

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

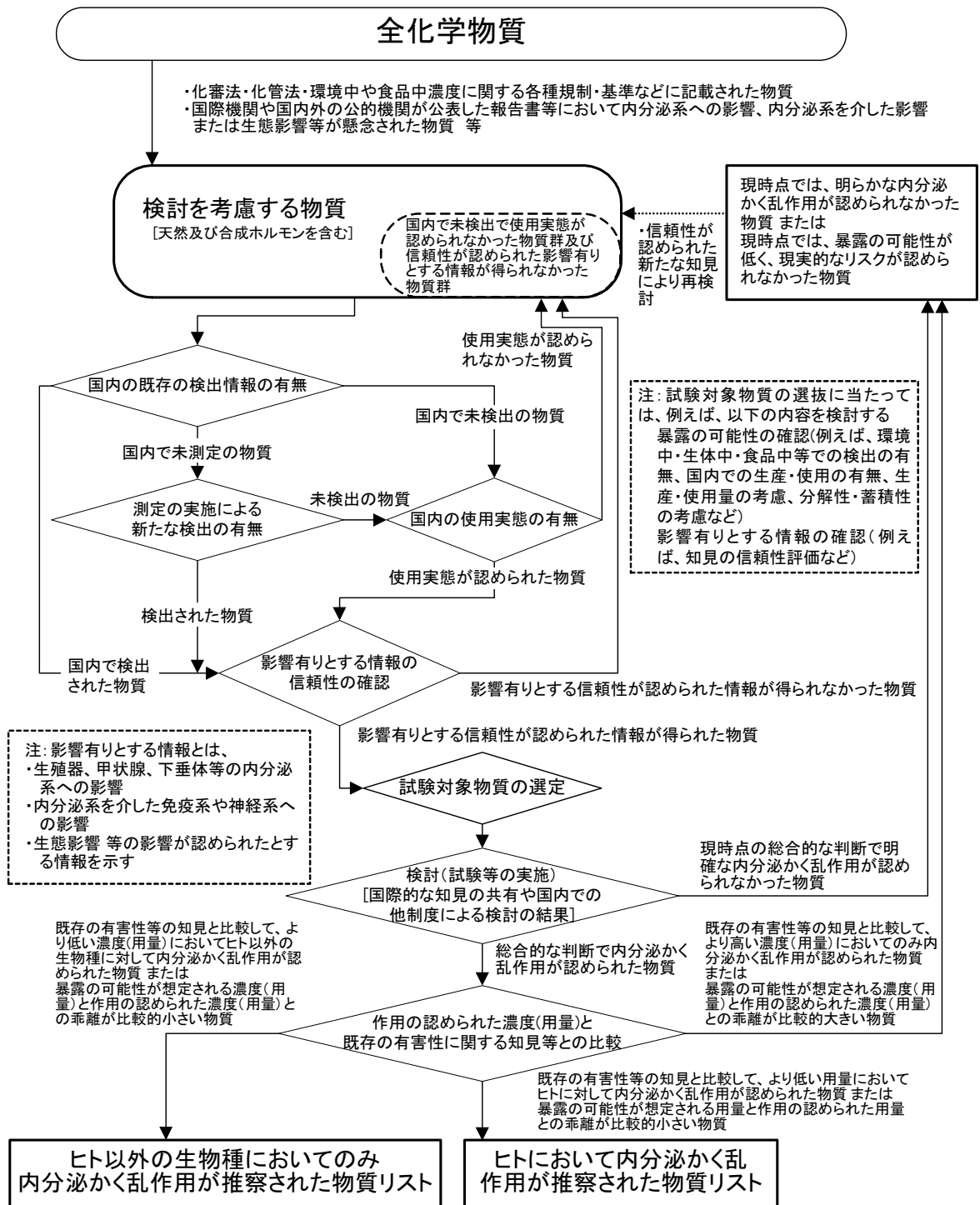
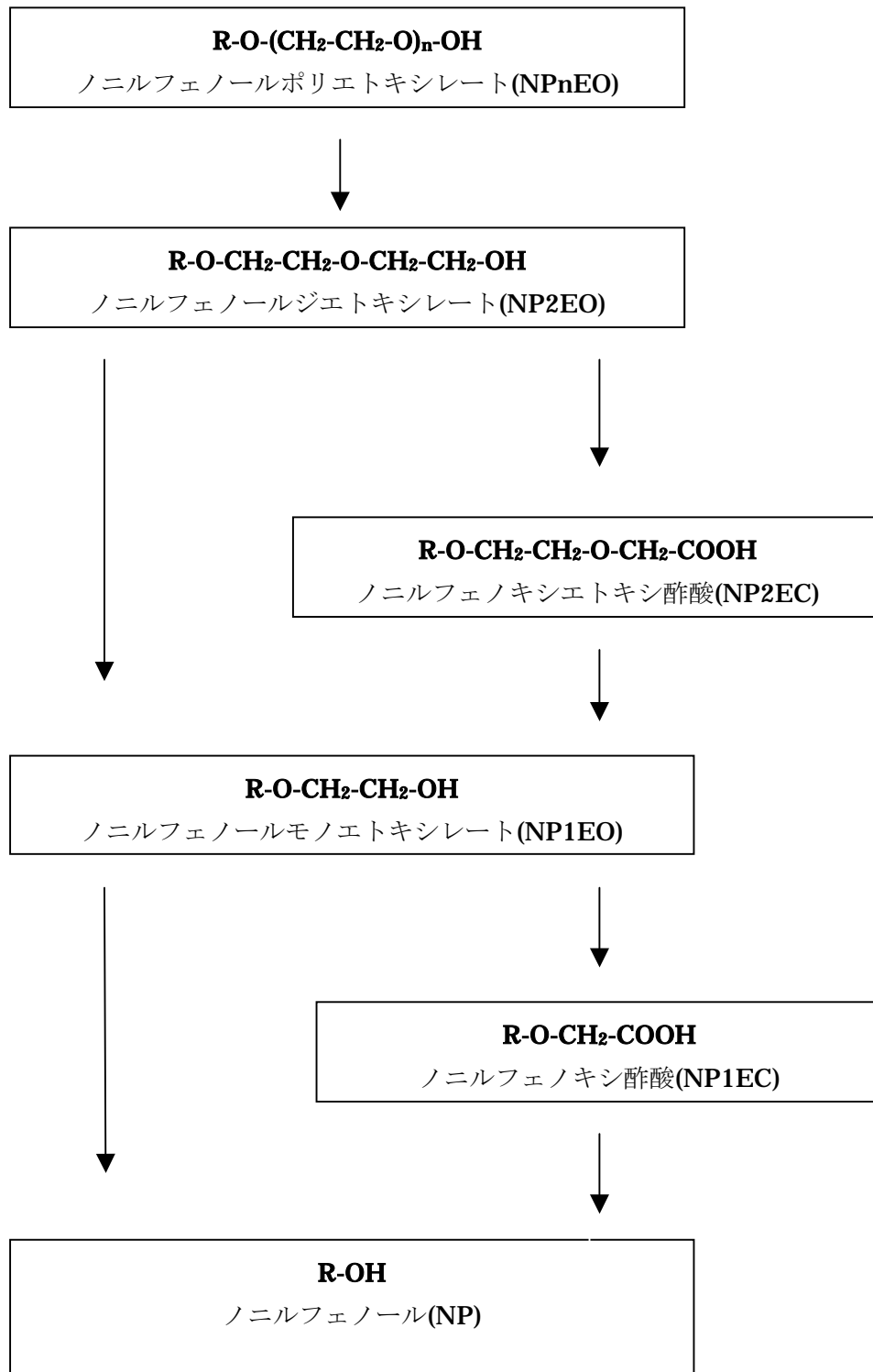


図6 化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験対象物質選定と評価の流れ

ExTEND2005 p.25 を記載



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

[μ 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 [μ 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) ^{a)} -0.09	2001/12
OP1EO	大阪府 石津川	表層水	(0.01) ^{a)} -2.3	2003/12
OP1EO	千葉県 手賀沼	表層水	(0.01) ^{a)} -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) ^{a)} -1.3	2001/1
NP1EO	大阪府 石津川	表層水	(0.1) ^{a)} -2.3	2003/12
NP1EO	千葉県 手賀沼	表層水	(0.2) ^{a)} -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 [μ g/kg]	採取年/月
OP2EO	大阪府 石津川	底質	(2) ^{a)} -3	2003/12
OP2EO	千葉県 手賀沼	底質	(2) ^{a)}	2001/12
OP1EO	大阪府 石津川	底質	(2) ^{a)} -13	2003/12
OP1EO	千葉県 手賀沼	底質	(2) ^{a)} -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) ^{a)} -2	2003/12
NP2EO	大阪府 石津川	底質	(20) ^{a)} -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) ^{a)} -510	2003/12
NP1EO	千葉県 手賀沼	底質	(50) ^{a)} -12000	2001/1
NP2EC	大阪府 石津川	底質	(20) ^{a)} -410	2003/12
NP1EC	大阪府 石津川	底質	(20) ^{a)} -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) ¹⁾ eco	可		4-t-		
Gimeno <i>et al.</i> (1998) ²⁾ eco	可		4-t-		
Gimeno <i>et al.</i> (1998) ³⁾ eco	可		4-t-		
Gimeno <i>et al.</i> (1997) ⁴⁾ eco	可		4-t-		
Panter <i>et al.</i> (2002) ⁵⁾ eco	可		4-t-		
Seki <i>et al.</i> (2003) ⁶⁾ eco	可		4-t-		
Yokota <i>et al.</i> (2005) ⁷⁾ eco	可		4-t-		
Kudo & Yamauchi (2005) ⁸⁾ eco	未実施	2-t-			
Kwack <i>et al.</i> (2002) ⁹⁾ 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) ¹⁰⁾ 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) ¹¹⁾ 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) ¹²⁾ vitro	未実施	4-s-	4-t-		
Jobling & Sumpter(1993) ¹³⁾ vitro	可	4-t- ニジマス肝細胞 Vtg ↑			
Routledge & Sumpter (1997) ¹⁴⁾ 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) ¹⁵⁾ vitro	可	4-t- hER 酵母転写活性 ↑			
Smeets <i>et al.</i> (1999) ¹⁶⁾ vitro	可		4-t-		
Hornung <i>et al.</i> (2003) ¹⁷⁾ vitro	可		4-t-		
Myllymäki <i>et al.</i> (2005) ¹⁸⁾ vitro	可	4-t- ラット卵巣細胞ホルモン産生↓			
Olsen <i>et al.</i> (2002) ¹⁹⁾ 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) ²⁰ 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) ²¹ 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) ²² 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) ²³ eco, vitro	不可	※					
Jobling & Sumpter (1993) ¹³ vitro	可	ニジマス肝細胞 Vtg ↑			ニジマス肝細胞 Vtg ↑		
White <i>et al.</i> (1994) ²⁴ 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) ²⁵ 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) ²⁶ 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 α -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 α 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 β -ガラクトシダーゼ活性誘導について検討ⁱⁱが行われている。4-t-ブチルフェノールは、**EC₅₀値 2.2** $\times 10^{-4} \text{M}$ の濃度において、 β -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 α への β -エストラジオールの結合阻害について検討ⁱⁱⁱが行われている。4-t-ブチルフェノールは、**IC₅₀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 α への β -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 β -ガラクトシダーゼ活性誘導について検討^{iv}が行われている。4-t-ブチルフェノールは、**EC₅₀値 5.7** $\times 10^{-4} \text{M}$ の濃度において、 β -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^v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^v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^{vi}が行われている。4-t-ブチルフェノール

は、 $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ Mの濃度においてテストステロンの産生を抑制し、 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ Mの濃度において β -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ⁱⁱⁱが行われている。**4-t-ブチルフェノール**は、 1.0×10^{-5} 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^{vii}が行われている。**4-t-ブチルフェノール**は、 6.7×10^{-6} 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、 6.7×10^{-5} Mの濃度においてテストステロンの産生を誘導し、 6.7×10^{-5} 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

-
- 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 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.
- ⁱⁱⁱ 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.
- ^{iv} Routledge EJ and Sumpter JP (1997) Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 3280-3288.
- ^v 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.
- ^{vi} 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.
- ^{vii} 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 β -ガラクトシダーゼ活性の誘導について検討が行われている。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、**EC₂₀ 値 9.6 mg/L** の濃度において、 β -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

-
- 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 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.
 - ^{iv} Gac FL, 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, 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ⁱⁱが行われている。4-ノニルフェノキシ酢酸は、 1.0×10^{-5} 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ⁱⁱⁱが行われている。4-ノニルフェノキシ酢酸は、 1.0×10^{-5} 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 β -エストラジオールの結合阻害についての検討ⁱⁱⁱが行われている。4-ノニルフェノキシ酢酸は、**Kd 値** 2.0×10^{-4} 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 β -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ⁱⁱⁱが行われている。4-ノニルフェノキシ酢酸は、 1.0×10^{-5} 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ⁱⁱⁱが行われている。4-ノニルフェノキシ酢酸は、 1.0×10^{-5} 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 μ 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ⁱⁱⁱされている。その結果として、**1、10 μ 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 μ 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^{iv}されている。その結果として、**50 μ g/L** 以上の曝露区で体重/全長比の高値、**100 μ 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。

評価の方法について（案）

1. 「ストレス因子」及び「仮説」に統一認識がないとそれ以下の評価も異なってしまうため、下記のとおり統一した。なお、影響を受ける対象は、
 1. カエルの生殖腺異常については「国内のカエル」であり、
 2. 1. 生殖器の先天異常、
 2. 2. 受胎能・生殖能への影響、
 2. 3. 小児悪性腫瘍、
 2. 4. 小児の骨代謝への影響については「国内のヒト」とする。人健康影響の場合、動物試験の結果が人健康影響に外挿可能かどうかの視点が必要となる。
 1. 1. カエルの生殖腺異常
ストレス因子：化学物質
仮説：化学物質の曝露が、カエルの生殖腺に影響を与える。
 2. 1. 生殖器の先天異常
ストレス因子：化学物質
仮説：化学物質の曝露が、ヒト生殖器の先天異常の発生率を増大させる。
 2. 2. 受胎能・生殖能への影響
ストレス因子：化学物質
仮説：化学物質の曝露が、ヒトの受胎能・生殖能に影響を与える。
 2. 3. 小児悪性腫瘍
ストレス因子：化学物質
仮説：化学物質の曝露が、ヒト小児悪性腫瘍を増大させる。
 2. 4. 小児の骨代謝への影響
ストレス因子：ディーゼルエンジン排気ガス
仮説：ディーゼルエンジン排気ガスの曝露が、ヒト小児の骨代謝に影響を与える。
2. 評価因子と主な評価担当
 - (1) 得られた懸念される影響に関する文献等の情報について下記の5つの評価因子により「科学的な根拠の全般的強度」の定性的な評価を行う。評価因子の主な評価担当を以下に示した。

評価担当者は、各評価因子に関し、得られた文献等を参考として、添付した評価結果まとめ表（例参照）に定性的な評価結果等を記入する。評価するに足る情報が得られない場合は、「情報の不足により評価不能」とする。

「ランク付け」欄には、情報の確かさ等を根拠に、「強・中・弱・評価不能」を記入する。

評価因子	主な評価担当	生態影響	人健康影響	作用メカニズム	曝露
1. 時間的な合理性					○
2. 関連性の強さ		○	○		
3. 観察の一致性		○	○		
4. 生物学的整合性*				○	
5. ストレス因子の減弱に伴う回復の証拠					○

***Biological plausibility** の訳語：財団法人 日本公衆衛生協会(2001)疫学辞典 第3版、**John M. Last** 編集、日本疫学会 翻訳に準拠した。

注：評価すべき内容の目安（グローバルアセスからの引用）

- 1) 「時間的な合理性」の視点からは、懸念される影響の推定原因が、生理学的状態、疾病率、集団の健康状態の変化が発現する以前に存在したかを追求する。曝露開始についての情報が欠落している場合が多いが、曝露が影響に先んじている時間的様式の例がいくつか存在する。
- 2) 「関連性の強さ」の視点からは
 - a) 集団内の影響発現率
 - b) その発生率に他の既知リスク因子が寄与する程度
 - c) 懸念される曝露に原因が求められるリスク
 - d) 実験室的研究や集団を対象とした研究から測定される用量反応曲線の形状について検討する。
- 3) 「観察の一致性」の視点からは、どの程度の頻度において、類似する、あるいは類似しない結論が科学文献において導かれているかを調べ、明らかとなった矛盾点のすべてについて議論する。結果が複数の地域から得られているか、複数の生物種が類似した様式で反応し得るのか、研究において類似の用量が用いられているか、についても評価する。
- 4) 「生物学的整合性」の視点からは、懸念される化学物質の作用メカニズムの特定に役立つような、複数の研究領域（生物学、発生学、内分泌学、集団力学、化学や物理学的な特性など）を調べる。化学物質のメカニズムを考察することは、極めて重要である。結局は、このクライテリアこそが、ある化学物質が「内分泌攪乱化学物質」かどうかのアセスメントの本質だからである。このアセスメントにおいては、「無処置の生物やその子孫や（部分）個体群の内分泌系の機能を変化させ、その結果として健康に有害な影響

を生ずる」という内分泌攪乱化学物質の運用上の定義に、化学物質を一つ一つ照合する。

- 5) 「回復の証拠」の視点からは、疑われる曝露の低減や中止に対し、有害影響発現が可逆的であるかどうか調べる。いくつかの影響は、発生の過程においてインプリントされるために、次世代にならないと回復が起きない、ストレス因子に曝露されていない次世代においても発現が起り得るという認識が、回復の問題を検討する際には重要である

なお、五つの評価因子には、評価資料の範囲のみでランク付けを行うべき項目と、原則として評価資料の範囲内でランク付けを行うが、それ以外の知見を加味し、ランク付けを行うことが妥当である項目があるので、ランク付けを行う文献資料の範囲を下記のとおり統一した。

- 1) 評価資料の範囲内のみ（文献記載の引用文献を含む）でランク付けを行う項目

なお、ランク付けには使用できないが、今後の参考となる知見について、出典を明記のうえ付記する。

1. 時間的な合理性（曝露）
3. 観察の一致性（人健康影響または生態影響）
5. ストレス因子の減弱に伴う回復の証拠（曝露）

- 2) 原則として評価資料の範囲内でランク付けを行うが、それ以外の知見を加味し、ランク付けを行うことが妥当である項目。なお、評価資料以外の知見については出典を明記する。

2. 関連性の強さ（人健康影響または生態影響）
4. 影響の生物学的整合性（作用メカニズム）

- (2) 懸念される影響と化学物質曝露との関連性及びその関連性において内分泌系が介在するメカニズムの有無を「科学的根拠の全般的強度」として評価する。

2. グローバルアセス 7 章において未検討の項目について

グローバルアセスの「内分泌攪乱化学物質を評価するための原因クライテリア（フレームワーク案）」に準拠して、「科学的根拠の全般的強度」の評価を行う。

3. グローバルアセス 7 章において検討されている項目について

グローバルアセスにおける「科学的根拠の全般的強度」の評価結果が、国内においても適用可能であるかについて、判断する。

評価結果まとめ表

記入日： 年 月 日

記入者： _____

1. 生態影響

懸念される影響	1. 1. カエルの生殖腺異常	
ストレス因子	化学物質	
仮説	化学物質の曝露が、カエルの生殖腺に影響を与える。	
評価因子	評価結果	ランク付け
1. 時間的な合理性		
2. 関連性の強さ		
3. 観察の一致性		
4. 影響の生物学的整合性		
5. ストレス因子の減弱に伴う回復の証拠		

参考文献

- 1) 染谷稔(2002)内分泌攪乱化学物質の野生生物への影響、環境研究、**126, 96-104.**
 - 2) 高瀬稔(2003)野外両生類の幼生における生殖腺異常発生率についての研究、環境科学総合研究所年報、**22, 33-40.**
- 環境省報告書

評価結果のまとめ (案)

評価結果まとめ表 (評価資料の範囲内の評価)

懸念される影響	ヒトまたは野生生物への内分泌かく乱作用	
ストレス因子	4-t-ブチルフェノール	
仮説	4-t-ブチルフェノールの曝露が、ヒトまたは野生生物に内分泌かく乱作用をもたらす。	
評価因子	評価結果	ランク付け
1. 時間的な合理性	<p>推定国内生産量ⁱは、平成 7 年度 800t、平成 8 年度 1000t、平成 9 年度 1000t、平成 10 年度 1000t、平成 11 年度 2000t、平成 12 年度 2000t、平成 13 年度 2000t、平成 14 年度 2000t、平成 15 年度 2000t で増加傾向。ヒト曝露に関する情報は得られなかった。</p> <p>環境実態調査 (水質) における最高濃度ⁱⁱは、平成 10 年度 0.87 $\mu\text{g/L}$、平成 11 年度 0.03 $\mu\text{g/L}$、平成 12 年度 0.62 $\mu\text{g/L}$、平成 13 年度 0.81 $\mu\text{g/L}$、平成 14 年度 0.51 $\mu\text{g/L}$、平成 15 年度 1.9 $\mu\text{g/L}$ であった。</p> <p>情報の不足により評価不能。</p>	評価不能
2. 関連性の強さ	<p>20 日齢雌 SD ラットを用いた用量群 100, 300, 1000 mg/kg/day の反復皮下投与子宮肥大試験においては 100, 300, 1000 mg/kg/day の投与量群において明瞭な用量相関性を示す陽性結果ⁱⁱⁱ が得られている。</p> <p>しかし、このデータのみではヒトで予想される経口・吸入曝露経路による影響を考察するのに不十分であり、結果を外挿することは困難である。</p> <p>情報の不足により評価不能。</p>	評価不能

<p>3. 観察の一致性</p>	<p>これまでに得られている <i>in vivo</i> 試験結果を以下に示す。</p> <p>① 8 週齢雌雄 SD ラットを用いた反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験^{iv}において F0 動物の生殖能及び F1 児動物の形態・発育には何ら異常は認められなかった。この試験における無影響量は F0 動物に対しては 60 mg/kg/day、F1 児動物に対する無影響量は 200 mg/kg/day であった。</p> <p>② 20 日齢雌 SD ラットを用いた反復皮下投与子宮肥大試験においては 100, 300, 1000 mg/kg/day の投与量群において明瞭な用量相関性を示す陽性結果ⁱⁱⁱが得られた。</p> <p>③ 妊娠 SD ラットを用いた用量群 1、10、100 mg/kg/day の胎児影響試験^vにおいて雄胎児の体重、テストステロン濃度、テストステロン産生能に影響は認められなかった。</p> <p><i>in vivo</i> 試験における①の陰性結果と②の陽性結果とは、試験の評価項目と方法の違いから、矛盾するものではないと考えられる。</p>	<p>弱</p>
------------------	---	----------

<p>4. 影響の生物学的整合性</p>	<p>これまでに得られている <i>in vitro</i> 試験結果を以下に示す。</p> <p>④ IC₅₀ 値 3.84×10^{-4} M においてヒトエストロゲンα受容体へのβ-エストラジオールの結合阻害^{vi}が示されている。</p> <p>⑤ EC₅₀ 値 2.2×10^{-4} M においてヒトエストロゲンα受容体及び応答遺伝子発現系をもつ形質転換酵母での転写活性化^{vii}が示されている。また、EC₅₀ 値 5.7×10^{-4} M にお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での転写活性化^{viii} が示されている。その他、酵母レポータ遺伝子試験におけるエストロゲンαに対する EC₁₀ 値 2.06×10^{-6} M、エストロゲンαに対する EC₁₀ 値 8.25×10^{-6} M が報告 ⁱⁱⁱ されている。</p> <p>⑥ 濃度 1.0×10^{-5} M においてニジマス肝臓培養細胞におけるビテロジェニン誘導^{ix}が示されている。</p> <p>⑦ その他、SD ラット卵胞細胞におけるテストステロン及びβ-エストラジオールの産生抑制^x、SD ラット精巣細胞におけるヒト絨毛性ゴナドトロピン誘導性テストステロン、テストステロン及びプロジェステロンの産生誘導^v、ヒト乳がん細胞 MCF-7 におけるプロジェステロン受容体発現誘導 ^{vi} の報告がある。</p> <p><i>in vitro</i> 試験における④⑤⑥の結果は弱いエストロゲン活性を示す点で一致しており、しかもそのエストロゲン活性強度についても試験間で矛盾は認められない。<i>in vitro</i> 試験でのエストロゲン活性は、ノニルフェノールやオクチルフェノールよりも微弱である。⑦の結果は、エストロゲン様作用以外の作用をもたらす可能性を示している。</p>	<p>中</p>
<p>5. ストレス因子の減弱に伴う回復の証拠</p>	<p>国内生産量は増加傾向にある。曝露量低減のための規制はない。</p> <p>情報の不足により評価不能。</p>	<p>評価不能</p>

まとめ

科学的根拠の全般的強度 弱

in vivo 試験における①の陰性結果と②の陽性結果とは、試験の目的と方法の違いから、矛盾するものではないと考えられる。また、*in vitro* 試験における④⑤⑥の結果は弱いエストロゲン活性を示す点で一致しており、しかもそのエストロゲン活性強度についても試験間で矛盾は認められない。特に④⑤で示されるヒトエストロゲン受容体 α へのアゴニスト活性は、齧歯動物における②の子宮肥大試験での陽性結果をメカニズム的に説明^{xi}している。

今後は、反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験が陰性であった結果を踏まえ、内分泌かく乱作用を把握することが可能な *in vivo* 試験プロトコールを作成する必要がある。

評価文献（「追加」は今回追加した情報）

-
- i 化学工業日報社（2005）14705 の化学商品 及びそのバックナンバー 追加
 - ii 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)
<http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1602/index.html> 追加
 - iii Yamasaki K, Noda S, Imatanaka N, and Yakabe Y (2004) Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in an uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. *Toxicological Letters*, 146, 111-120. 以下の公表資料と同内容：経済産業省 内分泌かく乱作用に関する試験法開発状況（平成 14 年度報告）追加
 - iv 厚生省（1996）p-tert-ブチルフェノールのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験
<http://wwwdb.mhlw.go.jp/ginc/html/db1.html>（2005 年 10 月 5 日現在）以下の公表資料と同内容：UNEP (2002) SIDS Initial Assessment Report for 10th SIAM. *p-tert-Butylphenol*.
<http://wwwdb.mhlw.go.jp/ginc/dbfile1/paper/paper98-54-4d.html>（2005 年 10 月 5 日現在）追加
 - v 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.
 - vi 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.
 - vii 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.
 - viii Routledge EJ and Sumpter JP (1997) Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 3280-3288.
 - ix 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.
 - x 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.
 - xi Hewitt SC and Korach KS (2003) Oestrogen receptor knockout mice: role for oestrogen receptor α and β in reproductive tissues. *Reproduction*, 125, 143-149. 追加

評価結果まとめ表（評価資料の範囲内の評価）

懸念される影響	ヒトまたは野生生物への内分泌かく乱作用	
ストレス因子	ノニルフェノールジエトキシレート（NP2EO）	
仮説	ノニルフェノールジエトキシレートの曝露が、ヒトまたは野生生物に内分泌かく乱作用をもたらす。	
評価因子	評価結果	ランク付け
1. 時間的な合理性	環境実態調査（水質）における最高濃度 ⁱ は、平成 14 年度 9.5 μg/L 、平成 15 年度 11 μg/L であった。 情報の不足により評価不能。	評価不能
2. 関連性の強さ	情報の不足により評価不能。	評価不能
3. 観察の一致性	<p>これまでに得られている <i>in vivo</i> 試験結果を以下に示す。</p> <p>①成熟雄ニジマスを用いた濃度区 1.24、4.97 μg/L の試験において、4.97 μg/L 濃度区において血漿中ビテロジェニン濃度の高値、生殖腺指数（精巣相対重量）の低値ⁱⁱが認められた。 （モノエトキシレート：ジエトキシレート＝約 8：2）</p> <p>②メダカを用いた濃度区 100 μg/L の試験ⁱⁱⁱにおいて、全長、体重、性比、精巣卵発生率には影響が認められなかった。 （モノエトキシレート：ジエトキシレート＝54：44）</p> <p><i>in vivo</i> 試験における①の陽性結果と②の陰性結果とは、試験の評価項目と生物種の違いから、矛盾するものではないと考えられる。</p> <p>これらの魚類 <i>in vivo</i> 試験は、ジエトキシレートとジエトキシレートとの混合物を被験物質として実施されており、単一物質を用いた試験が必要である。</p>	弱

<p>4. 影響の生物学的整合性</p>	<p>これまでに得られている <i>in vitro</i> 試験結果を以下に示す。</p> <p>③濃度 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$においてニジマス肝臓細胞におけるビテロジェニン誘導^{iv, v}が示されている。</p> <p>④濃度 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$において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^vが示されている。また、濃度 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$にお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^vが示されている。更に、EC₂₀ 値 9.6 mg/L において、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β-ガラクトシダーゼ活性の誘導ⁱⁱⁱが示されている。</p> <p>⑤濃度 $3.0 \times 10^{-5} \text{M}$において、雄ニジマス生殖細胞の細胞増殖ならびに IGF 刺激性細胞増殖を抑制ⁱⁱした。</p> <p>④で示される弱いエストロゲン活性は、③のビテロジェニン誘導をメカニズム的に説明している。報告件数は少なく、③の 2 件は同一研究班による試験結果である。</p>	<p>弱</p>
<p>5. ストレス因子の減弱に伴う回復の証拠</p>	<p>平成 14 年及び平成 15 年に実施された環境実態調査結果では、①で認められた最低影響濃度ⁱⁱを上回る最高濃度ⁱが測定されている。</p> <p>情報の不足により評価不能。</p>	<p>評価不能</p>

まとめ

科学的根拠の全般的強度 弱

①のニジマス *in vivo* 試験におけるビテロジェニン誘導は、③の *in vitro* 試験結果からも支持される。

しかし、①のニジマス *in vivo* 試験がジエトキシレートとジエトキシレートとの混合物を被験物質として実施されているのをはじめ、高純度被験物質を用いた信頼性の高い試験結果が数多く報告されているとはいえない。なお、③の 2 件は同一研究班による試験結果である。

今後は、*in vitro* 試験におけるエストロゲン活性の再確認が必要である。また、内分泌かく乱作用を把握することが可能な *in vivo* 試験プロトコルを作成する必要がある。

評価文献（「追加」は今回追加した情報）

-
- i 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)
<http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1602/index.html> 及び
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)
<http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1502/index.html> 追加
 - ii Gac FL, 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, 187-200.
 - iii 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.
 - iv 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.
 - v White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, and Parker MG (1994) Environmentally Persistent Alkylphenolic Compounds Are Estrogenic. *Endocrinology*, 135, 175-182.

評価結果まとめ表（評価資料の範囲内の評価）

懸念される影響	ヒトまたは野生生物への内分泌かく乱作用	
ストレス因子	ノニルフェノールモノエトキシレート（NP1EO）	
仮説	ノニルフェノールモノエトキシレートの曝露が、ヒトまたは野生生物に内分泌かく乱作用をもたらす。	
評価因子	評価結果	ランク付け
1. 時間的な合理性	環境実態調査（水質）における最高濃度 ⁱ は、平成 14 年度 0.8 μg/L 、平成 15 年度 2.5 μg/L であった。 情報の不足により評価不能。	評価不能
2. 関連性の強さ	情報の不足により評価不能。	評価不能
3. 観察の一致性	これまでに得られている <i>in vivo</i> 試験結果を以下に示す。 ①成熟雄ニジマスを用いた濃度区 1.24、4.97 μg/L の試験において、 4.97 μg/L 濃度区において血漿中ビテロジェニン濃度の高値、生殖腺指数（精巣相対重量）の低値 ⁱⁱ が認められた。 （モノエトキシレート：ジエトキシレート＝約 8 : 2） ②メダカを用いた濃度区 100 μg/L の試験 ⁱⁱⁱ において、全長、体重、性比、精巣卵発生率には影響が認められなかった。 （モノエトキシレート：ジエトキシレート＝ 54 : 44 ） <i>in vivo</i> 試験における①の陽性結果と②の陰性結果とは、試験の評価項目と生物種の違いから、矛盾するものではないと考えられる。 これらの魚類 <i>in vivo</i> 試験は、ジエトキシレートとジエトキシレートとの混合物を被験物質として実施されており、単一物質を用いた試験が必要である。	弱
4. 影響の生物学的整合性	これまでに得られている <i>in vitro</i> 試験結果を以下に示す。 ③EC ₂₀ 値 11.0 mg/L （高純度被験物質）あるいは 9.6 mg/L （ジエトキシレートとジエトキシレートとの混合物を被験物質）において、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 β -ガラクトシダーゼ活性の誘導 ⁱⁱⁱ が示されている。	弱
5. ストレス因子の減弱に伴う回復の証拠	平成 14 年及び平成 15 年に実施された環境実態調査結果では、①で認められた最低影響濃度 ⁱⁱ を最高濃度 ⁱ は下回っていた。 情報の不足により評価不能。	評価不能

まとめ

科学的根拠の全般的強度 弱

①のニジマス *in vivo* 試験におけるビテロジェニン誘導は、③の *in vitro* 試験で示される弱いエストロジェン活性と矛盾しない。

しかし、①のニジマス *in vivo* 試験がジエトキシレートとジエトキシレートとの混合物を被験物質として実施されているのをはじめ、高純度被験物質を用いた信頼性の高い試験結果が数多く報告されているとはいえない。

今後は、*in vitro* 試験におけるエストロジェン活性の再確認が必要である。また、内分泌かく乱作用を把握することが可能な *in vivo* 試験プロトコールを作成する必要がある。

評価文献（「追加」は今回追加した情報）

-
- i 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> 及び
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」追加
<http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1502/index.html>
 - ii Gac FL, 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, 187-200.
 - iii 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.

評価結果まとめ表（評価資料の範囲内の評価）

懸念される影響	ヒトまたは野生生物への内分泌かく乱作用	
ストレス因子	ノニルフェノキシ酢酸（NP1EC）	
仮説	ノニルフェノキシ酢酸の曝露が、ヒトまたは野生生物に内分泌かく乱作用をもたらす。	
評価因子	評価結果	ランク付け
1. 時間的な合理性	環境実態調査（水質）における最高濃度は、平成 15 年度 2.9 $\mu\text{g/L}$ であった。 情報の不足により評価不能。	評価不能
2. 関連性の強さ	成熟雌ニジマスを用いた <i>in vivo</i> 試験 ⁱⁱ では用量相関性が成立しておらず、3 試験区のうち濃度 1 $\mu\text{g/L}$ で生殖腺指数（卵巢相対重量）の低値が認められたが、 10 及び 30 $\mu\text{g/L}$ では認められなかった。 情報の不足により評価不能。	評価不能

<p>3. 観察の一致性</p>	<p>これまでに得られている <i>in vivo</i> 試験結果を以下に示す。</p> <p>①成熟雌ニジマスを用いた濃度区 1、10、30 μg/L の試験において、1 及び 10 μg/L 濃度区において成熟雌ニジマスの生殖腺指数（卵巣相対重量）の低値ⁱⁱが認められた。</p> <p>②メダカを用いた濃度区 50、100 μg/L の試験ⁱⁱⁱにおいて、100 μg/L 濃度区において全長の低値が認められたが、体重、性比、精巣卵発生率には影響が認められなかった。</p> <p><i>in vivo</i> 試験における①の陽性結果と②の陰性結果とは、試験の評価項目と生物種の違いから、矛盾するものではないと考えられる。</p> <p>①では、流水式曝露装置を用いて、曝露期間中の化学物質濃度を一定に保つような工夫がなされているものの、試験水中の化学分析は行われておらず、実測濃度は不明である。また、有機堆積物と藻類を砂により除去した Windermere Lake water を飼育水として用いているが、この飼育水中における化学物質の存在の有無も不明である。試験に用いたほとんどのアルキルフェノール類は、環境中存在濃度で雌ニジマスの成長に影響することを示唆したが、用量依存的な影響は認められていない。また、魚類の成長は特に餌量の影響を受けやすいことが知られており、曝露期間中に用いた餌量に関する説明も不足しているようである。解析に用いた試料数は各群 5 個体であることから、図中のエラーバーは大きく、各群の試料数不足が考えられる。</p> <p>情報の不足により評価不可能。</p>	<p>評価不可能</p>
------------------	--	--------------

<p>4. 影響の生物学的整合性</p>	<p>これまでに得られている <i>in vitro</i> 試験結果を以下に示す。</p> <p>③濃度 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$においてニジマス肝臓細胞におけるビテロジェニン誘導^{iv, v}が示されている。</p> <p>④Kd 値 $2.0 \times 10^{-4} \text{M}$でニジマス肝臓エストロゲン受容体へのβエストラジオールの結合阻害^vが示されている。</p> <p>⑤濃度 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$において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^vが示されている。また、濃度 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$にお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^vが示されている。しかし、他の報告ⁱⁱⁱでは、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β-ガラクトシダーゼ活性の誘導が認められていない。</p> <p>⑤では、条件が異なる転写活性化試験から陰性と陽性がそれぞれ報告されているが、検出されるエストロゲン活性が微弱であることとは矛盾しないと考えられる。④⑤で示される弱いエストロゲン活性は、③のビテロジェニン誘導をメカニズム的に説明している。報告数が4件と少ない上、3件は同一研究班によるものである。</p>	<p>弱</p>
<p>5. ストレス因子の減弱に伴う回復の証拠</p>	<p>平成15年に実施された環境実態調査結果では、①で認められた最低影響濃度ⁱⁱを上回る最高濃度ⁱが測定されている。</p> <p>情報の不足により評価不能。</p>	<p>評価不能</p>

まとめ

科学的根拠の全般的強度 弱

①では、流水式曝露装置を用いて、曝露期間中の化学物質濃度を一定に保つような工夫がなされているものの、試験水中の化学分析はおこなわれておらず、実測濃度は不明である。また、有機堆積物と藻類を砂により除去した **Windermere Lake water** を飼育水として用いているが、この飼育水中における化学物質の存在の有無も不明である。雌ニジマスの成長に影響することを示唆したが、用量依存的な影響は認められていない。また、魚類の成長は特に餌量の影響を受けやすいことが知られており、曝露期間中に用いた餌量に関する説明も不足しているようである。解析に用いた試料数は各群 5 個体であることから、図中のエラーバーは大きく、各群の試料数不足が考えられる。

⑤では、条件が異なる転写活性化試験から陰性と陽性がそれぞれ報告されているが、検出されるエストロゲン活性が微弱であることとは矛盾しないと考えられる。報告数が 4 件と少ない上、3 件は同一研究班によるものである。

全般的に情報が少ない上、①②の *in vivo* 試験での結果は、③④⑤の *in vitro* 試験結果では説明できない。

今後は、*in vitro* 試験におけるエストロゲン活性の再確認が必要である。また、内分泌かく乱作用を把握することが可能な *in vivo* 試験プロトコルを作成する必要がある。

評価文献（「追加」は今回追加した情報）

-
- i 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> 追加
 - ii 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.
 - iii 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.
 - iv 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.
 - v White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, and Parker MG (1994) Environmentally Persistent Alkylphenolic Compounds Are Estrogenic. *Endocrinology*, 135, 175-182.