

部分翻訳

**European Union
Risk Assessment Report**

**4-nonylphenol (branched)
and
nonylphenol**

**CAS Nos:84852-15-3
25154-52-3**

2nd Priority List, Volume 10, 2002

欧州連合
リスク評価書 (Volume 10, 2002)
4-ノンフェノール(分岐型)およびノンフェノール

European Chemicals Bureau
Institute for Health and Consumer Protection
European Chemicals Bureau
Existing Substances

European Union
Risk Assessment Report

CAS Nos: 84852-15-3
25154-52-3

EINECS Nos: 284-325-5
246-672-0

4-nonylphenol (branched)
and
nonylphenol

HO C9H19

EC: 284-325-5
and 246-672-0

2nd Priority List
Volume: 10

EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE
EUR 20387 EN

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部
2018年8月

本部分翻訳文書は、4-nonylphenol (branched) and nonylphenol (CAS No: 84852-15-3、25154-52-3)に関するEU Risk Assessment Report, (Vol. 10, 2002)の第4章「ヒト健康」のうち、第4.1.2項「影響評価：有害性の特定および用量反応関係」を翻訳したものである。原文(評価書全文)は、

<https://echa.europa.eu/documents/10162/efae6363-2c55-47ee-bc85-0c8d265803cf>を参照のこと。

4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量（濃度）-反応（影響）評価

今回の毒性試験に用いられる被験物質は商用生産されたノニルフェノール類であり、第1項で述べたとおり、様々な組成の異性体混合物からなる。検討された被験物質の組成を報告した毒性試験はほとんどなく、この組織の多様性が毒性学的特性に影響を及ぼし得る範囲（あるとすれば）の評価は困難である。

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

4.1.2.1.1 動物における試験

経口投与後のノニルフェノールのトキシコキネティクスは、動物における試験2件で直接検討されている (Knaak *et al.*, 1966, Fennell and MacNeela, 1997)。いずれも手短かに報告された試験であり、放射標識されたノニルフェノール投与後回収された放射能が測定された。ノニルフェノールの経皮吸収は、ブタおよびラットの皮膚を含む *in vitro* 系を用いて評価されている (Monteiro-Riviere *et al.*, 1999)。さらに、オクチルフェノール (p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)-フェノール：ノニルフェノールと近似の構造関係があり、類似の物理化学的特性および毒性学的特性を有するアルキルフェノール) 経口投与後のトキシコキネティクスが、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 (GLP) の原則に従って実施された、一連の詳細かつ十分に報告された試験において検討されている (Hüls 社, 1995a,b 1996g,h, Certa *et al.*, 1996)。オクチルフェノールがアルキルフェノール化合物のモデルとして選択されたのは、著者らによれば、オクチルフェノールの化学構造が定義されているのに対し、ノニルフェノールは、トキシコキネティクス検討の際、分析を困難にし得る様々な異性体混合物からなるためである。

Knaak *et al.* (1966) の試験では、雄 Wistar ラット4匹からなる群に、ベンゼン環 ^{14}C 標識ノニルフェノール 6.6 mg/kg を経口経路か腹腔内経路のいずれかにより単回投与した。尿、糞便、呼気 CO_2 試料を最大7日間採取し、放射能について分析した。経口経路では、4日以内に、投与された放射能の約70%が糞便、約20%が尿を介し排泄されたことが認められた。尿中放射能の存在から、有意な吸収の発生が示された。4日目より後の放射能の排泄はほとんどなかった。呼気 CO_2 の放射能は検出されなかった。データは提示されなかったが、腹腔内投与後に同一の結果を得たことが述べられ、吸収されたノニルフェノールの主要な排泄経路は糞便を介し、尿中排泄経路の重要性は二義的であると示唆された。イオン交換クロマトグラフィにより、ノニルフェノールの主要な尿中代謝物はグルクロン酸抱合体であることが示された。

Fennell and MacNeela (1997) は、抄録として報告された試験において、雄雌 Sprague-Dawley ラット(動物数の記載なし)にベンゼン環 ^{14}C 標識ノニルフェノール用量5または200 mg/kg を単回強制経口投与した。ラットをガラス製代謝ケージに入れ、放射能測定のため、尿、糞便、呼気を最大7日間採取した。7日後、血液、組織、胃・小腸・大腸内容物、屠体を取り出し、放射能について分析した。雄雌ラットいずれの投与量とも、放射能の大部分が糞便中に回収され、尿中の回収はそれより少量であった(実際の回収量の報告なし)。呼気中

の放射能 ($^{14}\text{C}\text{O}_2$) は得られなかった。5 mg/kg 群の雄に投与された放射能は、組織中に約 0.4%、消化管に 1.3%、さらに屠体に 1.3%認められた。投与量に対する割合として、200 mg/kg 群の組織および屠体において検出された放射能レベルはより低かった。これらの知見から、ノニルフェノールは経口暴露後全身に吸収され、糞便および尿経路を介した排泄であることが確認される。組織および屠体の放射能が比較的少量であることから、分布は広範に及ぶと考えられるが、生体内蓄積の可能性は限定的になり得ると示唆される。

In vitro 経皮試験では、ブタおよびラットの皮膚を用いて、8 時間にわたりベンゼン環 ^{14}C 標識ノニルフェノールの浸透および吸収が評価された (Monteiro-Riviere *et al.*, 1999)。ヒト皮膚試料も用いた (本試験のこの箇所の要約については、4.1.2.1.2 ヒトにおける試験の項参照)。1%標識ノニルフェノール PEG-400 溶液 (10 μL) を、フロースルー型拡散セルにマウントした面積 0.32 cm^2 の新鮮皮膚に適用し、拡散セルは閉鎖しなかった。皮膚面積当たりの投与量は 0.3 mg/cm^2 とした。皮膚試料を、皮膚採取器により標準的な厚さである 500 μm にしてからマウントした。灌流液の放射エネルギーを随時的にモニターし、暴露時間終了時に皮膚試料の放射エネルギーを測定した。経皮吸収率は灌流時間 8 時間の灌流液に検出された放射エネルギーと定義し、適用量に対する割合 (%) として示した。経皮浸透率は灌流液、角質層、投与された皮膚の総放射エネルギーと定義し、こちらも適用量に対する割合 (%) として示した。ブタおよびラットの皮膚の吸収率は、いずれも投与された放射エネルギーの 0.15%未満であった。浸透率はブタの皮膚では約 3%、ラットの皮膚では 6%、また角質層の投与量に対する割合は、ブタでは約 2%、ラットでは 0.5%であった。本試験終了時の試験系から得られた放射エネルギーの総回収率は、両動物種とも 90%を超えた。本試験の結果から、ノニルフェノールの皮膚全体における吸収は不良である一方、いくらか限定的な皮膚浸透 (特に角質層) は生じ得ると示唆される。

オクチルフェノールに関する最初の試験では、雄 Wistar ラットに経口経路および静脈内経路により単回暴露後、トキシコキネティクス測定が行われた (Hüls 社, 1995a)。ラット 6 匹からなる群に、プロピレングリコールに溶解したオクチルフェノール用量 50 もしくは 200 mg/kg のいずれかを単回強制経口投与、または 5 mg/kg を単回静脈内投与した。ガスクロマトグラフィを用いたオクチルフェノール分析のため、投与後 48 時間を限度に (各時点で 3 匹から) 血液試料を繰り返し採取した。静脈内投与後、血中オクチルフェノール濃度は約 1970 ng/mL でピークとなり、30 分以内に急速に低下した。投与から 8 時間後、血中オクチルフェノールは検出されなかった。消失半減期は 310 分であった。50 mg/kg 経口投与後 20 分で最高血中濃度 40 ng/mL が認められ、6 時間以内にオクチルフェノール濃度は約 5 ng/mL の検出限界に近似した。6 時間後に採取した血液試料は分析されなかった。200 mg/kg 群の血中オクチルフェノール濃度には大幅なばらつきがあったが、約 1~2 時間後と 4~8 時間後に約 100 ng/mL の 2 つのピーク濃度に識別できた。オクチルフェノールは、投与から 48 時間後なお 2 匹の血中に 5~10 ng/mL 存在した。経口投与による生物学的利用能 (血中濃度曲線下面積 [AUC] から算出) は低く、50 および 200 mg/kg 群の投与量のそれぞれ 2%、10% であることが認められた。

オクチルフェノールに関する第 2 の試験では、雄 Wistar ラットに反復経口投与後のトキシコキネティクスに関する挙動が検討された (Hüls 社, 1995b, 1996g)。ラット 5 匹からなる群に、プロピレングリコールに溶解したオクチルフェノール用量 50 または 200 $\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ を連続 14 日間 1 日 1 回強制経口投与した。オクチルフェノールの濃度分析のため、血液試料を 1 日目および 14 日目に数回採取した。雄 15 匹からなるさらなる 1 群に、オクチルフェノール濃度 8 mg/L を最大 28 日間飲水投与 (約 0.8 $\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ の摂取量を投与) し、血液試料について暴露期間全体を通じ数回採取した。暴露期間終了時に動物を屠殺し (最終投与と関連付けた正確な時期の報告なし)、オクチルフェノールの濃度分析のため、肝臓、腎臓、脳、肺、骨格筋、腹部脂肪を採取した。

強制経口投与群では、血中オクチルフェノール濃度が最初の投与から 1 時間以内にピークとなり、最大濃度は前回の試験で認められた濃度と同程度であった。その後 24 時間で、両群の濃度は約 13 ng/mL に着実に低下した。14 日目の血中濃度-時間プロファイルは、1 日目に認められたプロファイルと概して類似していた。飲水投与群では、いずれの時点でも血中オクチルフェノールは検出されなかった（検出限界：1~5 ng/mL）。臓器および組織の分析から、50 mg/kg/日群数匹の脂肪および肝臓にオクチルフェノールが存在し、組織における濃度はそれぞれ 16~32 ng/g、10~14 ng/g であることが示された。200 mg/kg/日群では、オクチルフェノールが分析されたすべての組織において認められた。脂肪が際立った最高濃度（平均：1285 ng/g）となり、次いで肝臓（平均：87 ng/g）、腎臓（平均：71 ng/g）、筋肉（平均：43 ng/g）の順となった。飲水投与群では、オクチルフェノールは 1 匹の腎臓および筋肉にのみ認められた。

本反復強制経口投与試験により、オクチルフェノールは体内に広範に分布するが、脂肪において最高濃度となることが示される。血中濃度-時間プロファイルが 1 日目と 14 日目で類似していたことから、生体内蓄積は限定的となり得ることが示唆されるが、この 1 時点より多くの時点における臓器および組織の濃度に関する情報はなく、本試験は生体内蓄積の可能性に関する強固な証拠とならない。また、飲水投与群の結果から、最大 0.8 mg/kg/日を 28 日間摂取後、本質的に検出可能な量のオクチルフェノールは血中および組織に到達しないことが示される。

Hüls 社による最後の試験では、ラット肝ホモジネートが、オクチルフェノールをグルクロニド抱合および硫酸抱合（多くのフェノール性物質の主要な代謝経路）により代謝できることが立証された（Hüls 社 1996h）。

上記の動物における試験で示された情報を合わせると、ラットの場合、ノニルフェノールのトキシコキネティクスに関する挙動について、いくつかの面から解明できる。放射能が尿から回収された Knaak および Fennell and MacNeela の試験から、ノニルフェノールは経口投与後に吸収されることが示される。アルキルフェノール類が消化管から吸収され、初期には急速であると考えられることが、オクチルフェノール経口投与後直ちに本物質が血中で検出された試験において確認される。これらの試験に基づいて吸収度を決定することはできないが、Knaak の試験では投与された放射能の 20%が尿から回収されたことから、吸収度はこの数値以上でなければならないと示唆される。オクチルフェノールの経口投与による生物学的利用能は 2~10%と予測されたが、Knaak の試験ではオクチルフェノール代謝物の血中および組織中濃度が測定されなかったことから、この数値は吸収度を反映しているとはみなせない。Fennell and MacNeela の試験では、オクチルフェノールに関する試験の裏付けにより、ノニルフェノールは広範に分布し脂肪において最高濃度であることが示される。ノニルフェノールの主要な代謝経路は、他のフェノール化合物と同様に、グルクロニド抱合および硫酸抱合であると考えられる。ノニルフェノール経口投与による放射標識試験が示すとおり、最大 200 mg/kg の単回投与では数日以内にほぼ排出され、少量の放射能が組織に保持されたことから、生体内蓄積の可能性は限定的になり得ると示唆されるが、ノニルフェノールに関する生体内蓄積の可能性の有無については、入手可能なデータが限られることから結論を導けない。ノニルフェノールの経口投与試験から、主要な排泄経路が糞便および尿を介することも示される。経皮経路に関しては、上記 *in vitro* 試験から、ノニルフェノールの皮膚全体における吸収は不良である一方、いくらか限定的な皮膚浸透（特に角質層）は生じ得ると示唆される。

4.1.2.1.2 ヒトにおける試験

29 歳および 58 歳の男性ボランティア 2 名を対象に、放射標識したノニルフェノールのトキシコキネティクスに関する挙動が検討された (Müller, 1997)。ベンゼン環 ^{14}C 標識ノニルフェノール 5 mg (66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重) を 1 名に単回経口投与し、1 mg (14 $\mu\text{g}/\text{kg}$) をもう 1 名に単回静脈内投与した。最初のボランティアから、投与後最大 56 時間の間隔で血液、尿、便を採取した。もう 1 名のボランティアからは、最大 24 時間の間隔で血液試料のみ採取した。これらの生体試料について、ノニルフェノールおよびノニルフェノール抱合体 (グルクロニド抱合体および硫酸抱合体) の分析をガスクロマトグラフィ/質量分析により行った (放射標識したノニルフェノールの使用理由は不明)。添加された血液、尿、便、脂肪組織試料を用いた回収実験から、本分析における抽出法の有効性が確認された。

経口投与後、ノニルフェノールおよび抱合体として存在するノニルフェノールの血中濃度は、いずれも約 1 時間でピークとなり、抱合体として存在するノニルフェノールのピーク濃度は 86 ng/g 血液で、これは非抱合体のノニルフェノールより約 100 倍高かった。静脈内投与では、ノニルフェノールの最高濃度は非抱合体および抱合体の化合物についてそれぞれ 0.6 ng/g 血液、0.2 ng/g 血液であることが、最初のサンプリング時点である 30 分後に認められ、また、すべての時点で、非抱合体および抱合体のノニルフェノール濃度は同一の桁数であった。経口経路と静脈内経路の双方について、血中濃度の経時変化により、血中から第 2 コンパートメント (脂肪コンパートメントと考えられる) に分布する初期相、続いてより緩徐な排出相に至ることが示された。経口経路と静脈内経路の AUC の比較から、非抱合体のノニルフェノールの経口投与による生物学的利用能は約 20% であると示唆された。尿試料の分析では、経口投与量の約 10% が非抱合体または抱合体のノニルフェノールとして尿中に排泄され、そのほとんどが 8 時間以内に排泄されることが示された。経口投与後 56 時間の採取期間中、便中に排泄されたのは約 1.5% にすぎなかった。

Müller (1997) は、アルキルフェノール類への職業曝露がなかったと考えられるヒトの剖検において、採取された 25 例の脂肪組織試料のノニルフェノール含有量も測定した。測定された組織中濃度は、すべて分析における「ブランク」試料に認められるバックグラウンドコンタミネーションの範囲内であった。著者は、分析の間の汚染を最小化するため、妥当な予防措置がすべて採られたことを示した。

本試験の最初のパートは、関与したボランティアが 2 名のみという点に大きな限界があるが、ノニルフェノールがヒトの消化管から急速に吸収されるという証拠は示される。また、56 時間以内に便中に回収された割合が投与量に対しごくわずかであったことから、投与量がほぼ完全に吸収されたと示唆される。経口投与後、ノニルフェノールのほとんどがグルクロニド抱合体または硫酸抱合体として血中に存在し、このことは、静脈内投与において、非抱合体および抱合体のノニルフェノールが同程度の割合で検出された知見とは対照的となった。これらの知見から、初回通過代謝は広範に及ぶことが示される。本試験経過中、経口投与により尿中および便中に回収された割合が 11.5% にすぎなかったことから、残りの投与量の運命については疑問が提起される。動物におけるデータに基づくと、呼吸を介して排泄された可能性は低いため、相当な割合のノニルフェノールが脂肪コンパートメントにより吸収されたと考えられる。一方、単回投与から 7 日後の組織および屠体にノニルフェノールはほとんど保持されないことが示されたが、上記の説明は、この動物における試験から得られた証拠とは一致しないと考えられる。ヒトの剖検試料において認められたノニルフェノールがごくわずかであったことは、生体内蓄積は生じないと考えられることを示唆した動物におけるデータと一致する。ただし、生体内蓄積が少ないという仮説は、経口投与を受けたヒトボランティアの排泄データにより支持されない。全体では、ヒトの場

合、ノニルフェノールに生体内蓄積の可能性があるか否かについては、結論を導ける適切なデータが不十分であるとみなされる。

In vitro 試験において、ヒト皮膚を用いてベンゼン環 ^{14}C 標識ノニルフェノールの経皮浸透率および吸収率が評価された (Monteiro-Riviere *et al.*, 1999)。本試験では、ブタおよびラットの皮膚試料も用いられた (詳細な情報については **4.1.2.1.1 動物における試験** の項参照)。1%標識ノニルフェノール PEG-400 溶液 (10 μL) を、フロースルー型拡散セルにマウントした面積 0.32 cm^2 (厚さ 500 μm) のヒト新鮮皮膚に適用し、拡散セルは閉鎖しなかった。皮膚面積当たりの投与量は 0.3 mg/cm^2 とした。灌流液の放射エネルギーを 8 時間の灌流時間中モニターし、暴露時間終了時に皮膚試料の放射エネルギーを測定した。ヒト皮膚の結果は、ラットおよびブタの皮膚ときわめて類似していた。吸収率は投与量の 0.1%、浸透率は約 4% であり、1.7% が角質層において回収された。本試験終了時の試験系から得られた放射エネルギーの総回収率は、投与された放射エネルギーの 92% であった。本試験の結果から、ノニルフェノールのヒト皮膚全体における吸収は不良である一方、いくらか限定的な皮膚浸透 (特に角質層) は生じ得ることが示唆される。

吸入後のノニルフェノールのトキシコキネティクスに関するデータは得られていない。しかし、ノニルフェノールが消化管から直ちに吸収されると考えられることに基づけば、また、その分配係数が高いことを考慮すれば、吸入経路を介し有意な吸収が生じ得ると想定することが賢明であると考えられる。さらに、吸入経路による暴露後には初回通過代謝が生じないと考えられることから、吸入による全身性生物学的利用能は、経口経路に伴う場合より実質的に高い可能性がある。

4.1.2.1.3 トキシコキネティクス、代謝および分布の要約

ノニルフェノールのトキシコキネティクスに関する情報のほとんどは、経口暴露を懸念し、ラットおよびヒトにおける少数の限定的な試験に基づいており、オクチルフェノール (ノニルフェノールと近似の構造関係があるアルキルフェノール) 関連データ全体から得られる資料により裏付けられる。入手可能なデータはわずかではあるが、トキシコキネティクスに関するプロファイルの主要な特徴全般を理解する基盤となる。消化管からの吸収は初期には急速であり、広範に及ぶと考えられる。主要な代謝経路にはグルクロニド抱合および硫酸抱合の関与が考えられ、消化管を通じ吸収されたノニルフェノールの広範な初回通過代謝の証拠が得られている。初回通過代謝のため、非抱合体のノニルフェノールの生物学的利用能は経口暴露後制限され、投与量のわずか 10~20% に留まると考えられる。ノニルフェノールは全身に広範に分布し、脂肪における濃度が最も高い。生体内蓄積に関しては、動物とヒト双方から入手可能な情報を考慮すると、ノニルフェノールにおける生体内蓄積の可能性の有無について結論を導けるほどデータの一貫性は十分でない。糞便および尿を介するのが主要な排泄経路である。

吸入暴露後のノニルフェノールのトキシコキネティクスに関するデータは得られていないが、経口投与による吸収データおよび高い分配係数に基づく、吸入経路を介し有意な吸収が生じ得ると想定することが賢明であると考えられる。さらに、吸入経路による暴露後には初回通過代謝が生じないと考えられることから、その全身性生物学的利用能は、経口経路に伴う場合より実質的に高い可能性がある。経皮経路に関しては、*in vitro* データから、ノニルフェノールの皮膚全体における吸収は不良である一方、いくらか限定的な皮膚浸透 (特に角質層) は生じ得ることが示される。

4.1.2.2 急性毒性

動物におけるデータのみ得られている。

4.1.2.2.1 吸入

唯一入手可能な試験は、報告が不十分でほとんど有用ではない。Smyth *et al.* (1969) は、ラット 6 匹からなる 1 群を定量化されていないノニルフェノール「濃縮蒸気」に 4 時間暴露させたところ、死亡例がないことを見出した。しかし、ノニルフェノールの腐食性から、吸入経路による暴露後、毒性を生じ得ると示唆される。

4.1.2.2.2 経口

ノニルフェノールの急性経口毒性は、動物における多数の試験で検討されている。最新の 3 件の試験は、OECD テストガイドライン 401 と同等の方法を用いて十分に報告されており、1 件は GLP に従って実施された (Berol Kemi AB 1982, Hüls AG 1981, インペリアル・ケミカル・インダストリーズ [ICI] 社 1984)。推定半数致死量 (LD₅₀ 値) の範囲は、雄で約 1200 ~ 2400 mg/kg、雌で 1600 ~ 1900 mg/kg であった。これらの試験の 95%信頼区間は概して比較的狭かったことから、用量反応曲線は急勾配であると示唆された。毒性の臨床徴候には過度の流涎、下痢、傾眠が挙げられた。剖検では、死亡動物の一部に胃粘膜表面のびらんが認められた。これより早期に行われたラット試験では、同程度の LD₅₀ 値が報告された (Gaworski *et al.*, 1979, Smyth *et al.*, 1969)。

Gaworski *et al.* (1979) は、手短に報告された試験において、雄マウスの経口 LD₅₀ 値が 307 mg/kg であるとも決定した。

4.1.2.2.3 経皮

手短に報告された試験において、雄ニュージーランド白色ウサギ 4 匹からなる群の経皮 LD₅₀ 値は、2031 mg/kg と判定された (Smyth *et al.*, 1969)。暴露時間は 24 時間であった。

4.1.2.2.4 急性毒性の要約

ヒトにおけるデータは得られていない。動物では、経口経路によるノニルフェノールには中程度の毒性があり、ラットの LD₅₀ 値の範囲は、雄で約 1200 ~ 2400 mg/kg、雌で 1600 ~ 1900 mg/kg である。致死性に関する用量反応曲線は、急勾配であると考えられる。致死量投与後、時に胃粘膜びらんが認められる。経皮経路によるノニルフェノールの急性毒性は同程度であり、ウサギの LD₅₀ 値は約 2000 mg/kg である。急性吸入毒性に関するデータは得られていないが、ノニルフェノールの腐食性から、吸入経路による暴露後、毒性を生じ得ると示唆される。

4.1.2.3 刺激性

動物におけるデータのみ得られている。

4.1.2.3.1 皮膚

皮膚刺激性は、OECD テストガイドライン 404 と同等の方法を用い十分に報告された、多数の試験において検討されている。Union Carbide 社 (1992a, b) は「ノニルフェノール S」お

よび「ノニルフェノール RNH」という名称の物質を検討し、1 時間または 4 時間いずれかの適用から 24 時間以内に全層壊死および潰瘍など重度の刺激性を認めた。Hüls 社 (1986a) は、ノニルフェノール 4 時間適用後 24、48、72 時間で壊死、ならびに紅斑および痂皮形成の最大スコアを生じると報告した。EniChem 社が資金提供した GLP 遵守試験 (1992) では、すべてのウサギが 24、48、72 時間でグレード 2 の紅斑およびグレード 3 の浮腫と記された皮膚反応を示し、8 日目の試験終了時にグレード 4 の痂皮形成に進行した。対照的に、Berol Kemi AB の GLP 遵守試験 (1987) ではそれほど重度の皮膚反応は報告されず、24、48、72 時間の観察期間の紅斑はグレード 2、浮腫はグレード 1~3 で、すべての動物が 13 日目に正常であると考えられた。

皮膚刺激性は、非標準的な方法を用いた複数の試験においても検討されている。Gaworski *et al.* (1979) は上記諸試験とは対照的に、ウサギの皮膚にノニルフェノール 0.5 mL を 24 時間適用後、刺激性の徴候がないことを報告した。ICI 社のラット試験 (1982) では、ノニルフェノール 0.1 mL に 24 時間接触直後、適用部位における接触感受性、重度の紅斑、皮膚の肥厚・しわ・硬化が報告された。これより早期の ICI 社の試験 (1979) では、2 ヶ所の供給元由来ノニルフェノールの単回適用により、ラットの適用部位における軽度の紅斑と共に、皮膚のしわおよび肥厚が生じたが、被験物質の適用量および接触時間は報告されなかった。

動物におけるこれらの試験結果から、ノニルフェノールの刺激性は試験に用いたサンプルの供給元により異なり得ることが示唆される。ただし、全層の破壊または皮膚壊死が 2 件の試験で認められたことから、ノニルフェノールには皮膚接触による腐食性があるとみなすのが妥当である。

4.1.2.3.2 眼

OECD ガイドライン 405 と同等の方法を用い、十分に報告された試験が 2 件得られている。Hüls 社 (1986b) は、重度の刺激性を示す眼の損傷について記述した。結膜発赤の最大スコアが 21 日間の観察期間の多くで報告され、観察期間終了時には、検討されたウサギ 3 匹中 2 匹にグレード 3 または 4 の角膜混濁を認めた。

別の試験では、ウサギ 3 匹からなる群を対象に、2 ヶ所の供給元由来ノニルフェノールが検討された (ICI 社 1979)。「石油工場」である ICI Oil Works 社由来のノニルフェノールでは、グレード 2 または 3 の結膜発赤、グレード 1~4 の結膜浮腫、グレード 1 または 2 の角膜混濁、2 匹にグレード 1 の虹彩損傷が生じた。7 日間の観察期間終了時、眼の損傷がなお 2 匹にみられた。Rohm and Haas 社由来のノニルフェノールでは、それほど重度の反応は生じなかったが、観察期間終了時になお損傷が認められた。

これより早期に手短かに報告された非標準的な試験では、1%ノニルフェノール溶液 0.5 mL 点眼により重度の熱傷を生じた (Smyth *et al.*, 1969)。

これらの結果から、ノニルフェノールは重度の眼刺激性物質であることが示される。

4.1.2.3.3 気道

ノニルフェノールの感覚刺激性が検討されている (ICI 社, 1995)。飽和蒸気濃度および飽和蒸気濃度の 10 分の 1 の空気 (名目上、それぞれ 3636 mg/m³ [400 ppm]、267 mg/m³ [30 ppm]) が検討された。雌 CD-1 マウス 5 匹からなる群を各濃度に鼻部暴露させ、呼吸数を圧力プレチスモグラフィによりモニターした。ノニルフェノール蒸気の暴露期間は報告されなかった。試験に用いた空気中における液体の微粒子状物質の比率を測定したところ、名目濃度

の約 1%で、結果に有意な影響を及ぼす可能性は低いとみなされる量であると認められた。3636 mg/m³ 群では、暴露中の呼吸数減少の平均値は約 25%であることが認められた。一方、267 mg/m³ 群では、呼吸数の変化がみられなかった。これらの結果から、ノニルフェノール暴露濃度が高いと、気道に軽度の感覚刺激性を生じ得ることが示唆される。

4.1.2.3.4 刺激性の要約

ヒトにおける試験の情報は得られていない。動物におけるデータでは、液体のノニルフェノールが皮膚腐食性となり得ることが示されているが、その効力は供給元および正確な組成により異なる可能性がある。液体は重度の眼刺激性物質でもある。マウスの気道では、飽和蒸気暴露により軽度の感覚刺激性を生じた。

4.1.2.4 腐食性

刺激性 (4.1.2.3) の項参照。

4.1.2.5 感作性

動物におけるデータのみ得られている。

4.1.2.5.1 皮膚

ノニルフェノールの皮膚感作性は、複数の試験において検討されている。

Hüls 社 (1986c) は、現 OECD ガイドライン 406 に類似した方法に従って十分に報告されたモルモットマキシマイゼーション試験を実施した。皮内注射および局所塗布による感作誘導相ではそれぞれ濃度 0.9、50%、惹起相では 10、30、45%を用いた。50%の局所適用により軽度の刺激性が生じた。いずれの動物も皮膚感作反応を示さなかった。

ICI 社 (1980) も、OECD ガイドラインと同等の方法を用いたモルモットマキシマイゼーション試験を実施した。皮内注射および局所塗布による感作誘導相では濃度 0.1 および 5%を選択した。惹起相において 1%適用から 24 時間後の皮膚反応は認められなかったが、48 時間後には試験群と対照群の双方に紅斑が認められた。2 週間後 0.1%で再惹起を実施したところ、皮膚反応は試験群 15 匹中 7 匹、対照群 7 匹中 1 匹に生じた。しかし、著者らは反応の頻度の正確な評価が困難であると報告したため、本試験から明確な結論は導けないと判断される。

方法および結果について詳細が手短かに報告された、別のモルモットマキシマイゼーション試験では、2 ヲ所の供給元由来ノニルフェノールが検討された (ICI 社 1979)。「石油工場」である ICI Oil Works 社由来のノニルフェノールでは、皮膚反応が惹起相において試験群の (おそらく) 20 匹中 2 匹に認められたが、Rohm and Haas 社由来のノニルフェノールでは反応が生じなかった。本試験では陰性と判断される。

Gaworski *et al.* (1979) は、おそらく対照群を用いなかった非標準的な方法により、皮膚感作性について検討した。惹起相における皮膚反応は動物の 50%超において報告されたが、対照群を欠くため本試験から結論は導けない。

4.1.2.5.2 気道

データは得られていないが、ノニルフェノールの化学反応性が低いことから、呼吸器アレルギーである可能性は低いと予測できる。

4.1.2.5.3 感作性の要約

ヒトにおけるデータは得られていない。複数のモルモットマキシマイゼーション試験の結果から、ノニルフェノールに有意な皮膚感作性はないことが示唆される。気道感作性に関する情報は得られていないが、ノニルフェノールの化学反応性が低いことから、呼吸器アレルギーである可能性は低いと予測できる。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1 動物におけるデータ

吸入経路および経皮経路に関するデータは得られていない。質の高い 28 日間および 90 日間 2 件のラット反復経口投与試験が実施されている。両試験とも複数の OECD ガイドラインに従って GLP を遵守して行われた。さらに、ノニルフェノールが発達および細胞増殖ならびに乳腺に及ぼす影響は、皮下投与を伴う非標準的なラット試験において検討されている。

28 日間試験では、Sprague-Dawley ラット雄 5 匹および雌 5 匹からなる群に、ノニルフェノール名目投与量 0、25、100、または 400 mg/kg/日を混餌投与により暴露させた (Hüls 社 1989)。毒性の臨床徴候、体重、摂餌量を記録し、本試験終盤にルーチンの血液検査、血液臨床化学検査、尿検査を行った。終了時にすべての動物の完全剖検を実施した。副腎、肝臓、腎臓、精巣上体を含む精巣について秤量し、主要臓器の限られた範囲を顕微鏡により検査した。

死亡例および投与関連の毒性の臨床徴候はなかった。400 mg/kg/日群では、有意な体重増加の抑制が本試験全体を通じ認められ、4 週目までに平均体重が対照群より雄で 26%、雌で 13% 低下した。400 mg/kg/日群の雄雌双方は、摂餌量および飼料使用量も減少した。400 mg/kg/日群の雄のみ、対照群に比べ特定の臨床化学パラメータでわずかな差が生じ、尿素濃度およびコレステロール値の上昇、および血糖値低下が認められた。また、同投与群では、腎臓、肝臓、精巣の相対重量の平均値が増加した (いずれも対照群に比べ約 20%)。組織病理学的検査では、400 mg/kg/日群の雄について、腎近位尿細管の硝子滴蓄積 (ヒトの健康との関連はないとみなされる影響)、および門脈周囲肝細胞の軽度の空胞化が認められた。同投与群の雌では、これらの臓器に投与関連の変化はなかった。

25 および 100 mg/kg/日群の雄雌では、検討されたいずれのパラメータにも、最終的に投与関連と考えられる差はなかった。25 および 100 mg/kg/日群の雄では、同時対照群に比べ腎臓、副腎、肝臓重量の軽度の増加、および腎臓における軽微な硝子滴形成のわずかな発生率上昇が報告されたことに留意されたい。ただし、すべての値は Hüls 社の背景対照群の範囲内 (試験依頼者の私信) であり、副腎および肝臓重量、あるいは硝子滴形成について確認された変化は、90 日間試験では認められなかった (下記参照)。そのため、こうした境界線上の変化は、ノニルフェノール投与に確実に起因するとはいえないと考えられる。全体では、28 日間暴露を行った本試験の無毒性量 (NOAEL) は、100 mg/kg/日と同定される。

90 日間試験では、Sprague-Dawley ラット雄 15 匹および雌 15 匹からなる群に、ノニルフェ

ノール濃度 0 (対照)、200、650、または 2000 ppm を混餌投与により暴露させた (化学製造業者協会 [Chemical Manufacturers Association] 1997a, Cunny *et al.*, 1997)。算出されたノニルフェノール摂取量はそれぞれ約 0、15、50、140 mg/kg/日であった。さらに、対照および高用量について雄雌各 10 匹からなるサテライト群を設け、90 日間暴露終了時に 28 日間の回復期間を与えた。毒性の臨床徴候、体重、摂餌量を記録し、本試験終盤にルーチンの血液検査、血液臨床化学検査、眼底検査を行った。終了時にすべての動物の完全剖検を実施した。多数の臓器について秤量し、臓器および組織の包括的範囲の組織病理学的検査を実施した。また、発情周期を 8 週目の間モニターし、剖検時に精子運動能、精子数 (精巣上体)、精子形態について評価した。

投与関連の死亡および毒性の臨床徴候はなかった。140 mg/kg/日群のみ雄雌双方について、投与期間全体を通じ体重増加、摂餌量および飼料使用量に関する有害作用が認められた。同投与群雄雌双方の 90 日後の平均体重は、対照群より約 7%少なかった。サテライト群では、暴露期間終了後、体重および摂餌量の値にいくらか回復が認められた。血液検査および眼底検査の所見、ならびに発情周期のパターンは投与による影響を受けなかった。精子形成に及ぼす影響の証拠はなかった。一方、140 mg/kg/日群の雌には、興味深い臨床化学検査値の変化が 1 つ認められた。血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 値およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 値が雌 2 匹で顕著に上昇し、この結果は、肝臓において報告された一部の組織病理学的変化と関連していた (下記参照)。

剖検時、投与関連の肉眼的所見は報告されなかった。90 日後に屠殺した雄では、腎臓絶対重量、および体重に対する腎臓相対重量の群平均値が用量依存的に増加した (絶対重量: 15、50、140 mg/kg/日群でそれぞれ対照群に比べ 6、9、13%、相対重量: それぞれ 8、11、24%)。回復群の雄でも体重に対する腎臓相対重量が増加したが、影響はそれほど顕著でなかった。ただし、腎臓重量の増加と臨床化学検査値の変化および組織病理学的変化との相関は得られなかったことから、本所見による毒性学的有意性の可能性は、特に変化の規模が小さかった 15 および 50 mg/kg/日群では低いとみなされた。また、90 日後、140 mg/kg/日群の雌の卵巣重量が対照群に比べ軽度の減少を示した。対照的に、回復群の卵巣重量は軽度の増加を示した。この場合も、その差から組織病理学的変化との相関が得られなかったことに加え、主試験群とサテライト群の所見間に不一致が生じ、本所見の解釈は明確にならない。90 日後、50 および 140 mg/kg/日群の雄、140 mg/kg/日群の雌のみ、体重に対する肝臓相対重量が対照群に比べ約 10%増加した。これは、毒性学的反応ではなく適応反応である可能性が高いとみなされた。

顕微鏡検査による顕著な変化は、腎臓および肝臓にのみ認められた。140 mg/kg/日を投与した主試験群とサテライト群双方の雄では、腎尿細管の硝子滴/硝子様小球の発生が、対照群に比べ低下した。この変化の生物学的意義は不明である。また、腎硝子滴発生率が実際に上昇した 28 日間反復投与試験の所見との相関を欠くことから、これらの変化を投与関連とみなすべきかは疑問である。140 mg/kg/日群の雌 3 匹に軽度または中等度の個別の肝細胞壊死が認められ、影響を受けた雌のうち 2 匹は血清中の ALT 値および AST 値も上昇した。このことから、肝臓はノニルフェノールの毒性の標的臓器であると考えられる証拠が得られるが、反応が軽度で影響を受けた動物数の少なさを考慮すると、これでは証拠として不十分である。

本試験の結果間には一貫性が欠け、また、多世代試験が以下のとおり要約された (国家毒性プログラム [NTP] 1997) ことから、この腎臓の組織病理学的所見について、元の研究に関与しなかった病理医 1 名が再検討した (Hard 1998)。140 mg/kg/日群の雄では、髄質外層外帯/髄質外層内帯 (OSOM/ISOM) 接合部の近位尿細管分節 3 (直部) に尿細管内石灰沈着

の発生率上昇が認められ、同群 25 匹中 11 匹が影響を受けたのに対し、対照群の影響は 25 匹中 1 匹であった。

全体では、本試験から NOAEL は約 50 mg/kg/日であると導ける。140 mg/kg/日では、体重増加の抑制、摂餌量および飼料使用量の減少に加え、肝臓および可能性として腎臓に形態学的変化の証拠が認められた。

反復投与毒性に関するさらなる情報は、質の高い多世代試験から得ることができる (NTP 1997, 生殖器の所見に関する情報を含む本試験の全詳細については **4.1.2.9.2 受胎能力に及ぼす影響**の項参照)。Sprague-Dawley ラット雄 30 匹および雌 30 匹からなる群に、ノニルフェノール濃度 0 (対照)、200、650、または 2000 ppm を混餌投与により 3 世代にわたり暴露させた。算出されたノニルフェノール摂取量は、非生殖相の間それぞれ約 0、15、50、160 mg/kg/日であった。F₀ 世代を 15 週間暴露させ、F₁ および F₂ 世代は出生直後から約 20 週齢まで、F₃ 世代は出生から約 8 週齢までとした。

すべての世代の成獣に一般毒性の証拠を認めたが、投与関連の臨床徴候、死亡、および摂餌量に関する有害作用はなかった。160 mg/kg/日群では、すべての世代全体で対照群に比べ成獣の体重増加の抑制が認められ、最終的な体重は対照群より約 10%少なかった。同程度の体重増加の抑制が、F₁ 雌、F₂ 雄、F₃ 雌の 50 mg/kg/日群でも認められた。腎臓相対重量の増加が、F₀、F₁、F₂ 世代の成熟雄の 50mg/kg/日群や 160 mg/kg/日群、ならびに F₁ 成熟雌の 160 mg/kg/日群でも得られた。組織病理学的検査では、すべての世代かつすべてのノニルフェノール投与群において、成熟雄の腎尿細管変性や腎尿細管拡張の発生率上昇が認められ (ただし、多くは明確な用量反応関係なし)、類似の所見が F₁、F₂、F₃ 世代の 160 mg/kg/日群、および F₃ 世代の 15、50 mg/kg/日群の成熟雌で報告された。これらのデータを **Table 4.13** に示す。

Table 4.13 Number of animals with histopathological abnormalities in the kidney (n=10)

Males

Generation	Finding	Dose level (mg/kg/day)			
		0	15	50	160
F ₀	Renal tubule degeneration	1	3	5	5
	Renal tubule dilatation	0	1	0	0
F ₁	Renal tubule degeneration	1	2	7	8
	Renal tubule dilatation	1	1	0	2
F ₂	Renal tubule degeneration	3	6	6	6
	Renal tubule dilatation	1	2	0	4
F ₃	Renal tubule degeneration	0	7	10	2
	Renal tubule dilatation	0	0	3	3

Females

Generation	Finding	Dose level (mg/kg/day)			
		0	15	50	160
F ₀	Renal tubule degeneration	3	3	0	0
	Renal tubule dilatation	0	0	1	0
F ₁	Renal tubule degeneration	0	1	1	6
	Renal tubule dilatation	0	0	0	3
F ₂	Renal tubule degeneration	1	2	0	4
	Renal tubule dilatation	0	0	0	1
F ₃	Renal tubule degeneration	0	8	9	7
	Renal tubule dilatation	0	0	1	1

腎尿細管変性や腎尿細管拡張のこうした発生率上昇が投与関連であるか否か、確実に判定するのは困難である。その理由として、こうした変化が同系統のラットを用いて実施した90日間試験の同じ範囲では認められなかったこと、および、用量依存的な傾向がすべての世代/性において明白でなかったことが挙げられる。両試験間で一致を欠くことは説明できない。何故なら、多世代試験の暴露期間がわずかに長いことに基づいても、腎臓における影響は8週間しか暴露しなかったF₃世代で認められたからであり、また、暴露が子宮内および新生児と異なることに基づいても、その影響はF₀世代にも生じたからである。多世代試験において4世代すべての発生率が一貫して上昇したことを特に重視すれば、このことは、背景に関するばらつきとして棄却できないと判断される。したがって、結論は本試験から導かれ、反復暴露の最小毒性量 (LOAEL) は腎臓の組織病理学的変化に基づき15 mg/kg/日となる。この値により、リスク特性評価が行われることになる。

この腎臓の組織病理学的所見について、元の研究に関与しなかった病理医1名が再検討した (Hard 1998)。ノニルフェノール暴露群すべてで腎障害の存在が確認されたが、その存在は、すべての世代で一貫した用量依存的傾向を欠いていた。主な腎障害は、OSOM/ISOM接合部の尿細管石灰化、線維症に囲まれた嚢胞性尿細管、あるいはOSOM/ISOM接合部の顆粒円柱形成として記述された。

ノニルフェノールの精巢毒性の検討について手短かに報告した(強制)経口投与試験(de Jager *et al.*, 1999a)が、**4.1.2.9 生殖毒性**の項に要約されている。本試験では100(検討された最低投与量)、250、400 mg/kg/日投与後の死亡率が観察され、投与期間10週間で各群20匹中それぞれ3、15、18匹が死亡した。この死亡率について、さらなる情報は得られていない。こうした投与量で死亡が認められたことは、混餌投与試験の知見とは対照的である(Hüls社, 1989; Chemical Manufacturers Association, 1997a; NTP, 1997)。この差は、投与方法により説明可能と考えられ、強制経口投与ではノニルフェノールの最高血中濃度が混餌投与より高くなる可能性がある。

ノニルフェノールが発達および細胞増殖ならびに乳腺に及ぼす影響は、非標準的な方法を用いたNoble系ラットによる2件の試験において検討されている。Noble系ラットは、エストロゲン活性に対する感受性が特に高い。元の試験では、雌若齢ラット6匹からなる群を、背側頸部に埋め込まれた浸透圧ミニポンプを介して投与される皮下経路により、ノニルフェノールに11日間暴露させた(Colerangle and Roy, 1996)。投与量は0(ジメチルスルホキシド[DMSO]:溶媒対照)、0.01、7.12 mg/日(体重200gと想定した場合、0.05、35.6 mg/kg/日)とした。追加した1群に、ジエチルスチルベストロール(DES) 0.01 mg/日(0.05 mg/kg/日)を11日間投与した(投与経路不明)。暴露期間終了時ラットを屠殺し、評価のため腹部乳腺を切除した。乳腺の発達、乳腺構造物(終末乳管、末梢芽状突起、または小葉)の数および乳腺面積16 mm²当たりの細胞数を計数することにより評価した。細胞増殖および細胞周期の動態について、S、G₁、G₀期の細胞を同定可能な免疫組織化学染色法(抗増殖細胞核抗原[PCNA]反応)を用いて評価した。標識率(LI:S期の細胞の割合)、増殖相細胞割合(GF:G₁またはS期の細胞の割合)を算出した。

ノニルフェノール最高用量投与群では、乳腺構造物の数が溶媒対照群に比べ1.5倍増加し、細胞数/面積16 mm²は4倍増加した。最低用量群の構造物の数は対照群と同程度であったが、細胞数は2倍増加した。DES群では細胞数が6倍の増加となった。ノニルフェノール低用量群および高用量群のLIは、溶媒対照群に比べそれぞれ1.3倍、1.8倍上昇し、GFについては1.2倍、2倍上昇した。DESが両指標に及ぼす影響ははるかに強く、その上昇はLIについては4倍、GFについては5倍であった。細胞周期の時間は低用量群では変わらなかったが、高用量群ではわずかに短縮(約10%)し、DES群では顕著な短縮(半分超)となった。本試験では、ノニルフェノール投与量0.05および35.6 mg/kg/日において、Nobleラットの乳腺の発達および増殖活性が用量依存的に増大するが、0.05 mg/kg/日における影響は境界線上にあることが示される。この所見のヒトの健康に関する意義は不明である。さらに、投与に皮下経路を用い、モデルとしてエストロゲン感受性Nobleラットを選択したことから、ヒトに対するこれらの所見の妥当性については疑問である。Ashby and Odum (1998)は、本試験で報告された同じ陽性対照(DES)データがColerangle and Royの別の2報(1995, 1997)にも掲載され、ノニルフェノールに関する試験の溶媒対照データが1997年の試験において重複していることに注目している。このことから、この対照データがノニルフェノールに関するデータと同時に作成されたか否かについてはいくつかの疑念が生じ、本試験の妥当性は疑わしい。

Colerangle and Roy (1996)の試験はOdum *et al.* (1999)により再現された。卵巣摘出(OVR⁺)雌Nobleラット10匹からなる群を、背側頸部に埋め込まれた浸透圧ミニポンプを介して投与される皮下経路により、ノニルフェノール投与量0(DMSO:溶媒対照)、0.073、もしくは53.2 mg/kg/日、またはDES 0.076 mg/kg/日に11日間暴露させた。乳腺分化および乳腺細胞増殖について、Colerangle and Roy (1996)と同様の方法に従って評価したが、例外として、BrdU染色およびPCNA染色を用い(BrdU取り込みはより高感度かつ頑健な技法とみなされた)、より客観的な方法を用いて乳腺の変化を定量化した。乳腺構造物の数および面

積を定量的に測定したところ、溶媒対照群とノニルフェノール暴露群との間に差は示されず、元の試験とは対照的な結果となった。一方、DES は、乳腺構造物の分化に顕著な影響を及ぼした。終末乳管は全くなく、末梢芽状突起は末梢領域にのみ認められた。また、小葉の数および面積は、末梢および中心領域で顕著に増加した。乳腺細胞増殖について評価したところ、溶媒対照群との比較では、ノニルフェノール暴露群との差はなかったが、DES 群の顕著な増殖（小葉において約 4 倍）が認められた。本試験から、Noble ラットの乳腺において、DES による発達および増殖活性を誘導可能であることは示されるが、Colerangle and Roy (1996) による試験で得られた知見と同程度の投与量のノニルフェノール暴露後、そうした活性は確認できなかった。

4.1.2.6.2 ヒトにおけるデータ

ノニルフェノール暴露の影響は、ヒトでは評価されていない。ポリエチレンアルキルフェニルエーテルを含有するアルカリ性界面活性剤に暴露された日本人作業員において、両手および前腕、その後他の領域に広がった白斑 2 件の異なる症例報告が得られている (Ikeda *et al.*, 1970)。著者らは、界面活性剤において存在を認めた遊離オクチルフェノールまたはノニルフェノールにより白斑が生じ得ると推測した。しかし、他に確証となる報告がない点で、因果関係に関する明確な結論は下せない。

4.1.2.6.3 反復投与毒性の要約

ヒトにおける有用なデータは得られていない。混餌投与による最大 20 週間の経口暴露を伴うラット多世代試験では、腎臓の組織病理学的変化（尿細管変性または尿細管拡張）に基づき、反復投与毒性の LOAEL は 15 mg/kg/日であることが同定されたが、こうした変化は、ラット 90 日間混餌投与試験の同投与量では明白にならなかった。投与量がより多くなると、肝臓が標的臓器になることも考えられ、一部の混餌投与試験では、用量 140 mg/kg/日以上で肝臓に軽度の組織病理学的変化（門脈周囲肝細胞の空胞化、または時にみられる個別の細胞壊死）が認められた。ノニルフェノールの経口毒性は強制経口投与時に亢進すると考えられ、100 mg/kg/日以上での投与量で死亡例が報告されている。経皮暴露および吸入暴露を伴う試験は実施されていない。Noble ラットでは、ノニルフェノールを濃度 0.05 mg/kg/日に下げても、皮下投与後の乳腺細胞増殖を誘発すると報告されているが、この知見は再現試験において再現できなかったことに加え、ヒトに対する本知見の妥当性および元の試験の妥当性に関しては疑問に思われる。

4.1.2.7 変異原性

In vitro 試験系および動物におけるデータのみ得られている。

4.1.2.7.1 *In vitro* 試験

プレインキュベーション法を用いた細菌による変異原性 (Ames) 試験 2 件が実施され、いずれも陰性であった。1 件目の試験は、得られているのが要約された報告のみであるため十分に評価できない (Hüls 社 1984)。ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 株 TA1537、TA1538、TA98、TA100 を、代謝活性化 (アロクロール誘導ラット肝 S9) ありおよびなしの双方でノニルフェノール濃度 5000 µg/plate に暴露させた。2 件目の試験は、これと同じネズミチフス菌株と共に大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 株を用いた (Shimizu *et al.*, 1985)。代謝活性化 (ポリ塩化ビフェニル誘導ラット肝 S9) ありおよびなしの双方で、濃度最大 100 µg/plate により検討され、毒性は検討された最高濃度において報告された。得られた結果は 2 回目の独立した実験により確認されなかったと考えられ、このことが両試験の制約である。

OECD ガイドライン 476 に従って GLP を遵守して十分に実施された哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験では、*HPRT* 遺伝子座におけるノニルフェノールの変異誘発能について、チャイニーズハムスター-V79 細胞を用いて検討された (Hüls 社, 1990)。暴露時間は 5 時間とし、濃度範囲は最大 2.5 µg/mL (代謝活性化なし) または 1.25 µg/mL (代謝活性化あり) で検討した。これより高濃度では、細胞生存を得られなかった。結果は独立した実験により確認され、本試験は陰性であった。

4.1.2.7.2 *In vivo* 試験

小核試験 2 件が得られている。

OECD ガイドライン 474 に従って実施された最新の試験では、NMRI 系マウス雄 5 匹および雌 5 匹からなる群に、用量 50、150、または 300 mg/kg を単回腹腔内投与した (Hüls 社, 1999b)。適切な陽性対照群 (シクロホスファミド) および陰性対照群 (溶媒) を設けた。最高投与量は、予備試験の結果に基づいて最大耐量として選択された。投与から 24 時間後骨髄を採取した。ノニルフェノール 300 mg/kg か溶媒のみのいずれかを投与した追加群では、48 時間後を 2 回目の採取時間とした。150 および 300 mg/kg 群には毒性が生じ、鎮静、しゃがみこみ姿勢、歩行異常、立毛などの臨床徴候として認められた。多染性赤血球/正染性赤血球の比率 (PCE/NCE 比) に関する一貫した影響はなかった。ノニルフェノール暴露群では、小核を有する PCE 出現頻度の増加を認めなかったため、本試験は陰性とみなされる。陽性対照群では、予測した反応が認められた。PCE/NCE 比が影響を受けなかった一方、本試験は最大耐量において腹腔内投与経路を用いて実施されたことから、ノニルフェノールの骨髄暴露は最大であったと推定できる。したがって、本試験結果が陰性であることには高い信頼性があると考えられる。

これより前に、経口経路による投与を用いた小核試験が実施された (Hüls 社, 1988)。OECD ガイドラインに従って NMRI 系マウス雄 5 匹および雌 5 匹からなる群に、ノニルフェノール 500 mg/kg を単回経口投与した。本投与量は最大耐量として選択された。この選択を裏付ける証拠は示されなかったが、マウスについて報告されている経口 LD₅₀ 値である 307 mg/kg/日より高いことは留意される。適切な陽性対照群および陰性対照群を設けた。骨髄を 18、48、72 時間後に採取した。小核の発現頻度はいずれの採取時点でも増加せず、本試験は陰性であることが示された。PCE/NCE 比はノニルフェノールによる影響を受けなかったが、被験物質の骨髄暴露の妥当性について懸念が生じる。トキシコキネティクスに関する情報から、経口投与後のノニルフェノールの全身性生物学的利用能は限定的であることが示唆され、このことも上記に加え懸念される。全体では、標的組織の暴露の程度について疑問に思われるため、陰性という本試験結果の意義はごく限定的と考えられる。

4.1.2.7.3 変異原性の要約

ヒトにおけるデータは得られていない。細菌による 2 件の試験、および 1 件の哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験におけるノニルフェノールの検討結果は陰性であった。腹腔内経路を用いて実施された *in vivo* 小核試験は陰性であった。経口経路を用いたもう 1 件の *in vivo* 小核試験も陰性であったが、本試験には方法論的欠点が認められた。これらの結果から、ノニルフェノールに変異原性はないことが示される。

4.1.2.8 がん原性

がん原性については、ヒトおよび動物とも直接検討されていない。ただし、がん原性に関するいくつかの情報はいずれのデータから得ることができる。現在入手可能な情報に基

づくと、ノニルフェノールの変異原性の可能性は低いとみなされることから、遺伝毒性機構により生じるがんに対する懸念は少ない。遺伝毒性でない機構によるがん原性を考慮しても、持続的な細胞増殖および過形成の証拠は、標準的な反復投与毒性試験において認められなかった。Noble ラットでは、ノニルフェノールを濃度 0.05 mg/kg/日に下げても、皮下投与後の乳腺細胞増殖を誘発すると報告されているが、この知見は再現試験において再現できなかった上、選択された系統の投与経路および感受性の理由から、ヒトに対する本モデルの妥当性については疑問に思われる。全体では、遺伝毒性でない機構によるがん原性の懸念は少ない。

4.1.2.9 生殖毒性

動物または *in vitro* 試験系由来のデータのみ得られている。

4.1.2.9.1 エストロゲン活性を検討した試験

ノニルフェノールのエストロゲン活性は、遺伝子組み換え酵母、エストロゲン感受性 MCF-7 細胞、げっ歯類子宮肥大試験の反応のいずれかを用いた多数の試験において検討されている。これらの試験は、いずれも国際的に受け入れられた毒性試験法として検証されていないが、MCF-7 細胞による試験および子宮肥大試験は、エストロゲン活性に関する標準的な試験として長年にわたり確立されている。これらの試験で認められたエストロゲン活性について、ヒトの健康に対する意義は未だ確立されていないことに留意されたい。

In vitro 系

アルキルフェノール基のエストロゲン活性に重要な構造特性を調査した試験では、酵母を用いた試験において検討された多数のアルキルフェノール類の 1 つに、4-ノニルフェノールが挙げられた (Routledge and Sumpter, 1997)。本試験では、エストロゲン誘導性の発現系を含む遺伝子組み換え系統の酵母 (出芽酵母: *Saccharomyces cerevisiae*) が用いられる。エストロゲン存在下では、酵素 β -ガラクトシダーゼをコードするレポーター遺伝子 (*Lac-Z*) が発現し、発現については、培養培地の発色変化反応の測定によりモニターできる。被験物質のエストロゲン活性は、同じ反応を生じるのに必要なモル濃度の比較により、17 β -エストラジオールに対する効力として示した。17 β -エストラジオールは、ノニルフェノールより約 30000 倍強力であることが認められた。タモキシフェン (エストロゲン受容体を介した作用が知られているエストロゲン拮抗剤) により、アルキルフェノール類の活性阻害が示され、本試験の反応がエストロゲン受容体との相互作用に起因することが立証された。

ノニルフェノールのエストロゲン活性は、エストロゲン感受性ヒト乳がん MCF-7 細胞を伴った *in vitro* 試験でも評価されている (Soto *et al.*, 1991)。MCF-7 細胞は、(内因性エストロゲン除去のため) 細胞増殖を阻害する活性炭処理したヒト血清存在下で培養される。そのため、エストロゲン活性を有する物質は、この増殖阻害を克服し、増殖できる。MCF-7 細胞を 17 β -エストラジオールにより培養し、複数の濃度のノニルフェノールによりマルチウエルプレートでそれぞれ 3 組培養し、細胞増殖について 6 日間の暴露期間後、溶解細胞由来の核を計数することにより評価した。濃度 10 μ M のノニルフェノールが、濃度 30 pM のエストラジオールと同程度の増殖反応を生じたことから、モル濃度に基づく、本試験で測定されたエストラジオールがエストロゲンにもたらす効力は、ノニルフェノールより 300 万倍強い。ノニルフェノール濃度 1 および 0.1 μ M において生じる増殖反応は、陰性対照培養物に認められた反応と同程度であった。

別の類似の *in vitro* 試験では、MCF-7 および ZR-75 ヒト乳がん細胞株が用いられた (White *et*

al., 1994)。細胞を、濃度範囲 0.1 nM～10 μ M のノニルフェノールまたは 10 nM の 17 β -エストラジオール存在下で 4 組培養した。ノニルフェノール濃度 100 nM 以下では、エストロゲン活性は認められなかった。ノニルフェノール 1 および 10 μ M において増殖反応が生じ、濃度 10 μ M における反応は、エストラジオールにより生じる反応と同程度であった。したがって、本試験では、17 β -エストラジオールがノニルフェノールより 1000 倍強力であった。さらなる研究では、ノニルフェノールの転写活性促進能について、レポーター遺伝子 pEREbLcAT をトランスフェクトした MCF-7 細胞およびニワトリ線維芽細胞 (CEF)、ならびにマウスエストロゲン受容体において判定した。ノニルフェノール濃度 1 および 10 μ M の培養物では、転写が促進された。

エストロゲンに関する *in vitro* データを要約すると、ノニルフェノールにはエストロゲン活性を有する証拠があるが、その効力はエストラジオールより 3～6 桁分弱い。

In vivo 系

ノニルフェノールのエストロゲン活性は、ラットの子宮肥大反応に基づいた試験を用いて、複数の試験において評価されている。

1 件目の試験では、Wistar 系由来の未成熟雌ラット (20～22 日齢、各群 6 匹) からなる 5 つの群に、ノニルフェノールのコーン油溶液を投与量 9.5～285 mg/kg/日の範囲で連続 3 日間それぞれ 1 日 1 回強制経口投与した (ICI 社, 1996)。溶媒対照群および陽性対照群 (安息香酸エストラジオール 8 μ g/kg、皮下経路) を設けた。最終投与から 1 日後これらの雌を屠殺し、各動物から子宮を切除し秤量した。濃度 47.5 mg/kg/日以上において、子宮絶対重量および体重に対する子宮相対重量が、用量依存的に統計的に有意な増加を示した。NOAEL は 9.5 mg/kg/日であった。陽性対照群に認められた子宮の反応はノニルフェノール群よりはるかに強かったが、暴露経路が異なることを考慮すると、効力を直接比較することはできない。同社由来の類似データは、ピアレビュー文献にも掲載されている (Odum *et al.*, 1997)。この後者の報告には、経口投与による陽性対照群 (17 β -エストラジオール: 10～400 μ g/kg) も設けられ、本試験では、陽性対照群におけるエストラジオールがノニルフェノール群より約 1000 倍強力であることが示された。

類似の試験において、雌卵巢摘出 Sprague-Dawley ラット 10 匹からなる群に、ノニルフェノール濃度 0 (溶媒対照)、30、100、300 mg/kg/日のエタノール/油懸濁液を 1 日 1 回連続 3 日間経口経路により投与した (Chemical Manufacturers Association 1997b)。陽性対照群には、エチニルエストラジオール濃度 10、30、80 μ g/kg/日のエタノール溶液を同じ投与レジメンに従って投与した。最終投与から 1 日後これらの雌を屠殺し、各動物から子宮を切除し秤量した。300 mg/kg/日群の子宮重量は、溶媒対照群に比べ有意に増加 (1.5 倍) した。30 および 80 μ g/kg/日を投与した陽性対照群では、これよりわずかに強い反応 (2 倍の増加) が認められた。

別の子宮肥大試験では、未成熟 Sprague-Dawley ラット (20～21 日齢) 3 匹からなる群それぞれに、ノニルフェノール投与量 0、1、2、または 4 mg/匹 (約 25、50、または 100 mg/kg) を単回腹腔内投与した (Lee and Lee, 1996)。同経路により投与されるエストラジオールを陽性対照とした。24 時間後に動物を屠殺し、各動物の子宮の切除、秤量を行い、タンパク質および DNA の含有量、ならびにペルオキシダーゼ (子宮肥大のマーカー酵素と考えられる) 活性について解析した。すべての投与量で子宮重量の用量依存的かつ統計的に有意な増加が得られ、これに伴い、子宮のタンパク質および DNA の含有量増加、ならびに子宮ペルオキシダーゼ活性の上昇が認められた。さらなる実験において、ノニルフェノールの子宮肥大活性は ICI 182,780 (エストロゲン拮抗剤) の同時投与により遮断されることが認められ、

ノニルフェノールの作用はエストロゲン受容体を介するという証拠が示された。また、その効力をエストラジオールと比較したところ、本試験において、エストラジオールはノニルフェノールより約 1000~2000 倍強力であることが認められた。

全体では、これらの *in vitro* および *in vivo* 試験から、ノニルフェノールにはエストロゲン活性があるが、その効力はエストラジオールより 3~6 桁分弱いことが示される。

4.1.2.9.2 受胎能力に及ぼす影響

ノニルフェノールが受胎能力および生殖能力に及ぼす影響は多世代試験 1 件において検討されており、加えて、ノニルフェノールの精巣毒性は反復投与試験 1 件において検討されている。

多世代試験は包括的で質が高く、GLP を遵守して実施された (NTP 1997)。全体的な試験デザインは、OECD の 2 世代生殖毒性試験ガイドラインを基準とし、対象を F₃ 世代の作製まで拡大した。Sprague-Dawley ラット雄 30 匹および雌 30 匹からなる群に、ノニルフェノール濃度 0 (対照)、200、650、または 2000 ppm を混餌投与により 3 世代にわたり暴露させた。算出されたノニルフェノール摂取量は、非生殖相の間それぞれ約 0、15、50、160 mg/kg/日、哺育の間には約 0、30、100、300 mg/kg/日に上昇した。

ノニルフェノールの暴露は約 7 週齢の F₀ 世代から開始し、F₃ 世代が約 8 週齢になる試験終了時まで継続した。F₀ 動物を各用量群内で交配 (雄 1 匹と雌 1 匹) させ F₁ 世代を作製し、同様に、選択された F₁ 動物の交配による F₂ 世代の作製、選択された F₂ 動物の交配による F₃ 世代の作製を行った。F₀ 世代および保持された F₁、F₂、F₃ 動物について、毒性の臨床徴候、体重、摂餌量を報告した。発情周期のモニター後交配させた。成熟動物の剖検時、精子の密度、運動能 (コンピュータの補助を受けた精子運動解析システムを使用、対照群および高用量群の雄のみ実施)、形態を解析するため精子試料を採取し (ただし、F₃ 世代を除く)、多数の臓器の秤量および選択された臓器の組織病理学的検査に向けた採取を行った。さらに、精巣の精子細胞を計数した。出生児において評価されるパラメータは、同腹児数、体重、生存状況、肉眼所見、肛門生殖器間距離、性的発達とし、離乳時に屠殺された動物では、剖検時の臓器の肉眼所見および生殖器重量とした。

すべての世代の成獣に一般毒性の証拠がみられ、50 および 160 mg/kg/日群の体重増加の抑制、また、すべての投与量における腎臓の組織病理学的変化として認められた。これらの状況のさらなる詳細については、**4.1.2.6.1 動物におけるデータ**の項に記載されている。

生殖関連パラメータを考慮すると、受胎能力および交配能力に関する有害作用はなかった。ただし、それ以外の複数のパラメータは影響を受けた。160 mg/kg/日群では、F₁ 雌および F₂ 雌の発情周期の長さが、対照群に比べ約 15%増大した。F₁、F₂、F₃ 世代の雌では、膣開口時期が 50 mg/kg/日群で 1.5~7 日、160 mg/kg/日群で 3~6 日早まった。また、F₂ 世代の 50 mg/kg/日群および F₁、F₂、F₃ 世代の 160 mg/kg/日群で卵巣絶対重量が減少したが、卵巣重量に関する影響を臓器体重比として分析した場合、F₁ および F₃ 世代の影響は明白にならなかった。雄では、精子に関するエンドポイントの変化が F₂ 世代にのみ認められ、精巣上体精子密度が 50 および 160 mg/kg/日群で約 10%低下し、精子細胞数が 160 mg/kg/日群で同程度減少した。ただし、精巣上体精子密度の測定値には方法に問題があった可能性がある。何故なら、対照群を含む F₂ 世代すべての群の密度が F₀ および F₁ 世代の雄の報告値より大幅に高く (約 25~40%)、各世代の週齢が剖検時には同程度であったため、精子密度の大きな差は予測されないと考えられるからである。

生殖の側面から本試験を要約すると、ノニルフェノール投与により受胎能力および交配能力は悪影響を受けなかった。ただし、比較的わずかながら、発情周期の長さ、膣開口時期、卵巢重量、精子数/精子細胞数には変化がみられた。発情周期に関する影響は F₁ および F₂ 世代双方に認められ (F₃ 雌の評価なし)、膣開口時期は 3 世代すべてで影響を受けた。その一貫性は、投与との関係ありという明確な証拠となる。これらの影響は、ノニルフェノールのエストロゲン性に関連すると考えられた。ノニルフェノール投与と卵巢重量減少との関係については、1 代のみ体重を調整後その影響が明白にされた一方、組織病理学的変化とは相関しなかったことから、いくらか不明ではあるものの、予測される外因性のエストロゲン活性の直接的影響とは矛盾しない。また、F₂ 世代の精子数/精子細胞数が明らかに減少した原因については不明である。こうした変化について、外因性のエストロゲン活性に対する胎児または新生児の暴露に起因し得るとの仮説が立てられているが (Sharpe and Skakkebaek, 1993)、仮説による機序が機能していた場合、精液/精巣の変化は F₁ 世代にも生じたはずである。さらに、方法に問題があった可能性により、精子数/精子細胞数データの解釈の困難が増す。その一方、**4.1.2.9.3 発生毒性**の項に要約した腹腔内投与試験では、雄生殖器系の発達障害が認められ、このことは、精子数/精子細胞数の変化とノニルフェノール投与との因果関係を支持する証拠の裏付けになる。加えて、この腹腔内投与試験では、その影響にきわめて重要な暴露期間が新生児期であると考えられることを示している。全体では、本試験が示した証拠から、数世代にわたるノニルフェノール暴露により出生児の生殖器系に軽度の攪乱を生じる可能性があり、そうした攪乱は、外因性のエストロゲン活性について予測または仮定された影響とは矛盾しないが、検討された投与量ではラット生殖器の機能的変化は生じない。これらの変化に関する NOAEL は、15 mg/kg/日であることが明確に同定された。

ノニルフェノールの精巣毒性は、Sprague Dawley ラットを対象に手短に報告された反復投与試験において検討された (de Jager *et al.*, 1999a)。雄ラット 20 匹からなる群に、投与量 0 (溶媒対照：綿実油)、100、250、または 400 mg/kg/日を 12 週齢から 1 日 1 回 10 週間 (強制) 経口経路により投与した。投与期間終了時に動物を屠殺し、生殖器の詳細な評価を実施した。精巣および精巣上体の重量を記録した。精巣上部尾部の総精子数を測定した。精巣をブアン固定液に保存し、組織学的検査に向け処理した。組織学的検査では、存在する精子形成段階の識別、および精細管の直径、内径、上皮の厚さの測定を行った。

100、250、400 mg/kg/日群で投与期間中それぞれ 3、15、18 匹が死亡したが、これらの死亡に関するさらなる情報は提示されなかった。毒性の臨床徴候は報告されなかった。生存動物の体重増加は投与により影響を受けなかったが、死亡動物では体重増加の抑制がみられた。対照群との比較では、250 および 400 mg/kg/日群の生存動物において、精巣および精巣上体の重量ならびに精細管の直径、内径、精上皮の直径の減少が認められ、400 mg/kg/日群では精子数が減少したが、死亡によりきわめて小規模な群になったため、これらの所見に対する毒性学的有意性はほとんど認めることができない。100 mg/kg/日群では、精巣および精巣上体の重量は影響を受けなかったが、精細管の直径、内径、精上皮の直径は対照群の結果より統計的に有意に減少し、精細管の直径の平均値は 10%低下したが、それ以外の 2 つのパラメータについてはデータが提示されなかった。250 および 400 mg/kg/日両群では、組織病理学的検査により精巣異常が同定された。250 mg/kg/日群の 1 匹には、上皮の空胞化および痂皮脱落による細胞壊死が精細管の約 40%で認められた。400 mg/kg/日群の生存動物でも精細管の空胞化、細胞壊死、攪乱が生じ、第 2 精母細胞および精子はほとんど存在しなかった。

本試験では、死亡も生じる暴露量において、ノニルフェノール関連の精巣毒性の証拠が示されている。精巣毒性の LOAEL は 100 mg/kg/日であると明示できる。本強制経口投与試験

において、100、250、400 mg/kg/日投与時に死亡が認められたことは、**4.1.2.6 反復投与毒性**の項に要約された混餌投与に伴う試験結果(Hüls 社, 1989; Chemical Manufacturers Association, 1997a; NTP, 1997) とは対照的である。この差はおそらく投与方法により説明でき、強制経口投与では、ノニルフェノールの最高血中濃度が混餌投与より高くなると考えられる。

4.1.2.9.3 発生毒性

質が高い標準的なラット経口発生毒性試験 1 件と、雄生殖器系の発達に関する影響の可能性を特に検討した 2 件の試験（腹腔内経路を用いた 1 件、経口経路を用いた 1 件）が得られている。

標準的なラット発生毒性試験の方は十分に報告され、OECD ガイドライン 414 に従って GLP を遵守して実施されている (Initiative Umweltrelevante Altstoffe, 1992)。指定時期に交配させた Wistar 系雌ラットからなる群に、ノニルフェノール投与量 0、75、150、300 mg/kg/日のコーン油溶液を妊娠 6 日目から 15 日目まで強制経口投与した。さらに設けた 600 mg/kg/日投与群は、投与から最初の数日間に多くの雌が死亡したため、早期に終了した。各群の妊娠雌が 21 匹以上となる十分な雌を本試験に割り付けた。生存した雌は妊娠 20 日目に屠殺し、胎児は外観、内臓、骨格に関するルーチン検査を受けた。

300 mg/kg/日群では母動物毒性の明確な証拠が得られ、体重増加の抑制および摂餌量の減少、2 匹の死亡、臓器の肉眼的変化（腎臓：7 匹で蒼白または異常な形状、脾臓：2 匹で縮小）として示された。類似の肉眼的変化が 150 mg/kg/日群で時にみられ、早期に終了した 600 mg/kg/日群の雌には高い発生率で認められた。75 mg/kg/日群における母動物毒性は認められなかった。着床後胚損失率、同腹児数、胎児体重、大小双方の胎児異常の発生率については、投与による影響を受けなかった。結論として、本試験では、母動物毒性となる暴露量においてラットの発生毒性を示す証拠がないことから、母動物の NOAEL は 75 mg/kg/日、胎児の NOAEL は 300 mg/kg/日とした。

一方、手短に報告された腹腔内投与試験では、ノニルフェノールが雄生殖器系の発達に及ぼす影響を、新生児 Sprague-Dawley ラットにおいて検討した (Lee, 1998; 追加情報は著者の私信により入手)。同齢の雄児を、対照群か投与群のいずれかに無作為に割り付けた。ノニルフェノール投与量 5~10 µg/回を、出生日 (0 日目) ~30 日齢の様々な日程で 1 日 1 回腹腔内経路により投与した。対照動物は、同じ経路により溶媒 (ジメチルスルホキシド) のみ投与した。児を 31 日齢の時点で屠殺し、最終的に生殖器領域の外観、肛門生殖器間距離、停留精巣の存在、生殖器重量 (体重に対する相対値として報告) について観察した。

最初の実験では、3 匹以上の児からなる群に 0、0.08、0.8、8 mg/kg/日を出生日から 15 日齢まで投与した。0.8 および 8 mg/kg/日群では、精巣、精巣上体、精囊、前立腺の重量減少が統計的に有意かつ用量依存的に認められ、典型的には重量が対照群の結果より約 15~25% 低下した。さらに、8 mg/kg/日群のみ肛門生殖器間距離が短縮した。0.08 mg/kg/日群では、生殖器重量は影響を受けなかった。次の実験では、3 匹または 4 匹の児からなる群に、ノニルフェノール 0 または 8 mg/kg/日を 1~18 日齢、6~24 日齢、または 13~30 日齢のいずれかの日程で投与し、発達の脆弱な相があるか検討した。生殖器重量は 1 日目または 6 日目の投与開始群では有意に減少したが、13 日目開始の投与群では減少しなかった。3 番目の実験では、エストロゲン受容体拮抗剤 ICI 182,780 がノニルフェノールにより障害された生殖器重量の増大に及ぼす影響について、6 匹または 7 匹の児からなる群にノニルフェノール 8 mg/kg/日を 1 日齢から 5 日齢まで投与することにより検討した。ノニルフェノール投与から 10 分後、本拮抗剤用量 0.5 mg/kg、投与量 5~10 µg/回を腹腔内経路により投与した。ICI 182,780 は、生殖器重量に及ぼすノニルフェノールの影響を遮断することが認められた。ICI

182,780 の単独投与では、生殖器重量に影響を及ぼさなかった。停留精巣の発生率は、ノニルフェノール 8 mg/kg/日を投与した児 6~34 匹の群において 1~5 日目 (33%)、1~10 日目 (55%)、または 1~18 日目 (62%) に報告された。停留精巣は、溶媒対照群、1 日目におけるノニルフェノール単回投与群、および ICI 182,780 とノニルフェノールとを同時投与した場合には認められなかった。

最後の実験では、2 組の同腹児から選択された雄児 8 匹に、ノニルフェノール 8 mg/kg/日を 1 日齢から 15 日齢まで腹腔内経路により投与後、性的成熟まで飼育した。受胎能力については、6 匹または 20 匹いずれかの無処置雌ラットと連続的に交配対を設け、雌の妊娠数を記録することにより評価した。同じ 2 組の同腹児から選択された雄児溶媒対照を比較に用いた。対照群では、妊娠がほぼすべての交配対から得られた。対照的に、ノニルフェノール投与群では、雄 2 匹は完全に受胎能力がなくいずれの雌も妊娠できなかった。また、3 匹では最初受胎能力があったが、後の交配対では雌が妊娠できず、2 匹は対照群と同程度の受胎能力を示し、残りの雄 1 匹は本受胎能力試験開始間近に死亡した。剖検所見はノニルフェノール投与群 5 匹について報告され、すべてに停留精巣や軽度もしくは顕著な精巣萎縮を認めた。

本試験デザインには、動物数が全般的にきわめて少なかったこと、見たところ、投与開始時の児の体重が一致していなかったこと、腹腔内経路の投与は、生殖器に非現実的な高暴露をもたらすと考えられ、吸入、経皮、経口経路に伴うヒトリスク評価に対しては妥当性に疑問があること、と複数の欠点が認められる。それでも、生殖器重量減少または停留精巣が一連の実験全体を通じ一貫して認められ、このことが肛門生殖器間距離短縮という観察結果により裏付けられ、また、性的成熟まで飼育された動物では受胎能力が低下したことから、新生児期の間のノニルフェノール暴露がラット雄生殖器系の発達を障害するという証拠になる。その影響に最も脆弱な期間は、13 日齢より前と考えられる。エストロゲン受容体拮抗剤 ICI 182,780 がその影響を遮断したことから、ノニルフェノールが雄生殖器系に及ぼす影響は、エストロゲン受容体の作用を介し得ると示唆される。一方、ノニルフェノールの腐食性および腹腔内経路による投与の使用を考慮すれば、認められた影響には、非特異的な刺激性の停留精巣が寄与した可能性があると考えられる。著者は、ノニルフェノール投与児の約 50%に腹腔の癒着が生じたのに対し、対照群には認められなかったことから、この仮説が裏付けられると述べている。癒着はみられたが、投与関連の毒性の臨床徴候および死亡の増加はなかった。ICI 182,780 による影響の遮断は、注入されたノニルフェノールの希釈に起因した可能性があると考えられる (本試験ではノニルフェノール投与後に溶媒のみ注入した対照群を設けなかったため、この代替的な説明は検討されなかった)。臨床徴候、死亡、全般的な剖検肉眼所見に関する正確な情報は、著者から得られなかったことに留意されたい。用量 8 mg/kg/日以外の投与群はきわめて少数であったため、0.08 mg/kg/日投与群では児の影響が認められなかったが、本試験から NOAEL および用量反応関係に関する情報は得ることができる。全体では、試験デザインに欠点があり、非特異的な刺激性が雄生殖器系に認められた影響に寄与した可能性があると考えられることから、ヒト特異的な生殖毒性の妥当性について本試験から明確な結論を導くことはできない。したがって、入手可能な生殖毒性データベース全体の評価については、本試験の影響力はほとんどない。

手短に報告された 3 番目の試験では、ノニルフェノール暴露の影響について、子宮内発生期間から性的成熟までノニルフェノールを暴露させた (強制) 経口投与試験において検討された (de Jager *et al.*, 1999b)。交配雌 10 匹からなる群にノニルフェノール濃度 0 (溶媒対照: 綿実油)、100、250、400 mg/kg/日を 1 日 1 回妊娠 7 日目からその同腹児の離乳まで投与した。F₁ 世代の雄 20 匹を各群から無作為に選択し、10 週齢まで母動物の場合と同様に投

与した。その後選択された F₁ 雄を屠殺した。精巣および精巣上体の重量を記録した。精巣上体尾部の総精子数を測定した。精巣をブアン固定液に保存し、組織学的検査に向け処理した。組織学的検査では、存在する精子形成段階の識別、および精細管の直径、内径、上皮の厚さの測定を行った。

母動物毒性に関しては、母動物の体重に関する情報は提示されなかったが、雌は身体的異常および行動異常を示さないことが記述された。400 mg/kg/日投与群母動物から出生児は出産されなかったが、それが母動物の死亡か胚/胎児吸収のためであったかは本報告から明確にされていない。

F₁ 出生児に奇形および死産はなかった。選択された F₁ 雄に身体的異常および行動異常は認められなかったが、試験終了時の動物数が 250 mg/kg/日群では 18 匹に減少したことから、2 匹は死亡した可能性がある。このことは、成熟雄を対象に実施された de Jager の試験 (1999a) において、250 mg/kg/日群 20 匹中 15 匹が死亡したのとは対照的である (**4.1.2.9.2 受胎能力に及ぼす影響**の項参照)。試験期間中 100 および 250 mg/kg/日両群で、F₁ の体重増加が対照群に比べ有意に減少した (それぞれ 11%、20%)。100 および 250 mg/kg/日両群では、F₁ の精巣および精巣上体の絶対重量が対照群より少なかったが、その影響は、臓器重量を体重に対する相対値で示した場合には明確にならなかったことから、臓器絶対重量の差は体重の群間差と関連している可能性があると考えられる。250 mg/kg/日群の精巣上体尾部の総精子数は減少した (対照群に比べ 36%) が、100 mg/kg/日群の精子数は対照群と同程度であった。両ノニルフェノール投与群の精細管の直径がわずかに減少 (約 10%) したが、驚くべきことに、このわずかな差は対照群と高度の統計的有意差を示した。著者らは、両ノニルフェノール投与群における精細管の内径および精細管上皮の厚さの減少が、対照群と高度の統計的有意差を示すことも述べたが、そのデータは提示されなかった。精細管のこうした定量的変化は de Jager の試験 (1999a) と一致した一方、今回の試験においては、そうした変化とノニルフェノール投与群の精巣重量減少とは関連している可能性がある。組織病理学的検査では、100 mg/kg/日群の F₁ 雄 1 匹の精巣に病変が認められ、精細管については、胚上皮の細胞壊死、空胞化、痂皮脱落が記述された。しかし、250 mg/kg/日群ではそうした組織病理学的異常が認められなかったことから、上記の変化がノニルフェノール投与に起因することはあり得ない。

本試験では、250 mg/kg/日 (死亡を生じた可能性がある投与量) において精子数減少の証拠が示されるが、それが発生に関する影響か、離乳後の雄に対する直接暴露の結果としてなのか述べることはできない。精細管測定値の変化は、特異的な生殖毒性を意味するのか、体重増加の抑制という非特異的な 2 次的結果を意味するのかは不明である。

4.1.2.9.4 生殖毒性の要約

ヒトにおけるデータは得られていない。ノニルフェノールは、多数の *in vitro* および *in vivo* 試験においてエストロゲン活性を有することが示されている。これらの試験におけるそのエストロゲン活性の効力は、エストラジオールより 3~6 桁分の範囲で弱かった。ノニルフェノールが受胎能力および生殖能力に及ぼす影響は、質の高い 1 件のラット経口 (混餌) 投与多世代試験において検討されている。本試験が示した証拠から、数世代にわたるノニルフェノール暴露により出生児の生殖器系に軽度の攪乱 (すなわち、発情周期の長さおよび膣開口時期の軽度の変化、また可能性として卵巣重量および精子数/精子細胞数についても軽度の変化) が生じ得るが、検討された投与量では生殖器の機能的変化は生じなかった。これらの変化に関する NOAEL は 15 mg/kg/日であった。出生児に認められた攪乱は、外因性のエストロゲン活性について予測または仮定された影響とは矛盾しない。精細管の空胞

化、細胞壊死、精細管の直径の減少として認められた精巣毒性の証拠は、ラット反復強制経口投与試験で死亡も生じる暴露量において報告された。精巣毒性の LOAEL は 100 mg/kg/日であった。ノニルフェノールの毒性が混餌投与に比べ強制経口投与により亢進すると考えられるのは、ノニルフェノールの強制経口投与の方が、より高い最高血中濃度を達成すると考えられるためである。

ノニルフェノールが発生毒性物質であるという証拠は、標準的なラット経口投与発生毒性試験では認められなかったことから、母動物および胎児の NOAEL は、それぞれ 75、300 mg/kg/日となった。対照的に、子宮内暴露、哺育中の暴露、離乳後の直接暴露に伴う 1 件の強制経口投与試験では、250 mg/kg/日において精子数が減少したが、それが発生に関する影響か、離乳後の直接暴露の結果としてなのか述べることはできない。ノニルフェノールが、新生児雄ラット生殖器系の発達に及ぼす影響について検討するためデザインされた 1 件の腹腔内投与試験では、発達障害の証拠が認められた。ただし、本試験の解釈は困難であったため、これらの結果については、入手可能なデータ全体の評価における影響力がほとんどない。

全体では、*in vitro* および *in vivo* 試験におけるエストロゲン活性、多世代試験の出生児における生殖器系の軽度の攪乱、強制経口投与試験における精巣の変化に関する知見をまとめると、エストロゲン受容体の作用を介すると考えられる生殖毒性に関する懸念が生じる。生殖毒性に関するこうした懸念はリスク特性評価において対処されるが、不明点は複数に及ぶ。エストロゲン活性に関する試験は、単なるスクリーニング検査にすぎない。多世代試験における生殖関連パラメータの影響は境界線上にあり、生殖に関する機能的変化の証拠は得られなかった。さらに、認められた変化は、いずれも反復投与毒性の LOAEL（腎毒性の LOAEL : 15 mg/kg/日、生殖器の変化に関する NOAEL : 15 mg/kg/日）を超える暴露量で生じた。精巣毒性の証拠は、生殖器に及ぼす影響について、特異的に検討するためデザインされた反復投与試験 2 件で報告されたが、報告されたのは死亡も生じた用量においてのみであった。混餌投与に伴う標準的な反復投与試験では、精巣毒性の証拠は認められなかった。標準的なラット経口投与発生毒性試験では、発生に関する影響は受けなかった。