異常がみられた。

EE、TMX、FLUの3物質における投与開始時期の違いによる検出感度については、母動物で

は妊娠 0 日投与開始試験が妊娠 6 日投与開始試験に比較し高感度であった。出生仔では TMX 投与試験の雌外性器形態計測検査で妊娠 6 日投与開始試験の方が高感度であったものの、その他の検査項目に明らかな差はみられなかった。

妊娠 0 日投与開始実験における胚致死作用と雌外性器形態異常の検出感度については、雌外性器形態異常のほうが胚致死作用より高感度であった。

FLT を用いた試験において、内、外性器の奇形に関しては離乳後継続投与の影響は殆どみられなかったが、包皮分離、血中ホルモン濃度に関しては離乳後継続投与の影響を大きく受けることが示唆された。

(7) 試験法としての評価

① OECD 等海外技術開発動向

2004 年 12 月に OECD より公表された Draft guideline on reproductive toxicity testing and assessment においては、子宮増殖アッセイや、ハーシュバーガーアッセイ等で内分泌かく乱作用を疑う所見が得られた場合は、1 世代若しくは 2 世代繁殖毒性試験を実施し、該当物質の生殖・発生毒性を評価することを求めている。EPA も繁殖毒性試験を実施し、内分泌かく乱作用の有無を確認するとしている。一方、EPA は、T1S と T2T の中間に相当する試験法として *in utero* / lactational exposure testing protocol の検証作業を開始した。

② スクリーニング試験法との結果の比較

EE、FLT、TMX、PTU に関するスクリーニング試験、繁殖毒性試験の報告例と本事業の結果及び妊娠期のみ、授乳期のみ又は妊娠期から授乳期に投与を行った試験の報告例を表 2-11-6 に要約する (Gray et al., 2001; Kim et al., 2002; Kunimatsu et al., 2004; Tinwell et al., 2002; Yamasaki et al., 2001, 2002a, 2002b; Wolf et al., 2002)。

表2-11-6. 4物質におけるスクリーニング試験、繁殖毒性試験、妊娠期・授乳期投与試験の結果概要

	子宮増殖アッセイ 又はハーシュバー ガーアッセイ	その他スクリーニング 試験結果	繁殖毒性試験の主な結果	当機構実施試験結果の概要	その他妊娠期又は 授乳期に投与した試験報告例
EE	0.3 µg/kg<でエスト ロゲン作用検出 (Kanno et al., 2001)	性周期の異常、雄副生殖腺 重量減少、肝臓、子宮、副 腎重量増加、精母細胞変 性、前立腺、精嚢、乳腺、 卵巣の萎縮、子宮内膜上皮 の扁平上皮化生、腺上皮細胞 、内膜上皮細胞の高円柱 状化、腺粘液分泌亢進、副 腎の皮質肥大(Gray et al., 1999; Martinez and Swartz, 1991; Yamasaki et al., 2002a)	E2の結果 (EEの報告例なし) 2.5 ppm(0.14/0.17 mg/kg雌雄)以 上で包皮分離遅延、精嚢、精 嚢重量減少、膣開口の早期 化、乳腺の過形成、子宮の内 膜上皮の肥大、扁平上皮化生 (Biegel et al., 1998; Cook et al., 1998)	総早期吸収胚/総着床数の増加、膣開口 早期化、雌外生殖器形態異常(尿道開口部 の過剰な開裂、外陰部正中皮膚の不完全 な癒合、cleft phallus) (Sawaki et al., 2003a; 2003b)	胚・胎仔死亡数増加、膣開口早期 化、雌外生殖器形態異常、性周期 異常、精嚢、精嚢上体、前立腺 重量減少、精子産生量減少、精 嚢、膣の組織学的変化以上はEE 200µg/kgの妊娠期・授乳期投与で みられている)Tinwell et al., 2002)
FLT	0.4 mg/kg<で高アン ドロゲン作用検出 (Yamasaki et al., 2001)	雄性副生殖腺重量、卵巣、 下垂体重量減少、肝臓重量 増加、膣開口早期化、LH- FSH-分泌細胞増加、ライ ディッヒ細胞肥大(Kim et al., 2002; Kunimatsu et al., 2004; Shin et al., 2002)	なし	死産仔数/出生仔数の増加、AGD短縮、 包皮分離遅延、雄内部、外部生殖器形態 異常、精嚢、腹葉前立腺、精嚢、陰茎亀 頭重量減少、雌外生殖器形態異常(cleft phallus)、膣開口早期化(Yamasaki et al., 2005a)	AGD短縮、遺残乳頭数増加、包 皮分離遅延、内部、外部生殖器 形態異常(McIntyre et al., 2001)
TMX	子宮増殖アッセイ での抗エストロゲン 作用物質としての陽 性対照濃度: 1 mg/kg(EE0.6 µg/kg同 時投与)	体重低値、甲状腺、子宮、 卵巣、下垂体、副腎重量減 少、膣開口遅延、性周期消 失(Kim et al., 2002)	10 µg/kg群で交尾率、妊娠率、 受精率減少、3 µg/kg以上の群 のF1出生仔で性周期異常、F2 雄新生仔数の減少 (Gaithersburg, M.D., 1997)	異常分娩、哺育障害、雌外生殖器形態異常 (cleft phallus)(Yamasaki et al., 2005b)	着床阻害、分娩障害、体重低 値、性成熟遅延、尿道下裂、子 宮低形成、黄体無形成、繁殖行 動消失(Harakivi-Clarke et al., 2000; Taguchi and Nishizuka 1985)
PTU	なし	T4、T3減少、TSHの増加、 甲状腺、下垂体重量増加、 甲状腺濾胞上皮細胞の腫 大、下垂体のbasophilic cell 増加(Yamasaki et al., 2002)	0.004 w/v%(0.4 mg/kg相当)以上 の群でAGD短縮、0.0015 w/v%(1.5 mg/kg相当)で体重、 摂餌、摂水量減少、発育分化 遅延、脾臓、肝臓、脳、副腎 重量減少、甲状腺重量減少、 甲状腺濾胞上皮過形成、切歯 崩出遅延、切歯欠損、行動検 査は実施せず(Nehrebeckyj et al., 2001)	体重低値、聴覚反射消失、下顎切歯萌出 の遅延、Biel型水迷路検査における直線 路及び迷路遊泳時間の延長、錯誤数の増 加、出生仔甲状腺重量増加、甲状腺の組 織学的異常(Noda et al., 2005)	聴覚反射消失、発育分化遅延、 学習能力低下、情動行動異常 (Akaike et al., 1991; Goldey et al., 1995)

③ 試験法としての評価（確認試験法としての可能性、問題点）

EE、TMX に関しては、本事業において実施した実験結果と文献値において、繁殖毒性試験でみられた有害性影響の多くがみられており、繁殖毒性試験の代替試験法として利用可能と思われる。FLT に関しては、限り公表されている繁殖毒性試験がないため、比較することが出来なかったが、少なくとも次世代に及ぼす有害性影響を検出することは可能であると考えられる。PTU については、本事業において実施した実験の観察項目と、公表されてある 2 世代繁殖毒性試験の観察項目に共通したものが少なく、両者の詳細な比較は困難であった。両者の比較を前提としたデザインによる試験実施が望まれる。

EE、TMX、FLT 投与実験に共通して雌外性器に *cleft phallus* がみられ、雌外性器の形態計測検査を実施したところいずれにおいても統計学的に有意な変化が認められた。雌外性器の詳細な観察及び形態計測検査は性ホルモンかく乱作用を検出するにあたり有用且つ検出感度の高い観察項目になる可能性がある。

TMX では母動物の分娩、FLT では雄出生仔の内、外性器の形態異常、PTU では出生仔の発育分化、反応性、学習能力異常と、各々の物質に特徴的にみられた変化があった。このほか E2 の混餌投与では乳腺の病理組織学的検査が最も高感度であったと報告されている (Latendresse et al., 2002)。また、抗アンドロゲン作用物質の評価には乳頭遺残と AGD が必須であるといわれている (Gray et al., 2002)。被検物質の特性を考慮し適切な観察項目を選択することでより精度の高い試験系を構築できると考えられる。

妊娠期・授乳期投与試験と繁殖試験の検出感度の比較した場合、TMX、PTU に関する検出感度はほぼ同等であると考えられる。EE の繁殖試験の報告例はないが、強力なエストロゲン作用物質の繁殖試験例としては E2 が報告されている。E2 と EE は *in vivo* 試験 (2-7、2-8 参照)、子宮増殖アッセイでもほぼ同等のホルモン活性 (Charles et al., 2002; Kim et al., 2001; Kanno et al., 2001)を示すと思われることから、妊娠期・授乳期投与試験と繁殖試験の検出感度の差を比較した場合、強力なエストロゲン作用物質についてもほぼ同等であると思われる。

EE、TMX、FLU の 3 物質における投与開始時期の違いによる検出感度については、母動物では妊娠 0 日投与開始試験が妊娠 6 日投与開始試験に比較し高感度であった。出生仔では TMX 投与試験の雌外性器形態計測検査で妊娠 6 日投与開始試験の方が高感度であったものの、その他の検査項目に明らかな差はみられなかった。以上のことから、出生仔に対する内分泌かく乱化学物質の有害性評価は、妊娠 6 日投与開始試験で評価可能であると考えられる。

FLT 投与試験において、離乳後非投与群では 10 mg/kg 群で包皮分離日齢の遅延、離乳後継続投与では、0.4 mg/kg 以上の群で包皮分離日齢の遅延がみられた。思春期・甲状腺アッセイでは 5 mg/kg 以上の群で包皮分離日齢の遅延がみられている (Shin et al., 2002)ことから、FLT の妊娠期・授乳期投与によって雄出生仔の FLT に対する反応性が高くなっている可能性が示唆される。以上のことから、妊娠期・授乳期投与試験は、短期間、安価、且つより簡便

に影響を捉えるためだけでなく、胎生期から新生仔期に投与された出生仔の機能面への影響を詳細に観察する場合等にも適していると考えられる。

(8) 今後の課題と展望

弱いホルモン作用を有するとされる物質、特に繁殖毒性試験の知見がある物質について、妊娠期・授乳期投与試験法を用いた評価が可能であるか、雌雄の内、外性器の奇形、雌外性器の形態計測検査が有用な検査項目になりうるか、さらに検証する必要がある。

FLT と PTU については、妊娠期・授乳期投与試験と繁殖試験との詳細な比較は困難であった。両者の比較を前提としたデザインによる試験実施が望まれる。

(9) 参考文献

- Akaike, M. Kato, N. Ohno, H. and Kobayashi, T. (1991) Hyperactivity and spatial maze learning impairment of adult rats with temporary neonatal hypothyroidism. *Neurotoxicol Teratol.*, **13**, 317-322.
- Charles, G.D., Gennings, C., Zacharewski, T.R., Gollapudi, B.B. and Carney, E.W. (2002) An approach for assessing estrogen receptor-mediated interactions in mixtures of three chemicals: a pilot study. *Toxicol. Sci.*, **68**, 349-360.
- Gaithersburg, M.D. (1997) Final report on the reproductive toxicity of tamoxifen citrate (CAS #54965-24-1) administered by gavage to Sprague-Dawley rats. NTIS Technical Report., NTIS/PB97-199723.
- Gray, L.E., Jr., Ostby, J., Furr, J., Wolf, C.J., Lambright, C., Parks, L., Veeramachaneni, D.N., Wilson, V., Price, M., Hotchkiss, A., Orlando, E. and Guillette, L. (2001) Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum. Reprod. Update.* **7**, 248-264.
- Gray, L.E., Jr., Ostby, J., Wilson, V., Lambright, C., Bobseine, K., Hartig, P., Hotchkiss, A., Wolf, C.J., Furr, J., Price, M., Parks, R.L., Cooper, R.J., Stoker, T.E., Laws, S.C., Degitz, S.J., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J., Makynen, E.A., Tietge, J.E. and Ankley, G.T. (2002) Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing Filling key data gaps. *Toxicology*, **181-182**, 371-382.
- Kanno, J., Onyon, L., Haseman, J., Fenner-Crisp, P., Ashby, J. and Owens, W. (2001) The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: phase 1. *Environ. Health Perspect.*, **109**, 785-794.
- Kim, H.S., Han, S.Y., Yoo, S.D., Lee, B.M and Park, K.J. (2001) Potential estrogenic effects of Bisphenol-A estimated by in vitro and in vivo combination assays. *J. Toxicol. Sci.*, **26**, 111-118.
- Kim, H.S., Shin, J.H., Moon, H.J., Kim, T.S., Kang, I.H., Seok, J.H., Kim, I.Y., Park, K.L. and Han,

- S.Y. (2002) Evaluation of the 20-day pubertal female assay in Sprague-Dawley rats treated with DES, tamoxifen, testosterone, and flutamide. *Toxicol. Sci.*, **67**, 52-62.
- Kunimatsu, T., Yamada, T., Miyata, K., Yabushita, S., Seki, T., Okuno, Y. and Matsuo, M. (2004) Evaluation for reliability and feasibility of the draft protocol for the enhanced rat 28-day subacute study (OECD Guideline 407) using androgen antagonist flutamide. *Toxicology*, **200**, 77-89.
- Latendresse, J.R., Weis, C., Newbold, R.R., Delclos, K.B. and Jefferson, A.R. (2002) Effects of dietary ethinyl estradiol (EE2) on the mammary gland of male CD (Sprague-Dawley) rats. *Toxicologist.*, **66**, 378.
- McIntyre, B.S., Barlow, N.J. and Foster P.M. (2001) Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. *Toxicol. Sci.*, **62**, 236-249.
- Nehrebeckyj, L., Wang, Y., Quance, J., Kariya, J., Wolfe, G.W. and Bishop, J. (2001) Craniofacial malformations observed in F1 pups of Sprague-Dawley (SD) rats administered propylthiouracil (PTU) in drinking water. NIEHS report, (TRC study No. 7244-601).
- Noda, S., Sawaki, M., Yamasaki, K., Tateyama, S. and Yamaguchi, R. (2005) Preliminary Evaluation of *In utero*-lactation Assay using 6-n-propyl-2-thiouracil. *Arch. Toxicol.*, **79**, 414-421.
- Sawaki, M., Noda, S., Muroi, T., Mitoma, H., Takakura, S., Sakamoto, S. and Yamasaki, K. (2003a) In utero through lactational exposure to ethinyl estradiol induces cleft phallus and delayed ovarian dysfunction in the offspring. *Toxicol. Sci.*, **75**, 402-411.
- Sawaki, M., Noda, S., Muroi, T., Mitoma, H., Takakura, S., Sakamoto, S. and Yamasaki, K. (2003b) Evaluation of an in utero through lactational exposure protocol for detection of estrogenic effects of ethinyl estradiol on the offspring of rats: preliminary trial. *Reprod. Toxicol.*, **17**, 335-343.
- Shin, J.H., Kim, H.S., Moon, H.J., Kang, H., Kim, T.S., Seok, J.H., Kim, I.Y., Park, K.L., Han, S.Y. and Nam, S.Y. (2002) Effects of flutamide on puberty in male rats: an evaluation of the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. *J. Toxicol. Environ Health.*, **65**, 433-445.
- Staub, C., Hardy, V.B., Chapin, R.E., Harris, M.W. and Johnson, L. (2002) The hidden effect of estrogenic/antiandrogenic methoxychlor on spermatogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **180**, 129-135.
- Tinwell, H., Haseman, J., Lefevre, P.A., Wallis, N. and Ashby, J. (2002) Normal sexual development of two strains of rat exposed *in utero* to low doses of Bisphenol A. *Toxicol. Sci.*, **68**, 339-348.
- Wolf, C.J., Ostby, J., Hotchkiss, A. and Gray, L.E., Jr. (2002) Effects of prenatal testosterone

- propionate on the sexual development of male and female rats. *Toxicol. Sci.*, **66**, 69-81.
- Yamasaki, K., Sawaki, M. and Takatsuki, M. (2001) Strain sensitivity differences in the Hershberger assay. *Reprod. Toxicol.*, **15**, 437-440.
- Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S., Imatanaka, M. and Takatsuki, M. (2002a) Subacute oral toxicity study of ethynyl estradiol and bisphenol A based on the draft protocol for the “Enhanced OECD Test Guideline no. 407”. *Arch. Toxicol.*, **76**, 65-74.
- Yamasaki, K., Tago, Y., Nagai, K., Sawaki, M., Noda, S. and Takatsuki, M. (2002b) Comparison of toxicity studies based on the draft protocol for the “Enhanced OECD Test Guideline no. 407” and the research protocol of “Pubertal Development and Thyroid Function in Immature Male Rats” with 6-n-propyl-2-thiouracil. *Arch. Toxicol.*, **76**, 495-501.
- Yamasaki, K., Noda, S., Muroi, T., Mitoma, H., Takakura, S. and Sakamoto, S. (2005a) Effects of In Utero and Lactational Exposure to Flutamide in SD Rats: Comparison of the Effects of Administration Periods. *Toxicology*, **209**, 47-54.
- Yamasaki, K., Noda, S., Muroi, T., Mitoma, H., Takakura, S. and Sakamoto, S. (2005b) Effects of In Utero and Lactational Exposure to Tamoxifen in SD Rats. *Toxicol. Letters*, **159**, 289-296.

3. 試験法開発全般にわたる課題と今後の取組み

内分泌かく乱作用に関する試験法開発事業における、三次元構造活性相関手法、*in vitro* 及び *in vivo* 試験の各領域での個別の試験法の開発状況とこれまでの成果及び今後の課題については、「第2章」に述べたとおりである。

OECDでは内分泌かく乱作用の試験法に関する国際的標準化に向けての取組みを継続しており、我が国としても今後も個別の試験法の有効性検証（バリデーション）のための作業やテストガイドライン化に向けての対応を図っていくことが重要である。また、ほぼ完成した試験法を化学構造の特徴の異なる化学物質群に適用し、試験データを収集解析する。基礎的知見を蓄積することも重要であると考えられる。

これまで、構造活性相関手法、*in vitro* 試験法、*in vivo* 試験法を同一化学物質に適用して得られた結果を横断的に評価することにより、重要な基礎的知見が得られつつあることから以下にその概要と今後の取組みのあり方についてまとめる。

始めに膨大な化学物質から内分泌かく乱作用の恐れのある物質を選別する手法として、内分泌かく乱作用の主要因と考えられているエストロゲン受容体(ER)への結合に着目した構造活性相関の手法の開発を行ったところ、ERへの結合性が疑われる骨格を有する物質群についての定量的な予測が可能となった。また、広範な構造バラエティの物質群に対しても、定性的ではあるがERへの結合性を予測することが可能となった。しかし、予測できない構造群もあることや、ERへの結合性が弱い物質の予測精度を向上させる必要もあることから、更なる改良を行う余地があると考えられる。

受容体結合試験及びレポーター遺伝子アッセイの*in vitro*試験については、ER系及びアンドロゲン受容体(AR)系共に、検証用物質を用いた比較試験結果からメカニズム特異的な作用の検出が可能な信頼性の高い試験法であることが分かった。また、ER及びARそれぞれに対して特異的に作用する物質が多く存在したことから、いずれの受容体を用いた試験系も重要であることが示された。

また、ERへの結合性と子宮増殖アッセイ結果の相関性については、「2-2. 受容体結合試験法」の「(7)試験法としての評価」の項に記述したように、65物質で比較を行ったところ全体の一致率は66%であり、いずれも陽性と判定された物質の用量-作用(影響)間に正の相関がみられたことから、*in vivo*試験で作用の検出されない(すなわち、陰性判定される)受容体結合強度のカットオフ値を*in vitro*試験から設定可能であることが示唆された。さらに、受容体結合試験とレポーター遺伝子アッセイの両方の結果と、子宮増殖アッセイの結果とを比較することで、偽陰性及び偽陽性となる物質数を減少させることができたことから、スクリーニングとして先行的に実施する*in vitro*試験としては、両試験を併用的に実施することが望ましいことが示唆された。なお、*in vitro*試験結果と子宮増殖アッセイの結果が一致しなかった物質については、代謝活性化を受けた可能性があることから、代謝アッセイ系試験の手法開発が必要であると思われる(表1)。

表1 2分割表による ER 結合試験と子宮増殖アッセイの比較

		ER 結合試験		計
		結合性物質数	非結合性物質数	
子宮増殖 アッセイ	陽性物質数	30	5	35
	陰性物質数	17	13	30
計		47	18	65

AR 結合試験の結果とハーシュバーガーアッセイの結果との関係についても、80物質で比較を行ったが、偽陽性と判定された物質にはエストロゲン作用を併せ持つ物質が多く含まれていた(表2)。これらは、AR に対する反応に加えて、雄性副生殖器官に発現している ER に対しても作用し、AR に対する作用に干渉した可能性が考えられる。すなわち、AR 系では ER 系と異なり、単一作用メカニズムを検出するための *in vitro* 試験結果が *in vivo* 試験結果に直接的に反映されない場合があることがわかった。従って、AR 系のスクリーニングでは、*in vivo* 試験を実施すべき物質の選定に際して、また、ハーシュバーガーアッセイのデータの解釈に当たり、この点を考慮する必要があると考えられる。また、ER 系のスクリーニングと同様に、レポーター遺伝子アッセイ結果と結合試験結果とを合わせて評価することで、偽陰性及び偽陽性となる物質数を減少させることができたことから、AR 系の評価についても、両試験法を併用実施することが望ましいと思われる。

表2 2分割表による AR 結合試験とハーシュバーガーアッセイの比較

		AR 結合試験		計
		結合性物質数	非結合性物質数	
ハーシュバーガー アッセイ	陽性物質数	21	5	26
	陰性物質数	35	19	54
計		56	24	80

以上のように、*in vitro* と *in vivo* のスクリーニング試験法の個々の性質、有用性について検討してきたが、異なる試験法での結果を横断的に比較評価したところ、不一致例の構造的要因の解析、暫定的カットオフ値の妥当性などを、より作用メカニズムに基づいた科学的根拠から裏付けるために、更なるデータ収集が必要であると考えられる。

従来の試験法開発事業において、鍵となる試験法と認識されながらも、データ収集が進んでいない試験に改良28日間反復投与毒性試験法(改訂TG407)の開発がある。本法に関しては、「2-9. 改良28日間反復投与毒性試験法」の「(7)試験法としての評価」

の項で考察したように、(抗) エストロゲン作用、(抗) アンドロゲン作用が明瞭な物質、すなわち強いホルモン様作用のある物質や甲状腺機能影響物質に対しては評価が可能である、というのが関係者の一致した考えであると思われるが、弱いホルモン作用物質、アロマターゼやステロイド生合成系の酵素を阻害、又は誘導することによる性ホルモン量の変動作用を改訂TG407試験で検出が可能かなど、試験法としての有効性検証の範囲をより広げて検討する余地が残されている。なお、アロマターゼ阻害剤を雌雄ラットに2～4週間反復経口投与した結果、雌雄の生殖器官の重量、組織変化などで評価が可能であったとする報告は数多くあり (Muratori et al., 2003; O'Connor et al., 2002; Kawashita et al., 2000; Matsuda et al., 1997; Walker & Nogues, 1994; Steel et al., 1988)、潜在的にアロマターゼ阻害/誘導作用を有する化学物質の検出法としての改訂TG407試験法の有用性についても検証していく必要があると考える。一方、弱い性ホルモン受容体介在作用物質に関しても、これまではビスフェノールAなど数物質しか検討できておらず、本試験法の限界も明らかにはなっていない。今後、ER系、AR系、アロマターゼ活性等に影響を及ぼした化学物質に関し、子宮増殖アッセイ、ハーシュバーガーアッセイ及び改訂TG407試験のフルセットでのスクリーニングデータ取得を行い、各化学物質の内分泌影響プロフィールに関するデータを取得すると同時に、作用メカニズムによる分類等でカテゴリー分けした物質群毎に横断的評価を行うことで、内分泌影響評価試験法としての改良28日間反復投与毒性試験法の評価を行うことを優先課題とすべきと考える。

内分泌かく乱作用で最も重要な観点は、内分泌系への作用が次世代の生殖機能へ有害性影響を示すかどうかという点であり、そのような評価が可能な試験法を開発することも重要である。これまでの検討では、7物質について(改良)二世代繁殖毒性試験(改良TG416)を行った。これらは当該物質の有害性影響評価の一環として行ったものであり、個々の物質についてのホルモン作用のスクリーニングデータも取得して、試験法としての評価を行った。必ずしも作用の明確な物質を用いたわけではないこと、物質数が限られていることから、試験法(プロトコル)の有用性検証は十分ではないが、限られた検討の中でも、内分泌系影響評価のために追加したエンドポイントで影響が検出可能であったなど、改良TG416試験法は、親世代及び次世代の生殖能への有害性影響評価の試験法として有用であることを確認することができた。

ただ、改良TG416は多大の費用と期間を要する試験法であり、より安価に簡便に評価できる手法の開発が望まれている。このようなニーズを受け、一世代試験法の改良型とみなされる「妊娠期・授乳期投与試験法」の開発を行ってきたがホルモン作用の明らかな物質での検討では、F1世代の生殖器系に対する明確な有害性影響が確認できたことから、ホルモン作用物質の影響評価が可能であることが検証できた。本試験法を内分泌かく乱作用による有害性影響評価のための試験法として確立し、二世代繁殖毒性試験法に代わる試験法として位置づけるには、より作用の弱い物質を検出できるか等更なる検討が必要である。

今回、内分泌かく乱作用の試験法開発の成果を取りまとめるにあたり、個々の試験法について、現時点での成果と今後の取組みの展望を示した。また、*in vitro* 試験から *in vivo* 試験まで同一の化学物質による一貫したデータを多く収集し、内分泌系への影響プロフィールに関する評価結果を総合的、横断的に評価することで、基礎的・学術的な知見や法則性を見出すことが可能と考えられること、さらにそれを応用することで有効な試験法の選択及び組み合わせによる実用的/効率的な試験体系化の枠組み構築に資するものと考えられることを明らかにした。以上から、今後も個別試験法の完成・標準化に向けての対応を図るのみならず、より多くのデータを収集することによる学術的知見の集積、応用という観点からも更なる取組みが必要と結論される。

参考文献

- Kawashita, H., Hiratsuka, K., Kuroda, J., Asada, Y., Suzuki, T., Muguruma, Y., Tomioka, S., Tani, M., Kondo, M., Mineshima, H. and Nagae, U. (2000) Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats. 4) Fadrazole hydrochloride: an oral 2/4-week male reproductive organ toxicity study. *J. Toxicol. Sci.*, **25**, Special Issue, 51-62.
- Matsuda, A., Higuchi, K., Karasawa, M., Yoneyama, S., Deguchi, J. and Miyamoto, M. (1997) Fourteen-day oral combination dose toxicity study of CGS 16949A (aromatase inhibitor) with 5-fluorouracil or tamoxifen in rats. *J. Toxicol. Sci.*, **22**, 1-24.
- Muratori, M., Lippi, A., Mancina, R., Iafrate, E. M., Cirillo, R., Lopez, G., Bigioni, M., Maggi, M., Criscuoli, C. A. and Maggi, C. A. (2003) Pharmacological profile of MEN 11066, a novel potent and selective aromatase inhibitor. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **84**, 503-512.
- O'Connor, J. C., Frame, S. R. and Ladics, G. S. (2002) Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying steroid biosynthesis inhibitors and thyroid modulators. *Toxicol. Sci.*, **69**, 79-91.
- Steele, R. E., Mellor, L. B., Sawyer, W. K., Wasvary, J. M. and Browne, L. J. (1987) In vitro and in vivo studies demonstrating potent and selective estrogen inhibition with the nonsteroidal aromatase inhibition CGS 16949A. *Steroids*, **50**, 147-161.
- Walker, U. J. and Noguez, V. (1994) Changes induced by treatment with aromatase inhibitors in testicular Leydig cells of rats and dogs. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **46**, 211-213.

4. まとめ

開発に取り組んだ試験法開発の結果と今後の課題の概要は以上に述べた通りである。

試験法の一部については、データの蓄積に取り組んでいる状況に示されているとおり、既に化学物質の内分泌かく乱作用に関する情報の収集に用いることが可能なレベルにあるものがあるが、今後の課題として示したとおり改良の余地があるものや、開発途上にあるものも残されている。これらの試験法の一部については、OECDにおいて *in vivo* 試験法を中心にバリデーションが行われ、テストガイドライン化の取り組みが進められているが、現時点において、国際的に認められたテストガイドラインとして取りまとめられたものはなく、それぞれの取り組みの進捗状況は異なっている。

また、内分泌かく乱作用そのものについては、2002年4月にとりまとめた評価スキーム（案）において評価の対象とされた性ホルモンや甲状腺ホルモンのみならず、免疫系や神経系への影響が指摘され、また、性ホルモン受容体に限らず多くの受容体が確認されるなど、新たなエンドポイントや作用メカニズムが提示されてきている状況である。その一方で、WHOやOECDにおける国際的取り組みや、我が国の関係省庁の取り組みによって、内分泌かく乱作用は化学物質の持つ毒性の作用メカニズムの一つとしてとらえられてきている。このような状況に鑑みると、新たに提起された課題については、基礎的研究課題としてメカニズムの解明を含む知見の収集を進めるべき段階にあり、現時点では汎用的な試験法開発を進める段階にないと考えられる。

このため、試験法開発は、引き続き「内分泌かく乱物質試験評価スキーム（案）」の枠組に従い、既に開発した構造活性相関評価法による予測データや *in vitro* 試験法による知見の集積を図りつつ、OECDにおけるテストガイドライン化の作業が進んでいる *in vivo* 試験法の確立を最優先の課題として取り組むものとする。また、今後の課題として示された各試験法の課題については、OECDにおける検討の進捗や、国際的な動向を踏まえて対応することとし、新たな課題については引き続き情報の収集に努めるものの、試験法開発の課題としては当面取り上げないこととする。

なお、試験法のテストガイドライン化に際して必要な試験の実施に際しては、化学物質の有害性評価を進める観点から、暴露量の観点を踏まえ、国内における取扱量の多い化学物質を優先することとする。

V. おわりに

Ⅲ章で述べたとおり、人の健康影響を中心とした有害性評価に関しては、評価対象とした化学物質の中には生殖発生毒性等の従来の有害性項目の観点からリスク評価が必要とされたものもあったが、これらのうち内分泌かく乱作用の観点からリスク評価が必要とされたものは1物質^{注)}のみだった。また、我が国の関係省庁の取り組みによっても新たに優先して調査対象とすべき化学物質は明らかになってきておらず、内分泌かく乱作用の観点から新たに有害性評価を緊急に行うべき物質はないと考えられている。

また、Ⅳ章で述べたとおり、試験方法の開発に関しては、平成16年度までに内分泌かく乱物質のスクリーニングのためのスキームの確立を目標として、OECDにおける試験法の開発に貢献すべく、主としてエストロゲン作用及びアンドロゲン作用に着目して、i) 構造活性相関評価法、ii) *in vitro* 試験法、iii) *in vivo* 試験法の開発を進めてきた。これらの手法は、既に化学物質の内分泌かく乱作用に関する情報の収集に用いることが可能なレベルにはあるが、現時点において、内分泌かく乱作用の評価のための国際的に認められたテストガイドラインとしては、取りまとめられていない。

このように、内分泌かく乱物質問題については、WHOやOECDにおける国際的取り組みや、我が国の関係各省による取り組みによって問題点が整理され、さらなる研究が望まれる科学的な課題が一部残されてはいるものの、当初懸念されたような人に対する差し迫ったリスクはないことが明らかになってきた。

その一方で、今まで国際的に取り組んできた試験法については、未だ確立されておらず、テストガイドライン化が急がれている。

注) フタル酸n-ブチルベンジル。現在、初期リスク評価書を作成中。