

DEHP の化審法優先化学物質（一次）リスク評価Ⅰにおいて、最小有害性評価値の根拠論文となった Zhang et al (2015)が、（一次）リスク評価Ⅱにおけるキースタディに選定される場合の化審法における問題点を考察する評価書

（一次）リスク評価において、最小有害評価値の根拠論文となった Zhang et al (2015)¹⁾では、雌 CD-1 マウスの交尾後 0.5 日—18.5 日（膣栓発見日＝交尾後 0.5 日）に 0.1% の DMSO を含む生理食塩水に溶解した DEHP 40 µg/kg 体重/日を経口投与して実験を行っている。交尾後 12.5 日に妊娠マウス（F0）の血清エストラジオールレベルを測定した。妊娠 F0 マウスは自然分娩させ、F1 児マウスを得た。選抜した F1 マウスは DEHP 非投与の雄マウスと交配させ、F2 児マウスを得た。生後 21 日の F1 及び F2 雌児卵巣の卵胞形成を調べた。さらに、F0 及び F1 マウスを交尾後 13.5 日にと殺し、雌生殖細胞のバイサルファイトシーケンシングを行った。DEHP 投与群において、F0 マウスのエストラジオールレベルは低下し、F1 マウス胎児における雌生殖細胞の減数分裂進行が遅れ、未成熟の細糸期及び合糸期染色体の割合が増加し、より進行した厚糸期及び複糸期染色体の割合が減少していた。交尾後 13.5 日には、減数分裂特異遺伝子 (*Stra8*) 及びタンパクレベルが低下し、よりメチル化していた。生後 21 日の F1 雌児の卵巣の病理組織学的検査では卵胞形成の変化、数少ない卵胞及び広範な生殖細胞嚢胞、がみられた。生後 21 日の F1 及び F2 マウス卵巣の原始卵胞の割合が低下し、二次卵胞の割合が上昇していた。DEHP 投与により卵胞形成関連遺伝子 (*Cx43, Egr3, Tff1, Ptgs2*) 発現がみられた。これらの結果から、DEHP は卵胞形成障害を引き起こすと結論している。

Zhang et al (2015)¹⁾の論文には、母体血清中のエストラジオールレベル測定結果に n=5 との記載があるだけで、対照群及び DEHP 投与群における使用動物数及び各検査に用いた標本数が記載されていない。生殖発生試験の各種ガイドラインでの使用動物の最小数は、生殖/発生毒性スクリーニング試験 (TG421)、反復投与試験と生殖発生毒性スクリーニング試験の併合試験 (TG422) における一群当たり最小 10 例である²⁾。また、発生毒性試験においては通常毒性試験とは異なり、母体に被験物質を投与して直接投与されていない次世代以降の児を検査するので、試験成績のばらつきは大きくなる。Zhang ら(2015)¹⁾における一群当たりの動物数が 5 例であるとしても十分な動物数を用いたとはいえない。Kimmel (2006)³⁾は少数の使用動物を用いた動物実験によるデータからは不十分な情報しか得られないと述べている。児の生後観察を行う場合、母体の栄養状態の影響を排除するために、一母体当たりの児数（通常一母体当たり 8-10 匹）を調整する⁴⁾。生殖発生毒性試験においては同一母体の個々の胎児または児は完全に独立して化学物質に反応するのではなく母体の化学物質に対する状態に影響されるので、統計処理においては母体ごとの児の検査結果の平均値を統計単位として用いる（すなわち、母体ごとの児検査値を平均し、この平均値が群の値となる）⁵⁾。しかしながら、本論文においては、児数の調整及び児検査結果の集計・統計方法についての記載はない。また、母体の影響 (litter effect) を避けるために児の検査を行う場合には同一母体の児のみを検査するのではなく、群内の母体から均等に選抜した児を用いて検査を行う必要があるが、このことについての記載もない。また、DEHP の用量が極めて少量であるので、通常（経口ゾンデを用いる強制経口投与、餌・飲

水に混じて与える等)の経口投与方法とは異なると考えられるが、投与方法の詳細についての記載がない。また、母体の一般状態や生殖発生毒性指標に関する記載もない。母体血清エストラジオールレベルの低下はそれに関連した生殖指標についての記述がないので、生物学的な意義が不明である⁶⁾。卵巣の卵胞数には個々の卵巣及び切片、測定者による大きな変動があり、卵胞数の変化と明確な生殖毒性との因果関係を示す報告はほとんどない⁷⁾ので、卵胞数の変化はリスク評価の単独のエンドポイントとして用いるべきではなく、他の生殖発生毒性の指標を含めて総合的に毒性を判断すべきである⁸⁾が、Zhangら(2015)¹⁾では生殖発生毒性指標についての記載はない。Zhangら(2015)¹⁾においては各卵胞の百分率を示しているが、各種卵胞の測定実数は示されていないので、他の報告結果との比較ができない。卵巣毒性検出には卵巣の病理組織学的検査が重要である⁷⁾が、Zhangら(2015)¹⁾においては卵巣の病理組織学的検査結果はSupplemental Figure 1として組織学的切片像が1例示されているだけである。生殖細胞嚢胞は対照群で17.50±1.41%、DEHP投与群で20.20±3.64%とわずかな差であった。投与物質による影響の用量—反応関係を明らかにすることは毒性を惹起する要因を確認するための重要な基準である³⁾が、本報告は40 µg/kg/dayの一用量のみの実験であるので用量—反応関係が不明である。Zhangら(2015)¹⁾の結果から、LOAEL(無毒性量)を40 µg/kg/dayとして規制値を設定することには疑問がある。

化学物質の有害性評価及びリスク評価においては、動物実験のデータの信頼性(Reliability: 実験方法は標準的方法に基づいているか、結果は明解で、実験方法から導かれた結果として妥当か)を評価し、信頼性の高いデータを採用する。一般的に、国際的に採用されている試験方法に従って実験が実施され、優良試験所基準(GLP、Good Laboratory Practice)に準拠した実験である場合、そのデータは信頼性があるとみなす。有害性評価に用いる動物実験データの信頼性に関しては、クリミッシュのコードを参考にし、以下の4つの信頼性コードに分類する⁹⁾。

コード1: 信頼性あり(国際的に認知された試験ガイドラインに従って実施された実験から得られたデータ。GLP下の実験が望ましい)。

コード2: 制限付き信頼性あり(試験ガイドラインに完全には一致していないが、科学的に許容できる実験から得られたデータ)。

コード3: 信頼性なし(コード1及びコード2以外の実験から得られたデータ。測定系と被験物質との間に干渉がある、非生理的な曝露経路である、実験方法が適切でない、記述が不十分である等の報告から得られたデータ)。

コード4: 評価できない(記述が十分でない短い要約又は書籍、レビュー等の二次資料に挙げられているだけの実験から得られたデータ)。

定量的な有害性評価には信頼性コード1及び2のデータを用い、信頼性コード3及び4のデータは用いない。

上記のようにデータの信頼性を確認したのちに化学物質の健康影響評価を行うことは、OECD化学物質共同評価プログラム¹⁰⁾、有害大気汚染物質の健康リスク評価¹¹⁾、化審法における人健康影響に関する有害性データの評価¹²⁾でも行われている。Zhang et al (2015)¹⁾は、試験動物数(各試験の標本数)、児の試験結果についての統計処理方法、卵巣の病理

組織学的所見及び経口投与方法の詳細、母動物の一般状態や生殖発生毒性指標、各種卵胞の測定実数などに関する記述が不十分であり、単一用量投与による試験で用量—反応関係が不明であることなどにより信頼性は低いと考えられ、規制値を設定するためのキースタディとするのは適切ではない。

DEHPの卵胞形成に対する影響を検討した結果（表—1）を下記に示した。

Hannonら（2014）¹³⁾は、雌CD-1マウス10日間20 µg, 200 µg, 20 mg, 200mgまたは750 mg/kg/day、または20日間20 µg, 200 µg, 20 mgまたは200 mg/kg/dayのDEHPを経口投与し、投与後の発情期の雌マウスをと殺して検査した。10日間投与後の20及び200 mg/kg/dayで原始卵胞の割合が低下し、20及び200 µg/kg/dayで一次卵胞の割合が上昇した。30日間投与では200 µg/kg/day及び20 mg/kg/dayで一次卵胞の割合の上昇がみられた。しかしながら、用量—反応関係は明確ではなく、10日間及び20日間投与で一貫した傾向はみられなかった。

Hannonら（2016）¹⁴⁾は、雌CD-1マウスに10日間20 µg, 200 µg, 20 mg, 200mgまたは500 mg/kg/dayのDEHPを経口投与し、投与後9か月の発情休止期の雌マウスをと殺して検査した。200及び500 mg/kg/dayで卵胞総数が減少し、20, 200及び500 mg/kg/dayで原始卵胞数が減少した。500 mg/kg/dayで一次卵胞数が減少し、原始卵胞の割合の低下、胞状卵胞の割合及び閉鎖胞状卵胞の割合の上昇がみられた。黄体数に変化はみられなかった。低用量域における卵胞形成に対する影響は観察されなかった。

Changら（2020a）¹⁵⁾は、雌CD-1マウスに10日間20 µg, 200 µg, 20 mgまたは200 mg/kg/dayのDEHPを経口投与し、投与直後、投与後6及び9か月の発情休止期に雌マウスをと殺して検査した。投与後9か月において20及び200 mg/kg/dayで前胞状卵胞の割合の上昇がみられたが、投与直後及び投与後6か月の原始卵胞、一次卵胞、前胞状卵胞及び胞状卵胞の割合に投与の影響はみられず、投与後9か月の原始卵胞、一次卵胞及び胞状卵胞の割合に投与の影響はみられなかった。低用量域における卵胞形成に対する影響は観察されなかった。投与後9か月にみられた前胞状卵胞の割合の上昇には用量—反応関係はみられなかった。本報告では、5匹のマウスが死亡または安楽死させられた。致死量よりはるかに低い量を投与されていたにもかかわらず死亡等が認められたことは、動物取扱または動物飼育環境に問題があったことを示唆しており、実験が適切に行われなかった可能性が懸念される。

Changら（2020b）¹⁶⁾は、雌CD-1マウスに10日間20 µg, 200 µg, 20 mgまたは200 mg/kg/dayのDEHPを経口投与し、投与後12, 15及び18か月に雌マウスをと殺して検査した。12か月において200 mg/kg/dayで不健全卵胞の割合が低下し、20 mg/kg/dayで一次卵胞数が減少した。15か月では200 µg/kg/dayで前胞状卵胞数の増加及び胞状卵胞の割合の低下がみられた。18か月では卵胞形成への影響は観察されなかった。卵胞形成に対する影響に用量—反応関係はみられなかった。

Chaら（2018）¹⁷⁾雌雄のCD-1マウスに133 µg/Lまたは1330 µg/LのDEHPを含む飲水を10週間（雌では交配前2週間、交配中2週間、妊娠及び授乳中6週間）与えた。1330 µg/L群において一次卵胞数、二次卵胞数及び三次卵胞数の増加がみられた。マウスの体重及び飲水量のデータは示されていない（因みに、既存の報告¹⁸⁾における妊娠及び授乳中の飲

水量から計算すると、DEHP 摂取量は 133 µg/L 群で 32-132 µg/kg/day、1330 µg/L 群で 315-1325 µg/kg/day となる)。

Niermann ら (2015)¹⁹⁾は、CD-1 マウスの妊娠 11 日—分娩日に 20 µg, 200 µg, 200 mg, 500 mg または 750 mg/kg/day を経口投与し、雌 F1 児の生後 8 及び 21 日に卵巣検査を行った。生後 8 日の原始卵胞数、一次卵胞及び前胞状卵胞数に DEHP 投与の影響はみられなかった。生後 21 日の卵巣では 200 µg, 500 mg で前胞状卵胞数が増加していたが、用量—反応関係は認められなかった。

Mirihagalle ら (2019)²⁰⁾は、CD-1 マウスの交尾後 10.5 日—交尾後 18.5 日に 20 µg/kg/day を経口投与し、雌 F1 児の生後 8 日及び 21 日に卵巣検査を行った。生後 8 日及び 21 日の卵巣検査の結果、原始卵胞、一次卵胞及び前胞状卵胞の数及び割合、総卵胞数に投与の影響はみられなかった。

以上に示したように、雌マウスに DEHP を投与した結果では低用量域での DEHP の影響はみられなかったかまたは影響がみられても用量—反応関係が認められなかった。高用量での卵胞形成に対する影響にも用量—反応関係は認められなかった。妊娠マウスに DEHP を投与し、その雌児 F1 の卵胞形成に対する影響が認められることもあるが、用量—反応関係は認められていない。このようなことから、卵胞形成の変化はリスク評価の単独のエンドポイントとして用いることは適切ではないと考えられる。

化審法における人健康影響に関する有害性データの信頼性評価等について (改訂第 2 版)¹²⁾では、有害性データの評価は Klimisch ら (1997)⁹⁾に従って信頼性を評価し、コード 1 及び 2 のデータを有害性評価に用いるとしている。また、化学物質の有害性に係る既存知見のうち、既に専門家によりレビューされ、信頼性が評価されている情報源や有害性データを最大限活用し、それらについては基本的に新たな信頼性評価は行わないとしている。しかしながら、データの正確性を担保するためにできる限り元論文を用いてデータの評価を行う必要がある。優勢順位 1 に分類されている ATSDR: Toxicological profile for di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) (2022)⁶⁾において、Zhang et al (2015)¹⁾は MRL (最小リスクレベル) のワークシートで Principal study として掲載されている (Appendix A, A13-A-16)。しかしながら、Zhang ら (2015)¹⁾の論文には信頼性に問題があり、当論文の結果である卵胞形成に対する影響を生殖発生毒性のエンドポイントとすることは不適切である。

引用文献

- 1) Zhang X-F, Zhang T, Han Z, Liu J-C, Liu Y-P, Ma J-Y, Li L, Shen W (2015) Transgenerational inheritance of ovarian development deficiency induced by maternal diethylhexyl phthalate exposure. *Reprod Fertil Develop*, 27, 1213-1221.
- 2) 国立医薬品食品衛生研究所安全性予測部 (2022) OECD テストガイドライン/化学物質安全性情報、<http://www.nihs.go.jp/hsc/chem-info/oecdindex.html> (2022. 7.14 確認)
- 3) Kimmel CA, Kimmel GL, Euling SY (2006) Developmental and reproductive toxicity risk assessment for environmental agents. in *Developmental and Reproductive Toxicology*, 2nd edition (Edited by Hood RD), pp. 841-875, Taylor and Francis.
- 4) Christian MS, Hoberman AM, Lewis EM (2006) Perspective on the developmental and reproductive toxicity guidelines, in *Developmental and Reproductive Toxicology*, 2nd edition (Edited by Hood RD), pp. 733-798, Taylor and Francis.

- 5) Holson JF, Nemecek MD, Stump DG, Kaufman LE, Lindstrom P, Varsho BJ (2006) Significance, reliability, and interpretation of developmental and reproductive toxicity study findings, in *Developmental and Reproductive Toxicology*, 2nd edition (Edited by Hood RD), pp. 329-424, Taylor and Francis.
- 6) ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2022) Toxicological Profile for di(ethylhexyl)phthalate (DEHP), <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp9.pdf> (2022. 7. 14 確認)
- 7) Regan KS, Cline JM, Creasy D, Davis B, Foley GL, Lanning L, Latendresse, Makris S, Morton D, Rehm S, Stebbins K (2005) STP position paper: Ovarian counting in the assessment of rodent reproductive toxicity. *Toxicol Pathol* 33, 409-412.
- 8) Parker RM (2006) Testing for reproductive toxicity, in *Developmental and Reproductive Toxicology*, 2nd edition (Edited by Hood RD), pp. 425-488, Taylor and Francis.
- 9) Klimisch H-J, Andreae A, Tillmann U (1997) A systemic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. *Regul Toxicol Pharmacol*, 25, 1-5.
- 10) 松本真理子、高橋美加、平田睦子、小野 敦、広瀬明彦 (2012) OECD 高生産量化学物質点検プログラムから OECD 化学物質共同評価プログラムへ、*化学物質管理*、8, 173-232
- 11) 国立環境研究所 (2022) 令和 3 年度 有害大気汚染物質の健康影響リスク評価手法等に関する検討等委託業務 報告書
- 12) 経済産業省 (2019) 化審法における 人健康影響に関する有害性データの信頼性評価等について (改訂第 2 版)、
https://www.neti.go.jp/policy/chemical_management/kashinho/files/information/r/a/reliability_criteria03.pdf (2022. 7.14 確認)
- 13) Hannon PR, Peretz J, Flaws JA (2014) Daily exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate alters estrous cyclicity and accelerates primordial follicle recruitment potentially via regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in adult mice. *Biol Reprod* 90, 1-11.
- 14) Hannon PR, Niermann S, Flaws JA (2016) Acute exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate in adulthood causes adverse productive outcomes later in life and accelerates reproductive aging in female mice. *Toxicol Sci*, 150, 97-108.
- 15) Chiang C, Lewis LR, Borkowski G, Flaws JA (2020a) Exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and diisononyl phthalate during adulthood disrupts hormones and ovarian folliculogenesis throughout the prime reproductive life of the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol*, 393, 114952.
- 16) Chiang C, Lewis LR, Borkowski G, Flaws JA (2020b) Late-life consequences of short-term exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and diisononyl phthalate during adulthood in female mice. *Reprod Toxicol* 93, 28-42.
- 17) Cha S, Jung K, Young M, Hwang YJ, Yang E, Lee S-H, Jung H, Cheon YP (2018) Nonmonotonic effects of chronic low-dose di(2-ethylhexyl) phthalate on gonadal weight and reproductive. *Dev Reprod*, 22, 85-94.
- 18) 雑賀 絢、多田幸恵、中村麻里、北条 幹、生嶋清美、前野 愛、湯澤勝廣、長澤明道、久保善一、安藤 弘、田中知良、鈴木 仁、猪又明子、守安貴子 (2020) ネオニコチノイド系農薬ジノテフランの CD-1 マウスによる次世代影響試験、*東京健安研セ年報*、71, 249-255.
- 19) Niermann S, Rattan S, Brehm E, Flaws JA (2015) Prenatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) affects reproductive outcomes in female mice. *Reprod Toxicol* 53, 23-32.

20) Mirihagalle S, You T, Suh L, Patel C, Gao L, Rattan S, Qiao H (2019) Prenatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate and high-fat diet synergistically disrupts mouse fetal oogenesis and affects folliculogenesis. *Biol Reprod*, 100, 1561-1570.

2022年8月26日

江馬 眞

