

DBP の生殖・発生毒性試験に関する追加文献
—Moody et al. 2013、Zhang et al. 2004—

① 生殖毒性試験（マウス）（追加試験）

雄の C57BL/6J マウスの生後 4 日から 10 日間又は生後 21 日（離乳時）まで DBP (0 (コーン油)、1、10、50*、100、250*、500 mg/kg 体重/日；*生後 4～14 日投与群の AGD 及び精巣相対重量データのみ) を強制経口投与し精巣の発達調べられた。生後 21 日まで投与したマウスは 8 週齢まで飼育した。

生後 14 日において、体幹長（前肢から尾の付け根までの長さ）で除した AGD（各群 5～10 匹）が対照群と比較して 1 mg/kg 体重/日以上以上の投与群で短縮し、500 mg/kg 体重/日投与群では 1～250 mg/kg 体重/日投与群より短く（いずれも $p < 0.05$ ）、同腹の雌（8 匹）と有意差がなかった¹。なお、体幹長に投与による変化はみられなかった。精巣相対重量（各群 9～23 匹²）は 50 mg/kg 体重/日以上以上の投与群で有意に減少した（ $p < 0.05$ ）。精巣の病理組織学検査（各群 8～9 匹）では、10 mg/kg 体重/日以上以上の投与群で生殖細胞に占める後期パキテン期精母細胞の割合が低下し、100 mg/kg 体重/日以上以上の投与群でセルトリ細胞核が中央部に位置する精細管/索の割合の増加、500 mg/kg 体重/日投与群で精原細胞やレプトテン期・サイゴテン期精母細胞の割合の増加及び精細管内腔が横断面に占める割合の減少（いずれも $p < 0.05$ ）といった、精子形成の遅れやセルトリ細胞の成熟抑制が示された。免疫組織化学的検査では（各群 6 匹）、10 mg/kg 体重/日以上以上の投与群で精巣のインヒビン α の発現が増強したが、FSH の血清濃度に投与による変化はなかった。血清 T の低下は 500 mg/kg 体重/日投与群でのみ認められた。

8 週齢では、AGD 及び体幹長（投与の影響なし）で除した AGD（各群 5～10 匹）が 1 mg/kg 体重/日以上以上の投与群で短縮したが（いずれも $p < 0.05$ ）、投与群間に有意差はなかった。剖検（各群 9～10 匹）では精巣相対重量が 500 mg/kg 体重/日投与群で減少し（ $p < 0.05$ ）、病理組織学的検査（各群 5～6 匹）では、全投与群で種々の程度の精細胞形成不全（減数分裂前後の生殖細胞の欠損及び部分的な精細管変性）が認められた。

以上の結果から、Moody らは思春期前の雄マウスへの 10 mg/kg 体重/日以上以上の DBP 投与で精巣体細胞数及び生殖細胞数への用量依存的影響を、1 mg/kg 体重/日投与で成長後にアンドロゲン作用障害性の表現型（AGD 短縮）を生じることを見出した。Moody らはラットで知られているより 50～500 倍低い用量の DBP でマウス精巣への急性影響がみられ、インヒビンの発現増加が潜在的な作用機序の一つであることを確認したと結論している。（Moody et al. 2013）。

¹AGD（と殺後のデジタル画像解析による測定）及び体重で除した AGD は 500 mg/kg 体重/日投与群で対照群より有意に短縮したが、その他の投与群での短縮の有意差に一貫性はなかった。

² 精巣相対重量の用量反応性は、同腹児数を共変数とし、腹数をランダム効果として調整した一般線形モデルによっても認められたため、以降の 14 日齢児の検討は各群 6～9 匹/4～5 腹の精巣に対して実施した（Moody et al. 2013）。8 週齢児の腹数について記載はない。

小野専門委員：LOAEL: 1mg/kg で評価書に記載することに同意します。本試験は、マウスでも雄性生殖系への影響が認められたことを示す結果として有用と考えます。しかし、本試験は、授乳期に強制経口投与しており、想定される暴露経路（?）にもよっては、TDI は Lee et al.2004 から求めるほうが妥当と考えます。

曾根専門委員：毒性試験のような完璧な記載ではないが、また、1群あたりの匹数が十分とはいえないかもしれないが、用量が4用量以上ある。エンドポイントに関して、病理所見の詳細な解析が行われており、他の文献と同様に評価書案に記載すべきであると考えます。

- Moody らの報告は、PND14 もしくは PND21 までの幼少期のホルモン変化に伴うと考えられる精巣重量の変化、精巣の病変的変化及び AGD とアンドロゲン受容体に関連した遺伝子発現を指標として評価している。

このうち、PND4 から 10 日間投与し PND14 で観察した場合、体長値で除した AGD において 1 mg/kg で影響が出ているが、補正しない場合は、50mg/kg/day より、体重で除した場合は、500 mg/kg/day で影響が出ている。さらに、PND4 から PND21 まで投与し 8 週齢で観察した場合、AGD に 1mg/kg/day から全用量において影響が出ている。体長値で除した補正でも同様に 1mg/kg/day から全用量において影響が出ている。体重で除した場合は、1 と 5mg/kg/day において影響が出ている。著者らはこの幼少期の投与試験をパイロット試験と位置づけて病理所見を定性的に解析している。

一方でホルモンレベルの変動は、PND7 及び 14 において FSH はどの用量も変化が認められない。血清インヒビンとテストステロンの値が PND14 の 500 mg/kg/day においてのみ影響が認められている。アンドロゲン受容体シグナル遺伝子発現の変動も 500 mg/kg/day でのみ観察されている。しかしながら、定性的な病理所見の解析では、10 mg/kg/day からパキテン後期の精母細胞の減少が認められている (Fig5C)。

総合的に判断すると、1 mg/kg/day では、ホルモン変動によるとみられる病理所見が定量化されていないため、1 mg/kg/day を LOAEL とする裏付け証拠がないに等しい。従って、この研究における LOAEL は 10 mg/kg/day と判断できる。これまでの DEHP の評価では、ホルモン変動のみの指標や精巣セルトリ細胞空胞変性のみで生殖・発生毒性を評価することは困難であるとされてきた。本研究において認められた 1mg/kg/day における AGD の減少も、それに起因するホルモンの変動や定量的な精巣の病理所見の裏付けがないため、判断は困難である。しかしながら、今後、裏付けデータが得られた場合には、幼少期の内分泌学的な所見における変化は、評価の対象として位置づけられる必要があるものとする。

・著者らは、今回の分子、内分泌と精巣の形態学的解析から、DBP はアクチビンの抑制因子インヒビンの上昇を介したアクチビンシグナル伝達の抑制による影響であると示唆しており、アクチビンAがアンドロゲン生合成酵素の調節に関与しているので、間接的な抗アンドロゲン作用によるものであると考えている。→事務局：著者らにより示唆されるメカニズムは（8）③へ記載いたしました。

田中専門委員：生殖毒性試験として NOAEL/LOAEL 設定のための実験（文献）には追加しない方が良くと思います。これまでの実験（文献）は、DBP に胎児期あるいは授乳を通じての暴露のものであり、この文献のように直接出生児に経口暴露した場合の摂取量の比較が出来ないからです。この文献に関しては、（8）③精巣毒性及び雄生殖器系の発生影響の作用機序に追加するだけで良くと思います。

中江専門委員：（組織病理所見についてコメント）病理組織学的所見が記載されており、その所見は信頼できると思います。ただし、組織学的な精巣病変が明らかなのは、8週齢で評価した成獣の全投与群で種々の程度の精細胞形成不全が認められています。

② 生殖・発生毒性試験（ラット）（追加試験）

SD ラット（雌、各群 20 匹）に、妊娠 1 日～出産後 21 日に DBP（0（コーン油、Tween 80）、50、250、500 mg/kg 体重/日）を強制経口投与し、児動物を生後 4 日に雌雄各 4 匹/腹に調整した各群 16 腹（最高用量群のみ 14 腹）を対象に児動物の発生及び成長した雄児の生殖系が調べられた。

母動物の体重に投与の影響はみられなかったが、対照群と比較して 500 mg/kg 体重/日投与群で出生児数が減少し、250 mg/kg 体重/日以上投与群で出生児体重（生後 1 日）が雌雄とも低値を示した（いずれも腹単位、 $p < 0.01$ ）。また、雄児動物（生後 4 日）の AGD 及び体重で除した AGD が短縮した（ $p < 0.05$ ）。精巣の病理組織学的解析では、250 mg/kg 体重/日以上投与群での用量依存的に増悪する精細胞形成不全が観察されている。

生後 70 日となった雄児動物（各群 20 匹）の剖検では、250 mg/kg 体重/日以上投与群で精巣上体の絶対重量が減少した（500 mg/kg 体重/日投与群では相対重量の減少も有意）（いずれも $p < 0.05$ ）。さらに 500 mg/kg 体重/日投与群では精巣萎縮又は精巣上体の発育不全（欠損 1 例を含む）がそれぞれ 6 匹に生じた。また、250 mg/kg 体重/日以上投与群では精巣上体の精子運動率の低下及び精巣の精細胞数の減少、500 mg/kg 体重/日投与群では精巣上体の精子数の減少がみられた（いずれも $p < 0.01$ ）。

著者らは児動物体重の低値及び雄児動物の生殖障害に基づき、生殖発生毒性の NOAEL を 50 mg/kg 体重/日と特定し、同様の試験系を用いて妊娠 12 日～21 日に DBP を投与した Mylcreest ら（2000）の試験と良く一致した結果が得られたとしている

1 (Zhang et al. 2004)。また、ECHA(2012b)はAGD短縮、雄性生殖器重量の低下及び
2 精子産生の低下に基づき生殖影響のNOAELを50 mg/kg体重/日とした。

3

小野専門委員：NOAEL 50 mg/kg 体重/日として評価書案に記載するということが良いと
思います。本試験のNOAELはLee et al.2004に比べ高いですが、本試験は強制経口投
与ですので、一概に比較は出来ないと思います。

曾根専門委員：1群あたりの匹数が十分にあり、用量も3種類ある。エンドポイントも生
殖発生毒性試験の一般的な所見と病理所見がある。他の文献と同等に評価書案に記載す
べきと思います。

著者がTable4に記載してあるとおり、NOAELは記載できる。公比が5と大きいので、
LOAELは、設定できないのではないかと。

田中専門委員：精巣毒性の指標だけではなくAGDや出生児の発生、発育に関する指標も調
べられており、各群の評価腹数も揃えられておりますのでNOAEL/LOAELの設定も可能
と思います。

中江専門委員：（組織病理所見についてコメント）F1成獣の精巣について病理組織学的解
析が為されており、中用量以上の投与群での用量依存的に増悪する精細胞形成不全が観
察されていて、その所見も信頼できると思います。

4

5

第 26 回用 追加検討毒性試験文献

試験番号	動物種系統	性別・動物数/群	投与期間	投与方法	用量 (mg/kg 体重/日) < 混餌等中濃度 >	NOAEL (N)/LOAEL (L) (mg/kg 体重/日) 及びその根拠エンドポイント< 用量 >	高用量でみられた影響、その他の影響 (mg/kg 体重/日) < 混餌等中濃度 >	文献
生殖	C57BL/6J マウス	雄 9~18(精巣重量)	PND4~6 (PND7 で剖検)	強制経口	0、1、10、50*、100、250*、500 (*PND14 の AGD、精巣相対重量データのみ)		PND7 ↓精巣相対重量、↑増殖セルトリ細胞率 (500)	Moody et al. 2013
		雄 9~23(精巣重量)、 6~9(その他)	PND4~13 (PND14 で剖検)			PND14 ↓AGD (1~) ↓後期パキテン期精母細胞割合、↑精巣のインヒビンα発現、↑精巣のコネキシン 34 発現 (10~)	PND14 ↓精巣相対重量、(50~) ↑セルトリ細胞核が中央部に位置する精細管割合、↑精巣の抗ミューラー管ホルモン発現 (100~) ↓精細管内腔の精巣横断面面積、↑血清インヒビンα濃度、↓血清 T 濃度 (500)	
		雄 9~10 (病理:5~6)	PND4~21 (8 週齢で剖検)			8 週齢 ↓AGD (1~) ・精細胞形成不全 (1~)	8 週齢 ↓精巣相対重量 (500)	
生殖・発生	SD ラット	雌 20、 PND4 に雌雄各 4/腹に調整：各群 16~14 腹	GD12~PND21	強制経口	0、50、250、500	N : 50 [ECHA、著者 (生殖発生)、ECHA (発生)] 児動物 (PND1) ↓雌雄の出生児体重、↓雄の AGD (250~) 雄児 (PND70) ↑肝臓相対重量、↓前立腺絶対・相対重量 (250) ↓精巣上体の絶対重量、↓精巣上体の精子運動率、↓精巣の精細胞数 (250~)	↓出生児数 (500) 雄児 (PND70) ↓精巣上体相対重量、↓肝臓絶対・相対重量 (500) ↓精巣上体の精子数 (500) ・精巣萎縮 6/20 匹、精巣上体形成不全 6/20 匹 (500)	Zhang et al. 2004

GD○：妊娠○日、PND○：生後○日

[機関名 (毒性等)]: NOAEL、LOAEL を設定した機関。欧州食品安全機関 (EFSA)、欧州化学物質庁 (ECHA)、米国国家毒性プログラム-ヒト生殖リスク評価センター (NTP-CERHR)、オーストラリア化学物質通知評価スキーム (NICNAS)