

EURAR BIS(HYDROXYLAMMONIUM)SULFATE

部分翻訳

**European Union
Risk Assessment Report
BIS(HYDROXYLAMMONIUM)SULFATE**

CAS No: 10039-54-0

07 April 2008

欧州連合

リスク評価書(2008年4月7日最終承認版)

硫酸ビス(ヒドロキシアンモニウム)

BIS(HYDROXYLAMMONIUM)SULFATE

CAS No: 10039-54-0

EINECS No: 233-118-8

RISK ASSESSMENT

07 April 2008

Germany

FINAL APPROVED VERSION

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2015年2月

本部分翻訳文書は、Bis(hydroxylammonium)sulfate (CAS No: 10039-54-0)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://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/information-from-existing-substances-regulation>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

硫酸ビス(ヒドロキシアニモニウム) (BHAS, 同義語: 硫酸ヒドロキシルアミン) に関しては、毒性学的評価項目のいくつかについては、わずかなデータしか得られていない。そのため、塩酸ヒドロキシルアミン(CAS No. 5470-11-1)に関する情報も考慮対象とした。塩酸ヒドロキシルアミンに関する試験の結果から類推して BHAS の毒性評価を行うことは、BHAS がヒドロキシアミンと硫酸の固体塩であり、一方、塩酸ヒドロキシルアミン($[\text{HO-NH}_3^+]\text{Cl}^-$) がヒドロキシルアミンと塩酸の結晶塩であることから、妥当であると判断される。

BHAS と類推のために用いた塩酸ヒドロキシルアミン(H_4NOCl)の物理化学的性質について、主要な項目を Table 4.4 に示した。これらの化学物質は、両方とも 120°C を超える温度では分解してしまうため、融点のデータは得られない。塩酸ヒドロキシルアミンに関するデータは、ドイツ化学工業協会 (Berufsgenossenschaft der Chemischen Industrie: BG Chemie, 2000) より入手した。

Table 4.4: Selected physico-chemical properties of BHAS and hydroxylamine hydrochloride (H_4NOCl)

	BHAS	H_4NOCl
Molecular weight (g/mol)	164.1	69.5
Water solubility (g/l, 20°C)	587	466
Relative density (at 20°C)	1.883	1.67

両化合物とも、水性媒体中では、ヒドロキシアニモニウムイオンと対応する陰イオンへと、完全に解離する。ヒドロキシルアミン部分が、両化合物が毒性化学種であることを物語っている(すなわち、この部分が毒性作用を担っている)。したがって、両化合物とも、ヒトの健康に対する影響に関しては、同じ R 警句を用いた分類がなされる。

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

BHAS の吸収、分布または排出に関する試験データは、得られていない。吸入による取り込みに関するデータは、全く見当たらない。血液への毒性影響が、ラットやウサギおよびネコへ経口投与もしくは経皮適用した場合に認められていることから、吸収が起こることが示されている。

4.1.2.1.1 動物における試験

In vivo 試験

吸入

吸入による取り込みに関するデータは得られていない。だが、BG Chemie(2000)には、ヒドロキシルアミンとその塩類は、吸入されて体内に入ると、吸収され得ると述べられている。

経皮

ラットやウサギの皮膚に局所適用した場合(閉塞条件 24 時間)、BHAS の吸収が起こる。このことは、ウサギの赤血球中にメトヘモグロビンが生成し、ハイツ小体が出現することにより証明されている(Derelanko et al., 1987)。経皮吸収に関する定量的データは得られていない。

経口

5 匹のラット(系統の記載無し)に、250 mg/kg の BHAS を、水溶液として強制経口投与したところ、チアノーゼやメトヘモグロビン生成が起こり、吸収があったことが示された(英国インペリアル・ケミカル・インダストリーズ社:Imperial Chemical Industries: ICI, 1984, BG Chemie 中に引用)。雌雄 3 匹ずつのネコに、200 mg/kg の BHAS を、2%水溶液として強制経口投与したところ、メトヘモグロビンが生成され、やはり吸収があったことが示された(ドイツ ビー・エー・エス・エフ社:Badische Anilin- und Soda-Fabrik: BASF, 1981)。これら 2 件の試験報告には、経口吸収に関する定量的データは提示されていない。

Saul and Archer(1984)は、*in vivo* 試験において、ヒドロキシルアミンがラットの体内で部分的に硝酸塩に酸化されることを示している。この試験では、20 μmol の ^{15}N -塩酸ヒドロキシルアミンが、ラットに 5 日間強制経口投与された。 ^{15}N -ヒドロキシルアミンは、その 4.7% が、ラットの体内で ^{15}N -硝酸塩へと酸化された。余剰となった ^{15}N -硝酸塩のほとんどは、4

EURAR BIS(HYDROXYLAMMONIUM)SULFATE

日間の尿中に検出された。アロクロール 1254 をラットに注射しても、体内での硝酸塩生成に大きく影響することはなかった。

In vitro 試験

様々な動物種を用いた比較試験により、哺乳類や鳥類の肝臓のミトコンドリア中にヒドロキシルアミン還元酵素が存在し、その活性はマウスやラットにおいて最も高いことが示されている。ヒドロキシルアミン還元酵素は、ヒドロキシルアミンをアンモニアに還元する (Bernheim 1972)。ラットでは、その活性は、再生肝や非常に幼若な個体では低く、加齢とともに上昇し、成体では、雄よりも雌の方が比活性が高い。ブタの肝臓からは、非常に活性の高いミトコンドリア調製物が得られるが、ネコやウサギの肝臓における活性は非常に低い。ラットやネコの腎臓には、この酵素がいくらか含まれているが、脳や血清中では活性が示されていない。ヒト由来の調製物での試験は実施されていない。

イヌの肝臓や腎臓のホモジネートを用いた *in vitro* 試験において、ヒドロキシルアミンは、グルタミン合成酵素、グルタミンナーゼ、グルタミン酸脱水素酵素、および各種グルタミン酸トランスアミナーゼの活性を阻害した (Valdiguie et al. 1965)。

Stolze and Nohl (1989) は、ウシの酸化ヘモグロビンを用い、ヒドロキシルアミンがメトヘモグロビンを生成させる反応過程を、*in vitro* で検討した。電子スピン共鳴 (ESR) 分光により、異なる 4 種類の常磁性中間体が検出された。第 1 段階の反応は、ヒドロニトロキシドラジカルとメトヘモグロビンの生成と思われる。第 2 段階は、当該ニトロキシドラジカルの急速な消失である。この主経路により、窒素ガスと水が生じると考えられる。著者は、第 3 段階において、メトヘモグロビンが過剰量のヒドロキシルアミンと反応し、メトヘモグロビン-ヒドロキシルアミン付加体を形成すると推測している。この複合体は、その後ゆっくりと酸化され、ヘモグロビン-一酸化窒素複合体となると考えられる。

4.1.2.1.2 ヒトにおける試験

In vivo 試験

BHAS のトキシコキネティクスに関するヒトのデータは、得られていない。しかし、経皮曝露後に見られるアレルギー反応から、この化合物は、ヒトの皮膚に適用されると吸収されると結論付けられる。

吸入

データは得られていない。

経皮

BHAS の 0.05% 水溶液を皮膚に閉塞適用したところ(週 3 日、1 日 24 時間で 3 週間)、後になってアレルギー反応が観察されたことから、経皮吸収が起こることが示された(Griffith and Buehler, 1977)。BHAS の皮膚からの吸収に関する定量的なデータは、この試験からは得られない。

経口

データは得られていない。

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

BHAS の吸収、分布または排出に関する毒物動態学的試験のデータは、得られていない。*In vitro* 試験から得られたデータは、わずかだけである。ヒドロキシルアミンは、細胞代謝の際に、中間体として生成される。ヒドロキシルアミン還元酵素は、マウス、ラットおよびブタの肝臓のミトコンドリア中に検出されている。その活性は、年齢によって異なる様である。ヒドロキシルアミンの一部は代謝的酸化を受けて硝酸塩になることが、ラットを用いた *in vivo* 試験の報告の中で記載されている。

リスクの総合評価に際し、経口および吸入による取り込みに関しては、吸収率を 100% (デフォルト)とすることとなる。

経皮経路に関するデータは、得られていない。したがって、経皮吸収に関して、デフォルト値を適用すべきである。BHAS の物理化学的性質(分子量: 164 g/mol; log Pow 値: -3.6; 水溶性: 587000 mg/L)に基づくと、この化合物の脂質親和性は低いと考えられる。このことから、皮膚を介しての吸収は少ないという結論が導かれる。また、この化合物は、水溶液中では第四級アンモニウムイオンを形成し、経皮吸収を妨げると考えられる。したがって、技術指針書(technical guidance document: TGD)に基づき、デフォルト値として 10% が導出される。試験データによれば、ラットやウサギの皮膚上に適用した後、ウサギの赤血球中にメトヘモグロビンやハイツ小体が形成されており、吸収が起こることが示唆されている。動物データでは、被験物質への曝露時間に依存して、中等度から重度の刺激症状が生じることが示されており、この化合物が、その高い親水性にもかかわらず、かなりの程度経皮

吸収され得ると解釈される。職業的経皮曝露は、ほとんどの場合、非閉塞条件下で起こると思われる(4.1.1.2 項参照)ことを考慮すると、10%という吸収率は、経皮曝露によるリスク評価という目的に適合しているとみなせる。

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

BHAS の吸入 LC₅₀ を求めることを目的として実施された試験の情報は得られておらず、この化合物を吸入した後のメトヘモグロビン形成に関する情報も得られていない。BHAS のエアロゾルを用いた試験の情報も得られていない。ラットを用いた吸入リスク試験の報告が2件得られており、飽和蒸気(20°C で飽和)を吸入させても、ラットに重度の毒性影響を及ぼさなかったことが示されている。しかし、BHAS の物理化学的性質(室温で固体であり、塩の性質を有する)から、この化合物の蒸気圧は非常に低いことが予想され、空气中で飽和状態となった BHAS の濃度も非常に低いと考えられる。したがって、報告が得られた2件の吸入試験で採用された方法によって、有効かつ毒性学的に意義のある BHAS 濃度が得られたのかどうかは疑問である。

一方の試験では、化学的に純粋な BHAS から飽和蒸気を得るために、20°C の温度で 5 cm の被験物質層への通気を行った。この様にして得た蒸気を、12 匹のラットに 8 時間吸入させた(それ以上の詳細な記述無し)。ラットに死亡例は無く、臨床症状も認められなかった。剖検は実施されなかった(BASF, 1969)。

他方の試験では、BHAS(純度 99.5%)の飽和蒸気にラットを 7 時間曝露したところ、12/12 匹が生残した。この試験では、飽和蒸気を得るために、20°C の温度で 5 cm の被験物質層へ、1 時間当たり 200 L の通気を行った(Smyth et al., 1962 の方法)。この様にして得た蒸気を、1 匹用の吸入チャンバーに流し、3、10 ないしは 30 分、または、1、3 ないしは 7 時間の曝露を実施した。全てのラットが、14 日間の観察期間を生残した。臨床症状は、何も認められなかった。剖検によっても、変化は何も検出されなかった(BASF, 1980a)。

経皮

BHAS の急性経皮毒性は、ラットとウサギでは相違している。また、急性経皮毒性は、BHAS を閉塞適用するために用いた包帯の種類によっても異なってくる。

ラットを用いたある試験では、経皮 LD₅₀ は 500 mg/kg よりも高いという結果が得られた。この試験では、雌ラットに BHAS (純度 98%超) を水で湿らせて単回適用し、24 時間曝露を行った。ラットの胴体をポリエチレンの包帯で包み、被験物質と皮膚との接触を保った。動物の 1 群には、被験物質を(1%水溶液として)皮下注射した。各群 10 匹ずつを、500、100 ないしは 10 mg/kg の用量で曝露した。10 mg/kg の BHAS の皮下注射は、被験物質が完全に経皮吸収された場合の大雑把な指標とすべく実施された。被験動物全てを、少なくとも 1 日 2 回、肉眼的な毒性徴候の有無について詳細に観察し、2 日目に被験動物全てから血液試料を採取し、メトヘモグロビンの定量を実施した。4 日目と 14 日目の血液試料では、赤血球数、白血球数、血小板数および網状赤血球数、ならびに総ヘモグロビン含量、ヘマトクリット値、平均赤血球ヘモグロビン濃度を測定した。この試験においては死亡例は見られず、中頻度で皮膚刺激症状が現れ、またこれより低頻度で壊死や皮膚脱落が生じた。曝露を受けたラットの多くは、曝露後に蒼白症状を示した(全ての用量群)。この影響は 24 時間以内に出現し、約 6 日間持続したが、チアノーゼは認められなかった。他の肉眼的な毒性徴候は、鼻孔、口ならびに前肢の褐色物質による汚染、会陰部の黄染、および流涙などであった。曝露開始後 48 時間で測定した血中メトヘモグロビン濃度は、曝露群全てにおいて、対照値を上回って有意に上昇し、最大の上昇は、500 mg/kg の局所適用群(4.0%)と 10 mg/kg の皮下注射群(6.3%)で見られた。循環血中の赤血球には、ハインツ小体は検出されなかった。剖検での主要な所見としては、脾臓の腫大および暗色化が挙げられ、用量や曝露経路に関係なく高頻度で発生した。肝臓への肉眼的影響は、認められた例でもわずかなものであった(Derelanko et al. 1987)。

閉塞経皮曝露と半閉塞経皮曝露とを比較した試験において、ウサギの経皮 LD₅₀ は、100 mg/kg と 500 mg/kg の間であることが確認された。BHAS (純度 98%超) を適用し、合成樹脂もしくはガーゼでの被覆を行った。両被覆法とも閉塞の意味合いを持つものであったが、BHAS は、後者よりも前者においてより著しい毒性を示すことが明らかとなった。この試験では、Albino ウサギに、水で湿らせた被験物質が、単回、24 時間局所適用された。被験物質は、多孔性のガーゼ片か合成樹脂の被覆材のいずれかで被覆された。ガーゼ片も合成樹脂の被覆材も、外科用テープで定位置に付け置かれた。皮下注射(1%水溶液)で被験物質投与を受ける 1 群も設けられた。各群に 10 匹ずつを割り当て、合成樹脂の被覆材で覆う場合は、500、100、10 ないしは 1 mg/kg の用量で、ガーゼ片で覆う場合は 1000、500 ないしは 100 mg/kg の用量で曝露を行った。合成樹脂の被覆材の場合は、1000 mg/kg 群を設けなかったが、それは、その様な用量で曝露を行った場合、ウサギの致死率が 100%になるという知

EURAR BIS(HYDROXYLAMMONIUM)SULFATE

見が、以前に得られていたからである。被験物質 10 mg/kg の皮下注射は、被験物質が完全に経皮吸収された場合の大雑把な指標とすべく実施された。被験動物全てを、少なくとも 1 日 2 回、肉眼的な毒性徴候の有無について詳細に観察し、2 日目に被験動物全てから血液試料を採取し、メトヘモグロビンの定量を実施した。4 日目および 14 日目の血液試料では、赤血球数、白血球数、血小板数および網状赤血球数、ならびに総ヘモグロビン含量、ヘマトクリット値、平均赤血球ヘモグロビン濃度を測定した。14 日間を生残した被験動物は剖検した。100 mg/kg の BHAS と閉塞皮膚接触させた群では、2/10 匹のウサギが死亡し、それらのメトヘモグロビンの割合は 18.7% であった。同群の生残ウサギでは、曝露後 4 日目の血液試料において、ハインツ小体を有する赤血球の割合が 80% にのぼった。100 mg/kg の BHAS と半閉塞皮膚接触させた群では、死亡例は認められなかった(メトヘモグロビンの割合: 1.9%)。500 mg/kg の BHAS と閉塞皮膚接触させた群では、9/10 匹のウサギが死亡し、それらのメトヘモグロビンの割合は 60.8% であった。この群のウサギでは、全例でハインツ小体形成が確認された(定量データ無し)。500 mg/kg の BHAS と半閉塞皮膚接触させた群では、死亡例は認められなかった(メトヘモグロビンの割合: 1.9%)。10 mg/kg で閉塞曝露を行った群でも(死亡例やメトヘモグロビン生成はみとめられなかったが)、曝露の 4 日後、1 匹にハインツ小体が確認された。さらに、赤血球数は減少し、網状赤血球数が増加した。対照的に、半閉塞条件での曝露を受けた群では、1000 mg/kg の場合でも、すべての被験動物が生残した(メトヘモグロビンの割合は 6.2%、ハインツ小体形成は 3 匹で確認)。10 mg/kg の皮下注射を受けた参照群では、メトヘモグロビンの割合は 5.1% (死亡例は無し)で、すべての被験動物において赤血球中にハインツ小体が検出された(投与の 4 日後、定量データは無し)。ただし、この試験においては、ウサギでのメトヘモグロビン定量に関して、方法論的に不十分な点があったことに留意すべきである(Derelanko et al., 1987)。

Derelanko et al.は、別個のより詳細な試験を行い、BHAS(純度 98%超)や塩酸フェニルヒドラジン(純度不明)をウサギやラットに 24 時間単回経皮適用して、それらの化合物の毒性を比較した(Allied Corporation, 1984)。両化合物とも、被覆材として合成樹脂を用いた場合、ガーゼを用いた場合よりもより強い毒性を示すことが明らかとなった。また、両化合物とも同当量ではほぼ同様の毒性反応を誘発した。誘発した毒性反応は、循環血中の赤血球におけるメトヘモグロビン生成とハインツ小体形成、網赤血球増加症、チアノーゼ、低体温症、一時的な体重増加抑制、適用部位における皮膚の壊死などであった。ウサギでは、0.1 g/kg 以上の用量で BHAS を適用された群で死亡が見られ、0.01 g/kg という低用量でも、合成樹脂材で閉塞適用した場合には、有意な血液学的影響が生じた。ラットでは、BHAS と塩酸フェニルヒドラジンのいずれの場合も死亡は起こらなかった。この試験では、血液学的影響に関しては、BHAS の方が、ウサギに対して、塩酸フェニルヒドラジンよりも強い毒性を示した。この試験では、皮下注入後の毒性反応および皮膚適用後の毒性反応が比較され、その結果、BHAS は、完全にではないが、かなりの量がウサギの皮膚を介して吸収されること

EURAR BIS(HYDROXYLAMMONIUM)SULFATE

が示唆された。血液毒性に関しては、0.001 g/kg が、ウサギにおける BHAS の「無影響」量 (NOAEL, Table 4.5 参照) であると考えられた。

ウサギを用いた他の試験でも、半閉塞皮膚適用の場合は毒性がそれほど高く現れないことが、明確に示された。雌雄 5 匹ずつのウサギを用いて限度試験が行われており、BHAS (純度 99.5%) を、50% 水溶液として、400 mg/kg の用量で半閉塞適用した (24 時間)。その結果、8 日間の観察期間中に死亡例は認められず、臨床症状や局所的影響も見られず、剖検でも変化は認められなかった (BASF, 1980b)。ウサギを用いた別の試験では、BHAS (純度に関するデータ無し) の経皮 LD₅₀ は、1500 mg/kg より大きい 2000 mg/kg よりも小さいという結果が得られた。この試験では、雌雄のウサギからなる 4 群が設けられ、BHAS が、2000 mg/kg (雄 6 匹、雌 4 匹)、1500 mg/kg (雄 5 匹、雌 5 匹)、1000 mg/kg (雄 5 匹、雌 5 匹)、および 500 mg/kg (雄 5 匹、雌 5 匹) の用量で単回適用され、14 日間の観察が行われた。対照群 (雄 5 匹、雌 5 匹) も設けられ、水を適用した。被験物質はガーゼ片に載せられ、背中 of 剃毛皮膚に適用された。最高用量群では、処置の 3 日後、10 匹中 7 匹のウサギが、死亡したか、あるいは切迫屠殺された。他のウサギは全例が生残した。死亡した 7 例ではいずれも、出血性皮膚炎が生じていた。解剖組織検査では、広範な上皮病変および皮膚病変を特徴とする、重度の出血性皮膚壊死が認められ、それらの病変には、上皮の直下から皮筋まで伸展しているものもあり、血液は褐色を呈していた。生残した被験動物で見られた皮膚病変は、出血、浮腫、水疱形成、血管の鬱血、重度の異染性細胞浸潤を特徴としていた。他の組織で見られた変化は、BHAS が誘発した毒性影響であるとは断定されなかった。しかし、皮膚病変により神経原性疼痛反射が起きて循環虚脱 (ショック) が生じ、それが死亡に関与した可能性があると思われた。肝臓や腎臓で見られた病変により、この説が支持される。生残例では、BHAS に関連した変化はほとんど見られなかった。皮膚には後遺症があったが、治癒変化によるものであった。観察期間後に最高用量群の 3/3 匹および中用量群の 4/10 匹を剖検したところ、脾臓にヘモジデリン色素の増加が認められた。赤血球の破壊が認められたが、他の組織変化は BHAS 処置とは無関係であると判断された (Allied Corporation, 1982)。

Table 4.5: Dermal toxicity of BHAS in rabbits⁵ and derived NOAEL (according to Derelanko et al., 1987)

Dose (mg/kg bw)	Exposure conditions		
	Injection, subcutaneous (as 1% aqueous solution)	Plastic cover (occlusive)	Porous gauze patch (semi-occlusive)
1.000	<i>not tested</i>	<i>not tested</i>	Lethality: 0/10 MetHb: 6.2% Heinz bodies: 3/10 Red blood cells: - 15%
500	<i>not tested</i>	Lethality: 9/10 MetHb: 60.8% presence of Heinz bodies: 10/10 Red blood cells: - 70%	Lethality: 0/10 MetHb: 1.9% NOAEL presence of Heinz bodies: 1/10 ⁶ Red blood cells: no decrease
100	<i>not tested</i>	Lethality: 2/10 MetHb: 18.7% presence of Heinz bodies: 8/10 Red blood cells: - 60%	Lethality: 0/10 MetHb: 1.9% presence of Heinz bodies: 0/10 Red blood cells: no decrease
10	Lethality: 0/10 MetHb: 5.1% Heinz bodies: 10/10 Red blood cells: - 50%	Lethality: 0/10 MetHb: 2.4 % presence of Heinz bodies: 6/10 Red blood cells: - 15%	<i>not tested</i>
1	<i>not tested</i>	Lethality: 0/10 MetHb: 0.8 % NOAEL presence of Heinz bodies: 1/10 ² Red blood cells: no decrease	<i>not tested</i>

⁵ Experimental conditions: Female rabbits, 24 h (for occlusive and semi-occlusive dermal treatment, single topical application of BHAS moistened with water, 10 animals per group; investigation of gross signs of toxicity, blood samples: methaemoglobin (MetHb), red blood cell count). It is assumed that MetHb levels are underestimated due to the late time point of determination.

⁶ Derivation of the NOAEL: The occurrence of Heinz bodies in 1 out of 10 animals is considered as uncertain due to the absence of corroborating effects on red blood cell count or other clinical effects.

経口

BHAS の急性経口毒性は、ラットとネコとでは、現れ方が相違している。ネコの方が、メトヘモグロビン生成に対する感受性が高い。ラットでは、545 mg/kg/日および 642 mg/kg/日という LD₅₀ 値が得られている。一方、ネコの雌では、BHAS がメトヘモグロビンを生成させる影響に関し、約 200 mg/kg/日という LD₅₀ 値が示されている。

BHAS の急性経口毒性を調べた 1 件の試験では、ラットにおいて、以下の様な LD 値が得られた(被験物質の純度に関するデータ無し)。LD₀: 450 mg/kg、LD₅₀: 545 ± 41 mg/kg、LD₁₀₀: 1200 mg/kg。試験手法に関して、より詳細なデータは提示されていない。

致死量の BHAS が投与された場合、1 時間以内に死に至っている。低用量の 300 mg/kg を投与されたラットについて剖検したところ、肝臓、腎臓および脾臓の損傷が明らかとなった。BHAS を投与された動物に現れた最も特徴的な事象は、脾臓の黒変であった。この試験の付加情報の中に、引用試験で観察された臨床症状のデータが、次の様に示されている。水を溶媒として 250 mg/kg の BHAS を 1 群 5 匹のラットに投与したところ、軽微で一時的なチアノーゼと活動性低下が引き起こされた。また、500 mg/kg の投与では、顕著なチアノーゼが引き起こされ、2/5 匹のラットでは、流涙、尾の屈曲および痙攣も現れ、それら 2 匹は 1 時間以内に死亡した(メトヘモグロビンも陽性)。生残ラットは、24 時間後、正常な状態であった(Angus Chemical Company, 1960 年の試験, 1982)。

化学的に純粋な BHAS の 2%ないしは 4%の水溶液をラットに経口投与した試験からは、LD₅₀ として 642(568-725) mg/kg という数値が得られた。しかし、投与用量、投与群、供試動物数および観察期間に関するデータは示されていない。この試験で認められた臨床症状は、呼吸困難、身震い、痙攣、振戦および横臥姿勢などであった。剖検では、脾臓において、青～紫色への変色および膨張が認められた(BASF, 1969)。

BHAS(純度 99.5%)をネコに経口投与し、メトヘモグロビン形成特性を調べた試験では、雌ネコについて、約 200 mg/kg という LD₅₀ が得られた。雌雄 1 匹ずつに 50 mg/kg が単回経口投与され、また雌雄 3 匹ずつに 200 mg/kg が単回経口投与された(水溶液の強制経口投与)。50 mg/kg の投与の場合は、雄も雌も生残し、4 時間後の観察時点でのメトヘモグロビン濃度はそれぞれ 12.1%および 21.6%であった。200 mg/kg の投与の場合は、雄では 0/3 匹、雌では 2/3 匹が死亡し、この群における投与 4 時間後のメトヘモグロビン濃度は 10%～41.9%であった。50 mg/kg 群で見られた臨床症状は、流涎、チアノーゼおよび嘔吐などであった。一方、200 mg/kg 群では、反復的な嘔吐、流涎の増加、無気力、チアノーゼ、散瞳および横臥姿勢などが観察された。これらの影響に基づき、ネコにおける LOAEL として、50 mg/kg

が導出された。死亡は投与の 2 日後に生じており、生残したネコは 9 日以内に回復した。死亡したネコの剖検により、心筋減弱、急性受動性充血、肝臓や肺の褪色が明らかとなった(BASF, 1981)。

In vitro 試験

データは得られていない。

4.1.2.2.2 ヒトにおける試験

In vivo 試験

ヒトにおける BHAS の急性毒性に関するデータは得られていない。

4.1.2.2.3 急性毒性の要約

ヒトにおける BHAS の急性毒性に関するデータは得られていない。ラット、ネコもしくはウサギを用いた試験から、BHAS が、経口投与もしくは経皮適用により、メトヘモグロビンを形成する能力を有することが証明されている。ただし、BHAS を吸入した場合のメトヘモグロビン形成に関するデータは得られていない。経口および経皮 LD₅₀ 値は、動物種差が見られ、ラットで経口 LD₅₀ が 545～652 mg/kg、経皮 LD₅₀ が 500 mg/kg 超であったのに対し、雌ネコの経口 LD₅₀ は約 200 mg/kg、ウサギの経皮 LD₅₀ は 100～500 mg/kg であった。吸入毒性の評価に関しては、吸入リスク試験の情報が 2 件だけ得られており、20°C で飽和した蒸気を吸入しても、毒性影響は何も引き起こされなかったことが示されている。しかし、BHAS の蒸気圧は非常に低く、また、それらの試験で使われた方法の妥当性の問題から、被験動物が十分な濃度の BHAS に曝露されたかどうかについて疑義が残る。皮膚接触後の毒性反応の程度は、曝露のやり方により変化する。閉塞条件の場合は、半閉塞条件の場合よりも有意に高い毒性が示され、これはおそらく、腐食性が増高し、皮膚が損傷を受けた後に経皮吸収が増強するためと考えられる。ウサギでは、BHAS を閉塞適用した場合の「無影響」量(NOEL)は、1 mg/kg であると考えられた。半閉塞適用の場合は、500 mg/kg という NOEL が導出された。従来の Xn; R 20/22 という表記は、R 21/22(皮膚に接触した場合や飲み込んだ場合に有害)に改められている。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.3.1 皮膚

動物における試験

ドレイズ試験のわずかな報告データだけが得られている。これらのデータでは、被験物質への曝露時間により、中等度から重度の刺激性、さらには、腐食性も生じ得ることが示されている。急性経皮毒性を評価するために行われた試験の結果 (4.1.2.2 項参照)により、このことが明確に示されている。

ウサギを用いた皮膚刺激性試験において、中等度から重度(曝露時間に依存)の皮膚刺激性が観察されている。ウサギ(数は不明)の皮膚に、化学的に純粋な BHAS の 80%水溶液(用量は不明)が適用され、1、5、15分ないしは20時間の曝露が行われた(これ以上の詳細は不明)。曝露終了後24時間の時点で、皮膚刺激性を評価した。1分もしくは5分間曝露では、皮膚刺激性は何も認められなかった。15分間曝露では、紅斑がかろうじて確認された。一方、20時間曝露では、重度の皮膚刺激症状が観察された(この症状は8日以内に回復)(BASF, 1969)。50 mg の(水で湿らせた)BHAS が、皮膚に閉塞適用され、4時間曝露が実施された。24時間後の観察時点で、グレード1の紅斑が認められた。他には病変は認められなかった(RCC NOTOX B.V., 1989a)。

ヒトにおける試験

Pellerat and Chabeau(1976)は、1%もしくは2%の濃度のヒドロキシルアミンを用い、それまでに当該化学物質に接触したことのない34人を対象にして行われた、臨床的皮膚刺激試験について報告している(方法に関する詳細情報無し)。被験者のうち41%が陽性であった(さらに詳細な情報は示されていない)。

ヒトで見られた BHAS の局所刺激性に関して、文献中で言及されている(BASF, 1956; Fousserau, 1982; Popchristov et al., 1957)が、詳細情報は示されていない。BASFによる報告を紹介した文献では、ヒドロキシルアミン塩を取り扱った後に皮膚刺激症状が現れたことが述べられている(より詳細な情報無し)。Fousserau(1982)の報告では、脂肪族アミン化合物が刺激症状とアレルギー性皮膚炎を引き起こすことが概説され、硫酸塩を含むヒドロキシルアミン塩がその例として挙げられていることが述べられている。Popchristov et al.(1957)は、フィルム製造業に従事するブルガリア人労働者における、皮膚刺激症状や搔痒症状について報告している。

4.1.2.3.2 眼

動物における試験

ウサギの眼に、化学的に純粋な BHAS を 50 mm³ 点眼した試験で、24 時間後に重度の結膜刺激症状と重度の角膜混濁が観察されている。この試験では、以下の影響が報告されている（重篤度の評点付けはされていない）。点眼後 1 時間の時点における、結膜の発赤および軽度の結膜浮腫。24 時間後における、軽度の結膜発赤、重度の結膜浮腫および重度の角膜混濁。8 日後の軽度の角膜混濁。観察された角膜混濁について、その可逆性に関する情報は示されていない(BASF, 1969)。別のドレイズ眼刺激性試験では、1 匹のウサギに 0.1 mL の BHAS (純度に関するデータ無し)が投与され、中等度の眼刺激症状が認められている。結膜発赤については平均スコア(24、48、72 時間)が 3、結膜浮腫については平均スコアが 1.3 であったと報告されている。虹彩炎(グレード 1)が、1 日目においてのみ認められたが、角膜混濁は認められなかった。8 日目の観察時には、結膜の刺激症状は認められなかった(RCC NOTOX B.V., 1989b)。

ヒトにおける試験

ヒトで見られた BHAS の局所刺激性に関して、文献中で言及されている(Fousserau, 1982; Popchristov et al., 1957)が、重要なデータの報告は無い。Science Appl. Incorporation による報告書原稿(1984)からさらにデータが得られるが、詳細な内容は入手できていない。

4.1.2.3.3 気道

データは得られていない。

4.1.2.3.4 刺激性の要約

ヒトで見られた BHAS の局所刺激性/腐食性に関して、文献中で言及されているが、個々の報告は入手できていない。Science Appl. Incorporation による報告書原稿(1984)からさらにデータが得られるが、詳細な内容は入手できていない。

臨床的皮膚刺激試験では、1%もしくは2%のヒドロキシアミン化合物により、高い割合で皮膚刺激が引き起こされることが明らかとされた(Pellerat and Chabeau 1976, さらに詳しい情報は提供されていない)。

ヒトで見られた BHAS の局所刺激性に関して、文献中でさらに言及されている (Fousserau, 1982; Popchristov et al., 1957) が、リスク評価に使用できる詳細なデータは提示されていない。

動物データがわずかに報告されており、被験動物が曝露された時間によって、中等度から重度の刺激性、さらには腐食性が現れることが示されている。急性経皮毒性を評価するために行われた試験の結果 (4.1.2.2 項参照) により、このことが明確に示されている。BHAS の局所刺激性/腐食性を正しく評価するためには、EU や OECD の現行ガイドラインに則った皮膚や眼の試験のデータが必要とされる。しかし、試験データを得るための動物試験を実施する場合、試験目的に使用する動物の保護に関する指令 86/609/EEC の条項に従い、重度の刺激性を示す可能性のある物質を用いた試験は避けられなくてはならない。したがって、以下の理由から、BHAS の眼への刺激性ならびに皮膚刺激性に関する現行の表記である R36/68 を保持することが提唱される。20~24 時間の曝露期間についてのみ、重度の皮膚病変が報告されている。1 匹のウサギに対して行われた 4 時間曝露では、軽度の皮膚刺激症状が認められている。一方、眼への刺激性に関しては、相反するデータが得られており、影響の不可逆性については述べられていない。

4.1.2.4 腐食性

ヒトのデータは、腐食性に焦点を当てたものが得られていない。BHAS の腐食性を正しく評価するためには、EU や OECD の現行ガイドラインに則った皮膚や眼の試験のデータが必要とされる。わずかな動物データから、被験物質への曝露時間に依存して、中等度から重度の刺激性、さらには腐食性が現れることが示されている (BASF, 1969)。ウサギを用いた経皮毒性試験において、広範な上皮病変および皮膚病変を特徴とする、重度の出血性壊死が観察されている (Allied Corporation, 1982)。病変の表面積やドレイズ・スコアなどの詳細情報は示されていない。これらの情報は、BHAS を腐食性物質と分類するには不十分である。

4.1.2.5 感作性

4.1.2.5.1 動物における試験

皮膚

In vivo 試験

10匹のモルモットを用いた試験が実施されている。片方の脇腹に、BHASの40%水溶液が0.1 mL適用された。この処置を、刺激性が明確に観察されるまで、毎日繰り返した。それから8～10日の休止期間を経て、被験動物のもう片方の脇腹を、濃度を10倍薄めた(4%)同量(0.1 mL)の被験物質で処置した。この場所に、8/10匹の被験動物で刺激症状、浮腫、および小結節が現れ、感作作用が示された(BASF 1956)。同じ方法(皮膚塗布法: skin painting testと記載されている)を用いた試験において、界面活性剤を用いて2%の濃度の被験物質を調製した場合には、陰性の結果が得られた(BASF 1970)。

合計28匹(被験物質投与群24匹および対照群4匹)のモルモットを用いて、Magnusson Kligman試験が1件行われている。皮内投与では、被験物質投与群に、BHAS(純度95%超)の5%水溶液が投与された。局所感作誘導では、7日目に25%水溶液が適用され、21日目に10%水溶液で感作惹起が行われた。対照群には、感作誘導の際には溶媒だけの処置を行い、感作惹起の際には10%水溶液で処置を行った。被験物質投与群では、96%(22/24匹)の割合で、感作陽性であった。陽性を示したモルモットの内、19/22匹で、グレード2(中等度もしくは瀰漫性の発赤)またはグレード3(強い発赤と腫脹)の皮膚反応が観察された。対照群のモルモットには、皮膚反応は何も認められなかった。55日目に感作惹起が再度実施され、その結果、初回の感作惹起と同等の感作陽性率(90%超)が示された。1回目の感作惹起と2回目の感作惹起との間に、被験動物は、エアロゾル吸入による感作惹起もしくは気管内感作惹起に供された(Allied Corporation 1984)。

マウス耳介腫脹試験(MEST)試験が1件行われている。この試験では、初回の感作誘導処置に先立って、FCA(フロイント完全アジュバント; 訳注: 原文では"fatal calf albumin"となっているが"Freund's complete adjuvant"の誤りと考えられる)が2回、合計0.05 mL、腹部に皮下注射された。その後、3日連続して、溶媒に混和したBHASもしくは溶媒を100 µL、腹部に局所適用した。7日間の回復期間の後、被験物質溶液20 µLを、右耳に適用した。24および48時間後に、両耳の厚さを測定した。被験物質投与群は10～15匹、対照群は5～10匹で構成されていた。この試験では、72種類の化学物質が調べられた。BHASについては、全ての処置において、25%エタノールを溶媒とした10%溶液が用いられた。33%のマウスが、陽性反応を示した(Gad et al. 1986)。

Gad et al.(1986)が著した手法と同じ試験が、2つの試験機関で行われている。両試験機関とも、BHAS に関して、陰性結果が得られたことを報告している。この手法は、強い接触感作物質〔ジニトロクロロベンゼン(DNCB)、グルタルアルデヒドなど〕を同定するためには有用であるが、弱いもしくは中程度のアレルゲンを検出する場合には信頼性が悪いと結論付けられている(Dunn et al. 1990)。

20匹のモルモットを用いて Buehler 試験が1件行われており、BHAS は陰性であった(被験物質濃度 0.2%、Griffith and Buehler 1977)。

Gad(1988)は、得られる文献を基に、BHAS や他の 52 の化合物について、順位付けを行った。BHAS は、MEST では中等度、GPMT(モルモット・マキシミゼーション・テスト)ではカテゴリIII(中等度)、Buehler テストおよび皮膚マキシミゼーション・テストでは陰性、そしてヒトに関しては陽性に位置付けられた。

In vitro 試験

データは得られていない。

気道

In vivo 試験

Magnusson Kligman 試験に供されたモルモット(当該試験では陽性率 96%)に、続いて以下の様な処置を施した試験が行われている。エアロゾル吸入による感作惹起を行うため、4匹ずつの2群を設け、それぞれ 0.0065 mg/L および 0.0132 mg/L の濃度のエアロゾルを 30 分間吸入させた。曝露期間中と曝露終了後 60 分間、呼吸数を測定した。基準値と比較して、呼吸数に変化は認められなかった。さらに4群(各群モルモット4匹)を設け、5、15、25 ないしは 75 mg/kg の用量で、気管内投与を行った。60 分間以上、呼吸数を観測した。測定された呼吸数を基準レベルと比較した結果に基づくと、被験物質は、肺感作の徴候を何も示さなかった。呼吸数の増加は肺感作の徴候、また、呼吸数の低下は感覚刺激の徴候とみなされたのだが、この試験では、呼吸数の変化は何も観察されなかった(Allied Corporation 1984)。

In vitro 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

In vivo 試験

BHAS もしくは塩酸ヒドロキシルアミンのいずれについても、接触性皮膚炎に関する報告が、何件か得られている。

ヒドロキシルアミン塩化合物による接触皮膚炎(顔、頸部、上肢に局限)の症例報告が、8 件得られている。ある報告では、ヒドロキシルアミン製造に携わる従業員合計 20 人の内 7 人が、非常に短い期間(2~60 日)で、接触性皮膚炎を示すようになったことが述べられている。写真撮影の助手を務め、カラーフィルムの現像液に曝露された化学物質取扱者の例では、パラ置換アミンだけではなく、BHAS や塩酸ヒドロキシルアミンにも感作されていることが明らかとなった。被験物質は、水を溶媒とし、濃度は 1%であった(Folesky et al. 1971)。

カラー写真の処理に用いられる化学物質を製造する設備で働いていた技術者の例では、従事し始めてから 5 か月後、手に慢性湿疹や爪剥離症が生じている。BHAS の 1、2 および 5% 水溶液でパッチテストを行ったところ、陽性反応が示された。10 名の対照者に 5%BHAS でパッチテストを行った結果は、陰性であった。梱包業務に異動された後、その人の湿疹は 2 ヶ月で無くなり、爪剥離症は 4 ヶ月で治癒した(Goh 1990)。

サイクロセリンの製造に携わっていた従業員の例では、13 名中 5 名において、上肢、顔および頸部に接触性皮膚炎が生じていた。塩酸ヒドロキシルアミンがサイクロセリンの製造に関係しており、パッチテスト(1%水溶液)により、塩酸ヒドロキシルアミンによって引き起こされた局所性湿疹であると、臨床的に診断された(Gobbi 1970)。

ヒドロキシルアミン化合物(塩酸塩、硫酸塩)に曝露されていた従業員の例では、11 人中 9 人が、顔や頸部および上肢に接触性皮膚炎を発症し、さらに亀裂や爪剥離症も認められた。検査に用いられた BHAS は、水を溶媒とし、濃度は 0.1~2%であった。34 人の対照被験者にも検査を行ったところ、14 人が、BHAS の 1%もしくは 2%水溶液で処置した後に、陽性反応を示した(Pellerat and Chabeau 1976)。

現像所で働いていた写真撮影従事者の例では、掌や指に病変が発現した。塩化ヒドロキシルアンモニウムの 0.1%水溶液でパッチテストを実施したところ、陽性の皮膚反応を示した。職を変えたことによりその従事者の状態は改善したが、その写真現像所に戻ると、皮膚炎が再発した(Aguiree et al. 1992)。

76 人の被験者に対して反復損傷パッチテストが行われている。界面活性剤を溶媒とした 0.05%BHAS 溶液が用いられ、3/76 人が感作された (Griffith and Buehler, 1977)。

In vitro 試験

データは得られていない。

気道

データは得られていない。

4.1.2.5.3 感作性のまとめ

BHAS や塩酸ヒドロキシルアミンを用いた動物試験では、皮膚感作性が示された。この結果は、両方の化学物質について、ヒトのデータと相関していた。したがって、R43(皮膚との接触により感作のおそれ有り)の表記が適切とされる。

まず最初に Magnusson Kligman 試験に供されたモルモット(当該試験では陽性率 96%)を、続いてエアロゾル吸入による感作惹起もしくは気管内惹起に供した試験では、肺感作の徴候は、何も検出されなかった。しかし、この試験手法はほとんど例が無く、妥当性に関するデータが得られていない。したがって、ここで得られた陰性という結果は、有害性評価に用いることはできない。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1 動物における試験

In vivo 試験

BHAS によって発現した主要な毒性徴候は、メトヘモグロビン血症、溶血性貧血および貧血による続発的影響であった。

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

飲水試験

28 日間試験(ラット)

ほぼ OECD TG 407 に準拠して、Wistar ラットを用いた 28 日間の用量設定経口毒性試験が実施されている。各群雌雄 5 匹ずつに、BHAS(純度 99%超)が、0、25、100、400 もしくは 1600 ppm の濃度で、連続 4 週間飲水投与された。被験物質調製物の分析を、試験の終了時に実施した。しかし、試験にはいくつかの制約があったため、一部の群については、雌雄のラットによる飲水量に基づいて、BHAS 消費量を厳密に推算することができなかった。BHAS は水の中で不安定であるため、25、100 および 400 ppm 群においては、飲用水から実際に摂取された BHAS を厳密に推算する上で、いくつかの技術的欠陥が存在した。特に低用量群では、被験物質の存在をまったく検出できないか、あるいは少量しか検出できなかった。そのため、BHAS の用量は、mg/kg ではなく、ppm で示されている。最高用量の 1600 ppm で飲用水中の BHAS の安定性を調べたところ、4 日間保存後で、平均 1437 ppm という結果が得られた。したがって、1600 ppm 群において飲用水から摂取された BHAS の平均用量は、雄で約 142 mg/kg、雌で 149 mg/kg であった。

試験期間中に死亡は起こらなかった。BHAS の投与を受けたラットにおける飼料摂取量は、対照群と同等であった。1600 ppm 群のラットは雌雄とも、投与の最終週に、飲水量の低下、チアノーゼ、尿の変色(黄赤色)を示した。1600、400 もしくは 100 ppm の飲水投与を受けた雄や雌について得られた、血液学的検査、臨床生化学的検査、臓器重量測定、剖検および顕微鏡学的検査の主要な結果を、次の Table 4.6 にまとめた。

Table 4.6: Summary table: Subacute toxicity (28-day) drinking water study, Wistar rat

Wistar rat (5m/5f) 25, 100, 400, 1600 ppm	<p>1600 ppm:</p> <p><u>blood (m/f):</u> ↓RBC, ↓HB, ↓HCT, ↓MCHC, ↑MCH, ↑MCV, ↑RET, ↑Heinz bodies, ↑methaemoglobin</p> <p>morphological changes of RBC: anisocytosis, poikilocytosis, and polychromasia (m/f) ↑ WBC (m/f), ↑ Neut (m/f), ↑ Eos (m/f), ↑ Lymph (m/f), ↑ Mono (m/f), ↓ PLT (m/f) ↑ bilirubin (m/f), ↓ AP (m/f), ↓ glucose (f), ↓ Ca (m), ↑ P (m), ↑ bilirubin in urine (f)</p> <p><u>spleen (m/f):</u> ↑ weight (abs/rel), splenomegaly hemosiderin deposits, extramedullary hematopoiesis</p> <p><u>liver:</u> hemosiderin deposits in Kupffer cells (m/f), extramedullary hematopoiesis and erythrophagocytosis (m/f), single megacaryocytes in intrasinoidal space (m/f), iron pigment deposition in hepatocytes (f)</p> <p><u>kidney:</u> ↑ weight, abs/rel (m), tubular hemosiderosis (m/f), iron-negative pigment deposition in proximal tubulus (m/f)</p> <p><u>bone marrow (m):</u> reticuloid hyperplasia, necrosis</p> <p>400 ppm:</p> <p><u>blood:</u> ↓ RBC (m), ↓ HCT (m), ↓ HB (m/f), ↑ MCV (f), ↑ RET (m/f), ↑ Heinz bodies (m/f), morphological changes of RBC: anisocytosis, micro-and macrocytosis (m), polychromatophily (m/f), ↑ Neut (m), ↓ bilirubin (f),</p> <p><u>spleen (m/f):</u> splenomegaly; extramedullary hematopoiesis</p> <p><u>liver (m/f):</u> extramedullary hematopoiesis</p> <p>100 ppm: :</p> <p><u>blood (m):</u> anisocytosis, polychromatophily <u>spleen (m):</u> splenomegaly</p> <p style="text-align: right;">BASF, 1989</p>
--	--

↑:statistically significant increase compared with controls; ↓:statistically significant decrease compared with controls; m: male; f:female; RBC:Erythrocyte count; HB:Haemoglobin; HCT:Hematocrit; MCV:Mean corpuscular volume;MCH: Mean corpuscular haemoglobin; MCHC:Mean corpuscular haemoglobin concentration; WBC:Leukocyte count; PLT: Platelet count; RET:Reticulocyte count; Neut:Neutrophiles; Lymph:Lymphocytes; Mono:Monocytes; Eos: Eosinophiles; AP:Alkaline phosphatase; Ca:Calcium; P:Inorganic phosphorus; abs:absolute; rel:relative; NOAELsys:no observed adverse effect level for systemic effects

要約すると、BHASによって発現した主要な毒性徴候は、まず、溶血性貧血と脾臓の腫大であり、特に1600および400 ppm群ではチアノーゼを伴って顕著に認められた。また、血液パラメータの変化(メトヘモグロビン量の増加、ハイイツ小体の出現、ならびに、未熟な赤血球すなわち網状赤血球の増加や白血球すなわち好中球、好酸性顆粒球、リンパ球および単球の増加などによる、血液細胞構成のシフト)や、血漿の生化学的組成の変化、ならびに、脾臓、肝臓および腎臓における関連性のある毒性影響が認められた。赤血球の崩壊が亢進したことが、これらの臓器へのヘモジデリン沈着や鉄色素沈着により確認された。さらにクッパー細胞による赤血球貪食も観察された。脾臓と肝臓では、代償性の影響として、髄外造血が生じていた。脾臓では、鬱血、脾洞の拡張、腫大および重量増加が、未熟な赤血球により引き起こされていた。類細網の過形成および骨髄における壊死が1600 ppm群の雄だ

けで認められたが、これは、骨髄の損傷を示唆するものと思われた。

25 ppm 群では、雄においても雌においても、投与に関連した影響は何も認められなかった。全身への影響に関する NOAEL は、雄では 25 ppm、雌では 100 ppm であった。

90 日試験(ラット)

OECD TG 408 準拠と同等に(回復期間は設けられていない)、Wistar ラットを用いた亜慢性経口毒性試験が実施されている。各群雌雄 10 匹ずつに、BHAS(純度 99%以上)が、0、10、50 もしくは 250 ppm の濃度で、連続 90 日間飲水投与された。投与量は、1 日当たりの平均 BHAS 摂取量としては、0、0.9、4 および 21 mg/kg に相当していた。

死亡率、一般状態、行動に関しては、被験物質投与群と被験物質非投与群との間に相違は認められなかった。被験動物 1 匹当たりもしくは体重 1 kg 当たりの平均 1 日飼料消費量、ならびに体重や体重増加率に関しても、毒性学的に有意な差は、雄でも雌でも認められなかった。以下の所見が得られ、それらは投与によって生じたものとみなされた。まず、250 ppm 群では、ラットは雌雄とも、尿の暗色化を示した。この所見は、投与による血液への影響と考えられた。血液学的検査により、赤血球崩壊の亢進が示唆された。250 ppm 群の雌雄と 50 ppm 群の雌では、赤血球数とヘモグロビンに関する値の減少が生じた。250 ppm 群の雌雄と 50 ppm 群の雌ではさらに MCH 値が上昇し、250 ppm 群の雌ではヘマトクリット値の減少、250 ppm 群の雄では MCHC 値の減少も認められた。50 ppm 群の雄では、投与期間中、赤血球数の減少とヘモグロビン含量の減少も顕著であったが、これらは統計学的に有意な変化ではなかった。これらの所見も、赤血球破壊の亢進に関連したものと考えられた。250 ppm 群の雌雄における MCV 値と網状赤血球数の増加は、代償性の赤血球産生増加の徴候とみなされた。骨髄からの幼若な赤血球放出が増加したために、250 および 50 ppm 群の雌雄では、用量依存的に、赤血球の多染性が増強していた。50 ppm 群では、雌雄のラットで網状赤血球が若干増加し、雌ではさらに、MCV 値がわずかに増加していた。また、250 ppm 群では、雌雄ともに、ビリルビン濃度が増加していた。50 ppm 群でも、ビリルビン値は雌雄ともに投与期間中明らかに増加していたが、統計学的に有意な変化には達していなかった。この所見は、赤血球崩壊が亢進したために生じたと考えられた。250 ppm 群の雌雄で、メトヘモグロビン濃度とハイנטツ小体発現率の上昇が認められ、メトヘモグロビン血症が生じていることが示された。脾臓の絶対および相対重量の増加が、250 ppm 群の雌雄で観察された。さらに雄では、肝臓の相対重量も増加していた。50 ppm 群の雌雄では、副腎の絶対および相対重量が増加していた。貧血による二次的影響を示す組織病理学的所見の 1 つとして、250 ppm 群の雌雄では、脾臓や肝臓において、ヘモジデリン沈着の亢進が認められた。50 ppm 群では、雌雄とも、脾臓でのヘモジデリン沈着が亢進していた。さらに、50 および 250 ppm 群の雌雄で、脾臓の鬱血を伴った洞拡張が、用量依存的に観察され

た。10 ppm では、雄ラットでも雌ラットでも、血液パラメータに変化は生じなかった。この90日試験の結果について、重要な所見を Table 4.7 にまとめた。

Table 4.7: Subchronic toxicity (90-day) drinking water study, Wistar rat

<p>Wistar rat (10m/10f) 10, 50, 250 ppm (0.9, 4, 21 mg/kg bw/d)</p>	<p>50 ppm: <u>clinical signs:</u> none specific (m/f) <u>blood:</u> ↓RBC (f), (↓)RBC (m), ↓Hb (f), (↓)Hb (m), ↑MCV (f), ↑MCH (f), ↑polychromasia (m/f), ↑RET (m/f), (↑)bilirubin (m/f) <u>effects on organs:</u> ↑adrenal weight, abs/rel (m/f); <u>spleen:</u> hemosiderin deposits (m/f), sinus dilatation together with congestion (2m/2f)</p> <p>250 ppm: <u>clinical signs:</u> dark coloration of the urine (m/f) <u>blood:</u> ↓RBC (m/f), ↓Hb (m/f), ↓HCT (f), ↓MCHC (m), ↑MCV (m/f), ↑MCH (m/f), ↑RET (m/f), ↑Heinz bodies (m/f), ↑MetHb (m/f), ↑polychromasia (m/f), ↑bilirubin (m/f) <u>effects on organs:</u> <u>spleen:</u> ↑ weight, abs (m/f), ↑ weight, rel (m), hemosiderin deposits (m/f), sinus dilatation together with congestion (10m/10f) <u>liver:</u> ↑ weight, rel (m), hemosiderin deposits (m/f)</p> <p style="text-align: right;">BASF, 1992b</p>
---	--

↑: statistically significant increase compared with controls; (↑): increase compared with controls, no statistically significant but possibly of toxicological relevance; ↓: statistically significant decrease compared with controls; (↓): decrease compared with controls, no statistically significant but possibly of toxicological relevance; m: male; f: female; RBC: Erythrocyte count; Hb: Haemoglobin; HCT: Hematocrit; MCV: Mean corpuscular volume; MCH: Mean corpuscular haemoglobin; MCHC: Mean corpuscular haemoglobin concentration; MetHb: methaemoglobin; RET: Reticulocyte count

結論として、BHAS を飲水中 50 もしくは 250 ppm の濃度(それぞれ約 4 および 21 mg/kg/日に相当)でラットに 3 ヶ月間反復投与すると、両用量において、雄および雌ラットに対する毒性が生じた。この試験では、BHAS が血液毒性を有することが示された。50 および 250 ppm 群の雌雄において、BHAS 投与により、メトヘモグロビン血症を伴う溶血性貧血が(用量関連的に)起こり、肝臓や脾臓では重量増加が見られ、それはヘモジデリン沈着の亢進といった特異的な組織病理学的所見を伴っていた。

この試験の結果に基づくと、50 ppm(約 4 mg/kg/日に相当)が、雄および雌ラットにおける全身影響に関する LOAEL であるとみなされる。この試験における雌雄のラットに対する全ての有害影響に関する NOAEL は、10 ppm(約 0.9 mg/kg/日に相当)であった。局所的な毒性影響は、最高用量の 250 ppm、すなわち約 21 mg/kg/日に相当する用量を投与された雌雄のラットにおいて、何も認められなかった(BASF, 1992b)。

慢性毒性/発がん性の併合試験, 12/24 ヶ月間(ラット)

OECD TG 453 に準拠して、慢性毒性/発がん性に関する併合試験が行われている。BHAS (市

EURAR 110 BIS(HYDROXYLAMMONIUM)SULFATE

販等級)が、各群雌雄 50 匹ずつの Wistar (Chbb:THOM, SPF)ラットに、0、5、20 もしくは 80 ppm の濃度で、24 ヶ月間飲水投与された(主試験群)。被験物質の血液毒性を確認するため、各用量につき雌雄 10 匹ずつの群を設け、12 ヶ月間の投与を行った(副試験群)。これらの副試験群の動物に対しては、血液パラメータの分析が、3 ヶ月ごとに実施された。飲水中の濃度は、以下に示す BHAS の 1 日当たりの平均摂取量に相当していた。主試験群では、雄で約 0、0.2、1.0 および 3.7 mg/kg/日、雌で約 0、0.4、1.6 および 6.2 mg/kg/日。副試験群では、約 0、0.3、1.1 および 4.5 mg/kg/日、雌で 0、0.4、1.6 および 6.2 mg/kg/日。

飼料消費量、飲水量および体重が、試験の最初の 13 週間にわたって、1 週間に 1 回測定された。その後は飲水量と体重は 4 週間毎に測定され、飼料消費量は 3 ヶ月ごとに確認された。少なくとも 1 日 1 回、毒性の徴候や死亡の有無について、各動物を観察した。また、包括的な臨床検査や触診が、週 1 回実施された。血液学的検査は、副試験群において、3、6、9 および 12 ヶ月後に実施された。主試験群では、血液学的検査は、12、18 および 24 ヶ月後に実施された。全ての被験動物について、一連の剖検および顕微鏡学的検査が実施された。

副試験群および主試験群において、投与に関連した臨床症状は、雌雄どちらにも認められず、また、生残率についての統計学的有意差は、被験物質投与群、対照群、雄および雌において、いずれの間にも認められなかった。被験物質投与群の雄および雌における平均体重や増体量は、試験期間を通して適合する対照群における値と同等であった。

3、6、9、12 および 24 ヶ月時に行われた血液学的検査の結果から、ラットに用量関連性の貧血が生じたことが示され、それは溶血性および再生性を特徴とするものであった。貧血症状は、雄の方でより顕著であった。副試験群の内 80 ppm 群においては、雌雄のラットで、統計学的に有意な赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の減少を示す、溶血性貧血が引き起こされた。さらに、MCV 値および MCH 値、ならびに雌における血小板数について、統計学的に有意な増加が認められた。ハインツ小体、ハウエル・ジョリー小体および網状赤血球の数が、雌雄共にわずかに増加していた。脾臓の絶対および相対重量が、80 ppm 群のラットの雌雄で、統計学的に有意に増加していた。脾臓の顕微鏡学的検査では、80 ppm 群の雌雄において、血管腔の拡張と血管腔への血液充満を特徴とした血管の鬱血が観察された。脾臓におけるヘモジデリンの沈着は、対照群および BHAS 投与群のほとんど全ての動物で生じていたが、20 および 80 ppm 群の雄、ならびに 80 ppm 群の雌でより重度に現れていた。

主試験群では、赤血球の形態学的観察の結果、80 ppm 群で、雄における赤血球不同症ならびに小赤血球症、雌における多染性の増高、ならびに雌雄におけるハウエル・ジョリー小体の増加が判明した。80 ppm 群の雌では、脾臓の絶対および相対平均重量が、統計学的に有

意に増加していた。脾臓の顕微鏡学的検査により、以下の非腫瘍性所見が得られた。80 ppm 群の雌雄における血管の鬱血、ならびに、対照群および BHAS 投与群のほとんど全ての動物におけるヘモジデリン沈着、ただし沈着は 80 ppm の雄や 20 および 80 ppm 群の雌でより重度であった。脾臓における髓外造血も、主試験群のラットのほとんどで観察された。それらのラットのうち、症状がより重度であったのは、80 ppm 群の雌雄であったが、発生率は、雌においてわずかに高かった。80 ppm 群のラットでは、脾臓における造血の増高と同様に、骨髓における造血の増高も認められた。さらに、肝臓における多巣性もしくは瀰漫性の色素沈着が認められた。鉄染色により、沈着した色素のほとんどは、ヘモジデリンであることが判明した。肝臓における瀰漫性の色素沈着は、80 ppm 群の雌雄でより高率かつ重度に認められた。慢性毒性/発がん性に関する 12/24 ヶ月間にわたるこの併合試験で得られた結果について、重要な所見を以下の Table 4.8 にまとめた。

Table 4.8: Combined chronic toxicity/carcinogenicity study, 12/24 months in drinking water, Wistar rat

<p>Wistar rat main/ satellite group (50/10m; 50/10f)</p> <p>5, 20, 80 ppm</p> <p>main/ satellite group (m: 0.2/0.3, 1.0/1.1, 3.7/4.5 mg/kg bw/d;</p> <p>f: 0.4/0.4, 1.6/1.6, 6.2/6.2 mg/kg bw/d)</p>	<p>Satellite groups (12 months of treatment):</p> <p>20 ppm: ↑ degree/severity of hemosiderin deposits in the spleen (m)</p> <p>80 ppm: blood: ↓RBC (m/f), ↓Hb (m/f), ↓HCT(m/f), ↑MCV (f), ↑MCH (f), ↑PLT (f), (↑)RET (m/f), (↑)Heinz bodies (m/f), (↑) Howell-Jolly bodies (m/f)</p> <p>spleen: ↑ weight, abs/rel (m/f), (↑)congested vessels (m/f), (↑)degree/severity of hemosiderin deposits (m/f), (↑)degree of extramedullary hematopoiesis (m/f)</p>
	<p>Main groups (24 months of treatment):</p> <p>20 ppm: (↑)degree/severity of hemosiderin storage in the spleen (f)</p> <p>80 ppm: blood: (↑)Howell-Jolly bodies (m/f), anisocytosis (m), microcytosis (m), (↑)polychromasia (f);</p> <p>spleen: ↑weight (abs/rel) (f), (↑)angiomatous hyperplasia (m/f), (↑)congested vessels (m/f), (↑)degree/severity of hemosiderin storage (m/f), (↑)degree of extramedullary hematopoiesis (m/f),</p> <p>liver: (↑)degree of diffuse hemosiderin storage (m/f)</p> <p>bone marrow: (↑)degree of hematopoiesis (m/f)</p> <p style="text-align: right;">BASF, 2001</p>

↑: statistically significant increase compared with controls; (↑): increase compared with controls, no statistically significant but possibly of toxicological relevance; ↓: statistically significant decrease compared with controls; (↓): decrease compared with controls, no statistically significant but possibly of toxicological relevance; m: male; f: female; RBC: Erythrocyte count; Hb: Haemoglobin; HCT: Hematocrit; MCV: Mean corpuscular volume; MCH: Mean corpuscular haemoglobin; PLT: Platelet count; RET: Reticulocyte count

結論として、BHAS を 80 ppm の濃度で雄および雌ラットに長期間飲水経口投与すると、溶血性貧血が引き起こされる。そして、その貧血は、赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘ

マトクリット値の有意な減少、さらに MCV、MCH の増加、ならびに、末梢血中のハインツ小体、ハウエル・ジョリー小体および網状赤血球数の増加を特徴としていた。これらの有害影響に伴って、脾臓重量の増加、骨髄の赤血球再生増高、および脾臓や肝臓における髄外造血の増高が観察された。20 ppm(雄で約 1.0 mg/kg/日、雌で約 1.6 mg/kg/日に相当)群では、それぞれ投与 12 ヶ月時の雄および投与 24 ヶ月時の雌において、脾臓中のヘモジデリン沈着および溶血症状が、対照群と比較して、有意に増高していた。5 ppm 群のラットでは、血液に対する毒性影響は何も認められなかった。したがって、全身的影響に関する NOAEL は 5 ppm とされたが、この濃度は、BHAS の 1 日当たりの平均摂取量としては、雄においては約 0.2/0.3 mg/kg/日、雌においては約 0.4 mg/kg/日に相当する。局所的な毒性影響は、最高用量の 80 ppm、すなわち雄で約 3.7 mg/kg/日、雌で約 6.2 mg/kg/日に相当する用量を投与されたラットにおいて、何も認められなかった(BASF, 2001)。

12/52 週間試験(マウス)

過去に、4 週齢の Swiss-Webster マウスを用いた亜慢性毒性試験が行われている。雄 8 匹を 1 群とし、BHAS(純度：市販等級)が、0、10 または 20 mmol/L(飲水量を体重の 15%として計算すると 0、100 および 200 mg/kg/日に相当)の濃度で、連続 12 週間飲水投与された。さらに、雄 4 匹の群を 2 つ設け、12 週間の投与を行い、投与終了後 8 週間ないしは 18 週間の回復期間を置く群として割り振った。血液学的検査を、投与期間の終了時、ならびに影響の可逆性を検討するための回復期間の終了時に実施した。剖検では、動物の肉眼検査、および肝臓、脾臓などの主要臓器の重量測定を行った(それ以上のデータ無し)。臓器や組織を採取し、組織病理学的検査用の標本を作製した。被験物質が投与されたマウスの体重増加量は、両用量群とも BHAS の投与によって影響を受けることはなかった。血液学的検査により、赤血球数の減少および白血球数の増加が判明し、検査の際には、多くの細胞残屑も認められた。肝臓重量は、顕著に増加していた。これらの影響は、8 もしくは 18 週間の回復期間終了時には、観察されなくなっていた。要約すると、BHAS を 100 mg/kg/日以上用量で雄マウスに 12 週間反復投与することにより、貧血、白血球増多症および脾腫が起こった。これらの影響は、8 および 18 週間後には消失した。

この試験の結果に基づくと、100 mg/kg/日が、雄マウスに対する全身的影響に関する BHAS の LOAEL であると考えられる。試験デザイン上、雄マウスについての NOAEL は、確立することができなかった。局所的な毒性影響は、最高用量の 200 mg/kg/日を投与されたマウスにおいても、何も認められなかった(Yamamoto et al., 1967)。

これと同じ試験報告の中で、Swiss-Webster マウスの雄および C3H/HeN マウスの雌における、BHAS の慢性影響ならびに発がん性についての記載がなされている。Swiss-Webster マウスの雄および C3H/HeN マウスの雌における、BHAS による非腫瘍性変化に関する情報は、

4.1.2.8 項に詳細に記載している。

これらの試験では、BHAS(純度:市販等級)が、0、10 または 20 mmol/L(飲水量を体重の 15% として計算すると 0、100 および 200 mg/kg/日に相当)の濃度で、両系統のマウスに対して飲水投与された。雄の場合は各群 5 匹、雌の場合は各群 10 匹で、両用量とも 52 週間の投与が行われた。雌マウスについては、投与終了後、各群から 5 匹を選び、104 週齢になるまで純水を与えた。BHAS を 52 週間摂取した Swiss-Webster マウスおよび C3H/HeN のほぼ 50% が、脾臓における骨形成を示した。この所見は、12 週間の投与を受けたマウスでは認められていない。供試マウスの状態や外観は、概して対照群のものよりも良好に思われた。

要約すると、BHAS を 200 mg/kg/日の用量で、マウス(雄および雌)に 52 週間飲水投与させることにより、脾腫と貧血が引き起こされ、また、100 mg/kg/日の場合は脾臓における骨形成が起こった。雄および雌マウスにおける全身的影響に関する NOAEL は、確立することができなかった。局所的な毒性影響は、最高用量の 200 mg/kg/日を投与された雄マウスにおいても雌マウスにおいても、何も認められなかった(Yamamoto et al., 1967)

In vitro 試験

データは得られていない。

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 反復投与毒性のまとめ

BHAS に反復曝露された場合の毒性データは、ヒトに関しては得られていない。

BHAS への吸入もしくは経皮曝露による毒性試験のデータは、何も得られていない。

実験動物における BHAS の反復投与毒性に関するデータは、経口曝露による試験報告から得られている。それらの試験は、92/32/EEC の付属書 VIIA に基づく規制 793/93/EEC の要件、および 67/548/EEC の付属書 V の方法に、それぞれ整合しているとみなされた。それらのデータから、経口投与による全身的影響に関する NOAEL を導出することができる。

BHAS により引き起こされる毒性のプロファイルは、血液毒性と血液毒性の結果生じる臓器病変が主であり、循環血中の赤血球の割合低下(総赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の減少として表される)や、骨髄ならびに脾臓と肝臓による赤血球再生の増加を特徴としていた。血液への毒性影響の重篤度ならびに発生率は、用量関連性や曝露時間関連性を有していると思われた。これらの影響は、健康を脅かす重大なものと考えられた。

ラットでは、BHAS を 80 ppm の濃度(雄で 3.7 mg/kg/日、雌で 6.2 mg/kg/日に相当)で 12 ヶ月にわたり長期飲水投与した場合、雌雄で貧血が生じ、赤血球数やヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の減少、さらにはハインツ小体やハウエル・ジョリー小体および網状赤血球の増加が観察された。また、骨髄中の造血および脾臓や肝臓における髄外造血が増高し、脾臓の腫大化も生じた。投与 24 ヶ月でも、ハインツ小体やハウエル・ジョリー小体ならびに末梢血中での網状赤血球の出現など、赤血球の特異的な形態学的変化と、それに伴って、骨髄での造血亢進を示す雌雄のラット数の増加が認められた。溶血の別の徴候である、ヘモジデリン沈着の増高が、20 ppm 以上の群で認められ、これは、雄では約 1.1 mg/kg/日以上、雌では約 1.6 mg/kg/日以上に相当する用量であった(BASF, 2001)。BHAS を、50 ppm 以上の濃度(4 mg/kg/日以上に相当)で、ラットに 3 ヶ月間飲水投与した場合でも、雌雄において、メトヘモグロビン血症を伴う溶血性貧血(用量関連性有り)および脾臓と肝臓の重量増加が引き起こされ、ヘモジデリン沈着の増加が両臓器の組織病理学的所見として得られた(BASF, 1992b)。溶血性貧血と脾腫は、共に、100 ppm 以上の濃度で 4 週間 BHAS への反復経口曝露を行った際に、顕著に認められた毒性徴候であった。400 ppm 以上では、これらの所見は、チアノーゼ、赤血球パラメータの変化(メトヘモグロビン量の増加、ハインツ小体の出現、ならびに、網状赤血球など未熟な様相の赤血球細胞の増加や白血球すなわち好中球、好酸性顆粒球、リンパ球および単球の増加などによる、血液細胞構成のシフト)や、血漿の生化学的組成の変化、ならびに、脾臓、肝臓および腎臓における関連性のある毒性影響が認められた(BASF, 1989)。この試験では、脾臓や肝臓におけるヘモジデリン沈着が散見された。溶血性の影響に呼応して、網状赤血球数が増加し、骨髄や髄外部位(主として脾臓)における造血活性が上昇していた。

マウスを用いた試験では、血液が主要な標的組織でありことが示され、ラットを用いた試験での観察所見と合致していた。ただし、マウスはラットよりも、BHAS に対する感受性が低いように思われた。血液毒性影響を特徴付ける所見の情報を得るために研究施設で観察が行われ、脾臓における所見が、Swiss-Webster マウスを用いた亜慢性および慢性試験により報告されている。しかし、メトヘモグロビン血症や臨床生化学的検査に関するデータは示されていない。Swiss-Webster マウスに、BHAS を、100 mg/kg/日以上の用量で 12 週間飲水投与した際には、総赤血球数の減少および白血球数の増加が引き起こされ、それは多量の細胞残屑出現および脾臓重量の増加を伴うものであったが、8 週間以上の回復期間での可

逆性を示した。200 mg/kg/日の用量を 52 週間投与した場合には、脾臓の腫大と貧血が引き起こされ、また 100 mg/kg/日では、脾臓での骨形成が引き起こされた (Yamamoto et al., 1967)。

無影響量もしくは無影響濃度 (NOAEL/NOAEC)

経口

全身影響/非腫瘍性所見に関する適切な NOAEL を導出し、リスク評価のための算出を行う際の根拠として用いるため、1 つの NOAEL を、90 日間試験 (BASF, 1992b) と慢性毒性/発がん性の併合試験 (BASF, 2001) の両方から導出した。これらの試験は両方とも、Wistar ラットを用いた飲水試験として実施され、標準的な反復投与毒性試験のプロトコルに整合しており、規制 793/93/EEC の要項を満たすものとみなされた。これらの試験は、特異的な染色を用いた顕微鏡学的検査など、血液学的パラメータに関する感受性の高い検査が実施され、また、赤血球の新陳代謝に則した長期の投与がなされているため、全身影響に関する NOAEL を確立するには、最も意義のあるものと考えられた。両試験とも、同じ有害影響について評価が行われ、そこから別々の NOAEL を導出することができた。飲水投与により BHAS を亜慢性もしくは慢性経口投与すると、溶血毒性影響が引き起こされた。血液毒性の重症度ならびに発生率は、用量関連性および曝露時間関連性を示しているように思われた。雌雄のラットの NOAEL として、90 日間の亜慢性飲水投与試験からは、10 ppm (約 0.9 mg/kg/日に相当) が導出され、慢性毒性/発がん性の併合試験からは、5 ppm (雄では約 0.2 mg/kg/日、雌では約 0.4 ppm に相当) が導出された。他にも、中期や長期試験の情報が得られ、それらの多くはラットやマウスにおける飲水投与試験であったが、既存の化学物質の基礎データを得る試験としての規制要項を完全に満たすものではなかった。結論としては、BHAS による全身的影響に関する最も小さくまた最も保護的な NOAEL_{sys} として、Wistar ラットに 24 ヶ月間飲水投与を行った慢性毒性/発がん性の併合試験 (BASF, 2001) から導出された 5 ppm (雄では約 0.2 mg/kg/日、雌では約 0.4 ppm に相当) を、リスクの総合評価に採用すべきであると考えられる。消化管での局所的影響に関しては、同じ試験から、NOAEL_{local} を導出することができた。90 日間の亜慢性飲水投与試験 (BASF, 1992b) における最高濃度の 250 ppm (21 mg/kg/日) でも、慢性毒性/発がん性の併合試験 (BASF, 2001) における最高濃度の 80 ppm (雄で 4.5 mg/kg/日および雌で 6.2 mg/kg/日) でも、消化管での有意な局所的影響は認められなかった。

慢性毒性/発がん性併合試験

24 ヶ月間 (飲水投与) 試験/Wistar ラット

NOAEL_{sys}: 5 ppm、雄 0.2 mg/kg/日および雌 0.4 mg/kg/日 (BASF, 2001)

NOAEL_{local}: 80 ppm、雄 4.5 mg/kg/日および雌 6.2 mg/kg/日 (BASF, 2001)

現在まで、BHAS は、有害と分類され、Xn, R48/22(有害:飲み込んで長期曝露されるとひどく健康が損なわれる危険性有り)と表記されてきている。提示したデータに基づき、現行のBHAS に関する分類が支持される。

4.1.2.7 変異原性

4.1.2.7.1 *In vitro* 試験

In vitro 変異原性試験：細菌を用いた遺伝毒性試験

BHAS については、細菌での遺伝毒性の報告は得られていない。米国国家毒性プログラムによれば(NTP, 2006)、BHAS はサルモネラ変異原性試験で陰性を示したが、その報告書を得ることができない。BHAS についての適切な情報を欠いているため、塩酸ヒドロキシルアミンについてのデータを検討する(その正当性については 4.1.2 章の冒頭を参照)。

ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)の TA 97、TA 98、TA 1535 株を用いた試験において、塩酸ヒドロキシルアミンは、細菌の遺伝子突然変異の誘発に関し、S-9 mix 存在下では 2000 µg/plate の用量まで、S-9 mix 非存在下では 667 µg/plate の用量まで、陰性を示した(Wang, 1977; Rosenkranz and Poirier, 1979; Dunkel et al. 1984; Zeiger et al. 1992)。ネズミチフス菌の TA 1537、TA 1538 株ならびに大腸菌(*Escherichia coli*) WP2uvrA 株を用いた試験でも、S-9 mix の存在下および非存在下で、333.3 µg/plate の濃度まで、陰性結果が得られた(Rosenkranz and Poirier, 1979; Dunkel et al. 1984)。

ネズミチフス菌の TA 100 株を用いた試験において、塩酸ヒドロキシルアミンは、S-9 mix の存在下および非存在下で、333.3 µg/plate の用量まで、陰性を示した(Dunkel et al. 1984)。Zeiger et al.(1992)によれば、TA 100 株において、S-9 存在下で 200 µg/plate の用量まで陰性結果が得られたが、333 µg/plate 以上の用量では、わずかに陽性が示された。具体的には、アルクロールで誘導したラットの肝 S-9 mix を用いた場合には、333 µg/plate 以上の用量において、9 回の試行のうち 3 回でわずかな陽性反応が誘発された。その反応は、用量依存的であると思われ、陰性対照に対する遺伝子突然変異誘発係数の最大値は、1.7 である。アルクロールで誘導したハムスターの肝 S-9 mix を用いた場合には、6 回の試行において、陰性もしくはどちらともとれる結果が得られた。細胞毒性は、500 µg/plate 以上で認められた。S-9 mix を用いない場合は、2 回の試行において、試験した最高用量である 667 µg/plate まで、陰性結果が得られており、333 µg/plate 以上の用量では細胞毒性が誘発された。

Wang(1977)は、ネズミチフス菌 TA 100 株において、S-9 mix の存在下および非存在下で、

EURAR 110 BIS(HYDROXYLAMMONIUM)SULFATE

塩酸ヒドロキシルアミンが陰性であったことを報告している。しかし、最大で 0.034 µg/plate という低濃度しか試験していないため、それらの結果の信頼性には問題がある。

大腸菌 K12 株を用いた試験で、塩酸ヒドロキシルアミンは、S-9 mix 非存在下での 20 分間のインキュベーションにより、1 mol/L (69500 µg/mL) という非常に高い濃度において、細菌遺伝子の突然変異誘発に関し、陽性を示した。細胞毒性に関するデータは提示されていない (Sledziewska-Gojska et al. 1992)。

大腸菌 polA 株を用いた DNA 修復試験では、塩酸ヒドロキシルアミンは、S-9 mix 非存在下において、唯一の試験濃度である 500 µg/mL で、陰性を示した。細胞毒性に関するデータは提示されていない (Rosenkranz and Poirier 1979)。

細菌を用いた遺伝毒性試験の要約

BHAS の細菌に対する遺伝毒性のデータは得られていない。ヒドロキシルアミンやその塩酸塩は、細菌を用いた遺伝毒性試験のほとんどで陰性を示した。ネズミチフス菌 TA 100 株では、高用量でわずかな陽性が示された。大腸菌では、非常に高用量においてのみ、陽性が示された。

Table 4.9: Overview on bacterial genotoxicity tests

Test system	Dose range		Result	Toxicity	Test substance	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix				
Gene mutations, Salm. typh. TA 98 and TA 100	not done	0.1 - 0.5 $\mu\text{mol/plate}$ (0.007 - 0.034 $\mu\text{g/plate}$)	negative	no data	hydroxylamine hydrochloride	Wang 1977
Gene mutations, Salm. typh. TA 1535, TA 1538	25 – 250 $\mu\text{g/plate}$	25 – 250 $\mu\text{g/plate}$	negative	none	hydroxylamine hydrochloride	Rosenkranz and Poirier 1979
Gene mutations, Salm. typh. TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538; E. coli WP2uvrA	0.3 - 333.3 $\mu\text{g/plate}$	0.3 - 333.3 $\mu\text{g/plate}$	negative	at high doses	hydroxylamine hydrochloride	Dunkel et al. 1984
Gene mutations, Salm. typh. TA 97, TA 98, TA 100, TA 1535	33 – 2,000 $\mu\text{g/plate}$	10 – 667 $\mu\text{g/plate}$	equivocal	at high doses	hydroxylamine hydrochloride	Zeiger et al. 1992
Gene mutations, E. coli K12	not done	1 mol/l (69,500 $\mu\text{g/ml}$)	positive	no data	hydroxylamine hydrochloride	Sledziewska-Gojska et al. 1991
DNA repair test, E. coli polA	not done	500 $\mu\text{g/ml}$	positive	no data	hydroxylamine hydrochloride	Rosenkranz and Poirier 1979

***In vitro* 変異原性試験：哺乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験**

マウスリンフォーマ試験のデータが 2 件得られており、塩酸ヒドロキシルアミンにより、S-9 mix 存在下および非存在下で、弱い陽性反応が導かれた (Myhr and Caspary 1988; Mitchell et al. 1988)。この陽性結果には、再現性が認められ、また用量依存性が示された。2 件とも、処置時間は 4 時間で行われた。S-9 mix 存在下の場合は、12.5～583 $\mu\text{g/mL}$ の用量で実施され、最小作用量 (LOED) は、200～410 $\mu\text{g/mL}$ の範囲であった。S-9 mix 非存在下の場合は、3.9～205 $\mu\text{g/mL}$ の用量で実施され、LOED は、31～67 $\mu\text{g/mL}$ の範囲であった。突然変異の最大発生率は、対応する陰性対照での値の 2～4 倍であった。2 件の内 1 件では、S-9 mix 非存在下で細胞毒性が認められた。

Table 4.10: Overview on mammalian cell gene mutation tests

Test system	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Test subst.	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix					
Mouse lymphoma assay	12.5 – 300 µg/ml	3.9 – 175 µg/ml	positive	without S-9 mix: 175 g/ml	4 h treatment	hydroxylamine hydrochloride	Myhr and Caspary 1988
Mouse lymphoma assay	262 – 583 µg/ml	67 – 205 µg/ml	positive	no toxic effects	4 h treatment	hydroxylamine hydrochloride	Mitchell et al. 1988

***In vitro* 変異原性試験：哺乳類細胞を用いた染色体異常試験**

染色体異常誘発に関する試験の情報が、塩酸ヒドロキシルアミンについて得られている。4件の試験のデータが得られているが、それらの全てにおいて、S-9 mix が用いられていない、陽性対照が設けられていないなど、方法論的に非常に不十分な点があった。さらに、染色体異常にギャップを含めているのかいないのかについての区別がなされていなかった。3件の報告書(Borenfreund et al. 1964; Brogger 1971; Gupta and Sharma 1982a)では、陽性であると報告され、1件(Oppenheim and Fishbein 1965)では、陰性であると報告されている。

Brogger(1971)は、塩酸ヒドロキシルアミンによる染色体異常に関する影響について、ヒトのリンパ球を用い、25~100 µg/mL の用量で、分析を行った。3回の試行が行われたが、そのうちの2回は、陰性対照での染色体異常発現頻度が、15%および7.0%と非常に高かったため、検討の対象から外された。残りの試行では、25、50 ないしは 100 µg/mL の用量において、4、6、12 もしくは 24 時間の曝露を行った場合に、陽性という結果が得られた。影響には用量依存性が見られ、染色体異常の最大頻度は15%であった(陰性対照での値は1.0%)。50 および 100 µg/mL の用量では、細胞毒性が誘発された。

Borenfreund et al.(1964)は、メチルコラントレンにより誘発した腫瘍を起源とする Chinese ハムスターの株化細胞を対象として、塩酸ヒドロキシルアミンの染色体異常誘発性を検討した。試験した用量は0.072 µmol/L(5.0 µg/mL)だけであったが、その用量で誘発された染色体異常発現頻度は13%で(陰性対照では5.0%)、有糸分裂活性は約40%減少した。

Gupta and Sharma(1982a)は、塩酸ヒドロキシルアミンが、インドホエジカのリンパ球において、染色体異常を誘発したことを報告している。25 および 50 µg/mL の濃度への1時間曝露により、染色体異常の発生頻度増加が認められた。細胞毒性のデータは示されていない。

Oppenheim and Fishbein(1965)は、塩酸ヒドロキシルアミンによるヒト白血球における染色体損傷を検討し、47～500 $\mu\text{mol/L}$ (4.6～34.5 $\mu\text{g/mL}$)の用量範囲では陰性であったことを報告している。著者は、この陰性結果は、技術的な要因によると推測している。白血球試料に赤血球の混入が認められた。塩酸ヒドロキシルアミンは、ヘモグロビンと接触すると即座に分解されるため、2～3%の混入でも、ヒドロキシルアミンの用量を低減させるのには十分である。

Table 4.11: Overview on mammalian cell chromosomal aberration tests

Test system	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Test subst.	Reference
	With S-9 mix	without S-9 mix					
Chrom. aberrat., human lymphocytes	not done	25 – 100 $\mu\text{g/ml}$	positive	from 50 $\mu\text{g/ml}$ upwards	inadequate methodology	hydroxylamine hydrochloride	Brogger 1971
Chrom. aberr., Chinese hamster tumour cell line	not done	72 $\mu\text{mol/l}$ (5.0 $\mu\text{g/ml}$)	positive	toxic effects	inadequate methodology	hydroxylamine hydrochloride	Borenfreund et al. 1964
Chrom. aberrat., lymph. of Indian muntjac	not done	25 – 50 $\mu\text{g/ml}$	positive	no data	inadequate methodology	hydroxylamine hydrochloride	Gupta and Sharma 1982a
Chrom. aberrat., human lymphocytes	not done	67 – 500 $\mu\text{mol/l}$ (4.6 - 34.5 $\mu\text{g/ml}$)	negative	unclear effects	inadequate methodology	hydroxylamine hydrochloride	Oppenheim and Fishbein 1965

***In vitro* 変異原性試験：哺乳類細胞を用いた姉妹染色分体交換試験**

塩酸ヒドロキシルアミンについて、*in vitro* での姉妹染色分体交換 (SCE) 誘発試験データが得られている。2件の試験において、陽性結果が報告されている (Speit et al. 1980; Gupta and Sharma 1982b)。両試験とも、重大な方法論的難点を抱えていた (S-9 mix 不使用、陽性対照が置かれていないなど)。

Speit et al (1980)は、塩酸ヒドロキシルアミンが、 10^{-5} ～ 5×10^{-3} mol/L (0.7～345 $\mu\text{g/mL}$)の用量範囲で、V79細胞に対し、弱い陽性影響を及ぼしたことを報告している。 10^{-5} mol/L ～ 5×10^{-4} mol/L (0.7～34.5 $\mu\text{g/mL}$)の用量では、SCE頻度が、27時間の連続処置後、わずかに上昇した。これより高用量の 10^{-3} mol/L ～ 5×10^{-3} mol/L (69～345 $\mu\text{g/mL}$)では、極端な細胞毒性

EURAR 110 BIS(HYDROXYLAMMONIUM)SULFATE

が示されたため、処置時間は 1 時間に限定された。その結果、やはり弱い影響が引き起こされ、SCE の最大頻度は、陰性対照の値の 1.5 倍であった。

塩酸ヒドロキシルアミンは、インドホエジカのリンパ球においても、わずかに陽性を示した (Gupta and Sharma 1982b)。被験用量の 25 µg/mL で、1 時間の処置後、SCE 頻度が約 1.5 倍に増加した。細胞毒性のデータは示されていない。

Table 4.12: Overview on mammalian cell SCE tests

Test system	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Test subst.	Reference
	With S-9 mix	without S-9 mix					
V79 cells	not done	10 ⁻⁵ - 5x10 ⁻³ mol/l (0.7 - 345)	positive	from 10 ⁻³ mol/l (69 µg/ml upwards)	weak effect; inadequate methodology	hydroxylamine hydrochloride	Speit et al. 1980
Lymphocytes of Indian muntjac	not done	25 µg/ml	positive	unclear effects	weak effect; inadequate methodology	hydroxylamine hydrochloride	Gupta and Sharma 1982b

In vitro 変異原性試験：哺乳類細胞を用いた不定期 DNA 合成試験 (UDS 試験)

塩酸ヒドロキシルアミンは、最高 1000 µg/mL の用量まで、ラットの初代肝細胞における不定期 DNA 合成 (UDS) 誘発は陰性であった (Williams et al. 1982)。全般的に、高用量側では細胞毒性が示された。DNA の修復合成は、オートラジオグラフィにより測定された。

Table 4.13: Overview on mammalian cell UDA tests

Test system	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Test subst.	Reference
	With S-9 mix	without S-9 mix					
Primary rat hepatocytes	not done	100 - 1000 µg/ml	negative	total toxic at 2000 µg/ml	autoradiography procedure	hydroxylamine hydrochloride	Williams et al. 1980

4.1.2.7.2 *In vivo* 試験

In vivo 変異原性試験：げっ歯類の骨髄を用いた試験

げっ歯類の骨髄を用いた BHAS の小核形成試験のデータが得られている (BASF 1992a; Litton Bionetics, Inc. 1980)。また、塩酸ヒドロキシルアミンについて、染色体異常試験により検討が行われている (Volgareva 1991)。

マウスの多染性赤血球での小核試験で、BHAS が 300、600 および 1200 mg/kg の用量で単回経口投与されたが、結果は陰性であった (BASF 1992a)。この試験では、16、24 および 48 時間後に試料採取が行われた。どの用量でも、毒性の徴候が認められた。局所的な細胞毒性影響 [多染性赤血球/正染性赤血球比 (PCE/NCE 比)] は、明確ではなかった。各群に割り当てられたマウスは、雌雄 5 匹ずつであった。予備試験では、1400 mg/kg/日 で、致死作用が観察された。

BHAS が経口投与された別の *in vivo* 小核試験でも、陰性結果が得られている (Litton Bionetics Inc. 1980)。ただし、この試験では、15.6 および 125 mg/kg の低用量のみでしか検討が行われていない (これらの用量が 2 分量に分けられて投与されたのか 2 回投与されたのかについて、明確な記載がない)。試料は、最後の投与から 6 時間後に採取された。各群に割り当てられたマウスは、雌雄各 4 匹ずつであった。毒性に関するデータは、示されていない。細胞毒性は生じなかった。低用量しか調べられなかったため、この試験の結果の重要性は、比較的低い。

マウスにおける塩酸ヒドロキシルアミンの *in vivo* 染色体異常誘発性試験が行われており、6.7 ないしは 67 mg/kg の用量で、単回腹腔内投与が行われたが、結果は陰性であった。最高被験用量は、LD₅₀ の 1/3 であった。各群に割り当てられたマウスは、5 匹だけであった (性別不詳)。試料採取は、24 および 48 時間の時点で行われた。毒性影響に関するデータは、示されていない。

げっ歯類の骨髄を用いた試験の要約

げっ歯類の骨髄細胞では、BHAS は、小核形成を誘発しなかった。塩酸ヒドロキシルアミンも、染色体異常を誘発することはなかった。

Table 4.14: Overview on rodent bone marrow tests with mice

Test system	Doses	Expos. regime n	Sampl. times	Result	Local cytoto x.	Gener al toxicity	Test subst.	Referenc e
Micronucle us test	300 – 1200 mg/kg	1 x p.o.	16, 24, 48 h	negative	no effect	toxic effect at all doses	BHAS	BASF 1992a
Micronucle us test	15.6 – 125 mg/kg	2 x p.o.	6 h after second applicati on	negative	no effect	no data	BHAS	Litton Bio- netics, Inc. 1980
Chromosom al aberrations	6.7 – 67 mg/kg	1 x p.o.	24 and 48 h	negative	no data	no data	hydroxyl- amine hydrochlo- ride	Volgarev a 1991

In vivo 変異原性試験：げっ歯類の生殖細胞を用いた試験

BHAS について、げっ歯類の生殖細胞を用いた試験のデータが得られている。

マウスを用いた優性致死試験において、BHAS が 102 および 112 mg/kg の用量で単回腹腔内投与されたが、早期胎仔死亡および着床前損失に関し、陰性結果が導かれた (Epstein et al. 1972)。この結果については、詳細な記述はなされていない。各群に 7~9 匹の雄マウスが割り当てられ、処置を受けた各雄は、未処置の 3 匹の未交配雌と一緒にケージ飼養された。未交配雌の入れ替えを、毎週、8 週間連続で実施した。陽性および陰性対照群は、設けられなかった。LD₅₀ および LD₂₅ に相当する用量設定で行われた。

げっ歯類の生殖細胞を用いた試験の要約

BHAS を用いた優性致死試験では、陰性結果が報告されている。

Table 4.15: Overview on rodent germ cell tests with mice

Test system	Doses	Expos. regime	Sampl. times	Result	Local cytotox.	General toxicity	Test subst.	Reference
Micronucleus test	300 – 1200 mg/kg	1 x p.o.	16, 24, 48 h	negative	no effect	toxic effect at all doses	BHAS	BASF 1992a

***In vivo* 変異原性試験：昆虫を用いた遺伝毒性試験**

BHAS と塩酸ヒドロキシルアミンについて、キロショウジョウバエを用い、様々な遺伝学的評価項目に関し試験が行われている (Parkash and Miglani 1978) (Fahmy and Fahmy 1970; Vijaykumar and Jain 1978; Graf et al 1989)。塩酸ヒドロキシルアミンについては、バッタにおいても試験が実施されている (Bhattacharya et al. 1986)。それら全ての試験において、重大な方法論的難点が認められている (陽性および陰性対照が設けられていないなど)。さらに、ショウジョウバエを用いた試験では、試験の方法論的な詳細は、Graf et al. (1989) の報告でしか示されていない。

塩酸ヒドロキシルアミンは、ショウジョウバエを用いた体細胞変異組換え試験 (SMART) において、陽性を示した (Graf et al. 1989)。90 もしくは 120 mmol/L (6219 および 8280 µg/mL に相当) の濃度で 48 時間給餌したところ、大小の単斑点や双斑点の出現頻度が、有意に上昇した。

Parkash and Miglani (1978) によれば、BHAS は、ショウジョウバエの唾液腺細胞において、染色体逆位を誘発した。

ショウジョウバエを用いた伴性劣性致死試験 (SLRL 試験) では、0.03 mmol/L (2070 µg/mL) の用量の塩酸ヒドロキシルアミンを給餌したところ、陽性結果が得られたと報告されている (Vijaykumar and Jain 1978)。

Fahmy and Fahmy (1970) は、塩酸ヒドロキシルアミンについてショウジョウバエの優性致死試験を実施し、0.1 mol/L (6900 µg/mL) の給餌で陰性であったことを報告している。

Bhattacharya et al. (1986) は、バッタ (*Spathosternum prasiniferum*) の精母細胞における染色体への影響の誘発に関して報告している。20 匹の雄の腹部に、0.1 mol/L の塩酸ヒドロキシルア

ミン溶液 50 µL が、単回注入された(一匹につき 0.345 mg/50µL)。その処置の 36 時間後、次に示す影響が、290 個の I 次精母細胞(バツタの数は示されていない)の分析により観察された。細胞の 7% で染色体架橋(陰性対照では 0%) ; 13% で「染色体切断」(陰性対照では 0%) ; 7.2% で断片化(陰性対照では 0%) ; 2.1% で染色体のけぼだち(陰性対照では 0.7%)。陰性対照は、562 個の精母細胞からなり、それらは異なる 2 種類のバツタ (*Spathosternum prasiniferum* および *Phleoba infumata*) 由来のものであった。陽性対照や毒性のデータは示されていない。全体的には、陽性所見の信頼性は低い。

昆虫を用いた遺伝毒性試験の要約

昆虫においては、妥当性が十分な遺伝毒性所見は見当たらない。しかし、様々な試験・検討データを考慮すると、BHAS は、昆虫における変異原性を有すると結論付けられそうである。

Table 4.16: Overview on genotoxicity tests with insects

Test system	Doses	Exposure period	Result	Remarks	Test subst.	Reference
Drosophila; somatic cell genotoxicity	90 -120 mmol/l (6'210 - 8'280 µg/ml); Feeding	48 h	positive	somatic mutation and recombination test (SMART)	hydroxylamine hydrochloride	Graf et al. 1989
Drosophila; somatic cell genotoxicity	454 µg/ml; feeding	not given	positive	induction of inversions; methodological insufficiencies	BHAS	Parkash and Miglani 1978
Drosophila; germ cell genotoxicity	0.03 mol/l (2'070 µg/ml); Feeding	not given	positive	sex-linked recessive lethal test (SLRL test); methodological insufficiencies	hydroxylamine hydrochloride	Vijaykumar and Jain 1978
Drosophila; germ cell genotoxicity	174 µg per insect; microinjection	not given	negative	test on dominant lethals; methodological insufficiencies	hydroxylamine hydrochloride	Fahmy and Fahmy 1970
Grasshopper; germ cell genotoxicity	345 µg per insect; abdominal injection	36 h	positive	methodological insufficiencies	hydroxylamine hydrochloride	Bhattacharya et al. 1986

4.1.2.7.3 変異原性のまとめ

BHAS に関しては、*in vitro* の遺伝毒性データは得られていない。*In vivo* 試験については、マウスにおいて、骨髄小核形成試験や優性致死突然変異に関するスクリーニング試験が行われているが、陰性であった。

ヒドロキシルアミンとその塩酸塩は、細菌を用いた遺伝毒性試験において、おおよそ陰性であった。ネズミチフス菌 TA 100 株では、高用量において、わずかな影響が観察され、大腸菌を用いた試験では、極端に高い用量においてのみ、陽性結果が得られた。塩酸ヒドロキシルアミンは、マウスリンフォーマ試験においてわずかに陽性であり、昆虫では遺伝毒性を示すように思われた。しかし、ラット肝細胞における UDS や、げっ歯類の骨髄細胞における染色体異常に関しては、明確な陰性結果が得られている。他のデータは、信頼性や重要性が低かった。

総括すると、BHAS は、遺伝毒性を有していないか、あるいは低い遺伝毒性しか有していないと結論付けられそうである。いずれにせよ、哺乳類においては、*in vivo* で変異原性が示されることは考えにくい。これらのことから、BHAS は変異原性物質に分類されない。

4.1.2.8 発がん性

4.1.2.8.1 動物における試験

In vivo 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

慢性毒性/発がん性の併合試験, 12/24 ヶ月間(ラット)

OECD TG 453 に準拠した、慢性毒性/発がん性に関する標準的な併合試験が実施されている。

EURAR 110 BIS(HYDROXYLAMMONIUM)SULFATE

この試験では、各群雌雄 50 匹ずつの Wistar(Chbb:THOM, SPF)ラットに、BHAS(純度:市販品等級)が、0、5、20 もしくは 80 ppm の濃度で、24 ヶ月間毎日飲水投与された(主試験群)。また、雌雄 10 匹ずつからなる追加群(副試験群)が設けられ、12 ヶ月の投与が行われ、血液学的パラメータの評価が実施された(BASF, report 2001)。各投与濃度は、1 日当たりの BHAS 摂取量としてみると、主試験群の雄では約 0、0.2、1.0 および 3.7 mg/kg/日に、主試験群の雌では 0、0.4、1.6 および 6.2 mg/kg/日に相当していた。また、副試験群の雄では、0、0.3、1.1 および 4.5 mg/kg/日に、副試験群の雌では、0、0.4、1.6 および 6.2 mg/kg/日に相当していた。

BHAS の投与を受けた群では、対照群と比較して、統計学的に有意な体重減少や重大な致死影響はなく、試験期間を通じて、雌雄いずれにおいても、投与に関連した臨床症状は認められなかった。

試験終了の時点では、80 ppm 群の雌において、脾臓の絶対および相対平均重量が、統計学的に有意に増加していた。脾臓の肉眼観察では、80 ppm 群で、腫瘤を認める雄の数が、軽度増加していた。鏡検においても、20 ppm 群および 80 ppm 群の屠殺した雌雄において、脾臓損傷の所見が得られた。対照群と比較して、発生率が増加した腫瘍は、雌雄両方における脾臓の腫瘍だけであった。雌雄のラットで観察されたそれらの腫瘍は、血管肉腫および血管腫と診断された。雄ラットの脾臓における血管肉腫の発生率は、対照群で 4/50 匹であったものが、BHAS 投与群では 5、20、80 ppm の順にそれぞれ 7/50 匹、9/50 匹、8/50 匹に増加していた。血管肉腫を有していたラットのうち、80 ppm 群の雄では 2 匹、対照群の雄では 1 匹に、他の臓器への転移が認められた。雌では、脾臓における血管肉腫の発生率は、対照群や BHAS 投与群にわたり、生物学的に均等であった(0、5、20、80 ppm 群でそれぞれ 2、1、1、3 匹)。一方、血管腫を生じた雌の数は、80 ppm 群でわずかに増加していた(0、5、20、80 ppm 群でそれぞれ 0、1、1、4 匹)。主試験群のラットの脾臓における腫瘍性病変の調査結果を、下表 Table 4.17 に示した。

Table 4.17: Incidence of neoplastic lesions in the spleen from Wistar rats treated with BHAS in the drinking water for 24 months

Neoplastic lesions Dose (ppm)	Male rats				Female rats			
	0	5	20	80	0	5	20	80
Animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Hemangiosarcoma [%]	4 [8]	7 [15]	9 [18]	8 [16]	2 [4]	1 [2]	1 [2]	3 [6]
Hemangioma [%]	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]	1 [2]	1 [2]	4 [8]
Hemangiosarcoma plus Hemangioma [%]	4 [8]	7 [15]	9 [18]	8 [16]	2 [4]	2 [4]	2 [4]	7 [15]

BHAS が投与された全群の雄で、脾臓における血管肉腫の発生率が若干上昇していることが

示された。雄の脾臓における血管肉腫発生率の上昇は軽微なものであり、用量関連性は無く、対照群との相違は統計学的に有意な水準に達していなかったが、この腫瘍型は、BHAS 投与による影響を示していると考えられた。このことは、全ての投与群で見られた脾臓における血管肉腫の発生率が、研究施設内の相応時点における背景対照値よりも全般的に高いという事実により裏付けられ、その背景対照値との比較により、この所見の生物学的な意義が明確にされている。脾臓に原発する内皮腫(血管肉腫または血管腫)の自然発生率は、雄では0~1.5%の間、雌では0~0.5%の間であると、4系統のラットについて言及されている(Losco, 1992)。Wistar ラットの背景対照値(BASF より入手)によれば、雄ラットにおける血管肉腫の発生率は0~10%で、平均3.1%である。雌における血管腫の背景対照発生率は、0~5%で、平均0.6%である。したがって、この発がん性試験の雄ラットの、5 ppm 以上の群で見られた血管肉腫の発生率は、背景対照値の範囲の上端にあることが判明した。このことは、雄において当該所見が生物学的意義を有する可能性を示している。雌においても、最高用量の80 ppm で血管腫の有意な増加が観察されており、やはり生物学的意義を有する可能性が示された。

BHAS を投与されたラットでは、対照群よりも、早期に腫瘍が発生した。

さらに、脾臓においては、次の様な変化が生じていた。すなわち、多形性や有糸分裂活性を欠き、小規模の線維組織により隔てられた正常内皮で覆われた、毛細血管の過形成および拡張である。これらの所見は、血管性過形成と診断され、投与を受けた全群と対照群で観察された。ただし、80 ppm 群の雌雄では、これらの脾臓病変が、高頻度で観察された。これらの所見の発生率を、下表 Table 4.18 に示した。

Table 4.18: Incidence of precursor lesions in the spleen from Wistar rats treated with BHAS in the drinking water for 24 months

Spleen	Male rats				Female rats			
	0	5	20	80	0	5	20	80
Hyperplasia, angiomatous	4	9	4	16	14	13	12	34

持続的な過形成は、腫瘍発生箇所の指標となっている可能性がある。そのため、脾臓におけるこれら血管性過形成の所見は、血管腫瘍(血管腫、血管肉腫)の前駆病変と考えられた。

副試験群(12 ヶ月間処置)においては、腫瘍性変化はほとんど認められず、対照群と BHAS 投与群にわたり、生物学的に同等の発生率で観察された。認められた腫瘍性変化は、偶発的もしくは自然発生的な起源によるものであり、投与とは無関係であると考えられた。

総じて、ラットにおけるこの慢性毒性/発がん性併合試験は、認容される水準を有し、ラットでの発がん性試験に関する指針(OECD TG 453)の要項を満たしている。この標準的な試

験の結果から、BHAS はラットに対し、雄では 5 ppm(約 0.2 mg/kg/日に相当)以上、雌では 80 ppm(約 6.2 mg/kg/日に相当)以上の用量で、発がん性を有することが示された。雄ラットでは、血管肉腫の発生率が、BHAS 投与を受けた全ての群で上昇した。雌では、80 ppm 群の 4 匹に、血管腫が認められた。雄における血管肉腫の発生率も、雌で観察された血管腫の発生率も、背景対照データの範囲を超えていた。脾臓における血管性過形成は、血管腫瘍の前駆病変と考えられ、80 ppm 群の雌雄で、発生数の増加が観察された。これらのことから、本試験では、5 ppm(雄では約 0.2 mg/kg/日、雌では約 0.4 mg/kg/日に相当)が、雌雄のラットの脾臓における腫瘍発生に関する最小用量であると考えられる(BASF, 2001)。

52 週間試験(マウス)

古い報告だが、Swiss-Webster マウスの雄および C3H/HeN マウスの雌に対する BHAS の慢性影響および発がん性についての情報が得られている。4 週齢のマウスに対し、BHAS(純度:市販品等級)が、0、10 もしくは 20 mmol/L の濃度で飲水投与された(飲水量が体重の 15%であると仮定した場合、それぞれ 0、100 および 200 mg/kg/日に相当)。雄 5 匹と雌 10 匹を 1 群とし、BHAS が 52 週間投与された。投与終了後、雌マウスの 1 群に対し、104 週間純水を与えた。1 年間にわたり BHAS を与え続けられたマウスにおいて、腫瘍は何も認められなかった。被験物質の投与を受けたマウスの状態や外観は、概して対照群よりも良好であるように見えた。また、BHAS 水溶液を 1 年間飲み続けた C3H/HeN マウスの雌では、その後 2 年間生残したのものにおいても、乳腺腫瘍の自然発生は認められなかった(Yamamoto et al., 1967)。

最長 50/70 週間試験(マウスおよびラット)

BHAS が腫瘍形成の自然発生を防ぐ機序を明らかとするために、1 件の試験が実施されている。この試験では、未経産の C3H/HeN マウスの雌が用いられ、週齢によった投与計画(試験開始の週齢を 6、13、18、24 および 28 とした)が採られ、計 5 組の検討が独立して行われており、また、投与期間別に被験動物の屠殺(13 週時から 50 週を超えた時点)を行い、乳腺、卵巣、ならびに下垂体の組織学的検査が実施された。それぞれの組で、各被験物質投与群や同時対照群には 5 匹ずつが割り当てられたが、長期間となる群では、被験物質投与群に 16 匹、対照群に 14 匹が割り当てられた。被験物質投与群の動物に対しては、BHAS(純度:市販品等級)が、10 mM 水溶液として、最長 70 週間飲水投与された(用量は約 100 mg/kg/日に相当)。1 週当たりの摂餌量を、消費された飼料を秤量することにより、被験物質投与群ごとおよび対照群ごとに、27 週間測定した。試験の初期には 1 週間に 1 回、その後は 1 週間に 2 回、全ての動物の体重を測定した。腫瘍の発生の有無を確認するために、毎週マウスを触診した。乳腺の延長的な発達への影響、および乳腺や卵巣の形態に対する影響につ

いて評価を行い、BHAS 投与がこれらの器官に及ぼす早期の影響を特定した。試験の趣旨については、4.1.2.9 項を参照のこと。

乳腺腫瘍の自然発生率は、対照群のマウスでは 100%であったのに対し、BHAS の投与開始が 6 週齢であった場合、31%まで減少していた。投与開始が 13 週齢であった場合には、乳腺腫瘍の自然発生率は、40%に減少していた。一方、投与開始が遅かった場合(18 週齢以降)には、腫瘍発生は抑制されなかった。BHAS は、下垂体の大きさや下垂体のプロラクチン含量に対して影響を及ぼした。乳腺腫瘍が存在しない場合、前者は縮小し、後者は増加した。対照群でも、被験物質投与群でも、腫瘍発生率と下垂体のプロラクチン含量との間には、関係性は認められなかった。

要約すると、C3H/HeN マウスの雌に、BHAS の投与を若齢から開始した場合には、乳腺腫瘍の自然発生が抑制されたが、高齢での投与では、そのような影響は認められなかった (Evarts and Brown, 1977)。

これとは別に、未交配の Sprague Dawley ラットの雌を用い、乳腺の形態や 7,12-ジメチルメメンズ[a]アントラセン(DMBA)により誘発される乳腺腫瘍形成に対し、BHAS が及ぼす影響について、検討が行われている。36 日齢のラット 15 匹の群と、64 日齢のラット 25 匹の群を設け、BHAS(純度:市販品等級)を、10 mM の濃度で飲水投与した(用量は約 67 mg/kg/日に相当)。また、2 つの対照群(すなわち 15 匹の群と 25 匹の群)が設けられ、この試験期間中、水道水が与えられた。さらに 1 群を設け、陽性対照群とした。被験物質投与群の 2 群と陽性対照群に対し、50 日齢時に、コーン油を媒体として、11 mg の DMBA を、胃管を介して投与した。乳腺腫瘍の発生の有無を追跡するために、各群の 3~5 匹のラットを定期的に屠殺した(50、69、85 および 210 日齢時)。DMBA の投与の後は、ラットを触診して乳腺腫瘍の有無を調べた。BHAS は、乳腺小葉の過剰な発育(肥大)や分泌亢進を引き起こした。試験の趣旨については、4.1.2.9 項を参照のこと。

BHAS を DMBA での処置後に投与された場合には、腫瘍を生じたラット当たりの腫瘍の数や大きさが減少した。平均潜伏期間は延長した(陽性対照で 63 日であったのに対し 102 日)。DMBA 処置の 2 週間前に BHAS が投与された場合には、影響は認められなかった (Evarts et al., 1979)。

要約すると、100 mg/kg/日の BHAS を、飲水を介し、雌マウスに若齢期から最長 70 週間反復投与したところ、乳腺の萎縮が誘発され、乳腺腫瘍の発生率が低下した。BHAS は、雌マウスに 67 mg/kg/日の用量で飲水を介して反復投与された場合、乳腺の過剰な発育と分泌亢進を引き起こした。BHAS は、7,12-ジメチルメメンズ[a]アントラセン(DMBA)の投与以前に与えられた場合、発がん物質により誘発される初期の破壊的変化がある程度抑えられ、乳

腺の正常な組織構造が護られた。

105/125 週間試験(マウス)

C3H 系の 2 種類のマウスを用い、BHAS の生涯投与が腫瘍発生や寿命に及ぼす影響が調べられている。一方は C3H/HeN 亜系で、この種のマウスは、性細胞にマウス乳腺ウイルス (MMTV) のプロウイルスを保持し、高齢期において中等度に高い確率で、腫瘍を発症する。もう一方は C3H/HeJ(+)亜系で、この種のマウスは乳汁移行型の外因性ウイルスを保持し、若齢期にやはり高率で乳腺腫瘍が引き起こされる。2 回の試行がそれぞれ独立して行われた。1 回目では、C3H/HeN マウスの雌 40 匹に、BHAS が 10 mM の濃度で 123 週間飲水投与され (飲水量が体重の 15%であると仮定すると、1640 mg/L すなわち 246 mg/kg/日に相当)、別の 60 匹が陰性対照に割り当てられた。2 回目では、各群雌雄 50 匹ずつの C3H/HeJ(+)マウスの群が 4 つ(雄の群と雌の群、および各性の陰性対照群)設けられた。ただし、雌の対照群の動物数は 56 匹であった。投与期間は 105 週間であった。投与は、マウスが 6 週齢の時点で開始された。マウスの観察を定期的に行い、触知可能な乳腺結節など、全ての肉眼的変化について記録した。体重は毎週計測した。剖検では、変化の見られた器官全てを書き留めた。全ての実質臓器から標本や試料を作製し、組織病理学的検査に供した。

10 mM(約 246 mg/kg/日に相当)の濃度で BHAS を一生涯にわたり飲水投与しても、雌の C3H/HeN マウスの寿命が有意に延長することはなく、また体重増加量にも影響は現れなかった。対照群のマウスと BHAS を投与されたマウスの両方において、担腫瘍動物数で見ても、腫瘍数で見ても、腫瘍発生率は高かった。乳腺がん、リンパ腫、肺腺腫、肝臓がんおよび卵巣腫瘍が、対照群のマウスと同様に BHAS を投与されたマウスでも観察され、対照群では 14/58 匹(24%)であったのに対し、BHAS 被投与群では 3/36 匹(8.6%)であった。対照的に、脾臓の血管腫瘍は、BHAS 被投与群では 10 匹のマウスで発生したが、対照群では発生は認められなかった。C3H/HeN マウスで見られた様々な腫瘍から少数を選び、発生率を調べた結果を、以下の表 Table 4.19 に示した。

Table 4.19: A small selection of different types of neoplasms in C3H/HeN mice after administration of BHAS for 105 weeks

Doses	0	246 mg/kg bw/d BHAS
Animals examined	58	36
Mammary carcinoma	14	3
Hemangioma (spleen)	0	10

2 回目は、雌雄の C3H/HeJ(+)マウスを用いて実施されたが、105 週間の BHAS 投与を受けた雌マウスでは、対照群と比べてわずかに生残率が低かった。雄マウスでは、雌マウスより

も平均体重が高かった。BHAS の投与により、雄では若干体重減少が生じたが、雌では影響は何も見られなかった。2 回目においても、やはり担腫瘍動物数および腫瘍数の両方の観点からみて、全ての群で、腫瘍発生率は高かった。肝細胞がん、肺腺腫およびリンパ腫が雌雄両方で観察されたが、肝臓がんの発生率は雄の方が高かった (43%)。雌では、乳腺や卵巣の腫瘍が頻発していた。乳腺腫瘍の発生率は、BHAS 被投与群の雌で若干高かった (対照群で 73%であったのに対し 84%)。脾臓の血管腫瘍の発生数は、BHAS 投与により影響を受けることはなかったが、リンパ節の血管腫の発生数は、BHAS 被投与群の雄で有意に高かった。BHAS の投与を受けた C3H/HeJ(+)マウスの雄における担腫瘍動物の数は、対応する対照群における数よりも有意に多かったが、群ごとの腫瘍の数は、それほど相違していなかった。C3H/HeJ(+)マウスで見られた様々な腫瘍から少数を選び、発生率を調べた結果を、以下の表 Table 4.20 に示した。

Table 4.20: A small selection of different types of neoplasms in C3H/HeJ(+) mice after administration of BHAS for 105 weeks

Doses	0	246 mg/kg bw/d BHAS
Animals examined (m/f)	44/44	50/48
Lymphoma (m/f)	0/0	3/5
Hemangioma, Lymph node (m/f)	5/1	1/13
Hepatocellular carcinoma (m/f)	19/4	21/0

要約すると、10 mM (約 246 mg/kg/日に相当) の濃度で BHAS を一生涯にわたり飲水投与すると、C3H/HeN マウスの雌における乳腺腫瘍の発生率はかなり減少したが、C3H/HeJ(+)の雌においてはそのような減少は見られなかった。卵巣の腫瘍や嚢胞の発生は、全ての群 (被験物質投与群および対照群) で均等であり、卵巣の機能障害を示していたが、投与による影響は認められなかった。対照群でかなりの数で見られた他の特発性腫瘍、すなわち肝臓がん、リンパ腫、肺腺腫および副腎皮質腫瘍、の発生率については、投与による影響はほんのわずかであった。しかし、BHAS の投与を受けた C3H/HeN マウスの雌における脾臓の血管腫瘍の発生率の増加、および BHAS の投与を受けた C3H/HeJ(+)の雄におけるリンパ節の血管腫瘍の発生率の増加から、マウスの垂系統に依存した細網内皮系への作用が示唆された。2 年の時点における対照群のマウスの生残率は 35~58% で、どちらの垂系統のマウスでも、BHAS によりそれが上昇することはなかった (Stenbäck et al., 1987)。

In vitro 試験

細胞形質転換試験

細胞形質転換試験のデータは、首尾一貫していない。BHAS については、Balb/3T3 細胞において、陽性反応を示したと報告されているが、塩酸ヒドロキシルアミンについては、この細胞系や SHE 細胞において、陰性であったとするデータが得られている。

BHAS は、Balb/3T3 において、S-9 mix 存在下および非存在下で、細胞形質転換 (type III 増殖巣) を誘発したと記載されている (Microbiological Associates, 1981)。S-9 mix 存在下では、 $2 \sim 3 \times 10^6$ 個の細胞が、10、30 もしくは 100 $\mu\text{g/mL}$ の用量で、2 時間曝露された。30 $\mu\text{g/mL}$ では、type III 増殖巣への形質転換率が増加した (陰性対照が 0.16×10^{-4} であったのに対し 0.82×10^{-4})。10 や 100 $\mu\text{g/mL}$ では、形質転換率は増加しなかった。細胞毒性影響については何も報告されていない。S-9 mix 非存在下では、24 時間の曝露が行われた。3 および 30 $\mu\text{g/mL}$ の用量で細胞形質転換が誘発され、最大形質転換率は、 6.44×10^{-4} であった (陰性対照では 0.15×10^{-4})。10 $\mu\text{g/mL}$ では、陰性結果が得られている。細胞毒性影響が 30 $\mu\text{g/mL}$ で誘発された。

4.1.2.8.2 ヒトにおける試験

ヒトにおける試験・調査データは得られていない。

4.1.2.8.3 発がん性の要約

BHAS の発がん性に関するデータは、ヒトについては得られていない。また、実験動物を吸入もしくは経皮曝露させた場合の発がん性に関する情報は得られていない。

BHAS の発がん性については、経口経路での投与で検証されている。雌雄のラットにおいて、BHAS の発がん活性について、陽性結果が得られている。雌雄のラットを用いた標準的な発がん性試験 (24 ヶ月間飲水投与) において、脾臓に発生した腫瘍数の増加が観察されている (BASF, 2001)。この試験は、ラットにおける慢性毒性/発がん性の併合試験であり、十分な内容を備え、ガイドラインの要項を満たすものである。生残率や体重増加量は、無処置対照群と同等であった。BHAS をラットに 24 ヶ月間飲水投与した場合には、脾臓において、雄では血管肉腫、雌では血管腫の発生率が増加した。これらの腫瘍病変は、投与に関連して生じたものとみなされる。この 24 ヶ月飲水投与試験の結果の概要を、以下の表 Table 4.21

にまとめた。

Table 4.21: Summary table: Tumour responses in the 24-month drinking water study on rats (BASF, 2001)

Species	Study design	TUMOR RESPONSE
Rat Wistar (Chbb; THOM; SPF) 50m/50f	drinking water 24 months 5, 20, 80 ppm (m: 0.2/0.3, 1.0/1.1, 3.7/4.5 mg/kg bw/d; f: 0.4/1.6, 1.6/1.6, 6.2/6.2 mg/kg bw/d)	- Survival was comparable to untreated controls. - Body weights were similar to controls. At termination: ↑ spleen weight (f, 80 ppm) <u>Neoplastic lesions in the spleen:</u> Hemangiosarcoma Males: 5, 20, 80 ppm: 7/50, 9/50, 8/50 vs 4/50 controls Females: 5, 20, 80 ppm: 1/50; 1/50, 3/50 vs 2/50 controls Hemangioma Males: 0/50 in all doses groups vs 0/50 controls Females: 5, 20, 80 ppm: 1/50, 1/50, 4/50 vs 0/50 controls Hemangiosarcoma plus Hemangioma Males: 5, 20, 80 ppm: 7/50, 9/50, 8/50 vs 4/50 controls Females: 5, 20, 80 ppm: 2/50; 2/50, 7/50 vs 2/50 controls <u>Precursor lesions:</u> Hyperplasia, angiomatous Males: 5, 20, 80 ppm: 9/50, 4/50, 16/50 vs 4/50 controls Females: 5, 20, 80 ppm: 13/50, 12/50, 34/50 vs 14/50 controls

雌雄のラットにおいては、BHAS の発がん活性を示す証拠がいくつか得られた。雄ラットでは、脾臓の血管肉腫の発生増加が、全ての被験物質投与群(5 ppm 以上、すなわち 0.2 mg/kg/日以上)において観察された。脾臓における血管肉腫の発生率は、対照群と比較すると、よりプラトー状に近い用量曲線を辿った増加を示したが、血管腫は発生しなかった。雌ラットにおいては、血管肉腫の発生は、対照群と被験物質投与群にわたり、生物学的に均等であった。対照群では 0 匹であった脾臓における血管腫の発生が、最高用量の 80 ppm (約 6.2 mg/kg/日に相当)群では、4 匹の雌に認められた。脾臓における腫瘍数の増加の割合は、雌雄のラットともに低く、用量関連性も無く統計学的有意な水準にも達していなかったが、明らかに対照群での発生数よりも多く、背景対照データの範囲も上回っていた。腫瘍の発生は、BHAS 投与を受けたラットの方が、対照群のラットよりも、早期に認められた。脾臓における血管性過形成は、血管腫瘍(血管腫、血管肉腫)の前駆病変であると考えられた。これらの脾臓病変は、80 ppm 群の雌雄において、高頻度で観察された。脾臓の血管肉腫や血管腫は、溶血性貧血や造血器官における二次的影響といった用量関連性の非腫瘍性変化を背景として観察された。他の部位では血管肉腫や血管腫が見られなかったことは、これらの腫瘍が脾臓を原発とすることを良く示している。血管腫は比較的まれであるため、生物学的意義についてはあまり良く判別されていない。脾臓の血管性過形成と脾臓に誘発された血管肉腫が形態学的に類似しているため、そういった病変は前がん性であることが示唆

される。BHAS 投与を受けたラットにおける血管性過形成、血管腫および血管肉腫の所見により、血管性過形成から腫瘍へ進行していくという様式が支持される。

ラットの脾臓において誘発された腫瘍が、一次的な遺伝毒性影響によるものであると考えられるような所見は得られていない(BHAS は遺伝毒性があったとしても弱い)。別の代替的な(非遺伝毒性的な)機序が存在するものと考えられる。発がんは、赤血球の崩壊亢進を介しており、腫瘍の増殖は、BHAS 投与を受けたラットにおける慢性的な細胞傷害と持続的な細胞増殖の結果生じると考えて良いかも知れない。目下のところ、他の作用機序は何も判明していない。正確な機序は不明確なままである。ヒトとは無関係の、動物種特異的な腫瘍形成機序は、未確認である。試験の結果から、5 ppm(雄で約 0.2 mg/kg/日、雌で約 0.4 mg/kg/日に相当)が、脾臓における腫瘍発生に関する最小用量であることが示されている。発がんに関するこの生物試験では、これより低い濃度での試行は行われていないため、5 ppm が、BHAS による腫瘍形成に関する閾値用量であるとみなされる(BASF, 2001)。

マウスにおける BHAS の発がん性を評価するために有用な、適切な試験のデータは得られていない。しかし、やはり得られたデータは、ラットの場合と同様に、BHAS が脾臓腫瘍を誘発することを示している。対照群では認められなかった脾臓の血管腫瘍の発生率増加が、約 246 mg/kg/日の BHAS を長期間(一生涯)飲水投与された C3H/HeN マウスの雌で観察された。また、C3H/HeJ(+)マウスの雄では、リンパ節における血管腫瘍発生数の増加が認められた(Stenbäck et al., 1987)。

有害な物質や組成物の分類と表記に関する指令 67/548/EEC によれば、BHAS は、カテゴリ 3 の発がん物質としての分類基準を満たしており、したがって、この潜在的な有害性に対応するために提唱されている表記、すなわち、Xn、有害;R40(わずかながら発がん作用の証拠あり)を維持すべきである。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 受胎能への影響

動物における試験

BHAS に関しては、ガイドラインに準拠して行われた多世代試験やそれぞれの世代の受胎能試験のデータは、目下のところ得られていない。

生殖器官に関係のある情報は、反復毒性試験のデータ(4.1.2.6 項参照)からある程度得るこ

とができる。その試験においては、Wistar ラット(各群雌雄 10 匹ずつ)に、BHAS(純度 99% 超)が、10、50 もしくは 250 ppm の濃度で、すなわち約 0.9、4 もしくは 21 mg/kg/日の用量で、3 ヶ月間にわたり飲水投与された(BASF 1992b)。雄に関しては、全ての用量群について、精巣の重量測定が実施され、また最高用量(250 ppm)群については、精巣の肉眼的および顕微鏡学的検査が実施された。一方、雌に関しては、最高用量(250 ppm)群について、子宮や卵巣の肉眼的および顕微鏡学的検査だけが実施された。試験終了時、これらのパラメータのいずれにも、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。この試験からは、BHAS は、生殖器官の重量や形態学的健全性に対して、250 ppm の濃度まで、すなわち、約 21 mg/kg/日の用量までは、影響を及ぼさないと結論付けられる(この用量が NOAEL)。この試験における全身への有害影響に関する NOAEL は、メトヘモグロビン血症を伴う溶血性貧血や臓器重量の変化、ならびに高用量群の脾臓や肝臓における組織病理学的変化の所見に基づき、雌雄とも 0.9 mg/kg/日とされた。

マウスとラットの乳腺腫瘍モデルにおける、BHAS の腫瘍防御性を検討することに焦点を当てて、試験が 2 件実施されている(4.1.2.8 項参照)。これらの試験の中で、BHAS のみを高濃度(10 mM、マウスでは約 100 mg/kg/日、ラットでは約 67 mg/kg/日に相当)で長期間飲水投与された動物について、その期間中、乳腺の乳管の発達の観察、乳腺の形態学的観察(マウスおよびラット)、ならびに卵巣の形態学的観察(マウス)が行われた(Evarts and Brown 1977; Evarts et al. 1979)。

CH3/HeN マウスを使用した試験(Evarts and Brown 1977)では、週齢によった BHAS 投与計画と、投与期間ごとの剖検スケジュールが組みられ、5 組の検討が実施された。第 I 組(98 匹)では、マウスが 6 週齢の時点で投与が開始された。第 II、III、IV および V 組(30 匹ずつ)では、それぞれ 13、18、24 および 28 週齢時に投与が開始された。第 I 組では、投与開始 7、10、13、16、19、22 および 28 週後に、被験物質投与群および対照群のそれぞれ 5 匹ずつを屠殺した。第 II~V 組では、投与開始 7 および 9 週後に屠殺が行われた。屠殺時、成熟中の卵胞および黄体の数を測定し、卵巣の組織病理学的検査を実施した。乳腺(全載標本)における、乳管および乳細管(小葉)の形態を、評点付けを行いながら評価した(Khanolkar and Ranadive, 1947)。

その結果、BHAS 投与開始 19 週後には乳腺や卵巣の発育遅延が明らかとなり、投与開始週齢が遅いほど、乳腺や卵巣における退行性変化は急激に生じた。さらに、第 I 組のマウスにおける膣スメアを 10 週間検査して発情周期を監視し、卵巣機能の評価を行った平均発情周期は、対照群のマウスでは 5.0 日であったのに対し、BHAS を投与されたマウスでは 6.8 日であった。また、発情期間の平均長は、対照群のマウスでは 2.1 日であったのに対し、BHAS を投与されたマウスでは 1.4 日であった。屠殺時には、成熟中の卵胞および黄体の数が測定され、また、卵巣の組織病理学的検討が行われた。6 週齢時に BHAS の投与が開始されたマ

ウスでは、**卵胞の数**は、25 週齢まで対照群と同等であったが、その後 34 週齢までは対照群の Maus よりも **BHAS** の投与を受けた Maus でより急激に減少した。成熟卵胞の減少は、6 週齢よりも遅く Maus への **BHAS** 投与が開始された全組において、より高齢になってから始まることが確認された。**黄体の数**は、13 週齢時には対照群と被験物質投与群とで同等であったが、その後高齢になるほど、対照群よりも **BHAS** を投与された群で明らかに低下した(少なくとも 2 倍の差が生じた)。後者の影響は、**BHAS** の投与を 13、18、24 および 28 週齢時に開始した Maus においても認められ、6 週齢時開始におけるよりも顕著な場合もあった。対照群と比較して、被験物質投与群の Maus では、膈上皮の角化がより顕著であり、発情周期における無発情期の長さが延長したと報告されている(データは提示されていない)。

一般毒性に関しては、第 I 組のデータについてのみ、**BHAS** を投与された同齢の Maus の平均が、対照群の平均と比較して図示されている。成長曲線は、**BHAS** を投与された Maus と対照群の Maus とで、19 週齢までは同等であった。その後、**BHAS** を投与された Maus では、増体量が低下した(図から判断すると最大の差は 30 週齢における 6 g)。**BHAS** を投与された Maus では、飼料消費量が、投与開始の 13 週後では、対照群の Maus の 11%にまで低下している(データは提示されていない)。全身毒性影響に関するデータは、これ以上報告されていない。

Sprague-Dawley ラットを用いた試験(Evarts et al. 1979)では、**BHAS** が、未交配の雌に投与された。投与開始は 36 日齢に固定されていた。被験物質投与群のラットの乳腺について、50 日齢時に組織病理学的検査を実施したところ、乳細管上皮の空胞化を伴った、小葉の拡大および濃染が観察された。嚢状拡張が広く認められた。69 日齢時には、**BHAS** だけの投与を受けたラットでは、おびただしい好塩基性分泌物を伴った妊娠ラット様の像が認められ、小葉上皮は空胞化していた。一方、対照群のラットでは、それとは反対に、小葉の大きさは小さかった。この所見について著者は、**BHAS** が、ラットのホルモンバランスに影響を及ぼした可能性があるとして説明している。

上述した 2 件の試験の結果から、げっ歯類の雌においては、高用量の **BHAS** により、発情周期や生殖器官(卵巣)の機能状態および形態に影響が及ぼされる可能性があることが示された。萎縮ないしは肥大、および分泌といった形態学的な徴候が示すように、乳腺の機能状態や形態学的発育ならびに健全性に対し、影響が及ぼされ得る。これらの知見に基づき、上述の試験からは、LOAEL として、67 mg/kg/日という値が導かれる。

Maus を用いた優性致死試験(4.1.2.7 項参照)では、102 もしくは 112 mg/kg の用量で **BHAS** が単回腹腔内投与され、早期胎仔死亡および着床前損失を指標に検討が行われたが、陰性結果が得られている(Epstein et al. 1972)。詳細な知見の記載はなされていない。

ヒトにおける試験

データは得られていない。

4.1.2.9.2 発生毒性

動物における試験

OECD TG 414 に準拠した試験が実施されており (BASF 1994)、Wistar ラット (Chbb:THOM) に経口投与(強制)した際の胎仔毒性が検討されている。各群 22~24 匹の妊娠ラットに、交尾後 6 日から 15 日にかけて、1、3、10 ないしは 20 mg/kg/日の用量で、BHAS が投与された。BHAS (純度 98.4%以上)は、水溶液として、標準容量が 5 mL/kg となるように投与された。対照群は、20 匹の雌親動物とし、媒体(ミリ Q 水)だけが投与された。

試験期間中、飼料消費量と体重が定期的に計測された。被験動物の健康状態は、毎日観察された。交尾の 20 日後に剖検が行われ、母動物の肉眼病理検査(脾臓重量の計測を含む)が実施され、黄体数と、着床部位の数ならびに分布状態が記録された。胎仔の性別鑑定や体重測定が実施され、さらに外観、軟部組織や骨格の異常について検査が行われた。

母動物では、10 および 20 mg/kg/日群において、脾臓の肥大と、脾臓の絶対および相対重量の統計学的に有意な増加が認められた。それより低用量の群については、被験物質投与に関連した母動物に対する影響は報告されていない。妊娠率、平均黄体数や平均着床部位数、着床前および着床後損失の算出値、吸収胚数、および生存胎仔数には、被験物質投与に関連した群間差は、何も認められなかった。平均胎仔体重は、被験物質投与群と対照群とで同等であった。胎仔の検査の結果、被験物質投与に関連した異常の徴候は、何も認められなかった。

この試験からは、母体毒性に関する NOAEL として 3 mg/kg/日が、胚/胎仔毒性に関する NOAEL として 20 mg/kg/日が導出される。

ヒトにおける試験

データは得られていない。

4.1.2.9.3 生殖毒性のまとめ

生殖毒性に関して、ヒトのデータは、現在まで得られていない。

BHAS に関する実験動物のデータからは、特異的な胚/胎仔毒性や催奇形性は、何も明らかとされていない。母体毒性に関する NOAEL(経口)として 3 mg/kg/日が、胚/胎仔毒性に関する NOAEL(経口)として 20 mg/kg/日が、ガイドラインに準拠してラットを用いて実施された、胎仔毒性試験から導出された(BASF, 1994)。BHAS に関しては、ガイドラインに準拠して行われた多世代試験やそれぞれの世代の受胎能試験のデータは、目下のところ得られていない。そのため、生殖器官に生じ得る障害に関しては、反復投与による他の試験で得られたデータが考慮に入れられた。マウスやラットでの反復経口投与毒性試験で得られたデータからは、卵巣の機能状態や形態の悪化、および、乳腺組織の発育や形態への影響という面から、雌の方が BHAS が誘発する影響に対する感受性が高いことが示された。これらの知見に基づき、ラットを用いた試験(Evarts et al. 1979)から、LOAEL(経口)は、約 67 mg/kg/日であると判断された。BHAS を3ヵ月間反復強制経口投与した毒性試験(BASF, 1992b)では、試験に採用した最高濃度においても、雌雄の生殖器官の障害を示唆する所見は何も認められなかった。