

## 令和5年度及び令和6年度第2段階生物試験(4-*t*-ブチルフェノール)の試験結果について (概要版)(案)

### 1. 令和5年度及び令和6年度に実施した試験結果について

第2段階生物試験として、4-*t*-ブチルフェノール(CAS No. 98-54-4、東京化成、99.9%)について、メダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT: OECD TG240)を実施した。

メダカ(*Oryzias latipes*)を用い、10.2、31.8、97.4、316、1,030 $\mu$ g/L(実測値)のばく露濃度で試験(全ばく露期間：19週間)を行った。

本試験は、テストガイドラインが規定する試験有効性基準をすべて満たしていた。

#### (1) F0世代(ばく露期間：4週間)

生存個体数(死亡率)、雌雄の全長、雌雄の体重、総産卵数、受精卵数、受精率、雌の肝臓体指数、雌雄の二次性徴、雌の生殖腺体指数に有意な変化は認められなかった。

10.2 $\mu$ g/L以上のばく露群において、雌の肝臓中ビテロゲニン濃度の統計学的に有意な高値(濃度依存性は認められなかった)が認められた。

1,030 $\mu$ g/Lのばく露群において、雄の肝臓中ビテロゲニン濃度、雄の肝臓体指数の統計学的に有意な高値、雄の生殖腺体指数の統計学的に有意な低値が認められた。

#### (2) F1世代(ばく露期間：16週間)

ふ化率、生存率(成熟個体)、雄の全長(10週齢)、雌の体重(10週齢、成熟個体)、雌の生殖腺体指数(10週齢)、雌の肝臓中ビテロゲニン濃度(10週齢)、雌の二次性徴(10週齢、成熟個体)、雌の肝臓体指数(成熟個体)に統計学的に有意な変化は認められなかった。

10.2、31.8、97.4、316 $\mu$ g/Lのばく露群において、雄の体重(10週齢)に統計学的に有意な高値(濃度依存性は認められなかった)が認められた。

31.8 $\mu$ g/L以上のばく露群において、雌の生殖腺体指数(成熟個体)、雌の肝臓中ビテロゲニン濃度(成熟個体)の統計学的に有意な高値が認められた。

97.4 $\mu$ g/L以上のばく露群において、受精率の統計学的に有意な低値が認められた。

316 $\mu$ g/L以上のばく露群において、ふ化日数の統計学的に有意な低値、雄の肝臓中ビテロゲニン濃度(10週齢)、雄の肝臓体指数(10週齢)の統計学的に有意な高値が認められた。

1,030 $\mu$ g/Lのばく露群において、生存率(4週齢、8週齢)、雌の全長(10週齢)、雄の二次性徴(10週齢)、総産卵数、受精卵数、雄の二次性徴(成熟個体)、雌の肝臓体指数(10週齢)、雌雄の全長(成熟個体)の統計学的に有意な低値、雄の生殖腺体指数(10週齢)、雄の体重(成熟個体)、雄の肝臓体指数(成熟個体)、雄の生殖腺体指数(成熟個体)、雄の肝臓中ビテロゲニン濃度(成熟個体)の統計学的に有意な高値が認められた。

(3) F2 世代(ばく露期間：2 週間)

10.2、31.8 $\mu\text{g/L}$  のばく露群において、ふ化率の統計学的に有意な低値が認められた。

31.8 $\mu\text{g/L}$  のばく露群において、ふ化日数の統計学的に有意な低値が認められた。

## 2. 試験結果のまとめ

4-*t*-ブチルフェノールは既存知見からエストロゲン作用を持つことが想定された(令和 2 年度に実施したメダカエストロゲン受容体  $\alpha$  レポータージーン試験の結果として  $\text{EC}_{50}$  値は、 $6.3 \times 10^{-8} \text{ M}$  で、17 $\beta$ -エストラジオールに対する相対活性比は、0.001 であった、抗エストロゲン作用は ND、アンドロゲン作用は未実施)。

令和 3 年度に第 1 段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(OECD TG229)では、1,000 $\mu\text{g/L}$  のばく露群において雄の肝臓中ビテロゲニン濃度(成熟個体)の統計学的に有意な高値が認められたため、エストロゲン作用を持つことが想定された(添付資料参照)。

今回の試験結果において、雌雄ともに死亡が認められなかった濃度範囲(1,030 $\mu\text{g/L}$  未満)において、エストロゲン作用を示す雄(F1 成熟個体)の肝臓中ビテロゲニン濃度の統計学的に有意な高値が認められ、エストロゲン作用を持つことが確認された。

また、97.4 $\mu\text{g/L}$  以上のばく露群において受精率の統計学的に有意な低値が認められたことから、メダカの繁殖に対する有害性を示すことが認められた。

なお、令和 3 年度に第 1 段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(OECD TG229)では、313 $\mu\text{g/L}$  のばく露群において受精卵数の統計学的に有意な低値が認められていた。

また、この試験結果等から、4-*t*-ブチルフェノールはメダカに対してエストロゲン作用を示すことが確認されたとともに、本物質がメダカの繁殖に及ぼす影響に関する最低影響濃度(LOEC)として 97.4 $\mu\text{g/L}$  が得られ、TG229 で得られた LOEC の約 1/3 の濃度であった。

メダカの繁殖に対する有害性が示唆されたばく露濃度 97.4 $\mu\text{g/L}$  は、平成 9 年度に実施された化学物質環境実態調査において測定された最高濃度 0.1 $\mu\text{g/L}$  の約 970 倍であった。

また、メダカの繁殖に対する有害性が示唆されなかったばく露濃度 31.8 $\mu\text{g/L}$  は、平成 9 年度に実施された化学物質環境実態調査において測定された最高濃度 0.1 $\mu\text{g/L}$  の約 320 倍であった。

(別添)

## メダカ拡張 1 世代繁殖試験結果(MEOGRT: OECD TG240)

4-*t*-ブチルフェノール

実施機関：三菱ケミカルリサーチ

## 1. F0世代

表 1-A 試験結果

| 平均濃度実測値<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 試験個体数 |    | 生存個体数 |    | 全長(mm)         |                | 体重(mg)       |              |
|--------------------------------|-------|----|-------|----|----------------|----------------|--------------|--------------|
|                                | 雄     | 雌  | 雄     | 雌  | 雄              | 雌              | 雄            | 雌            |
| 対照区(ND)                        | 12    | 12 | 12    | 11 | 30.3 $\pm$ 1.5 | 30.6 $\pm$ 0.9 | 305 $\pm$ 44 | 373 $\pm$ 41 |
| 10.2                           | 6     | 6  | 6     | 6  | 30.6 $\pm$ 2.2 | 29.3 $\pm$ 1.0 | 322 $\pm$ 47 | 333 $\pm$ 50 |
| 31.8                           | 6     | 6  | 6     | 6  | 30.7 $\pm$ 1.3 | 30.0 $\pm$ 1.6 | 311 $\pm$ 48 | 346 $\pm$ 59 |
| 97.4                           | 6     | 6  | 6     | 6  | 30.7 $\pm$ 1.4 | 30.4 $\pm$ 1.3 | 304 $\pm$ 46 | 355 $\pm$ 54 |
| 316                            | 6     | 6  | 6     | 5  | 28.8 $\pm$ 2.0 | 30.6 $\pm$ 1.7 | 285 $\pm$ 64 | 378 $\pm$ 60 |
| 1,030                          | 6     | 6  | 6     | 6  | 30.1 $\pm$ 1.6 | 29.0 $\pm$ 1.5 | 319 $\pm$ 49 | 329 $\pm$ 68 |

表 1-B 試験結果(続き)

| 平均濃度実測値<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 総産卵数            | 受精卵数            | 受精率             | 生殖腺体指数 (%)     |                |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
|                                | (eggs/day/pair) | (eggs/day/pair) | (%)             | 雄              | 雌              |
| 対照区(ND)                        | 21.4 $\pm$ 4.8  | 20.5 $\pm$ 4.6  | 96.1 $\pm$ 3.9  | 1.2 $\pm$ 0.4  | 9.0 $\pm$ 1.3  |
| 10.2                           | 21.2 $\pm$ 2.9  | 20.4 $\pm$ 3.1  | 96.2 $\pm$ 2.9  | 1.0 $\pm$ 0.2  | 11.0 $\pm$ 2.9 |
| 31.8                           | 22.5 $\pm$ 5.3  | 21.9 $\pm$ 5.2  | 97.6 $\pm$ 2.9  | 1.2 $\pm$ 0.4  | 9.9 $\pm$ 2.2  |
| 97.4                           | 22.5 $\pm$ 7.0  | 21.7 $\pm$ 6.8  | 96.8 $\pm$ 2.5  | 1.0 $\pm$ 0.3  | 9.7 $\pm$ 3.1  |
| 316                            | 21.9 $\pm$ 5.3  | 17.3 $\pm$ 4.1  | 80.9 $\pm$ 14.0 | 1.2 $\pm$ 0.5  | 11.0 $\pm$ 2.1 |
| 1,030                          | 16.3 $\pm$ 6.0  | 15.3 $\pm$ 6.4  | 90.6 $\pm$ 12.4 | 0.7 $\pm$ 0.2* | 9.2 $\pm$ 4.4  |

表 1-C 試験結果(続き)

| 平均濃度実測値<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 肝臓体指数 (%)       |               | ビテロゲン濃度 (ng/mg liver) |                 | 二次性徴        |   |
|--------------------------------|-----------------|---------------|-----------------------|-----------------|-------------|---|
|                                | 雄               | 雌             | 雄                     | 雌               | 雄           | 雌 |
| 対照区(ND)                        | 2.5 $\pm$ 0.7   | 5.3 $\pm$ 1.2 | 1.21 $\pm$ 3.4        | 627 $\pm$ 99    | 67 $\pm$ 11 | 0 |
| 10.2                           | 2.4 $\pm$ 1.3   | 5.8 $\pm$ 1.1 | ND                    | 864 $\pm$ 172** | 73 $\pm$ 12 | 0 |
| 31.8                           | 2.4 $\pm$ 0.6   | 7.3 $\pm$ 2.8 | ND                    | 790 $\pm$ 301** | 66 $\pm$ 15 | 0 |
| 97.4                           | 2.3 $\pm$ 0.5   | 4.9 $\pm$ 1.4 | 7.6 $\pm$ 16.4        | 775 $\pm$ 227** | 67 $\pm$ 6  | 0 |
| 316                            | 3.3 $\pm$ 0.6   | 6.1 $\pm$ 0.7 | 0.5 $\pm$ 0.6         | 910 $\pm$ 100** | 69 $\pm$ 10 | 0 |
| 1,030                          | 4.2 $\pm$ 0.5** | 5.5 $\pm$ 1.0 | 65.9 $\pm$ 143.1*     | 856 $\pm$ 333** | 60 $\pm$ 10 | 0 |

## 2. 1. F1世代(胚～仔魚期)

表 2-A 試験結果

| 平均濃度実測値<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | ふ化率 (%)     | ふ化日数 (day)         |
|--------------------------------|-------------|--------------------|
| 対照区(ND)                        | $96 \pm 4$  | $7.5 \pm 0.3$      |
| 10.2                           | $99 \pm 2$  | $7.4 \pm 0.1$      |
| 31.8                           | $97 \pm 4$  | $7.4 \pm 0.1$      |
| 97.4                           | $98 \pm 4$  | $7.6 \pm 0.2$      |
| 316                            | $100 \pm 0$ | $7.4 \pm 0.2^{**}$ |
| 1,030                          | $98 \pm 3$  | $7.4 \pm 0.1^*$    |

表 2-B 試験結果(続き)

| 平均濃度実測値<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 生存率 (%)         |                 | 全長(mm)(10週齢)   |                  | 体重(mg)(10週齢)      |              |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|------------------|-------------------|--------------|
|                                | (4週目)           | (8週目)           | 雄              | 雌                | 雄                 | 雌            |
| 対照区(ND)                        | $97 \pm 4$      | $96.4 \pm 4$    | $25.9 \pm 1.1$ | $27.3 \pm 1.0$   | $209 \pm 28$      | $301 \pm 45$ |
| 10.2                           | $100 \pm 0$     | $100 \pm 0$     | $28.5 \pm 1.0$ | $29.7 \pm 1.6$   | $287 \pm 35^{**}$ | $388 \pm 54$ |
| 31.8                           | $99 \pm 3$      | $99 \pm 3$      | $27.8 \pm 2.0$ | $30.1 \pm 1.6$   | $279 \pm 50^{**}$ | $415 \pm 79$ |
| 97.4                           | $100 \pm 0$     | $100 \pm 0$     | $27.9 \pm 1.2$ | $28.9 \pm 1.0$   | $285 \pm 41^{**}$ | $384 \pm 58$ |
| 316                            | $93 \pm 6$      | $93 \pm 6$      | $25.2 \pm 2.1$ | $26.7 \pm 1.3$   | $265 \pm 74^*$    | $341 \pm 48$ |
| 1,030                          | $83 \pm 8^{**}$ | $83 \pm 8^{**}$ | $23.8 \pm 1.4$ | $23.1 \pm 1.8^*$ | $223 \pm 42$      | $228 \pm 47$ |

表 2-C 試験結果(続き)

| 平均濃度実測値<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 肝臓体指数 (%)          |                 | ビテロゲン濃度 (ng/mg liver) |                 | 二次性徴        |   |
|--------------------------------|--------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-------------|---|
|                                | 雄                  | 雌               | 雄                     | 雌               | 雄           | 雌 |
| 対照区(ND)                        | $3.8 \pm 1.1$      | $7.3 \pm 1.5$   | ND                    | $935 \pm 407$   | $68 \pm 12$ | 0 |
| 10.2                           | $4.1 \pm 1.2$      | $7.0 \pm 1.6$   | ND                    | $1,450 \pm 473$ | $74 \pm 16$ | 0 |
| 31.8                           | $3.4 \pm 0.9$      | $6.3 \pm 1.2$   | ND                    | $676 \pm 372$   | $80 \pm 15$ | 0 |
| 97.4                           | $3.8 \pm 0.6$      | $6.6 \pm 1.1$   | ND                    | $1,300 \pm 485$ | $81 \pm 11$ | 0 |
| 316                            | $5.2 \pm 1.1^*$    | $7.4 \pm 0.9$   | $235 \pm 383^{**}$    | $942 \pm 305$   | $36 \pm 28$ | 0 |
| 1,030                          | $6.0 \pm 1.0^{**}$ | $5.8 \pm 1.0^*$ | $389 \pm 552^{**}$    | $826 \pm 411$   | 0*          | 0 |

表 2-D 試験結果(続き)

| 平均濃度実測値<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 生殖腺体指数 (%)      |                |
|--------------------------------|-----------------|----------------|
|                                | 雄               | 雌              |
| 対照区(ND)                        | $0.95 \pm 0.3$  | $8.3 \pm 2.7$  |
| 10.2                           | $1.0 \pm 0.3$   | $9.7 \pm 3.2$  |
| 31.8                           | $1.0 \pm 0.3$   | $10.3 \pm 4.0$ |
| 97.4                           | $0.99 \pm 0.2$  | $9.2 \pm 2.5$  |
| 316                            | $3.0 \pm 3.9$   | $8.3 \pm 3.1$  |
| 1,030                          | $4.5 \pm 4.5^*$ | $6.0 \pm 3.2$  |

## 2. 2. F1世代(成熟個体)

表 2-E 試験結果(続き)

| 平均濃度実測値<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 生存率 (%)     |            | 全長(mm)              |                     | 体重(mg)            |              |
|--------------------------------|-------------|------------|---------------------|---------------------|-------------------|--------------|
|                                | 雄           | 雌          | 雄                   | 雌                   | 雄                 | 雌            |
| 対照区(ND)                        | 100(24/24)  | 100(24/24) | $32.0 \pm 1.6$      | $33.5 \pm 1.0$      | $352 \pm 50$      | $545 \pm 67$ |
| 10.2                           | 100(12/12)  | 100(12/12) | $33.2 \pm 1.2$      | $34.9 \pm 1.2$      | $378 \pm 42$      | $601 \pm 77$ |
| 31.8                           | 100(12/12)  | 100(12/12) | $33.5 \pm 1.1$      | $34.6 \pm 1.6$      | $416 \pm 34$      | $619 \pm 72$ |
| 97.4                           | 100(11/12)  | 100(12/12) | $32.7 \pm 2.0$      | $33.6 \pm 1.0$      | $375 \pm 69$      | $603 \pm 72$ |
| 316                            | 100(12/12)  | 100(12/12) | $31.1 \pm 0.9$      | $32.4 \pm 1.0$      | $351 \pm 35$      | $573 \pm 92$ |
| 1,030                          | 100 (12/12) | 100(12/12) | $30.4 \pm 0.8^{**}$ | $29.1 \pm 1.0^{**}$ | $445 \pm 50^{**}$ | $458 \pm 49$ |

表 2-F 試験結果(続き)

| 平均濃度実測値<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 総産卵数<br>(eggs/day/pair) | 受精卵数<br>(eggs/day/pair) | 受精率<br>(%)           | 生殖腺体指数 (%)          |                     |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
|                                |                         |                         |                      | 雄                   | 雌                   |
| 対照区(ND)                        | $38.2 \pm 6.0$          | $35.7 \pm 7.1$          | $93.4 \pm 8.8$       | $1.2 \pm 0.4$       | $13.7 \pm 1.4$      |
| 10.2                           | $48.4 \pm 3.2$          | $46.2 \pm 3.1$          | $95.6 \pm 2.4$       | $1.1 \pm 0.1$       | $14.4 \pm 1.1$      |
| 31.8                           | $52.3 \pm 6.3$          | $48.2 \pm 8.7$          | $91.9 \pm 9.8$       | $1.2 \pm 0.2$       | $14.9 \pm 1.1^{**}$ |
| 97.4                           | $47.4 \pm 5.0$          | $42.8 \pm 5.0$          | $90.4 \pm 6.3^*$     | $1.2 \pm 0.2$       | $14.9 \pm 1.3^{**}$ |
| 316                            | $33.6 \pm 8.0$          | $27.6 \pm 12.5$         | $74.7 \pm 30.4^{**}$ | $1.2 \pm 0.2$       | $18.0 \pm 7.0^{**}$ |
| 1,030                          | $16.9 \pm 9.6^{**}$     | $0.4 \pm 0.6^{**}$      | $3.3 \pm 4.4^{**}$   | $11.9 \pm 8.0^{**}$ | $18.3 \pm 4.7^{**}$ |

表 2-G 試験結果(続き)

| 平均濃度実測値<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 肝臓体指数 (%)      |               | ビテロゲニン濃度 (ng/mg liver) |                   | 二次性徴          |   |
|--------------------------------|----------------|---------------|------------------------|-------------------|---------------|---|
|                                | 雄              | 雌             | 雄                      | 雌                 | 雄             | 雌 |
| 対照区(ND)                        | 2.9 $\pm$ 0.9  | 6.9 $\pm$ 1.9 | 0.43 $\pm$ 0.97        | 1,010 $\pm$ 364   | 100 $\pm$ 15  | 0 |
| 10.2                           | 2.9 $\pm$ 2.2  | 6.6 $\pm$ 1.9 | 0.55 $\pm$ 0.91        | 1,080 $\pm$ 180   | 100 $\pm$ 14  | 0 |
| 31.8                           | 2.1 $\pm$ 0.5  | 7.3 $\pm$ 1.1 | ND                     | 1,350 $\pm$ 559*  | 97 $\pm$ 8    | 0 |
| 97.4                           | 2.1 $\pm$ 0.7  | 7.4 $\pm$ 1.0 | ND                     | 1,350 $\pm$ 663** | 90 $\pm$ 9**  | 0 |
| 316                            | 3.0 $\pm$ 0.9  | 7.2 $\pm$ 2.1 | 0.86 $\pm$ 1.92        | 1,340 $\pm$ 384** | 77 $\pm$ 10** | 0 |
| 1,030                          | 5.8 $\pm$ 0.9* | 5.7 $\pm$ 0.9 | 1,305 $\pm$ 611**      | 1,850 $\pm$ 541** | 0**           | 0 |

## 3. F2世代(胚、仔魚期)

表 3-A 試験結果

| 平均濃度実測値<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | ふ化率 (%)     | ふ化日数 (day)      |
|--------------------------------|-------------|-----------------|
| 対照区(ND)                        | 98 $\pm$ 3  | 8.4 $\pm$ 0.2   |
| 10.2                           | 90 $\pm$ 8* | 8.1 $\pm$ 0.1   |
| 31.8                           | 88 $\pm$ 4* | 8.0 $\pm$ 0.1** |
| 97.4                           | 96 $\pm$ 4  | 8.5 $\pm$ 0.2   |
| 316                            | 94 $\pm$ 6  | 8.3 $\pm$ 0.2   |
| 1,030                          | 受精卵が得られなかった | 受精卵が得られなかった     |

結果は平均値 $\pm$ 標準偏差.

有意差水準 (\* $p$ <0.05、\*\* $p$ <0.01).

ビテロゲニン濃度のND は全ての個体において定量下限値未満であった (<0.4 ng/mg liver)ことを示す

NA: not available

二次性徴：乳頭状小突起を有する節板数

有効数字は測定精度を考慮して、

- ・ふ化率・ふ化後生存率・生存率は2桁（ただし1の位までとする）
- ・肝臓体指数及び生殖腺体指数は、1未満は1桁、1以上は2桁
- ・それ以外のエンドポイントは3桁（ただし二次性徴は1の位まで、ビテロゲニンは小数点以下2桁までとする）
- ・標準偏差の桁数は平均値の位に合わせる

## 令和3年度第1段階生物試験の試験結果について(抜粋)

## 1. 令和3年度に実施した試験結果について

試験管内試験の結果等から第1段階生物試験を実施する優先順位が高いと考えられた2物質(4-*t*-ブチルフェノール、クロルピリホス)について、メダカを用いた魚類短期繁殖試験(修正 TG229)を実施した(試験法の概要についてはp 2 参照)。

(1) 4-*t*-ブチルフェノールの試験結果

0.102、0.313、1.00mg/L(実測値)のばく露濃度で試験を行ったところ、雌雄の死亡率、雌雄の体重、雌の全長、雌雄の生殖腺体指数、雌雄の二次性徴に統計学的に有意な変化は認められなかった。

0.313mg/L 以上のばく露群において、受精卵数の統計学的に有意な低値及び雄の肝臓体指数の有意な高値が認められた。

1.00mg/L のばく露群において、雄の全長、総産卵数、受精率の統計学的に有意な低値及び雌雄の肝臓中ビテロゲニン濃度、雌の肝臓体指数の有意な高値が認められた。

## 2. 試験結果のまとめ

(1) 4-*t*-ブチルフェノール

4-*t*-ブチルフェノールについては既存知見及び試験管内試験の結果からエストロゲン作用( $EC_{50}$  値= $6.3 \times 10^{-8}$ 、比活性 0.001)を持つことが想定されており(抗エストロゲン作用は ND)、今回の試験結果において、有意な死亡が認められない濃度範囲において、エストロゲン作用を示す雄の肝臓中ビテロゲニン濃度の高値が認められ、エストロゲン作用を持つこと及び抗エストロゲン作用は持たないことが確認できた。

メダカに対する有害性(受精卵数の低値)が認められたばく露濃度 0.313mg/L は、平成9年度(1997年度)に実施された化学物質環境実態調査での最高検出値 0.1 $\mu$ g/L の 3,130 倍であった。

メダカに対する有害性が認められなかったばく露濃度 0.102mg/L は、平成9年度(1997年度)に実施された化学物質環境実態調査での最高検出値 0.1 $\mu$ g/L の 1,020 倍であった。

(参考)

### メダカを用いた魚類短期繁殖試験法

魚類短期繁殖試験(OECD TG229)は、成熟したメダカを雌雄混合で試験対象物質に 21 日間ばく露し、ばく露期間中の産卵状況並びにばく露終了時の生存個体の肝臓中ビテロゲン濃度及び二次性徴を調べる試験法である。

| 馴化      |   |   |   |   |   |   | 試験物質による暴露(日)                  |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------|---|---|---|---|---|---|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 6       | 5 | 6 | 4 | 3 | 2 | 1 | 1                             | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| 産卵状態の確認 |   |   |   |   |   |   | 産卵数(受精卵数、未受精卵数)の計数<br>死亡・一般症状 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

↑  
暴露開始

↑  
暴露終了(暴露個体の測定・分析)



#### エンドポイント

- ・産卵状態(産卵数、受精率、受精卵数)
- ・肝臓中ビテロジェニン濃度
- ・二次性徴
- ・生殖腺組織(オプション:実施せず)

- ・全長、体重
- ・肝臓、生殖腺重量(HSI、GSI)
- ・肝臓中ビテロジェニン濃度
- ・二次性徴(尻鰭乳頭状突起)



## 第 1 段階生物試験結果(TG229)

### 4-*t*-ブチルフェノール

実施機関：株式会社三菱ケミカルリサーチ

表 1-A 試験結果

| 平均濃度実測値<br>(mg/L) | 試験個体数 |    | 死亡率 (%) |   | 全長(mm)     |          | 体重(mg) |        |
|-------------------|-------|----|---------|---|------------|----------|--------|--------|
|                   | 雄     | 雌  | 雄       | 雌 | 雄          | 雌        | 雄      | 雌      |
| 対照区               | 12    | 12 | 0       | 0 | 29.4±1.5   | 29.7±1.6 | 250±33 | 318±69 |
| 0.102             | 12    | 12 | 0       | 0 | 29.2±1.5   | 29.7±0.8 | 258±36 | 322±32 |
| 0.313             | 12    | 12 | 0       | 0 | 28.7±0.8   | 29.0±1.1 | 256±26 | 315±47 |
| 1.00              | 12    | 12 | 0       | 0 | 28.3±1.3 * | 29.5±1.4 | 234±35 | 328±53 |

表 1-B 試験結果(続き)

| 平均濃度実測値<br>(mg/L) | 総産卵数<br>(eggs/female/day) | 受精卵数<br>(eggs/female/day) | 受精率<br>(%) | 生殖腺体指数 (%) |          |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|------------|------------|----------|
|                   |                           |                           |            | 雄          | 雌        |
| 対照区               | 20.4±0.8                  | 19.9±0.8                  | 97.5±0.9   | 0.937±0.27 | 9.51±1.5 |
| 0.102             | 19.2±0.7                  | 18.7±0.8                  | 97.2±1.6   | 1.16±0.25  | 10.4±1.4 |
| 0.313             | 19.3±0.6                  | 18.5±0.7 *                | 96.0±1.9   | 0.898±0.30 | 10.2±1.1 |
| 1.00              | 18.3±0.6**                | 16.9±0.9**                | 92.4±1.9** | 1.02±0.19  | 9.74±1.8 |

表 1-C 試験結果(続き)

| 平均濃度実測値<br>(mg/L) | 肝臓体指数 (%)   |             | ビテロゲン濃度 (ng/mg liver) |           | 二次性徴  |     |
|-------------------|-------------|-------------|-----------------------|-----------|-------|-----|
|                   | 雄           | 雌           | 雄                     | 雌         | 雄     | 雌   |
| 対照区               | 2.43±0.28   | 6.34±1.1    | 0.583±1.3             | 698±74    | 69±11 | 0±0 |
| 0.102             | 2.30±0.34   | 6.38±0.69   | 0.334±0.47            | 686±97    | 67±17 | 0±0 |
| 0.313             | 3.02±0.31** | 6.84±0.85   | 0.521±0.76            | 754±100   | 63±11 | 0±0 |
| 1.00              | 3.42±0.31** | 7.02±0.75 * | 68.1±160**            | 882±140 * | 66±10 | 0±0 |

表 1-D 試験結果(続き)

| 平均濃度実測値<br>(mg/L) |      | その他の所見 |
|-------------------|------|--------|
| 対照区               | 特になし |        |
| 0.102             | 特になし |        |
| 0.313             | 特になし |        |
| 1.00              | 特になし |        |

結果は平均値±標準偏差.

有意差水準 (\* $p$ <0.05、\*\* $p$ <0.01).

ND は未検出 (< 1 ng/mg liver).

(-)は、未測定

二次性徴：乳頭状突起を有する節板数

## 化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価 の実施結果について(令和元年度実施分)(抜粋)

### I. 令和元年度に実施した文献情報に基づく影響評価(信頼性評価)について

令和元年度に信頼性評価を実施する対象として選定した 14 物質群(表 1 参照) 及び令和 2 年度に信頼性評価を実施する対象として選定した 11 物質群(表 2 参照) のうち、表 3 に記載された 5 物質群について令和 2 年度に信頼性評価を実施した。

**表 1 令和元年度に信頼性評価の対象とする 14 物質群**

| 名称                                                              | 主な用途                                                                | 選定根拠となった調査区分の記号** |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------|
| <b>報告済</b>                                                      |                                                                     |                   |
| エチレングリコール<br>(別名：エタン-1,2-ジオール)                                  | ポリエステル繊維原料、不凍液、溶剤、有機合成原料 <sup>1)</sup>                              | 3.(1)             |
| メチルエチルケトン<br>(別名：2-ブタノン)                                        | 合成樹脂のカッティング溶媒、接着剤溶剤、有機合成原料 <sup>1)</sup>                            | 3.(1)             |
| 2-ナフトール(別名：β-ナフトール)                                             | 医薬・染料原料、選鉱剤 <sup>1)</sup>                                           | 3.(1)             |
| シアン化物(シアン化水素を含む)*                                               | メッキ助剤、写真材料 <sup>1)</sup>                                            | 3.(1)             |
| ジメチルスルホキシド                                                      | アクリル繊維の紡糸液、各種溶剤、有機原料 <sup>1)</sup>                                  | 3.(1)             |
| アセタミプリド                                                         | 農薬(殺虫剤) <sup>1)</sup>                                               | 3.(4)             |
| チアメトキサム                                                         | 農薬(殺虫殺菌剤) <sup>1)</sup>                                             | 3.(4)             |
| アゾキシストロビン                                                       | 農薬(殺菌剤) <sup>1)</sup>                                               | 3.(4)             |
| シアナミド*                                                          | 農薬(植物成長調整剤)、有機合成原料、チオ尿素原料、医薬 <sup>2)</sup>                          | 3.(5)             |
| パラコート*                                                          | 農薬(除草剤) <sup>2)</sup>                                               | 3.(5)             |
| <u>4-tert-ブチルフェノール*</u>                                         | 合成樹脂原料(油性フェノール樹脂)、合成樹脂改質剤、合成原料(香料、界面活性剤) <sup>2)</sup>              | 3.(6)             |
| メチルセルロース                                                        | セラミックス押出成形用バインダー、感熱紙用保護コロイド剤、乳化安定剤(化粧品、食品)、懸濁安定化剤、増粘剤 <sup>1)</sup> | 3.(7)             |
| <b>今回報告</b>                                                     |                                                                     |                   |
| フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (別名：フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)) *                       | 塩化ビニル樹脂の可塑剤、塗料、溶剤(顔料、接着剤) <sup>2)</sup>                             | 3.(6)             |
| 1,7,7-トリメチル 3-(フェニルメチレン)ビジクロ[2.2.1]ヘプタン-2-オン(別名：3-ベンジリデン=カンファー) | 日焼け止め剤、化粧品 <sup>3)</sup>                                            | 3.(6)             |

\*化管法第一種指定化学物質

1)化学工業日報社、17019 の化学商品 (2019) 及びバックナンバー

2)環境省、PRTR インフォメーション広場、対象化学物質情報

([https://www.env.go.jp/chemi/prtr/archive/target\\_chemi.html](https://www.env.go.jp/chemi/prtr/archive/target_chemi.html))

3) SVHC SUPPORT DOCUMENT - 3-BENZYLIDINE CAMPHOR

\*\*選定根拠となった調査区分の記号

3.(1) 化学物質環境実態調査

3.(4) 農薬残留対策総合調査

3.(5) 化管法第一種指定化学物質であって化学物質環境実態調査結果及び要調査項目等存在状況調査結果にて不検出であった物質

3.(6) 欧州化学物質庁において高懸念物質とされた物質

3.(7) 専門家から提案された物質

表2 令和2年度に信頼性評価の対象とする11物質

| 名称                                                                        | 主な用途                                                                                                                        | 選定根拠となった調査区分の記号** |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| エチレンチオウレア(別名:2-イミダゾリジンチオン) *                                              | 加硫促進剤 <sup>1)</sup>                                                                                                         | 3.(5)             |
| カフェイン                                                                     | 食品添加物(コーヒー飲料、コーヒー含有飲料) <sup>2)</sup> 、医薬品(強心剤、中枢興奮・鎮痛剤(片頭痛)等) <sup>3)</sup> 、動物用医薬品(神経系用薬、循環・呼吸器官用薬) <sup>4)</sup>          | 3.(1)             |
| カルバマゼピン                                                                   | 医薬品(向精神作用性てんかん治療剤、躁状態治療剤) <sup>3)</sup>                                                                                     | 3.(1)             |
| クロトリマゾール                                                                  | 医薬品(抗真菌剤)、動物用医薬品(抗生物質製剤) <sup>4)</sup>                                                                                      | 3.(1)             |
| クロミプラミン                                                                   | 医薬品(うつ病・うつ状態治療剤、遺尿症治療剤、情動脱力発作治療剤) <sup>3)</sup>                                                                             | 3.(1)             |
| サリチル酸及びその塩類(サリチル酸ナトリウムとして)                                                | アゾ染料、防腐剤、香料、角質溶剤 <sup>5)</sup> 、医薬品(鎮痛消炎剤、神経痛・腰痛治療剤、疼痛治療剤、寄生性皮膚疾患剤) <sup>3)</sup> 、動物用医薬品(神経系用薬、外用剤、動物用シャンプー) <sup>4)</sup> | 3.(1)             |
| チオシアン酸及びその塩類                                                              | ナトリウム塩としてアクリル繊維の溶剤、染料、除草剤、医薬。アンモニウム塩として合成樹脂、過酸化水素安定剤、染色助剤、写真、肥料、除草剤 <sup>5)</sup>                                           | 3.(1)             |
| 1,7,7-トリメチル 3-[4-(メチルフェニル)メチレン]ピジクロ[2.2.1]ヘプタン-2-オン(別名:4-メチルベンジリデン=カンファー) | 日焼け止め剤、化粧品 <sup>6)</sup>                                                                                                    | 3.(7)             |
| ヒドロクロロチアジド                                                                | 医薬品(降圧利尿剤) <sup>3)</sup>                                                                                                    | 3.(1)             |
| ベザフィブラート                                                                  | 医薬品(高脂血症治療剤) <sup>3)</sup>                                                                                                  | 3.(1)             |
| ペルメトリン*                                                                   | 農薬 <sup>1)</sup>                                                                                                            | 3.(1)             |

\*化管法第一種指定化学物質

1) 環境省、PRTR インフォメーション広場、対象化学物質情報  
([https://www.env.go.jp/chemi/prtr/archive/target\\_chemi.html](https://www.env.go.jp/chemi/prtr/archive/target_chemi.html))

2) 製品評価技術基盤機構、NITE 化学物質総合情報提供システム

- ([https://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip\\_search/systemTop](https://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/systemTop))
- 3) 医薬品医療機器総合機構、医療用医薬品の添付文書情報  
([http://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu\\_tenpu\\_base.html](http://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu_tenpu_base.html))
- 4) 農林水産省動物医薬品検査所、動物用医薬品等データベース  
(<https://www.vm.nval.go.jp/>)
- 5) 化学工業日報社、17120 の化学商品（2020）及びバックナンバー
- 6) SVHC SUPPORT DOCUMENT – 3-BENZYLIDINE CAMPHOR  
([https://echa.europa.eu/documents/10162/21833221/svhc\\_support\\_document\\_msc\\_opinion\\_3-bc\\_20160608\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/21833221/svhc_support_document_msc_opinion_3-bc_20160608_en.pdf))

\*\*選定根拠となった調査区分の記号

- 3.（1）化学物質環境実態調査
- 3.（4）農薬残留対策総合調査
- 3.（5）化管法第一種指定化学物質であって化学物質環境実態調査結果及び要調査項目等存在状況調査結果にて不検出であった物質
- 3.（6）欧州化学物質庁において高懸念物質とされた物質
- 3.（7）専門家から提案された物質

表 3 令和元年度に信頼性評価を実施した 12 物質群

|    | 物質名                        | 選定年度  | 信頼性評価<br>の実施年度 |
|----|----------------------------|-------|----------------|
| 1  | エチレングリコール(別名：エタン-1,2-ジオール) | 令和元年度 | 令和元年度          |
| 2  | メチルエチルケトン(別名：2-ブタノン)       | 令和元年度 | 令和元年度          |
| 3  | 2-ナフトール(別名：β-ナフトール)        | 令和元年度 | 令和元年度          |
| 4  | シアン化物(シアン化水素を含む)           | 令和元年度 | 令和元年度          |
| 5  | ジメチルスルホキシド                 | 令和元年度 | 令和元年度          |
| 6  | アセタミプリド                    | 令和元年度 | 令和元年度          |
| 7  | チアメトキサム                    | 令和元年度 | 令和元年度          |
| 8  | アゾキシストロビン                  | 令和元年度 | 令和元年度          |
| 9  | シアナミド                      | 令和元年度 | 令和元年度          |
| 10 | パラコート                      | 令和元年度 | 令和元年度          |
| 11 | <u>4-tert-ブチルフェノール</u>     | 令和元年度 | 令和元年度          |
| 12 | メチルセルロース                   | 令和元年度 | 令和元年度          |

## Ⅱ. 令和元年度に実施した文献情報に基づく影響評価(信頼性評価)の結果について

令和元年度に信頼性評価を実施した 12 物質群について、その評価結果及び信頼性の認められた文献情報から示唆された作用について物質群ごとに表 3 に示した。

### 1. 信頼性評価の実施

令和元年度に実施した 12 物質群の化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価について、化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価作業班会議(第 1 回：令和元年 6 月 10 日開催、第 2 回：同 8 月 30 日開催、第 3 回：同 10 月 29 日開催、第 4 回：同 12 月 26 日開催、令和 2 年 2 月 14 日開催、非公開)において評価を実施し、信頼性評価のまとめと今後の対応案について検討を行った。(信頼性評価の結果は別添参照)

### 2. 令和元年度に実施した 12 物質群の信頼性評価のまとめ

#### (1) 内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る 8 物質

- \*2-ナフトール：試験管内試験の報告において、エストロゲン作用、抗甲状腺ホルモン作用を示すことが示唆された。
- \*ジメチルスルホキシド：試験管内試験の報告において、成長ホルモン及びプロラクチン合成促進作用、プロラクチン分泌促進作用を示すことが示唆された。
- \*アセタミプリド：動物試験の報告において、抗エストロゲン作用、アンドロゲン作用、甲状腺ホルモン作用、抗甲状腺ホルモン作用、視床下部—下垂体—甲状腺軸への作用、視床下部—下垂体—副腎軸への作用を示すことが示唆された。
- \*チアメトキサム：試験管内試験の報告において、エストロゲン作用、アロマターゼ活性促進作用、エストロゲン合成経路かく乱作用を示すことが示唆された。
- \*アゾキシストロビン：動物試験の報告において、エストロゲン作用、視床下部—下垂体—生殖腺軸への作用を示すこと、試験管内試験の報告において、エストロン産生抑制作用、エストロン産生阻害作用を示すことが示唆された。
- \*シアナミド：動物試験の報告において、視床下部—下垂体—副腎軸への作用、甲状腺ペルオキシダーゼ抑制を介した甲状腺ホルモン合成抑制作用を示すことが示唆された。
- \*パラコート：動物試験の報告において、エストロゲン様作用、視床下部—下垂体—副腎軸への作用を示すこと、試験管内試験の報告において、コレステロール代謝阻害作用(プレグネノロン生成阻害最終的にプロゲステロン生成阻害)、アルドステロン合成阻害作用、アンジオテンシン 1 受容体を介したアンジオテンシン II 作用、アンジオテンシン 2 受容体を介した抗アンジオテンシン II 作用を示すこと、疫学的調査において、抗甲状腺ホルモン様作用、視床下部—下垂体—甲状腺軸への作用を示すことが示唆された。
- \*4-tert-ブチルフェノール：動物試験の報告において、エストロゲン作用を示すこと、試験管内試験の報告において、エストロゲン作用又は抗エストロゲン作用、性ステロイド結合蛋白質への競合阻害作用、ステロイド産生影響、 $\gamma$ -アミノ酪酸受容体への作

用を示すことが示唆された。

## (2)現時点では試験対象物質としない4物質群

- \*エチレングリコール：内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠は得られなかった。
- \*メチルエチルケトン：内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠は得られなかった。
- \*シアン化物：内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠は得られなかった。
- \*メチルセルロース類：メチルセルロース類のうち、メチルセルロース、高粘度ヒドロキシプロピルメチルセルロース及び超高粘度ヒドロキシプロピルメチルセルロースについては、内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠は得られなかった。

表3 信頼性評価結果を基にした物質ごとの確認すべき作用  
(試験管内試験の実施対象候補)

|   | 名称                     | 示唆された作用 |         |        |         |         |          |        |
|---|------------------------|---------|---------|--------|---------|---------|----------|--------|
|   |                        | エストロゲン  | 抗エストロゲン | アンドロゲン | 抗アンドロゲン | 甲状腺ホルモン | 抗甲状腺ホルモン | 脱皮ホルモン |
| 1 | 2-ナフトール                | ○       | —       | —      | —       | —       | ○        | —      |
| 2 | ジメチルスルホキシド             | —       | —       | —      | —       | —       | —        | —      |
| 3 | アセタミプリド                | —       | ○       | ○      | —       | ○       | ○        | —      |
| 4 | チアメトキサム                | ○       | —       | —      | —       | —       | —        | —      |
| 5 | アゾキシストロビン              | ○       | ○       | ○      | ○       | —       | —        | —      |
| 6 | シアナミド                  | —       | —       | —      | —       | ○       | ○        | —      |
| 7 | パラコート                  | ○       | —       | —      | —       | ○       | ○        | —      |
| 8 | <u>4-tert-ブチルフェノール</u> | ○       | ○       | —      | —       | —       | —        | —      |
| 計 | 18 試験                  | 5       | 3       | 2      | 1       | 3       | 4        | 0      |

○：既存知見から示唆された作用    —：試験管内試験を実施しない作用

X I . 4-*tert*-ブチルフェノール

## 1. 内分泌かく乱作用に関連する報告

4-*tert*-ブチルフェノールの内分泌かく乱作用に関連する報告として、生態影響、生殖影響、エストロゲン作用、性ステロイド結合蛋白質への競合阻害作用、エストロゲン作用又は抗エストロゲン作用、甲状腺ホルモン作用又は抗甲状腺ホルモン作用、ステロイド産生影響、 $\gamma$ -アミノ酪酸受容体への作用の有無及び疫学的調査の関する報告がある。

## (1)生態影響

- ①Barse ら(2006)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 690、1,380、2,300 $\mu$ g/L(設定濃度)に 28 日間ばく露した成熟雄コイ(*Cyprinus carpio*)への影響が検討されている。その結果として、690 $\mu$ g/L 以上のばく露区で生殖腺体指数、筋肉組織中アルカリフォスファターゼ比活性、筋肉組織中アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ比活性の低値、肝臓体指数、腎臓体指数、筋肉組織中ビテロゲニン濃度、筋肉組織中アラニンアミノトランスフェラーゼ比活性の高値、1,380 $\mu$ g/L のばく露区で筋肉組織中酸フォスファターゼ比活性の高値(690 $\mu$ g/L 区では低値)が認められた。なお、頭蓋体指数には影響は認められなかった。(14865)(評価結果の略号： $\Delta$ oP、以下同じ)
- 想定される作用メカニズム：エストロゲン作用

## (2)生殖影響

- ①Haavisto ら(2003)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 1、10、100mg/kg を妊娠 13.5 日目(膈中精子確認日を妊娠 0.5 日目とする)から隔日 3 回皮下投与した SD ラットへの影響(妊娠 19.5 日目の雄胎仔について試験)が検討されているが、体重、精巣中テストステロン濃度には影響は認められなかった。
- また、4-*tert*-ブチルフェノール 10mg/kg を妊娠 13.5 日目(膈中精子確認日を妊娠 0.5 日目とする)から隔日 3 回皮下投与した SD ラットへの影響(妊娠 19.5 日目の雄胎仔について試験)が検討されているが、精巣組織テストステロン産生量には影響は認められなかった。(5476)( $\Delta$ x) $\rightarrow$ (7)②
- 想定される作用メカニズム：影響は認められなかった。

## (3)エストロゲン作用

- ①Tollefsen ら(2008)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 0.3、1、3、10、30、100 $\mu$ M(=45、150、450、1,500、4,500、15,000 $\mu$ g/L)の濃度に 96 時間ばく露したニジマス肝培養細胞(未成熟雄由来)への影響が検討されている。その結果として、0.3、1、3、10 $\mu$ M(=45、150、450、1,500 $\mu$ g/L)の濃度区でビテロゲニン産生濃度の高値、30 $\mu$ M(=4,500 $\mu$ g/L)以上の濃度区で細胞生存率の低値が認められた。(14874)( $\bigcirc$  $\bigcirc$ P)
- ②Jobling と Sumpter(1993)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 10 $\mu$ M(=1,500 $\mu$ g/L)の濃度に 4 日間ばく露したニジマス肝培養細胞(未成熟雄由来)への影響が検討されている。その結果として、ビテロゲニン産生濃度の高値が認められた。(206)( $\Delta$  $\bigcirc$ P)
- ③Soto ら(1995)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 10 $\mu$ M(=1,500 $\mu$ g/L)の濃度に 6 日間ばく露したヒト乳がん細胞 MCF-7 による細胞増殖試験が検討されている。その結果として、細胞増殖誘導が認め



られた。(539)(×—)

本試験結果の解釈にあたっては、実験条件及び結果の詳細が Soto ら(1992)からの引用である点に注意を要すると判断された。

④Körner ら(1998)によって、4-*tert*-ブチルフェノール(測定濃度の記載不明瞭)に6日間ばく露したヒト乳がん細胞 MCF-7 による細胞増殖試験が検討されている。その結果として、10 $\mu$ M(=1,500 $\mu$ g/L)の濃度区で細胞増殖誘導が認められた。(2105)(△○P)

⑤Olsen ら(2005)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 0.3、1、3、10、30、100 $\mu$ M(=45、150、450、1,500、4,500、15,000 $\mu$ g/L)の濃度に4日間ばく露したニジマス肝培養細胞(未成熟雄由来)への影響が検討されている。その結果として、EC<sub>50</sub> 値 18 $\mu$ M(=2,700 $\mu$ g/L)の濃度でビテロゲニン産生濃度の高値が認められた。

また、4-*tert*-ブチルフェノール 0.3、1、3、10、30、100 $\mu$ M(=45、150、450、1,500、4,500、15,000 $\mu$ g/L)の濃度に6日間ばく露したヒト乳がん細胞 MCF-7 による細胞増殖試験が検討されている。その結果として、EC<sub>50</sub> 値 32 $\mu$ M(=4,800 $\mu$ g/L)の濃度で細胞増殖誘導が認められた。(14869)(○○P)

⑥Routledge と Sumpter (1997)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 1~1,000 $\mu$ M(=150~150,000 $\mu$ g/L)の濃度に84時間ばく露した酵母(ヒトエストロゲン受容体を発現)によるレポーターアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性発現誘導)が検討されている。その結果として、100 $\mu$ M(=15,000 $\mu$ g/L)付近の濃度以上で  $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現誘導が認められた。(363)(○○P)

#### (4)性ステロイド結合蛋白質への競合阻害作用

①Milligan ら(1998)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 0.3、3、30、300 $\mu$ M(=45、450、4,500、45,000 $\mu$ g/L)の濃度でステロイド結合蛋白質(ニジマス血漿を使用)による 17 $\beta$ -エストラジオールに対する結合阻害(競合結合)試験が検討されている。その結果として、IC<sub>50</sub> 値 10~100 $\mu$ M(=1,500~15,000 $\mu$ g/L)付近の濃度で結合阻害が認められた。

また、4-*tert*-ブチルフェノール 0.3、3、30、300 $\mu$ M(=45、450、4,500、45,000 $\mu$ g/L)の濃度で  $\alpha$ -フェトプロテイン(妊娠17日目ラット羊水を使用)による 17 $\beta$ -エストラジオールに対する結合阻害(競合結合)試験が検討されているが、結合阻害は認められなかった。

また、4-*tert*-ブチルフェノール 0.3、3、30、300 $\mu$ M(=45、450、4,500、45,000 $\mu$ g/L)の濃度でステロイド結合蛋白質(妊娠女性血清を使用)による 5 $\alpha$ -ジヒドロテストステロンに対する結合阻害(競合結合)試験が検討されている。その結果として、IC<sub>50</sub> 値 10~100 $\mu$ M(=1,500~15,000 $\mu$ g/L)付近の濃度で結合阻害が認められた。

また、4-*tert*-ブチルフェノール 0.3、3、30、300 $\mu$ M(=45、450、4,500、45,000 $\mu$ g/L)の濃度でステロイド結合蛋白質(ニジマス血漿を使用)による 5 $\alpha$ -ジヒドロテストステロンに対する結合阻害(競合結合)試験が検討されている。その結果として、IC<sub>50</sub> 値 10~100 $\mu$ M(=1,500~15,000 $\mu$ g/L)付近の濃度で結合阻害が認められた。(882)(○○P)→(5)①

本試験結果の解釈にあたっては、統計学的な検定が示されていない点に注意を要すると判断された。

②Tollefsen (2007)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 3、10、30、100、300、1,000 $\mu$ M(=450、1,500、4,500、15,000、45,000、150,000 $\mu$ g/L)の濃度でステロイド結合蛋白質(雌ニジマス血漿を使用)による標識 17 $\beta$ -エストラジオール 2.5nM に対する結合阻害(競合結合)試験が検討されている。その結果として、IC<sub>50</sub>

値 250 $\mu$ M(=37,500 $\mu$ g/L)の濃度で結合阻害が認められた。(14873)(○●P)

#### (5)エストロゲン作用又は抗エストロゲン作用

- ①Tollefsen と Nilsen (2008)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 1、3、10、30、100、300 $\mu$ M(=150、450、1,500、4,500、15,000、45,000 $\mu$ g/L)の濃度でエストロゲン受容体(未成熟雌ニジマス肝臓由来)による標識 17 $\beta$ -エストラジオール 2.5nM に対する結合阻害(競合結合)試験が検討されている。その結果として、IC<sub>50</sub> 値 87 $\mu$ M(=13,050 $\mu$ g/L)の濃度で結合阻害が認められた。(14875)(○●P)
- 本試験結果の解釈にあたっては、統計学的な検定が示されていない点に注意を要すると判断された。
- ②Blair ら(2000)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 1,000 $\mu$ M(=150,000 $\mu$ g/L)までの濃度でエストロゲン受容体(成熟雌 SD ラット子宮サイトゾルを使用)による標識 17 $\beta$ -エストラジオール 1 nM に対する結合阻害(競合結合)試験が検討されている。その結果として、IC<sub>50</sub> 値 368 $\mu$ M(=55,200 $\mu$ g/L)の濃度で結合阻害が認められた。(14411)(○●P)

#### ※参考 (6)甲状腺ホルモン作用又は抗甲状腺ホルモン作用(今回評価対象としなかった文献)

- ①van den Berg ら(1991)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 100 $\mu$ M(=15,000 $\mu$ g/L)の濃度でヒトトランスサイレチンによる標識サイロキシンに対する結合阻害(競合結合)試験が検討されているが、結合阻害は認められなかった。(2700)
- 評価未実施の理由：影響が認められなかった報告のため

#### (7)ステロイド産生影響

- ①Myllymäki ら(2005)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 0.01、0.1、1  $\mu$ M (=1.5、15、150 $\mu$ g/L)の濃度に4～5日間ばく露したラット卵胞(14日齢 SD ラット由来)への影響が検討されている。その結果として、0.01 $\mu$ M(=1.5 $\mu$ g/L)以上の濃度区でテストステロン産生量、エストラジオール産生量の低値が認められた。なお、アロマターゼ比活性には影響は認められなかった。
- また、4-*tert*-ブチルフェノール 0.01、0.1 $\mu$ M (=1.5、15 $\mu$ g/L)の濃度に5日間ばく露したラット卵胞(14日齢 SD ラット由来)への影響(ホルスコリン 10 $\mu$ M 共存下)が検討されているが、cAMP 産生量には影響は認められなかった。(7500)(△●P)
- 想定される作用メカニズム：エストロゲン産生低下作用、テストステロン産生低下作用
- ②Haavisto ら(2003)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 10,000、100,000、500,000 $\mu$ g/L の濃度に3時間ばく露したラット精巣培養組織(妊娠 19.5 日目 SD ラット胎仔由来)への影響が検討されている。その結果として、100,000 $\mu$ g/L 以上の濃度区でテストステロン産生濃度の高値、100,000 $\mu$ g/L の濃度区でプロゲステロン産生濃度の高値が認められた。なお、組織中テストステロン濃度、cAMP 産生濃度には影響は認められなかった。(5476)(△●P)
- 想定される作用メカニズム：ステロイド産生への作用

#### (8) $\gamma$ -アミノ酪酸受容体への作用への影響

- ①Aoshima ら(2001)によって、4-*tert*-ブチルフェノール 10 $\mu$ M(=1,500 $\mu$ g/L)の濃度にばく露したラット又はウシ脳由来  $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)受容体(アフリカツメガエル卵細胞中で発現)への影響(GABA 1  $\mu$ M 共存下)が検討されている。その結果として応答電気パルス強度の高値が認められた。(5479)(△

○P)

想定される作用メカニズム：その他の作用(GABA 受容体応答性増強(神経伝達抑制増強))

## (9)疫学的調査

①Aschengrau ら(1998)によって、4-*tert*-ブチルフェノールについて、米国 Massachusetts 州 Cape Cods の 5 都市にて 1983 年～1986 年にかけて、症例群(Massachusetts Cancer Registry において乳がんと診断された都市永住女性 334 名、エストロゲン様化学物質職業ばく露の可能性が possible 又は probable と判断された率 39.5%)と対照群(都市永住職業婦人 753 名、同ばく露の可能性が判断された率 38.2%)とを対象に、乳がん発生とエストロゲン様化学物質職業ばく露との関連性について検討されているが、4-*t*-ブチルフェノールばく露(症例群 7 名、対照群 40 名)と乳がん発症率とに関連性は認められなかった(発症率補正オッズ比 0.5)。(745)(○○N)

想定される作用メカニズム：影響は認められなかった。

## 2. 総合的判断(案)

得られた報告について信頼性評価を実施した結果として、内分泌かく乱作用に関する試験対象物質として選定する根拠として認められると評価された報告が得られた。

試験対象物質として選定する根拠として認められると評価された報告から、動物試験の報告において、エストロゲン作用を示すこと、試験管内試験の報告において、エストロゲン作用又は抗エストロゲン作用、性ステロイド結合蛋白質への競合阻害作用、ステロイド産生影響、 $\gamma$ -アミノ酪酸受容体への作用を示すことが示唆された。

なお、信頼性評価のまとめと今後の対応案について表 11 に示した。

表 11 信頼性評価のまとめ

物質名：4-*tert*-ブチルフェノール

| 区分          |          | 著者                          | 作業班会議における信頼性評価結果                                                                                        |                                               |                                                                     |
|-------------|----------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
|             |          |                             | 報告結果(Results)を証<br>するために必要である<br>『材料と方法(Materials<br>and Methods)』に関す<br>る記載の有無及びその<br>評価 <sup>1)</sup> | 内分泌<br>かく乱<br>作用と<br>の関連<br>の有無 <sup>2)</sup> | 内分泌かく乱<br>作用に関する<br>試験対象物質<br>として選定す<br>る根拠として<br>の評価 <sup>3)</sup> |
| (1)生態影響     | エストロゲン作用 | ①Barse ら(2006)              | △                                                                                                       | ○P                                            | ○                                                                   |
| (2)生殖影響     |          | ①Haavisto ら(2003)           | △                                                                                                       | ×                                             | ×                                                                   |
| (3)エストロゲン作用 |          | ①Tollefsen ら(2008)          | ○                                                                                                       | ○P                                            | ○                                                                   |
|             |          | ②Jobling と<br>Sumpter(1993) | △                                                                                                       | ○P                                            | ○                                                                   |
|             |          | ③Soto ら(1995)               | ×                                                                                                       | —                                             | ×                                                                   |
|             |          | ④Körner ら(1998)             | △                                                                                                       | ○P                                            | ○                                                                   |
|             |          | ⑤Olsen ら(2005)              | ○                                                                                                       | ○P                                            | ○                                                                   |

| 区分                           | 著者                                                                                                                                                        | 作業班会議における信頼性評価結果                                                                                        |                                               |                                                                     |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
|                              |                                                                                                                                                           | 報告結果(Results)を証<br>するために必要である<br>『材料と方法(Materials<br>and Methods)』に關す<br>る記載の有無及びその<br>評価 <sup>1)</sup> | 内分泌<br>かく乱<br>作用と<br>の関連<br>の有無 <sup>2)</sup> | 内分泌かく乱<br>作用に關する<br>試験対象物質<br>として選定す<br>る根拠として<br>の評価 <sup>3)</sup> |
|                              | ⑥Routledge と<br>Sumpter (1997)                                                                                                                            | ○                                                                                                       | ○P                                            | ○                                                                   |
| (4)性ステロイド結合蛋白質への<br>競合阻害作用   | ①Milligan ら(1998)                                                                                                                                         | ○                                                                                                       | ○P                                            | ○                                                                   |
|                              | ②Tollefsen (2007)                                                                                                                                         | ○                                                                                                       | ○P                                            | ○                                                                   |
| (5)エストロゲン作用又は抗エス<br>トロゲン作用   | ①Tollefsen と Nilsen<br>(2008)                                                                                                                             | ○                                                                                                       | ○P                                            | ○                                                                   |
|                              | ②Blair ら(2000)                                                                                                                                            | ○                                                                                                       | ○P                                            | ○                                                                   |
| (6)甲状腺ホルモン作用又は抗甲<br>状腺ホルモン作用 | ①van den Berg ら<br>(1991)<br>評価未実施                                                                                                                        |                                                                                                         |                                               |                                                                     |
| (7)ステロイ<br>ド産生影響             | エストロゲン産生<br>低下作用、テスト<br>ステロン産生低下<br>作用                                                                                                                    | ①Myllymäki ら(2005)                                                                                      | △                                             | ○P                                                                  |
|                              | ステロイド産生へ<br>の作用                                                                                                                                           | ②Haavisto ら(2003)                                                                                       | △                                             | ○P                                                                  |
| (8)γ-アミノ<br>酪酸受容体<br>への作用    | GABA 受容体応答<br>性増強(神経伝達抑<br>制増強)                                                                                                                           | ①Aoshima ら(2001)                                                                                        | △                                             | ○P                                                                  |
| (9)疫学的調査                     | ①Aschengrau ら<br>(1998)                                                                                                                                   | ○                                                                                                       | ○N                                            | ×                                                                   |
| 信頼性評価の<br>結果と今後の<br>対応案      | 動物試験の報告において、エストロゲン作用を示すこと、試験管内試験の報告において、<br>エストロゲン作用又は抗エストロゲン作用、性ステロイド結合蛋白質への競合阻害作用、<br>ステロイド産生影響、γ-アミノ酪酸受容体への作用を示すことが示唆されたため内分泌か<br>く乱作用に關する試験対象物質となり得る。 |                                                                                                         |                                               |                                                                     |

1)○：十分に記載されている、△：一部記載が不十分である、×：記載が不十分である、—：評価を行わない

2)○：内分泌かく乱作用との関連性が認められる(P：作用が認められる、N：作用が認められない)、?：内分泌かく乱作  
用との関連性は不明、×：内分泌かく乱作用との関連性が認められない、—：評価を行わない

3)○：試験対象物質として選定する根拠として認められる、×：試験対象物質として選定する根拠として認められない、  
—：内分泌かく乱作用との関連性が不明であるため、評価ができない

#### 参考文献

14865: Barse AV, Chakrabarti T, Ghosh TK, Pal AK and Jadhao SB (2006) One-tenth dose of LC<sub>50</sub> of 4-tert-butylphenol causes endocrine disruption and metabolic changes in *Cyprinus carpio*. Pesticide Biochemistry and Physiology 86, 172-179.

5476: Haavisto TE, Adamsson NA, Myllymäki SA, Toppaari 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 (5), 593-605.

14874: Tollefsen KE, Eikvar S, Finne EF, Fogelberg O and Gregersen IK (2008) Estrogenicity of alkylphenols and

- alkylated non-phenolics in a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primary hepatocyte culture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 370-383.
- 206: 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 (3-4), 361-372.
- 539: Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N and Serrano FO (1995) The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 103 (supplement 7), 113-122.
- 1984: Soto AM, Lin T-M, Justicia H, Silvia RM and Sonnenschein C (1992) An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics. In: *Chemically Induced Alterations in Sexual Development: The Wildlife/Human Connection* (Colborn T, Clement C, eds). Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing, 1992;295-309
- 2105: Körner W, Hanf V, Schuller W, Bartsch H, Zwirner M and Hagenmaier H (1998) Validation and application of a rapid *in vitro* assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. *Chemosphere*, 37 (9-12), 2395-2407.
- 14869: Olsen CM, Meussen-Elholm ETM, Hongslo JK, Stenersen J and Tollefsen KE (2005) Estrogenic effects of environmental chemicals: An interspecies comparison. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 141, 267-274.
- 363: Routledge EJ and Sumpter JP (1997) Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (6), 3280-3288.
- 882: 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 (1), 89-95.
- 14873: Tollefsen KE (2007) Binding of alkylphenols and alkylated non-phenolics to the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma sex steroid-binding protein. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68 (1), 40-48.
- 14875: Tollefsen KE and Nilsen AJ (2008) Binding of alkylphenols and alkylated non-phenolics to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic estrogen receptors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69, 163-172.
- 14411: Blair RM, Fang H, Branham WS, Hass BS, Dial SL, Moland CL, Tong W, Shi L, Perkins R and Sheehan DM (2000) The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences*, 54, 138-153.
- 2700: van den Berg KJ, van Raaij JAG, Bragt PC and Notten WR (1991) Interactions of halogenated industrial chemicals with transthyretin and effects on thyroid hormone levels *in vivo*. *Archives of Toxicology*, 65 (1), 15-19.
- 7500: 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 (1), 69-80.
- 5479: Aoshima H, Hossain SJ, Imamura H and Shingai R (2001) Effects of bisphenol A and its derivatives on the response of GABA(A) receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65 (9), 2070-2077.
- 745: Aschengrau A, Coogan PF, Quinn MM and Cashins LJ (1998) Occupational exposure to estrogenic chemicals and the occurrence of breast cancer: An exploratory analysis. *American Journal of Industrial Medicine*, 34 (1), 6-1.