

て検討した以下の研究が報告されている。

BBP (500 mg/kg)と除草剤である linuron (75 mg/kg)の精巣テストステロンに対する影響、生殖発生における影響、新生児 AGD と若年期乳輪数と成体時の生殖変化の関係を調べるために、BBP 単独、linuron 単独、linuron+BBP の併用投与を妊娠 15-19 日のラットに投与した。何れの投与でも精巣 T 及び P 低下、雄 AGD 短縮・乳輪数増加がみられたが、併用投与の作用は相加的であった。また、新生児の AGD や乳輪数増加は成熟期の AGD や乳頭保持、生殖器の奇形や生殖器官や組織の重量と有意に相関していた (Hotchkiss et al. 2004)。

ラットの妊娠 14-18 日に DBP 単独 (500mg/kg)、BBP 単独(500mg/kg)、DBP+BBP の混合 (それぞれ 500mg/kg)を投与した結果、生殖器の外表・内部奇形は DBP+BBP の混合投与が相加的に増加した。また、vinclozolin (50 mg/kg) + procymidone (50 mg/kg)、DBP (500mg/kg)+procymidone (50mg/kg)の混合投与でも尿道下裂や陰囊の増加などに相加作用が認められた[(Hotchkiss ら、出版予定)、(Gray et al. 2006; Howdeshell et al. 2008a; Rider et al. 2009)より要旨入手可]。

妊娠 8-18 日の SD ラットに単独または混合で BBP、DBP、DEHP、DEP、DiBP、DPP を (DPP : 100 mg/kg、それ以外は 300 mg/kg) 投与し、テストステロン生成に対する相加的な作用を調べるた研究で、胎児のテストステロン生成は相加的に減少した((Howdeshell et al. 2008b);DEHP の項参照)。また、妊娠 14-18 日の SD ラットに単独または混合投与で BBP、DBP、DEHP、vinclozolin、procymidone、prochloraz、linuron 投与した研究で、AGD の減少や乳頭保持などの抗アンドロゲン作用は相加的であった ((Rider et al. 2008) ; DEHP の項参照)。

ヒトへの影響としては、MBuP または MBzP の暴露が精子濃度の低下、精子の運動性の低下(Duty et al. 2003; Hauser et al. 2006)、血中フリーテストステロン量の減少(Pan et al. 2006)に関与していると示唆されている。しかし、インヒピン B や卵胞刺激ホルモンの血中濃度は MBuP または MBzP の影響を否定している(Duty et al. 2005)。また、BBP の暴露が子宮内膜症と関連しているという報告もある(Reddy et al. 2006)。

(4) 発生毒性

BBPの発生毒性に対する試験では、妊娠6-15日または妊娠7-15日の高用量の経口投与において、児死亡および催奇形性が確認されている。これらの毒性は、投与量および発育年齢に依存する。SDラット及びWistarラットの発生毒性に対するNOAELは、420-500 mg/kgとされ、750 mg/kg以上の投与では、

出生前死亡の増加、胎児の成長遅延、外表・骨格・内臓奇形がみられた(Field et al. 1989; Ema et al. 1992)。投与期間を妊娠0-20日に延長した結果、Wistarラットの発生毒性に対するNOAELは185 mg/kgであった。

MBuP及びMBzPのラットの催奇形試験(Ema et al. 1995; Ema et al. 1996a)においても、BBPを用いた試験(Ema et al. 1992)と同様の結果が得られ、MBuP及びMBzPがBBPの毒性に関与していることが示唆されたが、MBuP及びMBzPまたはBBPの間の毒性に対する量的比較はできていない。MBuPを用いたラットの試験では、1,000 mg/kgで移動精巣や精巣下降との関連が示唆された(Imajima et al. 1997)。これらの影響は、摂餌量減少によるものでなく化学物質そのものの毒性影響と考えられ(Ema et al. 1991)、胚吸収のメカニズムは黄体機能の低下によるプロゲステロンの減少と推定される(Ema et al. 1994)。

SDラットの2世代繁殖試験では100 mg/kgにおいてF₁児の体重低下が、また500 mg/kgにおいてF₁児のAGD短縮、精巣・精巣上体重量減少、FSHレベルの減少、精原細胞・精母細胞の減少がみられ、この試験における発生毒性のNOAELは20 mg/kgとされた(Nagao et al. 2000)。また、最近行われたSDラットの2世代繁殖試験では、250 mg/kgの投与でF₁・F₂児の絶対及び体重補正後のAGDの短縮がみられ、この試験におけるNOAELは50 mg/kgとされた(Tyl et al. 2004)。

CD-1マウスの母体及び発生毒性におけるNOAELは、182 mg/kgとされ、910 mg/kg (LOAEL) 以上の投与で胚吸収や出産前死亡、一腹当たりの生存児数減少、外表・骨格奇形がみられた(Price et al. 1990)。ウサギを用いた試験では、母体および生殖に対する毒性が10 mg/kgまでの投与で認められなかったが(Monsanto 1978)、最大耐量が定められなかったため、この試験結果の有用性には限界がある。

Wistarラットの交配・妊娠・授乳期間の低用量の飲水投与では1及び3 mg/L (0.14 及び0.385 mg/kg)で、出産後の児の死亡が増加した(TNO NaFRI 1998)。3 mg/Lの投与では再現性が得られ、LOAELは0.385 mg/kg (3 ppm)、NOAELは0.140 mg/kg (1 ppm)と判断された。しかし、これらの試験を行ったラボでは同時期に行った他の試験においても、非投与群を含む動物の生後0-4日の死亡数が多くなっており、試験の信頼性に疑問が残る。また、投与群単位の統計処理では有意差が認められたものの一腹単位では有意差が認められていない。更に、Wistarラットを用いた類似飲水投与試験 (1 mg/L) (Sharpe et al. 1995; Ashby et al. 1997)や、異なる飲水投与試験 (1 ppm: 0.170 µg/kg; 3 ppm: 0.540 µg/kg) や混餌投与試験 (1 ppm: 0.11 µg/kg; 3 ppm: 0.34 µg/kg) においても、児の死亡に影響はみられなかった(Bayer AG 1998)。

以上の結果より、発生毒性のNOAELは、2世代繁殖試験で抗アンドロゲン作用の指標とされるAGDの減少がみられたことから、50 mg/kgと判断された。

なお、経済産業省の報告

(<http://www.meti.go.jp/report/downloadfiles/g30701d46j.pdf>) によると、BBP(100,200,400mg/kg)を1群あたり雌雄各24匹のCrj:CD(SD)IGSラットに2世代にわたって強制経口投与した結果、児動物は100mgで雄動物の体重の低値及びAGDの低値がみられ、NOAELは100mg未満と判断された。また、環境省は、BBP (2,12,60,300ug/kg, 40,100,200,400,500,1000,2000mg/kg)を42日間強制経口投与した試験の結果、影響が既に報告されている用量付近(500mg/kg)でF1生存児数の減少、F1雄の体重減少やAGD短縮などの有意な所見が認められたと報告している。なお、F₂:F₁雌と無処置雄との2次交配結果の体重増加量の低値(60,300ug/kg)でも有意な反応が認められたが、その意義は今後の検討課題としている

(<http://www.env.go.jp/chemi/end/speed98/speed98-19.pdf>)。

ヒトへの影響としては、母乳中のMBuP及びMBzP濃度と児の精巣停留には相関関係がないものの、児の性ホルモン結合グロブリン量、卵巣刺激ホルモン/フリーテストステロン比率、フリーテストステロン量との相関関係がみられた(Main et al. 2006)。また、母親の血中MBuP及びMBzP濃度がAGD/体重の低下に関与していたという報告もある(Swan et al. 2005)。

(5) その他

IPCSの評価では、BBPの遺伝毒性は明らかに陰性であるが、2次的な影響であると考えられる染色体異常誘発性に関する曖昧な結果が示されている(IPCS (WHO) 1999)。

3. Di-n-Butyl Phthalate (DBP)

(1) トキシコキネティクス

DBPは、げっ歯類に経口投与すると、小腸に分泌される腓リパーゼにより、モノエステル体であるMBuPに急速に加水分解される(Rowland et al. 1977)。このモノエステル体は消化管から素早く吸収され、肝臓、腎臓や脂肪組織に分布するが、その後、主にグルクロン酸抱合体として急速に尿中に排泄されると考えられる(Williams and Blanchfield 1975; Foster et al. 1982)。他のフタル酸エステル類の様に、霊長類の消化管内における加水分解能や吸収能が、ラットと比較して低いというデータは得られていない。

ラットに30-40 mg/kgのDBPを経皮投与した結果、24時間以内に10-12%が尿中に排泄された(Elsisi et al. 1989)。ヒト及びラットの表皮膜を用いたin vitro試験では、ヒトの皮膚ではDBPの透過性がラットと比較して顕著に低いことが明らかとなっている(Scott et al. 1987)。

妊娠14日に¹⁴C-DBPを投与したラットの胎盤や胎児中の放射活性は、母動物の血清中放射活性の約65%であった(Saillenfait et al. 1998)。母動物の血清、胎盤及び胎児中の主要な代謝物はMBuPであった。

ラットにおけるDBPの組織分布については、組織へのMBuPの取り込みメカニズムとして、拡散限界やpHトラッピングを組み込んだPBPKモデルがKeysらにより開発されている(Keys et al. 2000)。このモデルは、げっ歯類のデータからヒトでの推定値を得るために作られたが、胎児や小児における推定値を算出するためのパラメータは含まれていない。

(2) 一般毒性

DBPの急性毒性は弱く、ラットにおける経口LD₅₀は8,000~20,000 mg/kgであることが報告されている(IPCS (WHO) 1997)。

生後5-6週のラット及びマウスを用いた反復混餌投与試験では、350 mg/kg以上の用量で毒性影響が認められた(BASF 1992; Marsman 1995)。主な標的臓器は肝臓であり、ラットでは、シアン化物非感受性パルミチル CoA 酸化活性の増加に加え、病理組織学的にもペルオキシソームの増殖が確認されている。ラットでは、赤血球数やヘモグロビンの低下などもみられており、さらに、720 mg/kg以上の投与により精細管萎縮や精子減少も認められた。DBPの反復投与毒性に関する最も低いNOAELは、Wistarラットを用いた3ヶ月間試験の結果から142 mg/kgと算出されている(BASF 1992)。DBPの慢性毒性や発がん性に関する報告はない。

(3) 生殖毒性

実験動物においては、上述の通り、ラットを用いた13週間混餌投与試験において、720 mg/kg以上の投与群で雄生殖器系への影響が認められている(Marsman 1995)。一方、マウスを用いた13週間混餌投与試験では、3,689 mg/kgの投与でもこのような影響は引き起こされていない(Marsman 1995)。2,000 mg/kgのDBPを7-9日間強制経口投与したラットやモルモットでは、顕著な精細管萎縮が観察されたのに対し、同様な投与を行ったマウスでは軽度な巣状萎縮のみが観察され、さらに、ハムスターではこのような精巣病変は引き起こされなかった(Gray et al. 1982)。雄の生殖機能や生殖器発達への影響に関しては、ラットを用いた多くの研究結果が報告されている。

Sprague-Dawley ラットへの混餌投与による連続交配試験では、F₁雄動物において精細管変性が用量依存的に増加し、509~794 mg/kg 投与群では、精巣上体の欠損・発育不全、精巣の精子細胞数の低下や間細胞過形成、さらには交尾率/受胎率の低下が認められた (Wine et al. 1997)。この試験では、すべての投与群で生存同腹児数や生存児重量の低下がみられたことから、LOAEL は 52~80 mg/kg と結論された。Long Evans ラットを用い、離乳時より DBP を反復強制経口投与した試験では、250 mg/kg 以上のすべての投与群で亀頭包皮分離の遅れがみられ、さらに、500 mg/kg 以上の投与群では、精細管萎縮、精子産生能の低下及び繁殖能の低下 (未投与雌動物と交配) が認められた (Gray et al. 1999)。妊娠期及び受乳期のみにも母体を介して暴露された F₁ 動物においても、尿生殖器の奇形、精子数の低下や繁殖能の低下が観察されている。CD ラットの妊娠 12~21 日に DBP を強制経口投与した試験では、雄児の生殖器奇形や乳頭/乳輪保持などがみられ、NOAEL は 50 mg/kg と結論された (Mylchreest et al. 1999; Mylchreest et al. 2000)。この試験では、生後 3 ヶ月時に剖検を行ったところ、低頻度であるものの、ライディッヒ細胞の増殖性変化 (過形成及び腺腫) が観察されたことが報告されている。また、より低い用量でも生殖器発達への影響が引き起こされたことが研究報告されている (Lee et al. 2004)。この試験では、CD(SD)IGS ラットに妊娠 15 日から出産後 21 日まで DBP を混餌投与した結果、雄児では精母細胞の発達低下がみられ、さらに雌雄児において乳腺の変化が観察された。児を生後 8~11 週時に剖検した結果、精巣の病変は軽度であったものの、雄動物の乳腺にはより顕著な変化 (腺房変性や萎縮) が観察された。これらの変化は最低用量群である 1.5~3.0 mg/kg 投与群でも認められたため、NOAEL を設定することが出来なかった。

雌の生殖機能への影響については、CD-1 マウスを用いた連続交配試験において、1,750 mg/kg 投与群の雌動物を未投与雄動物と交配させた結果、受胎率や生存同腹児数の低下などが認められたことが報告されている (Lamb et al. 1987)。さらに、Long Evans ラットに、離乳後より、250, 500, 1000 mg/kg の DBP を強制経口投与し、未投与雄動物と交配させた試験では、500 mg/kg 以上の投与群で出産率及び同腹児数の顕著な低下がみられ、DBP は妊娠中期に流産を引き起こすことが明らかとなった (Gray et al. 2006)。これらのことから、上述の Sprague Dawley ラットを用いた連続交配試験 (Wine et al. 1997) や Long Evans ラットを用いた多世代試験 (Gray et al. 1999) で観察された、繁殖能の低下や生存同腹児数の低下等には、雌の生殖機能への影響が関与している可能性も考えられる。

なお、環境省は DBP (31,63,125,250,500ug/kg, 40,50,200,250,1000mg/kg) を 42 日間強制経口投与した結果、影響が既に報告されている用量付近

(250mg/kg) で F₁ 雄の AGD 短縮や、生殖器及び副生殖器の欠損・低形成・萎縮などの有意な所見が認められたと報告している

(<http://www.env.go.jp/chemi/end/speed98/speed98-19.pdf>)。

なお、DBP を含む複数のフタル酸エステルを投与して際の複合影響について検討した以下の研究が報告されている。

Howdeshell らは、SD ラットの妊娠 14~18 日に DBP または DEHP を単独または複合投与した研究において、性成熟した雄の尿道下裂や精巣上体不全、生殖器重量の低下、生殖細胞の変異などを相加的に増加させることや、生後 13 日での AGD の減少、妊娠 18 日でのテストステロン生成、insl3 および cyp11a の遺伝子発現に相加的作用が認められること報告している ((Howdeshell et al. 2007); DEHP の項参照)。

DBP (500mg/kg) と BBP(500mg/kg) を単独または混合で性分化期に投与した研究で、生殖器の外表・内部奇形が増加した [(Hotchkiss ら) 出版予定]; 要旨は、(Gray et al. 2006b; Howdeshell et al. 2008a) より入手可]

妊娠 8~18 日の SD ラットに単独または混合で BBP、DBP、DEHP、DEP、DiBP、DPP を (DPP: 100 mg/kg、それ以外は 300 mg/kg) 投与し、テストステロン生成に対する相加的な作用を調べる研究で、胎児のテストステロン生成は相加的に減少した ((Howdeshell et al. 2008b); DEHP の項参照)。また、妊娠 14~18 日の SD ラットに単独または混合投与で BBP、DBP、DEHP、vinclozolin、procymidone、prochloraz、linuron 投与した研究で、AGD の減少や乳頭保持などの抗アンドロゲン作用は相加的であった ((Rider et al. 2008); DEHP の項参照)。

Wistar ラットの妊娠 13~21 日に DEHP(150mg/kg) と DBP(100, 500mg/kg) を単独または混合投与を行った結果、精細管の径の減少や、原生殖細胞の多角細胞化などが混合投与で認められたが、単独投与では認められなかった ((Martino-Andrade et al. 2008); DEHP の項参照)。

ヒトでのデータとしては、任意に抽出された大学生を対象とした研究で、精液の細胞分画中の DBP 濃度と精子密度との間に負の相関関係が見られたことが報告されている (Murature et al. 1987)。しかし、精子の質と DBP 濃度との因果関係については十分なデータは得られていない。また、近年 DBP、MBuP または MBzP の暴露が、精液量の低下 (Zhang et al. 2006)、精子濃度の低下、精子の運動性の低下 (Duty et al. 2003; Hauser et al. 2006)、血中フリーテストステロン量の減少 (Pan et al. 2006) に関与していると報告されている。しかし、インヒピン B や卵巣刺激ホルモンの血中濃度は MBuP または MBzP の影響を否定するものであった (Duty et al. 2005)。Colon らは、プエルトリコの女児にみられる乳房の早熟と DBP 暴露とに相関関係があると報告している

(Colon et al. 2000)。また、DBP 暴露が子宮内膜症と関連しているという報告もある(Reddy et al. 2006)。

(4) 発生毒性

Wistar ラットの妊娠 7~15 日に DBP を強制経口投与した結果、生存同腹胎児数及び生存胎児重量の低下や口蓋裂が引き起こされ、NOAEL は 500 mg/kg と結論された (Ema et al. 1993)。その後、Wistar ラットの妊娠 11~21 日に混餌投与を行ったところ、555 mg/kg 以上の投与群の雄児で停留率丸や肛門生殖突起間距離の低下が引き起こされることが明らかとなった (Ema et al. 1998)。DBP による生殖器発達への影響に関しては、上述の通り、多くの研究が報告されている (“3. 生殖毒性” 参照)。特に、Lee らによる研究では、最低用量群 (1.5~3.0 mg/kg) でも、雄児の精母細胞の発達低下や乳腺の変化が観察されており、DBP の生殖器発達への影響に関する NOAEL は得られていない (Lee et al. 2004)。

妊娠ラットに MBuP を投与した試験で観察された発生毒性プロファイルやその用量依存性、時期特異性は、DBP と類似していることが明らかになっている (Ema et al. 1995; Ema et al. 1996b; Imajima et al. 1997)。実際に、妊娠 14 日に放射標識した DBP を強制経口投与した Sprague-Dawley ラットの胎児から検出された放射活性は、主に MBuP やそのグルクロン酸抱合体由来のものであることが報告されていることから (Saillenfait et al. 1998)、DBP の発生毒性には MBuP が原因物質として関与していると考えられる。

マウスの妊娠期や授乳期に DBP を投与した試験では、454 mg/kg 以上の投与により同腹胎児/児数や胎児/児重量の低下が報告されている (Shiota et al. 1980; Shiota and Nishimura 1982; Marsman 1995)。さらに、ICR マウスの妊娠 0~18 日に混餌投与した試験では、80 mg/kg 以上のすべての投与群で骨化遅延が見られたことから、マウスにおける DBP の発生毒性に関する NOAEL は得られていない (Shiota et al. 1980; Shiota and Nishimura 1982)。しかし、マウスを用いたこれらの試験では、各群の動物数が少ない、影響の与えられる可能性がある投与群で剖検が行われていない、適切な発達/成熟指標の評価が行われていない、など、試験デザインが適切ではないため、DBP の発生毒性が十分に評価されているとは言えない。

ヒトへの影響としては、母乳中の MBuP 及び MBzP 濃度と児の精巣停留には相関関係がないものの、児の性ホルモン結合グロブリン量、卵胞刺激ホルモン/フリーテストステロン比率、フリーテストステロン量との相関関係がみられた (Main et al. 2006)。また、母親の血中 MBuP 及び MBzP 濃度が AGD/体重の低下に関与していたという報告もある (Swan et al. 2005)。

(5) その他

変異原性や関連する多くのエンドポイントについてレビューが行われており、その結果、DBP は遺伝毒性を示さないと結論されている (IPCS (WHO) 1997)。

4. Diisononyl Phthalate (DINP)

(1) トキシコキネティクス

ラットに 500 mg/kg までを経口投与した場合、消化管で腸リパーゼによって代謝された後、フタル酸モノイソノール (MINP) として速やかに吸収され、蓄積せず糞尿に排出された (Midwest Research Institute 1983b)。ラットでの皮膚吸収は 7 日間で 4%未満と少ない (Midwest Research Institute 1983a) が、DEHP の *in vitro* 試験から、ヒトでの吸収量はさらに少ないと考えられる (Scott et al. 1987)。また、胆汁経路の排出も認められた (Midwest Research Institute 1983a)。

(2) 一般毒性

13 週間、成熟マーモセットに 0、100、500、2,500 mg/kg を強制経口投与したところ、高用量で体重や体重増加量の減少がみられ (Hall et al. 1999)、NOAEL は 500 mg/kg であった。

2 週間、思春期前 (生後 2 年) のカニクイザルに 0、500 mg/kg の DINP を強制経口投与したところ、500 mg/kg で白血球数に変化がみられ、本試験の NOAEL は設定できなかった (Pugh et al. 2000)。

成熟 F344 ラットに雄で 0、639、1,192、2,195 mg/kg、雌で 0、607、1,193、2,289 mg/kg の DINP-1 (CAS: 68515-48-0) を 21 日間混餌投与した場合、全用量の雌雄に肝重量の増加がみられ、ペルオキシゾーム酵素活性の用量依存的増加、高用量で肝細胞質の好塩基性や好酸球増加も認められた (BIBRA 1985)。低用量から影響がみられたため、本試験の NOAEL は設定できない。DEHP 陽性対照の 1 例に 1,084 mg/kg で中等度の精巣萎縮がみられたが、DINP では高用量でも精巣影響は認められなかった。

同じ試験計画の 2 年間混餌投与試験が 3 通り行われた。F344 ラットに、より低用量で DINP (異性体混合物) を投与した試験 (雄: 0、15、152、307、雌: 0、18、184、375 mg/kg) (Lington et al. 1997)、F344 ラットに、より高用量で DINP-1 を投与した試験 (雄: 0、29、88、359、733、雌: 0、36、