

ると染色体構造異常の誘発作用が認められた。マウス・リンフォーム培養細胞を用いた遺伝毒性試験では、結果は陰性であったが、S9mix存在下で溶解限度を超えると遺伝毒性の誘発作用が認められた。In vivoでのマウスの小核試験で投与可能な最高投与量での結果が陰性であったことから、本化学物質はin vivoでは遺伝毒性を発現しないと考えられた。発がん性に関する有効な情報はなかった。

#### 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA) (868-77-9) (ICCA日本企業作成) (SIAM 13)

本化学物質は塗料、接着剤、コーティング剤、歯科用接着剤等に含まれる合成ポリマーのモノマーとして使用される。In vitroでは1日で80%以上が加水分解される。In vivoでのトキシコキネティクスに関する情報はない。

急性毒性は弱く、急性毒性試験では、経口LD<sub>50</sub>は4,000 mg/kg以上、経皮LD<sub>50</sub>は3,000 mg/kg以上であった。

ウサギの皮膚に対して弱い刺激性がみられた。ウサギの眼に対して中程度の刺激性がみられ、モルモットの皮膚に対して弱い感作性を示したが、フロイント・アジュバントの注入でのみ陽性を示し、本化学物質の単独塗布では感作性は認められなかった。ヒトの皮膚でのパッチテストで感作性が示され、他のアクリル酸塩との交差反応の可能性が考えられた。

本化学物質はメタクリル酸とエチレングリコールに加水分解される。他のアクリル酸塩及びメタクリル酸塩では、methacrylic acid (MAA) (SIAM 11で議論)へ加水分解された後、吸入による鼻腔の損傷が報告されている、この影響はHEMAについては調べられていない。

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (OECD TG 422) では、雄ラットには交配の14日前から49日間、雌ラットには交配前14日間から哺育3日まで、それぞれ0, 30, 100, 300, 1,000 mg/kg/dayを強制経口投与した。雄では1,000 mg/kg/dayで流涎がみられ、1/12が死亡した。1,000 mg/kg/dayで体重増加抑制、摂餌量減少がみられた。すべての投与群で血液学検査の各検査項目に投与による影響はみられなかった。血液生化学検査では30 mg/kg/day以上で尿素窒素の高値あるいはその傾向、1,000 mg/kg/dayでカリウム、塩素及び無機リンの高値及びトリグリセライドの低値がみられた。剖検では各投与群とも投与による影響はみられなかった。死亡例では胸腺及び肺の暗赤色化、副腎の肥大がみられた。100 mg/kg/day以上で腎臓の絶対重量の高値、1,000 mg/kg/dayで肝臓の絶対重量の高値がみられた。病理組織学的検査では、1,000 mg/kg/dayで腎臓に尿細管拡張及び集合管拡張がみられた。雌では1,000 mg/kg/dayで流涎、自発運動の低下、腹臥位、流涙、被毛の汚れ、表皮温下降及び呼吸緩徐がみられ、6/12が死亡した。1,000 mg/kg/dayで交配前投与期間の体重増加抑制及び摂餌量減少がみられた。剖検所見では1,000 mg/kg/dayで胸腺の萎縮及び副腎の肥大がみられた。100 mg/kg/day以上で腎臓の絶対重量の高値あるいはその傾

向、1,000 mg/kg/dayで腎臓の絶対・相対重量の高値がみられた。病理組織学的検査では1,000 mg/kg/dayで腎臓の髄質及び乳頭部への好中球湿潤、延髄の広範な軟化がみられた。雄での100 mg/kg/dayにおける腎臓の相対重量の増加、雌での100 mg/kg/dayにおける腎臓の絶対重量の増加を根拠に、ラットにおける反復経口投与のNOAELは30 mg/kg/dayと考えられた。

上述の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験においては生殖発生毒性に関するいずれの指標にも本化学物質投与の影響は認められなかったことから、ラットにおける生殖発生毒性のNOAELは1,000 mg/kg/dayと判断された。

細菌を用いた復帰突然変異試験の結果はS9mix存在下及び非存在下のいずれでも陰性であった。チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験は代謝活性の存在下及び非存在下で陽性であった。In vivoでのラットの試験で投与可能な最高投与量での結果が陰性であったことから、本化学物質はin vivoでは遺伝毒性を発現しないと考えられた。

発がん性に関する情報はなかった。

#### 1,3-Bis(aminomethyl) benzene (1477-55-0) (ICCA日本企業作成) (SIAM 13)

本化学物質は主に、エポキシ樹脂硬化剤、ポリウレタン、有機合成などに使用される。

トキシコキネティクスに関する情報はなかった。溶液はアルカリ性で、腐食性がある。

単回経口投与毒性試験 (OECD TG 401) では、ラットでの経口LD<sub>50</sub>は1,090 mg/kg (雄)、980 mg/kg (雌)、マウスでの経口LD<sub>50</sub>は1,180 mg/kgであった。ラットでの急性吸入毒性のLC<sub>50</sub> (4 h)は1.42 mg/L以上 (雄)、0.8 mg/L (雌)であった。毒性は接触部位における腐食性によるもので、経口/吸入毒性では消化管/呼吸器系障害であった。

皮膚腐食性 (ラットとマウス) 及び感作性 (モルモット) が認められた。

28日間反復経口投与毒性試験 (OECD TG 407) に準拠した化審法ガイドラインの28日間反復経口投与毒性試験に従い、雌雄ラットに28日間、それぞれ0, 10, 40, 150, 600 mg/kg/dayの用量を強制経口投与した。動物数は1群雌雄各6匹とし、7群を設け、5群は投与終了後屠殺群、2群は対照及び600 mg/kg/dayの14日間回復群とした。10, 40, 150 mg/kg/dayでは被検物質の投与に起因する変化は認められなかった。600 mg/kg/dayでは、流涎、自発運動の低下、立毛、腹部膨満などの症状が雌雄に、摂餌量の減少及び体重増加の抑制が雄に認められ、雄の1例及び雌の4例が死亡した。さらに、胃の前胃粘膜に潰瘍及び角化亢進を伴う上皮の過形成、骨髄に顆粒球系造血細胞の増加、副腎に皮質細胞の肥大・空胞化、盲腸の拡張が雌雄に、白血球好中球比、尿タンパク及び血清無機リンの増加、血色素量及びヘマトクリット

値の減少, プロトンピン時間の延長, 活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮が雄に, トリグリセライドの増加が雌に認められた. 回復期間後には, 前胃部粘膜の変化は回復傾向を示し, その他の変化はいずれも回復した. この28日間投与試験からはNOAELは150 mg/kg/dayと考えられた.

雌雄ラットに少なくとも41日間, それぞれ0, 50, 150, 450 mg/kg/dayの用量を強制経口投与した簡易生殖毒性試験(OECD TG 421)によると, 150 mg/kg/dayの雄1例及び450 mg/kg/dayの雄3例, 雌1例が死亡した. 被検物質投与による症状として, 150 mg/kg/dayの雄及び450 mg/kg/dayの雌雄で流涎, 鼻音, 不整呼吸, 腹部膨満及び鼻分泌物が認められた. また, 450 mg/kg/dayの雌雄で体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた. 病理組織学的検査では投与の直接作用によると考えられる前胃の潰瘍, 角化亢進を伴った扁平上皮増生等が450 mg/kg/dayの雌雄に認められた. なお, 生殖器系には投与に起因する所見は観察されなかった.

経口投与簡易生殖毒性試験(OECD TG 421)によるNOAELのほうが低いことから, ラットにおける反復経口投与のNOAELは50 mg/kg/dayとされた.

上述の経口投与簡易生殖毒性試験では, 生殖発生毒性に関するいずれの指標にも本化学物質投与の影響は認められなかったことから, ラットにおける生殖発生毒性のNOAELは450 mg/kg/dayと考えられた.

細菌を用いた復帰突然変異試験の結果はS9mix存在下及び非存在下のいずれでも陰性であった. チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験では, いずれの連続処理及びS9mix存在下及び非存在下のいずれの短時間処理

でも染色体の構造異常及び倍数体の誘発は観察されなかった. 染色体異常試験は陰性と判断された.

発がん性に関する情報はなかった.

製造工場の労働者における臨床観察の結果, この物質は胃腸への刺激性を持ち, また, 0.1 mg/m<sup>3</sup> (米国の職業閾値限界) 以下の濃度で労働者に接触感作反応を引き起こすことが示されている.

#### おわりに

本稿では, 第12回及び第13回初期評価会議で合意された日本担当の6物質についての, ヒトへの健康影響部分を紹介した. SIAMで合意された物質については, 初期評価文書が出版されたのち, インターネットのOECD webサイト (<http://cs3-hq.oecd.org/scripts/hpv/>) で報告書の入手が可能である.

#### 引用文献

- 1) Hasegawa, R., Nakadate, M. and Kurokawa, Y.: *J. Toxicol. Sci.*, 24, app.11-19 (1999)
- 2) Hasegawa, R., Kamata, E., Hirose, A., Kanno S., Hukuma, K., Takatsuki, M., Nakadate, M. and Kurokawa, Y.: *J. Toxicol. Sci.*, 24, app.85-92 (1999)
- 3) Hasegawa, R., Koizumi, M., Kamata, E., Hirose, A., Kanno S., Takatsuki, M., and Kurokawa, Y.: *J. Toxicol. Sci.*, 25, app.83-96 (2000)
- 4) Hasegawa, R., Koizumi, M., Hirose, A., Sugawara N., and Kurokawa, Y.: *J. Toxicol. Sci.*, 26, app.35-41 (2001)

## 生殖発生毒性を指標としたダイオキシンの耐容1日摂取量 (TDI) 算定の考え方について

総合評価研究室 広瀬明彦, 江馬 眞

The recent TDI derivation of the dioxin based on the reproductive and developmental toxicity.

Akihiko Hirose and Makoto Ema

Division of Risk Assessment

### SUMMARY

In 1998, WHO-IPCS re-assessed the TDI of dioxin, which was derived from the body burdens of TCDD exposed to the experimental animals. Then, the international assessment agencies and governmental assessment agencies have conducted the dioxin fs health assessment using the similar method to the WHO-IPCS approach. The key endpoints were reproductive and developmental toxicity caused by *in utero* and lactational exposure. Each assessment agencies used the similar data set of the toxicity studies, however, there are some differences about the TDI derivation method and the selection of adverse endpoints. This report reviewed the recent reproductive and developmental toxicity studies of the dioxins and summarized the health assessment in the international or governmental agencies, and discussed the appropriate TDI derivation.

Key Word: dioxin, tolerable daily intake, reproductive and developmental toxicity

### はじめに

1998年にWHO-IPCSが、ダイオキシンの体内蓄積性を考慮して体内負荷量という概念を用いて、耐容1日摂取量(TDI)の再評価を行った<sup>1)</sup>。我が国でも1999年に、体内負荷量を基にしてTDIの設定を行っている<sup>2)</sup>。これ以前は、発がん性を感受性の高いエンドポイントとしてTDIを設定していたが、この体内負荷量という物差しを用いることにより、胎児期及び授乳暴露による次世代への影響がより感受性の高い毒性指標となることが明らかになった。その結果、これ以降はヨーロッパ各国やJECFAなどの評価機関では、この評価法に従い耐用摂取量評価を算定してきている。本研究では、この評価法の重要なエンドポイントであるダイオキシン類による生殖発生毒性に関して、1998年以降の新しい知見と、各国および国際評価機関でのTDI算定経過をまとめると共に、現時点での適切なTDIのあり方について考察した。

### 体内負荷量とTDI

まず、体内負荷量を用いたTDIの算定法について概略を示す。一般に化学物質の耐用摂取量は、最も感受性の高い毒性学的エンドポイントを基に算定される。ヒトを対象とした定量的で信頼性の高い疫学研究などの知見がある場合はそれを用いるが、通常は疫学上の交絡因子を完全に排除することは難しく、動物実験における化学物質の投与用量を基に、ヒトにおける耐用摂取量を算出している。1990年代の前半頃まではダイオキシンに関して最も感受性の高い毒性は、げっ

歯類に対する発がん性であると考えられており、評価機関の多くは、ラットを用いた2年間の長期投与試験における無毒性量(NOEL):1ng/kg/dayを基に、不確実係数(多くは100)を適用して耐容1日摂取量を設定していた。しかし、1998年のWHO-IPCS<sup>1)</sup>での評価以後は、ダイオキシン類のように脂溶性が高く、排泄が遅い物質は、長い時間をかけて徐々に体内に化学物質が蓄積していくことや、ヒトとラットでは数百倍も排泄速度が異なることから、投与量と蓄積濃度(=体内負荷量)と関係はヒトとラットで著しく異なることになり、投与量をベースにして毒性発現を比較するのは適当ではないと判断された。また、ダイオキシン類による毒性発現は蓄積量である体内負荷量に依存して発現していることが示され、近年は、この体内負荷量を基に定量的な毒性評価を行うようになった。この体内負荷量という物差しを用いることにより、従来の発がん性よりも、胎児期及び授乳期暴露による次世代への影響がより感受性の高い毒性指標となることが明らかになった。この際、摂取量と体内負荷量との換算は、1コンパートメントモデルの定状態における、以下の近似式で示すことができる。

$$\text{摂取量(ng/kg/day)} = [\text{体内負荷量(ng/kg)} \times \ln(2)] / [\text{半減期(day)} \times \text{吸収率}]$$

また、ヒトや実験動物に関する様々な知見より、ヒトと実

験動物では同じ体内負荷量で毒性が発現すると判断されている。したがって、TDIを求めるには、まず動物実験において最も低い体内負荷量で発現するエンドポイントを選定し、その体内負荷量においてはヒトでも同様の影響が現れると仮定する。その後、上記の式からその体内負荷用に相当するヒトにおける1日摂取量を算出し、この値に対して不確実係数を適用して、TDIを算定するという手順を踏むことになる。

#### ダイオキシン類による生殖発生毒性

1998年以降に公表された2,3,7,8-四塩化ジベンゾパラジオキシン(TCDD)の生殖発生毒性に関する論文の内容について検討した(Table 1)。

SDラットの妊娠15日に200または1000 ng/kgのTCDDを単回強制経口投与したところ<sup>3)</sup>、両TCDD投与群で母体体重が低下し、1000 ng/kg投与群では出生児数の減少がみられたが、雄児の成長にはTCDD投与の影響は観察されなかった。雄児の生後30日において1000 ng/kg投与群で17-ヒドロキシラーゼ活性及び精巣上体重量の低下、生後45日に精巣の3β-及び17β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、5α-リダクターゼ活性上昇及び血清中アンドロゲン濃度の低下が認められた。

Holtzmanラットの妊娠15日に250 ng/kgのTCDDを単回強制経口投与した<sup>4)</sup>ときには、TCDD投与の雄児に精巣上体精子数の減少、前立腺重量の低下が観察されたが、肛門生殖突起間距離(AGD)、性成熟、精巣の1日精子産生、精巣重量及び前立腺を除く副生殖器重量にTCDD投与の影響は認められなかった。

Holtzmanラットの妊娠15日に1000 ng/kgのTCDDを単回強制経口投与した<sup>5)</sup>ところ、投与後4日の雌胎児でミューラー管尾部の間充織の肥厚、ミューラー管癒合の阻害、ウラルブ管退行の阻害が観察され、これらが永久的なvaginal thread(膣糸)の原因であることが示唆された。

Long Evansラットの妊娠15日に1000 ng/kgのTCDDを単回強制経口投与し<sup>6)</sup>、雄児の精囊について調べた。雄児体重及び精囊重量には生後32日までTCDD投与群と対照群との間に差はみられなかったが、49日以降ではTCDD投与群において低下が認められた。TCDD投与群では精囊上皮の分岐及び分化を低下させることによって、精囊の発生を傷害することが示唆された。

Syrianハムスターの妊娠11.5日に2000 ng/kgのTCDDを強制経口投与した<sup>7)</sup>ところ、母体の生存率及び体重、児数にTCDD投与の影響はみられなかったが、TCDD投与群のF1児の体重増加抑制、膣開口遅延、膣性周期の変化が認められた。雌F1では陰核の完全分裂が観察されたが、vaginal threadは観察されなかった。雌F1を無処置の雄と交配させたところ、TCDD投与群で妊娠率低下し、妊娠ハムスターの死亡率上昇、分娩生存児数減少、離乳率低下が観察された。これ

らの結果から、妊娠母体に有害な作用を示さない投与量のTCDDが雌児の成長、繁殖機能、生殖器の形態に悪影響を及ぼすことが明らかになった。

雌Wistarラットに25、60または300 ng/kgのTCDDを交配前2週に皮下投与し、交配前、交配中、妊娠中及び授乳中を通じて、5、12または60 ng/kgのTCDDを週1回皮下投与した<sup>8)</sup>。300/60 ng/kg投与群で母ラットの妊娠率が低下し、雄児の血清中テストステロン濃度の低下が認められた。全TCDD投与群の雄児で精巣上体の精子数、精巣の1日精子産生及び精子通過率の低下、異常精子割合の上昇、性行動の異常が観察されたが、1日精子産生以外のエンドポイントに明らかな用量-反応関係はみられなかった。最小毒性量は25/5 ng/kg (0.8 ng/kg/dayに相当)であった。

Holtzmanラットの妊娠15日に12.5、50、200または800 ng/kgのTCDDを単回強制経口投与したときの児に対する影響の検討が国立環境研究所で行われた。50 ng/kgで生後63及び120日における雄児のAGDが短縮し、12.5 ng/kgで生後120日の腹側前立腺重量が減少した<sup>9)</sup>。生後2、49または63日に雄児を検査したところ、800 ng/kgでAGDの短縮がみられたが、1日精子産生及び精巣上体尾部の精子保有に差は認められなかった<sup>10)</sup>。生後49または120日の検査結果では、200 ng/kg以上で腹部前立腺重量の低下が観察され、50 ng/kg以上で生後120日において雄児のAGDが短縮したが、精巣の重量及び組織病理学的検査、1日精子産生、精巣上体重量、精巣上体尾部の精子保有、血清ホルモンレベルにTCDD投与の影響は認められなかった<sup>11)</sup>。また、生後49日の雄児の腹側前立腺において200 ng/kg以上で5α-reductase type 2 mRNAレベルの上昇、50 ng/kg以上でandrogen receptor mRNAレベルの低下が観察された<sup>11)</sup>。生後5日の雄児の胸腺のCYP1A1 mRNA inductionが200 ng/kg以上でみられている(1群3例の実験であり統計処理については不明)が、胸腺の重量及び細胞数には800 ng/kgでもTCDDの影響は観察されなかった<sup>12)</sup>。

Long Evansラットの妊娠15日に800 ng/kgのTCDDを投与したとき、雄児の交尾行動の変化が示されている<sup>13)</sup>。また、妊娠15日のLong Evansラットに100、300または1000 ng/kgのTCDDを単回強制経口投与し、F4の離乳まで観察したところ、F1において1000 ng/kgで雄児の前立腺重量の低下及びテストステロンレベルの低下、雌児の子宮及び卵巣重量の低下がみられたが、AGD、精子指標、雌性成熟、繁殖指標にはTCDDの影響は認められず、F2以降に生殖に対する影響は観察されなかった<sup>14)</sup>。

妊娠18日に20、60または180 ng/kgのTCDDを単回強制経口投与したHoltzmanラットの雌児における回転かごでの行動変化が180 ng/kgで認められている<sup>15)</sup>。

Table 1. Summary of the reproductive and developmental effects by TCDD (published after 1988)

Species (strain)	Exposure method	Dose (ng/kg)	Reproductive and developmental effects in offspring (no effect)
rats (SD)	single gavage on day 15 of pregnancy	200, 1000	decreased number of pups delivered and decreased epididymus weight at 1000 ng/kg
rats (Holtzman)	single gavage on day 15 of pregnancy	250	decreased sperm number and prostate weight (no effects on anogenital distance (AGD), sexual maturation, daily sperm production, weight of other accessory reproductive organs)
rats (Holtzman)	single gavage on day 15 of pregnancy	10, 100	altered vaginal morphogenesis
rats (Long Evans)	single gavage on day 15 of pregnancy	1000	decreased seminal vesicle weight, decreased seminal vesicle epithelial branching and differentiation
hamster (Syrian)	single gavage on day 11.5 of pregnancy	2000	delayed vaginal opening, altered estrous cycles, death in the pre-pregnant F1 females near-term, decreased numbers of implants and F2 pups born live
rats (Wistar)	single s.c. injection at 2 weeks prior to mating (repeated s.c. injection once a week until end of lactation)	25, 60, 300 (5, 12, 60)	decreased daily sperm production in all dose, decreased sperm number, delayed time of the sperm pass through the cauda epididymis, increased abnormal sperm, abnormal sexual behavior (no dose related effects)
rats (Holtzman)	single gavage on day 15 of pregnancy	12.5, 50, 200, 800	decreased AGU more than 50 ng/kg, decreased ventral prostate weight more than 200 ng/kg (no effects in daily sperm production, epididymus weight, sperm number)
rats (Long Evans)	single gavage on day 15 of pregnancy	800	abnormal sexual behavior in male
rats (Long Evans)	single gavage on day 15 of pregnancy	100, 300, 1000	decreased prostate, uterus and ovary weights in F1 at 1000 ng/kg (no effects in AGD, sperm motility, sexual maturation in F1, no effects in all reproductive endpoints in F2 to F4)
rats (Holtzman)	single gavage on day 15 of pregnancy	20, 60, 180	altered opiate responding for male reinforcement at 180 ng/kg

## 1998年以降の国際機関および各国のダイオキシン評価

1998年WHO-IPCSで行われたダイオキシン類のTDI再評価以後、我が国を始め各国政府及び国際機関でダイオキシン類の健康影響評価と耐容摂取量の勧告状況について以下にまとめた(Table 2)。

1998年のWHO-IPCS専門家会合では、上述したようにTCDDの半減期がヒトとげっ歯類では著しく異なることから、体内負荷量という概念を用いてヒトへの換算を行い、ヒトの体内負荷量から1日摂取量を逆算した後、TDIとして1~4 pg TEQ/kg/dayを勧告した。このとき、算出の基となった最も低い体内負荷量で現れる毒性としては、サルにおける子宮内膜症及び神経行動学的発達への影響とげっ歯類の経胎盤/経母乳暴露による次世代の生殖器官発生異常・免疫抑制であり、最低毒性発現体内負荷量としては28~73 ng/kgと見積もられた。WHO-IPCSではこれらの毒性のうちどれかをTDI算定の根拠とするわけではなく、レンジとして捉え幅のあるTDIを勧告することになった<sup>1)</sup>。

我が国では1999年、厚生省と環境庁の合同専門家会合(中央環境審議会環境保健部会、生活環境審議会、食品衛生調査会)において、WHO-IPCS<sup>1)</sup>の考え方を基本とし、TCDDによる各種毒性影響を体内負荷量の基準とし、結果として数編の経胎盤/経母乳暴露による次世代の生殖器官発生異常・免疫抑制に関する報告をTDIの算定根拠として選択した。その際、最も低い体内負荷量を示したのはFaqrら<sup>8)</sup>の報告で27 ng/kg、次にOhsakoら<sup>10)</sup>ら(当時は学会発表時のデータを引用した)の43 ng/kgであったが、それらの単報での値を採用するのではなく、実験の信頼と再現性を考慮し、その他の同様の毒性を比較すると、概ね86 ng/kg以上で影響が現れるとすることが妥当であると判断した。また、このときサルの子宮内膜症と神経行動学的発達への影響の実験は、その実験方法に信頼性が担保できないので定量的評価には用いないこととした。その結果、体内負荷量86 ng/kgを

TDI算定の出発点とし、不確実係数10を用いて、TDIを4 pgTEQ/kg/dayとした<sup>2)</sup>。

米国EPAの2000年の再評価ドラフトでは、ダイオキシン類の最適毒性指標は発がん性にあるとし、動物実験及びヒトの疫学情報から導き出された体内負荷量をもとに発がん性リスクを計算した。その結果、1 pgTEQ/kg/dayあたりの発がんリスクは1000分の1であるとし、現在のバックグラウンドレベルの暴露におけるリスクは100~1000分の1の間にあると算出した。また、本来なら計算されるであろう耐容摂取量に相当するReference doseについては、ヒトのバックグラウンドレベルを大きく下回ることから算出せず、WHO-IPCSで評価した1~4 pgTEQ/kg/dayというTDIはリスクマネージメントの目的としては妥当であるとしている<sup>16)</sup>。

ECのScientific Committee on Food (SCF)が2000年11月に行ったダイオキシン類評価では、WHO-IPCS<sup>1)</sup>での評価と同様に、体内負荷量の概念を用い、最低体内負荷量のエンドポイントとして、サルにおける子宮内膜症及び神経行動学的発達への影響とげっ歯類の経胎盤/経母乳暴露による次世代の生殖器官発生異常・免疫抑制を取りあげた。このときの体内負荷量は25~60 ng/kg (WHO-IPCS<sup>1)</sup>)と同じデータセットを用いているが、主に体内吸収率を60%と少し低めに設定していることや、単回投与の実験結果を亜慢性試験の実験で得られる結果と比較できるように補正しているため異なった値となっている)と見積り、不確実係数9.6からTDIとしては1~3 pgTEQ/kgと計算した。SCFではこのレンジで与えられたTDIの中から単一の値を採用する科学的根拠に乏しいことから、暫定的なTDIとしては、1 pgTEQ/kgにすべきであるとの結論になった。しかし、ダイオキシン類の長い体内残留性を考慮して、1週間単位の耐容摂取量として7 pgTEQ/kg/week (t-TWI: temporary tolerable weekly intake)を勧告することになった<sup>17)</sup>。しかし、2001年5月には、新たに公表された報告も加え、暫定値の見直しを行った。新たに、Faqrら<sup>8)</sup>とOhsakoら<sup>10)</sup>のデータを追加し、最低毒性発現体内負荷量として40~100 ng/kg、無毒性体内負荷量として20 ng/kgをそれぞれ算出した。無毒性体内負荷量からTDIを算出すると、3 pgTEQ/kg/dayとなるが、Faqrら<sup>8)</sup>のWistarラットを用いた方が、感受性が高いと考えられ、40 ng/kgからTDIを算出すると2 pgTEQ/kg/dayとなった。前回の評価ではサルの試験も感受性の高いエンドポイントとして取りあげられていたが、試験の信頼問題が解決できなかったため、今回は考慮しなかった。さらに、最終的には、前回と同様、長い体内消失半減期を考慮し、1週間耐容摂取量として14 pgTEQ/kg/weekを勧告した<sup>18)</sup>。

2001年6月に行われたFAOとWHOの合同食品添加物専門家会議では、EC-SCF<sup>18)</sup>での再評価と同様のデータセットを用いて、評価を行ったが、耐容摂取量としては体内中の長い半減期を理由に、ECの評価より長い耐容1ヶ月許容量

(TMI) を勧告した。算定根拠となる体内負荷量としても SCF の評価と同様に最低毒性発現体内負荷量 (Faqi ら<sup>8)</sup> のデータ) と無毒性体内負荷量 (Ohsako ら<sup>11)</sup> のデータを基に計算を行ったが、その際の慢性投与に対する補正を行った体内負荷量の計算方法は、Linear fit model (直線回帰モデル) と Power fit model (べき乗回帰モデル) という 2 つの方法を試みている。それらの結果をもとに SCF と同様の TMI を算出すると 40 ~ 100 pg TEQ/kg/month の範囲になり、暫定 TMI としては中間値を取って、70 pgTEQ/kg/month を勧告した<sup>19)</sup>。

英国の UK-Food Standards Agency (FSA) では EC-SCF<sup>18)</sup> 及び JECFA<sup>19)</sup> の考え方を基本的に採用した、最も感受性の高いエンドポイントとして、ラット雄への生殖機能の発生異常 (特に精子形成への影響) を用いているが、体内負荷量の算定は、EC-SCF<sup>18)</sup> や JECFA<sup>19)</sup> とは異なり、最も感受性が高い時期を妊娠 16 日とし、この時期の胎児の体内負荷量と母体の体内負荷量との比を用いて単回投与と反復投与で得られる体内負荷量の値の補正を行った。その結果、Faqi らのデータに基づいて得られた妊娠 16 日の母体の体内負荷量は 33 ng/kg/day と見積もられた。この値から EC-SCF 及び JECFA と同様の不確実係数 (9.6) を用いて TDI として 2 pgTEQ/kg/day を勧告した。EC-SCF<sup>18)</sup> や JECFA<sup>19)</sup> では 1 週間や 1 ヶ月あたりの耐容量として勧告しているが、TDI として表現する方が適切で、わかりやすいとする理由で、TDI での勧告値を採用しているが、仮に短期間で TDI を越える暴露があっても体内負荷量が大きく変動することはなく、長期間に

例えば、SCF<sup>18)</sup> には低い体内負荷量で発現する TCDD の影響として、Holtzman ラットの雄児において 64 ng/kg 以上の投与量で観察された 1 日精子産生低下及び精巣上体精子数の減少<sup>21)</sup>、Long Evans ラットの雄児において 50 ng/kg 以上の投与量で観察された開眼促進及び射精精子数減少<sup>22)</sup>、Wistar ラットの雄児において 25/5 ng/kg 以上の投与量で観察された 1 日精子産生低下及び性行動の変化<sup>8)</sup>、Holtzman ラットの雄児において 50 ng/kg 以上の投与量で観察された AGD 短縮<sup>11)</sup> が記載されている。

Gray ら<sup>22)</sup> の報告した開眼促進は 1 日程度の遅れであり、毒性学的意義は弱いと考えられる。また、射精精子数についてはこの実験結果で有意な減少は最高投与量の 800 ng/kg だけに認められたものであり、前報<sup>23)</sup> の成績と合わせて統計処理すると 50 ng/kg 以上で有意差が認められたと云う結果である。これらの成績を TDI 設定の根拠とすることは不適切と考えられる。

Faqi ら<sup>8)</sup> の報告した雄児の性行動の変化には用量-反応関係は認められない。

Ohsako ら<sup>9, 11)</sup> により雄児の AGD 短縮が報告されている。AGD の体重による補正值 (AGD/cube root of body weight) は示されておらず、AGD 短縮の程度は軽度であり、児の生後 63 日<sup>9)</sup> と生後 120 日<sup>11)</sup> に断続的に認められた変化であり、毒性学的な意義は弱いと考えられる。

TCDD の精子細胞、精子に対する影響については多くの報告があるが、TCDD の精子細胞、精子に対する TCDD の影響には報告間で差がみられる。Ohsako ら<sup>9, 10, 11)</sup> は精子指標及び精巣の病理組織学的所見には 800 ng/kg までの TCDD 投与の影響は認められなかったとしている。米元ら<sup>14)</sup> は 1000 ng/kg の TCDD 投与でも精子検査において TCDD の影響は認められず、同様なプロトコールによる Holtzmann ラット<sup>21, 24, 25)</sup> 及び Long Evans ラット<sup>22, 26)</sup> を用いて行われた実験結果を再現できなかったと述べている。Gray ら<sup>23)</sup> は精巣の精子産生は TCDD の鋭敏な指標ではないと述べており、また、Theobald と Peterson<sup>27)</sup> はラット、ハムスター、マウスの 3 種の動物で観察される唯一の生殖発生毒性のエンドポイントは精巣上体の精子数減少であると述べている。このように、低用量の TCDD の精子指標 (1 日精子産生、精巣上体精子数) に対する影響については実験間で整合性のある結果は得られていない。

一方、JECFA<sup>19)</sup> の評価でも Faqi ら<sup>8)</sup> や Ohsako ら<sup>11)</sup> の両報告を用いて様々な体内負荷量の計算を試みているが、結局、どちらか単一の報告を基にするのではなく、両報告から得られた体内負荷量のレンジの中央値を TDI 算定の出発点としたことから、この両報告に対する毒性学的意義付けは必ずしも確定していないと考えられる。また、Rier ら<sup>28)</sup> および Scantz & Bowman<sup>29)</sup> のアカゲザルにたいする影響も、1999 年以後、未だにその実験の信頼性に関する問題は依然解決されていなく、EC、JECFA、UK における耐容摂取量

Table 2. Summary of tolerable intake derivations for TCDD in the assessment agencies

Assessment agencies	Endpoints in stippling	Study burden (ng/kg)	Equivalent human intake	Uncertainty factor	Tolerable intake
WHO/IPCS	decreased sperm count (rat), immune suppression (rat), increased genital malformations in female (rat), neurobehavioural effects (monkey)	28 - 73	14 pg/kg/day 25 pg/kg/day 37 pg/kg/day 21 pg/kg/day	10	1.4 pg/kg/day
Japan	decreased sperm count (rat), increased genital malformations (rat), immune suppression (rat)	16 - 43	6 pg/kg/day	10	0.6 pg/kg/day
EC-SCF	decreased sperm production (rat)	48	20 pg/kg/day	9.6	1.9 pg/kg/day (2 pg/kg/day)
JECFA	decreased sperm production (rat), decreased anogenital distance in male (rat)	28 or 42 16 or 22	473 or 630 pg/kg/month 237 or 330 pg/kg/month	9.6 3.2	29 pg/kg/month (44 - 103 pg/kg/month)
UK-FSA	decreased sperm production in rat	33	17 pg/kg/day	9.6	2 pg/kg/day

わたった平均値が TDI を下回れば有害影響が現れることはないであろうということが付け加えられている<sup>20)</sup>。

#### まとめ

最近の EC、JECFA、UK のダイオキシン類評価では使用されているデータセットは、1999 年に我が国で行われた再評価で用いられたものとほぼ同じであるが、Faqi ら<sup>8)</sup> の 1 日精子産生低下や Ohsako ら<sup>11)</sup> の雄児の AGD 短縮の報告が最も感受性の高いエンドポイントであるとして体内負荷量を計算し、TDI 算定のための出発点として使用している。た

算定のための定量的評価にも実質的には使用されていない。

以上のことから、TDI算定の出发点となる最低の毒性発現体内負荷量の算定のために Faqi ら<sup>8)</sup> や Ohsako ら<sup>11)</sup> の両報告結果を用いる積極的な理由は現在のところなく、1999年の我が国のTDI再評価に用いた Gray ら<sup>22,26)</sup> および Gehrs ら<sup>30)</sup> の報告で母動物に TCDD を投与した場合に児動物に見られる開眼促進、精巣上体精子数の減少、雌性生殖器形態異常、遅延型過敏症の抑制最低の毒性発現体内負荷量：86ng/kg を出发点として TDI を算定することは現在でも妥当であると考えられる。

#### 参考文献

- 1) WHO-IPCS(1998)WHO European Centre for Environment and Health International Programme on Chemical Safety EXECUTIVE SUMMARY Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI) WHO Consultation, May 25-29 1998, Geneva, Switzerland (1998)
- 2) 日本(1999)ダイオキシンの耐容1日摂取量(TDI)について、中央環境審議会環境保健部会、生活環境審議会、食品衛生調査会、平成11年6月
- 3) Cooke, G.M., Price, C.A., Oko, R.J. (1998) Effects of *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on serum androgens and steroidogenic enzyme activities in the male rat reproductive tract. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 67, 347-354
- 4) Loeffler, I.K., Peterson, R.E. (1999) Interactive effects of TCDD and p,p'-DDE on male reproductive tract development in utero and lactationally exposed rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 154, 28-39
- 5) Dienhart, M.K., Sommer, R.J., Peterson, R.E., Hirshfield, A.N., Silbeirgeld, E.K. (2000) Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces developmental defects in the rat vagina. *Toxicol. Sci.*, 56, 141-149
- 6) Hamm, J.T., Sparrow, B.R., Wolf, D., Birnbaum, L.S. (2000) In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters postnatal development of seminal vesicle epithelium. *Toxicol. Sci.*, 54, 424-430
- 7) Wolf, C.J., Ostby, J.S., Gray, L.E. (1999) Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) severely alters reproductive function of female hamster offspring. *Toxicol. Sci.*, 51, 259-264
- 8) Faqi, A.S., Dalsenter, P.R., Marker, H.J., Chahoud, I. (1998) Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 150, 383-392
- 9) Ohsako, S., Miyabara, Y., Sakaue, M., Kurosawa, S., Nishimura, N., Aoki, Y., Tohyama, C., Sone, H., Ishizuka, M., Jana, N.R., Sarkar, S., Yonemoto, J. (1999a) Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the development of male reproductive organs in the rats. *Organohalogen Compounds*, 42, 19-21
- 10) Ohsako, S., Nishimura, N., Miyabara, Y., Ishizuka, M., Aoki, Y., Tohyama, C., Sone, H., Yonemoto, J. (1999b) Changes in the reproductive organs of the male rats exposed maternally to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicol. Sci.*, 48 (1-S), 148
- 11) Ohsako, S., Miyabara, Y., Nishimura, N., Kurosawa, S., Sakaue, M., Ishimura, R., Sato, M., Takeda, K., Aoki, Y., Sone, H., Tohyama, C., Yonemoto, J. (2001) Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of *5 $\alpha$* -reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicol. Sci.*, 60, 132-143
- 12) Nohara, K., Fujimaki, H., Tsukumo, S., Ushio, H., Miyabara, Y., Kijima, M., Tohyama, C., Yonemoto, J. (2000) The effects of perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on immune organs in rats. *Toxicology*, 154, 123-133
- 13) 掛山正心, 遠山千春, 曾根秀子 (2000) 雄ラットの性行動に対する2,3,7,8-四塩化ダイオキシンの経胎盤及び経母乳曝露による影響, 第3回環境ホルモン学会研究発表会要旨集, p. 225
- 14) 米元純三, 遠山千春, 尾根田暁, 永田良一 (2001) 妊娠期2,3,7,8-TCDD投与ラットの多世代影響, 第4回環境ホルモン学会研究発表会要旨集, p. 347
- 15) Markowski, V.P., Zareba, G., Stern, S., Cox, C., Weiss, B. (2001) Altered operant responding for motor reinforcement and the determination of benchmark doses following perinatal exposure to low-level of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Environ. Health Perspect.*, 109, 621-627
- 16) US Environmental Protection Agency (EPA) (2000) Dioxin reassessment (draft documents on "Exposure and human health reassessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds". September 2000
- 17) EC Scientific Committee (SCF) (2000) Opinion of the SCF on the risk assessment of dioxin and dioxin-like PCBs in food. SCF/CS/CNTM/DIOXIN/8 Final, 23 November, 2000.
- 18) EC Scientific Committee (SCF) (2001) Opinion of the SCF on the risk assessment of dioxin and dioxin-like PCBs in food? update based on new scientific information available since the adoption of the SCF opinion of 22nd November 2000-. SCF/CS/CNTM/DIOXIN/20 Final, 30 May 2001.
- 19) JECFA (2001) Summary of the fifty-seventh meeting of the

- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome, 5-14 June 2001.
- 20) UK Food Standards Agency (2001) Statements on the tolerable daily intake for dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls. Committee on toxicity of chemicals in food, consumer products and the environment. October 2001, COT/2001/7.
- 21) Mably, T.A., Bjerke, D.L., Moore, R.W., Gendron-Fitzpatrick, A., Peterson, R.E. (1992c) In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 114, 118-126
- 22) Gray, L.E., Ostby, J.S., Kelce, E.R. (1997a) A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 146, 11-20
- 23) Gray, L.E., Kelce, W.R., Monosson, E., Ostby, J.S., Birnbaum, L.S. (1995) Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory glands weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 131, 108-118
- 24) Mably, T.A., Moore, R.W., Goy, R.W., Peterson, R.E. (1992b) In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 114, 108-117
- 25) Mably, T.A., Moore, R.W., Peterson, R.E. (1992a) In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin 1. Effects on androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 114, 97-107
- 26) Gray, L.E., Wolf, C., Mann, P., Ostby, J.S. (1997b) In utero exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 146, 237-244
- 27) Theobald, H.M., Peterson, R.E. (1997) In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: effects on development of the male and female reproductive system of the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 145, 124-135
- 28) Rier, S. E., Martin, D. C., Bowman, R. E., Dmowski, W. P., Becker, J. L. (1993) Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21, 433-441
- 29) Schantz, S. L., Bowman, R. E. (1989) Learning in monkeys exposed perinatally to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Neurotoxicol. Teratol.*, 11, 13-19
- 30) Gehrs, B.C., Riddle, M.M., Williams, W.C., Smialowicz, R.J. (1997) Alterations in the developing immune system of the F344 rat after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. II. Effects on the pup and adult. *Toxicology*, 122, 229-24



【報文】

## OECD 化学物質対策の動向 (第 6 報)

— 第 14 回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2002 年パリ) —

Progress on OECD Chemicals Programme (6): SIAM 14 in Paris, 2002.

高橋美加・平田睦子・松本真理子・広瀬明彦・鎌田栄一・長谷川隆一・江馬 眞  
国立医薬品食品衛生研究所

Mika Takahashi, Mutsuko Hirata-Koizumi, Mariko Matsumoto, Akihiko Hirose,  
Eiichi Kamata, Ryuichi Hasegawa and Makoto Ema  
National Institute of Health Sciences

要旨：第 14 回の OECD 高生産量化学物質初期評価会議が 2002 年 3 月にパリで開催された。日本が提出した 8 物質の初期評価文書については全ての評価結果の合意が得られた。本稿では、本会議で合意の得られた 8 物質の初期評価報告書の健康影響部分について、その要旨を紹介する。

Abstract: The 14<sup>th</sup> SIDS, the Screening Information Data Set, Initial Assessment Meeting (SIAM 14) was held at the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) headquarters in Paris, France, hosted by the European Commission. The initial assessment documents of eight substances at SIAM 14 (CAS numbers: 88197, 126987, 839907, 2403885, 2867472, 3319311, 3452979, 16219753) were submitted by the Japanese Government with or without the International Council of Chemical Associations (ICCA) and all of them were agreed at the meeting. In this report, the human health effect parts in their eight substance documents are introduced.

Key words: OECD, HPV program, SIDS Initial Assessment Meeting

## 1 はじめに

経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development : OECD) は加盟各国の経済の持続的な成長、多角的な貿易の拡大等を目的としているが、1960年代から化学物質貿易の拡大に伴う環境汚染が深刻化して化学品対策がその重要な課題となり、化学品テストガイドラインや Good Laboratory Practice (GLP) の作成等の種々の活動が進められてきた (長谷川ら 1999a)。加盟各国における高生産量化学物質 (High Production Volume Chemical : HPV) については、1992年に始まった OECD 高生産量化学物質点検プログラム (HPV Program) により安全性の評価が行われている (長谷川ら 1999a)。点検プログラムにおいて加盟各国での生産量・既存の毒性データ量に基づき OECD HPV Chemicals List の作成及び評価の優先順位付けが行われ (長谷川ら 1999a)、現在は加盟各国と企業が、生産した化学物質に関する情報収集や試験を行って評価文書を完成させ、順次それらの文書が初期評価会議 (SIAM : SIDS, the Screening Information Data Set, Initial Assessment Meeting) で討議されている。

日本政府は初回より評価文書を提出しており、第6回までに27物質の評価文書について合意を得た。第7回から第13回の初期評議会において日本政府が担当し結論および勧告が合意された化学物質の評価文書のヒトの健康影響部分については既に紹介された (長谷川ら 1999b、2000、2001 ; 高橋ら 2004)。

評価文書は、物性、環境毒性、及びヒトの健康影響に関する記述から構成されているが、著者らがヒトの健康影響部分の担当であるため、本稿では SIAM14 で合意に至った化学物質名及び日本担当物質の評価文書のヒトの健康影響についての記述の概要を紹介する。

## 2 SIAM14 で合意された化学物質名と日本担当物質の初期評価内容

2002年3月にパリ (フランス) で開催された SIAM14 において、33化学物質の初期評価文書が検討され、表1に示す物質の初期評価結果および勧告が合意された。SIAMにおける合意は FW (Further Work) または LP (Low Priority) として示されている。FW は「今後も追加の調査研究作業が必要である」、LP は「現状の使用状況においては追加作業の必要はない」ことを示す。日本政府が担当した化学物質の初期評価報告書のヒトへの健康影響についての記述の概要を以下に示す。

### (1) *o*-Toluenesulfonamide (88-19-7) (日本政府作成)

本化学物質はスルホンアミド類に属し、サッカリンの原料として使用される。

ラットへの経口投与では、ほとんどが速やかに尿中に排泄される。ヒトではラットより排泄は遅い。ラットとヒトにおける主要な代謝物質は 2-スルファモイル-ベンジルアルコール及びその硫酸塩、グルクロン酸塩である。さらに、ヒトでは代謝物質としてサッカリンが尿中で検知されている。

ラットにおける単回経口投与毒性試験 (OECD TG 401) では、投与直後から鎮静、脱力、側臥位、刺激に対する無反応、促迫呼吸、呼吸数減少、体温低下、カタレプシー等が最低投与量の 700 mg/kg でもみられ、LD<sub>50</sub> は雄で 2,000 mg/kg を上回り、雌で 1,000 ~ 2,000 mg/kg であった。ウサギの眼に対する刺激性が報告されているが、信頼性は不確実である。

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (OECD TG 422) では、ラットの雌雄に交配前2週間

及び交配期間 2 週間、さらに、雄では交配期間終了後 2 週間、雌では妊娠期間及び分娩後哺育 3 日まで、0、20、100 及び 500 mg/kg/day が強制経口投与された。雄の 100 mg/kg/day 以上の群で自発運動低下、腹臥姿勢、体重増加抑制、摂餌量減少、流涎が観察された。剖検時の血液学検査では、赤血球血色素濃度が 100 mg/kg/day 以上の群で、また、血小板数が 500 mg/kg/day 群で増加した。血液生化学検査では、100 mg/kg/day 以上の群で総コレステロール濃度が増加した。また、500 mg/kg/day 群では総蛋白濃度が増加し、A/G 比、ブドウ糖濃度及びトリグリセライド濃度が低下した。100 mg/kg/day 以上の群で肝臓及び腎臓に暗色化あるいは腫大が認められ、病理組織学検査において、肝臓では小葉中心性肝細胞肥大が認められ、腎臓では好酸性小体が被験物質投与群で頻度及び程度ともに増強された。雌の 500 mg/kg/day 群において自発運動低下、腹臥姿勢、鎮静、紅涙、体温低下、触発反応の喪失、流涎、呼吸困難、褐色尿などを示した後に 13 例中 3 例が死亡し、2 例が瀕死剖検された。雌の生存例では、100 mg/kg/day 以上の群で雄と同様の一般状態の変化が観察され、500 mg/kg/day 群ではさらに四肢の伸展及びよろめき歩行が認められた。哺育 4 日の剖検では、100 mg/kg/day 以上の群の肝臓に腫大あるいは暗色化、胸腺には小型化が観察された。100 mg/kg/day 以上の群の肝臓、500 mg/kg/day 群の腎臓、脳及び副腎の重量あるいは比体重が増加し、病理組織学検査では、100 mg/kg/day 以上の群で小葉中心性肝細胞肥大が、500 mg/kg/day 群では心外膜の線維化及び細胞浸潤、胸腺の萎縮ならびに被膜の線維化および細胞浸潤が認められた。

以上の臨床症状と肝臓の変化に基づいて反復経口投与の無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level) は 20 mg/kg/day と判断された。

上述の OECD の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験において、交尾及び受胎能、分娩及び哺育状態の異常は認められなかった。出生児に被験物質投与に起因した形態異常は観察されなかったが、500 mg/kg/day 群における哺育 0 及び 4 日における雌雄生存児体重に低下が認められた。また、0、2.5、25 及び 250 mg/kg/day を混餌投与したラットの二世代生涯試験では、250 mg/kg/day 群で児数及び体重の減少が認められた。これらの試験結果を考慮して、生殖発生毒性の NOAEL は 100 mg/kg/day と判断された。

細菌を用いた復帰突然変異試験では S9 mix 存在および非存在下で陰性であり、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験でも陰性であった。*In vivo* の 2 種類の小核試験では陰性であったが、マウスの Spot 試験では結果が曖昧であった。これら *in vivo* の試験は実験条件が十分に記載されていないことも考慮して、*in vivo* での遺伝毒性の可能性については結論できないとされた。

上述の二世代生涯試験では、いずれの投与群でも両世代に腫瘍発生率上昇は認められず、2 年間経口投与試験でも本物質に発がん性がないことが示された。一世代生涯試験において膀胱の腫瘍発生率の低下が示されているが、この研究の報告は記述が不十分であるため、信頼性は不確実である。ほ乳類の培養細胞を用いた細胞トランスフォーメーション活性は陰性であった。これらのデータの総合判断から本化学物質に発がん性はないと判断された。

## (2) Methyl acrylonitrile (126-98-7) (日本政府作成)

本化学物質はメタクリル酸誘導体やポリマーの中間体として使用される。

消化管で速やかに吸収されるが生体内蓄積の可能性は低い。主として呼気中に二酸化炭素として排泄される。投与に用いた溶媒の違いや試験に用いた動物の種差/系統差が本化学物質の代謝と排泄に影響を及ぼしている。

急性毒性に明確な種差があり、経口 LD<sub>50</sub> はラットで 64~240 mg/kg、マウスで 17 mg/kg、ウサギで 16 mg/kg、スナネズミで 3.8~4.9 mg/kg であった。自発運動低下、腹臥姿勢や側

臥姿勢、過呼吸がみられた。吸入 LC<sub>50</sub> は経口急性毒性と同様に、ラットにおいてマウスやウサギより高かった。意識喪失、強直間代性痙攣がみられた。

ウサギの皮膚及び眼には軽度の刺激性が認められた。ヒトでは呼吸器系と眼に対して軽度の刺激性がみられた (2 ppm で 10 分間暴露)。

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (OECD TG 422) では、ラットの雌雄に交配前 2 週間及び交配期間 2 週間、雄では交配期間終了後 2 週間、雌では妊娠期間、分娩後哺育 4 日まで、0、7.5、15 及び 30 mg/kg/day が強制経口投与された。一般状態、体重及び摂餌量にはいずれの群の雌雄にも異常は認められなかった。30 mg/kg/day 群の雄で赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量及びカリウムの低下、クレアチニンの高値、雌で総ビリルビン及びブドウ糖の高値が認められた。また、雌の脾臓に髄外造血が 30 mg/kg/day 群で 7 例に認められた。30 mg/kg/day 群での雄の貧血所見に基づき、本試験での NOEL は 15 mg/kg/day と判断された。米国の National Toxicology Program (NTP) による 2 年間経口投与発がん性試験では、ラットに 0、3、10 及び 30 mg/kg、マウスに 0、1.5、3 及び 6 mg/kg が週 5 日強制経口投与された。血液学検査及び血液生化学検査は行われなかった。ラットでは 30 mg/kg の雌雄で体重が減少し、鼻腔の嗅上皮萎縮及び嗅上皮化生が増加し、骨髓過形成が雌の 30 mg/kg で増加した。

嗅上皮及び骨髓の病理組織学的変化に基づき、反復投与毒性の NOEL は雌雄ともに 10 mg/kg (7.14 mg/kg/day) と判断された。マウスでは投与に関連した影響はみられなかったことから、反復経口投与毒性の NOEL は 6 mg/kg (4.29 mg/kg/day) と判断された。

上述の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (OECD TG 422) において、親動物の生殖能及び児動物に変化が認められなかったことから、生殖発生毒性の NOEL は 30 mg/kg/day と判断された。NTP による二世代生殖毒性試験では、ラットに 0、2、7 及び 20 mg/kg/day が二世代にわたり強制経口投与されたが、F0 と F1 ラットの生殖能に影響はみられなかった。F0 の精子密度に差はみられなかったが、F1 の 20 mg/kg/day 群で精子密度が 19% 減少した。F1 の精巢上体の形態に変化はみられなかった。F1 の精子密度の減少に基づき、本試験での生殖発生毒性の NOEL は 7 mg/kg/day (雌雄) と判断された。ラットの妊娠 6-15 日に 0、5、25 及び 50 mg/kg/day、ウサギの妊娠 6-19 日に 0、1、3 及び 5 mg/kg/day を強制経口投与して発生毒性試験を行った。ラットでは母動物及び胎児に投与に関連した影響はみられなかった。ウサギでは母動物に投与に関連した影響はみられなかったが、5 mg/kg/day 群で胎児の性比 (雄/雌) は減少したことから、NOEL は 3 mg/kg/day と判断された。

ラットの妊娠 6-20 日に 0、6、12、25、50 及び 100 ppm が 1 日 6 時間吸入暴露された。100 ppm で母動物の体重増加量が減少し、雌雄の胎児体重が 100 ppm で低値を示したことから、発生毒性の NOEL は 50 ppm (137 mg/m<sup>3</sup>) と判断された。

細菌を用いた復帰突然変異試験では S9 mix 存在および非存在下で陰性であった。チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験では、連続処理及び S9 mix 非存在下の短時間処理で陰性であったが、S9 mix 存在下の短時間処理では染色体異常の誘発作用が認められたことから、染色体異常試験は陽性と判断された。In vivo でのマウスの小核試験は投与可能な最高用量において陰性であった。これらの結果から本化学物質は遺伝毒性を発現しないと判断された。

上述の NTP による 2 年間経口投与発がん性試験において、ラット・マウスともに最高投与量でも腫瘍性の変化が認められなかったことから、齧歯類において発がん性はないと判断された。

**(3) Tris(2-hydroxyethyl)isocyanurate (839-90-7) (ICCA 日本企業作成)**

本化学物質は熱硬化性塗料となるポリエステルを合成するモノマーとして主に使用される。

ラットでの単回経口投与毒性試験 (OECD TG 401) では雌雄とも投与による変化はみられず、経口投与による LD<sub>50</sub> は雌雄で 2,000 mg/kg 以上であった。ラットでの 8 時間吸入暴露試験 (9.32 及び 15 mg/L) 及びマウスでの腹腔内注射試験においても、急性毒性影響はみられなかった。腹腔内注射による LD<sub>50</sub> は雌雄で 10,000 mg/kg 以上であった。

皮膚及び眼に対する刺激性はみられなかった。

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (OECD TG 422) では、雄ラットに交配前 14 日間、交配期間及び交配後を含む 49 日間、雌ラットに交配の最大 28 日前から哺育 3 日まで (計 40 ~ 46 日)、0、30、100、300 及び 1,000 mg/kg/day が強制経口投与された。全ての投与群において毒性影響は認められなかったことから、反復経口投与毒性の NOAEL は雌雄で 1,000 mg/kg/day、生殖発生毒性の NOAEL も雌雄親動物及び児動物で 1,000 mg/kg/day と判断された。

細菌を用いた復帰突然変異試験では S9 mix 存在および非存在下で陰性であった。チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験では、連続処理及び S9 mix 存在及び非存在下の短時間処理において染色体異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかったことから、染色体異常試験は陰性と判断された。これらの結果から本化学物質は遺伝毒性を発現しないと判断された。

**(4) 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-4-ol (2403-88-5) (ICCA 日本企業作成)**

本化学物質は主にプラスチック用光安定剤の合成用中間体として使用される。

単回経口投与毒性試験 (OECD TG 401) におけるラットでの LD<sub>50</sub> は雄で 1,482 mg/kg、雌で 1,564 mg/kg であった。雌雄とも全ての群で自発運動低下、散瞳及び眼瞼下垂がみられ、1,300 mg/kg 以上で腹臥位、体温低下、振戦が認められた。さらに、雄の 1,300 mg/kg で消瘦、腹部膨満及び耳介等の蒼白、1,690 mg/kg で立毛、雌の 1,690 mg/kg で腹部膨満、耳介等の蒼白及び脱毛が観察された。急性経皮毒性試験 (OECD TG 402) におけるラットでの LD<sub>50</sub> は雌雄で 2,000 mg/kg 以上であった。立毛、円背位及び塗布部位での紅斑がみられたが、試験期間での死亡例はなかった。急性皮膚刺激性/腐食性試験 (OECD TG 404) では、ウサギの皮膚への強い刺激性が示された。皮膚感作性試験 (OECD TG 406) では、モルモットへの中程度から高程度の皮膚感作性がみられた。

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (OECD TG 422) では、雌雄ラットの交配前 2 週間及び交配期間の 2 週間、さらに、雄では交配期間終了後 20 日間、雌では妊娠期間を通じて分娩後の哺育 3 日まで、0、60、200 及び 600 mg/kg/day が強制経口投与された。死亡が雌の 60 mg/kg/day 群及び雌雄の 600 mg/kg/day 群で観察された。眼瞼下垂及び散瞳が雌雄の 60 mg/kg/day 以上の群で、自発運動低下が雌雄の 600 mg/kg/day 群で認められた。また、雌雄の 200 mg/kg/day 以上の群で体重増加抑制が認められた。雄の血液学検査、血液凝固能検査及び血液生化学検査では投与の影響は認められなかった。器官重量では雌雄の 600 mg/kg/day 群で副腎重量が高値を、雌の 600 mg/kg/day 群で肝臓重量が高値を示した。

死亡動物に共通して腎臓の皮質や皮髄境界部に尿細管上皮の空胞変性が観察されたことにより死亡は本化学物質投与によることが示唆され、最低投与量の 60 mg/kg/day 群で死亡がみられたことから、NOAEL は雌雄で 60 mg/kg/day 未満と判断された。

上述の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験において、雄の生殖機能への影響は全投与量でみられなかったが、雌では 600 mg/kg/day 群で発情休止期の継続する性周期の停止が 3 例認められ、平均性周期が延長した他は、交尾能及び受胎能、妊娠及び分娩状態には投与の影

響はみられなかった。児動物では 600 mg/kg/day 群の雌雄で生後 0 日の体重及び 4 日の生存率が低値を示したことから、生殖発生毒性の NOAEL は 200 mg/kg/day と判断された。

細菌を用いた復帰突然変異試験では S9 mix 存在及び非存在下のいずれでも陰性であった。チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験では、S9 mix 非存在下の短時間処理で染色体異常の誘発がみられたことから、染色体異常試験は陽性と判断された。マウスの小核試験は投与可能な最高用量においても陰性であった。これらの結果から本化学物質は遺伝毒性を発現しないと判断された。

#### (5) 2-Dimethylaminoethyl methacrylate (2867-47-2) (ICCA 日本企業作成)

本化学物質は共重合による合成樹脂の接着性、染色性などの改善に用いられる他、凝集材、制電剤イオン交換樹脂、塗料用樹脂などのカチオン性モノマー、潤滑油及び燃料油添加剤の原料として使用される。

メタクリル酸及び N,N-ジメチルアミノエタノールに代謝され、メタクリル酸はアセチル-CoA 誘導体となり、通常の脂質代謝が行われると推定される。

ラットの単回経口投与毒性試験 (OECD TG 401) での LD<sub>50</sub> は 2,000 mg/kg 以上であった。ラットの急性経皮毒性試験 (OECD TG 402) では、最高用量の 2,000 mg/kg で運動低下、鎮静作用、呼吸困難及び皮膚への刺激性がみられたが、死亡例はなく、LD<sub>50</sub> は 2,000mg/kg 以上と判断された。

皮膚及び眼に対する強い刺激性/腐食性がみられた。モルモット皮膚感作性試験 (OECD TG 406) では皮膚感作性はみられなかった。

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (OECD TG 422) では、ラットの雌雄に交配前 2 週間及び交配期間 2 週間、雄では交配期間終了後 2 週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育 3 日まで、0、40、200 及び 1,000 mg/kg/day が強制経口投与された。1,000 mg/kg/day 群において、雄で攣縮、挙尾、間代性痙攣が散見され、雌雄で体重増加抑制、雌で 3 例の死亡及び哺育期間中の摂餌量減少が認められた。雌雄で脳及び脊髄の神経線維の変性、前胃壁の肥厚、粘膜上皮の増生、水腫及び炎症性細胞湿潤、雌で胸腺の萎縮が認められた。雄で尿素窒素の上昇、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少、網状赤血球比の増加などの貧血性変化、白血球数及び分葉核球数の増加が認められた。

これらの結果から、NOAEL は雌雄で 200 mg/kg/day と判断された。

ラットに 3 週間 (週 5 日、1 日 6 時間)、100 及び 250 ppm が反復吸入暴露され、250 ppm で眼と鼻への刺激、呼吸困難がみられたことから、NOAEL は 100 ppm (643 mg/m<sup>3</sup>) と判断された。

上述の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験において、親動物の交尾及び受胎能に投与による変化は認められなかったが、1,000 mg/kg/day 群の母動物 3 例で全児死亡が認められた。児動物では、1,000 mg/kg/day 群で低体重及び 4 日生存率の低下が認められた。これらより、生殖発生毒性の NOAEL は 200 mg/kg/day と判断された。

細菌を用いた 2 つの復帰突然変異試験では、S. typhimurium TA1537 を用いた S9mix 非存在下の 2500 µg/plate のみ陽性であったが、その他の細菌では S9 mix の存在下及び非存在下で陰性であり、チャイニーズ・ハムスター肺由来細胞を用いた HPRT 遺伝子座突然変異試験でも陰性であった。In vitro の染色体異常試験及びヒト末梢リンパ球細胞試験では S9 mix の存在下及び非存在下で構造異常の誘発が認められた。In vivo の腹腔内及び強制経口投与によるマウスの小核試験では投与可能な最高用量において陰性であった。これらの結果から本化学物質は遺伝毒性を発現しないと判断された。

(6) Tris(2-ethylhexyl)benzene-1,2,4-tricarboxylate (3319-31-1) (ICCA 日本企業作成)

本化学物質は軟性ビニル製品(耐熱ケーブル、自動車部品、絶縁テープなど)やPVC電気ケーブルの可塑剤として使用される。

ラットに単回経口投与されたうちの75%が糞と共に、16%が尿中代謝物として排泄され、1.9%が二酸化炭素として呼息された。

ラット単回経口投与毒性試験(OECD TG 401)では最高投与量の2000mg/kgの投与でも毒性徴候はみられず、LD<sub>50</sub>は2,000 mg/kg以上であった。ラットへの吸入曝露(2,600 mg/m<sup>3</sup>)では死亡はみられなかったが、肺の発赤斑が認められた。

皮膚刺激性試験(6試験)と眼刺激性試験(3試験)において、皮膚及び眼への軽微な刺激性が認められた。モルモット皮膚感作性試験(OECD TG 406)では皮膚感作性はみられなかった。

雌雄ラットに0、0.2、0.67及び2.0% (0、184、650及び1,826 mg/kg/day)を28日間混餌投与した試験では、650及び1,826 mg/kg/day群で、雌雄のヘモグロビン濃度の低下、肝臓の重量及び比体重の増加、アルブミン上昇、雄の白血球数及びコレステロールの上昇、1,826 mg/kg/day群で雄の尿素窒素の高値、雌の脂質の低値がみられた。本試験でのNOELは雌雄で184 mg/kg/dayと判断された。OECD TG 407に準拠した化審法ガイドラインに従って行った28日間反復経口投与毒性試験において、雌雄ラットに0、100、300及び1,000 mg/kg/dayが強制経口投与され、全ての検査項目において投与に関連した変化は認められず、本試験でのNOELは雌雄で1,000 mg/kg/dayと判断された。経口投与簡易生殖毒性試験(OECD TG 421)では、ラットの雌雄に交配前2週間及び交配期間2週間、雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育3日まで、0、100、300及び1,000 mg/kg/dayが強制経口投与された。反復投与毒性では、雄の精巣の病理組織学検査で300及び1,000 mg/kg/day群で精母細胞及び精子細胞の減少が認められた。雌雄の一般症状、体重推移、摂餌量、剖検所見、生殖器重量及び卵巣の病理組織学所見にはいずれの投与群においても投与による影響は認められなかった。本試験でのNOELは雄で100 mg/kg/day、雌で1,000 mg/kg/dayであった。

これらの反復投与試験の結果を考慮し、精巣毒性に基づいて、反復経口投与のNOELは、100 mg/kg/dayと判断された。

上述の経口投与簡易生殖毒性試験(OECD TG 421)において、精巣で病理組織学的変化が認められたが、親動物の生殖能検査・生殖器重量・分娩及び哺育行動、児動物の生存率・一般状態・体重推移・剖検所見に投与の影響は認められなかった。生殖毒性のNOELは雄で100 mg/kg/day、雌で1,000 mg/kg/day、発生毒性のNOELは1,000 mg/kg/dayと判断された。

細菌を用いた復帰突然変異試験ではS9 mix存在及び非存在下のいずれでも陰性であり、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験でも陰性であった。これらの結果から本化学物質は遺伝毒性を発現しないと判断された。

(7) 3,5,5-Trimethyl-1-hexanol (3452-97-9) (ICCA 日本企業作成)

本化学物質は可塑剤(フタル酸塩)及びエステル合成の原料として主に使用される。

ラットの雌雄を用いた単回経口投与毒性試験(OECD TG 401)では、自発運動の減少及び体重増加抑制が雌雄に認められたが、死亡、剖検及び病理組織学的変化はみられず、LD<sub>50</sub>は2000 mg/kg以上であった。

皮膚と眼に対して中程度の刺激性を示した。

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (OECD TG 422) では、ラットの雌雄に交配前2週間及び交配期間2週間、雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育3日まで、0、12、60及び300 mg/kg/day が強制経口投与された。雌の300 mg/kg/day 群で妊娠21日に1例が死亡し、妊娠14-19日に衰弱により3例が屠殺された。300 mg/kg/day 群の雌では体重増加抑制及び摂餌量の低下が認められた。雄の300 mg/kg/day 群で尿量及び飲水量の増加が認められた。肝臓の比体重の増加が雌雄の60および300 mg/kg/day 群で、腎臓の比体重の増加が雄の60 mg/kg/day 以上の群で、雌の300 mg/kg/day 群で認められた。病理組織学的検査では、雄では腎臓に軽度あるいは中程度の尿細管上皮の再生及び顆粒円柱が60及び300 mg/kg/day 群で、甲状腺に軽度の濾胞の不整形、濾胞上皮の円柱化及びコロイドの減少が300 mg/kg/day 群で、雌では腎臓に軽度の尿細管上皮の脂肪変性が60 mg/kg/day 以上の群で、胸腺の萎縮が300 mg/kg/day 群で認められた。

これらの結果から、NOAELは雌雄で12 mg/kg/day と判断された。

上述の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験では、雄の生殖能に影響はみられなかったが、雌の300 mg/kg/day 群で発情休止期の継続、全哺育児死亡例が観察され、着床率及び出産生児数の低下が60 mg/kg/day 以上の群で認められた。また、児動物では300 mg/kg/day 群で生後0日の低体重、生後4日の生存率の低下が認められた。生殖発生毒性のNOAELは12 mg/kg/day と判断された。

細菌を用いた復帰突然変異試験ではS9 mix 存在及び非存在下のいずれでも陰性であり、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験でも陰性であった。これらの結果から本化学物質は遺伝毒性を発現しないと判断された。

#### (8) 5-Ethylidene-2-norbornene (16219-75-3) (ICCA 日本企業作成)

本化学物質は高分子ゴム改質剤、塗料、接着剤などの製造に使用される。

ラットにおける経口投与のLD<sub>50</sub>は雄で2,276 mg/kg、雌で5,071 mg/kgであり、ラットにおける吸入曝露によるLC<sub>50</sub> (4h)は雄で13,300 mg/m<sup>3</sup>、雌で14,775 mg/m<sup>3</sup>であった。ウサギにおける経皮曝露によるLD<sub>50</sub>は雌雄で7,168 mg/kgを上回った。

ウサギでは皮膚に対する刺激性が中程度に認められたが腐食性はなく、眼に対する刺激性は軽微であった。

OECD TG 407に準拠した化審法ガイドラインの28日間反復経口投与毒性試験に従い、雌雄ラットに0、4、20及び100 mg/kg/day が強制経口投与された。雌雄の100 mg/kg/day 群で体重増加の低下が認められた。尿検査では、100 mg/kg/day 群の雄でタンパク陽性例の増加および尿検査時の飲水量の低値が、雌では蛋白陽性例の増加傾向が認められた。剖検では、雄の100 mg/kg/day 群で腎臓の褪色が認められ、雌雄の100 mg/kg/day 群で腎臓の比体重の高値が認められた。これらの結果から、NOAELは20 mg/kg/day と判断された。

ラットに14週間(週5日、1日6時間)、0、4.9、24.8及び149 ppmを吸入曝露させた。149 ppmでみられた雌雄の肝臓重量の増加から、NOAELは24.8 ppm (122 mg/m<sup>3</sup>) と判断された。

経口投与簡易生殖毒性試験 (OECD TG 421) では、ラットの雌雄に交配前2週間及び交配期間2週間、雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育3日まで、0、4、20及び100 mg/kg/day が強制経口投与された。親動物においては、100 mg/kg/day 群で妊娠期間の延長、着床率及び分娩率の低下がみられ、児動物においては、100 mg/kg/day 群で総出産児数、出産生児数及び哺育4日の生児数の低下が認められたことから、生殖発生毒性



の NOAEL は 20 mg/kg/day と判断された。

ラットの妊娠 6-15 日に 0、25、100 及び 354 ppm を吸入暴露して催奇形性試験が行われた。母動物においては 100 ppm 以上で体重及び摂餌量が低下し、肝臓比体重が増加した。胎児の骨格変異が 100 ppm 以上で増加した。本試験の母体毒性と発生毒性の NOAEL は 25 ppm (123 mg/m<sup>3</sup>) と判断された。

細菌を用いた復帰突然変異試験では S9 mix 存在及び非存在下のいずれでも陰性であり、チヤイニーズ・ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験の結果も陰性であった。これらの結果から本化学物質は遺伝毒性を発現しないと判断された。

### 3 おわりに

本稿では、SIAM14 で合意された化学物質名および日本担当の 8 物質の初期評価要旨の健康影響部分について紹介した。SIAM で合意された物質については、初期評価文書が出版されたのち、インターネットの OECD web サイト (<http://cs3-hq.oecd.org/scripts/hpv/>) で報告書の入手が可能である。

### 参考文献

- ・長谷川隆一，中館正弘，黒川雄二 (1999a) : OECD 化学物質対策の動向. J. Toxicol. Sci., 24, app. 11-19.
- ・長谷川隆一，鎌田栄一，広瀬明彦，菅野誠一郎，福間康之臣，高月峰夫，中館正弘，黒川雄二 (1999b) : OECD 化学物質対策の動向 (第 2 報). J. Toxicol. Sci., 24, app. 85-92.
- ・長谷川隆一，小泉睦子，鎌田栄一，広瀬明彦，菅野誠一郎，高月峰夫，黒川雄二 (2000) : OECD 化学物質対策の動向 (第 3 報). J. Toxicol. Sci., 25, app. 83-96.
- ・長谷川隆一，小泉睦子，広瀬明彦，菅原尚司，黒川雄二 (2001) : OECD 化学物質対策の動向 (第 4 報). J. Toxicol. Sci., 26, app. 35-41.
- ・高橋美加，平田睦子，松本真理子，広瀬明彦，鎌田栄一，長谷川隆一，江馬 眞 (2004) : OECD 化学物質対策の動向 (第 5 報). 国立医薬品食品衛生研究所報告 122, 37-42.

表1 SIAM14 で議論された化学物質と合意結果

CAS No.	物質名	担当国	結果
50000	Formaldehyde	DE/ICCA	FW
56815	Glycerol	UK/ICCA	LP
58082	Caffeine	DE/ICCA	LP
78706	Linalool	CH/ICCA	LP
78922	Butan-2-ol	US/ICCA	LP
80057	Bisphenol-A	UK:eu	FW
81141	Musk ketone	NL:eu	FW
81152	Musk xylene	NL:eu	FW
88120	1-Vinyl-2-pyrrolidone	Aus+UK:eu	FW
88197	<i>o</i> -Toluenesulfonamide	JP	LP
95761	3,4-Dichloroaniline	DE:eu	継続討議
100414	Ethylbenzene	US+DE:eu	LP
102067	1,3-Diphenylguanidine	FR/ICCA	FW
107062	1,2-Dichloroethane	DE/ICCA	LP
110656	But-2-yne-1,4-diol	DE:eu	継続討議
115957	Linalyl acetate	CH	LP
121915	Isophthalic acid	US/ICCA	LP
126987	Methyl acrylonitrile	JP	LP
128370	Butylated hydroxytoluene	DE/ICCA	FW
141786	Ethyl acetate	US/ICCA	LP
839907	Tris(2-hydroxyethyl)isocyanurate	JP/ICCA	LP
1310732	Sodium hydroxide	PT/ICCA:eu	LP
1333820	Chromium trioxide	UK:eu	FW
2403885	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-4-ol	JP/ICCA	LP
2867472	2-Dimethylaminoethyl methacrylate	JP/ICCA	LP
3319311	Tris(2-ethylhexyl)benzene-1,2,4-tricarboxylate	JP/ICCA	LP
3452979	3,5,5-Trimethyl-1-hexanol	JP/ICCA	LP
7775113	Sodium chromate	UK:eu	FW
7778509	Potassium dichromate	UK:eu	FW
7789095	Ammonium dichromate	UK:eu	FW
10588019	Sodium dichromate	UK:eu	FW
16219753	5-Ethylidene-2-norbornene	JP/ICCA	LP
90387578	Formaldehyde, reaction products with sulfonated 1,1'-oxybis[methylbenzene], sodium salts	DE/ICCA	FW

(注) FW = The substance is a candidate for further work. (追加の調査研究作業が必要) LP = The substance is currently of low priority for further work. (現状では追加作業の必要なし)。略号は Aus: オーストラリア, CH: スイス, DE: ドイツ, FR: フランス, IT: イタリア, JP: 日本, NL: オランダ, PT: ポルトガル, UK: 英国, US: 米国である。ICCA は国際化学工業協会協議会による原案提出を示す。eu は欧州共同体でのリスク評価文書をもとにしたことを意味する。



## Comparison of the Hershberger assay and androgen receptor binding assay of twelve chemicals

Kanji Yamasaki\*, Masakuni Sawaki, Shoji Noda, Takako Muroi, Saori Takakura, Hideo Mitoma, Satoko Sakamoto, Makoto Nakai, Yoshikuni Yakabe

*Chemicals Assessment Center, Chemicals Evaluation and Research Institute, 3-822, Ishii, Hita, Oita 877-0061, Japan*

Received 28 May 2003; received in revised form 29 September 2003; accepted 29 September 2003

### Abstract

We performed the Hershberger assay of 12 chemicals based on the OECD draft protocol. The chemicals tested by the Hershberger assay were phthalic acid di-*n*-hexyl ester, phthalic acid di-*n*-amyl ester, phthalic acid di-*n*-propyl ester, diethylstilbestrol, 17 $\beta$ -estradiol, tamoxifen, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, dichlorodiphenyldichloroethane, cyproterone acetate, 6 $\alpha$ -methyl-17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone, atrazine, and spironolactone. Phthalic acid di-*n*-hexyl ester, phthalic acid di-*n*-amyl ester, and phthalic acid di-*n*-propyl ester are phthalates; diethylstilbestrol and 17 $\beta$ -estradiol are estrogenic chemicals; tamoxifen is partial estrogen receptor antagonist with mainly estrogenic properties; 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone is an androgen derivatives; dichlorodiphenyldichloroethane is a reference androgen antagonistic chemical; cyproterone acetate, 6 $\alpha$ -methyl-17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone, and spironolactone have an androgenic steroid structure and are known as androgen antagonistic chemicals; and atrazine is a reference endocrine disruptor. We also subjected these chemicals to the receptor binding assay for androgen.

A clear androgen agonistic effect was detected in 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, and an androgen antagonistic effect was observed in five chemicals: cyproterone acetate, spironolactone, 6 $\alpha$ -methyl-17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone, phthalic acid di-*n*-amyl ester, and dichlorodiphenyldichloroethane. By contrast, diethylstilbestrol, 17 $\beta$ -estradiol, tamoxifen, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, dichlorodiphenyldichloroethane, cyproterone acetate, 6 $\alpha$ -methyl-17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone, and spironolactone were positive in the receptor binding assay for androgen. Three estrogenic chemicals, diethylstilbestrol, 17 $\beta$ -estradiol, and tamoxifen, were negative in the Hershberger assay with receptor binding affinity. On the other hand, the Hershberger assays of three phthalates were performed at the same dosages, and the results showed androgen antagonistic affinity only in the assay of phthalic acid di-*n*-amyl ester without receptor binding affinity.

© 2003 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Androgenic effect; Castration; Endocrine; Hershberger assay; OECD draft protocol; Rat; Receptor binding assay

### 1. Introduction

Because of concern that certain chemicals may have the potential to interfere with the normal sexual differentiation and development of animals and humans (McLachlan, 1993; McLachlan and Korach, 1995), the Organization for Economic Co-operation and

\* Corresponding author. Tel.: +81-973-24-7211; fax: +81-973-23-9800.

E-mail address: [yamasaki-kanji@ceri.jp](mailto:yamasaki-kanji@ceri.jp) (K. Yamasaki).

Development (OECD) has initiated a project to revise existing guidelines and develop new screening and testing guidelines to aid in the identification and assessment of such toxicants (OECD, 1998, 2000, 2003).

Assays to detect androgenic properties have been developed since the 1930s (Korenchevsky, 1932; Korenchevsky et al., 1932, 1933a,b; Bülbring and Burn, 1935; Dingemans et al., 1935; Deanesly and Parkes, 1936; Wainman and Shipounoff, 1941; Eisenberg et al., 1949; Eisenberg and Gordan, 1950; Di Salle et al., 1994), and the capabilities of the assays were demonstrated in 1953 by Hershberger et al. when they analyzed the response of the ventral prostate, seminal vesicles and coagulating glands, and the levator ani without the bulbocavernosus muscle to a number of active chemicals, including estrogens and progesterones (Hershberger et al., 1953).

In the 1970s and 80s, the discovery of the androgen receptor and the first compounds that acted as antagonists of the receptor, such as cyproterone acetate, was followed by modification of the assay to address antagonistic activity. Briefly, a fixed dose of a reference agonist was administered to several groups of animals that were also administered a set of doses of the purported antagonist. This modified system was successfully used by several investigators to assay androgen antagonists (Peets et al., 1973; Raynaud et al., 1980, 1984; Wakeling et al., 1981).

Based on the recommendations of scientific workshops, both the US Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) (USEPA, 1998) and the OECD Endocrine Disrupter Testing and

Assessment Group (EDTA) of the OECD (OECD, 2000) have proposed this assay as a Tier-1 screen to identify possible reproductive and developmental toxicants acting through androgen agonist and antagonist mechanisms.

We performed the Hershberger assay on 30 chemicals having estrogenic properties in our previous study (Yamasaki et al., 2003). In the present study, we performed the Hershberger assay on 12 chemicals based on the OECD draft protocol and assessed the androgen receptor binding assay for the same chemicals to confirm the usefulness of the assay.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Hershberger assay

The studies were performed under Good Laboratory Practice guidelines.

#### 2.1.1. Chemicals

The chemicals tested in the Hershberger assay are listed in Table 1, and their chemical structures are shown in Fig. 1. Phthalic acid di-*n*-hexyl ester, phthalic acid di-*n*-amyl ester, and phthalic acid di-*n*-propyl ester are phthalates; diethylstilbestrol and 17 $\beta$ -estradiol are estrogenic chemicals; tamoxifen is partial estrogen receptor antagonist with mainly estrogenic properties; 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone is an androgen derivative; dichlorodiphenyldichloroethane is a reference androgen antagonistic chemical; cyproterone

Table 1  
Chemicals tested in this study

Chemicals	CAS No.	Purity (%)	Source
Phthalic acid di- <i>n</i> -hexyl ester	84-75-3	99.3	Tokyo Kasei Kogyo, Co.
Phthalic acid di- <i>n</i> -amyl ester	131-18-0	99.5	Tokyo Kasei Kogyo, Co.
Phthalic acid di- <i>n</i> -propyl ester	131-16-8	98.4	Tokyo Kasei Kogyo, Co.
Diethylstilbestrol	56-53-1	99.8	Wako Pure Chemicals
17 $\beta$ -Estradiol	50-28-2	99.2	Wako Pure Chemicals
Tamoxifen	10540-29-1	>99	Sigma Chemical Co.
5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone	521-18-6	99	Tokyo Kasei Kogyo, Co.
Dichlorodiphenyldichloroethane	72-54-8	97.2	Aldrich Co.
Cyproterone acetate	427-51-0	100.3	Sigma Chemical Co.
6 $\alpha$ -Methyl-17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone	520-85-4	97.4	Sigma Chemical Co.
Atrazine	1912-24-9	99.9	Kanto Chemical Co.
Spirolactone	52-01-7	99.5	Across Organics