

一方、管延長が同じであれば口径が小さい方が滞留水中の鉛濃度は高くなる事が想定される。しかし、口径差が7mmと小さいためか、13mmの鉛濃度と20mmの鉛濃度はほぼ同じであった。

2) 流水中の鉛濃度

流量が20L/min程度までは、流量が多くなると鉛濃度は低くなる傾向を示したが、それ以上の流量では鉛濃度は高くなった。

3) pH調整による鉛溶出低減効果

pH値を上昇させることにより、鉛製給水管からの鉛溶出は、滞留時間によりバラツキが見られたが、管口径が大きくなり、管延長が長くなるほど、低減効果が認められた。

VII. 毒性評価分科会 報告書

分担研究報告書

WHO飲料水水質ガイドライン改訂等に対応する水道における化学物質等に関する研究 ——毒性評価分科会——

主任研究者 眞柄 泰基 北海道大学大学院工学研究科 教授
分担研究者 長谷川隆一 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室長
安藤 正典 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 部長

研究の要旨

WHO飲料水ガイドラインの改訂に際して、我が国が分担することとしている1,4ジオキサン、エピクロロヒドリンおよびヘキサクロロブタジエンについてのヘルスクライテリアを作成することとした。また、ジエチルヘキシルフタル酸、ジノニルフタル酸およびビスフェノールのについての内分泌攪乱性を含めた毒性情報を整理することとした。

WHOガイドライン改訂に際して我が国担当することとなっている化学物質についてヘルスクライテリアを作成し、その改訂に際する資料を提供することが出来た。また、内分泌攪乱性を有するとされている化学物質について毒性情報を整理解析し、ガイドライン値を見直すべきかどうかを明らかにした。

A. 研究目的

WHOガイドライン改訂作業の動向を踏まえ、我が国の水道水質関連物質の毒性情報の不足している物質の抽出をおこない、調査検討を行うことを目的とする。

B. 研究方法

本研究を実施するため分担研究者を含む分科会を作成し、研究を実施することとした。

研究はWHO飲料水ガイドラインの改訂に際して、我が国が分担することとしている1,4ジオキサン、エピクロロヒドリンおよびヘキサクロロブタジエンについてのヘルスクライテリアを作成することとした。また、ジエチルヘキシルフタル酸、ジノニルフタル酸およびビスフェノールのについての内分泌攪乱性を含めた毒性情報を整理することとした。

C. 研究結果

WHO飲料水ガイドライン改訂で日本が原案作成を行った1,4-dioxane（以下 dioxane）、epichlorohydrin（以下 ECH）および1,4-hexachloro butadiene（以下 HCBd）について、各国からのコメントに対して適切に回答した。また、近年内分泌かく乱作用の疑いのもたれている化学物質の内、本年度はbisphenol A、di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)および dinonyl phthalate (DINP)の

内分泌系への毒性情報を中心に調査し、まとめると共に DEHP と DINP に関しては現時点での1日耐容摂取量(TDI)の算定を行い、bisphenol Aについては低用量影響に関してのヒトへの健康影響の可能性に関して検討を行った。

D. 考察

WHO飲料水ガイドラインおよびフタル酸類など化学物質について WHO飲料水ガイドライン改訂について、日本の担当物質の1,4-dioxane、epichlorohydrin および1,4-hexachlorobutadieneの3物質の原案を作成し、提出し、WHO専門家会議において検討されガイドライン策定のための資料と活用されるものと期待している。

また、近年内分泌かく乱作用の疑いのもたれている化学物質のうち、di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)、dinonyl phthalate (DINP)および bisphenol A について内分泌系への毒性情報から次のことが考察される。

DEHPは遺伝毒性を示さない肝発がん物質である。しかし、これはペルオキシソーム増殖作用に基づくもので、ヒトへの外挿は不適切である。DEHPのその他の主な毒性は精巣毒性と生殖毒性でこれらのラットにおける無毒性量はそれぞれ3.7 mg/kg/day および14 mg/kg/day であることから、耐容1日摂取量

(TDI)は 40-140 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ とされた。しかし、精巣毒性については、霊長類のカニ食いザルおよびマーモセットでは毒性が発現していないなど種差の著しいことから、その機構が解明されれば TDI 改訂の可能性があると考えられる。

DINP も同様に肝発がん性を示すが、DEHP の場合と同様にヒトへの外挿は不適切と考えられる。その他の毒性として、DEHP と異なり、精巣毒性および生殖毒性は認められていない。TDI の根拠としては肝障害に基づく 15 mg/kg bw/day および催奇形性試験で骨格変異に基づく 100 mg/kg bw/day が最も適切であると考えられ、その結果、肝臓への影響に基づいた 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ が最も適切であると考えられた。

bisphenolA は、妊娠 CF-1 マウスに 2 および 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の bisphenolA を投与した場合に、次世代の雄に前立腺重量増加や 1 日精子生産量減少を引き起こすことが最も低用量での影響であるが、これらの影響を否定する報告もある。2000 年に開かれた米国国家毒性計画 (NTP) での内分泌攪乱物質による低用量問題のピアレビューでは、この相反する研究の結果はいずれも科学的に妥当なものであるという評価がなされた。現状の bisphenolA の暴露量と最低影響発現量との間のマージンはそれほど大きくなく、安全を見込んで低用量域で起こるこれらの影響を有害影響として機械的に TDI 等の許容摂取量を算定することはできない。これらの低用量影響のヒト健康影響への外挿性を明にするための、発現メカニズム等のさらなる研究が必要であるものとする。

E. 結論

WHO ガイドライン改訂に際して我が国が担当することとなっている化学物質についてヘルスクライテリアを作成し、その改訂に際する資料を提供することが出来た。また、内分泌攪乱性を有するとされている化学物質について毒性情報を整理解析し、ガイドライン値を見直すべきかどうかを明らかにした。

F. 研究発表

小泉睦子、江馬眞、広瀬明彦、黒川雄二、長谷川隆一：フタル酸エステルの生殖・発生無毒量、精巣毒性の週齢差、種差および DEHP の 1 日耐容摂取量、日本食品化学学会誌、8(1)、1-10、2001

Mutsuko KOIZUMI, Yuzuru YAMAMOTO,

Yoshihiko ITO, Masao TAKANO, Tomonori ENAMI, Eiichi KAMATA and Ryuichi HASEGAWA: COMPARATIVE STUDY OF TOXICITY OF 4-NITROPHENOL AND 2,4-DINITROPHENOL IN NEWBORN AND YOUNG RATS, 26(5), 299-311, 2001

毒性情報が不足している物質の毒性評価に係わる文献調査

| | | |
|-------|-------|----------------------------|
| 分担研究者 | 長谷川隆一 | 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室長 |
| 研究協力者 | 広瀬明彦 | 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室 主任研究官 |
| 研究協力者 | 小泉睦子 | 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室 研究員 |
| 研究協力者 | 西川秋佳 | 国立医薬品食品衛生研究所・病理部室長 |
| 研究協力者 | 江馬 眞 | 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 生物試験部室長 |
| 研究協力者 | 紅林秀雄 | 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部室長 |
| 研究協力者 | 小川幸男 | 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部 主任研究官 |
| 研究協力者 | 山田雅巳 | 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 主任研究官 |

研究要旨

WHO 飲料水ガイドライン改訂について、日本の担当物質の 1,4-dioxane、epichlorohydrin および 1,4-hexachlorobutadiene の 3 物質の原案を作成し、提出した。また、近年内分泌かく乱作用の疑いのもたれている化学物質のうち、本年度は di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)、dinonyl phthalate (DINP) および bisphenol A について内分泌系への毒性情報を中心に調査し、まとめた。DEHP は遺伝毒性を示さない肝発がん物質である。しかし、これはペルオキシソーム増殖作用に基づくもので、ヒトへの外挿は不適切である。DEHP のその他の主な毒性は精巣毒性と生殖毒性でこれらのラットにおける無毒性量はそれぞれ 3.7 mg/kg/day および 14 mg/kg/day であることから、耐容 1 日摂取量(TDI)は 40-140 μ g/kg/day とされた。しかし、精巣毒性については、霊長類のカニ食いザルおよびマーモセットでは毒性が発現していないなど種差の著しいことから、その機構が解明されれば TDI 改訂の可能性があると考えられる。DINP も同様に肝発がん性を示すが、DEHP の場合と同様にヒトへの外挿は不適切と考えられる。その他の毒性として、DEHP と異なり、精巣毒性および生殖毒性は認められていない。TDI の根拠としては肝障害に基づく 15 mg/kg bw /day および催奇形性試験で骨格変異に基づく 100 mg/kg bw /day が最も適切であると考えられ、その結果、肝への影響に基づいた 150 μ g/kg/day が最も適切であると考えられた。bisphenolA は、妊娠 CF-1 マウスに 2 および 20 μ g/kg の bisphenolA を投与した場合に、次世代の雄に前立腺重量増加や 1 日精子生産量減少を引き起こすことが最も低用量での影響であるが、これらの影響を否定する報告もある。2000 年に開かれた米国国家毒性計画 (NTP) での内分泌攪乱物質による低用量問題のピアレビューでは、この相反する研究の結果はいずれも科学的に妥当なものであるという評価がなされた。現状の bisphenolA の暴露量と最低影響発現量との間のマージンはそれほど小さくなく、安全を見込んで低用量域で起こるこれらの影響を有害影響として機械的に TDI 等の許容摂取量を算定することはできない。これらの低用量影響のヒト健康影響への外挿性を明にするための、発現メカニズム等のさらなる研究の進展が望まれる。

はじめに

WHO 飲料水ガイドライン改訂で日本が原案作成を行った 1,4-dioxane (以下 dioxane)、epichlorohydrin (以下 ECH) および 1,4-hexachlorobutadiene (以下 HCBD) について、各国からのコメントに対して適切に回答した。また、近年内分泌かく乱作用の疑いのもたれている化学物質の内、本年度は bisphenol A、di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) および dinonyl phthalate (DINP) の内分泌系への毒性情報を中心に調査し、まとめると共に DEHP と DINP に関しては現時点での 1 日耐容摂取量(TDI) の算定を行い、bisphenol A については低用量影響に関してのヒトへの健康影響の可能性に関して考察を行った。

1. DEHP

DEHP の毒性としては肝がんの誘発および生殖・発生毒性が主な毒性であり、その活性本体は加水分解代謝物であるモノエステル体であると考えられている。肝がん誘発についてはげっ歯類で特異的に強く発現する毒性影響であることが証明され (Ward ら: 1998)、その結果このヒトへの外挿は不適切であると判断されている (IARC: 2000)。しかし、生殖・発生毒性のメカニズムはまだ明らかにされていないことから、最近の文献を中心に整理し、estrogen 様作用、雌雄の生殖機能への影響およびその機構並びに TDI の算定を行った (小泉ら: 2000 & 2001)。

1. 1 Estrogen 様作用

Zacharewski ら(1998)はヒト乳がん由来の培養細胞株(MCF-7)を用いた試験で、DEHP

には estrogen 様活性が認められなかったことを報告したが、Blom ら(1998)は、同様の試験系において用量依存的な estrogen 様活性を示したことを報告している。一方、Zacharewski ら(1998)は、未成熟 SD ラットを用いた *in vivo* 試験で、DEHP が子宮肥大を引き起こさないことを示した。

1. 2 精巣毒性の週齢差、種差および無毒性量(NOEL)

ラットにおける週齢差

4 および 10 週齢の Wistar ラットに 2,800 mg/kg の DEHP を 10 日間経口投与すると、それぞれ強度および中等度の精細管萎縮を生じるが、15 週齢のラットでは精巣への影響は観察されない(Gray & Butterworth: 1980)。また、Sjoberg ら(1985)は、25、40、60 日齢の SD ラットに 1,000 mg/kg/day の DEHP を 14 日間強制経口投与では、25 日齢のラットで激しい精巣の損傷を観察したが、40 および 60 日齢のラットでは精巣への影響を認められていない。SD ラットに DEHP(1,000 mg/kg/day)を単回経口投与した後の mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) 平均血清濃度-時間曲線下面積(AUC)は、25 日齢のラットの値が 40 および 60 日齢のラットの二倍であったことから、精巣毒性の週齢差は、腸管内での加水分解速度の違いを含む MEHP の吸収量の違いにより生じると考えられた。さらに、Gray & Beaman (1984)は 4、5、6、10 週齢の SD ラットから調整した Sertoli 細胞および germ cell の共培養系に MEHP を添加し、Sertoli 細胞から分離した germ cell 数を測定した結果、成熟ラットより未成熟ラットの方が多いいことを示した。Germ cell の

Sertoli 細胞からの分離は、germ cell の apoptosis が促進されたことを意味している。従って、DEHP によるラットの精巣毒性の週齢差、すなわち成長による感受性の低下は、DEHP 加水分解能の減少と MEHP 感受性の低下によって生じたと考えられる。

種差

DEHP は、ラットでは 2,800 mg/kg/day の 9 日間強制経口投与で強度の精巣萎縮を引き起こすが、ハムスターでは 4,200 mg/kg/day の 9 日間強制経口投与でさえも軽度の変化しか引き起こさない (Gray ら: 1982)。1,000 mg/kg/day の MEHP の強制経口投与はラット (5 日間) およびハムスター (9 日間) にそれぞれ強度および中等度の精巣損傷を引き起こす (Gray ら: 1982)。また、ラットおよびハムスター (4-6 週齢) の腸管内容物と DEHP を 16 時間インキュベーションすると、ラットでは 18.9% の DEHP が加水分解されたのに対して、ハムスターでは 4.1% しか加水分解を受けなかった (Gray ら: 1982)。一方、Gray & Beamand (1984) は 4 週齢のハムスターおよびラットから調整した Sertoli 細胞と germ cell の共培養系において、MEHP 添加により Sertoli 細胞から分離した germ cell 数はラットの方が多かったことを報告している。これらのことから、ラットにおける週齢差と同様に、DEHP の引き起こす精巣毒性のラットとハムスターでの違いの原因として、その加水分解能と MEHP 感受性の両方の違いが考えられる。

一方、Kurata ら (1998) はマーモセット (13-14 週齢) に 250-2,500 mg/kg/day の DEHP を 13 週

間強制経口投与した結果、精巣毒性 (精巣および副生殖器官重量低下、精巣組織学的変化、ホルモンレベルの変化等) が全く引き起こされないこと、Pugh ら (2000) は 2 歳未満の若いカニ食いザルに DEHP を 500 mg/kg/day で 14 日間投与しても精巣に変化の見られないことを報告している。さらに、¹⁴C-labeled DEHP を連続経口投与した結果、ラット (2,000 mg/kg/day で 14 日間) では放射能の 50% が尿中に排泄されたが、マーモセット (2,000 mg/kg/day で 14 日間) では 2% (Rhodes ら: 1986)、カニ食いザル (500 mg/kg/day で 21 日間) では 3.8-12.7% しか排泄されなかったこと (Astill: 1989) から、モノエステル体吸収量の違いは種差の一因であると考えられる。しかし、霊長類における MEHP の精巣感受性に関する報告はない。

精巣毒性についての NOAEL

DEHP を 37.6 mg/kg/day 以上の用量でラットに連続経口投与すると、Sertoli 細胞の空胞化が生じたため、NOAEL は 3.7 mg/kg/day となった (Poon ら: 1997)。この結果は最近報告されたラットの 104 週間混餌投与試験で精子形成欠如の増加に基づいて判断された NOAEL 5.8 mg/kg/day に近似した値である (David ら: 2000)。

1. 3 精巣毒性発現のメカニズム

精細管への影響

DEHP はモノエステル体に加水分解された後吸収されると考えられているため、この研究はモノエステル体である MEHP を用いて行われている。

FSH は Sertoli 細胞の膜受容体に結合し、G

蛋白を介して adenylate cyclase を活性化させ、cAMP を産生させることにより生理作用を発現すると考えられている。Heindel & Chapin (1989)は、ラットの培養 Sertoli 細胞において、MEHP が FSH 刺激による cAMP の蓄積を用量依存的に抑制したことから、MEHP の作用点は細胞膜または FSH 受容体そのものであると予測した。Grasso ら(1993)は、同 Sertoli 細胞を MEHP と incubation したところ、FSH 結合性の低下が認められたが、MEHP と FSH の同時存在下では FSH 結合性の低下は認められなかったことから、MEHP の作用部位は FSH 受容体よりむしろ G 蛋白であろうと推定している。しかし、その後、DEHP の FSH-cAMP 経路への作用に関する研究報告はない。

一方、DEHP は精子形成阻害を引き起こすが、その作用機構の 1 つとして Sertoli 細胞からの germ cell (gonocyte) の遊離とその結果生じる germ cell の apoptosis 誘導が考えられている。精巣では常に apoptosis による germ cell の自発的な削除が行なわれており、この germ cell の apoptosis には、Fas system が重要な役割を果たしていると考えられている (Nagata & Golstein: 1995, Nagata: 1997)。Fas system は germ cell に存在する膜レセプター蛋白である Fas、Sertoli 細胞に存在するその ligand (FasL)からなる paracrine signaling 機構で、FasL の Fas への結合により、germ cell の apoptosis が引き起こされる(図-1A)。Richburg & Boekelheide (1996)はラットに MEHP を単回経口投与し、3、6、12 時間後に Sertoli 細胞および germ cell への影響を解析した結果、germ cell の apoptosis が 3 時間後には一過性に低下したものの、6 時間以後に

は著しく増加した。また、投与後 3 時間の時点から Sertoli 細胞内で germ cell の結合維持に重要な役割を果たしていると考えられている vimentin filament の崩壊が観察された。また、Lee ら(1999)は MEHP の Fas system への影響を解析し、ラットの投与 6 時間後に精巣内 Fas mRNA および FasL mRNA の増加を示した。さらに、Richburg ら(1999)は MEHP を投与したラットの精巣において、Sertoli 細胞膜上に発現した FasL が可溶性(sFasL)となって遊離すること、および germ cell 細胞膜分画の Fas が増加することを報告している。これらの結果に基づいて、MEHP は Sertoli 細胞の vimentin filament を崩壊させることにより、germ cell を Sertoli 細胞から分離させ、Fas signal 伝達経路を崩壊させる。その後、sFasL の形成および germ cell 膜で Fas 発現が増加し、sFasL が Fas に結合することによって germ cell の apoptosis が起こるといふ仮説を立てている。

しかしながら、精細管への影響について推測されるこれら二つのメカニズムの関連性については検討されていない。

ライディッヒ細胞への影響

ラットを用いた幾つかの実験では、DEHP により血中 testosterone 濃度の低下と共に精巣 testosterone 濃度の増加が報告されているが、Agarwal ら(1989)は間質組織の線維化が引き起こされたことから、DEHP により Leydig 細胞からの testosterone の放出が抑制されたのではないかと推測している。その後、Jones ら(1993)はラットへの DEHP の経口投与により、Leydig 細胞のミトコンドリア、小胞体、ゴルジ装置などの超微細構造が変化す

ること、また、ラットから調製した培養 Leydig 細胞の LH 刺激による testosterone 分泌を MEHP が用量依存的に低下させることを示した。

1. 4 雌の生殖器系への影響

Davis ら(1994a)は、成熟雌ラットへの DEHP 2,000 mg/kg/day 以上の経口投与により、性周期の延長、排卵阻害、血中 17 β -estradiol および progesterone 濃度の低下、GTH surge の阻害が引き起こされることを示した。形態学的変化として排卵前卵胞で顆粒膜細胞面積の減少が観察され、これが血中 17 β -estradiol 濃度低下の原因と考えられた。しかし、2,000 mg/kg/day 未満の投与量では認識できる変化は報告されていない。一方、Berman & Laskey (1993) は、DEHP を経口投与した成熟雌ラットから摘出した卵巣の培養系において、生成 steroid profile (progesterone、17 β -estradiol、testosterone) が変化したが、副腎の培養系ではこのような変化は引き起こされなかったことを報告している。

排卵前の顆粒膜細胞では、FSH が cAMP を介して aromatase 活性を増加させることにより testosterone から 17 β -estradiol を生成する。Treinen ら(1990)は diethylstilbestrol の入ったカプセルを埋植したラットから調製した培養顆粒膜細胞を用いて、MEHP が FSH 刺激による cAMP 蓄積を抑制することを示した。また、Davis ら(1994b)は同じ実験系で MEHP が 17 β -estradiol の生成を低下させたが、分離した aromatase には MEHP が影響しないことを示した。その後、Davis (1999)は培養顆粒膜細胞に MEHP を

添加することにより aromatase 遺伝子の発現量が 2 分の 1 に減少する結果を得た。

以上の報告から、MEHP の標的部位は排卵前の顆粒膜細胞で、FSH の作用を阻害することにより 17 β -estradiol の合成抑制を引き起こすと考えられる。この機構が後述する DEHP の雌に対する生殖毒性の原因と推定される。一方で、DEHP の NTP 連続交配繁殖試験(RACB: Reproductive Assessment by Continuous Breeding)で雌生殖器に組織学的変化は起きないものの、検体投与群の雌と未投与群の雄との交配により、妊娠率、出産回数、生存胎児数の低下などの生殖毒性が発現している (Lamb ら: 1987)。

1. 5 生殖への影響

Lamb ら(1987)は雌雄の CD-1 マウスに DEHP を餌に混ぜて与え、同一ペアによる複数回の交配を行った。その結果、0.1% (144 mg/kg/day)以上の投与群で不妊およびペア当たりの生存児数などの生殖指標が低下した。また、0.3% (432 mg/kg/day)投与動物と無処置動物との交配を行ったところ、いずれの場合も妊娠率は著しく低下し、雌雄ともに DEHP の影響が強く発現していることが確認された。なお、この試験では病理組織学的検査や次世代の生殖機能の検討は行われていない。これらの結果から、DEHP は雌雄それぞれに作用して生殖障害を引き起こし、不妊を引き起こすことが示された。DEHP の NOAEL は 14 mg/kg/day である。

1. 6 発生毒性

DEHP を Long-Evans ラットの妊娠 1 日か

ら分娩後 21 日まで 32.5 または 325 $\mu\text{g/l}$ の濃度で飲水中に混合して与えたところ、次世代において、肝比重量が増加し、腎および精巣比重量が低下し、高用量群の児に学習能力の低下が観察された(Arcadi ら: 1998)。一方、F344 ラットの妊娠 0 から 20 日、CD-1 マウスの妊娠 0 から 17 日に DEHP を飼料中に混じて与えたところ、ラットでは 2.0 % の投与により、胚致死作用がみられたが、催奇形作用は認められなかった。マウスでは 0.10 % 以上の投与により胚致死作用が、また、0.05 % 以上の投与により水頭症、眼瞼開裂、尾奇形などの催奇形が多く観察された(Tyl ら: 1988)。

Gray ら(1999 & 2000)の DEHP (750 mg/kg/day)を SD ラットの妊娠 14 日から授乳 3 日まで投与した実験では、次世代の雄生殖器の形態的变化および持続的体重低下が認められたが、その毒性発現 profile が典型的な抗 androgen 物質である flutamide や vinclozolin とは明確に異なることが示されている。

一方、DEHP は新生児期のラット Sertoli 細胞に対して影響を及ぼす。Dostal ら(1988)は 6 日齢の SD ラットに DEHP を 1,000 mg/kg/day で 5 日間経口投与し、精巣重量の低下を伴った Sertoli 細胞数の減少を認めた。Sertoli 細胞は生後 10-14 日までに細胞分裂を終了するため、Li ら (1998)は 2 日齢の SD ラットの精巣から調製した Sertoli 細胞および gonocyte の共培養系を用いて MEHP の作用を検討した。MEHP は用量依存的な Sertoli 細胞からの gonocyte の分離を引き起こすと共に、Sertoli 細胞の増殖を抑制した。また、MEHP は FSH 刺激による Sertoli 細胞の増殖を抑制したが、MEHP の Sertoli 細胞の増殖抑制に対

する cAMP の添加効果は認められなかった。これらのことから、Li ら(1998)は新生児期ラットの Sertoli 細胞に対する MEHP の作用機構は、Sertoli 細胞の細胞分裂終了以降の場合とは異なるのではないかと考えている。

以上の結果から、Tyl ら(1988)の実験に基づいて DEHP の NOAEL は 44 mg/kg/day となる。一方で Arcadi ら(1998)の実験では、DEHP の正確な摂取量が不明な点など、試験の信頼性には疑問があると評価されている(CERHR: 2000, 厚生省: 2000)。

1. 7 DEHP の耐容 1 日摂取量(TDI)

TDI の算定は通常、動物実験で得られた最も低い NOAEL に基づいて求める。ここで取り上げた 4 つの毒性指標について、それぞれ適切な DEHP の NOAEL は、精巣毒性では Poon ら(1997)の 3.7 mg/kg/day、生殖毒性は Lamb ら(1987)の 14 mg/kg/day、発生毒性は Tyl ら(1988)の 44 mg/kg/day である。雌生殖器(卵巣)毒性に関しては高用量の投与でしか異常は確認できないことから、雌への影響は生殖毒性でしか評価できないと考えられる。これらの NOAEL を不確実係数の 100 (いずれも十分な試験条件) で割ると TDI は精巣毒性では 40 $\mu\text{g/kg/day}$ 、生殖毒性では 140 $\mu\text{g/kg/day}$ 、発生毒性では 440 $\mu\text{g/kg/day}$ となる。

一方、DEHP の毒性のうち、精巣毒性には明確な種差があり、ラットで最も強く発現し、ハムスターおよびサルでは殆ど毒性が見られていない。この種差の生じる一つの要因として腸管リパーゼ活性の違いによる MEHP 生成量の差異が考えら

れ、ヒトでも腸内リパーゼ活性は低いと考えられている(Schmid & Schlatter: 1985)。そこで、ヒトでもサルと同様に DEHP による精巣毒性の生じない可能性は高いと推定されるが、サルで精巣毒性の現れない機構が解明されるまではヒトでの精巣毒性発現の可能性は無視できないと考えられる。したがって、現時点では TDI に幅を持たせた 40 - 140 µg/kg/day (厚生省: 2000) が適切であると考えられる。

1. 8 引用文献

- 小泉睦子、江馬 眞、広瀬明彦、長谷川 隆一 (2000) フタル酸エステルの生殖および発生に対する毒性影響についての最近の研究: 主として Di(2-ethylhexyl) phthalate および Di-n-butyl phthalate について. 日本食品化学学会誌, 7, 65-73.
- 小泉睦子、江馬 眞、広瀬明彦、黒川雄二、長谷川隆一 (2001) フタル酸エステル類の生殖・発生無毒性量、精巣毒性の週齢差、種差および DEHP の 1 日耐容摂取量. 日本食品化学学会誌, 8, 1-10.
- 厚生省(2000) 厚生省生活衛生局食品化学課長通知 塩化ビニル製手袋の食品への使用について、衛化第 32 号平成 12 年 6 月 14 日.
- Agarwal DK, Lawrence WH, Turner JE, Autian J (1989) Effects of parenteral di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on gonadal biochemistry, pathology, and reproductive performance of mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, 26, 39-59.
- Arcadi FA, Costa C, Imperatore C, Marchese A, Rapisarda A, Salemi M, Trimarchi GR, Costa G (1998) Oral toxicity of bis(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in the Long-Evans rat. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 963-970.
- Astill BD (1989) Metabolism of DEHP: Effects of prefeeding and dose variation, and comparative studies in rodents and the cynomolgus monkey (CMA studies). *Drug Metab. Rev.*, 21, 35-53.
- Berman E, Laskey JW (1993) Altered steroidogenesis in whole-ovary and adrenal culture in cycling rats. *Reprod. Toxicol.*, 7, 349-358.
- Blom A, Ekman E, Johannisson A, Norrgren L, Pesonen M (1998) Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 34, 306-310.
- CERHR (2000) NTP-CERHR Expert Panel Report, October 2000 (<http://cerhr.niehs.nih.gov>).
- David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D (2000) Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicol. Sci.*, 55, 433-443.
- Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ (1994a) Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 128, 216-223.
- Davis BJ, Weaver R, Gaines LJ, Heindel JJ (1994b) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSH-cAMP stimulation in rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 128, 224-228.

- Davis BJ (1999) Endocrine disrupting activity of phthalates. International Symposium on Environmental Endocrine Disruptor '99. pp 72.
- Dostal LA, Chapin RE, Stefanski SA, Harris MW, Schwetz BA (1988) Testicular toxicity and reduced Sertoli cell numbers in neonatal rats by di(2-ethylhexyl)phthalate and the recovery of fertility as adults. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **95**, 104-121.
- Grasso P, Heindel JJ, Powell CJ, Reichert LE Jr (1993) Effects of mono(2-ethylhexyl)phthalate, a testicular toxicant, on follicle-stimulating hormone binding to membranes from cultured rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.*, **48**, 454-459.
- Gray TJB, Beamand JA (1984) Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures. *Food Chem. Toxicol.*, **22**, 123-131.
- Gray TJ, Butterworth KR (1980) Testicular atrophy produced by phthalate esters. *Arch. Toxicol., Suppl* 4, 452-455.
- Gray LE, Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DNR, Parks L (2000) Perinatal exposure to the phthalates in DEHP, BBP and DINP but not DEP, DMP or DOTP alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, **58**, 350-365.
- Gray TJ, Rowland IR, Foster PM, Gangolli SD (1982) Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicol. Lett.*, **11**, 141-147.
- Gray LE Jr., Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, Ostby J (1999) Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol. Ind. Health*, **15**, 94-118.
- Heindel JJ, Chapin RE (1989) Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation by mono(2-ethylhexyl)phthalate in primary rat Sertoli cell cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **97**, 377-385.
- IARC monographs on the-evaluation of carcinogenic risks to humans (2000) Di(2-ethylhexyl) phthalate. **77**, 41-148.
- Jones HB, Garside DA, Liu R, Roberts JC (1993) The influence of phthalate esters on Leydig cell structure and function in vitro and in vivo. *Exp. Mol. Pathol.*, **58**, 179-193.
- Kurata Y, Kidachi F, Yokoyama M, Toyota N, Tsuchitani M, Katoh M (1998) Subchronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in common marmosets: lack of hepatic peroxisome proliferation, testicular atrophy, or pancreatic acinar cell hyperplasia. *Toxicol. Sci.*, **42**, 49-56.
- Lamb JC IV, Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR (1987) Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **88**, 255-269.
- Lee J, Richburg JH, Shipp EB, Meistrich ML, Boekelheide K (1999) The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli

- cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology*, **140**, 852-858.
- Li LH, Jester WF Jr., Orth JM (1998) Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cocultured Sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **153**, 258-265.
- Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, **88**, 355-365.
- Nagata S, Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science*, **267**, 1449-1456.
- Poon R, Lecavalier P, Mueller R, Valli VE, Procter BG, Chu I (1997) Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Food Chem. Toxicol.*, **35**, 225-239.
- Rhodes C, Orton TC, Pratt IS, Batten PL, Bratt H, Jackson SJ, Elcombe CR (1986) Comparative pharmacokinetics and subacute toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in rats and marmosets: extrapolation of effects in rodents to man. *Environ. Health Perspect.*, **65**, 299-307.
- Richburg JH, Boekelheide K (1996) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **137**, 42-50.
- Richburg JH, Nanez A, Gao H (1999) Participation of the Fas-signaling system in the initiation of germ cell apoptosis in young rat testes after exposure to mono-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **160**, 271-278.
- Schmid P, Schlatter C (1985) Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in man. *Xenobiotica*, **15**, 251-256.
- Sjoberg P, Bondesson U, Kjellen L, Linqvist NG, Montin G, Ploen L (1985) Kinetics of di(2-ethylhexyl) phthalate in immature and mature rats and effect on testis. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **56**, 30-37.
- Treinen KA, Dodson WC, Heindel JJ (1990) Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation and progesterone production by mono(2-ethylhexyl) phthalate in rat granulosa cell cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **106**, 334-340.
- Tyl RW, Price CJ, Marr MC, Kimmel CA (1988) Developmental toxicity evaluation of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate in Fischer 344 rats and CD-1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **10**, 395-412.
- Ward JM, Peters JM, Perella CM, Gonzalez FJ (1998) Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice. *Toxicol. Pathol.*, **26**, 240-246.
- Zacharewski TR, Meek MD, Clemons JH, Wu ZF, Fielden MR, Matthews JB (1998) Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol. Sci.*, **46**, 282-293.

2. DINP

Diisononyl phthalate(DINP)は DEHP に比べて毒性が弱いと考えられ、DEHP の代替品として用いられている。しかし、その毒性情報は専門誌に公表されたもの以外に企業が行った多くの内部試験資料が存在している。これらの未公開資料の一部については、2000年10月に米国国家毒性計画(National Toxicology Program)の一環としてヒトの生殖リスク評価センター(Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction)がまとめて公表した評価文書(CERHR: 2000)に記載されているため、それらの情報も含めてまとめた。

DINP は2つの isononyl 基とフタル酸とのエステル体として表記されているが、実際には isononyl 基は多くの C9 の異性体からなり、混合物として製造、販売、使用されている。CAS 番号としては2つあり、製品としては3種ある。DINP-1 と呼ばれているものは CAS が 68515-48-0 で、主に 3,4-, 4,6-, 3,6-, 3,5-, 4,5 および 5,6-dimethyl-heptanol、少量の methyl octanol と iso-decanol とフタル酸とのエステル体である。DINP-2 は CAS が 28553-12-0 で主に dimethyl heptanol と methyl octanol、少量の methyl ethyl hexanol と n-nonanol とフタル酸とのエステルである。DINP-3 も CAS は 28553-12-0 で trimethyl hexanol と dimethyl heptanol の比が約 3:1 の混合物とフタル酸とのエステルであるが、現在は製造されていない。

2.1 一般毒性および発がん性

Lington ら(1997)の報告では、雌雄の F344 ラットに 0、0.03、0.3、0.6% (雄: 0, 15, 152, 307 mg/kg bw ; 雌: 0, 18, 184, 375 mg/kg bw)

の DINP を混餌で2年間与えた結果、0.3 および 0.6%群の雄で有意な体重減少、肝、腎の比重量の増加、0.6%の雄で貧血、0.3%以上の雄で軽度の肝機能障害が認められ、病理組織学的には 0.6%群の雌雄で肝細胞肥大、雄で腎尿細管の色素沈着が観察されたが、0.6%群でもペルオキシソームの増殖は見られなかった。また、単核球性白血病を除いては投与に起因する腫瘍あるいは前癌性病変の増加は認められなかった。単核球性白血病は F344 ラットに特有の病変であり、ヒトには外挿出来ないと考えられている(Caldwell: 1999)。著者は肝機能障害や貧血は単核球性白血病による二次的な影響と判断しているが、この評価を十分支持できる情報はないと考えられることから、本試験の無毒性量は 15 mg/kg bw/day と考えられた。

DINP による肝ペルオキシソームの増殖作用は、3ないし13週間の試験では0.6%以上の投与量で認められており、その作用には代謝物である monoester が関与している。Moore ら(1998a)は雌雄の F344 ラットに 0、0.05、0.15、0.6、1.2% (雄: 0, 29, 88, 358, 733 mg/kg bw ; 雌: 0, 36, 109, 442, 885 mg/kg bw) の DINP 混餌食を2年間与えた結果、0.6%以上で軽度の体重減少および肝腎の比重量の増加、肝細胞肥大、尿細管上皮の色素沈着(雌雄)、腎乳頭の鉍質沈着(雄)の頻度が増加した。なお、DINP を78週投与後基礎食に切り替えさらに26週間観察した結果、これらの病変は対照レベルまでに回復した。腫瘍性病変は1.2%の雄で肝細胞がん、雌雄で肝細胞腺腫の発生頻度が有意に増加し、雄の0.6%以上で腎腫瘍の増加がみられた。この腎腫瘍は免疫組織学的手法を用いて

$\alpha_2\text{U-globulin}$ との複合体が沈着した結果であることが証明されている(Caldwell ら: 1999)。また、肝腫瘍については、DEHP と同様に PPAR α を介したペルオキシソーム増殖作用に由来する機構と考えられる。DEHP の場合はすでに、PPAR α ノックアウトマウスに 1.2 % の DEHP を 24 週間混餌投与して肝に毒性病変が認められず(Ward ら: 1998)、この肝腫瘍はヒトへ外挿出来ないと評価されていることから、DINP の場合も同様にヒトで肝腫瘍の生じる可能性は非常に少ないと考えられる。一方、雌では 0.15 % でも有意な血液、血清生化学的変動(赤血球数、血糖値の減少、ヘマトクリット、MCH、AST、アルブミン、グロブリンの増加)が認められており、無毒量は 36 mg/kg bw/day が適切と考えられる。

Moore ら(1998b)は雌雄の B6C3F1 マウスに 0、500、1500、4,000、8,000 ppm (雄: 0、90、276、742、1,560 mg/kg bw; 雌: 0、112、336、910、1,888 mg/kg bw) DINP 混餌飼料を 2 年間与えた結果、雌雄の 4,000 ppm 以上で体重減少、体重増加の抑制、雄の 4,000 ppm 以上および雌の 1500 ppm 以上で肝細胞癌、肝の色素沈着が増加、雌雄の 1500 ppm 以上で腎重量の増加がみられた。これらの結果から NOAEL は 112 mg/kg bw と判断されている。

Cynomolgus monkey に DINP、DEHP それぞれ 500 mg/kg bw、clofibrate 250 mg/kg bw を 14 日間胃内投与した結果では、いずれの化合物も肝、腎重量、肝のペルオキシソームベータ酸化、ギャップ細胞間連絡、複製 DNA 合成、その他肝、腎、精巣の病理所見に明らかな影響を与えなかった(Pugh ら: 2000)。

DINP のエストロゲン活性については、エストロゲンレセプターへの結合性、

MCF-7 細胞を用いた増殖試験、子宮肥大試験では陰性であるが、酵母でのスクリーニング試験では弱陽性(estradiol の 1,000,000 倍濃度で 15 % 程度の活性)を示した。

2. 2 遺伝毒性

DINP はエームス試験、マウスリンフォーマ試験、ラット初代培養肝細胞を用いた UDS 試験、BALB/C-3T3 マウス細胞を用いた形質転換試験でいずれも陰性、マウス骨髄を用いた *in vivo* の染色体異常試験では最高用量が 5 mg/kg bw と低い陰性であり、非遺伝毒性物質と考えられる。

2. 3 精巣毒性評価の評価

げっ歯類での毒性試験ではすべて DINP-1 が用いられ、幼若 F-344 ラットに混餌投与した 21 日試験(BIBRA: 1985)あるいは 2 つの 2 年間試験(Lington ら: 1997, Moore: 1998a)、および B6C3F1 マウスに 2 年間混餌投与した試験(Moore: 1998b)が行われているが、いずれも精巣に対する毒性は認められていない。一方、成熟マーモセットを用いた試験では協和発酵製造の混合物成分不明の DINP を用い、2,500 mg/kg/day で 13 週間強制経口投与し(Hall ら: 1999)、2 才のカニ食いザルを用いた試験では DINP-1 を 500 mg/kg/day で 2 週間強制経口投与した(Pugh ら: 2000)。これらの霊長類の試験でもいずれも精巣に対する毒性は認められていない。

以上のことから、DINP は通常の暴露ではヒトに対しても精巣毒性を発現する可能性は極めて低いと考えられる。

2. 4 生殖毒性および発生毒性

生殖毒性としては、パイロット試験として行われた DINP の SD ラットにおける 1 世代試験は 0.5、1.0 及び 1.5 % の混餌投与で行われ、交配、受胎及び出産児数等の生殖指標にはいかなる影響も認められなかった。また、DINP-1 (CAS No. 68515-48-0, > 99.7 % pure, Exxon Chem. Co.) の SD ラットにおける 2 世代試験は 0.2、0.4 および 0.8 % の混餌投与で行われ、同様に全ての生殖指標への影響は認められなかった。したがって、生殖毒性に関する無毒性量は 1 世代試験では 660-800 mg/kg/day、2 世代試験では 950 - 1,650 mg/kg/day となる。なお、両試験では発育中の体重増加抑制や、肝及び腎の組織学的変化が認められている (Waterman ら: 2000)。以上のように、DINP の生殖毒性に関しては、いずれの試験でも毒性発現は認められていない。

発生毒性としては、DINP-1 (CAS No. 68515-48-0, > 99.7 % pure, Exxon Chem. Co.) を SD ラットの妊娠 6-15 日に 100、500 及び 1,000 mg/kg/day で強制経口投与した実験では、胎児には骨格変異 (はん痕様腰肋及び頸肋) 及び腎盂拡張がみられ、著者らは母体毒性及び発生毒性の無毒性量はともに 500 mg/kg/day と判断した (Waterman ら: 1999)。しかし、CERHR の専門家会議では統計計算の再検討を著者らとともにに行い、発生毒性の無毒性量を 100 mg/kg/day と結論した (CERHR: 2000)。この結論は骨格変異の発現頻度から適切な結論と考えられる。

DINP-1 (CAS No. 68515-48-0, > 99 % pure, Commercial origin.), DINP-2 (CAS No. 28553-12-0) または DINP-3 (CAS No. 28553-12-0) を Wistar ラットの妊娠 6-15 日に

40、200 及び 1,000 mg/kg/day で強制経口投与した実験において、母体毒性として 1,000 mg/kg 群で DINP-1 の投与により、妊娠ラットの摂餌量低下及び肝相対重量増加、DINP-3 の投与により妊娠ラットの摂餌量低下、体重増加抑制及び肝相対重量増加が認められたが、DINP-2 の投与では母体毒性は観察されなかった。胎児については DINP-1、DINP-2 及び DINP-3 のいずれの投与でも 1,000 mg/kg 群において骨格または内部器官の変異または化骨遅延を有する胎児の頻度の上昇がみられた。200 mg/kg 以下の投与ではいずれの DINP 投与でも母体及び胎児に対する投与の影響は観察されなかった。これらの結果から、母体毒性及び発生毒性の無毒性量をともに 200 mg/kg/day と結論した (Hellwig ら: 1997)。

上述の Waterman ら (2000) の 2 世代試験の出生児の離乳前に全ての群で体重増加抑制が観察されている。低体重は低用量群の 0.2% では生後 21 日の雌雄に一時的に認められたのみであるが、この用量を最小毒性量 (143-285 mg/kg/day) としている (CERHR: 2000)。

以上の情報から、DINP の発生毒性の無毒性量は 100 mg/kg/day が適切であると考えられる。

2. 5 雄生殖器の形態異常誘発

750 mg/kg bw/day の DINP-1 を妊娠 14 日から分娩後 3 日まで SD ラットに強制経口投与した結果、精巣萎縮、精巣上体無発育、乳頭および乳輪保持を含む生殖器異常が雄新生児で観察された (Gray ら: 2000)。DEHP および BBP (n-butyl benzyl phthalate) についても同様の試験が行われ、観察された生殖異常の種類

は類似していたが、その頻度については DINP 投与群(7.7%)では DEHP(82%)や BBP 投与群(84%)と比較して非常に低かった。Ostby ら(2001)は 1,000 mg/kg bw /day および 1,500 mg/kg bw /day の DINP-1 を用いて、同様の試験を行った。その結果、13 日齢ではそれぞれ 55%および 75%の新生児に乳輪が、また、1,500 mg/kg bw/day 投与群の雄新生児では肛門-生殖器間距離の減少が観察された。これらのことから、DINP は弱いアンドロゲン様作用を示すことが示唆された。

2. 6 1 日耐容摂取量の算定

TDI の算定の基になる無毒性量は、Lington ら(1997)の 2 年間混餌投与試験で肝障害に基づく 15 mg/kg bw /day および Waterman ら(1999) の催奇形性試験で骨格変異に基づく 100 mg/kg bw /day が最も適切であると考えられる。両試験ともに十分な試験条件で行われていることから、不確実係数の 100 を適用し TDI はそれぞれ 150 µg/kg/day および 1 mg/kg/day となる。

DEHP の TDI は精巣毒性および生殖毒性に基づいて決定された (厚生省: 2000)。精巣毒性は DEHP の場合、ラットにかなり低用量を投与しても認められたが、DINP の場合にはラットおよび霊長類への投与で全く毒性が認められていないことから、ヒトで DINP の精巣毒性発現の可能性はほとんどないと考えられる。生殖への影響に関しても同様に全く毒性が認められていない。これらの点で、DEHP と DINP の毒性発現は著しく異なっているものと考えられる。一方、高用量を長期間

投与すると DEHP の場合と同様に肝ペルオキシソーム増殖を伴った肝腫瘍が発現する。しかし、DEHP の場合はすでに PPAR α ノックアウトマウスで肝に毒性病変が認められないことから(Ward ら: 1998)、この肝への影響はヒトへ外挿出来ないと評価されている。したがって、DINP の場合も同様にヒトで肝腫瘍の生じる可能性は非常に少ないと考えられる。

以上の結果、DINP の TDI はラットの長期毒性試験における肝への影響に基づいた 150 µg/kg/day が最も適切であると考えられた。

2. 7 引用文献

- BIBRA (1985) A 21-day feeding study of diisononyl phthalate to rats: effects on the liver and liver lipids. Unpublished Laboratory Report, Report No 0495/6/85, from the British Industrial Biological Research Association submitted to Chemical Manufacturers Association.
- Caldwell DJ (1999) Review of mononuclear cell leukemia in F-344 rat bioassays and its significance to human cancer risk: A case study using alkyl phthalates. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **30**, 45-53.
- Caldwell DJ, Eldridge SR, Lington AW, McKee RH (1999) Retrospective evaluation of alpha 2u-globulin accumulation in male rat kidneys following high doses of diisononyl phthalate. *Toxicol. Sci.*, **51**, 153-160.
- CERHR (2000) NTP-CERHR Expert Panel Report, October 2000

- (<http://cerhr.niehs.nih.gov>).
- Gray LE, Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DNR, Parks L (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, **58**, 350-365.
- Hall M, Matthews A, Webley L, Harling R (1999) Effects of di-isononyl phthalate (DINP) on peroxisomal markers in the marmoset - DINP is not a peroxisome proliferator. *J. Toxicol. Sci.*, **24**, 237-244.
- Hellwig J, Freuderberger H, Jäckh R (1997) Differential prenatal toxicity of one straight-chain and five branched-chain primary alcohols in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **35**, 489-500.
- Lington AW, Bird MG, Plutnick RT, Stubblefield WA, Scala RA (1997) Chronic toxicity a carcinogenic evaluation of diisononyl phthalate in rats. *Fundam Appl. Toxicol.*, **36**, 79-89.
- Moore MRCL (1998a) Oncogenicity study in rats with di(isononyl)phthalate including ancillary hepatocellular proliferation and biochemical analyses. Covance 2598-104 Volume 1 of 5. Vienna, VA: Aristech Chemical Corporation.
- Moore MRCL (1998b). Oncogenicity study in mice with di(isononyl)phthalate including ancillary hepatocellular proliferation and biochemical analyses. Covance 2598-105 Volume 1 of 6. Vienna, VA: Aristech Chemical Corporation Performing Laboratory.
- Ostby JS, Hotchkiss AK, Furr JR, Gray LE Jr. (2001) Investigation of the ability of diisononyl phthalate (DINP) to alter androgen-dependent tissue development in Sprague-Dawley rats. Abstract ID: 1070 in 41th Annual Meeting of Society of Toxicology.
- Pugh G Jr, Isenberg JS, Kamendulis LM, Ackley DC, Clare LJ, Brown R, Lington AW, Smith JH, Klaunig JE (2000) Effects of di-isononyl phthalate, di-2-ethylhexyl phthalate, and clofibrate in cynomolgus monkeys. *Toxicol. Sci.*, **56**, 181-188.
- Ward JM, Peters JM, Perella CM, Gonzalez-FJ (1998) Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice. *Toxicol. Pathol.*, **26**, 240-246.
- Waterman SJ, Ambroso JL, Keller LH, Trimmer GW, Nikiforov AI, Harris SB (1999) Developmental toxicity of di-isodecyl and di-isononyl phthalates in rats. *Reprod. Toxicol.*, **13**, 131-136.
- Waterman SJ, Keller LH, Trimmer GW, Freeman JJ, Nikiforov AI, Harris SB, Nicolich MJ, McKee RH (2000) Two-generation reproduction study in rats given di-isononyl phthalate in the diet. *Reprod. Toxicol.*, **14**, 21-36.

3. Bisphenol A

Bisphenol A はこれを原料としたポリカーボネート、エポキシおよびポリスチレン樹脂等から高温処置等で容易に溶出されるという性質から、これらの樹脂を使用した際の食品等への溶出や金属製の缶のエポキシコーティングからの溶出により直接ヒトに暴露される可能性が高く、健康に対する影響が懸念される物質の一つである。一般毒性に関しては、米国の EPA の

IRIS(Integrated Risk Information System)プログラムにおいて1993年に評価がなされており、NTP(National Toxicology Program)(1982)の報告に基づき、ラットへの103週間の混餌投与試験における1000 ppm(50 mg/kg/dayに相当)群での体重増加抑制をLOAELと位置づけ、この値をもとに、種差と個体差およびLOAELであること考慮した不確実係数にそれぞれ10を適用し、総合的な不確実係数1000で割った値:50 μ g/kg/dayをヒトの経口摂取に対するRfD(Reference Dose)として設定している。

しかし、近年報告されているの内分泌系への影響は、このTDIに相当するRfDよりも低い用量で現れており、内分泌攪乱物質の低用量影響として活発な議論や研究が行われている。そこで、この低用量影響を含むbisphenol Aによる内分泌攪乱影響に関する情報をまとめ、ヒト健康へ及ぼす可能性について考察した。

3.1 in vitro系におけるエストロゲン様活性

in vitro系で行われた最初の実験報告は、酵母の培養液中に存在するヒト乳腺

がん由来の細胞(MCF-7)のプロゲステロン受容体を誘導する物質の検索過程において、培養容器のポリカーボネートから溶出するbisphenol Aが同定されと共に、エストロゲン受容体と結合部位を競合することが明らかにされたというものである。その後様々な系を用いて検証が行われており、Table1にはエストロゲンレセプターとの親和性や、MCF-7の細胞増殖活性、エストロゲンレセプターの活性化によって誘導される遺伝子産物の産生量、レポーター遺伝子を使用したエストロゲンレセプターの活性化能などに関して、陽性対照に対する相対活性をまとめた。その結果、エストラジオールあるいはエストロンに対する相対的な活性の強さは1,000~100,000分の1の範囲で、ほとんどの報告は、数千から1万分の1の間に集中していた。このことから、レセプターレベルの反応に関しては、bisphenol Aはエストラジオールの3~4桁低い活性を持つことが推測される。また、ラット・マウスあるいはヒト由来レセプターを用いた系で得られる値に大きな違いが認められないことより、レセプターとbisphenol Aとの反応レベルにおいては、ラット・マウスとヒトにおいて大きな感受性の違いは存在しないと考えられる。

3.2 出生後の雌動物に対する影響

bisphenol Aによる最初エストロゲン作用の報告は、子宮摘出ラットに170 mg/kg/dayで、3日間皮下投与したときに持続性発情期が引き起こされたというものである(Dodds and Lawson, 1936)。その後、様々な用量を用いて試験が行わ

れ、子宮重量増加、膣開口促進、性周期の乱れ等が0.1~800mg/kgの用量範囲で観察されている。しかし、これらの影響は、Table2に示すように同様の用量が投与された場合でも観察されないこともある(Table中で括弧書きで示された用量は、影響が現れていないことを示している)。たとえば、未成熟雌Alpk:APラットを用いた系では、3日間の皮下および経口投与を行った結果、400~800mg/kg/dayの用量で子宮重量の増加が確認され、600mg/kg/day以上の高用量で膣開口が認められている(Asbyら:1998)が、未成熟雌ラットSDを用いた別の実験では、5~150mg/kg/dayの用量で3日間経口投与した結果、子宮重量の増加は150mg/kgでも認められなかった(Gouldら:1998)。

一方、影響発現の用量依存性については10mg/kg以上の用量で得られた陽性の結果では、概ね正の用量相関関係が確認されているが、離乳直後CD-1マウスを使用した系では、最低用量(0.1mg/kg)と最高用量(100mg/kg)でのみ、有意な子宮重量の増加が観察されるという逆U字型の用量反応曲線が、変化の割合は小さいものの認められている(Markeyら:2001)。

また、卵巣摘出したSD及びF344ラットを使用した系では、子宮重量増加や血清プロラクチン量の増加反応に関して種差のあることが観察されており、SDラットよりF344ラットの方が感受性の高いことが示されている(Steinmetzら:1997)。しかし、この感受性の違い

はbisphenolAに限定されたものではなく、陽性対照としたエストラジオールに対する感受性の違いも同様に観察されている(Steinmetzら:1998)。

3.3 出生後の雄動物に対する影響

出生後の雄動物に対する報告は雌ほど多くないが(Table3)、10mg/kg以上で各種生殖器官の重量変化や組織学的な異常が観察されている。しかし、雌での子宮重量増加のような統一的な影響は報告されていなく、Alpkラットへの100~200mg/kg投与時みられるように生殖器官重量に変化の認められないケースもある(Asbyら:2000)。また、投与期間が異なるので、一概に比較することはできないが、高用量(950mg/kg)での前立腺重量減少(Takahashiら:2001)に対して、50mg/kg未成熟Wistarラットに投与では、外側葉のみであるが前立腺の重量が増加しており(Stokerら:1999)、投与量の違いにより、影響の現れ方が異なることを示している。

一方、1日精子生産量の減少が、この後に示す次世代へ影響だけではなく、成熟SDラットにおいても、20 μ g/kg以上の投与で観察されることが報告されている。しかし、用量依存性に注目してみると、20 μ g/kgで1日精子生産量が有意に約20%減少しているものの、それ以上の用量での減少率も200mg/kgまで同程度で推移し、影響は頭打ちになっていた(Sakaueら:2001)。

3.4 次世代への影響