

## 平成17年度試験対象物質候補について

### 1. 検討を考慮する物質について

環境省が実施した試験において、環境中の濃度を考慮した濃度で**4-ノニルフェノール**(分枝型)と**4-t-オクチルフェノール**がメダカに対し内分泌かく乱作用を有することが推察された。

ノニルフェノール(**C=9**)とオクチルフェノール(**C=8**)は、アルキルフェノール類に属し、ノニルフェノールと**p-t-オクチルフェノール**以外のアルキルフェノール類において**p-t-ブチルフェノール(C=4)**について国内における使用実態に関する情報\*が得られている。

ノニルフェノールと**4-オクチルフェノール**以外のアルキルフェノール類について内分泌かく乱作用を有するか否かを確認する必要がある。

一方、ノニルフェノールとオクチルフェノールは、それらの前駆物質類が界面活性剤等として使用されており、環境中に放出されたそれらの前駆物質類が環境中で分解され、ノニルフェノールとオクチルフェノールを生成する。

環境中には分解過程の前駆物質類が存在することが想定され、前駆物質類について内分泌かく乱作用を有するか否かを確認する必要がある。

\***p-t-ブチルフェノール(4-t-ブチルフェノールと同じ物質)**の使用実態について

#### (1)用途

ポリカーボネート樹脂の分子量調節剤、油溶性フェノール樹脂(接着剤、インキ、ワニスなど)、各種合成樹脂変性(改質剤)、香料原料、安定剤原料(塩化ビニル)、界面活性剤ほか

#### (2)生産量

平成15年 20,000t(推定)

化学工業日報社(2005)14705の化学商品より

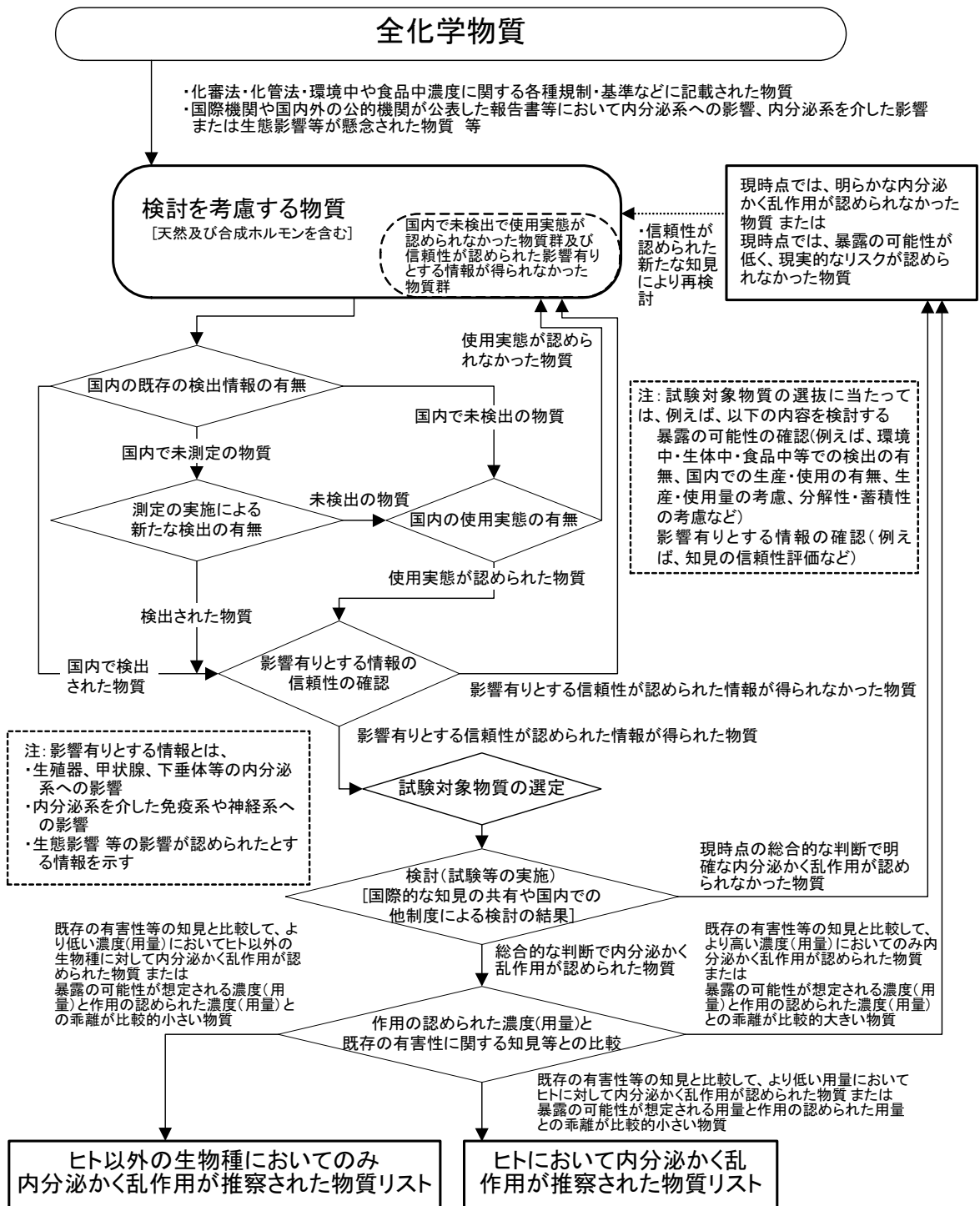
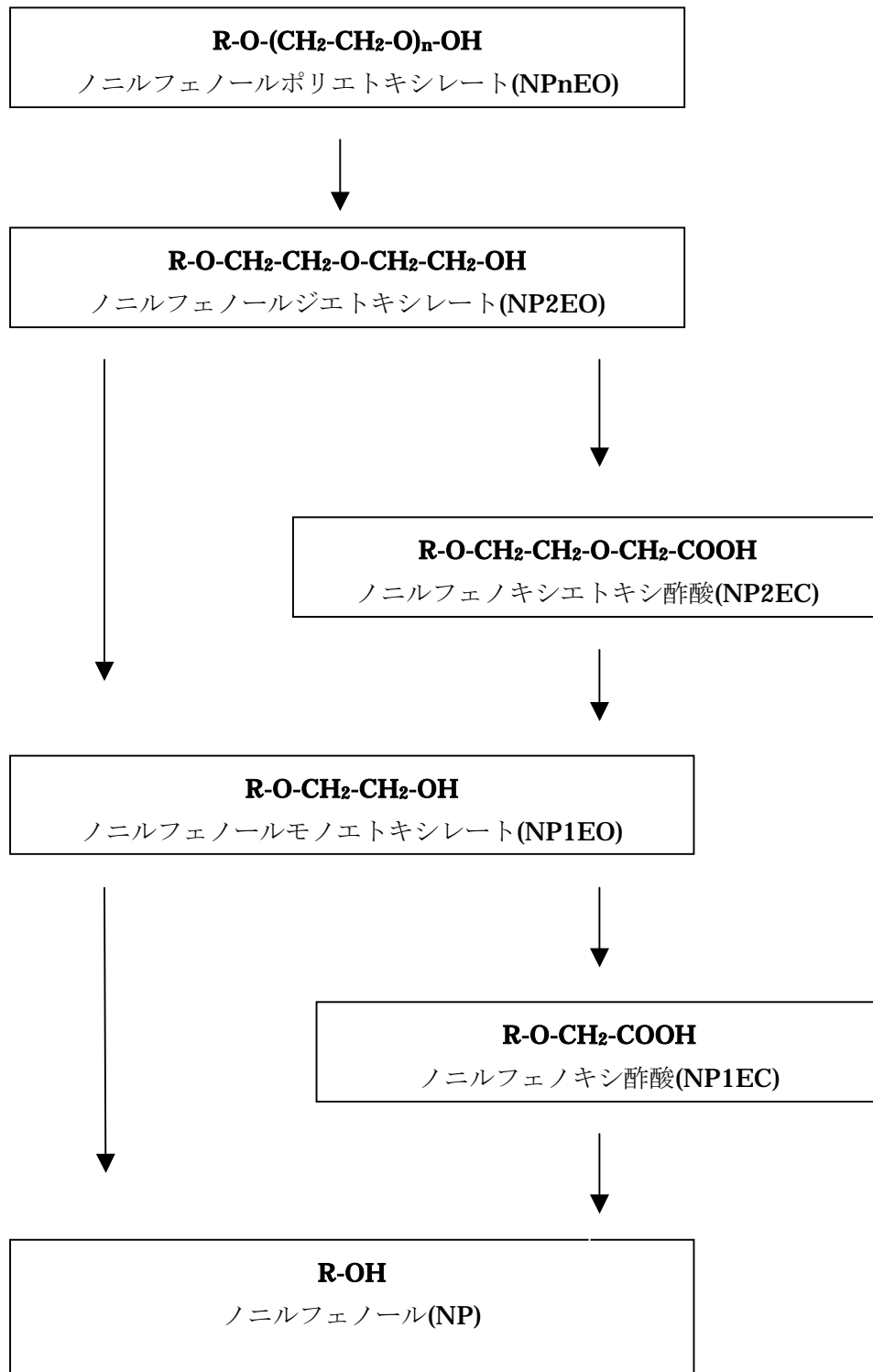


図6 化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験対象物質選定と評価の流れ



R : 4-ノニルフェニル基

図 ノニルフェノール関連化学物質の推定代謝経路

## 2. アルキルフェノール類、ノニルフェノール前駆物質類及びオクチルフェノール前駆物質類の検出状況について

アルキルフェノール類(ノニルフェノール及び 4-オクチルフェノールを除く)、ノニルフェノール前駆物質類及びオクチルフェノール前駆物質類を対照として環境省等が実施した水質調査における検出状況をまとめた。

4-t-ブチルフェノール、4-n-ペンチルフェノール、4-n-ヘキシルフェノール、4-n-ヘプチルフェノール、ノニルフェノールエトキシレート類(NP1-15EO)、ノニルフェノキシ酢酸類(NP1-10EC)及びオクチルフェノールエトキシレート類(OP1-10EO)が検出されていた。

環境省等による環境実態調査(水環境)最大検出濃度

[ $\mu$ g/L]

検出対象物質	1998 H10	1999 H11	2000 H12	2001 H13	2002 H14	2003 H15
4-t-ブチルフェノール	0.87	0.03	0.62	0.81	0.51	1.9
4-n-ブチルフェノール	ND(<0.01)	ND(<0.01)	ND(<0.01)	ND(<0.01)	-	-
4-n-ペンチルフェノール	ND(<0.01)	0.03*	ND(<0.01)	0.01	-	-
4-n-ヘキシルフェノール	ND(<0.01)	0.01*	ND(<0.01)	ND(<0.01)	-	-
4-n-ヘプチルフェノール	0.06	ND(<0.01)	ND(<0.01)	ND(<0.01)	-	-
NP1EO	-	-	-	-	0.8	2.5
NP2EO	-	-	-	-	9.5	11
NP3EO	-	-	-	-	1.8	7.6
NP4EO	-	-	-	-	1.2	8.8
NP5EO	-	-	-	-	0.8	7.6
NP6EO	-	-	-	-	0.5	7.0
NP7EO	-	-	-	-	0.3	8.0
NP8EO	-	-	-	-	0.1	8.5
NP9EO	-	-	-	-	ND(<0.1)	9.5
NP10EO	-	-	-	-	ND(<0.1)	9.6
NP11EO	-	-	-	-	ND(<0.1)	9.3
NP12EO	-	-	-	-	ND(<0.1)	7.6
NP13EO	-	-	-	-	ND(<0.1)	5.6
NP14EO	-	-	-	-	ND(<0.1)	4.4
NP15EO	-	-	-	-	ND(<0.1)	3.2

\*建設省調査

検出対象物質	1998 H10	1999 H11	2000 H12	2001 H13	2002 H14	2003 H15
NP1EC	-	-	-	-	-	2.9
NP2EC	-	-	-	-	-	20
NP3EC	-	-	-	-	-	3.2
NP4EC	-	-	-	-	-	1.1
NP5EC	-	-	-	-	-	0.7
NP6EC	-	-	-	-	-	0.4
NP7EC	-	-	-	-	-	0.48
NP8EC	-	-	-	-	-	0.84
NP9EC	-	-	-	-	-	0.80
NP10EC	-	-	-	-	-	0.91
OP1EO	-	-	-	-	2.7	ND(<0.3)
OP2EO	-	-	-	-	6.5	0.2 cf. 9.2 石津川
OP3EO	-	-	-	-	0.3	0.12
OP4EO	-	-	-	-	0.3	0.07
OP5EO	-	-	-	-	0.3	ND(<0.05)
OP6EO	-	-	-	-	0.2	ND(<0.05)
OP7EO	-	-	-	-	0.2	ND(<0.05)
OP8EO	-	-	-	-	ND(<0.1)	0.06
OP9EO	-	-	-	-	ND(<0.1)	0.09
OP10EO	-	-	-	-	-	0.11

## 水中濃度

検出対象物質	採取地点	採取試料	濃度 [ $\mu$ g/L]	採取年/月
OP2EO	大阪府 石津川	表層水	0.028-0.16	2003/12
OP2EO	千葉県 手賀沼	表層水	(0.01) <sup>a</sup> -0.09	2001/12
OP1EO	大阪府 石津川	表層水	(0.01) <sup>a</sup> -2.3	2003/12
OP1EO	千葉県 手賀沼	表層水	(0.01) <sup>a</sup> -0.09	2001/12
OP2EC	大阪府 石津川	表層水	1.6-4.7	2003/12
OP1EC	大阪府 石津川	表層水	0.32-0.82	2003/12
NP2EO	大阪府 石津川	表層水	1.0-5.5	2003/12
NP2EO	千葉県 手賀沼	表層水	(0.1) <sup>a</sup> -1.3	2001/1
NP1EO	大阪府 石津川	表層水	(0.1) <sup>a</sup> -2.3	2003/12
NP1EO	千葉県 手賀沼	表層水	(0.2) <sup>a</sup> -1.6	2001/1
NP2EC	大阪府 石津川	表層水	2.9-11	2003/12
NP1EC	大阪府 石津川	表層水	1.5-9.2	2003/12

## 底質濃度

検出対象物質	採取地点	採取試料	濃度 [ $\mu$ g/kg]	採取年/月
OP2EO	大阪府 石津川	底質	(2) <sup>a</sup> -3	2003/12
OP2EO	千葉県 手賀沼	底質	(2) <sup>a</sup>	2001/12
OP1EO	大阪府 石津川	底質	(2) <sup>a</sup> -13	2003/12
OP1EO	千葉県 手賀沼	底質	(2) <sup>a</sup> -7	2001/12
OP2EC	大阪府 石津川	底質	6-65	2003/12
OP1EC	大阪府 石津川	底質	(2) <sup>a</sup> -2	2003/12
NP2EO	大阪府 石津川	底質	(20) <sup>a</sup> -56	2003/12
NP2EO	千葉県 手賀沼	底質	20-880	2001/1
NP1EO	大阪府 石津川	底質	(20) <sup>a</sup> -510	2003/12
NP1EO	千葉県 手賀沼	底質	(50) <sup>a</sup> -12000	2001/1
NP2EC	大阪府 石津川	底質	(20) <sup>a</sup> -410	2003/12
NP1EC	大阪府 石津川	底質	(20) <sup>a</sup> -49	2003/12

a)検出下限値未満

平成 16 年度 第 2 回内分泌攪乱化学物質問題検討会資料(環境省、平成 16 年 12 月)資料 3-3 「内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズムの解明等基礎的研究」

<http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1602/index.html>、平成 15 年度 第 2 回内分泌攪乱化学物質問題検討会資料(環境省、平成 15 年 11 月)資料 2-3 平成 14 年度内分泌攪乱化学物質における曝露経路調査結果について」 <http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1502/index.html>

### 3. アルキルフェノール類の内分泌関連影響に関する文献調査・信頼性評価結果について

検出されたアルキルフェノール類、ノニルフェノール前駆物質類及びオクチルフェノール前駆物質類を被験物質とした哺乳類または魚類を用いた動物試験の信頼性が認められた結果が得られたのは、**4-t-ブチルフェノール**、ノニルフェノールジエトキシレートとノニルフェノールモノエトキシレートの混合物(**NP2EO20%+NP1EO80%**)及びノニルフェノキシ酢酸(**NP1EC**)であった。

文献調査においては、文献検索データベースとして情報源が比較的広い **MEDLINE** および **TOXLINE** を利用して、各検討物質ごとに内分泌に関連した報告の検索を行い、専門家により文献要旨の作成及び信頼性評価を行った。検索に用いたキーワードは、**(物質名 OR CAS 番号) AND (Endocrine OR Reproduction)**とした。



アルキルフェノール類の内分泌関連影響に関する文献調査・信頼性評価結果

文献	信頼性 評価	ブチルフェノール	ペンチルフェノール	ヘキシルフェノール	ヘプチルフェノール
Gimeno <i>et al.</i> (1996) <sup>1)</sup> eco	可		4-t-		
Gimeno <i>et al.</i> (1998) <sup>2)</sup> eco	可		4-t-		
Gimeno <i>et al.</i> (1998) <sup>3)</sup> eco	可		4-t-		
Gimeno <i>et al.</i> (1997) <sup>4)</sup> eco	可		4-t-		
Panter <i>et al.</i> (2002) <sup>5)</sup> eco	可		4-t-		
Seki <i>et al.</i> (2003) <sup>6)</sup> eco	可		4-t-		
Yokota <i>et al.</i> (2005) <sup>7)</sup> eco	可		4-t-		
Kudo & Yamauchi (2005) <sup>8)</sup> eco	未実施	2-t-			
Kwack <i>et al.</i> (2002) <sup>9)</sup> vivo	未実施	子宮内 mRNA 発現試験において影響なし	子宮内 mRNA 発現試験において影響なし		
Yamasaki <i>et al.</i> (2004) <sup>10)</sup> vivo, vitro	可/ある程度可	4-t- ラット子宮肥大↑ hER 競合阻害↑			
Haavisto <i>et al.</i> (2003) <sup>11)</sup> vivo, vitro	可	Vivo は影響なし ラット精巣細胞ホルモン産生↑			
Mueller & Kim(1978) <sup>12)</sup> vitro	未実施	4-s-	4-t-		
Jobling & Sumpter(1993) <sup>13)</sup> vitro	可	4-t- ニジマス肝細胞 Vtg↑			
Routledge & Sumpter (1997) <sup>14)</sup> vitro	可	4-t-, 4-s- hER 酵母転写活性↑	4-t-, 4-n- hER 酵母転写活性↑	4-t- hER 酵母転写活性↑	4-t-, 4-n- hER 酵母転写活性↑
Beresford <i>et al.</i> (2000) <sup>15)</sup> vitro	可	4-t- hER 酵母転写活性↑			
Smeets <i>et al.</i> (1999) <sup>16)</sup> vitro	可		4-t-		
Hornung <i>et al.</i> (2003) <sup>17)</sup> vitro	可		4-t-		
Myllymäki <i>et al.</i> (2005) <sup>18)</sup> vitro	可	4-t- ラット卵巣細胞ホルモン産生↓			
Olsen <i>et al.</i> (2002) <sup>19)</sup> vitro	可	4-t-, 4-n- hER 競合阻害↑			

2005年9月6日更新

- 1) Gimeno S, Gerritsen A, Bowmer T, and Komen H (1996) Feminization of male carp. *Nature*, 384, 221-222.
- 2) Gimeno S, Komen H, Gerritsen AGM, and Bowmer T (1998) Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-*tert*-pentylphenol during sexual differentiation. *Aquatic Toxicology*, 43, 77-92.
- 3) Gimeno S, Komen H, Jobling S, Sumpter J, and Bowmer T (1998) Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-*tert*-pentylphenol during spermatogenesis. *Aquatic Toxicology*, 43, 93-109.
- 4) Gimeno S, Venderbosch PWM, and Bowmer T (1997) Disruption of Sexual Differentiation in Genetic Male Common Carp (*Cyprinus carpio*) Exposed to an Alkylphenol during Different Life Stage. *Environmental Science and Technology*, 31, 2884-2890.
- 5) Panter GH, Hutchinson TH, Lange R, Lye CM, Sumpter JP, Zerulla M, and Tyler CR (2002) Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-) estrogenic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 319-326.
- 6) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, and Kobayashi K (2003) Fish full life-cycle testing for the weak estrogen 4-*tert*-pentylphenol on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 1487-1496.
- 7) Yokota H, Abe T, Nakai M, Murakami H, Eto C, and Yakabe Y (2005) Effects of 4-*tert*-pentylphenol on the gene expression of P450 11beta-hydroxylase in the gonad of medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 71, 121-132.
- 8) Kudo Y and Yamauchi K (2005) *In vitro* and *in vivo* analysis of the thyroid disrupting activities of phenolic and phenol compounds in *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences*, 84, 29-37.
- 9) Kwack SJ, Kwon O, Kim HS, Kim SS, Kim SH, Sohn KH, Lee RD, Park CH, Jeung EB, An BS, and Park KL (2002) Comparative evaluation of alkylphenolic compounds on estrogenic activity *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 65, 419-431.
- 10) Yamasaki K, Noda S, Imatanaka N, and Yakabe Y (2004) Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. *Toxicology Letters*, 146, 111-120.
- 11) Haavisto TE, Adamsson NA, Myllymäki SA, Toppari J, and Paranko J (2003) Effects of 4-*tert*-octylphenol, 4-*tert*-butylphenol, and diethylstilbestrol on prenatal testosterone surge in the rat. *Reproductive Toxicology*, 17, 593-605.
- 12) Mueller GC and Kim U-H (1978) Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkylphenols. *Endocrinology*, 102, 1429-1435.
- 13) Jobling S and Sumpter JP (1993) Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 27, 361-372.

- 14) Routledge EJ and Sumpter JP (1997) Structural Features of Alkylphenolic Chemicals Associated with Estrogenic Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 3280-3288.
- 15) Beresford N, Routledge EJ, Harris CA, and Sumpter JP (2000) Issues Arising When Interpreting Results from an *in Vitro* Assay for Estrogenic Activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 162, 22-33.
- 16) Smeets JMW, van Holsteijn I, Giesy JP, Seinen W, and van den Berg M (1999) Estrogenic Potencies of Several Environmental Pollutants, as Determined by Vitellogenin Induction in a Carp Hepatocyte Assay. *Toxicological Sciences*, 50, 206-213.
- 17) Hornung MW, Ankley GT, and Schmieder PK (2003) Induction of an estrogen-responsive reporter gene in rainbow trout hepatoma cells (RTH 149) at 11 or 18 degrees C. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 866-871.
- 18) Myllymäki S, Haavisto T, Vainio M, Toppari J, and Paranko J (2005) *In vitro* effects of diethylstilbestrol, genistein, 4-*tert*-butylphenol, and 4-*tert*-octylphenol on steroidogenic activity of isolated immature rat ovarian follicles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204, 69-80.
- 19) Olsen CM, Meussen-Elholm ET, Holme JA, and Hongslo JK (2002) Brominated phenols: characterization of estrogen-like activity in the human breast cancer cell-line MCF-7. *Toxicology Letters*, 129, 55-63.

NP 前駆物質及び OP 前駆物質の内分泌関連影響に関する文献調査・信頼性評価結果

文献番号	評価 依頼者	NP				OP	
		2EO	1EO	2EC	1EC	2EO	1EO
Ashfield <i>et al.</i> (1998) <sup>20</sup> eco	可/ある程度可	ニジマス体重↓			ニジマス体重↓↑ ニジマス卵巣相対重量↓		
Le Gac <i>et al.</i> (2001) <sup>21</sup> eco, vitro	可	混合物(2EO20%+1EO80%) 雄ニジマス血漿中 Vtg ↑ 雄ニジマス精巣相対重量 ↓ 雄ニジマス生殖細胞増殖 ↓					
Metcalf <i>et al.</i> (2001) <sup>22</sup> eco, vitro	可	混合物(2EO44%+1EO54%) ER 酵母転写活性 ↑ メダカ影響なし			混合物(2EC54%+1EC44%) ER 酵母転写活性なし メダカ全長 ↓		
			ER 酵母転写活性 ↑		ER 酵母転写活性なし		
Sturm <i>et al.</i> (2001) <sup>23</sup> eco, vitro	不可	※					
Jobling & Sumpter (1993) <sup>13</sup> vitro	可	ニジマス肝細胞 Vtg ↑			ニジマス肝細胞 Vtg ↑		
White <i>et al.</i> (1994) <sup>24</sup> vitro	可	ニジマス肝細胞 Vtg ↑ MCF-7 細胞増殖 ↑ hER 転写活性試験 ↑			ニジマス肝細胞 Vtg ↑ MCF-7 細胞増殖 ↑ hER 転写活性試験 ↑ ニジマス肝 ER 競合阻害 ↑		
Hanioka <i>et al.</i> (1999) <sup>25</sup> vitro	ある程度可					チトクローム P450 依存モノオキシゲナーゼの反応速度に与える影響	
Milligan <i>et al.</i> (1998) <sup>26</sup> vitro	不可				※※		

2005年9月6日更新

比較的分子数の多いノニルフェノールエトキシレート類(NP3-15EO)、ノニルフェノキシエトキシ酢酸類(NP3-10EC)

及びオクチルフェノールエトキシレート類 (OP3-10EO) については情報が得られなかった。

※魚類肝臓の代謝酵素誘導を指標とし、*in vitro* 及び *in vivo* を組み合わせた研究としては価値があると思われる。しかしながら、*in vitro* 試験において、具体的な濃度の表記がなく(各物質少なくとも 5 濃度区という表記)、48 時間曝露についての説明がない。また、*in vivo* 試験においても、試験魚の月齢、飼育条件 (明暗周期、温度)、馴化期間中の給餌回数、曝露試験 2 で流量の具体的な数値が表記されていないなど、曝露条件の不備がみられ、曝露期間中均一な濃度を保つような条件下の実験が行われているか疑わしい。試験液の実測値は測定してあるが、曝露期間中のどの時点で採水したかという表記はない。本研究では、*in vivo* による酵素反応の予測モデルとして肝細胞を用いた *in vitro* 試験の有効性を調べている。測定を行った代謝酵素量は、*in vitro* 及び *in vivo* において同等の結果が得られているものの、反応傾向が異なっている。これらからも、上述の実験方法(特に曝露実験)の不備が疑われ、信頼性は低いと評価した。

※※血清を何の分離もせずを使用しているため、本当に性ホルモン結合グロブリン SHBG や $\alpha$ -フェトプロテイン AFP との結合をみているのかどうかは大きく疑問が残る。例えば、E2 と被験物質が別のタンパク質に結合している可能性も考えられるが、その場合、本研究で使用している実験方法では、その点を明らかにすることはできない。つまり、SHBG や AFP との特異的結合を明らかにしていない点で信頼性が低いと判断した。

- 20) Ashfield LA, Pottinger TG and Sumpter JP (1998) Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modifications to growth and ovasomatic index. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17 (3), 679-686.
- 21) Le Gac F, Thomas JL, Mourot B, and Loir M (2001) *In vivo* and *in vitro* effects of prochloraz and nonylphenol ethoxylates on trout spermatogenesis. *Aquatic Toxicology*, 53, (3-4), 187-200.
- 22) Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, and Potter T (2001) Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (2), 297-308.
- 23) Sturm A, Cravedi JP, Perdu E, Baradat M, and Segner H (2001) Effects of prochloraz and nonylphenol diethoxylate on hepatic biotransformation enzymes in trout: a comparative *in vitro/in vivo*-assessment using cultured hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 53, (3-4), 229-245.
- 24) White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, and Parker MG (1994) Environmentally Persistent Alkylphenolic Compounds Are Estrogenic *Endocrinology*, 135 (1), 175-182.

- 25) Hanioka N, Jinno H, Chung TS, Tanaka-Kagawa T, Nishimura T, and Ando M (1999) Inhibition of rat hepatic cytochrome P450 activities by biodegradation products of 4-*tert*-octylphenol ethoxylate. *Xenobiotica*, 29 (9), 873-883.
- 26) Milligan SR, Khan O, and Nash M (1998) Competitive Binding of Xenobiotic Oestrogens to Rat Alpha-Fetoprotein and to Sex Steroid Binding Proteins in Human and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Plasma. *General and Comparative Endocrinology*, 112, 89-95.

#### 4-t-ブチルフェノールの有害影響に関する文献の信頼性評価結果

4-t-ブチルフェノールの有害影響に関連するものとして、既存の文献において、エストロゲン様作用に関連した作用の有無、ホルモン濃度等への影響に関連した作用の有無に関する報告がある。これらの報告について、個々の信頼性も評価し、試験対象物質に係る観点から現時点で以下のようにまとめた。

##### (1) エストロゲン作用

**Jobling** と **Sumpter** によって、4-t-ブチルフェノールについて、ニジマス肝臓細胞におけるビテロジェニン誘導について検討が行われている。4-t-ブチルフェノールは、 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度において、ビテロジェニンを誘導した。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

**Beresford** らによって、4-t-ブチルフェノールについて、ヒトエストロゲン受容体 $\alpha$ 及びエストロゲン応答遺伝子発現系をもつ形質転換酵母における $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性誘導について検討<sup>ii</sup>が行われている。4-t-ブチルフェノールは、**EC<sub>50</sub>値 2.2**  $\times 10^{-4} \text{M}$ の濃度において、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を誘導した。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

**Olsen** らによって、4-t-ブチルフェノールについて、ヒトエストロゲン受容体 $\alpha$ への $\beta$ -エストラジオールの結合阻害について検討<sup>iii</sup>が行われている。4-t-ブチルフェノールは、**IC<sub>50</sub>値 3.84**  $\times 10^{-4} \text{M}$ の濃度において、ヒトエストロゲン受容体 $\alpha$ への $\beta$ -エストラジオールの結合を阻害した。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

**Routledge** と **Sumpter** によって、4-t-ブチルフェノールについて、エストロゲン応答遺伝子発現系をもつ形質転換酵母における $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性誘導について検討<sup>iv</sup>が行われている。4-t-ブチルフェノールは、**EC<sub>50</sub>値 5.7**  $\times 10^{-4} \text{M}$ の濃度において、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を誘導した。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

**Yamasaki** らによって4-t-ブチルフェノール **100、300、1000 mg/kg/day** を3日間皮下投与された20日齢雌ラットへの影響が検討<sup>v</sup>されている。その結果として、**100 mg/kg/day** 以上の投与群において子宮(絶対、相対)重量の高値が認められた。また、4-t-ブチルフェノール **100、300、1000 mg/kg/day** をエチニルエストラジオール **0.6  $\mu\text{g/kg/day}$**  と同時に3日間皮下投与された20日齢雌ラットへの影響が検討<sup>v</sup>されている。その結果として、**100 mg/kg/day** 以上の投与群において子宮(絶対、相対)重量の低値が認められた。これらの試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

##### (2) ホルモン濃度等への影響

**Myllymäki** らによって、4-t-ブチルフェノールについて、未成熟雌SDラット由来卵胞細胞におけるホルモン産生について検討<sup>vi</sup>が行われている。4-t-ブチルフェノール

は、 $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ の濃度においてテストステロンの産生を抑制し、 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ の濃度において $\beta$ -エストラジオールの産生を抑制した。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

**Olsen** らによって、**4-t-ブチルフェノール**について、ヒト乳がん細胞 **MCF-7** のプロジェステロン受容体濃度について検討<sup>iii</sup>が行われている。**4-t-ブチルフェノール**は、 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度において、プロジェステロン受容体の発現を誘導した。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

**Haavisto** らによって、**4-t-ブチルフェノール**について、雄胎児 **SD** ラット由来精巣細胞におけるホルモン産生について検討<sup>vii</sup>が行われている。**4-t-ブチルフェノール**は、 $6.7 \times 10^{-6} \text{M}$ の濃度においてヒト絨毛性ゴナドトロピン誘導性テストステロンの産生を誘導し、 $6.7 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度においてテストステロンの産生を誘導し、 $6.7 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度においてプロジェステロンの産生を誘導した。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

#### 参考文献

- 
- <sup>i</sup> Jobling S and Sumpter JP (1993) Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 27, 361-372.
- <sup>ii</sup> Beresford N, Routledge EJ, Harris CA, and Sumpter JP (2000) Issues Arising When Interpreting Results from an *in Vitro* Assay for Estrogenic Activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 162, 22-33.
- <sup>iii</sup> Olsen CM, Meussen-Elholm ET, Holme JA, and Hongslo JK (2002) Brominated phenols: characterization of estrogen-like activity in the human breast cancer cell-line MCF-7. *Toxicological Letters*, 129, 55-63.
- <sup>iv</sup> Routledge EJ and Sumpter JP (1997) Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 3280-3288.
- <sup>v</sup> Yamasaki K, Noda S, Imatanaka N, and Yakabe Y (2004) Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. *Toxicological Letters*, 146, 111-120.
- <sup>vi</sup> Myllymäki S, Haavisto T, Vainio M, Toppari J, and Paranko J (2005) *In vitro* effects of diethylstilbestrol, genistein, 4-*tert*-butylphenol, and 4-*tert*-octylphenol on steroidogenic activity of isolated immature rat ovarian follicles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204, 69-80.
- <sup>vii</sup> Haavisto TE, Adamsson NA, Myllymäki SA, Toppari J, and Paranko J (2003) Effects of 4-*tert*-octylphenol, 4-*tert*-butylphenol, and diethylstilbestrol on prenatal testosterone surge in the rat. *Reproductive Toxicology*, 17, 593-605



#### 4-ノニルフェノールジエトキシレート有害影響に関する文献の信頼性評価結果

4-ノニルフェノールジエトキシレートの有害影響に関連するものとして、既存の文献において、エストロゲン様作用に関連した作用の有無、生態影響に関連した作用の有無に関する報告がある。これらの報告について、個々の信頼性も評価し、試験対象物質に係る観点から現時点で以下のようにまとめた。

##### (1) エストロゲン作用

**Jobling** と **Sumpter** によって、4-ノニルフェノールジエトキシレートについて、ニジマス肝臓細胞におけるビテロジェニン誘導について検討が行われている。4-ノニルフェノールジエトキシレートは、 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$  の濃度において、ビテロジェニンを誘導した。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

**White** らによって、4-ノニルフェノールジエトキシレートについて、ニジマス肝臓細胞におけるビテロジェニン誘導について検討<sup>ii</sup>が行われている。4-ノニルフェノールジエトキシレートは、 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$  の濃度において、ビテロジェニンを誘導した。また、エストロゲン応答遺伝子発現系をもつ形質転換ヒト乳がん細胞 **MCF-7** における細胞増殖及びルシフェラーゼ活性の誘導について検討<sup>iii</sup>が行われている。4-ノニルフェノールジエトキシレートは、 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$  の濃度において、細胞増殖及びルシフェラーゼ活性を誘導した。更に、4-ノニルフェノールジエトキシレートについて、エストロゲン応答遺伝子発現系をもつ形質転換ニワトリ胚繊維芽腫細胞 **CEFs** におけるルシフェラーゼ活性の誘導について検討<sup>iii</sup>が行われている。4-ノニルフェノールジエトキシレートは、 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$  の濃度において、ルシフェラーゼ活性を誘導した。これらの試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

**Metcalf** らによって、4-ノニルフェノールジエトキシレート（純度 54% で 44% のノニルフェノールモノエトキシレートを含む）についてエストロゲン応答性遺伝子発現系をもつ形質転換酵母における  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の誘導について検討<sup>iii</sup>が行われている。その結果として、4-ノニルフェノールジエトキシレートは、**EC<sub>20</sub> 値 9.6 mg/L** の濃度において、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を誘導した。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

##### (2) 生態影響

**Gac** らによって、4-ノニルフェノールエトキシレート類（モノエトキシレート：ジエトキシレート＝約 8：2 の混合物）**1.24、4.97  $\mu\text{g/L}$**  に 13 ヶ月齢から 3 週間曝露された雄ニジマスへの影響が検討<sup>iv</sup>されている。その結果として、**4.97  $\mu\text{g/L}$**  の曝露区で血漿ビテロジェニン濃度の高値及び精巣相対重量の低値が認められた。また、雄ニジマス生殖細胞における細胞増殖について検討<sup>iv</sup>が行われている。4-ノニルフェノールエトキシレート類（モノエトキシレート：ジエトキシレート＝約 8：2 の混合物）は、 $3.0 \times 10^{-5} \text{M}$  の濃度において、雄ニジマス生殖細胞の細胞増殖及び **IGF** 刺激性細胞増

殖を抑制した。これらの試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

#### 参考文献

- 
- <sup>i</sup> Jobling S and Sumpter JP (1993) Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 27, 361-372.
  - <sup>ii</sup> White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, and Parker MG (1994) Environmentally Persistent Alkylphenolic Compounds Are Estrogenic. *Endocrinology*, 135, 175-182.
  - <sup>iii</sup> Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, and Potter T (2001) Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 297-308.
  - <sup>iv</sup> Gac FL, Thomas JL, Mourrot B, and Loir M (2001) *In vivo* and *in vitro* effects of prochloraz and nonylphenol ethoxylates on trout spermatogenesis. *Aquatic Toxicology*, 53, 187-200.

#### 4-ノニルフェノキシ酢酸有害影響に関する文献の信頼性評価結果

4-ノニルフェノキシ酢酸の有害影響に関連するものとして、既存の文献において、エストロジェン様作用に関連した作用の有無及び生態影響に関連した作用の有無に関する報告がある。これらの報告について、個々の信頼性も評価し、試験対象物質に係る観点から現時点で以下のようにまとめた。

##### (1) エストロジェン作用

**Jobling** と **Sumpter** によって、4-ノニルフェノキシ酢酸について、ニジマス肝臓細胞におけるビテロジェニン誘導について検討<sup>ii</sup>が行われている。4-ノニルフェノキシ酢酸は、 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度において、ビテロジェニンを誘導した。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

**White** らによって、4-ノニルフェノキシ酢酸について、ニジマス肝臓細胞におけるビテロジェニン誘導について検討<sup>iii</sup>が行われている。4-ノニルフェノキシ酢酸は、 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度において、ビテロジェニンを誘導した。また、ニジマス肝臓エストロジェン受容体への $\beta$ -エストラジオールの結合阻害についての検討<sup>iii</sup>が行われている。4-ノニルフェノキシ酢酸は、**Kd 値**  $2.0 \times 10^{-4} \text{M}$ の濃度において、ニジマス肝臓エストロジェン受容体への $\beta$ -エストラジオールの結合を阻害した。また、エストロジェン応答遺伝子発現系をもつ形質転換ヒト乳がん細胞 **MCF-7** における細胞増殖及びルシフェラーゼ活性の誘導について検討<sup>iii</sup>が行われている。4-ノニルフェノキシ酢酸は、 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度において、細胞増殖及びルシフェラーゼ活性を誘導した。更に、エストロジェン応答遺伝子発現系をもつ形質転換ニワトリ胚繊維芽腫細胞 **CEFs** におけるルシフェラーゼ活性の誘導について検討<sup>iii</sup>が行われている。4-ノニルフェノキシ酢酸は、 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度において、ルシフェラーゼ活性を誘導した。これらの試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

##### (2) 生態影響

**Ashfield** らによって、4-ノニルフェノキシ酢酸 **1、10、30  $\mu\text{g/L}$**  に孵化直後から **35** 日間曝露された雌ニジマスへの影響が検討<sup>iii</sup>されている。その結果として、**1、10  $\mu\text{g/L}$**  の曝露区で **466** 日齢魚の体重の高値及び卵巣相対重量の低値が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

**Metcalfe** らによって、4-ノニルフェノキシ酢酸（純度 **54%**、**44%**のノニルフェノールエトキシカルボン酸を含む）**50、100  $\mu\text{g/L}$**  に **1** 日齢から約 **90** 日間曝露されたメダカへの影響が検討<sup>iv</sup>されている。その結果として、**50  $\mu\text{g/L}$**  以上の曝露区で体重/全長比の高値、**100  $\mu\text{g/L}$**  の曝露区で体長の低値が認められた。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

## 参考文献

---

- i Jobling S and Sumpter JP (1993) Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 27, 361-372.
- ii White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, and Parker MG (1994) Environmentally Persistent Alkylphenolic Compounds Are Estrogenic. *Endocrinology*, 135, 175-182.
- iii Ashfield LA, Pottinger TG, and Sumpter JP (1998) Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modifications to growth and ovasomatic index. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 679-686.
- iv Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, and Potter T (2001) Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 297-308.

#### 4. 平成17年度試験対象物質の候補について

平成17年度試験対象物質の候補として、国内で検出され、動物試験の信頼性が認められた結果が得られた**4-t-ブチルフェノール**、**ノニルフェノールジエトキシレート(NP2EO)**、**ノニルフェノールモノエトキシレート(NP1EO)**及び**ノニルフェノキシ酢酸(NP1EC)**を提案する。

なお、被験物質としては、標準物質を用いる。