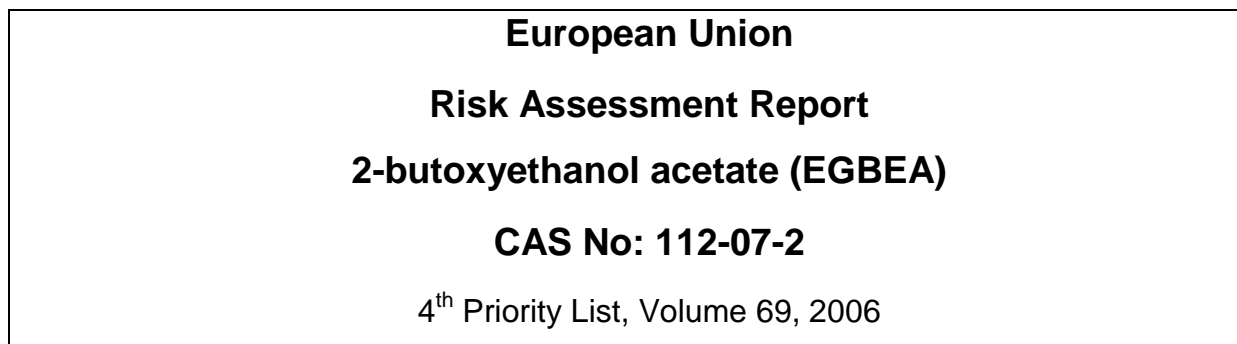


部分翻訳



欧州連合

リスク評価書 (Volume 69, 2006)

2-ブトキシエタノールアセテート



国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部

2018年11月

本部分翻訳文書は、2-butoxyethanol acetate (EGBEA) (CAS No: 112-07-2)に関する EU Risk Assessment Report, (Vol. 69, 2006 の第 4 章「ヒト健康」のうち、第 4.1.2 項「影響評価：有害性の特定および用量反応関係」を翻訳したものである。原文（評価書全文）は、<https://echa.europa.eu/documents/10162/f96ac7fe-299e-4af7-a26e-ddd8fc797480> を参照のこと。

#### 4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量（濃度）－反応（影響）評価

2-ブトキシエタノールアセテート (EGBEA) 分子は、おそらくエステラーゼによって、2-ブトキシエタノール (EGBE) と酢酸に速やかに分かれる (4.1.2.1 項参照)。したがって、全身に分布した EGBEA は、EGBE と酢酸に代謝されると予測することができる。EGBE と EGBEA とは構造が類似しており、さらに少なくとも体循環においては、EGBEA は EGBE に代謝される可能性が高いことから、EGBEA の全身毒性に関する特異的なデータや有効なデータが得られない場合に EGBE のデータから EGBEA を類推できると考えることは妥当である (EGBE に関する EU リスク評価報告書を参照)。

##### 4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

2-ブトキシエタノールからの外挿が必要な場合、経口曝露および経皮曝露に関しては次のルールを適用する。

EGBE 1 mg/kg は、EGBEA 160/118 (1.356) mg/kg に相当する (EGBEA の分子量 160、EGBE の分子量 118)。

吸入曝露の場合、EGBE と EGBEA の濃度 (ppm) は同じとする。

##### 4.1.2.1.1 *In vitro* 研究

2-ブトキシエタノールアセテートのトキシコキネティクスに関する研究はわずかしかない。*In vitro* 研究において、ラット血漿中の 2-ブトキシエチルアセテートの半減期は 1 分 (0.96 分) と確認されている。2-ブトキシエタノールアセテート分子は、おそらくエステラーゼによって、2-ブトキシエタノールと酢酸に速やかに開裂する。このため実際には、EGBEA の全身毒性は EGBE と同等となる。モル数に基づくと、有効用量と有害性影響量はほぼ同一とみなすことができる (BASF, 1984 and Hoffman and Jackh, 1985)。

エステル加水分解に関しては非常によく研究されており、香味物質の安全性評価における重要な議題とされている ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out158\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out158_en.pdf))。2003 年の食品科学委員会で検討された化学物質グループ 1、2 に含まれる第一級アルコールと分枝鎖カルボン酸のエステルは、カルボキシエステラーゼによりカルボン酸とアルコールに酵素的に加水分解されると

考えられた。カルボキシルエステラーゼは全身の組織の大部分に存在する酵素であり、中でも最も重要なのは $\beta$ -エステラーゼである。*In vitro* 研究の結果、エステル鎖長が長くなるほどエステラーゼの基質に対する親和性が高くなり、直鎖エステルの加水分解速度は分枝鎖エステルの約 100 倍であることが示されている (Arndt and Krisch, 1973 ; Junge and Heymann, 1979)。このレビューでは最終的に、検討対象としたエステル類が、消化管吸収の前後に加水分解を受けて対応する脂肪族アルコールと分枝鎖カルボン酸を生成すると考えられた。

総合すると、2-ブトキシエタノールアセテートは、おそらくエステラーゼによって、2-ブトキシエタノールと酢酸に速やかに開裂する。また、エステル加水分解は香味物質の安全性評価において非常によく研究されており、香料として検討されたエステル類は消化管吸収の前後に加水分解を受け、対応する脂肪族アルコールと分枝鎖カルボン酸を生成すると考えられた。したがって、EGBE と EGBEA とは構造が類似しており、さらに少なくとも体循環においては、EGBEA は EGBE に代謝される可能性が高いことを踏まえると、EGBEA の全身毒性に関する特異的なデータや有効なデータが得られない場合に EGBE のデータから EGBEA を類推できると考えることは妥当である。さらに、合理的な推定として、EGBEA の分布、代謝、排泄は EGBE に類似していると考えられる。

#### 4.1.2.1.2 その他のデータ

EGBEA と EGBE の  $\log K_{ow}$  を比較すると、それぞれ 1.51、0.8 である。 $\log K_{ow}$  が高い方が皮膚透過性は高まるが、EGBEA は分子量が大きいため、EGBE と比べて皮膚透過性が低下する可能性もある。

急性試験で得られた  $LD_{50}$  値の比較を以下に要約する。

経皮経路に関しては、EGBEA の  $LD_{50}$  は、ウサギを用いた急性試験 3 試験のうち 2 試験の結果 (4.1.2.2.1 項参照) で一貫して 2,000 mg/kg bw 未満であった。総合すると、EGBEA の  $LD_{50}$  は約 1,500 mg/kg bw と考えることができる。EGBE の  $LD_{50}$  は投与方法 (閉塞条件下か否か) により異なり、それぞれ 500 mg/kg bw、2000 mg/kg bw 超であった。EGBEA について確認された  $LD_{50}$  は約 1,500 mg/kg であったのに対し、モル数に基づき計算した EGBEA の  $LD_{50}$  はそれぞれ 678 mg/kg bw、2,712 mg/kg 超となる。これは EGBEA の経皮吸収が EGBE よりもわずかに低いことを示すものとも考えられるが、一方で、EGBEA の実験値はかなり古い試験から得られたものである。

ラットを用いた実験データより、グリコールエーテルの一種である PGMA (メトキシプロパノールの酢酸塩) の経皮吸収は、PGME (1-メトキシプロパン-2-オール) の約 30% であることが分かっている。しかし PGME のデータを EGBE にみなし代用するには情報が不十分であるため、この 30% という比率を EGBEA の評価に適用することはできない。

よって最終的には、分子量に基づき、EGBE で確立された数字から経皮吸収率を推定するのが妥当であろう。

吸入経路に関しては、EGBEA の LC<sub>50</sub> は 400 ppm 超 (4.1.2.2.1 項参照)、EGBE の LC<sub>50</sub> は 450 ppm ~486 ppm と確認された。ただし、EGBE で確認された吸収率を定量的に精密化しても正確な吸収率を得ることはできないと考えられる。よって、EGBEA の吸入吸収率は、EGBE の値に基づき推定するのが妥当であろう。

経口経路に関しては、EGBEA で得られた LD<sub>50</sub> (4.1.2.2.1 項参照) は、EGBE で得られた LD<sub>50</sub> と非常に似た範囲にある。よって、EGBEA の経口吸収速度は EGBE と同じ範囲にあり、EGBE の経口吸収速度を保持すべきと考えてよいだろう。

#### EGBE の吸収に関するデータの要約:

ヒト健康志願者を対象とした EGBE の吸入曝露試験が 3 試験報告されている (Johanson and Fernström, 1988 ; Johanson and Johnsson, 1991 ; Kumagai *et al.*, 1999)。EGBE の吸入による理論吸収率 (計算値) は 80% であることが分かったが、実際の測定に基づく真の吸収率は 55~60% であった。この差は「wash in / wash out」メカニズムにより説明される。すなわち、EGBE は親水性のため、吸気中は気道表面に吸着、呼気中は脱着することから、物質の実際の取り込みは少なくなる。リスク評価の項では、EGBE の吸入吸収率として 60% を用いる。

EGBE 溶液の経皮吸収は、投与方法、動物種および最終製品における EGBE の濃度により異なる。閉塞塗布の場合は経皮吸収率が高くなるが、EGBE は揮発性のため、非閉塞塗布では吸収率が最低となる。また、ラットの皮膚はブタやヒトの皮膚に比べて透過性が高い (2~3 倍) と考えられる (Bartnik *et al.*, 1987)。さらに、経皮吸収は被験製品の EGBE 濃度にも依存し、40% および 80% の EGBE 水溶液で最大の吸収率が得られた (Johanson and Fernström, 1988)。ラットを用いた 2 つの試験では、EGBE 溶液の吸収率は 20~30% と推定された (Bartnik *et al.*, 1987)。

EGBE 蒸気の経皮吸収を評価した *in vivo* 試験がある (Jones, 2003)。経皮吸収による EGBE の体内用量は、曝露中の外部環境によって、11~39% のあいだで変動した。11% は「通常」の使用環境 (温度、湿度)、39% は産業的な最悪の使用環境 (高温、多湿、オーバーオール着用) で得られた値であった。リスク評価の項での EGBE 蒸気経皮吸収による EGBE の体内用量の推定には、この最悪の場合の吸収率を用いる。

経口投与された EGBE は、速やかに、かつ基本的に完全に (100% と推定) 吸収される (Ghanayem *et al.*, 1987)。

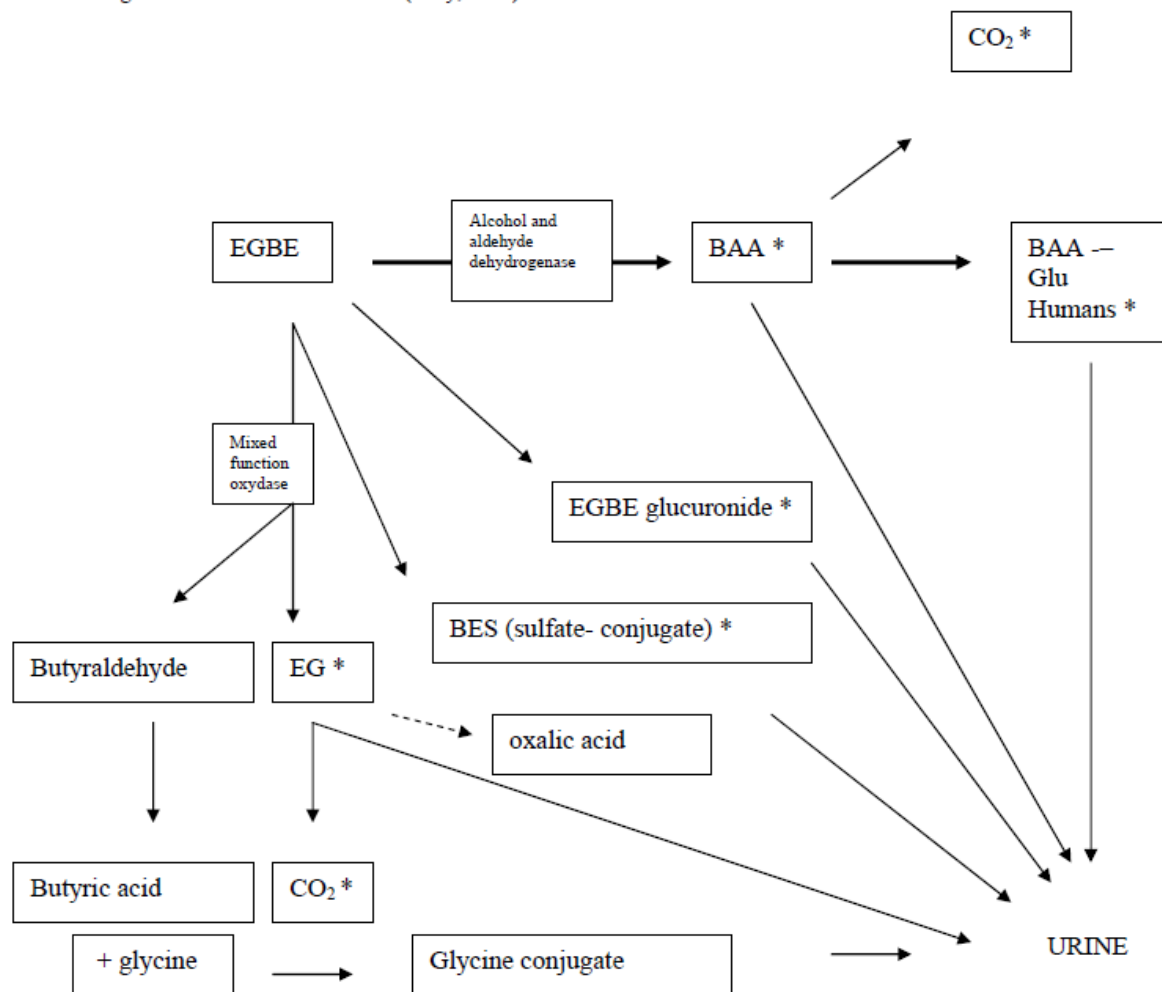
#### EGBE の分布、代謝、排泄に関するデータの要約:

- EGBE は、曝露経路にかかわらず、曝露後速やかに最高血中濃度に達する。EGBE は

速やかに代謝を受ける（血漿中半減期は約 1 時間）。

- 吸収後は血液により全身の臓器に分布する。経皮吸収または吸入の場合、動物種を問わず、2 時間以内に最高血中濃度に達する。
- 主な代謝経路では、飽和機構においてアルコールデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼを介してプトキシ酢酸（BAA）が生成される。EGBE のグルクロン酸抱合体や BAA の生成は、EGBE の用量増加に伴い亢進する。動物種によっては、マイナーな代謝物も報告されている（Figure 4.1 参照）。

Figure 4.1: Metabolism of EGBE (Patty, 2001)



げっ歯類またはヒトで確認されたものは、アスタリスク (\*) を付して示す。

排泄は速やかに起こり、主な排泄経路は尿中排泄である（代謝物の 80~90%）。代謝物の血漿中半減期は約 4 時間で、少量が呼気中に CO<sub>2</sub> として排泄される（10~20%）。正常な腎排泄は腎臓の生理状態により調整され、女性では男性よりも BAA の排泄速度が遅く、高齢動物では若齢動物よりも代謝物の排泄が困難な傾向がある。腎臓に何らかの障害がある場合、BAA の血中滞留時間が延長することで、その毒性が増強される。

一方、腎機能が完全に保たれていれば EGBE の反復投与により代謝の順応が起こり、この場合、BAA の排泄はより迅速に行われる。このような肝臓外での順応は、EGBE の赤血球に対する作用、特に赤血球変形能に対する作用についても言える。

#### 4.1.2.1.3 トキシコキネティクス、代謝、および分布の要約

*In vitro* データによると、EGBEA は、おそらくエステラーゼによって血漿中で速やかに酢酸と EGBE に加水分解される。したがって、全身に分布した EGBEA は、EGBE と酢酸に代謝されると予測することができる。EGBE と EGBEA とは構造が類似しており、さらに少なくとも体循環においては、EGBEA は EGBE に代謝される可能性が高いことから、EGBEA の全身毒性に関する特異的なデータや有効なデータが得られない場合に EGBE のデータから EGBEA を類推できると考えることは妥当である。また、EGBE から EGBEA へのデータの外挿が可能であることを踏まえると、EGBEA の吸収、分布、代謝、排泄が EGBE に類似しているとは合理的なアプローチと言える。

リスク評価の項では、EGBEA の吸収速度として以下を用いる。

- 経口経路の場合、100%
- 吸入経路の場合、60%
- 経皮経路の場合、外挿値は EGBE と同じか EGBE より低い値となる可能性が高い (4.1.2.1.2 項参照)。EGBEA 溶液の皮膚透過性は約 30%、EGBEA 蒸気の皮膚透過性は約 39% と考えることができる。

#### 4.1.2.2 急性毒性

##### 4.1.2.2.1 動物試験

###### 吸入

古い試験 (Smyth *et al.*, 1962) で、濃縮蒸気へ曝露した場合に死亡を認めない最大曝露期間が推定された。雌のアルビノラット 6 例 (系統は不明) が濃縮蒸気 (濃度不明) に曝露された結果、8 時間まで生存していた。また別の試験 (BASF, 1963 in IUCLID) では、2 種類の温度 (20°C および 120°C) で生成した高度飽和状態の EGBEA 蒸気-空気混合物に、ラットが様々な期間曝露された。動物数は実験群ごとに異なる。

死亡率とヘモグロビン尿の所見を Table 4.16 に要約する。

さらに、様々な動物（ネコ 3 例、ウサギ 3 例、モルモット 10 例、ラット 10 例、マウス 20 例）が 20°C の EGBEA 飽和蒸気（約 460 ppm）に 6 時間曝露された（BASF, 1965 in IUCLID）。ラット以外の動物は、急性吸入毒性の検討のため、同じ条件下で 2 回使用されていた。各検討のあいだには、6 日間の無処置の期間が設けられた。

いずれの動物も生存していたが、ネコでは粘膜刺激症状、ラットでは重度のヘモグロビン尿を認めた。

本試験の手法には欠陥があるため（すべての動物が 1 つの吸入チャンバーで一緒に曝露を受けた）、その信頼性には疑問がある。

一連の試験（Truhaut *et al.*, 1979）で、EGBEA の急性毒性および慢性毒性が検討された。各試験で、以下のパラメータが評価された。

- 尿検査：潜血、pH、タンパク質、グルコース、ケトン体、亜硝酸塩
- 血液検査：赤血球数、白血球数、血中ヘモグロビン
- 病理検査：脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、膀胱、副腎、精巣または卵巣について、肉眼的病理検査とともに、固定、薄切および染色し組織学的検査を実施。

急性吸入試験としては、ラット 10 例（雄、雌）とウサギ 4 例（雄 2 例、雌 2 例）からなる群が、飽和状態の EGBEA 蒸気-空気混合物（約 400 ppm に相当）に 4 時間曝露された。曝露後の観察期間は 14 日間であった。

処置後はいずれの動物も生存しており、ウサギでは軽微かつ一過性（24~48 時間を超える継続はなし）のヘモグロビン尿や血尿が認められた。屠殺後に、肉眼的な病理学的病変はみられなかった。組織学的には、全例で腎病変（主に腎尿細管ネフローゼ）を認め、その重症度は用量依存的であった。著者らは、観察された病変はいずれも溶血に起因するものであろうと考察している。

Table 4.16 - Summary of EGBEA animal studies for acute inhalation exposure

Species	Exposure time (h)	LC <sub>50</sub> (mg/L)	Observations and Remarks	Reference
Rats (females)	8 h	> concentrated vapour conc.	No death in 6 females exposed to "concentrated vapour concentration".	Smyth <i>et al.</i> , 1962
Rats		> saturated vapour conc.	Animals were exposed to highly saturated vapour-air mixture in various conditions: - 20°C, 3h: mortality: 0/6, haemoglobinuria: 5/6 - 20°C, 8h: mortality: 2/18, haemoglobinuria: 18/18 - 120°C, 30 min: mortality: 0/6, haemoglobinuria: 1/6 - 120°C, 3h: mortality: 0/12, haemoglobinuria: 12/12	BASF, 1963
Cats, rabbits, guinea pigs, rats and mice	6 h	> 3.06 mg/L	No mortality at the saturated vapour concentration at 20°C (ca. 460 ppm or 3.06 mg/L). Cats showed symptoms of irritation to the mucus membranes and the rats showed severe haemoglobinuria. The reliability of this study is questionable because of methodological deficiencies (all animals were exposed together in one inhalation chamber).	BASF, 1965
Rats (n=10) and rabbits (n=4)	4 h	> 2.66 mg/L	No mortality at the saturated vapour concentration (ca. 400 ppm or 2.66 mg/L). A slight and transient haemoglobinuria and/or haematuria were observed in rabbits (not lasting over 24 to 48 hours). No gross pathological lesions were noted.	Truhaut <i>et al.</i> , 1979

#### 吸入経路の要約：

吸入経路による急性毒性の評価に利用可能な研究は、かなり古いものである。検査された濃度が低く、LC<sub>50</sub>は3 mg/L超であろうという推測しかできない。症状としては溶血が観察された。この濃度は飽和蒸気の濃度を上回るもので、エアロゾル曝露に相当することには注意が必要である。

血液毒性の症状はEGBEで観察された症状に類似しており、吸入曝露時のEGBEのLC<sub>50</sub>は450～486 ppm（約3.0～3.23 mg/L）と推定されている。EGBEのデータからの外挿値はEGBEAに関して得られている試験結果と矛盾し、呼吸器におけるEGBEAの吸収がEGBEよりも低いことを



示唆している可能性がある。試験は古く、手法に欠陥のあるものも含まれるが、EGBEA に関するデータは吸入による急性毒性が低いことを一貫して示しており、既存の分類 Xn; R20 は取り除いた。

#### 経皮

雄の New Zealand ウサギ（各群 4 例）を用いて閉塞条件下で 24 時間経皮投与を行った一連の試験（Smyth *et al.*, 1962）で、LD<sub>50</sub>が算出されている。

14 日間の観察後、LD<sub>50</sub>は 1.58 mL/kg（1,485 mg/kg bw）と推定された。

また、モルモットを用いた試験（Eastman Kodak, 1971）では、LD<sub>50</sub>は 4,700 mg/kg と算出された。

ウサギを用いた modified Draize 法で急性皮膚毒性が研究されている（Truhaut *et al.*, 1979）。各用量 6 例のウサギに、EGBEA が 24 時間閉塞塗布された。塗布後の観察期間は 14 日間で、試験終了時に LD<sub>50</sub> の概算が行われた。Truhaut が実施した一連の試験におけるパラメータの一部は、試験終了後に分析された（実施された尿検査、血液検査、病理検査の詳細については 4.1.2.2.1 項の「吸入」を参照）。

LD<sub>50</sub>は約 1,500 mg/kg bw であり、塗布後 4 日以内、概して 24～48 時間で死亡に至った。一部では、ヘモグロビン尿および血尿が認められた。中毒によって死亡しなかった場合には、48～72 時間後に赤血球数およびヘモグロビン値が最低値を示し、その後 8～14 日かけて正常値に戻った。剖検の結果、腎臓に出血を認め、膀胱には大量の血液が存在していた。組織学的には、全例で腎病変（主に腎尿細管ネフローゼ）を認め、その重症度は用量依存的であった。著者らは、観察された病変はいずれも溶血に起因するものであろうと考察している。

**Table 4.17 - Summary of EGBEA animal studies for acute dermal exposure**

Species	Exposure time (h)	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	Observations and Remarks	Reference
New Zealand rabbits (male)	24h (occlusive)	1,485 mg/kg		Smyth <i>et al.</i> , 1962
Guinea pigs		4,700 mg/kg		Eastman Kodak, 1971
Rabbits (n=6)	24h (occlusive)	1,500 mg/kg	Animals generally died between 24 and 48 h after application, and no later than 4 days. Haemoglobinuria and haematuria was observed in some animals.	Truhaut <i>et al.</i> , 1979

*EGBEA* に関する経皮曝露の要約:

*EGBEA* に関して得られている 3 つの試験のうち 2 試験はウサギを用いたもので、LD<sub>50</sub> はいずれも 2,000 mg/kg bw 未満であった。主な毒性症状は溶血および関連病変であった。総合すると、ウサギにおける LD<sub>50</sub> は約 1,500 mg/kg bw と考えることができ、分類 Xn; R21 が適用される。

*EGBE* に関する経皮曝露の要約:

LD<sub>50</sub> は投与方法（閉塞条件下か否か）により異なるが、閉塞塗布の場合は 500 mg/kg bw、非閉塞塗布の場合は 2000 mg/kg bw 超であり、分類「Xn; R21」が適用されている。モル数に基づき計算した *EGBEA* の LD<sub>50</sub> は、閉塞塗布、非閉塞塗布でそれぞれ 678 mg/kg bw、2,712 mg/kg bw 超となる。

総合すると、ウサギでの経皮 LD<sub>50</sub> の比較より、*EGBEA* の経皮吸収は *EGBE* よりも低い傾向にあると考えられる。しかし、これらの情報を定量的に用いて *EGBE* のデータを基により正確な経皮吸収率を得ることはできない。

## 経口

ラットにおける試験

雄の Carworth Wistar ラット（各群 5 例）に経口投与を行った一連の試験（Smyth *et al.*, 1962）で、LD<sub>50</sub> が算出されている。14 日間の観察期間後、LD<sub>50</sub> は 7.46 mL/kg（7,012 mg/kg bw）と推定された。

*EGBEA* の 30% トラガント乳剤をラットに経口投与した試験（BASF, 1963 cited in IUCLID）については、現段階でこれ以上の試験の詳細は得られていない。LD<sub>50</sub> は 2,350 mg/kg bw と算出された。処置後 2~3 日で血尿およびヘモグロビンの低下を認め、雄よりも雌の方が高い感受性を示した。

さらに、Wistar ラットにオリーブ油で希釈した *EGBEA* が投与され、14 日間の観察後に経口 LD<sub>50</sub> が決定された（Truhaut *et al.*, 1979）。Truhaut が実施した一連の試験におけるパラメータの一部は、試験終了後に分析された（実施された尿検査、血液検査、病理検査の詳細については 4.1.2.2.1 項の「吸入」を参照）。

LD<sub>50</sub> は雄、雌でそれぞれ 3,000 ± 300、2,400 ± 200 mg/kg bw であった。投与 3 日目の時点で死亡例は認めなかった。ヘモグロビン尿や血尿が観察され、1 週間かけて徐々に減少した。剖検では、腎臓が肥大し、血液で拡張していた。

一覧表 (Nelson, 1981) では、ラットにおける LD<sub>50</sub> は 1,600 mg/kg bw と報告されているが、詳細は不明である。この値は疑わしいものと考えられる。

#### マウスにおける試験

マウスにおける LD<sub>50</sub> は、3,200 mg/kg bw と算出されている (Eastman Kodak, 1971 cited in Bibra 1987)。

EGBEA の 20% トラガント乳剤をマウスに経口投与した試験 (BASF, 1963 cited in IUCLID) については、現段階でこれ以上の試験の詳細は得られていない。

LD<sub>50</sub> は 2,820 mg/kg bw と算出され、血尿が認められた。

#### ウサギにおける試験

各群 3 例のウサギに EGBEA の 10% (940 mg/kg bw)、2% (188 mg/kg bw) トラガント水性乳剤が経口投与された (BASF, 1964 cited in IUCLID)。

LD<sub>50</sub> は約 940 mg/kg bw と算出された。高濃度群の 3 例中 2 例は、投与後 2 日以内に死亡した。重度のヘモグロビン尿および貧血が記録されている。生存動物では投与後 3 週間以内に血液検査値が正常まで回復し、低濃度群では死亡は認められなかった。

また、各群 3 例のウサギに、987 mg/kg bw、1,983 mg/kg bw の EGBEA が経口投与された (BASF, 1967 cited in IUCLID)。

投与後に全例が死亡し、臨床症状としては無緊張、痙攣、呼吸数増加および前房出血を認めた。低用量群では、ヘモグロビン尿、ヘマトクリット値低下、リンパ球減少、白血球増加、全血球分画の変性が観察された。また、全例の尿中に腎臓上皮、赤血球およびヘモグロビンを認め、高用量群では血中尿素の増加を認めた。病理検査所見は、腎臓重量の増加、ネフローゼ、肺水腫、肝臓および心臓の脂肪変性、リンパ球産生障害であった。

#### ネコにおける試験

各群 2 例のネコに EGBEA の 10% (940 mg/kg bw)、5% (470 mg/kg bw)、2% (188 mg/kg bw) トラガント水性乳剤が投与された (BASF, 1964 cited in IUCLID)。

死亡例はなく、ヘモグロビン尿は認められなかった。

EGBEA の急性経口曝露に関する動物試験を Table 4.18 に要約する。

Table 4.18 - Summary of EGBEA animal studies for acute oral route

Species	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	Observations and Remarks	Reference
Wistar rats (males)	7,012 mg/kg	-	Smyth <i>et al.</i> , 1962
Rats	2,350 mg/kg	Animals showed blood in the urine and a decrease in haemoglobin 2-3 days after treatment. Females were more sensitive than males.	BASF, 1963
Rats	Males: 3,000±300 mg/kg Females: 2,400±200 mg/kg	No animals died after Day 3 of administration. Haemoglobinuria and/or haematuria were observed and decreased progressively for over one week. At necropsy, kidneys were hypertrophic and dilated with blood.	Truhaut <i>et al.</i> , 1979
Rats	1,600 mg/kg	Only LD <sub>50</sub> value is reported.	Nelson 1981
Mice	3,200 mg/kg	-	Eastman Kodak, 1971
Mice	2,820 mg/kg	Animals showed blood in the urine.	BASF, 1963
Rabbits	ca 940 mg/kg	2 of 3 animals dosed with the high concentration (940 mg/kg) died within two days after the treatment. Severe haemoglobinuria and anemia were recorded. The blood values of the surviving rabbit returned to normal within three weeks after treatment. No mortality occurred at 188 mg/kg.	BASF, 1964
Rabbits	< 987 mg/kg	3 animals/group were dosed with 987 mg/kg or 1983 mg/kg. All animals died after treatment. Clinical symptoms were atonia, convulsions, increased breathing and hyphema. In the animals of the low dose group, haemoglobinuria, low haematocrit, lymphopenia, leukocytosis and degeneration in all blood cell fraction was found. In the urine of all animals renal epithelia, erythrocytes and haemoglobin were observed. Increased blood urea was found in the high-dose animals. Pathological examinations were increased kidney weights, nephrosis, lung oedema, fatty degeneration of liver and heart and disturbed lymphopoieses.	BASF, 1967
Cats	> 940 mg/kg	No mortality occurred and no haemoglobinuria was observed at 188, 470 or 940 mg/kg (2 animals/group)	BASF, 1964

経口経路の要約 (EGBEA のデータ) :

急性経口毒性の評価には、様々な動物を用いた試験が利用可能である。主な毒性影響は溶血および関連病変であった。いずれの試験も古く、純度や実験手順に関して不明確な点もあるものの、ウサギのLD<sub>50</sub>は約940 mg/kgで他の動物種に比べて感受性が高いことが示されている。

経口経路の要約 (EGBE のデータ) :

実験手法の詳細が明らかにされている最近の試験 (Carpenter *et al.*, 1956 ; Eastman Kodak, 1994) で、EGBE に関してラットで 1,000~2,600 mg/kg という結果が得られている。マウスでは、利用可能な試験から示されたLD<sub>50</sub>は1,000~2,000 mg/kgであった。ウサギを用いた試験は1試験で、そのLD<sub>50</sub>は320~370 mg/kgであり、経口曝露時の急性毒性に対する感受性はウサギの方が高いことが確認された。モルモットにおけるLD<sub>50</sub>は1,414~1,200 mg/kgと算出された。モル数に基づきEGBEから外挿した場合、EGBEAのLD<sub>50</sub>はラット、マウス、ウサギ、モルモットでそれぞれ1,356~3,525 mg/kg、1,356~2,712 mg/kg、437~502 mg/kg、1,627~1,917 mg/kgと算出される。

総合すると、EGBEAおよびEGBEのデータより、EGBEAは経口経路で有害でありXn; R22に分類することが提唱、合意された。

その他の経路

マウスにEGBEAの8%トラガント乳剤が腹腔内投与された (BASF, 1963 cited in IUCLID)。

LD<sub>50</sub>は約752 mg/kg bwと算出され、投与群ではヘモグロビン尿が記録されていた。

#### 4.1.2.2.2 ヒトにおける試験

ヒトにおけるEGBEAに関するデータは、得られていない。

EGBEに関して得られているヒトにおけるデータの要約 :

EGBEに関して得られているデータは次のとおり (Table 4.19 参照)。

Table 4.19: Summary human acute toxicity data

Estimation of absorbed dose	Patient pathology	Reference
Between 0.5 and 1 mg/kg bw	50-year woman. Suicide attempt with glass cleaner.  Coma, metabolic acidosis, hypokaliemia, increase in serum creatinine level and urinary excretion of oxalate crystals	Rambourg-Schepens <i>et al.</i> , 1988.
About 1 g/kg bw	23-year woman. Suicide attempt with mixture containing EGBE.  Coma, breathing difficulties and metabolic acidosis. Haematuria and decreased Hb for 2 days.	Gijsenbergh <i>et al.</i> , 1989.
About 750 mg/kg bw	53-year man. Suicide attempt with mixture containing EGBE.  Coma, tachycardia, metabolic acidosis, hypoxemia, pulmonary oedema and ARDS. Non haemolytic anaemia with thrombopenia.	Bauer <i>et al.</i> , 1992.
About 1.25 g/kg bw – 2 times separated by 9 days	18-year man. Ingestion of a glass cleaner.  Metabolic acidosis and hepatic biochemical disorders.  Nothing after the second ingestion.	Gualtieri <i>et al.</i> , 1995, Gualtieri <i>et al.</i> , 2003.
About 4.5 g/kg bw.	19-year man. Ingestion of a mixture containing EGBE.  Coma, acidosis and haematuria.	Burkhart and Donovan, 1998
Between 0.4 and 1.2 g/kg bw	51-year woman. Ingestion of a mixture containing EGBE.  Metabolic acidosis and mental status depression.	Mc Kinney <i>et al.</i> , 2000

結論として、以上のデータより、ヒトにおける経口曝露時の急性毒性に関する LOAEL は 400 mg/kg bw と考えることができる。この値は、曝露量が 0.4~1.2 g/kg bw と考えられる Mc Kinney の論文から導いた、最悪のケースの推定であることに留意されたい。

#### 4.1.2.2.3 特異的な毒性：EGBE の血液毒性

##### EGBE の血液毒性に関する機構研究

EGBE の主な毒性は血液毒性であり、EGBE の代謝物である BAA に起因する。EGBE の毒性（特に血液毒性）は広範に研究されており、これらの試験を以下に要約する。

機構研究の結果、EGBE が *in vivo* でラットに血液毒性を生じること、および非常に低濃度の BAA が *in vitro* で同じ作用を示すことが明らかとなった。BAA が生成される代謝経路を阻害した場合、RBC への影響は認められなかった。よって、*in vivo* での血液毒性は BAA に起因すると結論づけることができる。

一部の動物種（ラット、マウス、ハムスター、ヒヒ）では EGBE または BAA による溶血に対する感受性が非常に高い一方、他の動物種（イヌ、モルモット、ブタ、ネコ、ヒト）はこれらの溶血作用に抵抗性を示した（ラットと比較して 30 分の 1 以下の感受性）。ある試験で、イヌは EGBE には非常に高い感受性を示したが、BAA には感受性を示さなかった。

以上の試験において、*in vitro*、*in vivo* で BAA を投与した場合に、老齢の動物および雌で溶血に対する感受性の亢進が認められており、雌雄の代謝の違いでは性差を完全には説明できないことが示された。

*In vivo* または *in vitro* の溶血は、赤血球の膨張による変形能低下に起因するものであった（血栓形成もこれにより説明される）。新たに生成された赤血球は古いものに比べて抵抗性が高かった。また、EGBE による前処置によって、その後のより高用量の投与に対して相対的な「保護」が得られることが示された。さらにある試験（Lomonova and Klimova, 1977）で、EGBE への 1 日 3 時間、週 6 日、4 ヶ月の反復曝露の方が、同一用量の EGBE への 1 日 6 時間、週 3 日（連続）、4 ヶ月の曝露よりも血液毒性が高いことが示された。本試験は、EGBE への再曝露の前に回復期間がある場合に適応的「保護」機構があることを示すものである。

赤血球の膨張および変形能低下に至る機構は現段階では不明である。一見したところ、赤血球膜上の酸化機構を示す証拠はない。最近の研究（Udden, 2002）で、ラットを低用量の BAA に曝露した場合、赤血球内の Na<sup>+</sup>の上昇が K<sup>+</sup>の低下により相殺されないことが示されている。この機構により浸透圧の調整が起こると、赤血球の大きさおよび細胞容積が増大、密度および変形能が低下し、浸透圧脆弱性が亢進する。高用量では細胞密度の大きな変化や形態変化は認められなかったため、この機構はヒトでは異なる可能性がある。ヒトの赤血球においては、*in vitro* で、8 mM および 4 mM の BAA によりわずかな影響がみられた（Ghanayem, 1989）。

EGBEA の急性毒性の評価に利用可能なデータはわずかしかない。EGBE と比較すると、EGBEA は経口経路および経皮経路では有害でそれぞれ Xn; R22、Xn; R20 の分類、表示が付されるが、吸入経路では有害ではないと考えられる。

#### 経口経路：

EGBEA および EGBE のデータより、EGBEA は経口経路で有害であり Xn; R22 に分類することが

提唱される。

#### 呼吸器経路：

EGBE のデータからの外挿値は EGBEA に関して得られている試験の結果とは矛盾し、呼吸器における EGBEA の吸収が EGBE よりも低いことを示唆している可能性がある。試験は古く、手法に欠陥のあるものも含まれるが、EGBEA に関するデータは吸入による急性毒性が低いことを一貫して示している。よって、Classification and Labelling Committee は既存の分類 Xn; R20 を削除することを提唱した。

#### 経皮経路：

EGBEA のデータに基づき、ウサギにおける LD<sub>50</sub> は約 1,500 mg/kg bw と考えることができ、現行の分類 Xn; R21 が維持される。

自殺未遂例からヒトでの症例研究が多数得られており、EGBE に関するヒトでの LOAEL は 400 mg/kg bw 辺りであることが示唆されている。モル数に基づき EGBE から外挿すると、EGBEA の LOAEL は 542 mg/kg bw となる。EGBE および EGBEA の血液毒性はヒトよりも動物で顕著であるため、特にこれらの物質のリスク評価にはヒトでのデータを用いることが望ましい。

### 4.1.2.3 刺激性

#### 4.1.2.3.1 皮膚

#### 動物試験

Albino ウサギ 5 例の腹部皮膚を EGBEA に非閉塞条件下で 24 時間曝露した試験 (Smyth *et al.*, 1962) で、観察された反応の重症度に基づく 10 段階評価によりウサギでの皮膚一次刺激性が記録された。この試験では刺激性は認められなかった。

ウサギの皮膚に未希釈の EGBEA を適用した実験 (BASF, 1963 cited in IUCLID) では、背部皮膚に 1 分、5 分、15 分、20 時間、耳の皮膚に 20 時間の曝露が行われた。

背部皮膚を 20 時間曝露した結果、曝露後 24 時間に疑わしい発赤が認められた。1 分、5 分または 15 分の曝露後には影響はみられなかった。耳への適用では、曝露後 24 時間に耳の縁でわずかな発赤と壊死、7 日後には顕著な壊死が認められた。本実験で用いられた基準によると、EGBEA に刺激性はなかった。



5 例または 6 例のウサギを用いて、皮膚刺激性試験が行われた (Jacobs *et al.*, 1987)。modified Finn チャンバーを用いて、剃毛した皮膚に EGBEA が適用された。チャンバーには 0.5 mL の液体物質またはその甘扁桃油希釈物で浸したパッチが含まれていた。使用された被験物質の希釈物の濃度は 50、25、10、5%であった。第 2 の曝露チャンバーにはコントロールとして、対照溶媒 0.5 mL が含まれた。著者らによると、パッチ除去後 1、24、48、72 時間に Draize スケールに従って紅斑および浮腫のスコア評価が行われた。個々の結果は提示されていないため、本試験は評価には不十分なものであったと考える。本試験では EGBEA は刺激性物質ではないが、方法および記録が評価に不十分であるためこの結果は疑わしい。

6 例のウサギの無処置皮膚および擦過皮膚において、modified Draize 法による EGBEA の一次刺激性試験が行われた (Truhaut *et al.*, 1979)。24 時間の評価で、6 例中 4 例に非常に軽度 (グレード 1) の紅斑を認めた。72 時間にはそれと分かる刺激作用は認められていない。PDII は 0.17 と算出された。

New Zealand 白色ウサギ 6 例を用いた試験 (Jacobs *et al.*, 1989) では、皮膚に純品の EGBEA 0.5 mL が 4 時間にわたり適用された。パッチ除去後 1、24、48、72 時間に Draize スケールに従って紅斑の点数評価が行われたが、個々の結果は提示されていない。各観察時間における全 6 例のスコア平均値を Table 4.20 に示す。

**Table 4.20: mean erythema scores obtained for each observation time for the 6 rabbits**

Observation time	1h	24h	48h	72h
Erythema scores (standard deviation)	2.33 (0.80)	0.50 (0.55)	0.50 (0.55)	0.67 (0.57)

これらの値より、EGBEA は中等度の皮膚刺激性物質とみなすことができる。

ラットおよびヒトの培養ケラチノサイトを用いた細胞毒性試験の *in vitro* データを *in vivo* データと比較するため、ウサギを用いた皮膚刺激性試験 (CEC, 1990 in Lawrence *et al.*, 1996) が 12 種類の化学物質で行われた。ウサギ 6 例が閉塞条件下で未希釈の EGBEA 液に 4 時間曝露され、パッチ除去後 1、24、48、72 時間に、紅斑スコアおよび浮腫スコアの各平均値が算出された。平均紅斑スコアと平均浮腫スコアの合計は、1 時間と 24 時間の観察時点の EGBEA の適用量に対して正規化された。さらに、各時点での紅斑スコアと浮腫スコアの合計の全体平均も算出され、EGBEA の適用量に対して正規化された。

これらの結果を Table 4.21 に要約する。

Table 4.21 – skin irritation data in the CEC study

Rabbit skin irritation data					
Concentration	PDII	Irritant class	Mean erythema score + mean oedema score Normalised to the amount of EGBEA applied		
			1 hour	24 hours	1 – 72 hours
100 %	0.08	Non-irritant	0.005	0.002	0.002

以上の結果が *in vitro* データと比較された結果、*in vivo* データと *in vitro* データのあいだに良好な相関関係が認められた。

New Zealand ウサギを用いた EGBEA の皮膚刺激性の評価 (Zissu, 1995) が、2 種類の試験法 (EEC 試験法、Draize 法) で行われている。

EEC 試験法ではウサギ 3 例の剃毛した側腹部に EGBEA 0.5 mL が閉塞条件下で 4 時間適用され、適用後 24、48、72 時間に各個体の紅斑スコアおよび浮腫スコアの平均値が算出された。

Draize 法ではウサギ 6 例の剃毛した側腹部 2 箇所 (無処置皮膚および擦過皮膚) に EGBEA 0.5 mL が閉塞条件下で 24 時間適用され、各個体について皮膚一次刺激性指数 (PDII) が決定された。

いずれの試験法でも、EGBEA 適用 72 時間後に、適用部位の皮膚の組織学的制御が行われた。

EGBEA は、EEC 法のスコアでは非刺激性物質に分類され、Draize 法では PDII が 1.3 で軽度刺激性物質と考えられた。

#### ヒトにおける試験

EGBEA パッチ適用前後のヒトでの皮膚血流量 (CBFV) が確認されている (Jacobs *et al.*, 1989)。第一の試験では、志願者 8 名の前腕に未希釈の EGBEA 83  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  を含むパッチが適用され、閉塞条件下で 48 時間留置された。CBFV は 12 時間後に測定された。

次に行われた一連の試験では、志願者 4 名の前腕に EGBEA の 10% 水溶液が 3 時間にわたり適用された。

CBFV の測定は 1、24、48、72 時間の時点で行われ、曝露後のコントロール値により補正された。

CBFV は 24 時間の観察時点で最大値を示し、ブランクの 5 (+/- 0.8) に対して 7.5 (+/- 1.3) であった。本結果は、動物試験の他の結果や *in vitro* データに対して、EGBEA のヒト皮膚刺激性がわ

ずかであることを示すものであった。

### In vitro 試験

培養 KB 細胞（口腔類表皮癌由来の樹立細胞株）に様々な濃度の EGBEA を添加し、4 時間インキュベートした試験（Jacobs *et al.*, 1989）がある。これらの培養細胞でウリジン取り込み試験が実施され、UI50（線形回帰により算出されるウリジンの取り込みを 50% 阻害するのに必要な濃度）の決定により毒性が明らかにされた。

本試験で得られた値と、同様の試験で得られたヒトや動物での結果とのあいだには良好な相関関係は認められなかった。したがって、EGBEA の皮膚刺激性の評価において本試験を考慮に入れることはできない。

*In vitro* で 3 次元構造を有するヒト皮膚類似体（skin2）を用いた試験（De Wever and Rheins, 1994）では、未希釈の EGBEA が適用された。被験物質への組織の曝露時間は 5 分間で、曝露 24 時間後に MTT 法で細胞生存率が測定された。

MTT 値は 96% で 100% に近く、組織が依然として生存していることを示している。このモデルで得られた *in vitro* データは、Draize 法による *in vivo* での皮膚一次刺激性指数（PDII）のデータと良好な相関性を示した。EGBEA の PDII は 0.08 である（PDII の値が 2 を超える場合、当該化学物質は刺激性物質に分類される）。

ヒト培養ケラチノサイトを用いた EGBEA の DMSO 溶液の試験（Dickson *et al.*, 1994）で、NR50（ニュートラルレッド）および酸性ホスファターゼ（AP）のピーク値が測定された。

NR50 は約 4.6 mg/mL、AP（ピーク）値の平均は 8 mg/mL であり、これらの結果は EGBEA が軽度刺激性物質であることを示すものである。

また、ヒトおよびラットの培養ケラチノサイトを EGBEA（純度 98%）に曝露することにより、皮膚刺激性が評価された（Lawrence *et al.*, 1996）。細胞内酸性ホスファターゼ（AP）活性の測定およびニュートラルレッド（NR）の取り込みの測定のため、培養細胞が EGBEA の DMSO 溶液にそれぞれ 3 時間、18 時間曝露された。得られた結果は、*in vivo* データと比較された。

細胞内アッセイで確認された細胞毒性は、ラットとヒトのケラチノサイトで同等であった（いずれの動物種でも AP<sub>PK</sub> 値は 16,000 µg/mL）。NR 取り込み試験のデータにおいても、ラットとヒトのケラチノサイトで同様の結果が認められた（NR50 値はヒト、ラットでそれぞれ 4,600 µg/mL、2,900 µg/mL）。全体として、本試験では、*in vivo* データと *in vitro* データのあいだに良好な相関性が示された。

種々の化学物質（非刺激性のコントロールと考えられた EGBEA を含む）について、これらのヒト皮膚刺激性が PGE2 により示唆されるかを検討する試験が行われた（Lawrence *et al.*, 1997）。培養ヒトケラチノサイトを EGBEA（純度 98%）の DMSO 溶液に 18 時間曝露してニュートラルレッド（NR）取り込み試験を実施し、PGE2 濃度を測定した。

選択された濃度のうち高濃度（8,000 µg/mL）では、細胞傷害が生じることが NR50 値により示された。低濃度での NR 取り込みはコントロール（1,000 µg/mL）と同等の水準であった。

EGBEA の NR50 値は 4,600 µg/mL であったが、NR50 値に基づき広範な細胞傷害が生じる濃度でも細胞外 PGE2 濃度の有意な上昇は認められなかった。

この試験では、PGE2 濃度と被験物質の刺激性とのあいだに良好な相関関係が認められたため、EGBEA は非刺激性物質とみなすことができる。

#### 皮膚刺激性の要約

EGBEA に関して複数の皮膚刺激性試験が得られている。その多くは報告内容が不十分で欧州ガイドラインで推奨されている試験条件に従っていないが、いずれの試験でも EGBEA は非刺激性または軽度刺激性であることが示されている。Jacobs *et al.* (1987) および Zissu (1995) による試験はガイドラインに準拠して実施されており、個々の結果は提示されていないものの、両試験とも欧州分類基準に従い EGBEA は皮膚刺激性物質ではないと結論づけている。

したがって、皮膚刺激性に関する分類は提案されない。

#### **4.1.2.3.2 眼**

##### 動物試験

ウサギを用いた試験（Smyth *et al.*, 1962）で、EGBEA 点眼後に観察された角膜壊死に基づき眼刺激性が 10 段階で評価され、グレード 2 と記録された。この分類システムにおいて、グレード 1 は未希釈物質 0.5 mL の点眼による非常にわずかな壊死、グレード 5 は 0.005 mL の点眼による重度の熱傷を示す。その他の点として、本試験は非常に古いもので、分類システムはこの試験に特有のものである。本試験からは眼刺激性に関する結論を得ることはできない。

ウサギに未希釈の EGBEA を点眼した試験（BASF, 1963 cited in IUCLID）では、処置後 1、24 時間、8 日目時点で観察が行われた。点眼 1 時間後にのみ軽度の発赤と浮腫が認められた。他の観察時点では影響は記録されていなかった。本試験では、EGBEA は非刺激性と考えられる。

ウサギ 6 例を用いて、modified Draize 法により EGBEA の眼刺激性に関する試験が行われた (Truhaut *et al.*, 1979)。最初の 24 時間で、6 例中 2 例のみに軽度の結膜発赤および眼脂が認められた。48 時間以降の観察時点では、明らかな刺激症状はみられなかった。以上の結果より、EGBEA は非刺激性と考えられる。

#### In vitro 試験

ニワトリ摘出眼球試験 (CEET) で 21 種類の参照化学物質 (純度 99% の EGBEA を含む) が検討された。角膜の腫脹は観察されなかったが、角膜混濁およびフルオレセイン染色度に関してはごくわずかに影響を認めた。これは、EGBEA が軽度眼刺激性であることを示している。EGBEA を含む 21 物質が、FRAME のフルオレセイン漏出試験で試験された (Clothier *et al.*, 1994)。コンフルエントに達したイヌ腎臓尿管上皮由来の MDCK 細胞に被験物質 50 mg/mL が適用された。EGBEA への 1 分間曝露後、および 72 時間後のフルオレセイン漏出率は、それぞれ  $11 \pm 6\%$ 、 $2 \pm 0.3\%$  であった。この結果に基づくと、EGBEA の眼刺激性に関する分類は不要であった。しかし、本法は眼刺激性を *in vitro* で代替的に評価する試験で、ガイドラインでの妥当性確認はまだ行われていない。よってこの結果を考慮に入れるべきではない。

#### 眼刺激性の要約

動物試験では、EGBEA が軽度、一過性の眼刺激性物質であることが示された。

標準的な Draize 試験や EC 試験を代替する *in vitro* 試験でも、軽度刺激性のコントロール物質として EGBEA の試験が行われている。これらの試験の大部分で、予想どおり、EGBEA は眼刺激性物質ではないという結果が得られている。

したがって、眼刺激性に関する分類は提案されない。

#### **4.1.2.3.3 呼吸器**

ネコを 460 ppm の EGBEA に曝露した結果、粘膜刺激症状が認められた (BASF, 1965) (4.1.2.2.1 項で報告)。この 460 ppm という濃度は 20°C での飽和蒸気圧である 395 ppm を上回るものである。しかし、本試験の手法には欠陥があるため、その信頼性には疑問がある。その他の動物試験やヒトにおける試験は得られていない。

#### EGBEA に関する呼吸器データの要約:

得られている動物試験 (ラットおよびマウスを用いた反復吸入毒性試験を含む) では、有意な呼

吸器刺激徴候は認められていない。よって、EGBE の呼吸器刺激性に関して分類は不要である。ヒトにおける EGBE のデータからは、呼吸器刺激性に関する NOEL（不快感に基づく）は 100～200 ppm 未満である一方、NOEC（EGBE として）は 50 ppm を超えることが明らかである。以降のリスク評価には、NOEC 値 50 ppm を用いた。

全体として、EGBEA のデータおよび EGBEA が皮膚刺激性や眼刺激性を有しないことを考慮すると、EGBE が呼吸器刺激性物質として作用するとは考えられない。したがって、本エンドポイントに関する懸念はない。

#### 4.1.2.3.4 刺激性の要約

動物試験や *in vitro* 試験で観察された刺激症状は、非常に軽度のものばかりであり、EC 分類基準では、EGBEA は皮膚／眼刺激性物質には分類されない。また総合的にみて、皮膚／眼刺激性物質でないことを考慮すると EGBEA が呼吸器刺激性物質として作用するとは考えられず、刺激性の懸念はない。

#### 4.1.2.4 腐食性

EGBEA の腐食性が *in vitro* 試験（Corrositex 法）で評価されている（Gordon *et al.*, 1998）が、腐食作用を示す所見は認められなかった。さらに、*in vivo* の皮膚刺激性試験でもごく軽度の刺激性徴候しか観察されていない。

EU 分類基準によると、EGBEA は腐食性物質とは考えられない。

#### 4.1.2.5 感作性

##### 4.1.2.5.1 動物試験

##### 皮膚

##### *In vivo* 試験

GLP に基づく感作性試験が Buehler 法により行われ、モルモット 20 例に EGBEA（純度 99.1%）が適用された（Huls, 1998）。誘導相および惹起相には未希釈物質が用いられた。本試験は European technical guideline B6 に準拠して実施された。

予備試験では、モルモット 3 例の剃毛した皮膚に閉塞条件下で 6 時間 EGBEA（純品、または 5、25、50% のコーン油希釈物）が適用された。パッチ除去後、処置開始から 30、54 時間の時点で

皮膚反応が評価された。各評価時点において、いずれの剤形の被験物質によっても 3 例に皮膚刺激は生じなかった。

主試験では、モルモット 20 例を用いて、1 日目（誘導相 I）、7 日目（誘導相 II）および 14 日目（誘導相 III）に閉塞条件下で 6 時間 EGBEA（純品）が皮膚適用された。処置後 30 時間の時点で皮膚反応の観察が行われ、Magnusson and Kligman の分類に従い評価された。さらに 28 日目に惹起処置（EGBEA 純品の 6 時間閉塞適用）が実施され、適用後 30、54 時間の時点で刺激性徴候の観察が行われた。

純品の適用後に刺激性は認められなかった。また惹起処置後の 2 つの観察時点で影響はみられなかった。

### 呼吸器

グリコールエーテル系の SAR とその幅広い分散的な用途、そして呼吸器感作事例に関連付けられたグリコールエーテルがないことを考慮すると、呼吸器感作性は予測できずリスク評価の対象とはならないと考えられる。

#### 4.1.2.5.2 ヒトにおける試験

データなし。

#### 4.1.2.5.3 感作性の要約

適切に実施された Buehler 試験において、皮膚感作性の徴候は認められなかった。グリコールエーテル系の SAR と EGBEA の幅広い分散的な用途、そして曝露集団において EGBEA による皮膚感作を示す徴候が認められていないことを考慮すると、EGBEA に感作性はないと結論づけられ、さらなる試験は不要と考えられる。

グリコールエーテル系の SAR とその幅広い分散的な用途、そして呼吸器感作事例に関連付けられたグリコールエーテルがないことを考慮すると、呼吸器感作性は予測できずリスク評価の対象とはならないと考えられる。

#### 4.1.2.6 反復投与毒性

2-ブトキシエタノールアセテート分子は、おそらくエステラーゼによって、2-ブトキシエタノールと酢酸に速やかに開裂する（4.1.2.1 項参照）。したがって、全身に分布した EGBEA は、EGBE と酢酸に代謝されると予測することができる。EGBE と EGBEA とは構造が類似しており、さら

に少なくとも体循環においては、EGBEA は EGBE に代謝される可能性が高いことから、EGBEA の全身毒性に関する特異的なデータや有効なデータが得られない場合に EGBE のデータから EGBEA を類推できると考えることは妥当である。EGBEA の全身性の反復投与毒性は主にその代謝物である EGBE に起因する。EGBEA 特異的に実施された試験とともに EGBE で得られた結果も要約し、ヒトの健康に対する影響評価において考慮する。

#### 4.1.2.6.1 動物試験

##### 吸入

##### ラットにおける試験

4 週間吸入試験で、ラット 10 例が約 340 ppm の EGBEA に 1 日 6 時間、週 5 日曝露された (BASF, 1965 cited in IUCLID)。

4 例は最終投与前に死亡した。2 回目の曝露以降、無気力、側臥位、過呼吸が認められ、一部は貧血を有すると考えられた。また 1 回目と 2 回目の曝露後にはヘモグロビン尿を認めたが、その後は認められなかった。試験開始時にはヘモグロビンが低下したが、13 回目の曝露以降は正常に回復した。影響は雄よりも雌でより顕著であった。

1 群 20 例 (雌雄各 10 例) のラットが飽和状態の EGBEA 蒸気-空気混合物 (約 400 ppm に相当) に 1 日 4 時間、週 5 日、1 ヶ月にわたり曝露された (Truhaut *et al.*, 1979)。試験終了時に 3 分の 2 のラットが屠殺され、残りのラットでは屠殺前に 1 週間の回復期間が設けられた。Truhaut が実施した一連の試験におけるパラメータの一部は、試験終了後に分析された (実施された尿検査、血液検査、病理検査の詳細については 4.1.2.2.1 項の「吸入」を参照)。

曝露群と対照群のあいだに体重増加の有意な差は認められなかった。曝露 2 週目以降には軽度のヘモグロビン尿や血尿がみられるようになった。

剖検では腎臓が肥大し血液で拡張していた。他のラットでは病変は認められなかった。組織学的には、最終曝露の直後に屠殺した雌ラットで、軽度から重度の腎尿細管ネフローゼ病変 (単なる細胞の混濁腫脹から出血性壊死まで様々) が認められた。1 週間の回復期間後には、完全な病変の可逆性が認められた。雄ラットでは変化はみられなかった。著者らによると、観察された病変はいずれも間違いなく溶血に起因するものであった。

1 群 20 例 (雌雄各 10 例) のラットが 100 ppm の EGBEA に 1 日 4 時間、週 5 日、10 ヶ月にわたり曝露された (Truhaut *et al.*, 1979)。Truhaut が実施した一連の試験におけるパラメータの一部は、試験終了後に分析された (実施された尿検査、血液検査、病理検査の詳細については 4.1.2.2.1 項



の「吸入」を参照)。

試験中および試験後に影響は観察されなかった。雄ラットでは、皮質領域における尿細管の腫大または委縮を伴ういくつかの腎炎部を特徴とする非常に分散し不安定な腎病変がみられ、同時に一部の例では炎症性線維症およびヘンレ係蹄や遠位尿細管の拡張を認めた。いくつかの例では、脳細管の腫大とともに硝子円柱を認めた。雌ラットでは、曝露群だけでなく対照群でもいくつかの尿細管腎炎病変部を認めた。

#### マウスにおける試験

4週間吸入試験で、マウス 20 例が約 340 ppm の EGBEA に 1 日 6 時間、週 5 日曝露された (BASF, 1965 cited in IUCLID)。

4回目から 15 回目の曝露のあいだで 6 例が死亡したものの、コントロール群でも 20 例中 8 例が死亡した。臨床症状、特にヘモグロビン尿は観察されなかった。剖検で特別な所見は認められなかった。

#### モルモットにおける試験

4週間吸入試験で、モルモット 10 例が約 340 ppm の EGBEA に 1 日 6 時間、週 5 日曝露された (BASF, 1965 cited in IUCLID)。本試験が行われた 10 例中 8 例は、以前に急性吸入試験で 460 ppm の EGBEA に 6 時間曝露され検討を受けたモルモットであった。

本試験では死亡例はなく、所見も認められなかった。

#### ウサギにおける試験

4週間吸入試験で、ウサギ 3 例が約 340 ppm の EGBEA に 1 日 6 時間、週 5 日曝露された (BASF, 1965 cited in IUCLID)。これらのウサギは以前に急性吸入試験で 460 ppm の EGBEA に 6 時間曝露され、検討を受けていた。

4回または 11 回の曝露後に全例が死亡した。数回の曝露の後、ヘマトクリットまたはヘモグロビンの低下が記録された。さらに全例で、曝露期の開始時にヘモグロビン尿を認めた。剖検では、3 例中 2 例に溶血性貧血の徴候がみられた。

1 群 4 例 (雌雄各 2 例) のウサギが、飽和状態の EGBEA 蒸気-空気混合物 (約 400 ppm に相当) に 1 日 4 時間、週 5 日、1 ヶ月にわたり曝露された (Truhaut *et al.*, 1979)。Truhaut が実施した一連の試験におけるパラメータの一部は、試験終了後に分析された (実施された尿検査、血液検査、

病理検査の詳細については4.1.2.2.1項の「吸入」を参照)。

曝露群と対照群のあいだに体重増加の有意な差は認められなかった。曝露2週目以降には重度のヘモグロビン尿や血尿がみられるようになった。RBC数およびHbは曝露期間の最初の3週は正常であったが、その後2例でわずかな低下、他の2例で大幅な低下が生じた。大幅な低下を認めた2例は4週目のあいだに死亡した。これら死亡例の剖検では、腎臓が肥大し血液で拡張しており、膀胱内には血液が充満していた。他のウサギでは、屠殺時に肉眼的な病理学的病変は認めず、組織学的には、全例で壊死性腎尿細管ネフローゼ、萎縮性尿細管拡張および管腔内顆粒状沈着物を認めた。剖検でも、全例で壊死性腎尿細管ネフローゼ、萎縮性尿細管拡張および管腔内顆粒状沈着物を認めた。著者らは、観察された病変はいずれも溶血に起因するものに違いないとしている。また、1群4例(雌雄各2例)のウサギを100ppmのEGBEAに1日4時間、週5日、10ヵ月にわたり曝露した試験も行われている(Truhaut *et al.*, 1979)。Truhautが実施した一連の試験におけるパラメータの一部は、試験終了後に分析された(実施された尿検査、血液検査、病理検査の詳細については4.1.2.2.1項の「吸入」を参照)。

試験中および試験後に影響は観察されなかった。組織学的には、対照群に比べて投与群で軽度の腎病変を認めた。腎病変は、皮質領域における尿細管の腫大または萎縮を伴ういくつかの腎炎部を特徴とし、同時に一部の例では炎症性線維症およびヘンレ係蹄や遠位尿細管の拡張のみを認めた。以上の影響は対照群でも観察されたが、その程度は低かった。

(Truhaut *et al.*, 1979)によると、観察されたあらゆる腎障害は、溶血またはグリコール代謝物の腎臓への直接作用(血尿など)のいずれかに起因して生じた可能性がある。組織学的検査において尿細管にシュウ酸塩結晶を認めず、観察された著しい貧血は真の血尿よりも溶血に起因した可能性が高いことから、著者らは、前者の仮説が最も有力と考えた。

#### ネコにおける試験

4週間吸入試験で、ネコ3例が約340ppmのEGBEAに1日6時間、週5日曝露された(BASF, 1965 cited in IUCLID)。これらのネコは以前に急性吸入試験で460ppmのEGBEAに6時間曝露され、検討を受けていた。

初回曝露中に唾液分泌および嘔気、2回目の曝露中に過呼吸が認められた。ヘモグロビン値の低下(4回目の曝露後に約45%の低下)を認め、9回目の曝露後に正常値に回復した。本試験ではヘモグロビン尿および肝機能障害はみられなかった。

#### 吸入経路の要約

EGBEAを用いた試験では、モルモット以外のすべての動物種で、血液毒性および関連病変が認

められた。暫定的に決定された N(L)OAEC を Table 4.22 に要約する。ただし、これらの試験には限界があり、被験濃度は 1 種類のみで使用動物数は限定的、また定量的情報が欠如している。さらに一部の影響は対照群でも観察されていること、およびかなり古い試験であることから、EGBE に関して得られるより頑健な試験を利用することが望ましいと考えられた。

したがって、これらの試験は、リスク評価の目的での信頼性は低いと考えられた。EGBE の試験から得られた結果を考慮に入れることは可能である（吸入経路の要約（EGBE に関するデータ）を参照）。

Table 4.22 – Summary EGBEA Repeated Dose Toxicity studies by inhalation route

Study	NOAEC (ppm)	Effects	Reference
Rats			
4 weeks, 6hr/d, 5d/w, 340 ppm	-	Mortality, apathy, hyperpnoea, anemia.	BASF, 1965
4 weeks, 4hr/d, 5d/w, 400 ppm	LOAEC : 400 ppm (in females)	Haemoglobinuria and haematuria. Renal lesions.	Truhaut <i>et al.</i> , 1979
10 months, 4h/d, 5d/w, 100 ppm.	NOAEC ≤ 100 ppm	Very slight renal lesions but also seen in controls.	Truhaut <i>et al.</i> , 1979
Mice			
4 weeks, 6h/d, 5d/w, 340 ppm	-	Mortality (6/20 but 8/20 in controls)	BASF, 1965
Rabbits			
4 weeks, 6h/d, 5d/w, 340 ppm	-	Mortality (3/3). Signs of haemolytic anaemia in all animals.	BASF, 1965
4 weeks, 4hr/d, 5d/w, saturated air- vapour mixture	LOAEC : 400 ppm	Mortality (2/4) Haemoglobinuria and haematuria	Truhaut <i>et al.</i> , 1979
10 months, 4h/d, 5d/w, 100 ppm.	LOAEC : 100 ppm	Very slight renal lesions seen also in controls but to a lesser extent.	Truhaut <i>et al.</i> , 1979
Guinea pigs			
4 weeks, 6h/d, 5d/w, 340 ppm	NOAEC = 340 ppm	No findings	BASF, 1965
Cats			
4 weeks, 6h/d, 5d/w, 340 ppm	-	Sign of haematotoxicity (decrease in haemoglobin)	BASF, 1965

#### 吸入曝露の要約 (EGBE のデータ)

ラットおよびマウスを用いて EGBE を評価した試験が多く得られている。また、イヌ、モルモットおよびヒト以外の霊長類を用いた短期試験も、いくつか実施されている。

ラットおよびマウスでは、一般的な毒性徴候に加え、急性投与試験で観察されたものと同様の影響が認められた。主な影響として溶血が一貫して認められ、場合によっては、肝臓に対する二次的影響（クッパー細胞の色素沈着、肝臓の絶対および相対重量の増加）も認められた。他には、体重増加量の減少、嗅上皮の硝子変性、前胃への影響、および WBC 亜群（T リンパ球）への影響がみられた。以上の試験より、唯一重要な一次作用である溶血に基づき、ラットにおける NOAEC は 25 ppm (Bushy Run Research Center, 1981)、マウスおよびラットにおける LOAEC は 31 ppm と確認することができる (NTP, 2000)。リスク評価には、LOAEC 値 31 ppm (NTP, 2000 の 104 週間試験における 6 ヶ月サテライト群より導出) を用いる。

### 経皮

EGBEA の経皮経路での反復投与毒性に関するデータは得られていない。

#### 経皮経路の要約 (EGBE のデータ)

ウサギを用いて EGBE の経皮反復投与毒性を評価した試験が、2 試験得られている。1 つ目の試験で記録された毒性徴候は、一過性の溶血徴候のみであった。本試験では、900 mg/kg bw/d で血液学的影響が認められたことから、NOAEL は 450 mg/kg bw/d とされた (Bushy Run Research Center, 1980)。この試験の期間がわずか 9 日間であったことを考慮すると、ウサギを用いて 13 週間にわたり実施されたもう 1 つの試験での NOAEL の方がリスク評価の目的での信頼性は高いと考えられる。当該試験での NOAEL は 150 mg/kg bw/d であった (Wil Research Lab., 1983)。

EGBE の免疫系への影響を評価するために計画されたマウスを用いた試験では、NOAEL は 1,000 mg/kg bw/day と確認された。

EGBE のリスク評価報告書では、経皮曝露による反復投与毒性に関して、NOAEL 値 150 mg/kg bw/day が用いられた。EGBE データのみなし代用を行い、NOAEL 値 150 mg EGBE/kg bw、すなわち 203 mg EGBEA/kg bw を経皮経路による反復投与毒性に関して考慮した (外挿係数は 4.1.3 項を参照)。

### 経口

#### ラットおよびマウスにおける試験

ラットにおける EGBEA の経口反復投与毒性に関するデータは得られていない。

#### 経口経路の要約 (EGBE のデータ)

EGBE に関して、ラットを用いた 6 試験、マウスを用いた 2 試験が得られている。経口経路で認められた影響は、体重減少、溶血、肝臓への影響および局所刺激作用であった。強制経口投与後に前胃で刺激症状を認め、かつ、皮下および腹腔内投与後にも認めたが、その程度ははるかに低かった。この差は、強制経口投与後の方が局所濃度が高いことに起因している可能性が最も高い。総合すると、以下に詳述する 3 ヶ月間試験において、EGBE の LOAEL は雄、雌でそれぞれ 69、82 mg/kg bw/d と確認することができる。

1 群雌雄各 10 例の F344/N ラットに、0、750、1500、3000、4500、6000 ppm の EGBE (ロット番号 BT00504LP、Aldrich Chemical Co.、USA、純度約 99%) が 13 週間飲水投与された。投与された濃度は、目標用量である 0、100、150、250、400、650 mg/kg bw/d に相当するものであった。飲水量に基づくラットの推定 EGBE 摂取量は、雄で 69、129、281、367、452 mg/kg/day、雌で 82、151、304、363、470 mg/kg/day であった。1 週目と 3 週目の各時点で 1 群雌雄各 10 例からなる追加群が含まれ、血液学的検査および臨床生化学検査が行われた (NTP, 1993)。

750 ppm [雄で 69 mg EGBE/kg bw/d (94 mg EGBEA/kg bw/d)、雌で 82 mg EGBE/kg bw/d (111 mg EGBEA/kg bw/d) に相当] で雌雄両方の肝細胞に細胞質変性を認めたことから、本試験では NOAEL は確認されなかった。

#### ウサギにおける試験

5 週間強制経口投与試験で、ウサギ 3 例に 1 日当たり約 188 mg/kg の EGBEA が週 5 日間投与された (BASF, 1964 cited in IUCLID)。これらのウサギは以前に急性経口毒性試験で 188 mg/kg の EGBEA の単回投与を受け、検討されていた。臨床症状の記録、血液学的検査、肝機能検査、尿検査および剖検時の病理学検査が行われた。

試験終了時に 3 例中 2 例でヘマトクリット値のわずかな低下を認めたことを除いては、EGBEA に関連した所見は認められなかった。

#### ネコにおける試験

5 週間強制経口投与試験で、ネコ 2 例に 1 日当たり約 188 mg/kg の EGBEA が週 5 日間投与された (BASF, 1964 cited in IUCLID)。これらのネコは以前に急性経口毒性試験で 188 mg/kg の EGBEA の単回投与を受け、検討されていた。臨床症状の記録、血液学的検査、肝機能検査、尿検査および剖検時の病理学検査が行われた。

1 例で軽度の不均衡を認めた。試験終了時に赤血球数およびヘモグロビンの約 30~50% の低下がみられた。以上の所見は 2~3 週間で回復した。ヘモグロビン尿は観察されなかった。

### 経口経路の要約

経口経路での EGBEA の毒性評価に利用可能なデータは限定的である。2 試験、2 種類の動物種で血液毒性の徴候が観察されている。EGBE を用いた試験の結果、経口経路で体重減少、溶血、肝臓への影響および局所刺激作用の影響が認められた。総合すると、NTP の試験（1993）に基づき、雄、雌の LOAEL はそれぞれ 69、82 mg EGBE/kg bw/d と確認することができる。

モル数に基づき EGBE の LOAEL を EGBEA の LOAEL に外挿すると、雄、雌それぞれ 94、111 mg EGBEA/kg となる。

### EGBE に関する反復投与毒性試験の要約：

ラットおよびマウスにおいて、溶血が一貫して認められ（投与経路を問わない）、場合によっては、肝臓への影響（クッパー細胞の色素沈着、肝臓の絶対および相対重量の増加）、体重増加量への影響、嗅上皮の硝子変性（吸入の場合）、前胃への影響および WBC 亜群（T リンパ球）への影響も認められた。以上の試験および吸入経路では、マウスにおける NOAEC は確認されなかったが、ラットにおける NOAEC は 25 ppm (121 mg/m<sup>3</sup>) と確認された。別試験では、溶血およびクッパー細胞の色素沈着に基づき、ラットでの LOAEC を 31 ppm (150 mg/m<sup>3</sup>) と確認することができる。見かけ上の LOAEC と NOAEC が近接しているため、以降のリスク評価にはより保守的な LOAEC 値である 31 ppm を用いることが賢明と考えられる。ただし、適切な評価係数を導出する上では、この値が NOAEL に近い可能性を考慮する。

ラット、マウスおよびヒトの NK 細胞または T リンパ球亜種で、免疫系に対するわずかな影響が認められた。ヒトにおける試験では、多数の化学物質への同時曝露が行われており、EGBE のみに関する信頼性の高い結論を導くことができない。一方、げっ歯類の試験では、マウスにおける経皮経路での NOAEL は 1000 mg/kg bw と確認することができる。観察された影響は軽度であった。リスク評価で用いられる量では、EGBE による免疫毒性の誘導は認められなかった。

経皮経路に関しては、ウサギを用いた 13 週間試験で、NOAEL が 150 mg/kg bw/d（試験が行われた最高用量）と確認された。

経口経路に関しては、ラットを用いた 13 週間飲水投与試験で、雄、雌の LOAEL がそれぞれ 69、82 mg/kg/day と確認された（溶血に基づく）。

EGBE の溶血作用に対するヒトの感受性は他の動物種（モルモットを除く）よりもかなり低いため、溶血およびその関連事象と、EGBE により起こり得る他の特異的な毒性効果を別々に評価しようと試みた。いずれの試験でも、血液毒性以外の特異的な関連毒性は確認されていない。

リスク評価の目的では血液毒性をエンドポイントとして選択し、安全域の計算では種間差（ヒトとげっ歯類）に留意する。明らかに EGBE 投与に起因すると考えられる病変は他に確認されていない。

#### 4.1.2.6.2 ヒトにおける試験

データなし。

#### 4.1.2.6.3 反復投与毒性の要約

EGBEA で得られているデータはかなり古く、ガイドラインに従って実施されていないためその質も低い。しかし、これらの試験で主な影響として、血液毒性の徴候および関連する病変が示されている。EGBE と EGBEA とは構造が類似しており、かつ少なくとも体循環においては、EGBEA は EGBE に代謝される可能性が高いことから、EGBEA に関する特異的なデータや有効なデータが得られない場合には、EGBE のデータから EGBEA を類推することは妥当である。よって、EGBE のデータを用いて EGBEA の反復投与毒性評価を補強することができる（4.1.2.6.1 項参照）。

最も信頼性の高い吸入に関するデータは、ラットを用いた 2 年間試験における 6 ヶ月サテライト群から得た LOAEC 値 31 ppm である。

経口経路に関しては、ラットを用いた EGBE の 13 週間経口投与試験で雄および雌の LOAEL がそれぞれ 69、82 mg/kg/day と確認されており、そこから EGBEA の LOAEL（溶血作用）は 94、111 mg/kg/day と表された。

経皮経路に関しては、ウサギを用いた EGBE の 13 週間試験で、NOAEL が 150 mg/kg bw/d（試験が行われた最高用量）と確認された。これを EGBEA に外挿すると、NOAEL は 203 mg/kg bw/d となる。

EGBE または EGBEA で確認された N(L)OAEL(C)を Table 4.22 bis に要約する。

Table 4.22 bis: LOAEL(C) / NOAEL(C) for EGBE and EGBEA

	Oral	Inhalation	Dermal
End point	LOAEL	LOAEC	NOAEL
EGBE Value	69 mg/kg bw/day (male rat)	31 ppm (152 mg/m <sup>3</sup> )	150 mg/kg bw/day
EGBEA value	94 mg/kg bw/day (male rat)	31 ppm (206 mg/m <sup>3</sup> )	203 mg/kg bw/d



EGBEA の溶血作用に対するヒトの感受性は他の動物種（モルモットを除く）よりもはるかに低いため、溶血およびその関連事象と、EGBEA により起こり得る他の特異的な毒性効果を別々に評価しようと試みた。いずれの試験でも、血液毒性以外の特異的な関連毒性は確認されていない。リスク評価の目的では血液毒性をエンドポイントとして選択し、安全域の計算では種間差（ヒトとげっ歯類）に留意する。他に明らかに EGBEA 投与に起因すると考えられる病変は確認されていない。

#### 4.1.2.7 変異原性

EGBEA は体循環において速やかに EGBE と酢酸に加水分解され、さらに EGBEA と EGBE は化学構造的に類似しているため、EGBEA の変異原性は EGBE データのみなし代用により評価することができる。

##### *In vitro* 試験

EGBEA に関するデータなし。

##### 4.1.2.7.1 *In vivo* 試験

EGBEA に関するデータなし。

##### *EGBE* に関する変異原性データの要約：

*S. typhimurium* TA97a を用いた試験で有意な反応が 1 件報告されているものの、EGBE は細菌で非変異原性である。この報告について、これを特異的に検討するために設計された他試験での実証は行われていない。細菌では、BAL、BAA のいずれも変異原性を示さなかった。哺乳類細胞を用いた変異原性試験 3 試験のうち 2 試験では、EGBE の変異原性を示す所見は認められなかった。また、非常に高濃度（20 mM）を用いた試験では有意な結果が得られたが、報告は不十分であった。同じ文献において 20 mM の BAL で有意な結果が報告されているが、他試験では 7.6 mM 以下では影響がないことが確認されている。BAA に関しては、哺乳類細胞を用いた変異原性試験は得られていない。

SCE 誘発および細胞形質転換に関する試験で EGBE の有意な活性を示す報告があるが、これも結果には一貫性がない。さらに、SCE 試験での有意な結果は、細胞周期の遅延によるアーチファクトである可能性がある。また、EGBE とその主な代謝物 2 種類を用いた試験では、ギャップ結合による細胞間コミュニケーションの阻害が示されている。UDS 誘発に関する 1 試験に関しては、今では有意な反応が無効とみなされてしまう技術が使用されていた。

EGBE を用いた複数の哺乳類細胞培養研究や BAL または BAA を用いた研究では、染色体異常の誘発を示す所見は認められていない。一方異数性誘発作用に関しては、唯一得られている試験において、EGBE および BAL ではわずかな影響が認められたが BAA では影響は認められなかった。*In vitro* 長時間曝露試験での小核誘発は BAL および EGBE 自体（程度ははるかに低い）では認められたが BAA では認められず、染色体切断よりも異数性に起因するものと考えられる。

*In vivo* では、骨髄細胞での小核誘発やラットの複数の臓器での DNA との相互作用を示す所見はない。*In vitro* で BAA の異所性誘発能を示す所見が認められなかったことから、不分離が発生していたがこれらの試験で検出できなかったという可能性はほとんどないと考えられる。BAA は *in vivo* で速やかに生成され、EGBE の血中代謝産物の中で圧倒的割合を占めるため、標的となりうる細胞が EGBE や BAL に高濃度で曝露されるのは短時間である。証拠に照らすと、EGBE は *in vivo* で有意な変異原性を示さないと考えられる。

哺乳類を用いた EGBE およびその代謝物の *in vivo* 遺伝毒性試験を、Table 4.23 に要約する。

**Table 4.23: *In vivo* tests in mammals for the genotoxicity of EGBE and its metabolites**

Test system	Source & purity of chemical	Result <sup>a</sup>	Dose <sup>b</sup> (LED/HID)	Reference
<b>EGBE</b>				
DNA adducts, Sprague-Dawley rat brain, kidney, liver, spleen & testis, <i>in vivo</i> ( <sup>32</sup> P-post-labelling)	Merck, Germany 99 %	- (at 24 h)	120 mg/kg bw orally x 1	Keith <i>et al.</i> , 1996
Methylation level of DNA, Sprague-Dawley rat brain, kidney, liver, spleen & testis <i>in vivo</i>	Merck, Germany 99 %	-		Keith <i>et al.</i> , 1996
Methylation level of DNA, FVB/N transgenic mouse brain, kidney, liver, spleen & testis <i>in vivo</i>	Merck, Germany 99 %	-		Keith <i>et al.</i> , 1996
Micronucleus test, CD-1 mouse bone-marrow cells <i>in vivo</i>	Merck, Germany 99 %	-	800 mg/kg bw i.p. x 1	Elias <i>et al.</i> , 1996
Micronucleus test, B6C3F <sub>1</sub> mouse bone-marrow cells <i>in vivo</i>	Dow Chemical, USA >99 %	-	550 mg/kg bw i.p. x 3	NTP, 2000
Micronucleus test, male F344/N rat bone-marrow cells <i>in vivo</i>	Dow Chemical, USA >99 %	-	450 mg/kg bw i.p. x 3	NTP, 2000
<b>BAL</b>				
No data available				
<b>BAA</b>				
Micronucleus test, CD-1 mouse bone-marrow cells <i>in vivo</i>	Janssen Chimica, Belgium >99 %	-	200 mg/kg bw i.p. x 1	Elias <i>et al.</i> , 1996

<sup>a</sup> +, positive; -, negative; NT, not tested;

<sup>b</sup> LED, lowest effective dose; HID, highest ineffective dose

#### 4.1.2.7.2 変異原性の要約

EGBEA の変異原性は、EGBE のデータに基づき評価する。上述の情報より、EGBEA に遺伝毒性の懸念はなく、変異原性に関する分類は不要である。

#### 4.1.2.8 発がん性

2-ブトキシエタノールアセテート分子は、おそらくエステラーゼによって、2-ブトキシエタノールと酢酸に速やかに分かれる (4.1.2.1 項参照)。したがって、全身に分布した EGBEA は、EGBE と酢酸に代謝されると予測することができる。EGBE と EGBEA とは構造が類似しており、さらに少なくとも体循環においては、EGBEA は EGBE に代謝される可能性が高いことから、EGBEA に関する特異的なデータや有効なデータが得られない場合に EGBE のデータから EGBEA を類推できると考えることは妥当である。EGBEA の発がん性は EGBE のデータから類推することにより評価することができる。

##### 4.1.2.8.1 動物試験

データなし。

##### 4.1.2.8.2 ヒトにおける試験

データなし。

##### 4.1.2.8.3 発がん性の要約

EGBEA の発がん性は、EGBE に関する報告に基づき評価する。

*EGBE に関する発がん性データの要約：*

#### 雄マウスにおける血管肉腫形成のメカニズムとヒト健康に対する意義

EGBE を投与した雄マウスにおいて、肝臓の内皮細胞に由来する血管肉腫 (Frith and Ward, 1979) の発生率上昇が認められたが、雌マウスや高濃度の EGBE に曝露されたラット (雌雄両方) ではこのような上昇はみられなかった。血管肉腫発生の明らかな種特異性および性特異性は、ヒトでのリスク評価プロセスに影響を及ぼす可能性があるため、その誘発のメカニズムを本項で検討する。個々の化合物の実験データは、上述の項を参照されたい。

遺伝毒性に関する *in vitro* 試験のうち EGBE やその代謝物への曝露による有意な反応を報告しているものは一部にとどまり、*in vivo* 試験で染色体異常誘発性や DNA との共有結合性相互作用を示す証拠はない。したがって、新生物形成過程における EGBE やその代謝物による遺伝毒性の関与を示す証拠は不十分であると考えられる。

他に可能性のある血管肉腫誘発のメカニズムは、主な尿中代謝物である BAA の血液毒性に基づ

くものであろう。BAA は、雌雄両方のマウスで溶血性貧血を引き起こすことが確認されている。ただし、BAA による貧血はラットでも起こり、その感受性はマウスよりもやや高い。よって、溶血に起因するという仮説を支持するには、げっ歯類において、このメカニズムの重要な要素である種差や性差が必要となる。

EGBE 曝露により溶血が生じると、マウスおよびラットのクッパー細胞、肝細胞など肝臓の複数の細胞型でヘモジデリンが沈着する。また、マウスの内皮細胞は顕著な食作用活性を有することが分かっており (Steffan *et al.*, 1986)、この作用によって不溶性の鉄錯体や老化赤血球が内皮細胞に入る可能性がある。ヘモジデリン中の第一鉄は酸化還元サイクルを形成することができ、酸化過程ではフェントン反応によって第二鉄、および反応性が高く有害なヒドロキシラジカルを生成する。



雄のラットおよびマウスの肝細胞を用いて、これらの鉄沈着による酸化ストレスの発生に関する検討が行われた (上述の肝臓病変に関する機構研究を参照)。結論として、ラット培養肝細胞の酸化ストレスに対する感受性は、マウス肝細胞と比較して著しく低かった。ラット肝臓内皮細胞の抗酸化能は、肝細胞やクッパー細胞で認められたものよりずっと低い (DeLeve, 1998 ; Sporalics, 1999)。よって、内皮細胞、クッパー細胞および肝細胞で同様のヘモジデリン沈着が起こる場合、内皮細胞の保護が最も低く、最大の酸化的損傷を受けることになる。In vivo 試験 (Siesky *et al.*, 2002) において、2年間吸入試験で血管肉腫の発生率を上昇させた用量に相当する EGBE を雄マウスに投与 (強制経口投与) した結果、肝臓の DNA および脂質の酸化的損傷、ならびに DNA 合成の増加が認められた。これらの所見は特に内皮細胞で顕著であったが、肝細胞でも認められている。ラットではこのような影響は一切認められなかった。以上より、in vivo および in vitro で証明された酸化ストレスに対する感受性の種差は互いに一致しており、EGBE を投与した雄マウスでの血管肉腫形成プロセスにおいて酸化ストレスが不可欠な要素であるとする仮説とも矛盾しない。

また、マウスでの性差に関する in vivo 研究より、酸化的損傷に対する感受性は雌マウスよりも雄マウスの肝臓の方がわずかに高いことが示唆されている。急性的な酸化的 DNA 損傷や脂質過酸化の測定ではこの性差は大きくないように思われるが、雄よりも雌で高い抗酸化能が残っていた。以上からは、血管肉腫は雄で形成されるが雌では形成されないと確信をもって予測することはできない。実際、新生物反応は雄マウスでも大きくはなかったため、雄では酸化的損傷が特定の臨界値を上回ったが雌では臨界値に達しなかったと考えることもできる。Deguchi *et al.* (1995) は、雌性ホルモンが雄性ホルモンよりも高い抗酸化能を与えることを明らかにした。同グループ (Okada, 1996) はさらに、雌マウスの腎臓における脂質過酸化のレベルが雄マウスに比べてはるかに低いことも見出した。この結果は、雌マウスの腎臓が雄よりも高いレベルの保護を受けていることを示すものである。また、酸化的損傷に対する感受性の性差が肝臓に限ったものではない

ことも示しており、体内の他の臓器においても性別に関連した発症パターンで酸化的損傷の影響が認められる可能性がある。

BAA に対するヒト培養赤血球の感受性は、げっ歯類の細胞よりも明らかにはるかに（1桁以上）低い。さらに、職業曝露を受けた人々（2集団）や制御された条件下の健康志願者では、EGBE による血液毒性は認められなかった（EGBE の報告書 4.1.1.1 項を参照）。成人自殺未遂例 1 例でみられた極めて高用量（推定用量 4500 mg/kg bw）の EGBE への曝露では、EGBE 曝露の結果としてヒト赤血球が損傷を受ける可能性があることが示された。しかし、赤血球損傷には致死量に近い用量が必要であり（曝露量 1000 mg/kg bw 以上と推定された他の自殺未遂例では同影響は認められなかった）、職業環境や通常の消費者用途では起こらない（EGBE の報告書 4.1.1.2 項を参照）。よって、この影響をリスク評価で考慮する必要はない。小児の偶発的中毒例では、溶血を示す所見は認められていない。したがって、EGBE による血管肉腫の誘発に溶血が必要不可欠であれば、ヒトは感受性種ではないと言える。

得られているデータは、雄マウスで観察された血管肉腫が溶血によるヘモジデリン沈着に起因するもので雌雄両方のマウスで発現するという説と一致している。これらの沈着物は活性酸素生成の核をなし、十分な抗酸化保護がなければ活性酸素は DNA などの様々な細胞成分を損傷しうる。肝類洞細胞での沈着が一定レベルに達すると細胞の酸化防御メカニズムが圧倒され、肝臓血管内皮細胞における新生物反応が起こる条件が生み出される。EGBE の溶血作用に対するヒトの感受性ははるかに低く、自殺未遂での極めて高用量への曝露例を除いて血球の損傷は認められていない。よって、雄マウスにおける血管肉腫の軽度誘発（雌マウスや雌雄ラットでは認められていない）は、ヒトのリスク評価に影響を与えないと考えられる。この議論の欠点は、ヘモジデリン沈着がクッパー細胞で起こると報告されている一方で、類洞内皮細胞での沈着などは報告されていないことである。しかし、活性酸素種はクッパー細胞から隣接する内皮細胞に移動しうることが明らかにされており（Klaunig, 2004）、雄マウスで肝血管肉腫発生率を上昇させた用量で、雄マウス内皮細胞の反応が増殖という形で認められている。なお、雄ラットでは内皮細胞の反応は認められなかった（Siesky *et al.*, 2002）。

### EGBE を含まない試験での関連情報

EGBE が投与された雄の B6C3F<sub>1</sub> マウスで血管肉腫の発生率が上昇するプロセスは、化合物特有のメカニズムとして示されている。本メカニズムの原理は血管肉腫を誘発する他の化合物にも適用できる可能性があるが、説明された全過程を含めた一般化ができる可能性は極めて低い。理由は以下のとおり。

- 特定の化合物に関する、種間、雌雄間および投与経路による代謝や動態の差
- 血管肉腫形成に至る経路を本質的またはそれより低い程度で変化させる他の毒性学的過程（遺伝毒性など）との相互作用

- 雌雄間での偶発的な発生率の差（特に発生率が低い場合）
- 血液学的データの欠損など情報の欠如（特に古い試験の場合）

B6C3F<sub>1</sub> マウスや F344/N ラットを用いて発がん性試験が行われた化合物について、その結果が要約されている（EGBE の報告書 Table 4.85）。これらの化合物では、パブリックドメインである比較的完全な報告（特に NCI および NTP の報告）でヘモジデリン沈着の証拠が得られている。本リストの編纂において、一部の化合物は肝臓ではヘモジデリン沈着を引き起こさないが他臓器で沈着を起こすことが明らかであり、このような化合物は除外した。また、血管肉腫誘発反応を記載した列では肝臓での発生率のみに言及するようにし、血液毒性、ヘモジデリン沈着および肝血管肉腫の関係に重点を置いている。肝臓では、曝露後の血液毒性の原因は化合物により異なる可能性があるものの、最近の仮説に基づきヘモジデリン沈着に対する応答は EGBE を含むいかなる化合物に対しても同様であると考えられた。他の臓器では、影響を及ぼす複数の因子が認められるかもしれない。食細胞と新生物反応が生じる細胞集団との空間的關係は、クッパー細胞と肝類洞内皮細胞のあいだでみられるものとは異なる可能性がある。さらに、防御能も異なる可能性があり、例えば脾臓食細胞は類洞内皮細胞よりも高い抗酸化能を有する（DeLeve, 1998）。

血管肉腫形成に対する感受性はラットよりもマウスで高く、さらに雄マウスの方が雌マウスよりも影響を受けやすいことがデータにより示されている。Table 4.85（EGBE の報告書）のセクション C（雄マウス）に記載されている化合物はいずれもセクション D（雌マウス）では血管肉腫を誘発せず、セクション C の中で生涯にわたる肝臓クッパー細胞の色素沈着を確実に誘導した化合物のみが、肝血管肉腫の発生率も上昇させた。一見したところ、主な結論として、血管肉腫発生率の上昇を認めない場合には有意なヘモジデリン沈着も起こらないとする推定機序にデータの大部分が一致していると言える。しかし、結果の中には詳細な調査が必要なものもあり、ヘモジデリン沈着が血管肉腫を引き起こす唯一の機序であるとは示されていない。最も高い血管肉腫発生率は、ペンタクロロアニソールを強制経口投与された雄マウスで認められた。この一連の実験で、13 週目に観察されたクッパー細胞色素沈着には鉄、胆汁または PAS 陽性物質は含まれていなかった。2 年間試験で確認された色素には、特有の染色法は用いられなかったと考えられ、このためこの色素がヘモジデリンであったのか 13 週間試験でみられた非鉄色素であったのかは不明である。さらに、物質はクッパー細胞よりも肝細胞の方が多かったとも述べられている。ヘモジデリンでなかったとすれば、メカニズムの裏付けの探索にペンタクロロアニソールは使えなくなる。

考察が必要なもう 1 つのケースとして C.I.Pigment Red 3 がある。C.I.Pigment Red 3 は、マウスやラットで血管肉腫を誘発しなかったが脾臓でヘモジデリン沈着が観察され、クッパー細胞で「緑褐色の色素沈着」が生じた。後者は報告書内ではヘモジデリンとは確認されておらず、ヘモジデリンでなかったとすれば、メカニズムの裏付けの探索に C.I.Pigment Red 3 は使えなくなる。さらに、C.I.Pigment Red 3 によってマウスで溶血性貧血が起こったとしても、血液学的変化が予備的な 2 週間試験の最後に観察されたが 13 週間試験（NTP TR 407 の p.62）の最後には観察されなかったことより、ラットとは異なり一過性であったことが示唆される。これは 12 ヶ月（検討され

た最長期間) 以上持続した EGBE の血液毒性とは対照的であり、雄マウスでの肝血管肉腫発生率上昇には肝臓のクッパー細胞色素沈着への生涯にわたる曝露が必要条件であるとする仮説を支持するものである。

メチルオイゲノールの場合、雌マウスの肝臓ではヘモジデリン沈着を認めたが、雄マウスや雌雄ラットの肝臓ではヘモジデリン沈着は認められなかった。血管肉腫は誘発されなかったが、肝細胞癌は増加した。本試験で用いられたマウスは *Helicobacter hepaticus* に感染していたが、これによって結果は損なわれていないと主張されている。EGBE の試験でも、雄マウスでの血管肉腫発生率の上昇は中程度で、雌マウスではこのような上昇はみられなかった。よって、メチルオイゲノールの試験で雌マウスに血管肉腫が認められなかったことは、EGBE による血管肉腫誘発のメカニズムと矛盾しない。

導かれる結論としては、慢性的なヘモジデリン沈着パターンと雄のみのマウスでの血管肉腫発生率上昇を裏付ける化合物は、EGBE のほかには *p*-クロロアニリンと *p*-ニトロアニリンの 2 種類のみと言える。最近、別のグループにより US NTP データベースにおけるマウスでの肝血管肉腫と化学的に誘発されたヘモジデリン沈着症との関連が研究され (Nyska *et al.*, 2004)、本質的に同じ結論が出された。ただし、Nyska *et al.* (2004) では、本書で説明した質的関連に加えて、肝血管肉腫とクッパー細胞色素沈着とのあいだに統計的に有意な非常に高い相関があることも示されている ( $p < 0.001$ )。いずれの場合も、ヘモジデリン沈着症の原因は化学物質による溶血であった。

EGBE に曝露された雄マウスでの血管肉腫発生率の軽度上昇を説明するために提唱された仮説を裏付けることのできる、他の化合物に関するげっ歯類試験はほとんどない。しかし、得られている証拠は仮説と一致している。現在のところ、BAA への代謝とそれに続く溶血 (げっ歯類の赤血球が感受性を示す)、肝臓での鉄タンパク複合体の沈着、そしてこの沈着物からの傷害性 (細胞毒性または DNA 損傷性) ラジカルの持続的な生成を基盤とする、推定機序が最も有力である。

ヒトでの試験において、遺伝性ヘモクロマトーシスの患者では肝細胞癌のリスクが極めて上昇し [例、Niederau *et al.* (1985) では 16 症例でリスクが 219 倍に上昇]、鉄の毒性作用が原因とされたが、肝臓外のがんのリスクもわずかに上昇していると考えられる。複数のがんと、遺伝性ヘモクロマトーシスの原因となる最も頻度の高い HFE 遺伝子変異、すなわち C282Y 変異との遺伝的関連が、いくつかの試験で確認されている。ただし、このような関連性はトランスフェリン受容体遺伝子の特定のアレルの存在下でのみ認められる。これは、発がんリスクの上昇が鉄の作用に起因することを示唆するものである (Dorak *et al.*, 2002)。さらに、遺伝要因とは関係なく食事に含まれる鉄も結腸直腸癌など一部のがんのリスク因子と考えられ (Nelson, 2001)、アフリカ系黒人で肝細胞癌のリスクが約 10 倍高いことと食事による鉄過剰とが関連付けられている (Mandishona *et al.*, 1998)。しかし肝血管肉腫のみに焦点を当てると、このヒトではまれな癌 (人口  $10^7$  名当り 0.5~2.5 例) について頻繁に引用されるリスク因子 (ヒト遺伝性ヘモクロマトーシスを含む) で説明できるのは、公表されている症例のわずか 20%に過ぎない。実際、塩化ビ



ニルへの職業曝露は別として、肝血管肉腫の病因の大部分は不明のままである (Zocchetti, 2001)。したがって、ヒトでの血管肉腫に鉄が関与しているかの結論を出すことはできない。

B6C3F<sub>1</sub> マウスおよび F344 ラットにおける化学物質に起因する血液毒性と血管肉腫との関係を Table 4.24 に要約する。

Table 4.24: Summary of relationship between chemicals inducing haematotoxicity and haemangiosarcomas in B6C3F1 mice and F344 rats (incidences are given for control, low, middle and high dose groups, respectively).

A. Male Rats

Chemical	Haematology indicating toxicity to erythrocytes	Incidence of Kupffer cell pigmentation (KCP) or hepatic haemosiderin (HS) at 2 years	Kupffer cell pigmentation (KCP) or hepatic haemosiderin (HS) observed at 3 months	Incidence of hepatic haemangiosarcoma	Reference **
EGBE	Yes, at 14 wks	KCP: 23/50, 30/50, 34/50, 42/50	KCP	0/50, 0/50, 1/50, 0/50	TR484
<i>o</i> -Nitroanisole	Yes, at 2 & 13 wks	KCP: 0/20, 1/20, 18/20	KCP	None	TR416
<i>p</i> -Chloroaniline	Yes, at 13 wks	HS: 1/49, 0/50, 0/50, 26/50	KCP	None	TR351
Pentachloroanisole	Normal at 13 wks.	KCP: 0/50, 1/50, 4/50	None (hypertrophy of Kupffer cells)	None	TR414
Pyridine	Yes, at 13 wks	KCP: 4/50, 11/50, 20/50, 25/50	HS, but cell-type not identified	None	TR470
Titanocene dichloride	Yes, at 2 wks	KCP: 1/60, 39/60, 41/60	None	None	TR399 (rats only)
D&C Yellow No. 11	No haematology	KCP: 7/50, 15/51, 23/51, 26/54	KCP	None	TR463 (rats only)
Butyl benzyl phthalate		KCP, 0/59, 1/58, 6/59, 6/58		None	TR458
Cupferron (N-hydroxy-N-nitroso-benzenamine)	No haematology.	HS: 0/49, 15/48, 28/43	No data	None	TR100
No significant haemosiderin/pigmentation deposition was observed with: Methyleugenol, 2,4-diaminophenol.2HCl, CI Pigment Red 3.					

## B. Female Rats

Chemical	Haematology indicating toxicity to erythrocytes	Incidence of Kupffer cell pigmentation (KCP) or hepatic haemosiderin (HS) at 2 years	Kupffer cell pigmentation (KCP) or hepatic haemosiderin (HS) observed at 3 months	Incidence of hepatic haemangiosarcoma	Reference
EGBE	Yes, at 14 wks	KCP: 15/50, 19/50, 36/50, 47/50	KCP	None	TR484
<i>o</i> -Nitroanisole	Yes, at 2 & 13 wks	KCP: 8/20, 2/20, 20/20	KCP	None	TR416
Pentachloroanisole	Normal at 13 wks.	Pigmentation in hepatocytes	None (hypertrophy of Kupffer cells)	None	TR414
Pyridine	Yes, at 13 wks	KCP: 6/50, 2/50, 6/50, 17/50	HS, but cell-type not identified	None	TR470
Titanocene dichloride	Yes, at 2 wks	KCP : 3/60, 45/61, 50/60	None	None	TR399 (rats only)
CI Pigment Red 3	Yes, at 2 & 13 wks.	KCP : 0/50, 3/50, 14/50, 41/50*	Pigment (type & cell-type not identified)	None	TR407
D&C Yellow No.11	No haematology	KCP: 9/50, 11/51, 16/50, 32/51	KCP	None	TR463 (rats only)
Butyl benzyl phthalate		KCP: 4/60, 1/60, 6/60, 10/60		None	TR458
Cupferron (N-hydroxy-N-nitroso-benzenamine)	No haematology	HS: 0/48, 9/44, 33/44	No data	None	TR100
No significant haemosiderin/pigmentation deposition was observed with: Methyleugenol (anaemia at 14 wks), 2,4-diaminophenol.2HCl, butylbenzyl phthalate, <i>p</i> -chloroaniline					

## C. Male Mice

Chemical	Haematology indicating toxicity to erythrocytes	Incidence of Kupffer cell pigmentation (KPC) or hepatic haemosiderin (HS) at 2 years	Kupffer cell pigmentation (KPC) or hepatic haemosiderin (HS) observed at 3 months	Incidence of hepatic haemangiosarcoma	Reference
EGBE	Yes, at 14 wks	KCP: 0/50, 0/50, 8/50, 30/50	KCP	0/50, 1/50, 2/50, 4/50	TR484
<i>p</i> -Chloroaniline	Yes, at 14 wks.	KCP/HS: 0/50, 0/49, 0/50, 50/50	KCP	2/50, 2/49, 1/50, 6/50	TR351
Pentachloroanisole	No haematology	KCP: 1/50, 50/50, 50/50	KCP (but not containing iron)	2/50, 8/50, 10/50	TR414
<i>p</i> -Nitroaniline	Yes, at 2 & 13 wks	KCP: 1/50, 1/50, 8/50, 50/50	KCP	0/50, 1/50, 2/50, 4/50	TR418
<i>o</i> -Nitroanisole	Yes, at 13 wks	KCP: 0/50, 0/50, 3/50, 16/50	No	2/50, 2/50, 1/50, 0/50	TR416
CI Pigment Red 3	Normal at 13 wks	KCP : 0/50, 5/50, 30/50, 41/50*	No	0/50, 1/50, 1/50, 0/50	TR407
2,4-Diaminophenol.2HCl	No haematology at 13 wks. Yes, at 15 months	KCP: 0/50, 44/50, 47/50	No	1/50, 0/50, 1/50	TR401
No significant haemosiderin/pigmentation deposition was observed with: Methyleugenol, Pyridine, Cupferron					

## D. Female Mice

Chemical	Haematology indicating toxicity to erythrocytes	Incidence of Kupffer cell pigmentation (KPC) or hepatic haemosiderin (HS) at 2 years	Kupffer cell pigmentation (KPC) or hepatic haemosiderin (HS) observed at 3 months	Incidence of hepatic haemangiosarcoma	Reference
EGBE	Yes, at 14 wks	KCP: 0/50, 5/50, 25/50, 44/50	KCP	0/50, 0/50, 1/50, 0/50	TR484
<i>p</i> -Chloroaniline	Yes, at 14 wks	KCP: 0/50, 0/50, 1/50, 46/50		1/50, 0/50, 0/50, 1/50	TR351
Pentachloroanisole	No haematology	KCP: 0/50, 37/50, 48/50		0/50 0/50, 1/50	TR414
<i>p</i> -Nitroaniline	Yes, at 2 & 13 wks	KPC: 1/50, 1/50, 4/50, 39/50		1/50, 1/50, 0/50, 0/50	TR418
Methyleugenol	No haematology	HS: 0/50, 11/50, 24/50, 19/50*		0/50, 1/50, 0/50, 0/50	TR491
CI Pigment Red 3	Normal at 13 wks	KCP: 2/50, 1/50, 1/50, 29/50*		0/50, 0/50, 1/50, 0/50	TR407
2,4-Diaminophenol.2HCl	No haematology at 13 wks. Yes, at 15 months	KCP, 0/50, 31/50, 50/50		None	TR401
No significant haemosiderin/pigmentation deposition was observed with: Pyridine, Cupferron, <i>o</i> -Nitroanisole					

\*See discussion in the text.

\*\*NTP Technical Report Numbers

## マウスにおける前胃腫瘍形成のメカニズムとヒト健康に対する意義

雌マウスで前胃の扁平上皮乳頭腫および扁平上皮癌の誘発を認め、雄でも増加を示すいくつかの証拠（有意水準には達していない）が得られている。対照的に、雌雄ラットでは2年間試験において前胃腫瘍、または過形成など前がん性の影響も含めて、誘発を示す証拠は得られていない。ただし過形成は、より高い曝露濃度が用いられた14週間試験で雌ラットに観察された。

EGBEは蒸気圧の低い液体であるため、全身曝露実験では動物の毛に沈着する。さらに吸入された蒸気は鼻咽頭で濃縮する可能性がある。このメカニズムおよび汚染された毛をつくろった結果として、EGBEは吸入実験であっても経口経路からの有意な曝露を達成しうる。これはEGBEの前胃に対する毒性作用および腫瘍発生作用についてのもっともらしい説明ではあるが、250 ppm（NTPの発がん性試験で用いられた最高濃度）のEGBEへの6時間全身曝露終了時のマウスの毛では、ほんの少量（10 mg/kg未満）のEGBEしか確認されなかった。さらに、マウスへの腹腔内注射または皮下注射による投与でも前胃の病変が生じた。したがって、EGBEが複数のプロセスを組み合わせた結果として前胃に蓄積することは明らかである。マウスが毛に存在するEGBEをつくろい、場合によっては曝露チェンバーの壁を舐めることに加えて、気管支に沈着した物質の唾液中排泄および粘液線毛輸送、続く経口からの摂取が、試験中の胃の曝露を引き起こした可能性が高い。

ラットおよびマウスの胃は前胃（ヒトではみられない）および腺部からなる。前胃は貯蔵器官として働き、摂取された物質が急速な通過と消化の第一段階が起こる腺部に輸送されるまで、数時間にわたりとどまることのできる場所である。重ねて、これは前胃の長期曝露に至る唯一のメカニズムではない。また、EGBEおよびBAA（程度はより低い）は、経口強制投与または腹腔内投与後の前胃組織からの排泄が血液や他の組織に比べて遅い。結果として、前胃では腺胃に比べて毒性物質による損傷を受ける可能性が高い。

EGBEまたはBAAを経口投与されたマウスの胃を調べた結果、使用された用量では、いずれの化学物質でも腺胃の損傷は認められず、前胃ではEGBEよりも低い用量のBAAで角化亢進という形で損傷を認めた。ラットおよびマウスの前胃と腺胃では、アルコールデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼの有意な活性がみられている。ラットとマウスにおいて、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性にはほとんど差がないがアルコールデヒドロゲナーゼ活性には大きな種差があり、EGBEを基質とした場合、ラットよりもマウスの方が親和定数および最大反応速度はるかに高い。よって、EGBEがBAAに代謝される可能性はラットの前胃よりもマウスの前胃の方が高い。

過形成および角化亢進は、前胃の乳頭腫および扁平上皮癌をも引き起こす広範な化学物質への曝露に対する組織学的反応である。これらの化学物質の多くは遺伝毒性を有さず、新生物は持続的な細胞損傷および過形成の結果として生じると考えられる（Kroes and Webster, 1986）。本プロセ

スに関してげっ歯類に特有のことはないが、げっ歯類の前胃と、ヒトの胃およびげっ歯類の腺胃とのあいだでの生理学的および機能的な根本的違いにより、ヒトの胃およびげっ歯類の腺胃が本メカニズムによる新生物形成の標的となる可能性は低いことが示唆される。前胃腫瘍を生じる条件で EGBE に曝露したマウスの腺胃で新生物反応がみられなかったことから、本提言は実証されている。

## IPCS の枠組みの中で評価された推定作用機序

### 序論

発がん作用メカニズムの評価の基礎を形成する実験は本書の上述の項に要約する。

EGBE を蒸気として与えると、雌マウスで前胃腫瘍、雄マウスで肝血管肉腫を誘発する。さらに、雄マウスでも前胃腫瘍の増加を示すいくつかの証拠が認められた（有意水準には達していない）。これらの腫瘍はいずれも反対の性のマウスでは発現せず、ラットでは腫瘍発生率の有意な上昇は認められない。以上の所見について、独立した別個の実験での確認は行われていない。

### 雌マウスにおける前胃腫瘍誘発の提唱作用機序

前胃腫瘍の生成に関する提唱作用機序は、局所生成、および持続的な代償性細胞増殖を誘発する細胞毒性代謝物の蓄積と、この増殖性細胞集団からの新生物の発生である。新生物は主に乳頭腫であり、最高用量を投与された雌マウスでは扁平上皮癌が 1 件生じた。

### キーイベント

前胃腫瘍の生成には次の重要なステップが関与している。

**前胃の曝露量増加** 内外様々な原因により、EGBE およびその代謝物への前胃の曝露量が増加する。EGBE を雌マウスに吸入投与すると内臓器官全体に分布し、曝露後 5 分以内には胃内容物に存在した。曝露の 24 時間後、48 時間後には前胃、口腔および食道の粘膜に存在したが、前胃では高濃度に認められたのに対して腺胃および十二指腸での濃度ははるかに低かった。EGBE はさらに、動物の毛、口腔内、食道内および胃内容物にも認められた。EGBE を雌マウスに静脈内投与すると、肝臓、骨、ハーダー腺、口腔などのいくつかの組織に選択的に集中した。前胃および腺胃の粘膜も標識されたが、その程度は同程度であった。EGBE を静脈内投与または皮下投与すると、EGBE およびブトキシ酢酸が唾液中に排泄され、胃内に長時間認められる。

**細胞毒性代謝物（おそらくブトキシ酢酸）への代謝**（同代謝物が既に前胃に存在している場合を除く） EGBE は、ラットおよびマウスの前胃標本、腺胃標本で代謝を受ける。EGBE の代謝に主に関与する酵素は、アルコールデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼである（マイナーな酸化経路はチトクロム P450 酵素により媒介される）。これらの代謝酵素はラットおよびマウスの腺胃と前胃の両方で認められるが、いずれの動物種でも前胃では重層扁平上皮に集中しているのに対して、腺胃ではびまん性に分布している。アルデヒドデヒドロゲナーゼの組織での平均活性に大きな種差はないが、アルコールデヒドロゲナーゼの最大反応速度はラットに比べてマウスでは最大 10 倍である。胃に入った EGBE は前胃にとどまり、さらに前胃表面層に



は代謝酵素が集中しているため、前胃が標的組織となる。前胃に対する有害作用は、BGBE よりも BAA の方が強いことが分かっている。EGBE から 2-ブトキシアセトアルデヒドへの代謝速度はマウスよりもラットの方が遅いことからある程度の種差は存在すると考えられ、ラットではマウスに比べて、細胞毒性のより高いブトキシ酢酸の生成が遅いか、その最大濃度が低くなる可能性が高い。

*細胞毒性および細胞増殖* マウス（特に雌）を用いた 2 年間吸入試験では、細胞毒性および細胞増殖は、上皮過形成で示されるように潰瘍を伴うことが多かった。しかしこのような反応はラットでは報告されなかった。未希釈の EGBE を雌雄マウスに強制経口投与すると用量依存的に前胃の炎症が誘発され、免疫化学的染色で代償性細胞増殖が確認された。EGBE を腹腔内または皮下投与した場合やブトキシ酢酸を経口投与した場合にも、同様の前胃病変が誘発される。ブトキシ酢酸は EGBE 自体よりも強力であった。

*扁平上皮乳頭腫または扁平上皮癌* これらの新生物は、雌マウスに最高用量を投与した場合のみ有意に増加した。また、前胃腫瘍誘発に対する感受性はラットよりもマウスの方が高いと考えられ、背景発生率はマウスの方が高かった。

- ▶ **用量反応相関** 雌マウスにおいて、投与量増加に伴い前胃上皮過形成の発生率および重症度が上昇し、前胃潰瘍の発生率でも同様の相関を認めた。潰瘍は雄マウスでもみられたが、発生率は低く濃度との関連は明確ではなかった。
- ▶ **時間的關係** マウスを用いた 14 週間吸入試験において、125 ppm 以上で前胃上皮過形成が観察され、250 ppm または 500 ppm（最高濃度）では炎症、壊死および潰瘍に進展した。このように、2 年間試験のみで認められた新生物に先立っては、前がん事象がみられた。
- ▶ **腫瘍反応とキーイベントとの関連の強さ、一貫性および特異性** キーイベントと腫瘍形成との関連に関する雌マウス個体レベルでの検討は行われていない。しかし広い意味では、用量反応相関および時間的關係から、これらのイベントに一貫性があることは明らかである。前胃腫瘍の誘発は、1 つの単回試験のみでしか認められていない。したがって、イベント全体の連鎖は、個別の実験によって検証されていない。このような検証をもっと容易にするためには、EGBE を強制給餌によって前胃内に直接経口投与すべきであるが、実験を職業曝露や消費者曝露に適用することはほとんど不可能であろう。
- ▶ **生物学的妥当性と一貫性** 一般論として、化学物質の発がん作用が突然変異を介さない場合には、有糸分裂誘発または細胞毒性が引き起こす修復機構による細胞増殖増加などの作用機序でがんが誘発される。得られている証拠に基づき、EGBE による雌マウ

スでの前胃腫瘍誘発に関しては、後者の機序が生物学的に理にかなっている。

- **他の作用機序** 他に提唱されている作用機序はないが、遺伝毒性が検討され却下されている。その他可能性のあるものとしては、調節タンパク質のアルキル化（クロマチン内など）に起因する遺伝子発現の異常制御とこれに続く遺伝的安定性の喪失が挙げられる。このような機序を検討する試験はこれまで実施されていない。
- **推定作用機序の評価** 得られているデータは、雌マウスでの前胃腫瘍誘発に関する提唱機序と完全に一致している。見かけ上の雌での性特異性は、偶然によるものである可能性が高い。
- **不確実性、不一致およびデータギャップ** 実験的観察は提案された一般仮説と一致している。しかし、より明確な論拠が必要な事項が 2 つある。すなわち、反応における種差と過形成から新生物への進行である。ラットとマウスでの反応の差異は、アルコールデヒドロゲナーゼの速度論的特性の差が原因であると提唱されている。しかし、これが実際に前胃でのプトキシ酢酸の濃度や量の差につながるかは不明である。別の仮説として、マウスでは前胃腫瘍誘発に対する感受性がラットよりも高いことが考えられる。この仮説は、無処置マウスで前胃腫瘍の発生率が高かったことに基づく。また、見かけ上正常な細胞の増殖が新生物に変化する方法は分かっていない。このような批評は、いかなる非遺伝的発がんメカニズムにも向けられる（ただし、EGBE の報告書 1.3.5 項を参照）。現時点で既知のデータベースでは一致しているが、雄マウスをより高濃度の EGBE に吸入曝露すれば前胃腫瘍が誘発されると予測される。同様に、雌雄ラットを高濃度の EGBE に曝露した場合も、同濃度が耐えられるものであれば、新生物が誘発される可能性がある。ただし、ラットを用いた 2 年間吸入試験では、最大耐量の確認を目的として慎重に実施された短期試験に基づいてより低濃度が選択されたため、この仮想試験が成功する可能性は低い。

### 雄マウスにおける肝血管肉腫誘発の推定作用機序

肝血管肉腫形成の提唱機序は、関連する細胞型（おそらく、血管肉腫が発生する内皮細胞を含む）でのヘモジリン沈着、そして細胞毒性活性酸素種の生成である。この活性酸素種は、二次機構により遺伝子変化を誘発するか、または内皮の標的組織内での持続的な細胞増殖を誘導しその増殖細胞集団から新生物を生じさせる。

### キーイベント

血管肉腫の生成には次の重要なステップが関与している。

**溶血性物質（おそらくブトキシ酢酸）への代謝** EGBE は主に、アルコールデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼにより、それぞれ 2-ブトキシアセトアルデヒド、ブトキシ酢酸に代謝される。ブトキシ酢酸は、その前駆体よりも強力な溶血性物質である。さらに、これらの前駆体は、代謝を受けなければ溶血性を示さないと考えられる。アルデヒドデヒドロゲナーゼを阻害すると、2-ブトキシアセトアルデヒドの溶血作用が低下した。少なくとも *in vitro* では、ブトキシ酢酸は、ヒト赤血球よりもはるかに低い濃度でラット赤血球の溶血を引き起こす。

**溶血** ブトキシ酢酸により溶血が生じ、その後持続的で用量依存的な貧血が起こると、肝臓にヘモジデリンが沈着する。マウス、ラットともにクッパー細胞および肝細胞でのヘモジデリン沈着が認められているが、内皮細胞でのヘモジデリン沈着を示す証拠は現在のところない。溶血はマウスおよびラットの両性で起こるため、新生物反応が雄マウスに特異的にみられる理由を示すことが必要である。しかしこれは、雄マウスでの腫瘍形成反応が統計的には有意であるものの低いことを考慮すると、困難と考えられる。

**細胞毒性** 鉄が介在するヘモジデリンからの活性酸素種生成により、細胞毒性が生じる。雄マウスは、ラットおよび雌マウスに比べて肝臓の抗酸化能力が低く、酸化的損傷に対する感受性が高い。しかし一方で、肝血管肉腫に固有の雄マウスの感受性の高さを考慮すると、この差が重要であるかは不明である。マウスに最大 600 mg/kg bw/day の EGBE を最長 90 日間経口投与すると、曝露開始 14 日間に内皮細胞、90 日後には肝細胞での DNA 合成の増加を認めた。本実験のマウスでは酸化的損傷の増加もみられたが、ラットでは変化は認められなかった。

**血管肉腫** 血管肉腫は内皮の標的細胞から生じるもので、250 ppm 投与群の雄マウスではその発生率が 8% に有意に上昇した。また、雄の B6C3F<sub>1</sub> マウスは雌マウスよりも血管肉腫に対する感受性が高いと考えられ（NTP の実験における対照群の発生率は雌雄それぞれ約 0.9%、2.5%）、さらにマウスは F344 ラットよりも感受性が高い（NTP の実験において、ラットのコントロール群では血管肉腫の報告なし）。したがって、見かけ上の性差および種差は、単に本来の感度の表れである可能性がある。

- ▶ **用量反応相関** 溶血および持続的な貧血は、用量依存的に起こることが複数の実験で示されている。2 年間吸入試験において、雌雄ラット（EGBE 曝露濃度 62.5 または 125 ppm）、雄マウス（EGBE 曝露濃度 125 または 250 ppm）、および雌マウス（EGBE 曝露濃度 62.5、125 または 250 ppm）で、対照群と比較して有意なクッパー細胞色素沈着の増加を認めた。雌雄マウスで観察された増加は用量依存的であったが、クッパー細胞色素沈着の発生率は雄マウスよりも雌マウスの方が高かった。血管肉腫発生率の有意な増加は雄マウスの最大濃度曝露群でのみ認めた。
- ▶ **時間的關係** 実験の結果、EGBE への反復曝露の急性期反応として溶血、持続性の反応として貧血が起こることが分かっている。ヘモジデリン沈着は短期実験で認められ

ており、2年間吸入曝露試験でのみ発生率増加がみられる血管肉腫の発生までは相当の期間存在することとなる。

- **腫瘍反応とキーイベントとの関連の強さ、一貫性および特異性** 他の化合物を用いた実験のデータより、マウスはラットよりも血管肉腫形成に対する感受性が高く、さらに雄マウスは雌マウスよりも感度が高いことが示されている。しかし、疑わしい例を除くと、雄マウスでの肝血管肉腫発生率上昇には肝臓のクッパー細胞色素沈着への生涯にわたる曝露が必要条件であるとする仮説を支持するデータベースは小規模である。
- **生物学的妥当性と一貫性** 活性酸素種生成の増加および持続が間接的な遺伝毒性メカニズムによって新生物を生じさせることは、ペルオキシソーム増殖剤などに関して、長く提唱されてきた。EGBEによって細胞内の酸化的損傷が増加することが、マロンジアルデヒドの生成、脂質沈着およびDNAの酸素付加体である8-ヒドロキシデオキシグアノシンにより示されており、細胞内抗酸化物質濃度の低下の違いが反応の性差および種差に関与していると考えられる。しかし、このような機序を介して腫瘍を誘発することが明確に示されている物質はない。
- **他の作用機序** 他に提唱されている作用機序はないが、遺伝毒性が検討され却下されている。その他可能性のあるものとして、前胃腫瘍で推定されたように調節タンパク質のアルキル化に起因する遺伝子発現の異常制御が挙げられるが、前胃粘膜、肝類洞内皮細胞のいずれに関してもこの推論を支持する証拠はない。肝切片を用いた動態試験より、長期吸入実験の条件下では、2-ブトキシアセトアルデヒドが遺伝的損傷を誘発しうる濃度に達する可能性は低いことが示唆されている。
- **推定作用機序の評価** 血管肉腫はまれであり本実験での発生率は低かったが(4/49)、高用量では背景対照の範囲を超えていた。発生率上昇は軽度で裏付けも行われていないため、機序を特定することは困難である。可能性のある機序として遺伝毒性が却下されており、肝臓内に活性酸素種の生成源を示す有力な証拠があることから、これらが新生物形成に決定的な役割を果たしていると考えるのが妥当である。

**不確実性、不一致およびデータギャップ** 活性酸素種はその性質から標的組織に局在することは困難である。さらに、これらの細胞毒性種を発生させるヘモジデリンは、血管肉腫が発生する内皮細胞では認められていない。クッパー細胞ではヘモジデリンが認められており活性酸素種が生成される可能性があり、さらに最近ある試験で活性酸素種がクッパー細胞から内皮細胞へ移動することが明らかになったことから、内皮細胞が損傷を受ける方法が示唆されている。ペルオキシソーム増殖剤の場合にはクッパー細胞から分泌されるサイトカインの関与が示唆されているが、その標的細胞は肝細胞である。ヘモジデリン沈着についてもクッパー細胞と内皮細胞のあいだで同様のサイトカインの相互作用が関与している可能性があるが未だ明らかでなく、代替案を考慮す

ると必要ないかもしれない。根本的で大きな不確実性として、1つの実験で観察された雄マウスでの軽度かつかつらうじて有意な血管肉腫発生に再現性があるのか、また実験を再度行った場合に雌マウスでも同様の結果が観察される可能性があるのかは不明である。しかし、雌マウスでは血管肉腫に対する感受性が低いと考える根拠はある。

#### 発がん性の要約

EGBE は雄マウスおよび雌マウスで発がん性を示し、それぞれ血管肉腫発生率の軽度増加、前胃腫瘍の発生率増加を引き起こす。ラットでは発がん性は認められない。遺伝毒性は EGBE の重要な毒性ではなく、軽度で安定せず、曖昧に定義された遺伝毒性が発がん反応の原因であるとは考えにくい。上述のとおり、発がん反応を説明するために仮説が立てられ、実験データにより裏付けられた。前胃腫瘍の場合、持続的な曝露とその結果起こる修復を受けた組織から生じるという議論は明確である。本所見は実際には性特異的ではなく、単に偶然、低い発生率が雌では統計的有意水準を上回り雄では上回らなかったものと考えられる。血管肉腫に関しては、他の化合物を用いた実験のデータより、マウスはラットよりも血管肉腫形成に対する感受性が高く、さらに雄マウスは雌マウスよりも感度が高いことが示されている。しかし、疑わしい例を除くと、雄マウスでの肝血管肉腫発生率上昇には肝臓のクッパー細胞色素沈着への生涯にわたる曝露が必要条件であるとする仮説を支持するデータベースは小規模である。可能性のある機序として遺伝毒性が却下されていること、そして肝臓内に活性酸素種の生成源を示す有力な証拠があり推定作用機序の各過程は少なくともいくつかの裏付けデータを有していることから、これらが新生物形成に関与していると考えるのが妥当である。

ヒトへの関連では、ヒト赤血球はげっ歯類の赤血球に比べて溶血に対する耐性が明らかに高いため、血管肉腫誘発に関して推定された機序から、通常の実験条件においては EGBE に発がんの危険性はないであろうことが強く示唆される。前胃腫瘍誘発に関する推定機序も、通常の実験条件ではヒトに関連しないことを示すと考えられる。最近言明されたように (IARC, 2003)、ヒトには前胃がないが、口腔および食道の上部 3 分の 2 に前胃と同等の扁平上皮組織を有している。したがって、原則として、げっ歯類の前胃扁平上皮を標的とする発がん物質はヒトにも関連する。ただし、明らかな遺伝毒性を有しない物質およびげっ歯類への経口投与後にだけ前胃扁平上皮に対する発がん性を示す物質に関しては、ヒトへの関連性はおそらく低い。よって、このような物質の発がん作用機序は実験動物に特異的である可能性がある (IARC, 2003)。EGBE は上記条件の一部しか満たさない。一方で、EGBE がたとえ吸入された場合でも前胃に蓄積し、そこに長時間とどまることで直接または BAA に代謝された後に損傷を引き起こすことを示す実験的事実が推定機序を裏付けている。

結論として、発がん反応の種差および性差、ならびに作用機序は血液毒性に基づく可能性が高いとする仮説を支持する最新の証拠を考慮すると、EGBE はヒト発がん物質ではないと考えられる。したがって、発がん性に関しては「分類なし」が妥当な分類として提唱される。この分類に関する

る提案は、C&L ワーキンググループにより合意された。さらに、2006 年に公表された最新の IARC 評価 (2004) では、実験動物での証拠が限定的でヒトでの証拠も不十分であることに基づき、EGBE をヒトに対する発がん性について分類できない (グループ3) と分類している。

唯一の発がん作用は溶血に続発すると考えられ、さらに溶血は反復投与毒性のキーエンドポイントであることから、発がん性のエンドポイントに対する個別のリスク評価は必要ない。反復投与毒性の懸念がなければ、発がん性に関しても懸念がないとみなすことができる。

EGBEA に関しても同様の結論が適用される。

#### 4.1.2.9 生殖毒性

2-ブトキシエタノールアセテートは、エステラーゼにより、2-ブトキシエタノールと酢酸塩に速やかに分かると考えられる (4.1.2.1 項参照)。したがって、全身に分布した EGBEA は、EGBE および酢酸塩に代謝されると予測することができる。EGBE と EGBEA とは構造が類似しており、かつ少なくとも体循環においては EGBEA は EGBE に代謝される可能性が高いことから、EGBEA に関する特異的なデータや有効なデータが得られない場合には、EGBE のデータから EGBEA を類推することは妥当である。EGBEA の生殖毒性は EGBE データのみなし代用により評価することができる。EGBE で得られた結果を考慮に入れる。

##### 4.1.2.9.1 生殖に対する影響

データなし。

##### 4.1.2.9.2 発生毒性

データなし。

*EGBE に関する生殖毒性データの要約:*

EGME および EGEE とは異なり、EGBE は生殖能に対する特有の影響を有しないと考えられる (連続繁殖試験で影響を認めず、反復投与毒性試験では重度の一般毒性を示さない用量で生殖器に対する肉眼的、顕微鏡的影響なし)。生殖能への影響に関する連続繁殖試験により、NOAEL は 720 mg/kg と確認された (高用量でみられた影響が間違いなく一般毒性に起因するものであることに注意すべきである)。

発生毒性については、様々な投与経路で行われた動物試験で催奇形性は認められていないが、母体毒性 (再生性溶血性貧血) と関連して胎仔毒性および胚毒性 (死亡および胚吸収) がしばしば

観察された。胎仔ではその他、一般に骨化遅延と言われる骨格変異の発生率上昇が認められた。*In vitro* 試験の結果、EGBE およびその代謝物である BAA による発生への有害作用が認められたが、その作用は必ず成長効果に関連していた。胎仔でみられた影響は間違いなく母体毒性に関連するものである。過去にいくつかの試験で、母体毒性と EGBE で認められる影響（胚吸収、発育遅延、変異）との相関が示されている。

4.1.2.2.3 項で述べた血液毒性は通常、投与経路にかかわらず、低用量の EGBE で生じた。これらの試験では、溶血に関するデータはしばしば急性投与でみられた。発生毒性試験では被験物質の連日投与が必要となり、これによって造血パラメータにより顕著な影響が生じうる。さらに、雌のマウスおよびラットは、雄に比べて EGBE による溶血の影響を強く受けた。したがって以上のデータは、発生毒性試験で用いられた EGBE 濃度が、胚/胎仔の生存に影響を及ぼすのに十分な重度貧血を母体に引き起こすものであったことを示している。これらのデータは、EGBE の発生毒性試験でみられた影響が溶血とそれに続く母体の貧血に起因するという仮説を適切に裏付けるものである。

ヒトでは、1 件を除きグリコールエーテルを検討したすべての疫学研究で、奇形（口唇裂、神経管欠損）のリスク増大を認めた。たいていの試験は EGME などの既知の発生毒性物質や他の化学物質も含む様々なグリコールエーテルへの同時曝露を報告しており、いずれの試験でもグリコールエーテルの独自の発生源を明確に区別することはできないため、これらの試験から EGBE のヒトへの影響に関する結論を得ることはできなかった。

総合すると、動物試験に基づきヒトに関連した発生毒性の適切な NOAEL を得ることはできない。速度論的特性および他のグリコールエーテルとの SAR の点から、ヒトでの EGBE による発生毒性は母体毒性なしに生じるとは考えられない。したがって、本エンドポイントの懸念はなく、リスク評価は不要である。

本データより EGBEA の発生毒性に対する懸念はないが、EGBE を用いた連続繁殖試験から得られた生殖能に関する NOAEL 値 720 mg/kg は EGBEA にも使用することができる。EGBEA の生殖能に関する NOAEL はモル数に基づき 976 mg/kg bw/d であり、これをリスク評価に用いる。

#### 4.1.2.9.3 生殖毒性の要約

EGBEA の生殖毒性は、EGBE のデータに基づき評価する。EGBE のデータより EGBEA の発生毒性に対する懸念はないが、EGBE を用いた連続繁殖試験から得られた生殖能に関する NOAEL 値 720 mg/kg は EGBEA にも使用することができる。EGBEA の生殖能に関する NOAEL はモル数に基づき 976 mg/kg bw/d であり、これをリスク評価に用いる。