

部分翻訳

European Union
Risk Assessment Report
P-TERT-BUTYLPHENOL
CAS No: 98-54-4
2008

欧州連合
リスク評価書（2008年最終承認版）
p-tert-ブチルフェノール

P-TERT-BUTYLPHENOL

CAS No: 98-54-4

EINECS No: 202-679-0

RISK ASSESSMENT

Final report 2008

Norway

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2015年10月

本部分訳文書は、p-tert-Butylphenol (CAS No: 98-54-4)に関する EU Risk Assessment Report, (2008)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(濃度)-反応(影響)関係」を翻訳したものである。原文(評価書全文)は、

http://esis.jrc.ec.europa.eu/doc/risk_assessment/REPORT/4tertbutylphenolreport404.pdf

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)関係

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

OECD 417 に準拠したトキシコキネティクス試験のデータは、得られていない。しかし、ラットを用いた *in vivo* 試験において、p-tert-ブチルフェノール(ptBP)の尿中および糞中への排泄が検討されている(Freitag *et al.*, 1982)。さらに、同物質の生体内変化における硫酸化およびグルクロン酸抱合の役割についても、ラットを用いた *in vivo* 試験および肝細胞を用いた *in vitro* 試験で検討されている(Koster *et al.*, 1981)。

経口投与

ptBP の糞中および尿中への排泄、ならびに特定の組織への同物質の滞留性が、雄の Wistar ラット 3 匹を用いた試験で検討されている(Freitag *et al.*, 1982)。この試験では、U-¹⁴C 標識 ptBP (147 μg/kg 体重/日)を、1 日 1 回、3 日間強制経口投与した。媒体として、0.2% Keltron 水溶液が用いられた。尿および糞便は毎日採取し、7 日後に組織中濃度を測定した。糞中および尿中には、投与量のそれぞれ 26.7%および 72.9%が排泄された。放射活性は、脂肪組織および肺には認められず(0.01%未満)、肝臓および屠体にそれぞれ 0.02%および 0.1%が検出された。ラットにおける 7 日後の ptBP の滞留率(放射活性の百分率で表す)は 0.1%であったことから、無視しうる値であると見なされる。排泄比(糞中排泄量÷尿中排泄量)は、0.4 であった。なお、排泄物中に検出された代謝物に関する情報や、排泄物中に未変化体が検出されたか否かについての情報は示されていない。

その他の投与経路

放射標識した被検物質(¹⁴C-ptBP)を生理食塩液に溶解し(生理食塩液で希釈する前に水酸化ナトリウムで pH 10.5 に調整)、1.2~10.34 mg/kg 体重、すなわち 8、15、28 および 68

$\mu\text{mol/kg}$ の用量にて、雄の Wistar ラット(体重 200 g、各用量群 4 匹ずつ)に静脈内投与(単回)した試験の報告が得られている。投与後 4 時間までの胆汁および尿が採取された。試料採取は 1 回のみであった。

この結果、投与量の 65~71%および 17~21%が、それぞれグルクロン酸抱合体または硫酸抱合体として排泄された。(8、15、28 および 69 $\mu\text{mol/kg}$ 投与群で、グルクロン酸抱合体としての排泄率はそれぞれ 68 ± 7 、 65 ± 4 、 71 ± 3 および $67 \pm 3\%$ 、硫酸抱合体としての排泄率はそれぞれ 21 ± 8 、 29 ± 4 、 17 ± 3 および $29 \pm 4\%$ であった。) 未変化体の尿中または胆汁中からの回収に関する情報は提示されておらず、胆汁および尿の薄層クロマトグラフィーで、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体のほかには放射活性を示すスポットは認められなかったことのみが報告されている。詳細は不明であるが、放射能の総回収率は 91~93%であった(Koster *et al.*, 1981)。なお、この試験は静脈内投与によるものであったため、吸収率の推定に用いることはできない。

In vitro 試験

Koster *et al.*(1981)は、単離肝細胞を用い、ptBP の硫酸抱合およびグルクロン酸抱合を検討した。この試験では、肝細胞と放射標識した被験物質を 1 時間培養し、*in vivo* 試験の結果を裏付ける結果を得ている。肝細胞により、低濃度(25 μM)では数分以内に、高濃度(80 μM)では 40 分以内に、被験物質は完全に抱合された。しかし、最高濃度では、抱合速度が低下して完全には抱合されなくなり、これは、おそらく ptBP の毒性作用によるものであろうと考えられた。ptBP は、試験を行いたいずれの濃度(25~800 μM)においても主としてグルクロン酸抱合され、硫酸抱合とグルクロン酸抱合との比率には、濃度依存性の変動はみられなかった。

4.1.2.1.2 ヒトにおける試験

In vivo 試験

吸入

ptBP を取り扱う作業者を対象にしてバイオモニタリング調査が実施されており、各作業者の曝露の指標として、尿中代謝物濃度(ptBP の硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体の加水分解物)が測定された(Kosaka *et al.*, 1989)。吸入曝露でのフェノールの吸収率が 100%であること(Ohtsuji and Ikeda, 1972)、および ptBP の大半が 24 時間以内に尿中排泄されたことを示す分析結果に基づくと、吸入曝露での ptBP の吸収率は、100%であると考えられる。

作業環境における空気中 ptBP 濃度の 8 時間加重平均(8 時間 TWA)の幾何平均値は、包装作業員で 0.39 mg/m^3 ($n = 15$)、運搬作業員では 0.10 mg/m^3 ($n = 5$)であった。尿中の ptBP 濃度は、勤務時間の後半に採取した尿で最も高値を示した〔幾何平均値:包装作業員で $5.07 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ($n = 20$)、運搬作業員では $3.03 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ($n = 8$)〕。ptBP は、作業場を離れると尿中濃度が低下し、24 時間以内にほとんどが排泄された。勤務開始後 24 時間までに尿中に排泄された ptBP の総量は、推定された経気道吸収量の 2~3 倍であったことから、この物質は、気道を介してのみではなく、健全な皮膚からも吸収されると考えられる。

Ikedae *et al.* (1978) も ptBP を取り扱う作業員を対象にバイオモニタリング調査を実施し、尿中代謝物濃度 (ptBP の硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体の加水分解物) を測定した。この調査では、ptBP 製造工場の工場オペレータ、エンジニアおよび製品包装作業員から尿試料が採取された。各作業員が曝露された空気中の濃度に関する情報は示されていない。試料採取は、勤務時間中のほか、作業を終えて次回作業場に入るまでの勤務時間外にも行った。勤務中の尿中代謝物濃度は、工場オペレータで $1.2 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ($0.5 \sim 3.0$, $n = 11$)、エンジニアで $0.5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ($0.2 \sim 1.2$, $n = 7$)、製品包装作業員では $6.3 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ($1.8 \sim 21.7$, $n = 9$)であった。作業を終えてから次回作業場に入るまでの勤務時間外における尿中代謝物濃度は、工場オペレータで $0.6 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ($n.d \sim 6.0$, $n = 10$)、エンジニアで検出限界未満 ($n.d \sim 0.4$, $n = 5$)、製品包装作業員では $3.5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ($1.0 \sim 12.1$, $n = 9$)であった。著者は、尿中濃度は、ptBP の吸入摂取量のみではなく、相当量の経皮摂取量も合わせたものを反映していると述べている。

経皮

「吸入」の項に示したヒトにおけるバイオモニタリング調査の報告では、吸入に加え、皮膚浸透も曝露経路として重要な役割を果たしていることが記述されている。ptBP の経皮曝露に関しては、これらの調査を参照されたい。

経口

データは、得られていない。

In vitro 試験

Temellinet *et al.* (1991) が行った試験において、硫酸基転移酵素およびグルクロン酸転移酵素と、ptBP を含むフェノール化合物との構造-活性相関が検討されている。「構造-活性相関がある」というのは、複数の化合物(基質、フェノール性化学物質)をグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体の基質とすることを意味する。ただし、これらの両酵素は、同一の基質の

抱合に関与することはあるが、それぞれの関与の度合いは基質によって異なる。この試験では、ptBP 濃度を 1 mM~0.01 μ M の 6 段階とし、それを 2 組設けて、酵素反応速度を二重に測定した。ヒトの肝臓の硫酸基転移酵素およびグルクロン酸転移酵素について試験を行い、肝サイトゾル中のものとミクロソームタンパク質中のものとをそれぞれ個別に検討した。なお、高濃度で代謝がどのように変化するかについての情報は、示されていない。ptBP に関する酵素反応速度パラメータは、ヒト肝硫酸基転移酵素では K_m 110 \pm 32.5 μ M および V_{max} 0.58 \pm 0.42 nmol/min/mg、ヒト肝グルクロン酸転移酵素では K_m 0.03 \pm 0.01 μ M および V_{max} 4.08 \pm 0.53 nmol/min/mg であった。この試験により、フェノール性の基質に関するヒト肝 UDP-グルクロン酸転移酵素および硫酸基転移酵素の K_m および V_{max} は、フェノール分子内の置換基の位置およびその化学的性質により影響を受けることが明らかにされ、パラ置換フェノールでは、オルソ置換フェノールに比べ、グルクロン酸転移酵素の V_{max} が大きいことが示された。また、フェノール性の基質に関して、グルクロン酸転移酵素では V_{max}/K_m 比の変動がわずか 25 倍までの範囲であったのに対し、硫酸基転移酵素では 14,000 倍までの変動がみられたことから、UDP-グルクロン酸転移酵素は、硫酸基転移酵素に比べ、基質の化学的性質による影響を受けにくいことが明らかとなった。

4.1.2.1.3 トキシコキネティクス、代謝および分布についての要約

OECD 417 に準拠したトキシコキネティクス試験のデータは、得られていない。しかし、ptBP の生体内変化における硫酸抱合およびグルクロン酸抱合の役割が、ラットを用いた *in vivo* 試験、ならびにラットおよびヒトの *in vitro* 試験で検討されている。また、ptBP を取り扱う作業員の尿中代謝物濃度が測定されている。

ラットに ptBP を経口投与し、糞中および尿中への排泄、ならびに特定の組織への同物質の滞留性を検討した結果、糞中および尿中には、投与量のそれぞれ 26.7% および 72.9% が排泄された。ラットに ptBP を静脈内投与した別の *in vivo* 試験では、投与量の 65~71% および 17~21% が、それぞれグルクロン酸抱合体または硫酸抱合体として排泄され、放射能の総回収率は 91~93% であった。また、ラット肝細胞およびヒトの肝臓を用いた複数の *in vitro* 試験で、ラットに ptBP を静脈内投与した *in vivo* 試験の結果を裏付ける結果が得られている。ラットを用いた試験では、投与 7 日後の滞留率は 0.1% で、これは無視し得る値とみなすことができ、したがって、本物質が生体内に蓄積する可能性は低い。また、ptBP の生理化学的特性〔水溶性 600 mg/L、 $\log P_{ow}$ 値 3.31、および低分子量 152〕も、生体内に蓄積する可能性が低いことを示唆・支持している。

ptBP を取り扱う作業員の尿中代謝物濃度を測定したところ、尿中代謝物濃度は曝露量の増加に伴って上昇し、ptBP は 24 時間以内にほぼ完全に排泄された。また、複数の試験にお

いて、吸入に加え、皮膚浸透が曝露経路として重要な役割を果たしていることが示された。

リスクの総合評価にあたっては、経口曝露による吸収率を 100%とする。この吸収率は、Freitag *et al.*の試験において、経口投与量の 26.7% および 72.9%が、それぞれ糞中および尿中に排泄されたことに基づいたものである。ただし、この試験では、糞中に検出された放射能が代謝物または未吸収の ptBP のいずれに由来するものであったかは示されていない。一方、Koster *et al.*(1981)の試験では、静脈内投与量のほぼ 100%が抱合代謝物として排泄されたことが報告されているが、投与用量のうちどの位が胆汁中や尿中へ排泄されたかは不明である。このため、この試験をそのまま吸収率の推定に用いることはできない。だが、ptBP は、低分子量(152)で K_{ow} 値が小さく(3.31)、水溶性を示す(600 mg/L)ことから、吸収率はほぼ 100%に達するものと考えられる。吸入曝露による吸収率については、これに関するデータが存在しない場合、デフォルト値として 100%を使用する。経皮曝露については、試験データが得られていないが、ptBP の水溶性(600 mg/L)、 $\log P_{ow}$ 値(3.31)および低分子量(152)を考慮し、[技術指針書(TGD)、Appendix IV、p. 263 に規定された基準に従い]吸収率を 100%とみなして、これを使用する。

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 動物における試験

In vivo 試験

吸入

現行のガイドラインを満たした急性吸入毒性試験の報告は、得られていない。しかし、以下に示す限度試験により、吸入による ptBP の急性全身毒性は低いことが示されている(LC₅₀は 5,000 mg/m³超)。

この限度試験では、雌雄各 5 匹のラット(Sprague-Dawley)を、粉塵エアロゾル(中央粒径 3.6 μm)として 5,600 mg/m³の ptBP を含み、蒸気成分として 30 mg/m³の ptBP が加わった空気に、120 L のチャンバー内で 4 時間曝露させた(Klonne *et al.*, 1988)。粉塵エアロゾルは、融解した ptBP(110°C)から生じた蒸気を曝露チャンバーに誘導し、チャンバー内の空気中で凝集させて微粉末とすることにより発生させた。曝露当日から曝露 7 日後までに観察された徴候は、粘膜刺激性徴候(鼻周囲、口周囲および眼周囲の痲疲)および呼吸窮迫徴候(異常呼吸音、あえぎ呼吸および呼吸数減少)であった。毒性徴候の程度や徴候が認められた動物数についての詳細は、報告されていない。雌雄各 1 匹が曝露後 1~2 日以内に死亡した。

死亡した動物では、肺や腎臓の暗赤色ないしは紫色への変色がみられたが、生残した動物には肉眼的病変は認められなかった。

別の 2 件の試験において、ptBP を飽和させた空気にラットを 6 時間 (Klonne *et al.*, 1988/UCC 1985) もしくは 8 時間 (BASF, 1971) 曝露したが、致死例は認められなかったことが報告されている。前者の試験では、雌雄各 5 匹の Sprague-Dawley ラットを用い、動物を収容する 18 時間前に 100 g の ptBP を入れておいたチャンバー内で曝露させた。一般状態観察および剖検が行われたが、体重への影響も毒性徴候も認められなかった。

経皮

ptBP の急性経皮毒性は低いと考えられる。ウサギを用いた 2 件の試験で、LD₅₀ 値が 2,000 mg/kg 体重を上回ることが報告されているが、両試験における LD₅₀ 値は大きく異なっている。また、モルモットに ptBP の 10% 溶液を経皮適用した試験でも、LD₅₀ 値は 2,000 mg/kg 体重を上回ることが示されている。

ウサギを用いた経皮試験の一方では、粉末にした ptBP を蒸留水で湿らせ、2,000、8,000 ないしは 16,000 mg/kg 体重の用量で、1 群雌雄各 5 匹の New Zealand ウサギの刈毛した皮膚に適用した (Klonne *et al.*, 1988/UCC 1985)。その後、閉塞条件下で 24 時間、ptBP を皮膚に接触させたままにした。この結果観察された毒性徴候は、中用量群および高用量群における体重増加量の減少、ならびに皮膚刺激性反応であった。また、16,000 mg/kg 体重投与群の雌 1 匹に衰弱がみられたが、この試験では、死亡例は認められていない。重度の皮膚刺激性反応が、すべての投与群において雌雄両方で認められた。誘発された刺激性反応の詳細については、第 4.1.2.3 章を参照されたい。

ウサギを用いたもう一方の経皮試験では、ptBP の経皮 LD₅₀ が 2.52 mL/kg 体重 (IUCLID には 2,318 mg/kg 体重と記載) であったことが、用量設定試験の毒性データをまとめた一覧表に示されている (Smyth *et al.*, 1969)。Smyth (1969) は、試験手順の記述については、過去の試験報告 (Smyth, 1962) を引用している。1962 年の報告には、アルビノ New Zealand ウサギの雄 4 匹を用いたと記述されている。被験物質は、刈毛した体幹部の皮膚に適用し、不浸透性プラスチックフィルムで被覆して 24 時間保持された。投与プロトコルについては、これ以上の詳細な情報は示されていない。この試験は修正ドレイズ法に従って実施したとされ、動物の観察期間は 14 日間であった。LD₅₀ 値が示されているほかは、皮膚反応または全身毒性に関する報告はない。

モルモットを用いた試験では、オリーブ油またはアルコールを媒体とした ptBP の 10% 溶液を、刈毛した腹部に単回適用した (The Dow Chemical Company, OECD-SIDS 2003 に記載)。

媒体がオリーブ油の場合は 2,000 mg/kg 体重の用量まで死亡例は認められなかったが、媒体がアルコールの場合は 2,000 mg/kg 体重群および 3,000 mg/kg 体重群のそれぞれ 5 匹中 1 匹が死亡したことから、経皮 LD₅₀ は 2,000 mg/kg 体重を上回るとみなされた。

経口

情報が得られた試験の大半で、ラットにおける LD₅₀ 値は 2,000 mg/kg 体重を上回っている。しかし、ラットを用いた 1 件の試験で、LD₅₀ 値は 800 mg/kg 体重であると報告されている。得られた急性経口毒性データの一覧を、Table 4.1.2.2.i [訳注:実際の表では Table 4.31] “acute oral toxicity”に示す。

Table 4.31 Acute oral toxicity

LD ₅₀	Species/sex	Method	Reference
> 2000 mg/kg bw	Rat – male/female	OECD 401, GLP	Sandoz Chemicals (1991)
4000 mg/kg bw	Rat – male/female	OECD 401 (May 1981)	Huels, 1985a
5360 mg/kg bw	Rat – male		Klonne et al.,
3620 mg/kg bw	Rat – female		1988/UCC 1985
2990 mg/kg bw	Rat – male		Smyth et al., 1969
3500 mg/kg bw	Rat – male/female		BASF, 1971
801 mg/kg bw	Rat – male/female		Shell, 1980
LD0 = 400 mg/kg bw LD100 > 1400 mg/kg bw	Guinea pig (sex not specified)		The Dow Chemical Company, (referred to in OECD-SIDS 2003)

ラット (Sprague-Dawley) を用い、OECD ガイドライン 401 および GLP に準拠した試験が実施されており、雌雄各 5 匹に、ptBP が、2,000 mg/kg 体重の用量で投与された (Sandoz Chemicals, 1991)。ptBP は、ラッカセイ油に懸濁され、強制経口投与された。14 日間の観察期間中に、死亡例および全身毒性徴候は認められなかった。これに付随する用量設定試験では、5,000 mg/kg 体重投与群で雄ラットが死亡したが、雌は死亡しなかった。高用量 (5,000 mg/kg 体重) の投与を受けた雄で報告された毒性徴候は、円背姿勢、嗜眠、眼瞼下垂、鼻部周囲の赤色/褐色の着色および運動失調であった。この試験では、剖検は実施されていない。また、高用量群の雌では、いかなる毒性徴候も認められていない。

Hüls (1985a) の試験も、ラットを用いて OECD ガイドライン 401 に準拠して実施されたもので、ptBP がパラフィン油に溶解され、強制経口投与された。この試験では Wistar 系 (Bor:WISW) ラットが用いられ、最低用量群 (3,160 mg/kg 体重) には雌雄各 5 匹、これより高用量の群 (3,980 mg/kg 体重および 5,010 mg/kg 体重) には 1 群雌雄各 10 匹が配分された。

投与後、最低用量群では、雄 5 匹中 1 匹および雌 5 匹中 2 匹が 11 日以内に死亡した。また、中用量群では雄 10 匹中 4 匹および雌 10 匹中 8 匹が、最高用量群では雄 10 匹中 7 匹および雌 10 匹中 5 匹が、投与後 48 時間以内に死亡した。この結果より、LD₅₀は 4,000 mg/kg 体重と算出された。毒性徴候としては、衰弱、運動失調、呼吸窮迫、ふるえ、円背姿勢、鼻出血、下痢および多尿などが認められた。生残動物では、体重減少がみられたが、投与後 6 日間に他の毒性徴候は報告されていない。剖検時に最も多く観察された所見は、胃粘膜および小腸粘膜の充血であり、腫脹ならびに肝臓や脾臓の変色が伴う例も認められた。また、肝臓、腹膜および脾臓の充血も観察され、2 匹の被験動物では腎臓に重度の肥大が認められた。

ラット (Sprague-Dawley) を用いた別の試験 (Klonne et al., 1988/UCC 1985) では、1 群雌雄各 5 匹の動物に、2,500、3,500、5,000 および 10,000 (雄のみ) mg/kg 体重の用量で、ptBP を投与した。この試験では、コーン油を媒体とした 25%ptBP 懸濁液が、胃挿管により投与された。最低用量群では死亡例はなかったが、3,500 mg/kg 体重投与群で雌 5 匹中 2 匹、5,000 mg/kg 体重投与群で雌全部と雄 5 匹中 2 匹、最高用量群では雄全部が死亡した。この試験で得られた LD₅₀ 値は、雄ラットおよび雌ラットでそれぞれ 5,360 mg/kg 体重および 3,620 mg/kg 体重であった。観察された主な毒性徴候は、活動性低下、不安定歩様、衰弱、粗毛および鼻汁であった。雌では、最低用量群において、被毛に色の付いた分泌物の付着もみられたことが報告されている。動物の観察期間は、投与後 14 日間であった。生残動物では、毒性徴候は投与後 3~7 日で消失し、投与後第 7 日および第 14 日には全例で体重増加を認めた。死亡は、投与 2 時間後~5 日後に認められた。試験期間中に死亡した雌ラットで観察された主な肉眼的病変は、肺および肝臓における斑紋形成であった。雄では、意義のある肉眼的病変は認められなかった。

Shell (1980) の試験では、1 群雌雄各 6 匹の Wistar ラットに、DMSO を媒体とした ptBP の 10% 溶液が、4、5、6.3、7.9 ないしは 10 mL/kg 体重 (400、500、630、790 および 1,000 mg/kg 体重に相当) の用量で、挿管により投与された。観察期間は、投与後 14 日間であった。LD₅₀ 値は 801 mg/kg 体重と算出された。毒性徴候として嗜眠、鼻出血および立毛がみられ、明らかな用量-反応関係が認められた。最低用量 (400 mg/kg 体重) では、毒性の徴候は報告されていない。500 mg/kg 体重投与群および 630 mg/kg 体重投与群では、雌雄 3 匹ずつに毒性徴候がみられたのに対し、790 mg/kg 体重投与群では全例に毒性徴候が認められた。さらに、1,000 mg/kg 体重投与群では、投与後数時間から数日以内に大半の動物が死亡した。生残動物は、概ね投与後 3~4 日以内に完全に回復した。投与後第 7 日には体重増加量の減少がみられたが、投与後 7 日~14 日の期間には、すべての生残動物で体重増加を認めた。死亡動物数は、400 mg/kg 体重投与群で 12 匹中 0 匹、500 mg/kg 体重投与群で 12 匹中 1 匹、630 mg/kg 体重投与群で 12 匹中 2 匹、790 mg/kg 体重投与群で 12 匹中 5 匹、1,000 mg/kg 体

重投与群では 12 匹中 10 匹と報告されている。算出された LD₅₀ の雌雄差はわずかであったが(雄で 786 mg/kg 体重、雌で 815 mg/kg 体重)、最高用量群における生存例は 2 匹の雌のみであった。なお、剖検に関するデータは示されておらず、対照群についても報告されていない。また、ptBP の用量の増加に伴い、被験物質液の容量も増加している(3.6 mL/kg～9.0 mL/kg)。このため、当局は、観察された毒性および用量-反応関係には、DMSO 投与量の増加が影響している可能性が高いと考えている。この試験で得られた LD₅₀ が、適切に実施された他の試験における値と異なっていることは、これを裏付けるものである。なお、ラットにおける DMSO の LD₅₀ の文献値は 17.9 mL/kg 体重および 17,400～28,300 mg/kg 体重であり、マウスでは 5 mL/kg 体重で致死例が生じたことが報告されている。上記の理由により、Shell の試験結果は ptBP の毒性を正確に反映していないと判断し、ptBP の急性経口毒性の評価においては、この試験を除外した。

用量設定試験の毒性データの一覧表には、ラット(雄の Carworth-Wistar ラット 5 匹)における経口 LD₅₀ を 3.25 mL/kg 体重(IUCLID では 2,990 mg/kg 体重)とした試験のデータも記載されている(Smyth *et al.*, 1969)。この試験では、胃挿管により被験物質を投与した。投与方法または毒性に関する詳細な情報は示されていない。

その他の投与経路

腹腔内投与での ptBP の LD₅₀ 値が、225 mg/kg(ラット)および 78 mg/kg(ptBP の DMSO 溶液、マウス)であったことが報告されている(BASF, 1971; Biagi *et al.*, 1975)。第 4.1.2.7.2 項に示した *in vivo* 小核試験(OECD 474)(厚生省、日本、2003)では、用量設定試験において、1 群雌雄各 5 匹の CD-1 マウスに ptBP を 25、50、100 ないしは 200 mg/kg 体重の用量で腹腔内投与した。その結果、200 mg/kg 体重投与群の全例が死亡し、100 mg/kg 体重投与群の雄 3 匹および雌 4 匹が重度の毒性徴候を示して死亡した。また、主試験では、これより低用量(25 mg/kg 体重および 50 mg/kg 体重)で、自発運動の低下が認められている。なお、現時点では、観察された毒性の詳細は不明であり、完全な報告書が発表された後、試験プロトコル全文のコピーおよび関連情報を本リスク評価書に追加する予定である。

4.1.2.2.2 ヒトにおける試験

ヒトにおける致死量または急性全身毒性の徴候に関する情報は、得られていない。

4.1.2.2.3 急性毒性についての要約

3種類の投与経路のいずれを用いた場合も、ptBPの急性毒性は低いと考えられる。吸入投与によるLC₅₀は、5,600 mg/m³(粉塵エアロゾル)に30 mg/m³の蒸気成分が加わった濃度を超えることが、限度試験により示されている。また、経皮LD₅₀値および経口LD₅₀値については、大半の試験で、2,000 mg/kg体重を超えるという結果を得ている。例外的に、ラットを用いた経口投与試験(Shell, 1980)で801 mg/kg体重というLD₅₀値が示されているが、この試験では、高用量であるほどptBPの挿管投与に使用したDMSOの量も増加したために、報告されている他の急性経口毒性試験に比べ、急性毒性が強く現れたものと考えられる。データが得られた試験は、附属書VIIAの急性毒性の評価に求められる試験要件を満たしている。

4.1.2.3 刺激性

動物における複数の試験で、ptBPが刺激性を有することが示されている。加えて、ptBPは、限局性色素脱失(白斑)を引き起こすことがある。ptBPの色素脱失作用については、第4.1.2.6.4項「色素脱失」に詳述する。

4.1.2.3.1 皮膚

動物における試験

ptBPの刺激性については、Table 4.1.2.2.ii [訳注:実際の表ではTable 4.32]に示した複数の試験で検討されている。これらの試験により、ptBPが皮膚に対して中等度から強度の刺激性および腐食性を示すことが明らかにされている。

Table 4.32 Skin irritation

Species	Method	Exposure duration	Result	Reference
Rabbit	OECD 404, GLP	4 hours	Severely irritating	Sandoz Chemicals, 1991
Rabbit (male/female)		4 hours	Non- to moderately irritating. Severely irritating/corrosive to 1/6 animals	Klonne <i>et al.</i> , 1988/UCC 1985
Rabbit (male/female)	OECD 404	4 hours	Irritating	Huels, 1985b
Rabbit (male/female)	US DOT regulation 173.1300	4 hours	Irritating. Severely irritating/corrosive to 1/6 animals	Schenectady, 1982
Rabbit (male/female)		24 hours	Moderately irritating	Shell, 1980

OECD ガイドライン試験 (OECD 404, GLP に準拠) で、3 匹 (雄 1 匹、雌 2 匹) の New Zealand ウサギの無傷皮膚に、蒸留水で湿らせた ptBP 500 mg が、4 時間適用 (半閉塞) された (Sandoz Chemicals, 1991)。適用後 1、24、48 および 72 時間、ならびに 7 および 14 日後に、ドレイズの基準に従って皮膚反応のスコアが判定された。被験物質に起因して、重度の紅斑および軽微から中等度の浮腫が認められた。紅斑の平均スコアは 24 時間後に 4、72 時間後に 3.4、14 日後には 0 であり、浮腫の平均スコアは 24 時間後に 2、72 時間後に 1.7、14 日後には 0 であった。そのほかに観察された有害な皮膚反応は、白色の小壊死斑 (24 時間後および 48 時間後、全適用部位)、痂皮周囲の境界明瞭な紅斑、硬化した淡褐色の痂皮、皮膚肥厚、痂皮形成および被毛再生遅延であった。14 日後まで不可逆的な皮膚の変化は報告されておらず、本物質は、EU 分類基準 (全層に及ぶ皮膚の損傷) に従い、非腐食性であると判断された。報告された病変は、ptBP が皮膚刺激性であることを示すものである。

別の試験では、雌雄各 3 匹の New Zealand ウサギを用い、水で湿らせた ptBP 500 mg を刈毛した無傷皮膚に塗布してガーゼパッチで覆い、4 時間適用 (半閉塞) した (Klonne *et al.*, 1988/UCC 1985)。適用後 1、24、48 および 72 時間、ならびに 7、10、14 および 17 日後に、ドレイズの基準に従って皮膚反応のスコアを判定した。この結果、6 匹中 4 匹では、いかなる皮膚刺激徴候も認められなかったが、雌 1 匹で一過性の紅斑 (グレード 1、第 1 日) および持続性の落屑 (第 10~17 日) がみられ、雄 1 匹で紅斑 (グレード 1~2、第 1~10 日)、軽微な浮腫 (グレード 1、第 1~3 日)、落屑 (第 10~14 日)、痂皮形成 (第 7~10 日) および壊死 (第 1~10 日) が認められた。この試験は、ptBP には皮膚刺激性があり、なおかつ腐食性を有する可能性もあることを示している。

第 4.1.2.2.1 項 (急性毒性) に示した経皮毒性試験では、2,000、8,000、および 16,000 mg/kg 体重の ptBP を 24 時間経皮適用した結果、重度の刺激性反応および皮膚壊死が認められた

(Klonne *et al.*, 1988)。重度の皮膚刺激性反応(紅斑、浮腫、亀裂、落屑および壊死等)は、すべての投与群の雌雄両方で認められた。中用量群および高用量群では、多くの動物で、14日間の投与後期間を通じて、壊死が持続してみられた。低用量群(2,000 mg/kg 体重)では、紅斑、壊死および亀裂が第7日までみられ、第14日には落屑および痂皮が認められた。

OECD ガイドライン 404 に準拠し、白色小型のロシアウサギ(Chbb-SPF)を用いて実施した試験でも、ptBP の刺激性が示されている(Huels, 1985b)。この試験では、500 mg の ptBP を、ウサギ(雌雄各3匹)の擦過皮膚に4時間適用し、適用後1時間、24、48 および72時間、ならびに6、8、10 および14日の時点で、ドレイズの基準に従って皮膚反応のスコアを判定した。この結果、6匹中2匹で境界明瞭な紅斑が、6匹中4匹で中等度から重度の紅斑が認められた。適用後24時間の時点で認められた浮腫は、6匹中4匹では非常に軽微であったが、2匹では中等度であった。被験動物の何匹かでは、紅斑および浮腫は、第10日まで持続した。また、6匹中3匹で、痂皮および落屑が第14日まで持続して認められた。この試験は、ptBP が皮膚刺激性であることを示している。

米国運輸省規則 173.1300 に従って実施した皮膚刺激性試験では、New Zealand ウサギ(雌1匹/雄5匹)の無傷皮膚に、生理食塩水で湿らせた ptBP 500 mg を4時間適用(半閉塞)し、パッチ除去後、約48時間にわたり皮膚反応を観察した(Schenectady, 1982)。紅斑の平均スコアは4時間後に2、48時間後に2.3であり、浮腫の平均スコアは4時間後に1.5、48時間後には1.7であった。48時間後に雄1匹で壊死が観察された。これ以上の詳細な情報は示されていない。一次刺激性指数は8段階評価で3.4であった。この試験は、ptBP が皮膚に対して強度の刺激性を示し得ること、そして腐食性も示し得ることを裏付けるものである。

雌雄各3匹のNew Zealand ウサギを用い、500 mg の ptBP を無傷皮膚または擦過皮膚に24時間適用した閉塞パッチ試験(Shell, 1980)では、適用後24、48 および72時間後、ならびに7日後に、ドレイズの基準に従って皮膚反応のスコアを判定した。無傷皮膚における紅斑の平均スコアは、24時間後に1.7、48時間後に1.1、72時間後に0.2、7日後に0.6であり、浮腫の平均スコアは、24時間に0.8、48時間後に0.7、72時間後に0.4、7日後には0.2であった。擦過皮膚では、紅斑の平均スコアが24時間後に1.8、48時間後に1.7、72時間後に1.3、7日後に1.0であり、浮腫の平均スコアは24時間後に0.8、48時間後に0.8、72時間後に0.6、7日後には0.3であった。また、3匹の動物の皮膚に、熱傷の所見に類似した小白斑がみられたことが報告されている。なお、これらの影響の可逆性については、報告がなされていない。この試験では、ptBP はウサギの皮膚に対して中等度の刺激性を示すとみなされた。

ウサギを用いた別の皮膚刺激性試験(BASF, 1971/IUCLID)でも、刺激性および腐食作用に

ついて言及されているが、この試験の詳細な情報は得られていない。

また、第 4.1.2.6.4 項に示した色素脱失試験(Gellin *et al.*, 1970)でも、刺激性が報告されている。この試験では、黒色モルモットの剃毛した皮膚に、種々の溶媒に溶解した ptBP 溶液 0.1 mL を 1 日 1 回、最長 3 週間適用した。この結果、ptBP 1 mg では刺激性は認められなかったが、5 mg で中等度の刺激性が誘発された。ptBP 10 mg では、アセトンを媒体とした場合、強度の皮膚刺激性(適用領域を越えて広がる紅斑および浮腫)が誘発されたのに対し、DMSO やプロピレングリコールを媒体とした場合は、中等度の刺激性を認めたのみであった。

ヒトにおける試験

ヒトにおける試験の情報は、得られていない。

4.1.2.3.2 眼

動物における試験

ptBP は、眼に対して強い刺激性を示すことが明らかにされている。

約 80 mg の乾燥微粉末をウサギ(New Zealand ウサギ、6 匹)の眼に適用した試験で、重度の角膜損傷、虹彩炎、および重度の結膜刺激症状が認められた(Klonne *et al.*, 1988/UCC 1985)。ドレイズの基準に従ってスコアリングを行った結果、以下の平均スコアが得られている。角膜混濁:グレード 1(1 時間後)~3.2(7 日後)、虹彩病変:グレード 1、結膜発赤:グレード 1.8(1 時間後)~2.2(72 時間後)、および結膜浮腫:グレード 2.3(1 時間後)~3.8(72 時間後)。多くの動物で、角膜混濁により 4 時間後の虹彩病変スコアが判定不能であったため、可逆性の有無は不明である。角膜混濁は持続して観察され、適用 21 日後にも顕著に認められた(平均スコア 2.5 ; 範囲 0~4)。これより低用量(10 mg)を適用した場合も同様の影響が認められ、試験に供された大半の眼で、21 日間の観察期間を通じて持続したが、影響の程度は高用量に比べ軽度であった。この試験の結果は、ptBP がウサギの眼に対して強度の刺激性を有することを示している。

6 匹の New Zealand White ウサギに ptBP を 100 mg 適用した試験も報告されている(Shell, 1980)。この試験では、ドレイズの方法に従って、適用後 1、24、48 および 72 時間後、ならびに 7 日後に眼の損傷のスコアを判定し、以下の平均スコアが得られている。角膜混濁:グレード 0(1 時間後)~1.4(48 時間後~7 日後)、虹彩病変:グレード 0(1 時間後)~0.5

(48 時間後～7 日後)、結膜発赤:グレード 2(1～48 時間後)～1.2(7 日後)、および結膜浮腫:グレード 2.2(24 時間後)～0.3(7 日後)。この試験の結果は、ptBP がウサギの眼に対して刺激性を有することを示している。

別の試験(BASF, 1971)でも、強度の刺激性、および腐食性と考えられる影響について言及されているが、詳細には報告されていない。

ヒトにおける試験

ヒトにおける試験の情報は、得られていない。

4.1.2.3.3 気道

動物における試験

第 4.1.2.2.1 項「急性毒性」に示したラットにおける急性吸入試験で、呼吸器毒性が観察されている(Klonne *et al.*, 1988)。ptBP への曝露後に、粘膜の刺激症状(鼻周囲、口周囲および眼周囲の痂皮)ならびに呼吸窮迫(異常呼吸音、あえぎ呼吸および呼吸数減少)が認められた。この試験では、被験動物が、ptBP の粉塵エアロゾル(5,600 mg/m³)に蒸気成分(30 mg/m³)が加わった空気に、曝露チャンバー内で曝露された。

ヒトにおける試験

ヒトにおける試験の情報は、得られていない。

4.1.2.3.4 刺激性についての要約

上述の情報を踏まえ、ptBP を、眼、皮膚および呼吸器系に強度の刺激性を与える物質であるとみなし、「Xi, R37/38-41」に分類することを提案する。ただし、腐食作用についても報告が得られている(後述の第 4.1.2.4 項を参照のこと)。得られたデータから、大半の被験動物(ウサギ)で、中等度から重度の皮膚刺激が観察されると考えられる。Sandoz Chemicals による試験と Klonne *et al.*による試験とでは、報告された皮膚刺激性に明らかな相違があるが、その原因は不明である。また、2 件の試験で、本物質に曝露された動物の少数に、皮膚腐食性が認められたことが報告されている。腐食性および壊死の特徴に関する情報は限

られたものであるが、高用量の ptBP に長期曝露した場合、すべての被験動物の皮膚に、持続性の壊死が生じている。データが得られた試験は、附属書 VIIA の刺激性に関する要件を満たしている。

4.1.2.4 腐食性

広く認められているガイドラインに従って最近実施された試験において、ptBP が皮膚に対して強度の刺激性を有することが示されている。この試験では、ptBP への曝露により白色の小壊死病変が形成されたが、EU および米国の腐食性の判定基準(全層に及ぶ皮膚の損傷が 1 例以上/不可逆的な皮膚の変化)に従い、これらの病変は腐食性の影響であるとはみなされていない。この白色壊死の性状に関する詳細な情報が示されていないため、本稿では、この試験報告において提案された分類を容認することとした。ほかにも、4 時間の曝露後に、曝露された動物の少数で皮膚の壊死が認められたことが、2 件の試験で報告されている(Klonne *et al.*, 1988/UCC 1985; Schenectady, 1982)。また、経皮急性毒性試験(Klonne 1988/UCC 1985)において、長時間(24 時間)の皮膚接触により、曝露されたすべての動物で壊死が認められたことが報告されているが、このような長時間の曝露による試験のデータは、分類の根拠として用いられない。

4.1.2.5 感作性

4.1.2.5.1 動物における試験

皮膚

Magnusson-Kligman 法により近年実施された皮膚感作性試験で、ptBP は非感作性であることが示されている(Hüls, 1998)。この試験は、OECD ガイドライン 406 および GLP に準拠して実施された。Harlan Winkelmann GmbH(ドイツ、Borchen)より入手した Dunkin Hartley (Pirbright White Hsd/Poc:DH [SPF])系若齢成熟モルモットの雄(体重 500 g 未満)が、被験物質投与群には 10 匹、対照群には 5 匹用いられた。皮内注射による予備試験を行い、適切な被験物質濃度を確認した。予備試験では、コーン油を媒体として、ptBP を 0、0.01、0.05、0.1、0.5、1.00 ないしは 5.00%の濃度で投与した結果、高用量側 2 群(1.00%および 5.00%)において、投与後 24 時間の時点で壊死を認めた。

皮膚への適用には、ワセリンで調製した 5、10、25 および 50% (w/w) の ptBP を塗布したパ

ッチを用い、左右の側腹部にそれぞれ 2 箇所ずつ閉塞貼付した。この結果、48 および 72 時間後に、25 および 50%の組成のパッチにより、壊死および痂皮形成を伴う孤立性で強度の紅斑および腫脹が引き起こされた。これらの予備試験の結果を踏まえ、主試験の感作誘導における濃度としては、皮内注射にはコーン油を媒体として 0.5%、局所適用にはワセリンを媒体として 10%を採用し、感作惹起における濃度としては、ワセリンを媒体として、刺激性を示さない最高濃度であった 1%を採用した。主試験では、局所感作誘導に対する皮膚反応を、適用の 49 および 72 時間後に評価した。ワセリンを媒体とした 1%ptBP 調製物を用いて感作惹起を行ったところ、処置によるいかなる皮膚反応も認められなかった。この結果からは、皮膚感作性の証拠は示されなかった。

主試験における溶媒対照群および陽性対照群の動物では、0.5%の被験物質または溶媒の注射により、1 時間後に境界明瞭な膿疱を伴う中等度かつ融合性の紅斑がみられ、24 時間後には孤立性の紅斑が認められた。主試験における局所感作誘導では、10%の濃度の被験物質を適用する 1 週間前にフロイント完全アジュバント(FCA)で処置した場合、被験物質適用の 49 および 72 時間後に、出血性の搔創を部分的に有する強度の紅斑および腫脹ならびに痂皮形成が観察された。しかし、1 週間前に 0.5%の濃度の被験物質で前処置した場合には、試験群および対照群のいずれにおいても、被験物質注射の 49 および 72 時間後に、いかなる反応も認められなかった。また、1%の濃度の被験物質で感作惹起を行った後、48 時間の時点でも 72 時間の時点でも、試験群、対照群または溶媒対照群のいずれにおいても、皮膚反応は全く認められていない。

Zimerson(1999)は、Magnusson-Kligman 法の修正法(GPMT)により、ptBP の皮膚感作性および p-tert-ブチルカテコール(ptBC)との交差反応性を検討した。この試験でも、ptBP は非感作性であることが示されている。この試験は、OECD ガイドライン 406 に準拠して実施され、供試動物には、Dunkin Hartley 系若齢成熟モルモット[J.A.Sahlin(スウェーデン、Malmö)より入手]の雌(体重 300~400 g)が用いられた。各被験物質ごとにそれぞれ計 42 匹の動物を用い、ptBP、p-tert-ブチルカテコール(ptBC)、2,6-ジメチロール p-tert-ブチルフェノール(2,6-MPTBP)、2-メチロール p-tert-ブチルフェノール(2-MPTBP)、tert-ブチル-4-ヒドロキシアニソール(BHA)および 3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシトルエン(BHT)の感作性が検討された。12 匹は陰性溶媒対照群、24 匹は被験物質投与群、残る 6 匹は陽性対照群[2-メチロールフェノール(2-MP)を使用]に充てられた。

局所刺激性

各化合物につき 4~8 匹のモルモットを用い、48 時間閉塞パッチ試験により、局所刺激性を評価した。この試験では、被験物質(ptBP または ptBC)を、各動物の側腹部 4 箇所(背側

に 2 箇所、腹側に 2 箇所)に、パッチにより適用した。溶媒にはプロピレングリコールまたはアセトンが用いられ、適用濃度は ptBP で 6.0% w/v (0.4 mol/L)、ptBC では 16.7% w/v (1.01 mol/L)であった (Table 4.1.2.2 iii を参照のこと) [訳注: 実際の表では Table 4.33]。被験物質は頸部にも適用した。適用の 1 週間前に、フロイント完全アジュバント (FCA) (Pierce, Rockford, IL) による前処置を行った。この結果、この試験で用いた濃度において、すべての被験物質で局所刺激性が認められた。

皮内感作誘導

第 0 日に、36 匹の動物 (Table 4.1.2.2 iii を参照のこと) [訳注: 実際の表では Table 4.33] に対し、両側の肩部のそれぞれ 3 箇所に、以下の I、II および III が 1 列となるよう皮内注射を行った。I: FCA と水の 40% w/v 混合物 (FCA/水 50/50 v/v に相当) 0.1 mL、II: プロピレングリコール/アセトン (90/10% v/v) で調製した被験物質 [ptBP (1.0% w/v, 0.67 mol/L) または ptBC (3.40% w/v, 0.20 mol/L)] 0.1 mL、III: FCA 濃度が I と等しく、被験物質濃度が II と等しくなるようプロピレングリコール/アセトン (90/10% v/v) で調製した被験物質 (ptBP または ptBC) と FCA の混合物 0.1 mL。続いて、全動物に対し、局所感作を行う 24 時間前の時点で、肩部の試験区画 (2×4 cm) に、ジメチルアセトアミド/アセトン/エタノール 4/3/3 v/v/v 混合液 (99.5%) で調製した 10% w/v ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) 200 µL を適用した。局所感作誘導は、これと同一の区画に ptBP (感作性が疑われる物質) の 6.0% w/v (0.40 mol/L) 溶液 200 µL を塗布したろ紙 (Munktell 1002) を貼付し、それを不透性のプラスチック粘着テープで被覆し、さらに粘着包帯で固定し、その状態を 48 時間保持することで行われた。

感作惹起

すべての物質につき、刺激性を示さない濃度で感作惹起を行った。

感作惹起 I は、感作性が疑われる物質または交差反応を起こす可能性がある物質による 2 回目の感作誘導の 2 週間後に、36 匹の動物 (Table 4.1.2.2 iii を参照のこと) [訳注: 実際の表では Table 4.33] に対して行った。試験液 [ptBP (2.0% w/v, 0.13 mol/L) または ptBC (7.5% w/v, 0.45 mol/L)] 25 µL を、右側腹部の背側寄りのそれぞれ 2 箇所に閉塞パッチで適用し、24 時間保持した。このパッチテストは、Durapore® に Al-test® (Astra Agency, Södertälje, Sweden) を被せる形で行われた。各感作性試験で、12 匹の被験動物には、背側寄りの 2 箇所のパッチの両方に、感作性が疑われる物質を適用した。6 匹には、頭側寄りのパッチのみに感作性が疑われる物質を適用し、他方のパッチには溶媒のみを適用した。他の 6 匹には、頭側寄りのパッチに溶媒のみを適用し、他方のパッチに感作性が疑われる物質を適用した。

また、他の 6 匹の動物には、背側寄りの 2 箇所のパッチの両方に、感作性が疑われる物質を適用した。3 匹には、頭側寄りのパッチのみに感作性が疑われる物質を適用し、他方のパッチには溶媒のみを適用した。さらに他の 3 匹には、頭側寄りのパッチに溶媒のみを適用し、他方のパッチに感作性が疑われる物質を適用した。感作惹起 I では、ptBP に対して陽性を示したのは、試験群の 24 匹中 1 匹のみであった。

感作惹起 II は、36 匹の動物 (Table 4.1.2.2 iii を参照のこと) [訳注: 実際の表では Table 4.33] に対し、感作惹起 I と同時に、左側腹部において行われた。試験群 24 匹および対照群 12 匹の動物の左側腹部の 6 箇所 (背側寄りに 2 箇所、腹側寄りに 2 箇所、および背側と腹側の中間部に 2 箇所) でパッチテストを行った。被験動物に対する感作惹起は、ptBP (2.0% w/v、0.13 mol/L)、もしくは交差反応を起こす可能性がある物質、すなわち、ptBC (10.0% w/v、0.60 mol/L)、2-MPTBP (21.8% w/v、1.21 mol/L)、2,6-MPTBP (25.4% w/v、1.21 mol/L)、BHA (10.9 % w/v、0.61 mol/L) または BHT (13.3 % w/v、0.61 mol/L) を用いて行われた。この結果、試験群のうち ptBP で感作誘導した動物には感作惹起 II で陽性を示した例はなかったが、ptBC で感作誘導した動物 9 匹で、ptBP による感作惹起後に陽性を認めた。

対照群

各対照群の 6 匹の動物には、感作誘導時に感作性が疑われる物質を投与しないことを除き、対応する試験群の動物と同様の方法で、感作誘導および感作惹起を行った。この結果、2-メチロールフェノール (2-MPTBP) [訳注: 2-MP と思われる] の適用により、6 匹中 3 匹で陽性を認めた。また、感作惹起 II では、ptBC で感作誘導した動物のうち 4 匹が対照物質に対して陽性を示し、ptBP 誘導で感作した 3 匹で 2-MPTBP [訳注: 2-MP と思われる] に対する陽性反応を認めた。

「陽性」対照群の 6 匹の動物すべてに対しては、Bruze (1985) が記述した方法に従い、2-MP による感作誘導および感作惹起を行った。

融合性の紅斑をアレルギー (陽性) 反応の最低基準として、すべての動物を評価した。

この試験の要約 :

ptBP による感作誘導および感作惹起により、試験群の 24 匹中 1 匹 (4%) のみが陽性反応を示した。

ptBC で感作誘導した動物群では、24 匹中 9 匹 (37.5%) が ptBP に対して陽性反応を示した ($P=0.014$)。

EURAR: P-TERT-BUTYLPHENOL

この試験の結果は、ptBP の感作性は非常に弱い、ptBC への曝露により ptBP との交差反応が引き起こされる可能性があることを示している。

Table 4.33 Induction and challenge with ptBP or ptBC and cross-reaction studies between ptBP, ptBC, 2-MPTBP, 2,6-MPTBP, BHA and BHT in Dunkin Hartley guinea pigs.

Procedure (Vehicle)	Number of exposed animals (Test substance/vehicle)	Substance (Concentration in % w/v/molx1-1)						
		ptBP	ptBC	ptBC	2-MPTBP	2,6-MPTBP	BHA	BHT
MP (positive control)	6							
Topical (ac)	4-8	6.0/0.4	16.7/1.01					
Induction ID (pg/FCA/ac)	24/12	1.0/0.67	3.4/0.20					
Challenge I (pg/ac)	24/12	2.0/0.13	7.5/0.45					
Challenge II (pg/ac)	24/12	2.0/0.13	10.0/0.60	21.8/1.21	25.4/1.21	10.9/0.61	13.3/0.61	

ID = intradermal; ac = acetone; pg = propylene glycol; FCA = Freund's complete adjuvant; ptBP = p-tert-butylphenol; ptBC = p-tert-butyl catechol; 2-MPTBP = 2-methylol p-tert-butylphenol; 2,6-MPTBP = 2,6-dimethylol p-tert-butylphenol; BHA = tert-butyl-4-hydroxyanisole; BHT = 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene; MP=2-methylol phenol.

Malten (1967) は、雌の白色モルモット (系統は不明) を用い、ptBP-ホルムアルデヒド樹脂 (ptBP-FR) および遊離 ptBP の感作性試験を 2 回行った。しかし、これらの試験は古く、現行のガイドラインに準拠して実施されていない。したがって、ptBP の感作性の評価においては、この試験の結果の価値は限られている。

初回の試験では、雌の白色モルモット 20 匹を用い、両耳後部の被毛のない皮膚に、酢酸エチルを媒体とした 30%ptBP-FR 溶液を 1 日 1 回 1 滴ずつ 3 週間塗布し、2 週間の休止期間を設けた後、左乳頭に酢酸エチルを媒体とした 1%ptBP 溶液を、右乳頭に酢酸エチルを媒体とした 0.5%ptBP-FR 溶液を適用した。その 48 時間後に、乳頭の生検を実施した。なお、過去の試験により、酢酸エチルには有害性のないことが証明されている。組織学的検査の結果、20 匹中 15 匹で ptBP-FR に対する接触アレルギー反応が認められ、さらに、これらの 15 匹中 7 匹で ptBP に対する陽性反応を認めた。ただし、この試験の結果は、陽性または陰性として記述されているのみであり、詳細には報告されていない。

2 回目の試験も同様に行われ、雌の白色モルモット 20 匹に 30%ptBP 溶液を 1 滴ずつ塗布し、後に、左乳頭に 1%ptBP 溶液を、右乳頭に 0.5%ptBP-FR 溶液を適用した。曝露の日程

は、初回の試験に示したとおりである。この結果、14 匹のモルモットが ptBP に感作され、このうち 9 匹では ptBP-FR に対する反応も認められた。なお、この接触アレルギー反応のスコアについては、報告がない。

気道

試験データは、得られていない。

4.1.2.5.2 ヒトにおける試験

皮膚

いくつかの試験から、ヒトへの影響を検討したデータが得られている。ヒトについての試験の大半は ptBP-ホルムアルデヒド樹脂 (ptBP-FR) を用いて実施されており、ptBP 自体の感作性を検討したものではない (Fisher *et al.*, 1995; Massone *et al.*, 1991; Beetz, 1971; Geldof *et al.*, 1989; Rycroft *et al.*, 1980)。これらの試験は、Geldorf *et al.* (1989) の試験を除き、本リスク評価には含めていない。

ptBP-FR によって引き起こされる影響は、2-ヒドロキシメチル ptBP および 2,6-ジヒドロキシメチル ptBP などの分解生成物ならびにその他の確認されていない副生成物が原因となっている可能性が高い。このことから、ptBP-FR に対する反応は、製品の分解によって生じることが考えられる (Malten *et al.*, 1985; Rudner, 1977; Hausen *et al.*, 1985; Brugnamì *et al.*, 1982; Budde *et al.*, 1988)。ptBP のリスク評価には、Rudner (1977) の試験のみを含めている。

ptBP のパッチテスト

国際接触皮膚炎研究班 (ICDRG) の標準検査シリーズに記述されている方法を用いたパッチテストにおいて、ptBP が酸化防止剤として使用されているセルロースエステルプラスチックに対するアレルギー患者 6 名中 1 名で、ワセリンを媒体とした 2%ptBP 調製物に対するアレルギー反応が認められた (Jordan *et al.*, 1972)。なお、セルロースエステルプラスチックに含まれる ptBP 濃度は 0.5% である。

北米接触皮膚炎グループ (North American Contact Dermatitis group) は、1974~1975 年に皮膚感作性に関するルーチン検査を行っており (Rudner, 1977)、このとき対象とされた接触皮膚炎患者 1,900 名のうち 1.9% が陽性反応を示した。また、900 名以上の接触皮膚炎患者を対象とした 1975~1976 年の追加検査では、1.1% の患者で 2% の ptBP に対する陽性反応が認

められた。

Table 4.34 Detailed descriptions of the human patch tests

Patch test with ptBP	Number of exposed individs	Previous exposure	Present exposure	Vehicle	Test guideline*	Result	Reference
patients allergic to cellulose ester plastics	6	0.5 % ptBP in Celluloics	2 % ptBP	petrolateum	ICDRG	one patient with positive reaction	Jordan, 1972
patients with contact dermatitis	1900 (1974-75 series)	N.I.	3 % ptBP	N.I.	AI-test and Dermicel tape	36.1 (1.9%) patients with positive reactions	Rudner, 1977
patients with contact dermatitis	900-2000 (1975-76 series)	N.I.	2 % ptBP	N.I.	AI-test and Dermicel tape	Between 10 and 22 patients with positive reactions	Rudner, 1977
patients with severe contact leukoderma	9	ptBP in flakes	1 % ptBP	petrolateum	Standrad Spanish contact dermatitis research group series	all showed positive reactions	Romaguera, 1981
patient with no previous history of skin disease	1	ptBP or ptBP-FR from shoes	2 % ptBP	petrolateum	European standard series and shoe series	positive (++) reaction after 21 days	Chalidapongse, 1992
patients hypersensitive to ptBP-FR	12	ptBP-FR	1.2 % ptBP	water	ICDRG	negative reactions	Zimerson, 2002
Patch test with ptBP-FR and ptBP							
shoemakers with eczema	10	glue with ptBP	50 % ptBP	ethylacetate	7mm ² Patch test with 12 different substances	positive reactions from erythema and edema or papules	Malten, 1958, 1977
shoemakers with eczema	10	glue with ptBP	50 to 75 % ptBP-FR	ethylacetate	patients back covered with cellophane 15mm ² for 24 h	to erythema+edema +papules+a few vesicles	Malten, 1958, 1977
shoe manufacturing workers	246 (201 F + 45 M)	glue with ptBP among other things	2 % ptBP and	petrolateum	van der Bend patch test camber, Nederlands using ICDRG crit	5 reacted allergic contact dermatitis to ptBP-FR but was negative according to ptBP	Mancuso, 1996
patients suspected to have occupational skin disease	359 <hr/> 308(of 359)	allergens in glue or plastics	1 % ptBP	petrolateum	ICDRG	3 (0.8 %) patients showed an irritations respons to ptBP	Kanerva, 1999
			5 % ptBP-FR	petrolateum	ICDRG	8 showed allergic reaction and 5 showed irritation reactions to 5 % ptBP-FR.	
patient exposed to cosmetics	1	ptBP-FR	2 % ptBP	N.I.	True test (Pharmacia)	positive (++)	Angelini, 1993
patients with suspected contact dermatitis	1966	N.I.	1 % ptBP-FR and 1% ptBP	petrolateum	ICDRG	30 were positive to ptBP-FR and 3 were positive to ptBP in a follow-up study 10 of the 30 were positive for ptBP	Geldof, 1989

* all human test series are performed by different commercial standard series without any further details; N.I. no information available

他の物質の製造における中間体として使用される ptBP の製造を行う 2 ヲ所の工場の作業 者計 8 名を対象に、1%ptBP でパッチテストを行ったところ、全員が陽性を示した (Romaguera *et al.*, 1981)。

皮膚疾患の既往歴がある 1 名の女性患者が、踵部に皮膚炎を発症した (Chalidapongse *et al.*, 1992)。この患者は、欧州の標準検査シリーズおよび靴アレルギーシリーズによるパッチ

テストを受け、ワセリンを媒体とした 2% ptBP などに対し陰性結果を示した。しかし、21 日後、パッチ貼付部位に強い陽性反応が確認された。このため、30 日後に、異なる部位にパッチを貼付して再検査を行ったところ、曝露後 21 日目に、2%の ptBP に対する陽性反応が認められた。

ptBP のパッチテストについての概評

ヒトにおける試験の大半で、頻度や程度に差はあるが、パッチ貼付に対する陽性反応が認められた。このうち 2 件の試験(すなわち、Rudner, 1977 および Romaguera *et al.*, 1981)では、かなりの患者に明確な陽性反応が認められている。さらに、これらの試験で観察された陽性反応は、いくつかの単一症例調査における陽性所見により裏付けられている。これらの試験や調査はすべて、パッチテストの国際基準に従って実施されたものであり (Table 4.1.2.2.iv を参照のこと)[訳注：実際の表では Table 4.34]、実施時点で利用可能であった最新のパッチテストの手法が用いられている。試験・調査ごとに、使用した溶媒、検査対象とした患者数、および ptBP または ptBP-FR を含有すると考えられる種々の物質への曝露歴が異なっているが、対象とした患者には皮膚疾患の既往歴があった。最近になって最新の試験の結果が公表され、陰性結果が報告されている。このデータは過去のデータと相反するように思われるが、ほとんどの試験が、国際的に推奨されている周知のパッチテスト法および評価基準に従って実施されたものである。一見矛盾した結果であるが、1960 年～1970 年以降 ptBP-FR の製造方法が変化したことが一因であろうと考えられる。これについては、感作性についての要約の項の説明を参照されたい。

ptBP と ptBP-FR のパッチテスト

ptBP-FR に対する過敏症を有する患者 12 名を対象とし、ICDRG 基準に準拠して、ptBP、ptBP-FR、ホルムアルデヒドおよび 3 種の関連物質によるパッチテストが行われている (Zimerson *et al.*, 2002)。パッチテストには、水が媒体として用いられ、1.2%w/v の ptBP(81 mmol/L)、1.0%w/w の ptBP-FR および 1.0%w/v のホルムアルデヒドが供試された。この結果、ptBP、ホルムアルデヒド、p-tert-ブチルカテコール、2(3)-tert-ブチル-4-ヒドロキシアニソール(BHA)または 3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシトルエン(BHT)に対して、並発反応や交差反応は認められなかった。

1957 年に、ptBP を含有する接着剤への職業曝露により湿疹を発症した靴職人 10 名を対象とし、感作性を検討するためのパッチテストが行われている (Malten *et al.*, 1958: 1977)。このテストでは、全患者において、接着剤の成分である ptBP-FR(酢酸エチルを媒体とした 50%溶液;3 名に対しては酢酸エチルを媒体とした 75%溶液)および ptBP(酢酸エチルを媒体

とした 50%溶液)に対する陽性反応が認められた。ptBP のパッチにより 24 時間後に観察された反応は、紅斑、浮腫または丘疹であり、小水疱を呈した症例もあった。48 時間後には、全患者において、これらの症状が認められた。

靴製造業界では、ptBP-FR がネオプレン接着剤に広く用いられており、しばしば職業性アレルギー性接触皮膚炎(OACD)の原因となっている(Mancuso *et al.*, 1996)。256 名の靴職人を対象とし、面接、検査、ならびに ICDRG が推奨する標準および職業別パッチテストシリーズを用いたパッチテストを行った。その結果、主要成分である ptBP(2%)やホルムアルデヒドに対する陽性例は認められなかったが、5 名(2%)が ptBP-FR(1%)に対して陽性反応を示した。この調査の結果から、ptBP については皮膚感作性がないことが示唆される。

プラスチックおよび接着剤は、職業性皮膚疾患の一般的な原因物質である(Kanerva *et al.*, 1999)。職業性の皮膚疾患が疑われる患者 359 名に対して ptBP(1%)のパッチテストを行った。その結果、パッチテストにアレルギー反応を示した患者はなかったが、359 名中 3 名(0.8%)に刺激性反応が認められた。また、ptBP-FR(5%)に対する反応を評価するため 308 名に対してパッチテストを行ったところ、刺激性反応が認められた患者は 1.6%であったが、2.6%の患者が ptBP-FR に対するアレルギー反応を示した。

ptBP-FR が化粧品に使用されることは稀である(Angelini *et al.*, 1993)。しかし、リップライナーに含まれる ptBP-FR に曝露された 1 名の女性患者で、口唇周囲にそう痒性皮膚炎が認められた。この患者に、TRUE Test™ (Pharmacia)を用いて ptBP-FR のパッチテストを行ったところ、第 2 日および第 3 日に、陽性反応が認められた。感作物質が ptBP であったことを確認するため、ptBP(2%)のパッチテストも行ったところ、ptBP 単独でも第 2 日および第 3 日に陽性のアレルギー反応がみられ、7 日後にはパッチ貼付部位に色素脱失が認められた。

接触アレルギーが疑われる複数の患者を対象に、ICDRG ガイドラインに準拠して、ptBP-FR、遊離 ptBP およびフェノール-ホルムアルデヒド樹脂などを被験物質として、パッチテストが行われた。(Geldof *et al.*, 1989)。その結果、検査対象とされた 1,966 名のうち、1.5%が ptBP-FR に陽性、0.15%が遊離 ptBP に陽性であった。初回の検査で ptBP-FR に陽性を示した 30 名の患者を対象として追跡調査を行ったところ、2 度目の検査では 3.33%が ptBP に陽性、87%が ptBP-FR に陽性であった。

気道

職業に関連した息切れの既往歴のある化学工業従事者 1 名に対し、ptBP による気管支誘発試験を行ったところ、2 相性の喘息反応が認められた(Brugnam *et al.*, 1982)。他の情報は

提示されていない。

In vitro 試験

データは得られていない。

4.1.2.5.3 感作性についての要約

報告が得られた 3 件の動物試験のうち、2 件は陰性であり、残る 1 件で陽性の結果が得られている。陰性であった試験は、GPMT 法を用い、現行の試験ガイドラインおよび GLP に準拠して実施されたものであり、陽性であった試験は、古く、なおかつ試験プロトコルの詳細が示されていない。動物における試験からは、確固とした結論を導き出すことができないが、これらの試験の科学的品質を考慮すると、ptBP が動物に皮膚感作を引き起こす可能性は低いと考えられる。

ptBP は、ptBP-FR 中に最初に同定されたアレルゲンであると報告されている (Zimerson and Bruze, Kanerva *et al.*の中で引用; Handbook of Occupational Dermatology, 2000)。職業性接触アレルギーまたは一般アレルギーの患者を対象としたパッチテストによる感作性試験がいくつか報告されている。また、文献中には数多くの症例報告がみられる。しかし、これらの多くは ptBP-FR を用いており、ptBP の感作性の有無を評価する上での価値は限られたものである。また、これらの試験/報告の結果により示された ptBP のヒトに対する感作性には、非常に大きなばらつきがあり、ptBC のような他の物質への曝露により ptBP との交差反応が起こり得ることも報告されている (Zimerson, 1999)。Fisher (1986) の Contact Dermatitis (第 649 ページ)によると、1950 年代および 1960 年代には、樹脂中に過剰の遊離 p-tert-ブチルフェノールが含まれていたため、樹脂そのものおよび ptBT の両者に対する感作が高い頻度で起こっていた。このため、Malten は、樹脂中の過剰な遊離 ptBP を除去することを推奨した。したがって、以前のヒトの曝露においては、遊離 ptBP 濃度が低く中間生成物および分解生成物が多く含まれる現在の曝露に比べ、高濃度の遊離 ptBP が含まれていた可能性が高い (Fisher, 1986)。結果として、現在 ptBP-FR にアレルギーがある患者では、ptBP に反応しない例が多く、また、遊離ホルムアルデヒド (F) に反応する例はほとんどみられない。生産工程が変更される以前に実施された試験は、遊離 ptBP に対するアレルギー反応を反映しているとみられ、後に実施された試験よりも ptBP の感作性の評価における重要性が高いと考えられる (Rudner, 1977; Romaguera *et al.*, 1981)。

ptBP の皮膚感作性を評価するためのデータベースは限られている。動物におけるデータは、

信頼性にばらつきがあり、ptBP が感作物質であるという結論を導き出すためには不十分である。ヒトにおけるデータもまた、大半の試験で陽性結果が非常に少ない上、主として皮膚アレルギーまたはその他の皮膚疾患の既往歴をもつ患者を対象として実施されているか、または曝露物質に関する情報が不十分であることから、その価値は限定的である。分類および表示に関する専門委員会において、R 43 とする分類提案が検討されたが、得られているデータでは分類基準が満たされないと結論付けられた。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1 全身毒性 - 動物における試験

吸入

データは、得られていない。

経皮

データは、得られていない。

経口

反復投与毒性の評価は、反復投与毒性・生殖/発生毒性併合試験および二世代生殖試験の結果に基づいて行った。

以下に示す反復投与毒性・生殖/発生毒性併合試験 (OECD 422) は、GLP に準拠して実施された (厚生省、1996)。

14 日間用量設定試験 (厚生省、未発表、OECD/SIDS report, 2003 の中で引用されている) では、Sprague-Dawley ラットを用い、0 (溶媒)、250、500 ないしは 1,000 mg/kg 体重/日の用量で、強制経口投与を行った。この結果、すべての用量群で、異常呼吸音 (喘鳴) および呼吸困難が認められた。また、最高用量群では、雌 5 匹中 3 匹および雄 5 匹中 1 匹が、第 9 日までに死亡した。この時点で、すべての生残動物についても剖検を行ったが、いかなる毒性徴候も認められなかった。500 mg/kg 体重/日投与群で報告された唯一の異常は、雌雄とも 5 匹中 3 匹で観察された異常呼吸音であった。250 mg/kg 体重/日投与群では、雌 5 匹中 1 匹に異常呼吸音が認められた。以下に述べる主試験で用いた最高用量では、呼吸窮迫

も観察された。

主試験では、8 週齢の雌雄の Sprague-Dawley ラット(各群雌雄 13 匹ずつ)に、0.5%メチルセルロース溶液で調製した ptBP を、0(溶媒)、20、60 ないしは 200 mg/kg 体重/日の用量で強制経口投与した。雄には ptBP を 6 週間投与し、雌に対しては交配 14 日前より哺育 4 日まで投与が行われた。

反復投与毒性を評価するため、一般状態の観察、摂餌量測定、体重測定、血液学的検査、血清生化学的検査、肉眼的剖検、および特定の臓器の病理組織学的検査を行った。

最高用量群の複数の雌で、呼吸困難(異常呼吸)を伴う喘鳴が認められた。観察された呼吸窮迫は、投与時の気道刺激によるものと考えられた。強制経口投与時に、少量の ptBP が呼吸器系に直接接触し、これにより局所の刺激が誘発される可能性がある。しかし、病理組織学的検査では、気道に刺激徴候は認められていない。雄におけるアルブミンの平均血漿中濃度は、60 mg/kg 体重/日投与群および 200 mg/kg 体重/日投与群でわずかに(6%および 13%)低値を示し、これに伴い、200 mg/kg 体重/日投与群の雄では血漿タンパクの減少(6%)も認められた。また、200 mg/kg 体重/日投与群の雄では、平均赤血球数の有意な減少(5%)、および平均白血球数の増加(38%)も報告されている。親動物の病理組織学的検査では、被験物質に関連した形態学的変化は観察されなかったが、雄で、平均相対肝重量にわずかな増加(5%未満)が認められた。子動物の体重および肉眼的形態には、ptBP による影響は認められなかった。被験物質投与群の雌で観察された呼吸窮迫および雄にみられた複数の血液パラメータへの影響に基づく、この試験では、親動物における NOAEL は、60 mg/kg 体重/日であると判断される。

ptBP の二世世代生殖試験は、Sprague-Dawley ラットを用い、OECD ガイドライン 416 および米国 EPA ガイドライン OPPTS 870.3800 に準拠して実施された(Clubb and Jardine, 2006)。この試験の概要は、第 4.1.2.9 項、生殖毒性の項に示したとおりである。ここでは、反復投与毒性の評価に関連する知見について述べることとする。

この試験では、0、800、2,500 ないしは 7,500 ppm(約 0、70、200 および 600 mg/kg 体重/日に相当)の用量で、ptBP を混餌投与した。親世代には 1 群雌雄各 28 匹のラットを用い、交配の 10 週間前より哺育終了までを被験物質投与期間とした。

投与に関連した臨床徴候は報告されていないが、上位 2 つの高用量群では、対照群に比べ体重増加量が減少した。統計学的に有意な体重増加量の減少が、雄では第 0~16 週に 200 mg/kg 体重/日投与群(対照群の約 90%)および 600 mg/kg 体重/日投与群(対照群の約 70%)で、雌では第 0~10 週に 200 mg/kg 体重/日投与群(対照群の約 80%)および 600 mg/kg 体重/日投

与群(対照群の約 70%)で、それぞれ認められた。また、体重増加量の減少と同時に、摂餌量の減少も認められた。

体重を共変数として共分散分析を行った結果、試験終了時、臓器重量の統計学的有意な増加が、雄では、600 mg/kg 体重/日投与群の腎臓(対照群の 3.96 g に対して 4.29 g)および肝臓(対照群の 18.87 g に対して 20.19 g)において、雌では、副腎(対照群の 0.076 g に対して 0.064 g)および卵巣(対照群の 0.107 g に対して 0.081 g)において、それぞれ認められた。高用量群の雌では、ごく軽微から軽度の膣萎縮の発生率が統計学的に有意に増加し、原始卵胞数の増加が認められた。

200 mg/kg 体重/日投与群の雌では、統計学的に有意な卵巣相対重量の減少(対照群の 0.107 g に対し 0.096 g)が観察された。また、有意ではなかったが、副腎の相対重量にも減少がみられた。一方、200 mg/kg 体重/日投与群の雄では、臓器の相対重量に有意な変化は認められなかった。70 mg/kg 体重/日投与群(最低用量群)では、雄で肝臓の相対重量にわずかではあるが有意な増加(対照群の 18.87 g に対し 20.17 g)が認められたが、雌では臓器相対重量の有意な変化はみられなかった。

この試験からは、反復投与毒性に関する NOAEL は、雌にみられた卵巣および副腎相対重量の用量依存性の減少に基づき、70 mg/kg 体重/日 (800 ppm)であると判断される。

ほかに、ハムスターおよびラットの前胃および腺胃における増殖性病変の誘発に対するフェノール化合物(ptBP を含む)の影響を検討した 2 件の試験の報告が得られている(Hirose 1986; 1988)。第 1 の試験では、7 週齢の雄のシリアンゴールデンハムスター 1 群(15 匹)に、ptBP を 1.5%の濃度で飼料に混合(TGD 2003, Appendix VI, Table 3 に記載の平均摂餌量 82 g/kg 体重/日に基づくと、約 1,230 mg/kg 体重/日に相当)して、20 週間混餌投与した。その結果、平均体重が対照群に比べわずかに(5%)減少し、肝臓の相対重量が約 20%増加した。第 2 の試験では、1 群 20 匹の雄の Fischer 344 ラットに 1.5%の ptBP を 51 週間混餌投与した。その結果、肝臓の相対重量に約 8%の減少がみられ、腎臓の相対重量には約 13%の増加が認められた。なお、この試験におけるラットへの ptBP の投与用量は、約 600 mg/kg 体重/日と推定される(TGD 2003, Appendix VI, Table 3 に記載の平均摂餌量 40 g/kg 体重/日に基づく)。これら 2 試験の詳細については、第 4.1.2.8 項「がん原性」を参照されたい。

4.1.2.6.2 ヒトにおける試験

データは、得られていない。

4.1.2.6.3 反復投与毒性についての要約—全身毒性

ptBP に関しては、現行のガイドラインである OECD407(げっ歯類における 28 日間反復経口投与毒性試験)または OECD408(げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験)に準拠した反復投与毒性試験の報告は得られていない。反復投与毒性の評価に利用できる試験は、OECD 反復投与毒性・生殖/発生毒性併合試験(OECD ガイドライン 422)および二世世代生殖試験の 2 件である。親動物における NOAEL は、前者の試験では、被験物質投与群の雌で観察された呼吸窮迫および雄にみられた複数の血液パラメータへの影響に基づいて 60 mg/kg 体重/日とされ、後者の試験では、雌にみられた卵巣および副腎相対重量の減少に基づいて 70 mg/kg 体重/日であると判断された。高用量の ptBP の長期混餌投与においては、雄のラットおよびハムスターで、それぞれ推定 600 mg/kg 体重/日および 1,230 mg/kg 体重/日の用量群で、前胃の過形成が誘発された。これらのがん原性試験では、腎臓および肝臓の相対重量に対する中等度の影響が報告されている。OECD 反復投与毒性・生殖/発生毒性併合試験で報告された呼吸窮迫は、ptBP の強制経口投与時に起こった意図しない気道への投与によるものであった可能性がある。このことは、ptBP を混餌投与した試験では呼吸窮迫の報告がないことから裏付けられる。また、この試験で雄にみられたアルブミン値および白血球数の変化については、その毒性学的意義は曖昧である。上記の理由により、二世世代生殖試験で得られた NOAEL が、最も妥当であると考えられる。

リスクの総合評価にあたっては、二世世代生殖試験において報告された臓器の相対重量に対する影響に基づき、反復投与による全身毒性に関する NOAEL を 70 mg/kg 体重/日とする。

4.1.2.6.4 皮膚の色素脱失—動物における試験

多くの試験で、実験動物の皮膚に対する ptBP の影響として、色素脱失が報告されている。

無作為交配した黒色短毛のイングリッシュモルモット[Robert Kydd 氏(Chelmsford, Mass)より入手、平均体重 675 g]の雌雄の成獣 12 匹を用い、剃毛した背部皮膚の 3×3 cm² の領域に、種々の溶媒に溶解した ptBP 溶液 0.1 mL を 1 日 1 回、最長 3 週間適用した試験(Gellin *et al.*, 1970)では、ptBP を 5 mg または 10 mg 含むアセトン溶液では、皮膚刺激反応が誘発されたが色素脱失は認められなかったのに対し、ptBP 10 mg を含む DMSO 溶液およびプロピレングリコール溶液は、いずれも強い色素脱失作用を示した。

C57 黒色マウスの雄(各群 5 匹ずつ)を用いて色素脱失を検討した試験が、複数報告されている。1 件は経口投与試験で、0.2 mL のオリーブ油で調製した 0.2 M の ptBP(6 mg)を週 3 回、6 ヶ月間投与したところ、大半の被験動物に、びまん性または斑状の色素脱失が認め

られた(Hara and Nakajima, 1969)。また、別の試験では、0.05 mL のオリーブ油で調製した 0.01 M の ptBP(0.075 mg)を週 6 回、7 ヶ月間皮下投与したところ、初回投与から 12 週間後に、やはり色素脱失が認められた(Hara and Uda, 1966; Hara and Nakajima, 1969)。この試験では、黒色被毛の色素脱失が観察され、試験終了時に病理組織学的検査が実施された。この結果、ptBP 投与群で軽度の変化が明らかに認められたのに加え、オリーブ油を投与した対照群においても軽度の変化が観察された。この所見は、皮下組織中に蓄積したオリーブ油による毛乳頭の圧迫が原因であろうと考えられた。ptBP 投与群でみられた変化は、対照群に比べはるかに顕著であり、ptBP の投与部位以外の皮膚にも色素の変化が認められた。ptBP を経口投与した場合、色素の変化は概ね軽度ではあったが、明確な変化が認められた。以上の結果より、ptBP の経口投与による全身毒性に関する LOAEL は、103 mg/kg 体重/日(6 mg×3 日÷7 日÷マウス体重 0.025 kg)と算出された。色素脱失のリスク判定にあたっては、この LOAEL 値を用いることとする。なお、皮下投与に関しては、被験動物に色素脱失が認められた最低用量が 0.075 mg であることから、この値(0.075 mg/日/0.025 kg=3 mg/kg 体重/日)を全身毒性に関する LOAEL とするが、皮下投与はヒトにおける曝露と関連性がないと考えられることから、この LOAEL 値はリスクの総合評価に用いないこととする。

黒色マウスにおける白斑様色素脱失は、ptBP の経口摂取および吸入摂取の両方で報告されている。種々の溶媒を用い複数の濃度条件で皮膚に適用したところ、皮膚の変化は観察されなかったが、改変「Kligman 溶液」(ptBP+ビタミン A 酸+デキサメタゾン)を用いた場合に、明らかな色素脱失が認められた。なお、皮膚または被毛の変化がみられた部位については報告がなく、皮膚刺激性反応および一般状態のいずれに関する情報も示されていない(Forck *et al.*, 1981)。

黒色ウサギ 8 匹に ptBP(7.5 mg/kg ないしは 10 mg/kg)を 1 日 1 回筋肉内投与した試験では、投与開始の 12~24 日後に側腹部および背部の被毛の灰色化がみられたが、野生型の有色モルモット 10 匹に 7.5 mg/kg の ptBP を週 5 日、10 ヶ月間経口投与した試験では、いずれの被験動物にも明確な色素脱失は認められなかった(Malten *et al.*, 1971)。試験動物に色素脱失が認められた最低用量が 7.5 mg/kg であることから、この値を全身毒性の LOAEL とするが、皮下投与[訳注:筋肉内投与と思われる]はヒトにおける曝露と関連性がないと考えられることから、この LOAEL 値はリスクの総合評価に用いないこととする。

雌雄の成熟黒色モルモット(各群 5 匹ずつ、平均体重 675 g)を用い、ptBP を含む種々の化学物質を検討した試験が報告されている(Gellin *et al.*, 1979)。この試験では、DMSO、アセトンおよび親水性軟膏等の種々の溶媒を用い、液体溶媒の場合は 0.01 M~1.0 M、固形の軟膏基剤の場合は 0.1%~10%の濃度で、ptBP 調製物 0.1 mL を、被験動物に適用した。背部の皮膚(3×3 cm²、8 箇所)は週 1 回剃毛し、耳部および乳頭部の皮膚は除毛を行わずに、それらの部位に被験物質を週 5 日、1~6 ヶ月間、種々の濃度(明記されていない)で適用した。

ptBP による明確ではあるが中等度の色素脱失作用が、背部および耳部における均一な色素減少として認められたが、乳頭部には色素脱失はみられなかった。色素脱失の発現がみられたのは、DMSO を媒体とした 0.25 M の ptBP 溶液を背部および耳部に適用した場合は適用の 23 日後であり、10% の ptBP を含む親水軟膏を背部に適用した場合には第 74 日目であった。色素脱失作用が最も強く認められるまでに要した最長期間は、アセトンを媒体とした 1 M の ptBP 溶液を背部に適用した場合の 112 日であった。DMSO のみの適用では、色素脱失は認められなかった。色素脱失が認められた皮膚検体の HE 染色および銀染色による組織学的検査では、表皮の肥厚ならびに真皮の上層および中層における単核組織球性細胞の増加が認められ、メラニンが完全に欠失していた。

他の試験でも、動物において ptBP が皮膚の色素脱失を引き起こすことが報告されている (Zavadskii & Khovanova: 1975)。この試験では、4 匹の黒色モルモットの皮膚に ptBP を 4～5 日間適用し、15 匹を対照群として用いた。この結果、炎症が先行することなく、色素脱失が生じた。色素脱失斑(白色)が皮膚に認められ、被毛の周囲には色素過剰沈着が認められた。白斑は、不可逆性のもも認められ、進行性の傾向および自然に播種する傾向がみられた(詳細は不明)。

4.1.2.6.5 皮膚の色素脱失—ヒトにおける試験

工場内で ptBP を取り扱う作業者に色素脱失が観察されたことが報告されている。

ptBP および ptBP-ホルムアルデヒド樹脂(ptBP-FR)を製造するロシアの工場で、作業員 52 名中 23 名に色素脱失が観察されている (Chumakov *et al.*, 1962)。最初の 3 症例は、ptBP/ptBP-FR に曝露され始めてから 1 年後に発生しており、21 例では左右対称に分布する白斑が認められた。ドイツ(Westfalia にある化学工場)では、ptBP を取り扱う作業員 23 名が、曝露数ヵ月～2 年後に、手および腕の皮膚に色素脱失を発症した (Forck *et al.*, 1981)。一部の患者では、衣服で覆われた部位に左右対称性の色素脱失がみられており、それらは皮膚の直接曝露ではなく、経口または吸入曝露によって生じた可能性が高い。他にも複数の調査で、ptBP への職業曝露による色素脱失が報告されている (Rodermund *et al.*, 1975a, Rodermund and Winkler *et al.*, 1975 (b), Rodermund and Wieland: 1975a, Budde and Stary: 1988, Goldmann and Thiess: 1975, 1976, Ebner *et al.*, 1979, Gebhart *et al.*, 1980, James *et al.*, 1977, Wozniak and Hamm: 1977, Bleehen and Sharquie: 1981)。

これらの調査に基づくと、ptBP は、ヒトにおいて皮膚の色素脱失を誘発すると考えられる。また、この影響は、直接接触のみならず、吸入または経口摂取によっても生じ得ると考えられる。

2つの工場(Derfesa および Givaudan)において、白斑を有する作業員計9名を対象としたptBPのパッチテストが実施されている(Romaguera *et al.*, 1981)。9名中1名は、若い頃から典型的な白斑を呈しており、この疾患の家族歴を有していたため、この検査から除外したが、他の8名の作業員はすべて、ptBPを取り扱うようになった以降のパッチテストで陽性を示した。これらの作業員は、手および前腕に白斑を有し、作業員の一部では、手首、首、襟ぐり線にも白斑がみられた。Derfesa工場の4名では、パッチテストの8~15日後に、これに反応した色素脱失が認められた。Givaudan工場の作業員では、48~96時間後に陽性反応が確認された。

接着剤に含まれるptBP-FRおよび遊離ptBPへの曝露により感作された、5つの靴工場の作業員計246名を対象とした疫学的調査が実施されており、面接、検査およびパッチテスト(2%のptBPおよび1%のptBP-FR)が行われた(Mancuso *et al.*, 1996)。この調査では、工場の組み立て部門で調合や靴の接着に従事していた作業員70名中2名(2.8%)において、手背部および前腕に白斑様色素脱失が認められた。

ほかにも、ptBPまたはptBP-FRのパッチテストを行った調査が実施されているが、これらではいずれも、色素脱失に関して陰性の結果を得ている(James *et al.*, 1977; Takeshi *et al.*, 1977; Bajaj *et al.*, 1990; 1996)。James *et al.*は、製造に従事してptBPに曝露された作業員198名中54名に白斑を認めている。この調査では、白斑の発症は、蒸留工程におけるptBPの気化ないしは成形や包装を担う施設における粉塵に起因する、全身作用によるものであると報告している。なお、ptBPの粉塵中濃度は、10~100 ppmの範囲であった。また、男性54名中20名に対して2%のptBPでパッチテストを行ったところ、全員が陰性を示した。

Takeshi *et al.*は、ptBCとの接触後に職業性白斑を発症し、なおかつptBPとの交差反応も認められたポリエステル樹脂工場の作業員について報告している。この男性患者に0.05%のptBPでパッチテストを行ったところ、パッチテストに対する陽性反応が認められたが(この陽性反応の評価に関する詳細は不明)、色素脱失はみられなかった。なお、これらのデータは、ptBPではなくptBCへの曝露に起因する交差反応に関するデータであるため、リスクの総合評価に有用な追加情報を提供するものではない。

Bajaj *et al.*(1990)は、ビンディ[訳注:インドの女性などが額に施す装飾]に起因する接触性色素脱失の連続症例100例の分析を行った。ビンディに使用する接着剤はptBPを80%含有することが、薄層クロマトグラフィー、赤外分光光度法およびHPLCにより明らかにされた。患者100名中15名に対し、ビンディ接着剤、2%のptBPおよび1%のptBP-FRでパッチテストを行い、正常対照者10名および白斑患者14名に対しては、プラスチックベース[訳注:炭化水素ゲル軟膏基剤]で調製した10%および50%のptBPでパッチテストを行った。パッチテスト後2ヵ月間、これらの患者および対照者を観察した。この結果、ビンディ接

着剤のパッチを貼付した患者 15 名中 5 名で刺激性の陽性反応が認められたが、ptBP または ptBP-FR のパッチを貼付した患者には陽性反応が認められなかった。また、10%の ptBP のパッチを貼付した正常対照者 10 名および白斑患者 14 名のうち、対照者 5 名および白斑患者 6 名が陽性(刺激性)反応を示し、50%の ptBP のパッチでは、対照者 7 名および白斑患者 13 名で陽性(刺激性)反応が認められた。2 ヶ月後の追跡調査では、両群ともにすべてのパッチ貼付部位が正常に回復していた。

Bajaj *et al.*(1996)は、靴皮膚炎患者 19 名を対象とした調査を行った。このうち 5 名に白斑が認められ、他の 6 名には、色素脱失が続発する皮膚炎の既往歴があった。全患者に対して、ワセリンで調製した 2%の ptBP および 1%の ptBP-FR でパッチテストを行ったところ、全員が陰性を示した。

Mathur *et al.*の調査では、色素脱失症例 2 例が、使用したビンディに ptBP が 80%含まれていた可能性があることから、ptBP に関連した色素脱失であったとされている(Mathur *et al.*, 1991)。この症例の女性 2 名はいずれも、市販の接着剤付きビンディを貼付けた部位に色素脱失を生じた既往歴があった。両患者に対し、市販のビンディ、ペースト状接着剤およびエンプラストリン(emplastrin)樹脂のパッチテストを行ったところ、1 名が市販のビンディに対して 2 日後に 1+の陽性反応を示し、ペースト状接着剤に対しては両者ともに 1 日後に 2+の陽性反応を示した。いずれの患者にも全身性疾患は認められず、10 ヶ月後の追跡調査時には、両患者とも色素脱失部位が正常な色に回復していた。

上述のすべての調査において、ヒドロキノンモノメチルエーテル(MBH)(靴およびビンディの接着剤に使用される)等の ptBP と構造的に類似した物質によっても色素脱失反応が生じることが示されている。

ptBP に曝露された 5 名の患者から色素脱失部位の生検試料を得て、電子顕微鏡で検査したところ、5 例中 4 例でメラニン細胞の欠失が認められた(Malten *et al.*, 1971)。残る 1 例の生検試料ではメラニン細胞が確認されたが、検出は困難であった(これらの細胞には、ミトコンドリアの肥大化および多数の空胞が認められ、成熟したメラノソームにみられる密度の濃い色素は見られず、算盤型の色素分布を示すプレメラノソームのみが認められた)。このような不完全なメラニン細胞の周囲の角化細胞には、重大な異常は認められなかった。ptBP に曝露された 10 名の作業員について顕微鏡的評価を行った別の調査では、メラニンおよびメラニン細胞の欠失または減少が観察されている(Ebner *et al.*, 1979; Gebhart *et al.*, 1980)。この調査では、メラニンを含んだ真皮マクロファージが認められており、また、正常な組織との境界部には色素過剰はみられなかった。

Ikeda *et al.*(1978)によるヒトにおける曝露調査[詳細については、ヒトの曝露 27 ページ]記

注:4.1.2.1.2 項と思われる]を参照されたい]によれば、産業曝露で尿中に ptBP が検出されることから、高用量での曝露により色素脱失が起こる可能性があることが示されている。しかし、曝露量および曝露経路に関する情報が提示されていないため、リスクの総合評価においては、この点についてはさらなる検討は行わないこととする。

色素脱失のリスク判定にあたっては、全身毒性の LOAEL である 103 mg/kg 体重/日を用いることとする。

4.1.2.6.6 反復投与毒性についての要約—皮膚の色素脱失

ヒトにおいても動物においても、ptBP による色素脱失に関する複数の試験が報告されているが、ヒトにおけるこれらの試験の大半は、色素脱失ではなく感作性反応に関する結論付けを行っている。これらの試験の結果には矛盾がみられ、科学界では、ヒトにおける試験では異なる溶媒が使用されていたり適切な対照が置かれていなかったりしたことに起因して、偽陽性や偽陰性の結果が得られた可能性があるのではないかと、といった議論がなされている。C57 黒色マウスにおける ptBP の経口投与による全身毒性の LOAEL_{animal} は、103 mg/kg 体重/日 [6 mg × 3 日 ÷ 7 日 ÷ 0.025 kg (マウス体重)] と算出された。色素脱失のリスク判定にあたっては、全身毒性の LOAEL_{animal} である 103 mg/kg/日を用いることとする。

皮下投与に関しては、C57 黒色マウスに色素脱失が認められた最低用量が 0.075 mg であることから、3 mg/kg 体重/日 [0.075 mg/日 ÷ 0.025 kg (マウス体重)] が全身毒性の LOAEL_{animal} とされる。しかし、皮下投与はヒトにおける曝露と関連性がないと考えられることから、この LOAEL 値はリスクの総合評価には用いないこととする。

全体として、ptBP がヒトに色素脱失を起こす可能性を示す十分なエビデンスがあると考えられ、動物における試験がこれを裏付けている。動物における試験では、溶媒として DMSO を用いた場合でもプロピレングリコールを用いた場合でも、10 mg の ptBP によるパッチテストで色素脱失が認められた。ヒトにおいては、50%以上の濃度の ptBP で色素脱失が起こることが報告されている。しかし、いくつかの試験では、2%の ptBP でもヒトに色素脱失が生じることが示されており、1 件の試験では、曝露部位においてメラニン産生能の低下およびメラニン細胞数の減少がみられたことが報告されている。また、誘発物質を皮膚から除去した場合、数ヵ月後には色素脱失は可逆的に回復している。こうしたデータに基づき、滴下により実施したパッチテストでの用量から、ヒトにおける局所毒性の LOAEL が推定される。パッチテストで滴下した 2% ptBP 溶液の容量は 30~50 µL と推定されることから、ヒトにおける局所毒性の LOAEL は、0.0086~0.014 mg/kg [(ptBP 20g/L × 0.000030 L) × 1,000 mg/g / 70 kg (ヒトの体重)]; (ptBP 20g/L × 0.000050 L) × 1,000 mg/g / 70 kg (ヒトの体重)] と推定される。

トの体重]と算出される。この値は、パッチテストにおける滴下量から推算した局所毒性の LOAEL であり、リスクの総合評価においては、検討の対象としない。Ikeda *et al.* (1978) によるヒトにおける曝露調査[詳細については、ヒトの曝露 27 ページ[訳注:4.1.2.1.2 項と思われる]を参照されたい]によれば、産業曝露で尿中に ptBP が検出されることから、高用量での曝露により色素脱失が起こる可能性があることが示されている。しかし、曝露量および曝露経路に関する情報が提示されていないため、この点についてはさらなる検討は行わないこととする。また、Bajaj *et al.* (1996) による別の調査において、EU 以外の熱帯の国々で靴の製造に使用されている接着剤に関連して、靴により色素脱失が起こる可能性が示されているが、この報告は、EU 諸国内では意義に乏しいと考えられる。

色素脱失は刺激性の影響ではないと考えられ、これに基づいて提案できる刺激性の分類区分はない。しかし、Hara and Nakajima (1969) による試験で得られた 103 mg/kg 体重という全身毒性の LOAEL は、リスクの総合評価に用いられる。

4.1.2.6.7 反復投与毒性についての総括—全身毒性

ptBP に関しては、現行のガイドラインである OECD407 または OECD408 に準拠した反復投与毒性試験の報告は得られていない。反復投与毒性の評価に利用できる試験は、OECD ガイドライン 416 に準拠した二世世代生殖試験(Clubb and Jardine, 2006)である。この試験で得られた反復投与による全身毒性の NOAEL は 70 mg/kg/日であり、この値をリスクの総合評価に用いることとする。この NOAEL は、色素脱失を除く、想定され得るすべてのリスクの判定において用いられる。

色素脱失に関しては、ヒトにおける調査が行われているが質が低く、情報も不足していることから、これらの調査をリスクの総合評価に用いることは適切ではない。しかし、C57 黒色マウスに ptBP を単一用量で経口曝露して色素脱失を検討した試験に基づいて、103 mg/kg/日という全身毒性の LOAEL が得られている。色素脱失のリスクの判定にあたっては、この LOAEL 値を用いることとする。

反復投与毒性および色素脱失について 2 つの異なる値を用いる理由は、全身毒性の NOAEL がアルビノ Sprague-Dawley ラットを用いた二世世代試験から得られた値であるという事実に基づいている。この系統のラットを色素脱失の検出に用いることは、不適切である。したがって、色素脱失を示す信頼できるデータおよび情報が得られている試験は、C57 黒色マウスを用いた単一用量経口曝露試験のみであり、この試験で得られた 103 mg/kg/日という全身毒性の LOAEL が採用される。

4.1.2.7 変異原性

4.1.2.7.1 *In vitro* 試験

細菌を用いた試験

ネズミチフス菌 (*S. typhimurium*) の菌株 TA100、TA1535、TA98、および TA1537 ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* 株を用いた細菌復帰突然変異試験 (Ames 試験) では、遺伝子突然変異の誘発は認められていない (SIDS program, 1996)。細菌に対する細胞毒性濃度は、代謝活性化の存在下では 5 株すべてにおいて 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ であったが、代謝活性化の非存在下では、TA100、TA1535、TA1537 株においては 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、WP2 株および TA98 株においては 1,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ であった。この試験は、化学物質の変異原性スクリーニング試験に関するガイドライン (日本) および OECD ガイドライン 471 (471/472) ならびに GLP に準拠して実施された。ptBP の添加量は、TA 株に対しては 0、15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、WP2 株に対しては 0、31.3~1,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ であった。なお、被験物質の純度は、99.9% であった。プレート法で DMSO を溶媒として用い、外因性の代謝活性化系 (ラット肝 S9 mix) の存在下および非存在下で試験を行った。各濃度に 3 プレートずつが用いられ、2 回試行された。この試験では、陽性対照の使用に関する情報は示されていない。

細菌を用いた別の試験では、最高 1,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量まで遺伝毒性作用は認められていない (Dow Project No.: 44/901 未公表, 1992a)。試験株としてネズミチフス菌の菌株 TA1535、TA1537、TA98、および TA100 ならびに大腸菌の WP2 *uvrA* 株を用い、ラット肝代謝活性化系 (S9) の存在下および非存在下で、プレート法により被験物質に曝露させた。用量は 5 段階とし、各用量につき 3 プレートを用い、2 回試行した。1 回目の試行では、ptBP の添加量を 0、1.6、8、40、200、および 1,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし、適切な陽性対照化合物を用いた。2 回目の試行では、添加量を 0、31.25、62.5、125、250、500、および 1,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とした。この試験は、GLP に準拠して実施された。溶媒には DMSO を用いた。代謝活性化系存在下の陽性対照には、TA 1535 株および WP2 *uvrA* 株に対しては 2-アミノアントラセンをそれぞれ 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ および 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、TA 100 株、TA 1537 株および TA 98 株に対してはベンゾ[a]ピレン 5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を用いた。また、代謝活性化系非存在下での陽性対照には、WP2 *uvrA* 株、TA 100 株、TA 1535 株に対しては N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン をそれぞれ 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{plate}$ および 8 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、TA 1537 株に対しては 9-アミノアクリジン 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を、TA 98 株に対しては 4-ニトロキノリン 1-オキシド 0.2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を用いた。この結果、1,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量で、細胞毒性が観察された。いずれの菌株においても、用量または外因性代謝活性化の有無にかかわらず、復帰突然変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。したがって、この試験条件下では、ptBP は変異原性を示さないと判断された。

ptBP は、ネズミチフス菌の菌株 TA1535、TA1537、TA1538、TA98、および TA100、ならびに大腸菌の菌株 WP2 および WP2 *uvrA* を用いた試験で、遺伝毒性を示さなかった。この試験で用いた被験物質の添加量は、代謝活性化の存在下および非存在下とともに、0、125、250、500、1,000、2,000 および 4,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ であった(Dean *et al.*, 1985)。この試験は、1975 年～1985 年に実施され、試行回数は 3 回もしくは 4 回(1980 年まで)であった。この試験には複数の陽性対照物質が使用されたが、どの菌株に何をどのくらいの用量で用いたかに関する詳細は示されていない。使用した陽性対照物質は、エチルメタンサルホン酸(EMS)、メチルメタンサルホン酸(MMS)、シクロホスファミド(CP)、ベンゾ[a]ピレン(B(a)P)、ニュートラルレッド(NR)、アジ化ナトリウム(SA)、7,12-ジメチルベンゾアントラセン(DMBA)、4-ニトロキノリン-N-オキシド(NQO)であった。B(a)P、NQO および DMBA はいずれも DMSO に溶解し、他の陽性対照物質は水溶液として用いた。被験物質の純度は 95%を超えていたと報告されており、溶媒として DMSO が用いられている。

細菌以外の試験

哺乳類細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験で、ptBP は変異原性を示さないことが確認されている(Dow Project No.: 44/902 未公表、1992c)。この試験では、マウスリンパ腫細胞 L5178 TK +/-を用い、S9 mix の存在下および非存在下で、37°C にて 3 時間、ptBP に曝露した。曝露濃度は 5 段階とし、各濃度につき 2 系列培養で行った。濃度範囲は、細胞毒性を検討した予備試験(0、5、10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)の結果より決定し、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で細胞毒性が観察されたことから、0、5、10、20、40 および 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度を用いた。この試験には、陽性対照(S9 mix 非存在下では EMS、S9 mix 存在下では CP)および陰性対照(DMSO)の両対照群を設け、代謝活性化の存在下および非存在下で、37°C にて 3 時間曝露した。陰性対照群における反応は、生存細胞あたりの変異体数が、L5178Y 細胞の TK +/--遺伝子座での正常値である $1\sim 10 \times 10^5$ の範囲をわずかに外れていたが、試験の完全性には影響がないものと考えられる。2 種の陽性対照物質では、いずれも生存細胞あたりの変異頻度に顕著な増加が認められたことから、試験系の妥当性および代謝活性化系の活性が確認された。この試験は、OECD ガイドライン 476、および GLP に準拠して実施された。ptBP は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの曝露濃度においても変異頻度の増加をもたらさなかった。すなわち、この試験条件下では、ptBP は変異原性を示さなかった。

代謝活性化の存在下および非存在下で 0、20、40、60 および 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 3～6 時間 ptBP への曝露を行ったマウスリンパ腫細胞 L5178Y の TK +/--遺伝子座試験では、ptBP は有意な変異原性を示さなかった(Honma *et al.*, 1999)。しかし、0、20、40、60 および 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露時間を 24 時間とした試験では、変異原性が認められた。ただし、変異原性の評価は細胞毒性[通常、相対生存率(RS)が 20%未満]が十分に現れる条件に至るまで

EURAR: P-TERT-BUTYLPHENOL

行われており、24時間の曝露では ptBP 濃度 40 µg/mL における RS がすでに 20%未満であった。また、各試行は、S9 mix の非存在下で、処理群ごとに 1 系列培養で実施されており、OECD TG 476 に準拠していない。mutant frequencies 24時間の曝露後に実際に得られた変異体頻度(MF)は、30 µg/mL で約 100 MF($\times 10^{-6}$)、40 µg/mL で約 150 MF($\times 10^{-6}$)、および 50 µg/mL で約 230 MF($\times 10^{-6}$)であった。実際の濃度は、上述の濃度とは異なっていたと思われる。実際の濃度は Honma *et al.*の論文中(Honma *et al.*, 1999)の figure 1 より読み取ったものであり、上述の曝露濃度と一致していない。

Table 4.35 Summary of ptBP on gene mutation data in vitro

Assay	Strain	Metabolic activation	Cytotoxicity	Dose/concentration of ptBP	Result	Solvent	GLP	Ref.
Bacterial mutation / Ames test	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537	+ / -	+S9 500µg/plate for all TA strains - S9 500µg/plate for TA98	0, 15.6, 31.3, 62.5, 25, 250 and 500 µg/plate for <i>S. typhimurium</i>	Negative	DMSO	NI	SIDS program, 1996
	<i>E. coli</i> WP2P <i>uvrA</i>	+ / -	+S9 500µg/plate for WP2 strains -S9 1000 µg/plate for WP2	0, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 µg/plate for the <i>E. coli</i>	Negative	DMSO		
Bacterial mutation / Ames test	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537;	+ / -	1000 µg/plate	first test: 0, 1.6, 8, 40, 200, 1000 µg/plate second test: 0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/plate	Negative Negative	DMSO	Yes	Dow Project No.: 44/901 unpublished 1992a
	<i>E. coli</i> WP2P <i>uvrA</i>	+ / -						
Bacterial mutation	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538; <i>E. coli</i> WP2, WP2 <i>uvrA</i>	+ / - + / -	NI	0, 125, 250, 500, 1000, 2000 and 4000 µg/plate	Negative	DMSO	NI	Dean <i>et al.</i> , 1985

Assay	Strain	Metabolic activation	Cyto toxicity	Dose/concentration of ptBP	Result	Solvent	GLP	Ref.
Mammalian mutation	Mouse lymphoma L5178Y TK(±)	+ / -	80 µg/ml	Preliminary cytotoxicity test 0, 5, 10, 20, 40, 80 µg/ml Mutagenicity test 0, 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml	Negative	NI	Yes	Dow Project No.: 44/902 unpublished 1992c
	Mouse lymphoma L5178Y TK(±)	+ / -	40 µg/ml for the 24 h study	Preliminary test 0, 20, 40, 60, 80 µg/ml exposure 3-6 h Secondary test 0, 20, 40, 60, 80 µg/ml exposure 24h	Negative	NI	No	Honma <i>et al.</i> , 1999

NI = no information

染色体への影響

OECD TG 473 に準拠し、CHL/IU 細胞を用いて外因性代謝活性化系存在下での ptBP による染色体構造異常の誘発について検討した試験が報告されている (OECD, SIDS program, 1996)。ptBP は、外因性の代謝活性化系の存在下でのみチャイニーズハムスター肺細胞に染色体異常を誘発した。代謝活性化系の有無にかかわらず倍数性(染色体倍化現象)がみられたことが報告されているが、それが高頻度で観察されたのは細胞毒性濃度においてのみであった。

溶媒 : DMSO

陽性対照 : マイトマイシン C、S9 非存在下 ; シクロホスファミド、S9 存在下

試験

- 用量 : -S9(連続処理、24 時間または 48 時間) ; ptBP 0、0.013、0.025、および 0.05 mg/mL
- 用量 : -S9(短時間処理、6 時間) ; ptBP 0、0.02、0.04、0.08 mg/mL

- 用量：+S9(短時間処理、6時間)；ptBP 0、0.013、0.025、0.050 mg/mL

細胞毒性は、連続処理では 0.025 mg/mL で、短時間処理では 0.08 mg/mL で、いずれも代謝活性化系非存在下で認められた。代謝活性化系の存在下では、いずれの用量においても、細胞毒性は認められなかった。

細胞遺伝学的な影響が認められた最低濃度は、(1) S9 非存在下(連続処理)で 0.025 mg/mL(倍数性)、(2) S9 非存在下(短時間処理)で 0.02 mg/mL(倍数性)、(3) S9 存在下(短時間処理)で 0.013 mg/mL(染色体異常誘発性)および 0.025 mg/mL(倍数性)であった。倍数体の出現率は、24 時間後で 7.63%、48 時間後では 93.18%であった。

この試験については、英語で書かれているのは要約のみであり、試験報告書の全文が日本語であったため、これ以上の評価を行うことができなかった。この試験は、OECD ガイドライン 473 および GLP に準拠して実施された。なお、被験物質の純度は 99.9%であったと報告されている。細胞毒性は、ptBP 濃度 0.025 mg /mL(代謝活性化系非存在下、連続処理)および 0.08 mg/mL(代謝活性化系非存在下、短時間処理)において認められた。

OECD 473 に準拠した別の染色体異常試験では、ラットリンパ球を用いて ptBP の染色体異常誘発作用が検討されている(Dow Project No.: 44/903 未公表、1992b)。この試験では、いずれの処理群においても染色体異常が認められなかったことから、この試験条件下では、ptBP は染色体異常誘発性を示さないと判断される。溶媒として DMSO を用い、3 段階の濃度に希釈した被験物質で細胞を処理した(各濃度につき 2 組の試験系)。1 回目の試行で、添加量を 0、15.63、31.25、62.5、125、250、および 500 µg/mL としたところ、125、250 および 500 µg/mL の濃度で部分的または完全な細胞溶解が観察され、評価を行うために必要な分裂中期の細胞が 6 段階の濃度のうち 4 段階以上で十分に得られるという結果にならなかった。1 回目の試行では、代謝活性化系非存在下での 20 時間連続曝露、または代謝活性化系存在下での 4 時間曝露の 2 とおりの処理を行い、その後 16 時間または 26 時間の発現期間を設けた。評価対象濃度は、0、15.63、31.25 および 62.5 µg/mL とした。また、2 回目の試行では、細胞の回収を、処理の 20 時間後および 30 時間後に行った。

陽性対照：

- EMS 500 µg/mL、代謝酵素非存在下
- シクロホスファミド(CP)4.2 µg/mL、S9 存在下
- 試行 I、37°C で 20 時間、ptBP 濃度 0、15.63、31.25、62.5 および 125 µg/mL、適切な陽性対照物質(EMS または CP4.2)± S9 mix；30 時間の時点で、細胞を、1.9、3.75、7.5、15、30 および 60 µg/mL の ptBP に曝露、適切な陽性対照物質(CP4.2)+ S9 mix。125

μg/mL を除くすべての用量で、評価可能な分裂中期細胞が十分に得られた。いずれの処理群にも、ptBP による染色体異常の誘発は認められなかった。

- 試行 II、37°C で 20 時間および 30 時間、ptBP 濃度 0、1.0、1.95、3.9、7.8、15.63、31.25、62.5 および 125 μg/mL、適切な陽性対照物質(EMS)-S9 mix。3.9 μg/mL から 31.25 μg/mL までの 4 用量について、染色体異常を評価した。37°C で 20 時間および 30 時間、ptBP 濃度 0、1.88、3.75、7.5、15.0、30 および 60 μg/mL、適切な陽性対照物質(CP4.2)+S9 mix。20 時間培養群では 3.75 μg/mL から 30 μg/mL までの 4 用量について、30 時間培養群では 7.5 μg/mL について、染色体異常を評価した。いずれの処理群にも、ptBP による染色体異常の誘発は認められなかった。

この試験は、OECD ガイドライン 473 および GLP に準拠して実施された。この試験では、いずれの処理群においても染色体異常の発現頻度の有意な増加が認められなかったことから、この試験条件下では、ptBP は染色体異常誘発性を示さないことが明らかにされた。

Dean *et al.* (1985) の試験では、ptBP による、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) JD1 株における有糸分裂遺伝子変換および培養ラット肝細胞系における染色体構造異常の誘発が検討されている。その結果、ラット肝上皮細胞では染色体異常は認められなかった。また、30°C で 18 時間 ptBP に曝露された出芽酵母 JD1 株においても、外因性の代謝活性化系の有無にかかわらず、有糸分裂組換えは認められなかった。この試験では、ptBP の 5% 溶液を被験物質として用い、静止期における組換えを検討したアッセイと対数期における組換えを検討したアッセイを 1 回ずつ行った。この試験は、EEC Annex V B16 (Commission Directive 84/449/EEC) および GLP に準拠して実施された。

チャイニーズハムスター肺 (CHL/IU) 細胞を用いた試験で、ptBP により、染色体異常および倍数体が誘発されたことが報告されている。この試験では、アセトンまたは DMSO に溶解した 100~1,000 mM (論文中では、濃度範囲 50 mg/mL~500 mg/mL) の ptBP で CHL/IU 細胞を処理した (Kusakabe *et al.*, 2002) [訳注: 本報告は、前述の OECD, SIDS Program, 1996 をまとめ直したもので、データは同一である]。しかし、公表文献には、試験濃度および使用した溶媒が明示されていない。したがって、濃度は、100 mM (15mg/mL) または 50 mg/mL で、水溶液であった可能性もある。ptBP に対する代謝活性化の役割を検討するため、増殖細胞を、S9 mix の存在下および非存在下で、無血清培地中で 6 時間 ptBP 処理した後、さらに血清を加えた新鮮培地中で 18 時間培養した。また、S9 mix の非存在下で 24 時間および 48 時間連続処理する試行も行った。なお、いずれの試行でも、培養系は 2 組ずつ設けられた。この試験は、OECD ガイドライン 473 に準拠して実施された。ptBP は、S9 mix 存在下での短時間処理により染色体構造異常を誘発し、その際、最小有効濃度で強い細胞毒性 (50% 以下) が認められた。また、48 時間連続処理では、93.2% の割合で、倍数体が認められた。

EURAR: P-TERT-BUTYLPHENOL

Table 4.36 Summary of in vitro chromosomal aberrations caused by ptBP

Assay	Strain	Meta bolic activa tion	Positive control	Dose/concent ration of ptBP	Cyto toxicity	Result	Solv ent	GLP	Ref.
Chrom o- somal aberrati on, OECD TG 473	<i>CHL/UI cells</i>	+ / -	Mitomycine C -S9 and Cyclophosp hamide +S9	-S9 (continous treatment)0, 0.013, 0.025 and 0.05 mg ptBP/ml (short term treatment) 0, 0.02, 0.04 and 0.08 mg ptBP/ml +S9 (short term treatment) 0, 0.013, 0.025 and 0.050 mg ptBP/ml	-S9 0.025 mg ptBP/ml at continous treatment and at 0.08 mg ptBP/ml for short-term treatment +S9 No detection of cytotoxicity	positive	DMSO DMSO	Yes	OECD, SIDS program , 1996
Chrom o- somal aberrati on, OECD TG 473	<i>Rat lymphoc ytes</i>	+ / -	EMS -S9 and Cyclophosp hamide +S9	Experiment I 0, 15.63, 31.25, and 65.5 µg ptBP/ml Experiment II 0, 3.9, 7.8, 15.63 and 31.25 µg ptBP/ml	Experiment I Partial or complete haemolysis observed at 125, 250 and 500 µg ptBP/ml. Not possible to evaluate metaphases.	Negative	DMSO	Yes	Dow Project No.: 44/903 unpubli- shed 1992b
Mitotic gene convers ion	<i>Saccaro myces cerevisi ae JD1.</i>	?	NI	NI	NI	Negative	NI	NI NI Yes	Dean <i>et al.</i> , 1985
Structu ral chromo somal damage	<i>Rat liver cell-line</i>	?	NI	NI	NI	Negative	NI		
Mitotic recomb ination Annex V B16	<i>Saccaro myces cerevisi ae JD1.</i>	+ / -	NI	5% solution of ptBP	NI	Negative	NI		

Assay	Strain	Meta bolic activa tion	Positive control	Dose/concent ration of ptBP	Cyto toxicity	Result	Solv ent	GLP	Ref.
Chrom o- somal aberrati on, OECD TG 473	CHL/UI cells	+ / -	NI	100-1000 µM (15 or 50-500 mg ptBP/ml)	yes	positive	DMSO or water	No	Kusakab e et al 2002

4.1.2.7.2 *In vivo* 試験

In vivo における ptBP の遺伝毒性を明らかにするため、OECD 毒性試験ガイドライン 474 に準拠した哺乳類赤血球小核試験(腹腔内投与)が実施されている(厚労省、日本、2005)。この試験の結果、ptBP は *in vivo* では遺伝毒性を示さないと考えられた。この試験では、ptBP を 0.5%メチルセルロース溶液に溶解して用いた。予備試験として行った用量設定試験で、雌雄 5 匹ずつを 1 群として、ptBP を 25、50、100 ないしは 200 mg/kg の用量で投与した。その結果、200 mg/kg 投与群の全例が死亡し、100 mg/kg 投与群の雄 3 匹および雌 4 匹が重度の臨床症状を示して死亡した。この予備試験の結果に基づき、最大耐用量(MTD)は 50 mg/kg であると判断された。先に行った用量設定試験において 100mg/kg の用量で強い毒性がみられたこと、および毒性に雌雄差が認められなかったことから、主試験では、9 週齢の雄の CD-1 マウス(各用量群 5 匹ずつ)に、ptBP を 0、12.5、25 ないしは 50 mg/kg の用量で単回腹腔内投与した。ptBP 投与の 24 時間後および 48 時間後に、骨髓細胞中の多染性赤血球(PCE)を 2,000 個計測し、陽性対照であるシクロホスファミド(CPA)を投与した動物の結果および陰性対照であるメチルセルロース(MC)を投与した動物の結果と比較した。陰性対照群と ptBP 曝露群とで、毒性徴候に有意差は認められなかった。ptBP 曝露群の雄マウスでは、25 mg/kg および 50 mg/kg の用量で自発運動量の低下が観察されたが、いずれの用量群においても、投与 24 時間後および 48 時間後の時点で、小核を有する骨髓細胞の発現率には、増加がみられなかった。この試験で得られたデータには統計学的有意差は認められなかったが、用量の増加に伴い PCE/NCE 比が低下する傾向があることが示された。また、この試験における投与経路と試験用量(MTD に近い用量)の組み合わせを考慮すると、被験物質は標的臓器に到達していたと考えられる。以上の結果(Table 1 を参照のこと：厚労省、日本、2005 年に報告された Hara の試験より転載)より、ptBP は *in vivo* では遺伝毒性を示さないと考えられた。

加えて、同一の検体で染色体異常を検討したところ、マウスの骨髓細胞には、ptBP に誘発された染色体異常または紡錘体の形成[訳注:形成阻害と思われる]は認められなかった。

この結果からも、ptBP は *in vivo* では遺伝毒性を示さないと考えられた。[訳注:Hara の試験では、小核形成のみが評価されており、分裂中期像による染色体異常は直接的に検討されていない。]

Table 1 Results of micronucleus test in male CD-1(ICR) mice after single intraperitoneal injection of *p-tert*-butylphenol

Compound	Dose (mg/kg)	No. of doses	Sampling time (hr)	No. of mice	PCE/ERY ^{a)}		No. of PCE observed	No. of MNPCE	MNPCE/PCE ^{b)}		
					% ± SD	(Min/Max)			% ± SD	(Min/Max)	
<i>p-tert</i> -Butylphenol	0	1	24	5	51.7±3.9	(48.2/57.0)	–	10000	16	–	0.16±0.08 (0.05/0.25)
	12.5	1	24	5	50.1±6.2	(45.5/57.9)	N.S.	10000	6	N.S.	0.06±0.04 (0.00/0.10)
	25	1	24	5	54.8±5.7	(47.4/60.7)	N.S.	10000	12	N.S.	0.12±0.06 (0.05/0.20)
	50	1	24	5	44.3±10.5	(26.0/53.0)	N.S.	10000	9	N.S.	0.09±0.07 (0.00/0.15)
Cyclophosphamide	50	1	24	5	46.6±9.8	(32.4/51.4)	N.S.	10000	195	***	1.95±0.52 (1.25/2.55)
<i>p-tert</i> -Butylphenol	0	1	48	5	55.5±4.2	(51.7/61.7)	–	10000	16	–	0.16±0.07 (0.10/0.25)
	12.5	1	48	5	55.3±6.1	(48.6/62.7)	N.S.	10000	8	N.S.	0.08±0.06 (0.00/0.15)
	25	1	48	5	50.2±3.6	(45.2/54.2)	N.S.	10000	11	N.S.	0.11±0.04 (0.05/0.15)
	50	1	48	5	49.6±10.8	(34.3/63.1)	N.S.	10000	6	N.S.	0.06±0.02 (0.05/0.10)

a) Number of polychromtic erythrocytes / number of erythrocytes observed

b) Number of micronucleated polychromatic erythrocytes / number of polychromatic erythrocytes observed

N.S.:No significant difference from 0 mg/kg, $p \geq 0.05$

***:Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.001$

ptBP の構造異性体(すなわち *o-tert*-ブチルフェノール)を用いた *in vivo* マウス小核試験も報告されている(Condea, 2000)。この試験は、OECD ガイドライン 474 および GLP に準拠して実施された。この試験では、Swiss-CD マウス(各群雌雄 5 匹ずつ)に、250、500、または 1,000 mg/kg を単回強制経口投与した。陰性対照群には溶媒(コーン油)を、陽性対照群の動物にはマイトマイシン C を投与した。これらの動物については、投与 24 時間後に骨髓標本を作製した。ほかに 1 群(雌雄 5 匹ずつ)を設け、1,000 mg/kg を単回投与して、投与 48 時間後に骨髓細胞の標本を作製した。全試験群で被験物質の投与に関連した毒性影響が観察されたが、いずれの試験群においても、小核発現の増加は認められなかった。すなわち、この試験条件下では、*o-tert*-ブチルフェノールは染色体異常を誘発しなかった。

さらに、他のアルキルフェノール(*p-tert*-オクチルフェノール、*p*-ノニルフェノール等)に関するデータも得られているが、いずれも、アルキルフェノールが変異原性を有していないことを示している。これらの知見を踏まえると、ptBP は遺伝毒性を示さないと考えられる。*o-tert*-ブチルフェノールを用いた試験では PCE/NCE 比の変化が観察され、被験物質が標的臓器に到達していたことが示されている(CEPAD EBPP, October 31, 2006)。ノニルフェノールを用いた試験では、PCE/NCE 比には影響がみられなかったが、この試験は最大耐用量に近い用量で腹腔内投与により行われたことから、標的臓器の曝露に至ったものと推察され

る (CEPAD EBPP, October 31, 2006)。これらの付加的なデータもまた、同様に最大耐用量に近い用量で用いられた ptBP がほぼ確実に標的臓器に到達していたとみられることを示している。したがって、ptBP は変異原性を示さないと考えられる。

Table 4.37 Summary of in vivo Micronucleus test on ptBP

Assay	Strain	Metabolic activation	Positive control	Dose/concentration of ptBP	Cyto toxicity	Result	Solvent	GLP	Ref.
Micronucleus test, OECD TG 474	<i>Bone marrow Erythrocyte on CD-1 mice</i>		No information of positive control No information of negative control	Preliminary range finding study 0, 25, 50, 100 and 200 mg ptBP/kg bw. Experiment: 0, 12.5, 25 and 50 mg ptBP/kg.	Based on this preliminary study maximum tolerable dose (MTD) was defined at 50 mg ptBP/kg bw.	Negative	Methylcellulose Methylcellulose	Yes	MHLW, Japan in progress, 2003

4.1.2.7.3 変異原性についての要約

p-tert-ブチルフェノール(ptBP)は、細菌を用いた 3 件の試験で陰性を示した。マウスリンパ腫細胞 L5178Y の TK⁺/-遺伝子座試験では、陰性および陽性の相反する結果が得られているが、この相違は曝露時間の違いによるものであると考えられる。OECD TG 476 および GLP に準拠して実施された 1 件の試験では、陰性の結果を得ている。別の試験でも、3~6 時間の曝露では陰性であったが、24 時間の曝露では変異原性を示すような結果が得られた。

チャイニーズハムスター肺細胞を用いた 2 件[訳注:2 件は同一であり、実際は 1 件]の試験では、外因性代謝活性化の存在下で染色体異常が誘発され、外因性代謝活性化の有無にかかわらず倍数体が誘発されたが、ラットリンパ球を用いた試験では、これらの異常の誘発は認められなかった。

このため、*in vitro* での哺乳類細胞に対する変異原性についての結果を総合的に検討すると、決定的な結論は得られない。

In vivo における ptBP の遺伝毒性を明らかにするために実施された哺乳類赤血球小核試験では、いずれの用量群においても、小核を有する骨髓細胞の発現率に、増加は認められて

いない。

統計学的有意差は認められていないが、用量の増加に伴い PCE/NCE 比が低下する傾向があることが示されている。また、投与経路と試験用量(MTDに近い用量)の組み合わせを考慮すると、被験物質が標的臓器に到達していた可能性は非常に高いと考えられる。

他のアルキルフェノールに関するデータ、および ptBP の変異原性に関する利用可能なデータより、ptBP は、ほぼ確実に変異原性物質ではないと考えられる。

得られたデータに基づくと、ptBP は、変異原性に関する EU の分類基準を満たしておらず、変異原性物質には分類されない。

4.1.2.8 がん原性

ptBP のがん原性を評価するためのデータベースは限られている。

4.1.2.8.1 動物における試験

吸入

試験の報告は、得られていない。

経皮

試験の報告は、得られていない。

経口

標準的な現行の試験ガイドラインに従った試験の報告は、得られていない。

ラット

雄の F344 ラットを用い、MNNG(N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)で前胃および腺胃の発がんをイニシエートし、それに対する ptBP および他の 4 種のフェノール系酸化防止剤の発がんプロモーター作用を検討した試験が報告されている(Hirose *et al.*, 1988)。

この試験では、1群 20 匹のラット(5 週齢)に、150 mg/kg 体重の MNNG を単回胃内投与し、投与の 1 週間後より、ptBP(純度 95%超)1.5% (TGD 2003 appendix VI table 3 に基づくと、推定投与量:600 mg /kg 体重)を混合した基礎飼料(Oriental MF basal powdered diet, Oriental Yeast Co. Tokyo, Japan)、または基礎飼料のみを 51 週間摂食させた。対照群として、MNNG の前投与を行わずに基礎飼料のみを与える群、および MNNG の前投与を行わずに ptBP を含む飼料を与える群を設けた。

MNNG の投与後に ptBP を投与した動物、または MNNG の前投与を行わずに ptBP を投与した動物における最終体重は、MNNG の投与後に基礎飼料のみを与えた動物に比べ、有意に減少していた。しかし、体重 100 g に対する相対重量で表した肝臓および腎臓の重量は、化学物質を投与した動物で、対応する対照群に比べ有意に高値を示した。

Table 4.38 Histological changes in the forestomach

Treatment	No. of rats	No. of rats (%)			
		Hyperplasia	Papilloma	Carcinoma <i>in situ</i>	Squamous cell carcinoma
MNNG → ptBP	20	20 (100%)	19 (95%)	8 (40%)	15 (75%) ^a
MNNG → basal diet	19	19 (100%)	13 (68%)	11 (58%)	5 (26%)
PtBP	15	14 (93%) ^b	1 (7%)	0	0
Basal diet	10	0	0	0	0

Significant different from control group at (^a) P < 0.05, (^b) P < 0.001.

雄の F344 ラットでは、MNNG によるイニシエート後に ptBP を投与することにより、前胃の扁平上皮がんが誘発された[Table 4.40[訳注:Table 4.38 とと思われる]]。また、1 匹のラットで、胃底腺領域に腺がん(5%;有意差なし)の発生が認められた。

MNNG によるイニシエートを行わなかったラットで ptBP の投与により誘発された前胃の過形成は、ptBP の刺激作用によるものと考えられる。

ハムスター

雄の Syrian ゴールデンハムスターを用い、13 種のフェノール化合物について、前胃における増殖性病変の誘発性影響が検討されている(Hirose *et al.*, 1986)。この試験では、1 群 15 匹のハムスター(6 週齢)に、ptBP(純度 95%超)1.5% (TGD 2003 appendix VI table 3 に基づくと、推定投与量:2,300 mg /kg 体重)を混合した基礎飼料(Oriental MF basal powdered diet)を 20 週間摂食させた。対照群には、基礎飼料のみを 20 週間給餌した。

試験終了時、ptBP 投与群の平均体重は、対照群に比べ 5% 低値を示した。肝臓の相対重量

には、ptBP 投与群で、わずかな増加が認められた(統計学的有意差なし)。

ptBP 投与群のハムスターに、白色のケラチン様物質を伴う前胃上皮の肥厚が認められた。組織学的検査において、前胃にみられた過形成を、上皮の厚さにより、軽度(0.1 mm 未満)、中等度(0.1~0.5 mm)、および重度(0.5 mm 超)の 3 型に分類した。ほかに観察された変化は、乳頭腫様病変であり、それらの病変では、上皮がわずかな細胞異型を伴って上向きに突出していたり、または粘膜筋板を貫通して粘膜下層方向へ増殖していたりするのが認められた。

Table 4.39 Histological changes in the forestomach

Treatment	No. of hamsters	No. of hamsters (%)			
		Mild hyperplasia	Moderate hyperplasia	Severe hyperplasia	Papillomatous lesions
PtBP	15	15 (100%) ^a	12 (80%) ^a	11 (73%) ^a	7 (47%)
Basal diet	15	7 (47%)	1 (7%)	0	0

^aSignificant different from control group at P < 0.001.

ptBP により、過形成および乳頭腫様病変が誘発された(Table 4.39)。オートラジオグラフィーでは、前胃における標識率が、ptBP 投与群のハムスターで対照群に比べ高値を示した(P < 0.001)。

4.1.2.8.2 ヒトにおける試験

Aschengrauet *al.*(1998)は、米国マサチューセッツ州において、エストロゲン様化学物質への職業曝露と乳がん発症との関連性を検討するため、地域住民を対象とした症例対照調査を行った。この調査では、乳がんの患者は 1983 年~1986 年に診断を受けた 261 名、対照者は 753 名であった。このうち乳がんの患者 7 名および対照者 40 名が何らかのかたちで ptBP への曝露を受けたことがあり(調整オッズ比 0.5 ; 95%信頼区間 0.2~1.2)、乳がんの患者 2 名および対照者 1 名は ptBP への曝露のみを受けていた(曝露を受けていた乳がんの患者数や対照者数が 3 に満たなかったため、オッズ比は算出せず)。曝露を受けた人の例数が少なく、なおかつ複数の物質への複合曝露があったため、この調査から結論を導くことはできない。

4.1.2.8.3 がん原性についての要約

Hirose *et al.*(1986, 1988)の試験により、ptBP がラットおよびハムスターの前胃に過形成を

誘発することが示されている。ハムスターでは、前胃に乳頭腫様病変も誘発された。また、ラットを用いた 2 段階発がん試験(イニシエーション-プロモーション試験)では、MNNG によるイニシエーション後の ptBP の投与により、前胃の腫瘍が誘発された。しかし、試験期間が短いため(ラットで 1 年未満、ハムスターでは半年未満)、ptBP が単独でがん原性を示す可能性に関して、明白な結論を導き出すことはできない。ptBP による前胃腫瘍誘発のメカニズムは、プロモーター作用である可能性が高いと考えられる。また、明らかな遺伝毒性が認められない化学物質によってげっ歯類の前胃に腫瘍が誘発されても、それはヒトとの関連性はほとんどないものと考えられる(IARC, 2003)。

「カテゴリ 3 のがん原性物質に分類するかがん原性作用に関して分類対象外とするかの区別に関しては、ヒトでの懸念を除外する論拠が重要となる：試験で生じた腫瘍の形成メカニズムが明確となっており、そのプロセスがヒトに外挿され得ないという十分な証拠が得られている場合、当該物質はいかなるカテゴリにも分類すべきではない。」このケースでは、腫瘍が形成された部位が前胃であることおよびそのメカニズムがプロモーター作用である可能性が高いことの双方により、がん原性物質として分類すべきではないと考えられる。

ptBP のがん原性に関して得られた試験の報告はがん原性の評価を行うには不十分であるが、ptBP はほぼ確実に変異原性を有さないことから、この物質ががん原性を示す可能性は低いと考えられる。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 内分泌変調

内分泌かく乱物質は、内分泌系の機能を変化させることにより正常な生物およびその子孫の健康に有害な影響を及ぼす外因性の物質である。*In vitro* 試験は、以降の試験の優先順位を決定し、作用機序を理解するための情報を得る上で有用であると考えられるが、*in vivo* における内分泌かく乱物質の影響を予測するために *in vitro* 試験を用いた場合、偽陰性および偽陽性の結果を生むことがある。このため、*in vivo* 試験に重点をおくべきと考えられる。現在のところ、内分泌かく乱物質の検討に利用できる最も完成度の高い試験は、二世代生殖毒性試験(OECD TG 416)である。

ある種のアルキルフェノールは、内分泌修飾物質として作用すると論じられている。この作用に関しては、より長鎖のアルキルフェノール(すなわち、p-ニルフェノールおよび p-tert-オクチルフェノール)が、複数の *in vitro* および *in vivo* 試験で、最も高い活性を示して

いる。

In vitro 試験

In vitro における ptBP の内分泌活性に関しては、以下に示すスクリーニング試験のデータが得られている。

ptBP およびその他の環境化学物質のエストロゲン性を評価するために、E-screen アッセイによる試験が実施されている (Soto *et al.*, 1992; 1995; 1998)。このアッセイ法では、エストロゲンや外因性エストロゲンがそれらの標的細胞 (MCF-7 細胞) に及ぼす増殖性影響を、エンドポイントとして用いる。この試験では、細胞を、10 μ M の ptBP、その他の環境化学物質および 17 β -エストラジオール (E₂) (濃度は不明) に 6 日間曝露し、相対細胞増殖力価 (Relative proliferative potency; RPP, %) を測定した。RPP は、(最大細胞収率を示す E₂ の最低濃度と、同様の効果を示す ptBP の最低用量との比) $\times 100$ として算出した。この結果、E₂ では 30 pM で最大細胞収率 (相対細胞増殖率; Relative proliferative effect, RPE) を示したのに対し、ptBP では収率 71% を得るために 10 μ M の濃度を必要とした。RPE 値が 100 であることは、被験物質が完全アゴニストであることを意味し、この値が 0 である場合は、被験物質が試験用量ではエストロゲン性を示さないことを意味する。また、この値が中間値である場合は、被験物質が部分的アゴニストであることを意味している。RPP 値は、E₂ で 100% であったのに対し、ptBP では 0.0003% であった。4-ノニルフェノールでは、最大細胞収率 (100%) を得るために必要な最低濃度は 10.0 μ M、RPP は 0.001% であった (Soto *et al.*, 1992; 1998)。また、5-オクチルフェノール [訳注: 4-オクチルフェノールと思われる] では、最大細胞収率 (RPE 100%) を得るために必要な最低濃度は 100 nM、RPP は 0.03% であった (Soto *et al.*, 1995)。著者は、考察の中で、アルキルフェノールの *p*-異性体のみがエストロゲン性を示したと述べている (Soto *et al.*, 1991)。

別の試験でも、E-screen アッセイ法を用いて、ptBP、E₂ およびその他の環境化学物質のエストロゲン性が評価されている (Körner *et al.*, 1998)。この試験では、6 日間培養したヒトエストロゲン受容体陽性 MCF-7 乳がん細胞が用いられ、その増殖の誘発が指標とされた。PtBP については、10 μ M で 4 回アッセイが行われ、各アッセイは 4 組の試験系で行われた。この結果、E₂ では 1×10^{-10} M で最大細胞増殖 (100 %) を示したのに対し、最大細胞増殖 (78%) を示した ptBP 濃度は 1×10^{-5} M であった。これに比べ、4-ノニルフェノールでは、最大細胞収率 (104%) を得るために必要な最低濃度は 1×10^{-6} M であった。

さらに別の試験でも、エストロゲン依存性ヒト乳がん細胞株 MCF-7 を用いて、ptBP のエストロゲン様活性が検討されている (Olsen *et al.*, 2002)。ptBP の試験濃度は、 10^{-11} ~ 10^{-5} M であった。拮抗作用の検討には、10 または 30 μ M の濃度を用いた。この試験により、ptBP

はエストロゲン受容体と結合するが、その親和力は 17 β -エストラジオールの約 1/10,000 であることが示された(結合親和力は、17 β -エストラジオールの 100%に対し、0.01~0.03%)。この試験ではまた、ptBP による細胞増殖の刺激も認められ、10 μ M の ptBP で相対細胞増殖率が最大(7%)となった。これに対し、17 β -エストラジオールでは、100%の相対細胞増殖率を示すために必要な最低濃度は 30 pM であった。さらに、ptBP は、プロゲステロン受容体(PgR)などのエストロゲン応答性のタンパク質およびエストロゲン応答性の分泌タンパク質(pS2)をも誘導することが示された。対照と比較して顕著な PgR の増加(14 倍)が、ptBP では 10 μ M の濃度で、17 β -エストラジオールでは 30 pM の濃度で報告されている。供試された他のフェノール化合物[4-ブロモフェノール(4-BP)、2,4-ジブロモフェノール(2,4-DBP)、2,4,6-トリブロモフェノール(2,4,6-TBP)]では、30 μ M の濃度においても、PgR の誘導は認められなかった。pS2 に関しては、30 pM の濃度の 17 β -エストラジオール(100%)では、細胞質タンパク質 1 mg あたりの pS2 の最高濃度が 3.8~10.53 μ g であったのに対し、対照物質では、細胞質タンパク質 1 mg あたりの pS2 の最高濃度は、0.8~3.59 μ g であった。MCF-7 細胞を 17 β -エストラジオールに曝露したことにより、培地中の pS2 濃度は 3~11 倍に増加した。10 μ M の ptBP によっても、対照物質に比べ 39%というかなりの pS2 誘導が認められたが、4-BP、2,4-DBP、および 2,4,6-TBP は、pS2 濃度に影響を及ぼさなかった。この試験により、ptBP はエストロゲン受容体に対して親和性を示し、MCF-7 細胞の増殖を誘導し、なおかつ PgR および pS2 のようなエストロゲン応答性のタンパク質をも誘導することが示された。しかし、臭素化フェノールでは、エストロゲン受容体(ER)との結合はみられたが、細胞増殖の刺激や PgR または pS2 濃度の上昇は認められなかった。

ptBP はエストロゲン受容体 ER α および ER β に対して弱い結合性を示すことが、明らかにされている(Kuiper *et al.*, 1998)。この試験では、ER α および ER β を用いた競合結合アッセイにより、ptBP およびその他の化学物質のエストロゲン様活性を検討した。試験には、段階希釈した被験物質を用いた。ptBP は、ER のいずれの亜型との結合に対しても 17 β -エストラジオール(E₂)と競合し、同様の選択性および結合力を示した。これは、Jobling *et al.* (1995)の ER α に関する報告とは正反対の結果である。Jobling *et al.*(1995)の試験では、ptBP の濃度に関する情報がなく、結果が報告されているのみであるが、E₂の濃度は 10 nM であったことが示されている。この試験では、ER α および ER β に対する相対結合親和性(RBA)は、E₂で 100 であったのに対し、ptBP では 0.01 未満であった。RBA を比較すると、ビスフェノール A は ptBP と同等であったが、ノニルフェノールの RBA は、ER α に対して 0.05、ER β に対しては 0.09 であった。この試験では、アルキル基の炭素原子数が多い化合物ほど結合親和性が高いことが示されている。

Routledge and Sumpter(1997)の試験では、ヒトエストロゲン受容体を発現し、エストロゲン応答性の増殖を示す出芽酵母の菌株を用い、エストロゲン様活性を検討している。この手

法は、「組み換え酵母スクリーンアッセイ (The recombinant Yeast screen assay)」と呼ばれている。培養期間は7日間、E₂濃度は10 nM～5 pM、ptBP濃度は5 mM～5 pMであった。この結果、ptBPは弱いエストロゲン活性を有することが示された。ヒトERに対する結合力は、ptBPで17β-エストラジオールの約1/1,500,000であったのに比べ、4-ノニルフェノールでは1/30,000であった。

Aschengrauet *al.* (1998)は、外因性エストロゲン(ptBPを含む)への職業曝露の発生率を調べることを目的として、E-screen バイオアッセイを実施した。この試験では、さらに、既知のリスク因子に関する調整を施しながら、外因性エストロゲンへの職業曝露と乳がん発症との関連性を明らかにすることも目的とされた。この試験では、ptBPへの曝露と乳がん発症との関連性は示されなかったが、曝露を受けた被験者の数が少ないデータに基づいているうえ、曝露状況の把握が不十分であることから、この試験の解釈には注意が必要である。

Van den Berg *et al.* (1991)の試験では、競合結合アッセイ法を用い、ptBPと、トランスサイレチン(ビタミンAおよび甲状腺ホルモンの輸送担体)のサイロキシン(T4)結合部位との、直接的な相互作用が解析された。100 μM(この濃度でのみ試験実施)における競合は10%未満であり、ptBPは非常に弱い競合物質であると考えられた。このアッセイ法は、用いられるT4の比放射能が高く、標準的な試験条件下で非標識T4が50%の競合力(IC₅₀)を示すのは4×10⁻⁸ Mであることから、感度の高い手法となっている。

内分泌変調についての要約

これらの試験により、ptBPが、エストロゲン依存性ヒト乳がん細胞株MCF-7の増殖を誘発するのみならず、エストロゲン受容体と結合し、エストロゲン応答性タンパク質をも誘導することが示されたが、親和性は17β-エストラジオールの1/10,000にすぎない。また、E-screenアッセイでは、ptBPの活性は17β-エストラジオールの1/100,000～1/10,000であることが示された。

4.1.2.9.2 生殖能力

動物における試験

ptBPへの曝露が生殖能力に及ぼす影響の評価は、OECD 422に準拠した反復投与毒性・生殖/発生毒性併合スクリーニング試験、およびOECDガイドライン416に準拠して近年実施された二世代生殖毒性試験の結果に基づいている。

GLP に準拠して実施された OECD の反復投与毒性・生殖/発生毒性併合スクリーニング試験 (OECD 422) では、雌雄の Sprague-Dawley ラット (各用量群に雌雄各 13 匹) に、ptBP を 0、20、60 ないしは 200 mg/kg 体重/日の用量で、1 日 1 回、約 6 週間 (雌では妊娠期間および分娩後 4 日間を含める) 強制経口投与した (厚生省、1996)。投与期間は、雄で交配 14 日前から交配 14 日後まで、雌では交配 14 日前から哺育 3 日までとした。媒体として、0.5% メチルセルロース溶液を用いた。

結果：

200 mg/kg 体重/日投与群の F0 世代の雌 1 匹が、分娩 2 日後に死亡した。この雌親の 16 匹の新生仔のうち 5 匹は分娩当日に、残る 11 匹は分娩から 1 日目に死亡した。この雌親の肉眼的剖検で、肺の退縮不全および色調変化 (赤色～黒色) がみられた。組織学的検査では肺にうっ血が認められたが、この所見は、肺への誤投与によるものであると考えられた。また、200 mg/kg 体重/日投与群の複数の雌に、呼吸困難を伴う喘鳴がみられ、おそらく気道の刺激が原因であると考えられた。この所見は、刺激性物質の強制経口投与による 2 次的な影響に関連すると考えられる。黄体数、着床数、産仔数、出産率、生存仔数、出生率、および生存仔出生率については、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。雄では、血漿中アルブミン濃度がわずかに低値を示し、これに伴う血漿タンパクの減少が認められた。また、200 mg/kg 体重/日投与群の雄では、赤血球数および白血球数の有意な減少も報告されている。親動物の病理組織学的検査では、被験物質に関連した形態学的変化は観察されなかった。妊娠中および哺育中の雌ラットでは、呼吸器刺激のほかには、投与に関連した毒性影響は認められなかった。第 4.1.2.6 項 - 「反復投与毒性」に述べたとおり、親世代の動物における全身毒性に関する NOAEL は、60 mg/kg 体重/日であると判断される。また、生殖能力に関する NOAEL は、200 mg/kg 体重/日以上である。なお、この試験は、GLP に準拠して実施された。

ptBP の二世世代生殖試験は、Sprague-Dawley ラットを用い、OECD ガイドライン 416、米国環境保護庁ガイドライン OPPTS 870.3800、ならびに GLP に準拠して実施された (Clubb and Jardine, 2006)。この試験では、0、800、2,500 ないしは 7,500 ppm (約 0、70、200 および 600 mg/kg 体重/日に相当) の用量で、ptBP が混餌投与された。F0 世代には 1 群雌雄各 28 匹を、F1 世代には 1 群雌雄各 24 匹を用いた。試験の結果を以下に示す。

F0 世代：

投与に関連した臨床徴候は、報告されていない。また、F0 世代の交尾行動、受胎能または妊娠期間には、投与による明らかな影響は認められなかった。体重増加量の減少が、試験第 0～16 週にかけて F0 世代の雄では 2,500 ppm 投与群 (対照群の 351 g に対して 324 g) および 7,500 ppm 投与群 (対照群の 351g に対して 252 g) で、F0 世代の雌では 2,500 ppm 投与群 (対照群の 114g に対して 95 g) および 7,500 ppm 投与群 (対照群の 114g に対して 78 g) で、統計学的に有意に認められた。7,500 ppm 投与群の F0 世代の雌で、妊娠期間中の体重が対

照群に比べ低値を示し(対照群の 441g に対して 372 g)、体重増加量は対照群の 138g に対し 108 g であった。7,500 ppm 投与群の哺育期間中の体重は、対照群の 353 g に対して 321 g であった。800 ppm 投与群では、雌雄ともに統計学的に有意な体重変化は認められなかった。7,500 ppm 投与群では統計学的に有意な摂餌量の減少が、F0 世代の雄では投与第 1～16 週に(第 1 週 ; 対照群の 28.7 g/動物/日に対して 20.3 g/動物/日、第 16 週 ; 対照群の 31.6 g/動物/日に対して 28.5 g/動物/日)、F0 世代の雌では投与第 1 週～第 10 週に(第 1 週 ; 対照群の 20.6 g/動物/日に対して 13.7 g/動物/日、第 10 週 ; 対照群の 22.8 g/動物/日に対して 20.0 g/動物/日)認められた。7,500 ppm 投与群の F0 世代の雌における摂餌量は、妊娠期間中は対照群の 33.0 g/動物/日に対して 30.4 g/動物/日、哺育期間中には対照群の 91.6 g/動物/日に対して 75.8 g/動物/日であった。2,500 ppm 投与群では統計学的に有意な摂餌量の減少が、雄で投与第 3 週(対照群の 31.2 g/動物/日に対して 29.3 g/動物/日)および第 14 週(対照群の 31.4 g/動物/日に対して 29.5 g/動物/日)に認められた。雌では、統計学的に有意な摂餌量の減少は、交配前の 10 週中 6 週で認められている(第 1 週;対照群の 20.6 g/動物/日に対して 17.5 g/動物/日、第 10 週;対照群の 22.8 g/動物/日に対して 21.3 g/動物/日)。800 ppm 投与群では、雌雄ともに統計学的に有意な摂餌量の変化は認められなかった。体重を共変数として共分散分析を行った結果、7,500 ppm 投与群の雄で腎臓重量(対照群の 3.96 g に対して 4.29 g)および肝臓重量(対照群の 18.87 g に対して 20.19 g)に統計学的に有意な増加が認められ、雌では副腎重量(対照群の 0.076 g に対して 0.064 g)、卵巣重量(対照群の 0.107 g に対して 0.081 g)および下垂体重量(対照群の 0.012 g に対して 0.011 g)に統計学的に有意な減少が認められた。2,500 ppm 投与群では、雌で、統計学的に有意な重量減少が、副腎(対照群の 0.079 g に対して 0.070 g)および卵巣(対照群の 0.109 g に対して 0.095 g)で認められている。2,500 ppm 投与群の雄、および 800 ppm 投与群の雌雄では、臓器重量の変化は報告されていない。7,500 ppm 投与群の F0 世代の雌で、原始卵胞数の増加(対照群の 102 ± 44 に対して 120 ± 53)およびこれに伴う発育卵胞数の減少(対照群の 96 ± 30 に対して 80 ± 29)が報告されているが、この影響は、F1 世代でより顕著であった。また、7,500 ppm 投与群の F0 世代の雌で、膈上皮の萎縮が統計学的に有意に増加した。同群では 28 匹中 12 匹で同所見がみられ、萎縮の程度は 5 匹で軽微、7 匹で軽度であった。2,500 ppm 投与群でも雌 28 匹中 7 匹に膈上皮の萎縮が認められ、萎縮の程度は 3 匹で軽微、4 匹で軽度であった。さらに、800 ppm 投与群の雌 28 匹中 2 匹、ならびに対照群の 28 匹中 1 匹でも軽微な膈上皮の萎縮がみられた。7,500 ppm 投与群の F0 世代では、発情前期の状態を示す雌の割合が統計学的に有意に増加(対照群の 6 匹に対し 14 匹)し、発情後期の状態を示す雌の割合が減少(対照群の 13 匹に対し 2 匹)した。F0 世代の雄では、精子の運動性、精子数または精子の形態に対する有意な影響はみられなかった。また、800 ppm 投与群では、着床、一腹仔数および一腹仔重量に対する有意な影響は報告されていない。7,500 ppm 投与群では、着床数(対照群の 14.4 ± 3.1 に対して 13.1 ± 2.0)および一腹当たりの生存出生仔数(対照群の 13.1 ± 2.8 に対して 12.2 ± 2.0)のわずかな減少が認められた。同群での一腹仔数は対照群に

比べてわずかに少なく(対照群の 13.4 ± 3.0 に対して 12.3 ± 2.0)、一腹仔重量も対照群に比べ低値を示した(哺育1日目:対照群の 80 ± 12 g に対して 72 ± 14 g、哺育21日目:対照群の 598 ± 79 g に対して 424 ± 102 g)。一腹仔重量の増加にも同様の影響が認められた。また、2,500 ppm 投与群でも、哺育14日目より、仔動物体重および一腹仔重量がわずかに減少した(対照群の 357 ± 52 g に対して 324 ± 83 g)。さらに、7,500 ppm 投与群では、仔動物生存率も低下し、特に哺育1~4日には、6腹でそれぞれ3匹以上の仔動物の死亡を認め、うち2腹では全仔動物が死亡した。

F1世代:

投与に関連した臨床徴候は、報告されていない。また、F1世代の交尾行動、受胎能または妊娠期間には、投与による明らかな影響は認められていない。統計学的に有意な体重増加量の減少が、7,500 ppm 投与群のF1世代の雄で試験第4~22週に(対照群の442 g に対して357 g)、同群の雌で第4~15週(交配前)に(対照群の173 g に対して143 g)報告されている。7,500 ppm 投与群のF0[訳注:F1と思われる]世代の雌では、妊娠期間中の体重が対照群に比べ低値を示した(対照群の411 g に対して320 g)。7,500 ppm 投与群のF1世代の雌では、妊娠期間中の体重増加は、対照群の130 g に対して89 g、また、哺育期間中の体重は、対照群の335 g に対して290 gであった。2,500 ppm 投与群の雄で、統計学的に有意な体重の変化が、投与第4週(対照群の124 g に対して114 g)から第9週(対照群の379 g に対して358 g)に報告されている。2,500 ppm 投与群の雌および800 ppm 投与群の雌雄では、統計学的に有意な体重の変化は認められていない。7,500 ppm 投与群では、統計学的に有意な摂餌量の減少が、F1世代の雄で投与第5~22週に(第5週;対照群の23.6 g/動物/日に対して20.1 g/動物/日、第22週;対照群の32.2 g/動物/日に対して26.0 g/動物/日)、F0[訳注:F1と思われる]世代の雌では第5~15週(交配前)に(第5週;対照群の19.2 g/動物/日に対して17.4 g/動物/日、第15週;対照群の23.7 g/動物/日に対して19.0 g/動物/日)認められた。7,500 ppm 投与群のF1世代の雌における、妊娠期間中の摂餌量は、対照群の30.9 g/動物/日に対して26.2 g/動物/日、哺育期間中の摂餌量は対照群の91.1 g/動物/日に対して69.9 g/動物/日であった。2,500 ppm 投与群の雌で、統計学的に有意な摂餌量の減少が、交配前の投与第13週(対照群の23.1 g/動物/日に対して21.8 g/動物/日)および第15週(対照群の23.7 g/動物/日に対して21.9 g/動物/日)に認められた。2,500 ppm 投与群の雄および800 ppm 投与群の雌雄では、統計学的に有意な摂餌量の変化は認められていない。体重を共変数として共分散分析を行った結果、7,500 ppm 投与群の離乳動物で、脾臓重量の減少が雄(対照群の0.29 g に対して0.26 g)および雌(対照群の0.27 g に対して0.24 g)で認められるなど、臓器重量の変化が示された。より詳細には、7,500 ppm 投与群のF1世代の雌で、副腎(対照群の0.076 g に対して0.059 g)、卵巣(対照群の0.104 g に対して0.075 g)、下垂体(対照群の0.013 g に対して0.011 g)、脳(対照群の1.89 g に対して1.84 g)、腎臓(対照群の2.52 g に対して2.32 g)および子宮(対照群の0.67 g に対して0.48 g)の重量が対照群に比べ統計学的に有意に減少し、肝臓重量(対照群の16.18 g に対して18.47 g)が有意に増加したことが示さ

れている。また、2,500 ppm 投与群でも、F1 世代の雌で、副腎(対照群の 0.076 g に対して 0.068 g)および脳(対照群の 1.89 g に対して 1.84 g)の重量が対照群に比べ統計学的に有意に減少し、肝臓重量(対照群の 16.18 g に対して 17.35 g)が対照群に比べ統計学的に有意に増加したことが、同様の分析により示されている。800 ppm 投与群の雌雄では、臓器重量の変化は報告されていない。7,500 ppm 投与群の F1 世代の雌では、原始卵胞数の増加(対照群の 79 ± 35 に対して 134 ± 55)およびこれに伴う発育卵胞数の減少(対照群の 80 ± 30 に対して 64 ± 13)が報告されている。この影響は、F0 世代に比べ F1 世代でより顕著であった。7,500 ppm 投与群の F1 世代の雌で、膈上皮の萎縮が対照群に比べ統計学的に有意に増加し、24 匹中 14 匹で同所見がみられた。萎縮の程度は 24 匹中 10 匹で軽度、24 匹中 4 匹で軽微であり、F0 世代に比べ重症度の高い例が多くみられた。これより低用量では、膈上皮の萎縮は認められなかった。重症度は、F1 世代の方が F0 世代に比べ増高していた。F1 世代の雄では、精子の運動性、精子数または精子の形態に対する有意な影響は報告されていない。F1 世代では、着床数(対照群の 14.4 ± 1.9 に対して 7,500 ppm 投与群で 11.6 ± 1.3)および生存出生仔数(対照群の 13.5 ± 2.6 に対して 7,500 ppm 投与群で 10.8 ± 1.8)において、F0 世代よりも大きな変化がみられたが、一腹当たりの仔動物については、数は少なかったものの生存率には異常を認めなかった。仔動物の体重は、哺育 1 日目以降、対照群に比べて減少し(対照群の 78 ± 14 g に対して 62 ± 9 g)、哺育 21 日目では、対照群の仔動物の体重より約 25~30%低値を示した(対照群の 554 ± 146 g に対して 395 ± 51 g)。一腹仔重量の増加にも、同様の影響が認められた。7,500 ppm 投与群では、膈開口および包皮分離に、対照群に比べそれぞれ 3 日および 4 日の遅延が認められた。仔動物の雌の膈開口時における体重は、対照群で 120 ± 13 g、7,500 ppm 投与群では 122 ± 11 g であり、仔動物の雄の包皮分離時における体重は、対照群で 220 ± 20 g、7,500 ppm 投与群では 205 ± 20 g であった。包皮分離に対する影響は、仔動物の雄の低体重に関連したものと考えられる。肛門性器間距離および乳頭遺残に対する影響は、報告されていない。

F2 世代：

仔動物の生存率には、影響は認められなかった。7,500 ppm 投与群では、哺育 1 日目に一腹仔数および一腹仔重量にわずかな減少がみられた。仔動物の体重増加は対照群に比べて少なく、哺育 20 日目には対照群より 20%低値を示した。2,500 ppm 投与群では、哺育 14 日目より仔動物の体重が対照群に比べて低値を示し、これに伴って一腹仔重量の増加も低減した。

生殖器官/生殖能力への影響に関する NOAEL は、70 mg/kg 体重/日に相当する 800 ppm と判断された。この NOAEL 値は、2,500 ppm 以上の投与群の F0 および F1 世代において、卵巣の相対重量が統計学的に有意に減少していたこと、ならびに 2,500 ppm 以上の投与群の F0 世代の雌において、膈上皮萎縮の発生率が対照群よりも増加していたことに基づいて設定された。膈上皮萎縮については、7,500 ppm 投与群の F1 世代の雌でも発生率が対照群よりも増加していたことが報告されており、また、その重症度は、F1 世代の方が F0 世

代に比べ増高していた。

4.1.2.9.3 発生毒性

動物における試験

OECD 414 に準拠した発生毒性試験によるデータは、得られていない。しかし、近年実施された二世世代試験および OECD422 に準拠した反復投与毒性・生殖/発生毒性併合試験から、データが得られている。

OECD422 に準拠した反復投与毒性・生殖/発生毒性併合試験の結果により、ptBP は、試験した用量(0、20、60 および 200 mg/kg 体重/日)では、胎仔毒性および催奇形性を示さないことが示されている。仔動物の体重測定および肉眼による形態学的検査では、ptBP による影響は認められなかった。また、哺育 4 日目における仔動物の生存率には、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。しかし、200 mg/kg 体重/日投与群の F0 世代の雌 1 匹が、分娩 2 日後に死亡し、その雌親の仔動物 16 匹のうち 5 匹が分娩当日に、残る 11 匹は分娩 1 日目に死亡した。分娩当日に死亡した新生仔には、形態学的異常は認められていない。また、分娩後 4 日目に剖検された新生仔には、いかなる異常も観察されなかった。その雌親の肉眼的剖検では、肺の退縮不全および色調変化(赤色～黒色)が観察され、組織学的検査では肺のうっ血が認められている。

しかし、これは、肺への誤投与によるものと考えられた。全体として、仔動物には投与に関連した影響は認められず、発生毒性に関する NOAEL は 200 mg/kg 体重/日以上であると判断された。また、母体毒性に関する NOAEL は、200 mg/kg 体重/日投与群の複数の雌に呼吸困難を伴う喘鳴が観察されたことに基づき、60 mg/kg 体重/日と判断された。しかし、この所見は、気道の刺激により生じた可能性が高く、刺激性物質の強制経口投与による 2 次的な影響に関連すると考えられる。この試験の詳細については、第 4.1.2.9.2 「生殖能力」の項を参照されたい。

ptBP の二世世代生殖試験は、Sprague-Dawley ラットを用い、OECD ガイドライン 416 および米国 EPA ガイドライン OPPTS 870.3800 に準拠して実施された(Clubb and Jardine, 2006)。この試験では、0、800、2,500 および 7,500 ppm(約 0、70、200 および 600 mg/kg 体重/日に相当)の用量で、ptBP が混餌投与された。F0 世代には 1 群雌雄各 28 匹を、F1 世代には 1 群雌雄各 24 匹を用いた。この試験の詳細については、第 4.1.2.9.2 「生殖能力」の項を参照されたい。発生毒性に関連する結果は、以下のとおりである。

F0 世代：

投与に関連した臨床徴候は、報告されていない。体重増加量の減少が、F0 世代の雌において、2,500 ppm 投与群(対照群の 114 g に対して 95 g)および 7,500 ppm 投与群(対照群の 114 g に対して 78 g)で、統計学的に有意に認められた。7,500 ppm 投与群の F0 世代の雌で、妊娠期間中の体重が対照群に比べ低値を示し(対照群の 441 g に対して 372 g)、体重増加量は対照群の 138 g に対し 108 g であった。7,500 ppm 投与群の哺育期間中の体重は、対照群の 353 g に対して 321 g であった。800 ppm 投与群の雌では、統計学的に有意な体重変化は認められなかった。7,500 ppm 投与群の F0 世代の雌では、統計学的に有意な摂餌量の減少が、交配前の投与第 1~10 週に(第 1 週;対照群の 20.6 g/動物/日に対して 13.7 g/動物/日、第 10 週;対照群の 22.8 g/動物/日に対して 20.0 g/動物/日)認められた。7,500 ppm 投与群の F0 世代の雌における、妊娠期間中の摂餌量は、対照群の 33.0 g/動物/日に対して 30.4 g/動物/日、哺育期間中の摂餌量は、対照群の 91.6 g/動物/日に対して 75.8 g/動物/日であった。雌では[訳注:4.1.2.9.2 項の記載から 2,500 ppm 投与群の雌と思われる]、統計学的に有意な摂餌量の減少は、交配前の 10 週中 6 週で認められている(第 1 週;対照群の 20.6 g/動物/日に対して 17.5 g/動物/日、第 10 週 ; 対照群の 22.8 g/動物/日に対して 21.3 g/動物/日)。800 ppm 投与群の雌では、統計学的に有意な摂餌量の変化は認められなかった。7,500 ppm 投与群では、対照群に比べ一腹仔重量の減少が認められた(哺育 1 日目:対照群の 80 ± 12 g に対して 72 ± 14 g、哺育 21 日目:対照群の 598 ± 79 g に対して 424 ± 102 g)。一腹仔重量の増加にも同様の影響が認められた。また、2,500 ppm 投与群でも、哺育 14 日目より、仔動物体重および一腹仔重量がわずかに減少した(対照群の 357 ± 52 g に対して 324 ± 83 g)。さらに、7,500 ppm 投与群では、仔動物生存率も低下し、特に哺育 1~4 日には、6 腹でそれぞれ 3 匹以上の仔動物の死亡を認め、うち 2 腹では全仔動物が死亡した。

F1 世代 :

投与に関連した臨床徴候は、報告されていない。7,500 ppm 投与群の F1 世代の雌で、第 4~15 週(交配前)に、統計学的に有意な体重減少が認められた(対照群の 173 g に対して 143 g)。7,500 ppm 投与群の F0[訳注 : F1 とと思われる]世代の雌では、妊娠期間中の体重が対照群に比べ低値を示した(対照群の 411 g に対して 320 g)。7,500 ppm 投与群の F1 世代の雌では、妊娠期間中の体重増加は、対照群の 130 g に対して 89 g、また、哺育期間中の体重は、対照群の 335 g に対して 290 g であった。7,500 ppm 投与群の F0[訳注 : F1 とと思われる]世代の雌で、統計学的に有意な摂餌量の減少が、投与第 5~15 週(交配前)に(第 5 週;対照群の 19.2 g/動物/日に対して 17.4 g/動物/日、第 15 週;対照群の 23.7 g/動物/日に対して 19.0 g/動物/日)認められた。7,500 ppm 投与群の F1 世代の雌における、妊娠期間中の摂餌量は、対照群の 30.9 g/動物/日に対して 26.2 g/動物/日、哺育期間中の摂餌量は対照群の 91.1 g/動物/日に対して 69.9 g/動物/日であった。2,500 ppm 投与群の雌で、統計学的に有意な摂餌量の減少が、交配前の投与第 13 週(対照群の 23.1 g/動物/日に対して 21.8 g/動物/日)および第 15 週(対照群の 23.7 g/動物/日に対して 21.9 g/動物/日)に認められた。7,500 ppm 投与群では、仔動物の体重が、哺育 1 日目以降、対照群に比べて減少し(対照群の 78 ± 14 g に対して 62

± 9 g)、哺育 21 日目では、対照群の仔動物の体重より約 25~30%低値を示した(対照群の 554 ± 146 g に対して 395 ± 51 g)。一腹仔重量の増加にも、同様の影響が認められた。7,500 ppm 投与群では、膣開口および包皮分離に、対照群に比べそれぞれ 3 日および 4 日の遅延が認められた。仔動物の雌の膣開口時における体重は、対照群で 120 ± 13 g、7,500 ppm 投与群では 122 ± 11 g であり、仔動物の雄の包皮分離時における体重は、対照群で 220 ± 20 g、7,500 ppm 投与群では 205 ± 20 g であった。包皮分離に対する影響は、仔動物の雄の低体重に関連すると考えられる。肛門性器間距離および乳頭遺残に対する影響は、報告されていない。

F2 世代：

仔動物の生存率には、影響は認められなかった。7,500 ppm 投与群では、哺育 1 日目に一腹仔数および一腹仔重量にわずかな減少がみられた。仔動物の体重増加は対照群に比べて少なく、哺育 20 日目には対照群より 20%低値を示した。2,500 ppm 投与群では、哺育 14 日目より仔動物の体重が対照群に比べて低値を示し、これに伴って一腹仔重量の増加も低減した。

発生毒性に関する NOAEL は、70 mg/kg 体重/日に相当する 800 ppm と判断された。この値を、リスクの総合評価に用いることとする。仔動物への影響に関するこの NOAEL 値は、2,500 ppm 以上の投与群の F1 世代および F2 世代で哺育 14 日目以降にみられた仔動物体重および一腹仔重量の減少に基づいて設定された。この用量では、妊娠期間中または哺育期間中の雌親の体重には、統計学的に有意な減少は認められていない。母体毒性に関する NOAEL は、2,500 ppm 投与群の F0 世代の雌で試験第 1~16 週に観察された統計学的に有意な体重増加量の減少、ならびに交配前に F0 世代および F1 世代の雌にみられた統計学的に有意な摂餌量の減少に基づく、800 ppm である。2,500 ppm 投与群においては、卵巣重量および副腎重量の統計学的に有意な減少も、報告されている。

Haavistoet *al.* (2003) の試験では、Sprague-Dawley ラットを用い、出生前の精巣におけるテストステロンサージに対する ptBP、ptOP およびジエチルスチルベストロール(DES)の影響が、胎齢 19.5 日に評価されている。胎齢 13.5、15.5 および 17.5 日に、雌親に対し、ptBP (雌親 13 匹)を 1.0、10 ないしは 100 mg/kg 体重の用量で、または ptOP(雌親 25 匹)を 0.1、1.0、10 ないしは 100 mg/kg 体重の用量で皮下投与した。この ptBP または ptOP への子宮内曝露では、精巣のテストステロン含有量の減少は認められなかった。一方 DES への曝露(雌親 18 匹に 0.01、0.1 または 0.2 mg/kg 体重を投与)により、テストステロンの含有量および分泌が有意に減少した。対照群には、9 匹の雌親を用いた。アルキルフェノールへの子宮内曝露は、胎仔の体重増加に影響を及ぼさなかった。テストステロンサージの変化に関しては、ptBP の NOAEL は、試験した最高用量である 100 mg/kg 以上であった。この *in vivo* での結果をさらに検討するため、胎齢 19.5 日の無処置の精巣を取り出して組織培養を行い、被験物質との 3 時間の培養期間中および培養期間後に、テストステロンおよびプロ

ゲステロンの基礎分泌量を測定した。この結果、ptBP(100 mg/L)およびptOP(10、100 および 500 mg/L)で、テストステロンおよびプロゲステロンの分泌量が有意に増加し、最高 7 倍の値を示した。一方、DES(100 mg/L)では、テストステロンの分泌量には変化がなかったが、プロゲステロンの分泌量が 2 倍に増加した。しかし、100 mg/L の ptBP の存在下での培養では、分泌または漏出したテストステロンの量は有意に増加したが、その量と精巣内のテストステロン含有量との間には相関は認められなかった。分泌または漏出したテストステロン量については、電子顕微鏡レベルで観察された組織の損傷との間に相関が認められた。500 mg/L の ptBP では、テストステロンの分泌量が対照値まで減少したが、プロゲステロンの分泌量は 1.9 倍の高値を維持した。電子顕微鏡レベルでは、ptBP で処理した場合および ptOP で処理した場合の両方で、ライディッヒ細胞における重度の細胞膜構造変化および重度の脂肪滴変性が引き起こされた。DES で処理した精巣では、脂肪滴周囲の膜小胞形成およびミトコンドリアの多形性の増高が認められている。著者は、DES ではテストステロン含有量の有意な減少が引き起こされたが、これと比較すると、アルキルフェノールへの子宮内曝露が出生前ラットの精巣におけるテストステロン産生に及ぼす影響は、より軽度な減少にとどまり、逆に増加となる場合もあると結論づけている。報告されている組織の損傷は、ptBP への曝露に関連すると考えられるが、この損傷は、*in vitro* での曝露の場合に観察された影響である。子宮内曝露の場合にはテストステロンサージへの影響は報告されていないこともあり、*in vitro* で報告されたこの影響は、付加的な情報であるとみなされる。

4.1.2.9.4 生殖毒性についての要約

有用なデータは、近年実施された OECD416 に準拠した二世代生殖試験および OECD422 に準拠した反復投与毒性・生殖/発生毒性併合試験から得られている。二世代生殖試験では、ラットに 0、800、2,500 ないしは 7,500 ppm(約 0、70、200 および 600 mg/kg 体重/日に相当)の用量で、ptBP を混餌投与した。報告された結果は、以下のとおりである。2,500 ppm 以上の用量では、交配前の F0 世代および F1 世代の動物に、統計学的に有意な体重増加量の減少が認められた。7,500 ppm 投与群では、妊娠期間中および哺育期間中に、統計学的に有意な体重増加量の減少が認められた。2,500 ppm 以上の用量では、交配前の F0 世代および F1 世代の動物で、統計学的に有意な摂餌量の減少も認められた。7,500 ppm 投与群では、妊娠期間中および哺育期間中に、統計学的に有意な摂餌量の減少が認められた。7,500 ppm までの用量では、交尾行動、受胎能または妊娠期間には、投与による明らかな影響は認められなかった。しかし、7,500 ppm 投与群では、着床数、生存出生仔数および仔動物の生存率に、わずかな減少が認められた。また、2,500 ppm 以上の投与群の F1 および F2 世代では、一腹仔数が低値であったことに加えて、哺育 14 日以降に仔動物体重および一腹仔

EURAR: P-TERT-BUTYLPHENOL

重量の減少も認められた。仔動物生存率も低下し、特に哺育 1~4 日目には、6 腹でそれぞれ 3 匹以上の仔動物の死亡を認め、うち 2 腹では全仔動物が死亡した[訳注:F0 世代の 7,500 ppm 投与群において]。F1 世代では 7,500 ppm 投与群において、膈開口および包皮分離の遅延も認められた。F0 世代および F1 世代の雌では、2,500 ppm 以上の投与群において、膈上皮萎縮の顕著な増加が報告されている。膈上皮萎縮の重症度は、F1 世代の方が、F0 世代に比べて増高していた。F0 世代および F1 世代の雌では、7,500 ppm 投与群において、原始卵胞数の増加、およびこれに伴う発育卵胞数の減少が報告されている。この影響は、F1 世代でより顕著に認められた。統計学的に有意な卵巣重量の減少が、F0 世代では 2,500 ppm 以上の用量でみられたが、F1 世代では 7,500 ppm の用量でのみ認められた。この二世代試験で得られた生殖および発生への影響に関する NOAEL は、800 ppm (70 mg/kg 体重/日に相当)である。

反復投与毒性・生殖/発生毒性併合試験(OECD422)の結果により、ptBP は、試験を行った用量(0、20、60 および 200 mg/kg 体重/日)では、生殖能力に影響を及ぼすことはなく、胎仔毒性や催奇形性を誘発しないことが示された。この試験で得られた生殖能力および発生毒性に関する NOAEL は、200 mg/kg 体重/日以上であった。

In vitro 試験において、ptBP が弱いエストロゲン活性を有することが示されている。なお、ptBP の抗アンドロゲン活性の有無については、明らかにされていない。

二世代生殖試験で得られた 800 ppm (70 mg/kg 体重/日に相当)という NOAEL 値を、生殖能力および発生に対する影響に関するリスク判定に用いることとする。