

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

部分翻訳

**European Union**  
**Risk Assessment Report**  
**TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE, TCEP**  
**CAS No: 115-96-8**  
July 2009

欧州連合  
リスク評価書 (2009年7月最終承認版)  
リン酸トリス(2-クロロエチル)

**European Union Risk Assessment Report**  
**TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE, TCEP**

CAS No: 115-96-8

EINECS No: 204-118-5

**RISK ASSESSMENT**

*July 2009*

***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、Tris(2-chloroethyl) phosphate (CAS No: 115-96-8)に関する EU Risk Assessment Report, (2009)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

##### 4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝および分布

###### 4.1.2.1.1 動物における試験

###### In vivo 試験

###### 経口

C<sup>14</sup>-リン酸トリス(2-クロロエチル) (TCEP)を、88 mg/kg の用量でラットに経口投与したところ、90%を超える放射活性が、72 時間以内に尿中に排出され、7%が糞便に、1%が二酸化炭素として排出された。血漿や赤血球からの排出は二相性を示し、半減期は初期相でそれぞれ、3 時間および 3.4 時間、終末相でそれぞれ 1.8 日および 10.8 日である。30 分から 4 時間で、放射活性は組織全般に一樣に分布した。濃度が高めであったのは、肝臓、腎臓、脂肪および胃腸内容物であった (Chadwick et al., 1989)。

雄の Wistar ラット(各群 5 匹)を用いた別の試験では、14 mg/kg の C<sup>14</sup>-TCEP が経口投与され、93%の尿中排泄が 168 時間までに観察された。投与用量の 6%が糞便中に、1%が呼気中に回収された。放射活性の組織分布が、投与の 24 時間後に測定された。放射活性濃度が低かったのは、脳、筋肉、精巣、脾臓および肺で、高かったのは、肝臓と腎臓であった。48 時間後での胆汁/糞便排出比は、4.62 であった。これは、消化管から放射活性が再吸収されることを示唆するものである。TCEP は腸管循環を受けると考えられた (Minegishi et al., 1988)。

さらに、脳の各部における TCEP の濃度に関する試験が、雌雄の F344 ラット(各群 3 匹)を用いて実施されている。C<sup>14</sup>-TCEP が、0、175、350 ないしは 700 mg/kg の用量で単回経口投与された。雌では、0、175 ないしは 350 mg/kg/日の用量による、14 日以内の連日投与も行われた。TCEP は、消化管からよく吸収され、脳全域に分布した。代謝と排出は、単

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

回あるいは反復投与後 72 時間以内に、全体的にはほぼ完了した。単回投与(175 mg/kg)の場合、放射活性は、尿(85%)や糞便(10%未満)とともに排出され、また二酸化炭素としても排出された。脳の領域には、残留した放射活性は検出されなかった。用量が 350 mg/kg の場合、雄では代謝や排出の促進が観察された一方、雌では投与後初期に、血漿濃度の軽度の上昇が観測された(Herr et al., 1991)。

雌雄の B6C3F1 マウスおよび F344 ラットを用いて、代謝試験が行われている。C<sup>14</sup> で標識した TCEP を、175 mg/kg の用量で単回投与し、またラットにおいては 9 日以内の連日投与も行った(マウスは 3 各群匹、ラットは各群 4 匹)。両動物種とも、24 時間以内に、75% を超える量が尿中に、10%未満が糞便中に排出された。ラットでは、排出に性差は認められなかった。最初の 4~8 時間以内の排出は、ラットに比べてマウスの方が 3 倍速かった(排泄割合はラットで約 40%であったのに対しマウスで 70%超)。反復投与でも、代謝や排泄速度に相違は見られなかった。尿中代謝物は、両動物種で同一であった。主要な代謝産物は、リン酸ビス(2-クロロエチル)カルボキシメチル、リン酸水素ビス(2-クロロエチル)およびリン酸ビス(2-クロロエチル)-2-ヒドロキシエチルグルクロニドであった(Sanders et al., 1990; Burka et al., 1991)。

### 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。

### In vitro 試験

ヒトやラットの肝標本から得た肝切片や肝ミクロソームを用いて、C<sup>14</sup>-標識された TCEP の代謝に関する *in vitro* 試験が行われており、リン酸水素ビス(2-クロロエチル)や2-クロロエタノールが、主要な代謝産物として同定された。他にも 3 種類の化合物が見つかったが、それらの構造の特定はなされていない。この試験で得られた最も重要な知見は、ラットのミクロソームでは、雄と雌とで、代謝速度や代謝様式が顕著に異なるという事である。具体的には、雄ラットの肝ミクロソームは、雌ラットの肝ミクロソームよりも、TCEP をより早く代謝する。この相違は、肝切片においては観察されておらず、ミクロソーム外での代謝過程が存在することが推測される。ヒトの肝切片やヒトの肝ミクロソームでは、代謝における性差は観察されていないため、ラットにおける性差については、リスク評価に際

して考慮されないものと考えられる (Chapman et al., 1991)。

#### 4.1.2.1.2 ヒトにおける試験

##### 経口、吸入、経皮

データは得られていない。

#### 4.1.2.1.3 結論

TCEP のトキシコキネティクスデータは、ヒトに関しては報告が得られていない。TCEP は、ラットにおいて、経口投与後、良く吸収され(投与用量の 90%超)、広く分布する。投与後 24 時間までは、肝臓や腎臓での濃度が高めであった。腸管循環を受けると考えられた。血漿や赤血球からの排出は二相性に起こり、初期相は 3 および 3.4 時間であり、終末相は 1.8 および 10.8 日であった。単回投与でも反復投与でも、同等に代謝や排出が行われた。尿中代謝産物は、ラットとマウスで同一であった。主要代謝産物は、リン酸ビス(2-クロロエチル)カルボキシメチル、リン酸水素ビス(2-クロロエチル)およびリン酸ビス(2-クロロエチル)-2-ヒドロキシエチルグルクロニドであった。リスクの総合評価を行うに当たっては、ラットにおける経口、経皮および吸入経路での吸収率は 100%とみなされる。

#### 4.1.2.2 急性毒性

##### 4.1.2.2.1 動物における試験

##### 経口

リン酸トリス(2-クロロエチル)の急性経口毒性は中等度であり、雌雄のラットについては、LD<sub>50</sub>が 430 mg/kg (Stauffer Chemical Company, 未公表報告 1972)から 1230 mg/kg (Ulsamer et al., 1980)の範囲の値で報告されている。古い方の試験では、様々なロットの「Fyrol CEF」という名称の被験物質が用いられ、それらの純度は不明である。GLP および現行の国際的ガイドラインに準拠して実施された試験では、雄ラットの経口 LD<sub>50</sub>は 1182 mg/kg、雌ラットの経口 LD<sub>50</sub>は 1123 mg/kg という結果が得られている。この試験では、各用量群雌雄 5 匹ずつのラットに、800、1000 ないしは 1260 mg/kg の用量で、水を媒体として経口投与が行われた。死亡は 2~4 日目に認められた(1000 mg/kg 群の雌 1 匹および 1260 mg/kg 群の雌雄

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

4 匹ずつ)。臨床症状として、全ての用量群で、立毛や流涎増加が観察された。さらに、1000 および 1260 mg/kg では、円背姿勢、歩様異常、嗜眠、呼吸数低下、眼瞼下垂、四肢の蒼白化も観察された。生残ラットは、4 日以内に回復した。試験期間中に死亡したラットの剖検により、1260 mg/kg の雌ラット 1 匹で、左側の腎臓の皮質が顕著に褪色しているのが明らかとなったが、他の肉眼的異常は認められなかった (Huntingdon Research Center, 未公表報告 1990)。

### 吸入

空気をリン酸トリス(2-クロロエチル)のエアロゾルで飽和させ、それにラットを曝露させた試験が行われている。曝露は、まず被験物質を 170°C に保ち、そこに通気して霧状空気を得、それを冷却し、小さな容器中に入れたラットに供給して行った。この結果、8 時間吸入させた場合でも、ラットは 1 匹も死亡しなかった (Smyth et al., 1951)。雌雄 5 匹ずつのラットを用いた限度試験が行われており、32 L の陽圧吸入チャンバー内で、目標濃度を 25.7 mg/L として、1 時間の曝露が実施された。被験吸入物質は、小型インピンジャーを用いて発生させた。被験動物の観察を、14 日間行った。この結果、死亡例は無く、ラットは中等度の流涙や流涎を示したが、全てのラットが 3 時間以内には正常な様子を見せていた (Stauffer Chemical Company, 未公表報告 1974)。

### 経皮

3 つの異なるロットの無希釈リン酸トリス(2-クロロエチル) (純度の情報無し)を用いた限度試験が実施されている。それぞれ 4 羽ずつのウサギに、2150 mg/kg が経皮適用され、パッチで閉塞状態とし、24 時間曝露を行った。被験動物における死亡の有無や毒性徴候について、14 日間、観察を行った。明らかな毒性徴候は、何も認められなかった。72 時間後の時点で、どのウサギにもコリンエステラーゼの阻害は、全く認められなかった (Stauffer Chemical Company, 未公表報告 1972)。

#### 4.1.2.2.2 ヒトにおける試験

ヒトのデータは得られていない。

#### 4.1.2.2.3 結論

リン酸トリス(2-クロロエチル)は、経口投与で中等度の毒性を示し、ラットの経口 LD<sub>50</sub> は、430～1230 mg/kg の範囲であった。吸入毒性については、飽和エアロゾルに 8 時間曝露した試験や、目標濃度 25.7 mg/L で 1 時間曝露した試験で、ラットが生残したという結果に基づくと、低いものと考えられる。ウサギにおける急性経皮毒性は低く、経皮 LD<sub>50</sub> は、2150 mg/kg より大きいと判断された。

リン酸トリス(2-クロロエチル)に関する情報は、ヒトに関する知見としては得られていない。この化学物質は、EEC の分類ガイドラインに準拠すると、「有害」に分類されるべきであり、「R22, 飲み込むと有害」と表示するのが適切である。

#### 4.1.2.3 刺激性

##### 4.1.2.3.1 皮膚

##### 動物における試験

アルビノウサギ 9 羽の擦過処置を施した皮膚もしくは無傷の皮膚に、純度不明の無希釈の被験物質(3 ロット)を、1 羽当たり 0.5 mL ずつ適用し、閉塞状態での 24 時間曝露を行った。無傷の皮膚では、3 つのロット全てにおいて、浮腫は生じなかったが、24 時間後、グレード 1 の発赤が認められた。擦過処置を施した皮膚では、24 時間後に浮腫を示したウサギはいなかったが、72 時間後では、全例が浮腫を発症した。また、ほとんど全例で、グレード 1～2 の発赤が、24 および 72 時間後の観察時に認められた。これらの影響の可逆性に関するデータは提示されておらず、試験期間に関する情報も述べられていない (Stauffer Chemical Company, 未公表報告 1972)。

アルビノウサギ 3 羽を用い、GLP および国際的な試験ガイドライン (EECB.4/OECD 404) に準拠して、Draze 皮膚試験が実施されている。無希釈の被験物質(純度 99%超)を、1 羽当たり 0.5 mL ずつ皮膚に適用し、半閉塞状態での 4 時間曝露を行った。その結果、全てのウサギが軽度の発赤を示したが、それは 24 時間以内に回復した (Huntingdon Research Center, 未公表報告 1991; Hoechst AG, 未公表報告 1988a)。試験ガイドライン EECB.4/OECD 404 に準拠して実施された別の試験では、3 羽のアルビノウサギの皮膚に、無希釈の被験物質(純度 99.5%)が 1 羽当たり 0.5 mL ずつ皮膚に適用され、半閉塞状態での 4 時間曝露が行われた。その結果、1/3 羽がグレード 1 の軽微な発赤を示したが、それは 24 時間以内に回復した (Hoechst AG, 未公表報告 1988a)。

## ヒトにおけるデータ

ヒトのデータは得られていない。

### 4.1.2.3.2 眼

#### 動物における試験

GLP および国際的な試験ガイドライン (EECB.5) に準拠して、Draize 眼刺激試験が実施されている。3羽のウサギのそれぞれの眼に、無希釈リン酸トリス(2-クロロエチル) (純度 99%超) を 0.1 mL 滴下した。その結果、結膜に軽度の刺激症状が現れた (全例で 1 日目にグレード 1 の浮腫、全例で 1 もしくは 2 日間、グレード 1 の結膜充血)。点眼の 3 日後、全ての影響は消失した。角膜損傷や虹彩の炎症は、認められなかった (Huntingdon Research Center, 未公表報告 1991b)。GLP や国際的なガイドライン (EECB.5/OECD TG 405) に準拠した別の試験でも、同様の結果が示されている。この試験では、無希釈の被験物質 (純度 99.5%) が、0.1 mL 点眼され、その結果、結膜に弱い刺激症状が現れた (初日に 2/3 羽でグレード 1 の浮腫、初日にウサギ全例にグレード 2 の結膜充血)。点眼の 24 時間後、全ての影響は消失した (Hoechst AG, 未公表報告 1988b)。1972 年に、純度が不明な別々の 3 ロットの被験物質を用いて試験が行われているが、ウサギの眼に局所的影響は認められなかった (Stauffer Chemical Company, 未公表報告 1972)。

#### ヒトにおけるデータ

ヒトのデータは得られていない。

### 4.1.2.3.3 結論

リン酸トリス(2-クロロエチル)のヒトにおける局所刺激性に関しては、データは得られていない。TCEP は、ウサギの皮膚や眼の結膜に対して、弱い局所刺激性を示すだけである。したがって、TCEP は、皮膚や眼に対する刺激物質とは考えられない。

#### 4.1.2.4 腐食性

##### 動物における試験

既述のデータから、リン酸トリス(2-クロロエチル)が腐食性物質でないことは明らかである。

##### ヒトにおけるデータ

ヒトのデータは得られていない。

#### 結論

既述の動物試験に基づいて判断すると、リン酸トリス(2-クロロエチル)は、腐食性物質ではない。

#### 4.1.2.5 感作性

##### 4.1.2.5.1 動物における試験

TCEP の皮膚感作性について、Buehler 法により評価が行われている (Mobil, 1983、BG Chemie, 1995 が引用)。モルモット(雌雄 5 匹ずつ)に対し、無希釈の被験物質で、1 週間に 1 度、3 週間にわたって感作誘導を実施した。3 回目の感作誘導の 2 週間後、モルモットに対し、無希釈の被験物質で感作惹起を行った。アレルギー反応は全く認められなかった (24 および 48 時間の時点で観察)。詳細データは得られていない。

##### 4.1.2.5.2 ヒトにおけるデータ

ヒトのデータは得られていない。

##### 4.1.2.5.3 構造的に類似したリン酸クロロアルキル化合物に関して得られたデータ

リン酸トリス(2-クロロエチル)は、アイルランド/英国によって評価が実施されている [EU

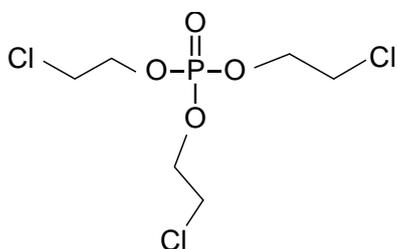
## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

RAR TCPP(2006)、EU RAR TDCP(2006)参照] 2つの優先検討物質、リン酸トリス(2-クロロ-1-メチルエチル)およびリン酸トリス[2-クロロ-1-(クロロメチル)エチル]と構造的に類似性がある。したがって、これらのリン酸クロロアルキルエステル化合物に関する情報を本文書に収載し、それを利用して、TCEPの皮膚感作性を類推・検討することとする。

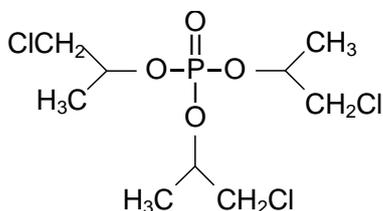
### 4.1.2.5.3.1 化学構造

それぞれの化合物の構造は、以下のとおりである。

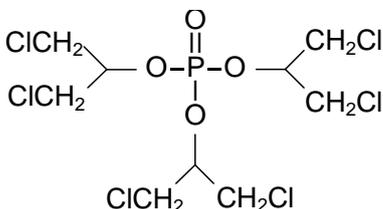
リン酸トリス(2-クロロエチル) (TCEP)



リン酸トリス(2-クロロ-1-メチルエチル) (TCPP)



リン酸トリス[2-クロロ-1-(クロロメチル)エチル] (TDCP)



### 4.1.2.5.3.2 物理化学的性質およびアルキル化特性

これら 3 つのリン酸クロロアルキル化合物について、類推による検討に用いた主要な物理

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

化学的性質を、Table 4.7 に一覧表示した。分子量や log Pow の値は同等であるが、水溶性は、TCEP、TCPP、TDCP の順に低くなっている。

Table 4.7 Selected physico-chemical properties of TCEP, TCPP and TDCP

	TCEP	TCPP	TDCP
Molecular weight (g/mol)	285	327	430
Water solubility (mg/l, 20°C)	7820	1080	18.1
Partition coefficient (LogPow)	1.78	2.68	3.69

リン酸クロロアルキル化合物のアルキル化特性については、Crook and Haggis (1969)、Bissell (1977)、Levchik et al. (2005) などの様々な研究者により、検討が行われている。それらの結果から、TCEP、TCPP および TDCP は、高温 (140°C 超) および特定の反応条件下で、芳香族アミン化合物やポリウレタンフォームのウレタン構造を、N-アルキル化する傾向を有することが示されている。しかし、この様な反応は、第一級脂肪族アミン化合物については、低温の水溶性媒体中では起こりづらいと考えられる (Belke et al., 2003)。このことから、ポリペプチド骨格やタンパク質の ε-アミノ基の窒素原子での N-アルキル化は、体温ほどの温度かつ生理学的媒体中では、起きないものと結論付けられる。したがって、TCEP やその類縁体が、アルキル化を介してタンパク質と共有結合する可能性については、無視できるものとみなせる。

### 4.1.2.5.3.3 動物におけるデータ

#### リン酸トリス(2-クロロ-1-メチルエチル)

1979 年に行われた試験では、皮膚感作性の証拠は示されていない (SafePharm, 1979)。用量設定試験により、局所感作誘導における TCPP の皮内注入量として、5%液 0.1 mL が選択された。皮内注入の 24 時間後、無希釈の被験物質が、48 時間適用された。局所感作誘導の 24 時間前に、10%ラウリル硫酸ナトリウムが適用された。10 匹のモルモットを TCPP で処置し、別の 4 匹を無処置対照群とした。局所感作誘導の 2 週間後、無希釈の被験物質を適用し、閉塞包帯を施して 24 時間保持した。感作惹起後に、有意な反応は現れなかった。この試験は (1979 年の実施のため) GLP には準拠していないが、得られた結果は、TCPP を陰性とするのを容認させるに足るものと考えられる。

GLP に準拠して、局所リンパ節試験 (LLNA) が実施されている。この試験は、OECD のガ

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

イドライン No. 429 に整合するもので、TCPP は非感作性であるとみなされる結果が得られた(EU RAR TCPP, 2006)。各群 4 匹ずつの CBA/Ca マウスを、無希釈の TCPP または、アセトン/オリーブ油の 4:1 混合液を媒体とした TCPP の 50%もしくは 25%v/v 調製液 25  $\mu$ L で 3 日間処置した。さらに 4 匹のマウスの群を設け、媒体だけの塗布を行った。最初の局所適用の 5 日後、全てのマウスに、尾静脈から、合計 20  $\mu$ Ci の  $^3$ H-メチルチミジン(比活性 2.0 Ci/mmol)を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を 250  $\mu$ L 注入した。全てのマウスを 5 時間後に屠殺した。刺激指数は、25、50 および 100% (v/v) の濃度で、それぞれ、1.55、1.97 および 1.56 であった。

EU 内の 2 箇所の TCPP 製造現場に関して産業医により 2 件の私信が作成されており、そこから、アイルランドの評価書作成者は、労働者内では、皮膚感作の所見は認められなかったとの情報を得ている。

また、米国を本拠とする TCPP 製造現場の規制関連業務監督者により私信が作成されており、そこから、アイルランドの評価書作成者は、その現場における 2001 年以前の 13 年間の医療記録には、TCPP への曝露や TCPP 取扱いに関連して、皮膚感作を含め、健康への影響が生じた証拠は見つからなかったとの情報を得ている。

結論として、モルモットでの試験と LLNA の結果から、TCPP は、問題となるような皮膚感作性を有していないことが示されている。TCPP の呼吸器感作性に関する情報は、得られていない。

### リン酸トリス[2-クロロ-1-(クロロメチル)エチル]

OECD ガイドラインに沿って、モルモットマキシミゼーション試験が行われており、充実した報告がなされている。それによれば、TDCP は、皮膚感作性の徴候を示さなかった(Manciaux, 2001, EU RAR TDCP, 2006)。この試験では、1 群 20 匹の被験動物に、コーン油を媒体とした 25%TDCP 液が皮内注射され、また、10%ラウリル硫酸ナトリウムの塗布を行った後、100%TDCP が局所適用された(局所適用は感作誘導 7 日目)。10 匹の対照群の動物には、媒体のみが投与された。100%TDCP で感作惹起が行われたが、被験群および対照群のいずれの動物にも、紅斑や浮腫などの症状は現れなかった。メルカプトベンゾチアゾールを投与した陽性対照群も設けられていたが、そこでは適切な反応が得られている。

結論として、モルモットでの試験から、TDCP は、問題となるような皮膚感作性を有していないことが示されている。TDCP の呼吸器感作性に関する情報は、得られていない。

#### 4.1.2.5.4 結論

リン酸トリス(2-クロロエチル)のヒトにおける感作性に関するデータは、得られていない。動物の皮膚感作試験(Buehler 法)では、TCEP の皮膚感作性は認められなかった。追加試験については、別の 2 つのリン酸クロロアルキルエステル化合物、TCPP と TDCP の感作性データによる類推・検討に基づき、提言されない。これらの化合物(4<sup>th</sup> EU 優先順位リストに掲載)は、構造的に関連する化合物であり、モルモットを用いた試験や局所リンパ節試験で検討が行われている。その結果、これらの化合物は、問題となるような皮膚感作性を有していないことが示されている。

構造的に関連のある 3 つのリン酸クロロアルキル化合物に関する情報(動物試験の結果、物理化学的データや化学構造の類似性、そして TCEP、TCPP および TDCP のアルキル化特性)を総合的に考慮すると、TCEP は、ヒトに対して非感作性であると結論付けられる。

TCEP や他の 2 つのリン酸クロロアルキル化合物の呼吸器感作性については、情報が得られていない。

#### 4.1.2.6 反復投与毒性

##### 4.1.2.6.1 動物における試験

最も信頼性の高い反復投与毒性試験は、経口経路(強制もしくは混餌)によりリン酸トリス(2-クロロエチル)への曝露を行ったものであった。これらの試験の結果から、動物種や性別によってばらつきがみられたものの、脳や腎臓が毒性の主要な標的臓器であることが示された。また、リン酸トリス(2-クロロエチル)による影響に対して、マウスはラットよりも感受性が低いことも明確にされた。リン酸トリス(2-クロロエチル)を反復投与した試験の結果を、Table 4.11 にまとめた。データのいくつかは、発がん性を調べる目的で行われた長期/一生涯試験のものである。したがって、それらについては、4.1.2.8 項も参照されたい。

#### 4.1.2.6.1.1 一般的な評価項目

- 経口

##### 強制経口投与試験(ラットおよびマウス)

想定生存期間にわたるリン酸トリス(2-クロロエチル)の連日投与により生じる毒性学的影響を評価すること、また、後の発がん性試験における用量を決定することを目的として、14日間および16週間試験が、ラットやマウスを用いて実施されている。多くの有機リン酸系化合物が、コリンエステラーゼを阻害し、それにより神経毒性活性を示すことから、リン酸トリス(2-クロロエチル)が同酵素を阻害する能力についても検討された(Matthews 1990, NTP 1991)。これらの試験では、リン酸トリス(2-クロロエチル)は、コーン油を媒体として、1日1回で週5日、強制経口投与された。

#### 14日間試験

##### ラット

各群雌雄5匹ずつのF344/Nラット(8~9週齢)に、リン酸トリス(2-クロロエチル)(純度98%)を、0、22、44、88、175ないしは350 mg/kg/日の用量で、16日間に12回投与した。350 mg/kg/日の用量まで、雌雄両方において、リン酸トリス(2-クロロエチル)による死亡例は認められず、体重増加量に変化はなく、毒性や神経毒性の臨床症状は、何も認められなかった。175および350 mg/kg/日群では、雄の腎臓の絶対および相対重量の平均値が、対照群よりも、それぞれ10および12%高かった。350 mg/kg/日群の雌の肝臓重量は、対照群よりも有意に(17%)上昇していた。さらに、88から350 mg/kg/日群の雌において、肺の絶対および相対重量が、有意に低下していた( $p \leq 0.05$ )。しかし、臓器重量の変化は、いずれもそれを補完する他の所見を欠いており、このことから、それらの変化に毒性学的な意義は無いと考えられた。リン酸トリス(2-クロロエチル)による他の臓器重量の変化は、雌雄のラットにおいて、認められなかった。コリンエステラーゼ活性は、剖検時に採取した新鮮な血清で計測されたが、リン酸トリス(2-クロロエチル)を投与された雄ラットにおいては、低下は認められなかった。一方、雌では、175および350 mg/kg/日群で、それぞれ18% ( $p \leq 0.01$ )および20% ( $p \leq 0.05$ )の低下が認められた。血漿コリンエステラーゼが20%を超えて統計学的に有意に阻害された場合に、毒性学的に有害であるとみなされるため、上述の低下の所見は、曝露に関する単なる生物学的指標と思われ、毒性学的に重要ではないと考えられた。〔WHO/UNEP(1990)、U.S.EPA(Sette, 1997; Dorsey, 1997)およびJMPPR(Reprt, 1998)に公表された、コリンエステラーゼ阻害に関する指針では、アセチルコリンエステラーゼが20%以上統計学的に有意に阻害された場合に、毒性学的にみて「有害」とみ

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

なしている。) 肉眼的もしくは組織病理学的病変は、投与を受けたどの群でも認められなかった。

雄および雌ラットの NOAEL は、350 mg/kg/日であった (NTP 1991, Matthews 1990)。

### マウス

各群雌雄 5 匹ずつの B6C3F1 マウス (9~10 週齢) に、リン酸トリス (2-クロロエチル) (純度 98%) を、0、44、88、175、350 ないしは 700 mg/kg/日の用量で、16 日間に 12 回投与した。700 mg/kg/日の用量まで、死亡率、体重増加量、臓器の絶対および相対重量、組織病理学的異常に関して、投与に関連した影響は、何も認められなかった。雄で 2 匹 (175 および 350 mg/kg/日群で 1 匹ずつ)、雌で 1 匹 (700 mg/kg/日群) が死亡したが、強制経口投与による受傷によるものであった。175 および 350 mg/kg/日群の雌雄において、投与の最初の 3 日間、運動失調や痙攣性動作が認められた。これらの症状は、最初の 3 日を超えると消失した (それ以上のデータ無し)。投与を受けた雌雄のマウスにおける血清コリンエステラーゼ活性は、対照群と同等であった。

最終的に、雄および雌マウスの NOAEL は、痙攣や運動失調に関して、175 mg/kg/日であった (NTP 1991; Matthews, 1990)。

### **16 週間試験**

4 週目の期間における最初の 3 日間、高用量側 2 群への被験物質の調製に手違いがあり、誤った量が投与された。これら高用量側 2 群のラットやマウスは、4 週目の期間におけるその 3 日間、2 倍量の投与を受けていた。

### ラット

各群雌雄 10 匹ずつの F344/N ラットに、リン酸トリス (2-クロロエチル) (純度 98%) を、0、22、44、88、175 ないしは 350 mg/kg/日の用量で、16 週間 (雌) もしくは 18 週間 (雄) 投与した。亜慢性毒性試験の過程 (第 4 週) で、350 および 175mg/kg/日群で雌が 1 匹ずつ死亡したが、これは、上述した被験物質調製における手違いによるものであった。過量投与を受けた雌ラットは、運動失調、過剰な流涎、浅速呼吸、痙攣などの毒性徴候を示した。過量投与を受けた雄ラットでは、毒性の徴候はみられず、死亡例も無かった。この 16 週間試験の間に、さらに死亡例が認められている。175 mg/kg/日群の雄 1 匹、350 mg/kg/日群の雄 5 匹、および 350 mg/kg/日群の雌 3 匹が死亡したが、これらは過量投与とは関係がなかった。別に 350 mg/kg/日群の雄 1 匹および 22 mg/kg/日群の雄 1 匹と雌 2 匹が死亡したが、これら

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

は強制経口投与時の受傷によるものであった。175 および 350 mg/kg/日群の雌では、投与後、時おり活動過多期が見受けられた。12 週目において、350 mg/kg/日群の雌で、断続的な痙攣が認められたが、同群の雄では認められなかった。350 mg/kg/日群の雌の最終体重は、対照群よりも 20% 重く、投与を受けた他の群の雌や投与を受けた雄の群では、最終平均体重は対照群と同等であった。肝臓および腎臓の相対重量が、350 mg/kg/日群の雄および 44 から 350 mg/kg/日群の雌で、有意 ( $p \leq 0.01$ ) に増加した。350 mg/kg/日群の雄における肝臓および腎臓の相対重量の増加率は、それぞれ 22% および 26% であった。雌における肝臓の相対重量の増加率は、44、88、175 および 350 mg/kg/日群の順で、それぞれ 13%、13%、19% および 50% であった。雌における腎臓の相対重量の増加率は、44、88、175 および 350 mg/kg/日群の順で、それぞれ 8%、11%、11% および 22% であった。これらの影響は、いずれの組織にも明確な組織病理学的病変を伴うことなく生じたものであった。350 mg/kg/日群の雌では、脳および胸腺の絶対重量が低下していた(それぞれ 11% および 19%)。鏡検により、雄ラットおよび雌ラットの脳で、病変が有意に増加していることが明らかとなった。175 および 350 mg/kg/日群の雌ラットでは、海馬と視床において、リン酸トリス(2-クロロエチル)投与に関連した神経細胞壊死が生じていた。それより程度は低かった(軽度かつ有意性無しであった)ものの、350 mg/kg/日群の雄ラットでも同じ所見が認められた。これらの影響は、雄よりも雌で顕著であった。海馬の領域における神経細胞の減少は、350 mg/kg/日群の雌では 10/10 匹、同群の雄では 2/10 匹に観察され、175 mg/kg/日群の雌では 8/10 匹に観察された。用量-反応関係において、有意な ( $p = 0.001$ ) 性差が認められた。海馬の損傷は、350 および 175 mg/kg/日群の雌で有意に認められ、その程度は雌ラットで用量依存的に増悪した ( $p = 0.0001$ )。神経細胞への影響は、主として海馬の錐体細胞層の背側正中部で認められた。視床核の壊死や損傷も、350 mg/kg/日群の雌 2 匹で観察された。海馬の錐体細胞の損傷に付随して、組織の石灰化や小神経膠細胞症が認められる例もあった。剖検時の血清で測定したコリンエステラーゼ活性は、175 および 350 mg/kg/日群の雌で、それぞれ対照群の 75% および 59% であった ( $p \leq 0.01$ )。一方、雄ラットでは、活性の低下は認められなかった。

総括すると、350 mg/kg/日の投与を受けていた雄と、44 から 350 mg/kg/日の投与を受けていた雌において、肝臓や腎臓の相対重量の増加が見られ、臓器重量への影響が有意に認められた。雄や雌で認められたこの肝臓や腎臓の相対重量の増加には、呼応する組織病理学的影響が認められなかったため、臓器重量で見られたそれらの所見は、この試験においては毒性学的に有害なものとは考えられなかった。この試験で観察された最も重要な毒性影響は、350 mg/kg/日の投与を受けていたラットにおける死亡と、175 ないしは 350 mg/kg/日の投与を受けていたラットの海馬領域でみられた脳病変であった。海馬の神経細胞への影響に関する NOAEL は、雌ラットにおいては 88 mg/kg/日、雄ラットにおいては 175 mg/kg/日であった (NTP 1991, Matthews 1990)。

## マウス

各群雌雄 10 匹ずつの B6C3F1 マウスに、リン酸トリス(2-クロロエチル) (純度 98%) を、0、44、88、175、350 ないしは 700 mg/kg/日の用量で、16 週間投与した。強制経口投与による外傷により、雄 3 匹(175、350 および 700 mg/kg/日群で 1 匹ずつ)と雌 2 匹(175 および 350 mg/kg/日群で 1 匹ずつ)が、試験終了以前に死亡したが、被験物質に関連した死亡は起こらなかった。44 から 700 mg/kg/日のリン酸トリス(2-クロロエチル)投与群において、体重増加量、平均最終体重、コリンエステラーゼ活性に、変化は認められなかった。肝臓の平均絶対重量が、175、350 および 700 mg/kg/日群の雌で、有意に( $p \leq 0.01$ )増加していた(それぞれ 14%、20%および 13%)。雄でも、700 mg/kg/日群において、増加(5%)が認められた。しかしながら、体重に対する肝臓重量の比は、増加していなかった。それらの肝臓の絶対重量の増加は、これを補完する形態学的所見を伴うものではなかった。175、350 および 700 mg/kg/日群の雄マウスでは、腎臓の絶対重量が、有意に( $p \leq 0.01$ )減少していた(それぞれ 5%、10%および 20%)。しかしながら、体重に対する腎臓重量の比には、影響は見られなかった。腎臓の組織病理学的検査では、700 mg/kg/日群の雌雄の全マウスにおいて、肥大した核を有する上皮細胞(軽度の細胞質肥大および核肥大)が認められた。病変は、主として、皮質の近位尿細管や髄質の外線条でみとめられ、また、これらほどではないが、髄質のヘンレ係蹄の直線状部分においても認められた。ラットで見られた様な、海馬や視床の病変は、マウスでは雌雄共に認められなかった。700 mg/kg/日群のマウスにおける精子数は、対照群に比べてわずかに減少していた( $p = 0.05$ )。

臓器重量の測定により、175、350 および 700 mg/kg/日群の雌ならびに 700 mg/kg/日群の雄で、肝臓重量の有意な増加が明らかとなったが、これを補完する他の所見は認められなかった。したがって、これらの所見は、毒性学的有害性を示すものとはみなされなかった。重要な毒性影響は、700 mg/kg/日群の雌雄で認められ、具体的には、腎病変(軽度の細胞質肥大および核肥大)および腎臓の平均絶対重量の有意な減少が認められた。

マウスにおける腎臓への影響に関する NOAEL は、雌雄共に、350 mg/kg/日と推定された(NTP 1991, Matthews 1990)。

リン酸トリス(2-クロロエチル)への反復曝露による、ラットやマウスの脳への有害影響については、後述の 4.1.2.6.1.2 特別な評価項目 - 神経毒性の項で検討する。

### 103 週間試験

ここに取り上げた発がん性試験(NTP 1991, Matthews 1993)で得られた、リン酸トリス(2-クロロエチル)が実験動物に及ぼす腫瘍性影響に関する知見や情報は、4.1.2.8 項に詳しく記

載されている。

## ラット

各群雌雄 60 匹ずつの F344/N ラットに、リン酸トリス(2-クロロエチル) (純度 98%) が 0、44 ないしは 88 mg/kg/日の用量で、1 日 1 回、週 5 日で最長 103 週間、コーン油を媒体として強制経口投与された。投与期間が 66 週となった時点で、各群雌雄 10 匹ずつについて、中間評価(剖検、組織病理学的、血液学および臨床生化学的検査)が実施された。66 週目に入った時点では、88 mg/kg/日群の雌 1 匹が 261 日目に、媒体対照群の雄 1 匹が 408 日目に死亡していた。残りのラットは、458 および 459 日目の中間屠殺時まで生存していた。中間評価では、体重増加量や血液学的項目に、有害な影響は見られなかった。88 mg/kg/日群の雌で、血清アルカリホスファターゼおよびアラニンアミノトランスフェラーゼが、有意に減少した ( $p \leq 0.01$ )。同用量群の雄で、肝臓と腎臓の平均絶対重量が、軽度上昇していた。肝臓と腎臓の相対重量に関しては、それぞれ 14% および 20% という、有意な増加が観察された ( $p \leq 0.01$ )。この時点で、88 mg/kg/日群の雄 1 匹で、腎尿細管腺腫が認められた。限局的な脳病巣が、大脳および視床で認められた。大脳や視床の病巣は、局所壊死と炎症性細胞の蓄積、反応性神経膠症、および内皮の肥厚および過形成によるもので、88 mg/kg/日群の雌 3/10 匹で認められた。

103 週目における最終体重の平均値は、被験物質投与群と対照群とで同等であった。毒性を示す臨床症状は見られなかった。88 mg/kg/日群では、雄ラットおよび雌ラットにおいて、生存率が減少していた(雄では対照群が 78%であったのに対し 51%、雌では対照群で 66%であったのに対し 37%、 $p \leq 0.01$ )。早期死亡した雌ラットや切迫屠殺した雌ラットでは、脳病巣が高頻度で認められたが、雄では認められなかった。リン酸トリス(2-クロロエチル)投与に関連した主要な影響は、腎臓と脳に現れた。腎尿細管上皮の限局的な過形成の発生が、投与を受けた雌雄において、有意に増加した(雄で 0/50、2/50 および 24/50 匹、雌で 0/50、3/50 および 16/50 匹)。腎尿細管上皮の過形成は、皮質の曲尿細管で生じており、上皮細胞の層状化を特徴とし、そのため尿細管腔は、部分的に完全に閉塞していた。ラットにリン酸トリス(2-クロロエチル)を投与した 2 年間試験における、腎尿細管での過形成の発生率を、次の Table 4.8 にまとめて示した。

雌雄のラットの腎臓におけるこの重要な毒性影響は、明確な用量-反応関連性を示し、44 および 88 mg/kg/日の両投与群で観察された。そのため、この試験において、腎病巣に関する NOAEL を推定することはできなかった。したがって、44 mg/kg/日は、雌雄のラットにおける腎病巣に関する LOAEL と考えられる。

脳幹および大脳(視床、視床下部および基底核)における退行性病変の発生率が著しく増加

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

しており、88 mg/kg/日群の雌では、44%を超えていた。16 週間試験における知見とは対照的に、退行性病変は、高用量群の雌において、脳幹の灰白質および白質ならびに大脳皮質に広範に分布しており、それより程度は劣るものの、同群の雄ラットでも認められた。退行性病変は、神経膠細胞増殖、石灰化、出血ないしはヘモジデリン蓄積によるものであり、88 mg/kg/日のリン酸トリス(2-クロロエチル)投与を受けていた群の 50%を超える雌ラットにおいて、大脳や脳幹に認められた。一方、投与を受けていた雄では、同様の病変は、数匹でしか見られなかったが、毒性的関連性があるものとみなされた。雄での病変の発生率や重症度は、有意に高いものではなかったが、リン酸トリス(2-クロロエチル)投与に関連して上昇していた。したがって、雌雄の F344/N ラットにおける、脳病変に関する NOAEL は、44 mg/kg/日である(NTP 1991, Matthews 1993)。リン酸トリス(2-クロロエチル)をラットに投与した、この 2 年間試験における非腫瘍性脳病変に関しては、「特別な評価項目に関する試験 - 神経毒性」と題した欄を別途設けてまとめてあり、より詳細な情報もそこに提示されている。

**Table 4.8 Incidence of hyperplasia in the renal tubules of F344/N rats in the 2-year study of tris(2-chloroethyl)phosphate (NTP 1991, Matthews 1993)**

	Vehicle control	44 mg/kg bw/d	88 mg/kg bw/d
<b>male</b> (number examined)	50	50	50
Hyperplasia, focal		1 (2%)	1(2%)
Mineralization		1 (2%)	
Epithelium, hyperplasia		1 (2%)	1 (2%)
Epithelium, hyperplasia, focal			18 (36%)
Epithelium, hyperplasia, multifocal			4 (8%)
<b>female</b> (number examined)	50	50	50
Epithelium, hyperplasia			4 (8%)
Epithelium, hyperplasia, focal		3 (6%)	11 (22%)
Epithelium, hyperplasia, multifocal			1 (2%)

マウス

各群雌雄 60 匹ずつの B6C3F1 マウスに、リン酸トリス(2-クロロエチル)(純度 98%)が、0、

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

175 ないしは 350 mg/kg/日の用量で、同じ投与スケジュールにより、強制経口投与された。各群雌雄 10 匹ずつを、66 週での中間評価(剖検、組織病理学的、血液学および臨床生化学的検査)に割り振った。66 週の時点では、死亡率、体重増加量、血液学的項目ないしは臨床生化学的項目に関して、何も影響は見られなかった。腎臓の鏡検により、350 mg/kg/日群の雄 2 匹で、尿細管上皮細胞の過形成が認められた。

103 週の時点でも、死亡率や体重増加量は、投与を受けた雌雄の群と、それぞれに対応する対照群との間で、同等であった。毒性の主要な標的臓器は腎臓であり、175 もしくは 350 mg/kg/日のリン酸トリス(2-クロロエチル)投与を受けた雌雄のマウスにおいて、尿細管上皮細胞の核肥大(巨大核)が認められた(それぞれ雄で 16/50 および 39/50 匹、雌で 5/49 および 44/50 匹)。この所見は、350 mg/kg/日群のマウスの約 80%で認められ、175 mg/kg/日群のマウスではこれより発生率が低かったが、どちらの用量群でも細胞壊死の徴候は報告されていない。影響を受けた細胞は、皮質の近位曲尿細管や髄質の外線条で認められ、それらより頻度は低い、髄質のヘンレ係蹄の直部でも認められた。病変は、ほとんどのマウスではごく軽微なもので、過色素性の肥大核を 1 個有する数個の尿細管上皮細胞が広く散在した様相を示すものであった。同時対照群では、核肥大は、雄の 2/50 匹、雌の 0/50 匹で観察された。トリス(2-クロロエチル)を B6C3F1 マウスに投与した、この 2 年間試験でみられた主要な腎尿細管病変について、その概要を以下の Table 4.9 に示した。

**Table 4.9 Selected renal tubule cell lesions in B6C3F1 mice in the 2-year study of tris(2-chloroethyl)phosphate (NTP 1991, Matthews 1993)**

	Vehicle control	175 mg/kg bw/d	350 mg/kg bw/d
<b>male</b> (number examined)	50	50	50
Karyomegaly	2	16	39**
Hyperplasia (original + step sections)	1	0	3
<b>female</b> (number examined)	50	49	50
Karyomegaly	0	5*	44**
Hyperplasia (original + step sections)	0	1	2

\* significantly different ( $p \leq 0.05$ ); \*\* significantly different ( $p \leq 0.01$ ) from the control group by logistic regression tests

両投与群の雌雄のマウスにおいて、腎臓でみられたこの毒性影響には、明確な用量-反応関係が存在した。この試験では、マウスの腎病変に関する NOAEL を推定することはできなかった。したがって、175 mg/kg/日は、B6C3F1 マウスの雌雄における、腎臓の形態学的変化に関する LOAEL であると考えられた。肝臓では、雄において、細胞学的変化による

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

病巣、特に好酸性病巣の発生率が増加した(対照群:0/50 匹で 0%、175 mg/kg/日群:3/50 匹で 6%、350 mg/kg/日群:8/50 匹で 16%)。一方、好塩基性病巣の発生率(対照群:1/50 匹で 2%、175 mg/kg/日群:2/50 匹で 4%、350 mg/kg/日群:1/50 匹で 2%)や、透明細胞病巣の発生率(対照群:4/50 匹で 8%、175 mg/kg/日群:1/50 匹で 2%、350 mg/kg/日群:5/50 匹で 10%)は増加しなかった。好酸性、好塩基性および透明細胞病巣は、肝細胞腺腫と合わせ、形態学的連続性を示す関係にあり、肝細胞腫瘍の前駆体と考えられている。雌マウスでは、肝細胞病巣の発生率増加は認められなかった。総括的に検討すると、雌雄のマウスにおける非腫瘍性病変に関する NOAEL を決定することはできなかった(NTP 1991, Matthews 1993)。

### ● 混餌投与試験(ラットおよびマウス)

#### 28 日間試験

##### ラット

28 日間の混餌投与用量設定試験が実施されており(Stauffer Chemical Company, 未公表報告 1980a)、各群雌雄 10 匹ずつの Sprague-Dawley CD ラットに、0、500、850、1500 ないしは 2000 ppm(標準的な摂餌量に基づいて計算すると、雄では 0、42、72、125 および 163 mg/kg/日、雌では 0、50、88、144 および 191 mg/kg/日に相当)のリン酸トリス(2-クロロエチル)が、混餌投与された。この試験報告の中に記載されている被験物質消費量の週当たりの平均値から、12 週間での消費量の平均値を算出した。また、200 ppm(雄では 19 mg/kg/日、雌では 20 mg/kg/日に相当)の用量群も設けられていたが、投与開始の 2 週間後、4000 ppm(雄では 293 mg/kg/日、雌では 334 mg/kg/日に相当)に増加させた。さらに、350 ppm(雄では 30 mg/kg/日、雌では 38 mg/kg/日に相当)の用量群も設けられていたが、3 週間後、8000 ppm(雄では 495 mg/kg/日、雌では 508 mg/kg/日に相当)に増加させて 1 週間投与した。この試験は、B.7/OECD TG 407 といった試験手順ガイドラインの要項に沿って実施されたものではなく、いくつかの点で、公的なガイドラインから逸脱していた。主に、次の様な不備が存在していた。すなわち、採り上げた臨床生化学的パラメータの種類がわずかである、臓器重量が検討されていない、組織病理学検査が行われていない、という点である。しかし、この用量設定試験では、基礎的なデータが提示されており、それらを裏付け情報として利用することができた。この試験では、被験物質投与に関連した死亡例は認められなかった。被験物質投与を受けたラットの平均体重は、どの用量群においても、対照群と同等であった。8000 ppm(雄では 495 mg/kg/日、雌では 508 mg/kg/日に相当)を 1 週間投与された群では、雌雄両方において、統計学的に有意な( $p \leq 0.05$ )飼料消費量の低下が観察された。血液学および臨床生化学的検査では、投与に関連した生物学的に意義のある変化は認められなかった。1500 ppm(125 mg/kg/日に相当)群の雄 1 匹および 8000 ppm(495 mg/kg/日に相当)の雄

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

3 匹で、精嚢や前立腺が、正常よりも縮小していた。雄 1 匹において、精嚢の大きさや重量が正常値からかけ離れており、これは被験物質の摂取と関連している可能性が考えられた。

この試験の結果から、以下に示した 3 ヶ月間試験における適切な用量を選択するための根拠が得られた。

### 3 ヶ月間試験

#### ラット

OECD の試験ガイドライン 408 にほぼ準拠して(脳組織の鏡検は行われていない)、3 ヶ月間の混餌投与毒性試験が実施されている。Sprague-Dawley CD ラット 5 群(各群雌雄 20 匹ずつ)に対し、リン酸トリス(2-クロロエチル)(市販品純度)が、0、400、1000、3000 ないしは 8000 ppm の濃度で、市販飼料に混ぜて投与された(目標濃度に基づいて摂取量を算出すると、雄で 0、26、65、192 および 506 mg/kg/日、雌で 0、30、75、215 および 586 mg/kg/日に相当)(Stauffer Chemical Company, 未公表報告 1980b)。

雌雄のラット両方において、投与に関連した死亡例や臨床症状は認められなかった。8000 ppm のリン酸トリス(2-クロロエチル)を混餌投与されていた雌雄で、体重と過当たりの平均飼料消費量が、対照群に比べ、有意に( $p \leq 0.05$ )減少した(それぞれ 13~16%および 11~18%)。3000 ppm 群の雌でも、飼料消費量が、わずか 5%だが減少し、生物学的意義があるものと思われた。最終体重の低下が、3000 ppm 群の雌雄(それぞれ-7%および-8%)、および 8000 ppm 群の雌雄(それぞれ-18%および-17%)で認められた。臨床生化学的検査、血液学的検査、尿分析およびコリンエステラーゼ測定の結果には、被験物質に関連した影響は見られなかった。肝臓と腎臓の平均相対重量が、3000 ppm 群と 8000 ppm 群の雌雄両方で有意に( $p \leq 0.05$ )増加した(8000 ppm は、雄で 506.42 mg/kg/日、雌で 586.22 mg/kg/日に相当)。雄ラットでは、肝臓の平均相対重量が、同時対照群と比較して、3000 ppm 群で 19%、8000 ppm 群で 22%高い値を示した。雌でも同様に、それぞれ 9%と 30%の増加を示した。腎臓の平均相対重量は、以下の様に有意に増加していた。すなわち、雄では、1000 ppm 群で 9%、3000 ppm 群で 15%、8000 ppm 群で 22%増加し、雌では、3000 ppm 群で 12%、8000 ppm 群で 13%の増加が示された。尿細管の過形成は、対照群でも被験物質投与群でも多数認められたが、投与用量が高いほど増加する傾向が見受けられた(合計の発生率は、0、400、1000、3000 および 8000 ppm 群の順で、それぞれ、6/20、4/20、7/20、8/20 および 11/20 匹)。対照群との比較においては、1000 および 3000 ppm 群では数値の上昇はわずかであり、それを投与によるものとするには疑義が残りそうだが、8000 ppm 群での発生率は、対照群の発生率を著しく上回っている。平均重症度は、400 ppm 群で対照群よりも上昇している

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

ように思えるが、用量依存性の重症度上昇は、高用量群側では認められなかった(平均重症度は、0、400、1000、3000 および 8000 ppm 群の順で、1.3、2.75、1.1、1.0 および 1.2)。400 ppm 群でこの影響を示した 4 匹のうち 2 匹は、著しいあるいは重篤な再生性過形成を示していたが、これらは、高用量群側での重症度スコアの平均値を考慮すると、偶発的なものであったと考えられる。リン酸トリス(2-クロロエチル)投与によると考えられる、他の肉眼的もしくは組織学的病変は認められなかった。生殖器官ならびに脳の平均相対重量も、3000 ppm 群や 8000 ppm 群で減少していた。心臓の絶対重量は、高用量群の雌雄で低下したが、それ以外の臓器の絶対重量は、対照群の臓器重量と同等であった。この事と、投与に関連した肉眼および組織学的病変が他に認められなかったことから、臓器の相対重量で増加が見られたのは、3000 および 8000 ppm 群で体重が低値であったためであることが支持される。この成長抑制は、飼料消費量が少なかったためと考えられる。8000 ppm 群において、腎皮質での再生性過形成の発生率が上昇したのは、投与に関連していると考えられる。したがって、3000 ppm が NOAEL となる(雄で 192 mg/kg/日、雌で 215 mg/kg/日に相当)。

さらに以前にも、ラットを用いた混餌投与試験が実施されているが、わずかな情報しか得られていない(Stauffer Chemical Company, 未公表報告 1975、Ulsamer et al. 1980 の中で詳細情報の無い要約のみ引用)。この試験では、雌雄 10 匹ずつのラット(系統の情報無し)に、最高 0.5%の濃度(250 mg/kg/日に相当)で、リン酸トリス(2-クロロエチル)が 30 日間混餌投与された。死亡は起こらなかった。投与終了時、成長、外観、行動、肝臓や腎臓の重量に有害影響は認められず、生残動物に病理学的検査を行ったが、変化は何も認められなかった。

総括すると、最高 0.5%の濃度(約 250 mg/kg/日に相当)のリン酸トリス(2-クロロエチル)を 30 日間混餌投与しても、投与による影響は何も認められなかった。NOAEL は、250 mg/kg/日であると考えられた。試験法についての情報や報告内容が乏しいため、この試験はリスク評価において有用とは言えない。

### 18 ヶ月試験

以下に示す慢性毒性試験からは、マウスにおけるリン酸トリス(2-クロロエチル)による腫瘍形成に関する知見・情報が得られており、それらについては 4.1.2.8 項で詳述する。この 18 ヶ月混餌投与試験は、Slc:ddY マウスを用い、防火剤代替物の安全性評価計画の一環として実施されたもので、特に発がん性の評価に重点が置かれたものである。制約事項はあるものの、許容される範囲内にあり、OECD ガイドライン TG 451 の要項を満たす基礎データが得られている。検討されたパラメータは、全体としては発がん性に関するそのガイドラインを満たすものではなかった。しかし、試験報告内容は十分に裏付けがあり、基本

的な科学的原理に基づいている。提示されたデータをリスク評価に利用することは、妥当であると考えられる。

## マウス

各群雌雄 50 匹ずつの Slc:ddY マウスに、リン酸トリス(2-クロロエチル)(純度 98%)を、0、0.012、0.06、0.3 ないしは 1.5%の濃度(体重を 20 g、飼料消費量を 1 日当たり体重の 10%と想定して計算すると、それぞれ 0、12、60、300 および 1500 mg/kg/日に相当)で、18 ヶ月間混餌投与した(Takada et al., 1989)。対照群よりも低い生残率が、雄マウスでは 70 週から、雌マウスでは 60 週から報告されている。対照群の最終生残率は約 65%であったのに対し、1500 mg/kg/日のリン酸トリス(2-クロロエチル)投与を受けていた雌雄では、約 40%であった。1500 mg/kg/日の投与を受けていた雌雄では、体重増加量の顕著な低下も見受けられた(対照群の値よりも約 60%低下)。飼料消費量は、雌雄とも、群間差は認められなかった。血液学的検査では、300 mg/kg/日群の雄で、血小板数が有意に増加したのを除き、変化は認められなかった。1500 mg/kg/日群の雄では、心臓や精巣の重量が有意な低下を示し、同群の雌では腎臓の重量が有意に低下した(より詳細なデータ無し)。剖検では、すべての群で、いろいろな臓器に様々な変化が観察された。腎臓および肝臓が、標的臓器であることが判明した。これらの臓器では、腫瘍性変化が顕著に認められた(詳細は 4.1.2.8 発がん性の項参照)。さらに、リン酸トリス(2-クロロエチル)に関連した非腫瘍性変化も、これらの臓器で報告されており、特に腎臓で顕著であった。肝臓では、巣状壊死、肝細胞の空胞化および髓外造血像が、対照群を含む全群で観察された。最も重要な影響が観察されたのは、腎臓であった。全投与群の雌雄において、尿細管上皮の過形成や肥大が、細胞核の肥大を伴って観察された。これらの核は多形成を示し、異常分裂像、変性および壊死も認められた。これらの所見の発生率は、残念ながら報告されていない。しかし、このような所見は、同時対照群では認められていない。また、1500 mg/kg/日群においては、嚢胞、尿細管上皮の壊死、間質の線維化も観察された。

要約すると、最高用量の 1500 mg/kg/日群において、生残率の低下、体重増加量の低下(10%超)および重度の毒性が報告されており、この最高用量は、その系統のマウスにおける MTD(最大耐量)を上回っていることが示されている。しかし、組織の形態学的に重要な変化は、最高用量群の雌雄の腎臓に限って観察されたものではなかった。長期にわたる再生性の細胞増殖の徴候が、全ての投与群で報告されており、その様な増殖は、腎尿細管が損傷を受けた後に生じる可能性がある。尿細管上皮の過形成や肥厚が、核の肥大を伴って生じており、異常分裂像、変性および壊死も散見された。投与群の腎臓でみられたこれらの顕微鏡学的所見には、定量的な情報が伴われていないが、このような腎臓での所見が、同時対照群では認められなかったことから、重要な毒性影響とみなされる。そのため、

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

腎臓への影響(核肥大を伴う尿細管上皮の過形成および肥厚)に関する NOAEL は、この試験において確立することはできなかった。したがって、この 18 ヶ月間混餌投与試験からは、雌雄の Slc:ddY マウスにおける腎臓への影響に関する LOAEL として、12 mg/kg/日という値が得られる。

### ● 吸入

情報は得られていない。

### ● 経皮

情報は得られていない。

#### 4.1.2.6.1.2 特別な評価項目に関する試験

### ● 神経毒性

リン酸トリス(2-クロロエチル)の神経毒性影響は、白色レグホン種(White Leghorn)の雌のニワトリにおいてのみ、検討されている。

### ニワトリ

OECD の試験ガイドライン 418 に準拠して(臨床生化学的検査のデータは無し)、急性遅発性神経毒性試験が実施されている。その中で、リン酸トリス(2-クロロエチル)の急性遅発性神経毒性が、白色レグホン種の雌の成鶏(12~14 ヶ月齢)を用いて検討されている。18羽のニワトリに、10 mL/kg(約 14200 mg/kg に相当)の用量のリン酸トリス(2-クロロエチル)(市販品等級)が、3 週間の期間を空けて、2 回経口投与された(Stauffer Chemical Company, 非公表報告 1979)。さらに 10 羽ずつのニワトリからなる 2 群を設け、対照群とした。一方を陽性対照群として、有機リン酸系神経毒化合物であるリン酸トリ-*o*-クレジルを、500 mg/kg の用量で投与した。他方を陰性対照として、コーン油を与えた。リン酸トリス(2-クロロエチル)を投与されたニワトリ 18 羽のうち、4 羽が試験期間中に死亡した。毒性症状で顕著なものは、重度の羽毛脱落、産卵停止、飼料消費量減少および体重減少であった。リン酸トリス(2-クロロエチル)を投与されたニワトリの歩様は、コーン油を与えられた群と同様であった。鏡検では、脳、脊髄ないしは坐骨神経に、変化は認められなかった。リン酸トリス(2-クロロエチル)投与を受けて生残した 14/18 羽には、リン酸トリ-*o*-

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

クレジル投与を受けた陽性対照で見られた様な、神経線維の変性を示すものはいなかった。

結論的には、雌のニワトリに、14.2 g/kg/日の用量で、リン酸トリス(2-クロロエチル)を2回(初日および3週間後)経口投与しても、神経毒性の所見は何も認められなかった。

### ● リン酸トリス(2-クロロエチル)に反復曝露されたラットやマウスの脳における有害影響

#### ラットおよびマウス

雌の F344/N ラットを用いた 16 週間強制経口投与試験において、ならびに、B6C3F1 マウスを用いた 16 日間の用量設定毒性試験の中で、神経毒性に関する臨床症状が観察されている。確認された毒性の臨床症状は、運動失調、過剰な流涎、喘ぎ呼吸、痙攣などであり、175 および 350 mg/kg/日が目標用量であったが、被験物質調製の手違いにより、それらの2倍のリン酸トリス(2-クロロエチル)を投与された、F344/N ラットの雌で認められた。手違いによる2倍量での投与は、この16週間の毒性試験の第4週中の3日間行われた。さらに、この亜慢性試験では、175 ないしは 350 mg/kg/日のリン酸トリス(2-クロロエチル)を投与された雌ラットにおいて、投与後、一時的に多動となる例が散見された。第12週に、350 mg/kg/日群の雌ラットで、周期的な痙攣が認められたが、雄では認められず、また、この試験で手違いにより過剰投与を受けた雄ラットでも、そのような症状は示されなかった(NTP 1991, Matthews 1990)。350 ないしは 700 mg/kg/日のリン酸トリス(2-クロロエチル)を16日間投与された雌雄の B6C3F1 マウスでは、運動失調や痙攣性運動が、投与の最初の3日間に観察された(NTP 1991, Matthews 1990)。

ラットやマウスを用いた2年間強制経口投与試験が実施されている。リン酸トリス(2-クロロエチル)が、ラットに対しては44 ないしは 88 mg/kg/日の用量で、マウスに対しては最高350 mg/kg/日の用量で投与されたが、成長、外観および行動に関して、有害影響は全く示されなかった(NTP 1991, Matthews 1993)。

### ● アセチルコリンエステラーゼ活性の測定

ほとんどの有機リン化合物が、ヒトにおいて、アセチルコリンエステラーゼ(AChE)活性阻害を介して神経毒性影響を引き起こすことから、実験動物にリン酸トリス(2-クロロエチル)を投与した場合に、この酵素が阻害される可能性について、検討が行われている。経口投与による14日間および16週間試験が、F344/N ラットと B6C3F1 マウスで実施された(NTP 1991, Matthews 1990)、また、3ヵ月間亜慢性混餌投与試験が、Sprague-Dawley CD ラットを用いて実施された(Stauffer Chemical Company, 未公表報告 1980b)。毒性試験におい

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

て AchE 阻害の評価を行うには、複数の場を考慮した手法が不可欠である。しかしながら、中枢神経系と末梢神経系において、赤血球中もしくは全血中における AchE 阻害を測定したデータは得られていない。血清中のコリンエステラーゼ (ChE) を測定した結果だけが得られている。神経組織の酵素は、有機リン化合物による阻害を受けるのに必須の構造を特に有しており、血清コリンエステラーゼの測定では、それほど有用なデータは得られないことを考慮しておく必要がある。

### ラット

リン酸トリス(2-クロロエチル)投与に関連した血清コリンエステラーゼ活性の変化は、175 もしくは 350 mg/kg/日の用量を 16 週間投与された雌の F344/N ラットにおいて、明確に認められた。剖検時に測定されたコリンエステラーゼ活性は、175 および 350 mg/kg/日群で、それぞれ対照群の値の 75% および 59% に減少していた ( $p \leq 0.01$ )。雄の F344/N ラットでは、変化は何も観察されなかった。ここで観察されたコリンエステラーゼ活性阻害は、単に、TCEP への曝露があったことを示しているものと考えられる。

#### ● 脳の組織学的検査

文献の報告では、ほとんどの有機リン化合物が神経毒性影響を引き起こすことが示されている。そのため、上述の NTP のデータをさらに検討して、リン酸トリス(2-クロロエチル)の神経系への影響を明らかにした。そこでは、各動物の前脳部、中脳、脳幹および小脳の切片についても、光学顕微鏡による検査が実施されている (Matthews 1990)。

### ラットおよびマウス

F344/N ラットを用いた、16 週間の亜慢性(強制)経口投与毒性試験では、リン酸トリス(2-クロロエチル)に関連した神経細胞の壊死が、175 および 350 mg/kg/日群の雌で(それぞれ 8/10 および 10/10 匹)、海馬と視床に認められた。これより程度は低い、雄ラットでも 350 mg/kg/日群で認められた(2/10 匹) (NTP 1991; Matthews 1990)。F344/N ラットを用いた 2 年間試験では、66 週間後の中間評価時に、脳病巣が、小脳や視床において限局的に認められた。これらの病巣は、炎症性細胞の蓄積を伴った壊死、反応性神経膠症、ならびに上皮の肥厚および過形成を特徴としていた。この様な病変は、88 mg/kg/日群の雌では、3/10 匹で確認された。長期/一生涯にわたる経口曝露(103 週間)の後では、88 mg/kg/日群の F344/N ラットの雌で、脳幹や小脳(視床、海馬および基底核)における、神経膠症、出血、壊死および石灰化などの退行性病変の発生率が顕著に増加していた。16 週間試験における所見と対照的に、退行性病変は、88 mg/kg/日群の雌において、脳幹の灰白質および白質、

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

ならびに大脳皮質に広範に分布していた。脳の退行性病変は、88 mg/kg/日のリン酸トリス(2-クロロエチル)を投与されていた群の50%を超える雌ラットで、小脳や脳幹に発生していた。投与を受けていた雄で、同様の病変を示したのは数例だけであった。雌雄とも、それら脳病変の重篤度については、極軽微から顕著までのばらつきがあり、広範な領域が侵されたものも散見された。病変が両側性で対称性を示していた動物がいた一方、両側性で非対称性、もしくは片側性の病変を有していた動物も認められた。活動性病変は、出血性の変性や壊死を特徴としていた。一方、治癒病変では、神経細胞や好中球の消失、神経膠細胞の増殖、毛細血管の過形成、小血管の中膜の肥厚、および担ヘモジデリンマクロファージが見うけられた。石灰沈着のある病巣も存在した(NTP 1991, Matthews 1993)。ラットにおけるリン酸トリス(2-クロロエチル)の2年間投与試験で観察された、非腫瘍性の脳病変の概要を、次のTable 4.10に示した。

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

**Table 4.10 Selected brain lesions in F344/N rats in the 2-year study of tris(2-chloroethyl)phosphate (NTP 1991, Matthews 1993)**

	Vehicle control	44 mg/kg bw/d	88 mg/kg bw/d
<b>male</b> (number examined)	50	49	50
Brain stem, hemorrhage			1(2%)
Brain stem, pigmentation, hemosiderin	1 (2%)		
Cerebrum, gliosis, focal			1 (2%)
Cerebrum, hemorrhage		1 (2%)	1 (2%)
Cerebrum, pigmentation, hemosiderin			1 (2%)
Pons, hemorrhage			3 (6%)
<b>female</b> (number examined)	50	50	50
Brain stem, gliosis	1 (2%)		15 (30%)**
Brain stem, hemorrhage	1 (2%)		12 (24%)**
Brain stem, mineralization			7 (14%)**
Brain stem, necrosis			1 (2%)
Brain stem, pigmentation, hemosiderin	1 (2%)		17 (34%)**
Cerebellum, hemorrhage	1 (2%)		2 (4%)
Cerebellum, necrosis			1 (2%)
Cerebellum, pigmentation, hemosiderin	1 (2%)		
Cerebrum, gliosis			19 (38%)**
Cerebrum, hemorrhage	1(2%)		17 (34%)**
Cerebrum, mineralization			15 (30%)**
Cerebrum, pigmentation, hemosiderin			22 (44%)**
Pons, hemorrhage		1 (2%)	

\*\* significantly different ( $p \leq 0.01$ ) from the control group by logistic regression tests

マウスは、ラットよりも、リン酸トリス(2-クロロエチル)によるこれらの影響に対して、感受性が低かった。B6C3F1 マウスでは、44~700 mg/kg/日の用量で 16 週間反復強制経口投与した場合でも、また、最高 350 mg/kg/日の用量で 103 週間投与した場合でも、雌雄両方において、リン酸トリス(2-クロロエチル)誘発性の脳病変は認められなかった(NTP 1991; Matthews 1993)。

要約すると、F344/N ラットにリン酸トリス(2-クロロエチル)を亜慢性経口投与した場合、

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

雄では 175 mg/kg/日の用量において、雌では 88 mg/kg/日の用量において、脳への毒性影響は認められなかった(NTP 1991; Matthews 1990)。一方、F344/N ラットを用いた 2 年間試験の場合は、66 週目の中間屠殺時に、88 mg/kg/日の投与を受けていた雌において、小脳や視床に限局性の脳病変が認められた。雄ではこのような脳病変は認められなかった。この試験では、103 週間の投与期間後には、88 mg/kg/日の投与を受けていた群の 50%を超える雌ラットに、そのような脳病変が観察された。雄では、同様の病変は数匹でしか見られなかったが、毒性学的関連性があるものとみなされた。雄での病変の発生率や重症度は、有意に高いものではなかったが、リン酸トリス(2-クロロエチル)投与に関連して上昇していた。したがって、雌雄の F344/N ラットにおける、脳病変に関する NOAEL は、44 mg/kg/日である(NTP 1991, Matthews 1993)。B6C3F1 マウスに、最高 350 mg/kg/日の用量で 103 週間投与した場合は、対照群と比較して、脳において、リン酸トリス(2-クロロエチル)に関連した顕微鏡学的変化は認められなかった。したがって、雌雄の B6C3F1 マウスにおいては、脳病変に関する NOAEL は、ともに 350 mg/kg/日である(NTP 1991; Matthews 1993)。

### 4.1.2.6.2 ヒトにおけるデータ

Ingerowski & Ingerowski(1997)は、5 歳の女兒が TCEP に曝露された症例を報告しており、長時間の接触により、神経毒性症状が現れたと記載している。この症例は、ドイツ連邦リスク評価研究所[Bundesinstitut für Risikobewertung = Federal Institute for Risk Assessment : 前ドイツ連邦消費者保護獣医学研究所 Bundesgesundheitsamts das Institut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) = Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine]の症例登録局にも報告されている(Case Register BgVV 1061/97)。

その女兒は、進行性の麻痺を発症した。彼女は、木製の羽目板が取り付けられた部屋を寝室としており、それらの板は、3%の TCEP を含有する木材用防腐剤で処理されたものであった。板材中の TCEP を測定したところ、木 1 kg 中 600 mg であることが判明した。さらに 9 種類の化学物質についても分析が行われたが、検出限界未満であった。筋電図および神経伝導速度測定検査では、全身性の神経原性障害が示されたが、臨床所見からは、「棘筋ジストロフィー」と明確に診断することはできなかった。さらに臨床経過が追われ、四肢の不全麻痺を伴う、「クーゲルベルグ-ウェランダー型脊髄性筋萎縮症」との診断が確定した。住居の改装(全ての羽目板の除去)を行った後、臨床症状は改善した。曝露から 2 年後、機能的障害は全て解消した。

ハウスダスト中の TCEP は測定されていないため、羽目板中の濃度に基づいた曝露解析だけで曝露源が鑑定されており、曝露を定量化できるものではなかった。この事例では、粉

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

塵を取り込んだことによる経口曝露や、TCEP の粒子を吸い込んだことによる吸入曝露が考えられる。粉塵や羽目板との接触による、経皮曝露も考慮に入れるべきである。病態は、曝露時間の経過とともに増悪し、曝露停止後は増悪しなくなった〔曝露中止に反応 (dechallenge reaction)〕。これらの理由から、TCEP への曝露と神経毒性徴候との関係について、無視することはできない。

4.1.2.6.3 リン酸トリス(2-クロロエチル)の動物における反復投与毒性データの要約

動物における毒性試験で得られた、リン酸トリス(2-クロロエチル)による主要な毒性影響のデータを、以下の Table 4.11 にまとめた。

Table 4.11:

Summary table: Animal toxicity data after repeated exposure to tris(2-chlorethyl)phosphate

Study design: Species, strain (male/female) Exposure route Exposure duration Dose	Non-neoplastic effects (selected) at LOAEL NOAEL	Reference
F344/N rat (5m/5f) Oral Gavage 16 days, 5 d/wk (12 doses) 0, 22, 44, 88, 175, 350 mg/kg bw/d	350 mg/kg bw: ↑** liver weight (f) ≥175 mg/kg bw/d: ↑** kidney weight, abs/rel (m) ↓** serum cholinesterase activity (f) ≥88 mg/kg bw/d: ↓* lung weight, abs/rel (f)  NOAELsys (m/f): 350 mg/kg bw/d	NTP 1991 Matthews 1990
F344/N rat (10m/10f) Oral Gavage 16/18 weeks (f/m), 5 d/wk 0, 22, 44, 88, 175, 350 mg/kg bw/d	350 mg/kg bw/d: mortality: 4/10 (m), 3/10 (f) periodic convulsion during week 12 (f) ↑** liver and kidney weights, rel (m) ↓ brain, thymus, abs (f) neuronal necrosis, loss of neurons in the brain (f:10/10; m: 2/10)  ≥175 mg/kg bw/d: in the brain: neuronal necrosis (10/10 f) loss of neurons (8/10 f) ↓** serum cholinesterase activity (f)  ≥44 mg/kg bw/d: ↑** liver and kidney weights, rel (f)  NOAELsys for brain lesions: (m): 175 mg/kg bw/d (f): 88 mg/kg bw/d	NTP 1991 Matthews 1990

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

<p>F344/N rat (10m/10f)                  Oral                  Gavage                  66 weeks (interim sacrifice),                  5 d/wk                  0, 44, 88 mg/kg bw/d rat</p>	<p>88 mg/kg bw/d:                  ↓** AP (f), ↓** ALAT (f)                  ↑** liver and kidney weights, rel (m)                  renal tubule adenoma (1/10m)                  brain: local necrosis, accumulation of inflammatory                  cells, reactive gliosis, endothelial hypertrophy (3/10 f)</p> <p>NOAELsys for brain lesions (f):                  44 mg/kg bw/d</p>	<p>NTP 1991                  Matthews                  1993</p>
<p>F344/N rat (60m/60f)                  Oral                  Gavage                  103 weeks, 5 d/wk                  0, 44, 88 mg/kg bw/d rat</p>	<p>88 mg/kg bw/d:                  ↓** survival (m/f);                  ↑** focal hyperplasia of tubule epithelium of the                  kidney (m:24/50; f: 16/50)                  ↑** degenerative lesions in the brain (f)                  ↑ lesions in the brain (m)</p> <p>44 mg/kg bw/d:                  ↑** focal hyperplasia of tubule epithelium of the                  kidney (m:2/50; f: 3/50)</p> <p>LOAELsys for kidney lesions (m/f):                  44 mg/kg bw/d                  NOAELsys for brain lesions (m/f):                  44 mg/kg bw/d</p>	

For key to symbols, see at the end of the table

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

Table 4.11 (continued):

Summary table: Animal toxicity data after repeated exposure to tris(2-chlorethyl)phosphate

Study design: Species, strain (male/female) Exposure route Exposure duration Dose	Non-neoplastic effects (selected) at LOAEL  NOAEL	Reference
Sprague-Dawley CD Rat (10m/10f) Oral In feed 28 days, daily 0, 500, 850, 1500, or 2000 ppm (m: 0, 41.75, 71.5, 125 or 163 mg/kg bw/d; f: 0, 50, 88, 144 or 191 mg/kg bw/d); 200→4000 ppm (m: 293 mg/kg bw/d; f: 334 mg/kg bw/d); 350 ppm (m: 30 mg/kg bw/d; f: 38 mg/kg bw/d)→8000 ppm (m: 495 mg/kg bw/d; f: 508 mg/kg bw/d)	8000 ppm (m: 495 mg/kg bw/d; f: 508 mg/kg bw/d): ↓** food consumption (after 1 week) smaller seminal vesicles and/or prostate (m: 3/10 ) ↓** testes weight, size (m: 1/10)  1500 ppm (m: 125 mg/kg bw/d): smaller seminal vesicles and/or prostate (m: 1/10)  NOAELsys (m): 850 ppm (71.5 mg/kg bw/d) NOAELsys (f): 8000 ppm (508 mg/kg bw/d)	Stauffer Chemical Company 1980a
Sprague-Dawley CD Rat (20m/20f) Oral in feed 3 months, daily 0, 400, 1000, 3000, or 8000 ppm (m: 0, 25.96, 65.43, 192, or 506 mg/kg bw/d; f: 0, 30.4, 75.15, 215, or 586 mg/kg bw/d)	8000 ppm (m: 506 mg/kg bw/d; f: 586 mg/kg bw/d): ↓* food consumption (m/f) ↓* body weight (m/f) ↑* relative liver and kidney weights (m/f) ↑ incidence in regenerative hyperplasia in the renal cortex  3000 ppm (m: 192 mg/kg bw/d; f: 215 mg/kg bw/d): ↓ food consumption (f) ↓ body weight (m/f) ↑* relative liver and kidney weights (m/f)  1000 ppm (75 mg/kg bw/d): ↑* relative kidney weights (m)  NOAELsys: (m/f): 3000 ppm (m: 192 mg/kg bw/d; f: 215 mg/kg bw/d) for kidney effects	Stauffer Chemical Company 1980b
Sprague-Dawley Rat (10m/10f) Oral In feed 30 days, daily 0.5% (250 mg/kg bw/d)	5000 ppm (appr. 250 mg/kg bw): no treatment-related effects  NOAELsys (m/f): 5000 ppm (appr. 250 mg/kg bw)	Ulsamer 1980

For key to symbols, see at the end of the table

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

Table 4.11 (continued):

Summary table: Animal toxicity data after repeated exposure to tris(2-chlorethyl)phosphate

Study design: Species, strain (male/female) Exposure route Exposure duration Dose	Non-neoplastic effects (selected) at LOAEL  NOAEL	Reference
B6C3F1 Mice (5m/5f) Oral Gavage 16 days, 5 d/wk (12 doses) 0, 44, 88, 175, 350, or 700 mg/kg bw/d	≥350 mg/kg bw: ataxia, convulsive movements during the first three days of dosing (m/f)  NOAELsys (m/f): 175 mg/kg bw/d	NTP 1991 Matthews 1990
B6C3F1 Mice (10m/10f) Oral Gavage 16 weeks (f), 18 weeks (m), 5 d/wk 0, 44, 88, 175, 350, or 700 mg/kg bw/d	700 mg/kg bw/d: ↑** liver weights, abs (m) ↑** nuclear enlargement of tubule epithelial cells of the kidney (10/10 m/f) ↓* sperm count (10/10 m)  ≥175 mg/kg bw/d: ↑** absolute liver weights (f) ↓** absolute kidney weights (m)  NOAELsys for renal lesions (m/f): 350 mg/kg bw/d	NTP 1991 Matthews 1990
B6C3F1 Mice (10m/10f) Oral Gavage 66 weeks (interim sacrifice), 5 d/wk 0, 175, 350 mg/kg bw/d	350 mg/kg bw/d: hyperplasia of tubule epithelial cells of the kidney (2/10 m)  NOAELsys (m/f): 175 mg/kg bw/d	NTP 1991 Matthews 1993
B6C3F1 Mice (60m/60f) Oral Gavage 103 weeks, 5 d/wk 0, 175, 350 mg/kg bw/d rat	350 mg/kg bw/d: ↑** nuclear enlargement of tubule epithelial cells of the kidney (39/50 m; 44/50 f)  175 mg/kg bw/d: ↑** nuclear enlargement of tubule epithelial cells of the kidney (16/50 m; 5/49 f)  LOAELsys for kidney lesions (m/f): 175 mg/kg bw/d NOAELsys not derived for kidney lesions	
Slc:ddY mice (50m/50f) Oral in feed 18 months, daily 0, 12, 60, 300, 1500 mg/kg bw/d	1500 mg/kg bw/d: cysts, necrosis of the urinary tubule epithelium and interstitial fibrosis  ≥12 mg/kg bw/d: hyperplasia and hypertrophy of the urinary tubule epithelium together with enlargement of the nuclei  LOAELsys for kidney effects (m/f): 12 mg/kg bw/d NOAELsys not derived for kidney lesions	Takada et al. 1989

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

<p>White Leghorn Hens (18 test animals, 10/negative and 10/positive control group) Oral by stomach tube 2 treatments (on day 1 and again 3 weeks later) 0, 14200 mg/kg bw</p>	<p>14200 mg/kg bw: mortality (4/18) ↓** body weight cessation of egg production feather loss  NOAELsys: not derived</p>	<p>Stauffer Chemical Company 1979</p>
---	---	---

↑\*\*: statistically significant increase compared with controls (p<0.01); ↑\*: statistically significant increase compared with controls (p<0.05); ↑ increase compared with controls, no statistically significant but possibly of toxicological relevance; ↓\*\*: statistically significant decrease compared with controls (p<0.01); ↓\*: statistically significant decrease compared with controls (p<0.05); ↓: decrease compared with controls, no statistically significant but possibly of toxicological relevance; →: during the study dose level was increased to; m: male; f: female; AP: Alkaline phosphatase; ALAT: Alanine aminotransferase; abs: absolute; rel: relative; LOAELsys: lowest observed adverse effect level for systemic effects; NOAELsys: no observed adverse effect level for systemic effects

実験動物では、リン酸トリス(2-クロロエチル)の短期および長期経口曝露における主要標的臓器は、脳、腎臓、および肝臓であった。

脳における影響:

リン酸トリス(2-クロロエチル)に長期(亜慢性および慢性)経口曝露した場合、マウスでは認められなかったが、ラットにおいては、神経膠症、石灰化、出血および色素沈着(ヘモジデリンの蓄積)といった退行性病変が、大脳や脳幹に生じた。ラットの脳におけるこれらの退行性病変は、用量関連性に生じており、さらに、出現頻度、重症度や規模において、明確な時間-反応関係が認められた。雄ラットは、雌ラットよりも、脳における有害影響に対して感受性が低い。脳の退行性病変は、曝露期間が16週間の場合は、175 mg/kg/日以上のリン酸トリス(2-クロロエチル)を投与されていた雌のF344/Nラットで観察された。また、長期曝露の場合は、88 mg/kg/日の投与を受けていたF344/Nラットの40%を超える雌で、脳の退行性病変が認められた。雄のF344/Nラットでは、同様の病変は、350 mg/kg/日で16週間の投与を受けていた群で認められ、長期曝露の場合は、88 mg/kg/日の投与を受けていた群で数例認められるだけであった。長期投与を受けた雄のF344/Nラットの脳におけるこれらの所見は、発生率や重症度に関して、有意な増高を示したわけではなかったが、毒性学的に意義のあるものと見なされた。その理由は、それらの発生率や重症度が、少数ながら、対照群のデータと比較して、リン酸トリス(2-クロロエチル)投与に関連して増高を示していたからである(NTP 1991, Matthews 1990)。B6C3F1マウスでは、脳におけるこのような顕微鏡学的変化は、リン酸トリス(2-クロロエチル)を44~700 mg/kg/日の用量で16週間強制経口投与した場合でも、103週間にわたって最高350 mg/kg/日の用量で投与した場合でも、認められなかった(NTP 1991, Matthews 1993)。

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

血清コリンエステラーゼ活性の顕著な低下が見られたのは、175 mg/kg/日以上のリン酸トリス(2-クロロエチル)を 16 週間強制経口投与されていた雌の F344/N ラットだけであった(NTP 1991, Matthews 1990)。リン酸トリス(2-クロロエチル)投与を受けていた F344/N ラットの雄では、コリンエステラーゼ活性の阻害は認められなかった(NTP 1991, Matthews 1990)。有意な阻害は、8000 ppm の混餌投与を受けていた Sprague-Dawley CD ラットの雌雄でも認められなかった(投与用量は、雄で約 506 mg/kg/日、雌で約 586 mg/kg/日に相当)(Stauffer Chemical Company, 未公表報告 1980)。B6C3F1 マウスにおいては、最高 700 mg/kg/日の用量でリン酸トリス(2-クロロエチル)を、亜急性経口投与した場合でも亜慢性経口投与した場合でも、雌雄共に、血清コリンエステラーゼ活性は、対照値と同等であった(NTP 1991, Matthews 1990)。AChE 阻害の測定を中枢神経組織、末梢神経組織、および赤血球について実施していない場合、血漿 ChE 測定の結果を評価することは困難である。このため、観察された血漿 ChE 阻害は、リン酸トリス(2-クロロエチル)への曝露があったことを示すだけのものとみなされる。

白色レグホンの雌に非常に高用量(14200 mg/kg)のリン酸トリス(2-クロロエチル)を投与した例では、神経毒性を示唆する行動への影響や神経障害は引き起こされなかった(Stauffer Chem. Company 1979)。

### 腎臓における影響:

リン酸トリス(2-クロロエチル)にラットやマウスを反復曝露した試験では、対照群と比較すると、腎臓重量に相違が見られた。Sprague-Dawley CD ラットに 3 ヶ月間混餌投与した場合には、雄では 1000 ppm(65.43 mg/kg/日に相当)以上の用量で、雌では 3000 ppm(214.62 mg/kg/日に相当)以上の用量で、腎臓の平均相対重量が有意に増加した(Stauffer Chem. Company 1980)。雌の F344/N ラットでも、16 週間の強制経口投与試験において、44 mg/kg/日以上で、腎臓の相対重量増加が観察された(NTP 1991, Matthews 1990)。雄の F344/N ラットでは、16 週間の強制経口投与試験において、350 mg/kg/日の群で、腎臓の相対重量が有意に増加し(NTP 1991, Matthews 1990)、66 週間 88 mg/kg/日の投与を受けていた場合は、腎臓の相対および絶対重量の両方が有意に増加した(NTP 1991, Matthews 1993)。これらの腎臓を組織病理学的に検査したところ、リン酸トリス(2-クロロエチル)の 3 ヶ月間混餌投与を 8000 ppm(約 506 mg/kg/日に相当)の濃度で受けていた Sprague-Dawley CD ラットの雄で、腎皮質における再生性過形成の発生率が上昇していた(Stauffer Chem. Company 1980b)。103 週間、44 もしくは 88 mg/kg/日の投与を受けていた F344/N ラットの雌雄では、腎尿細管上皮の単巢性または多巢性の過形成が顕著に増高していた(NTP 1991; Matthews 1993)。B6C3F1 マウスでは、リン酸トリス(2-クロロエチル)の反復強制経口投与を 16 週間受けていた雄において、175 mg/kg/日以上で、腎臓の絶対重量の低下が認め

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

られた。同期間 700 mg/kg/日の投与を受けていた B6C3F1 ラットでは、雌雄両方において、腎臓の近位尿細管およびヘンレ係蹄の上皮に、軽度の巨細胞化が観察された (NTP 1991, Matthews 1990)。長期一生涯曝露の場合は、175 mg/kg/日以上以上の投与を受けていた雌雄の B6C3F1 マウスにおいて、腎尿細管上皮細胞に核の肥大が見られ、これは、350 mg/kg/日群では約 80%のマウスに認められた (NTP 1991; Matthews 1993)。リン酸トリス (2-クロロエチル) の発がん性を判定するためにマウスで実施された試験では、腎臓組織に、形態学的に大きな変化、すなわち、核肥大を伴った尿細管上皮の過形成および肥厚が認められた。この様な腎臓の所見は、リン酸トリス (2-クロロエチル) の 18 ヶ月間混餌投与を 12 mg/kg/日以上以上の用量で受けいていた Slc:ddY マウスでも、雌雄両方で認められたが、同時対照群についての報告が伴われていなかった。1500 mg/kg/日の用量で投与を受けていたマウスでは、さらに、尿細管上皮の壊死や間質の線維化が認められた (Takada et al., 1989)。

### 肝臓における影響:

350 mg/kg/日の用量で 16 週間の強制経口投与を受けた F344/N ラットの雌では、肝臓の相対および絶対重量が、対照群と比較して、有意に増加 (17%) していた (Matthews 1990; NTP 1991)。肝臓の相対重量の増加は、同用量の投与を 16 週間受けた F344/N ラットの雄や、44 mg/kg/日群の雌でもそれぞれ認められた。88 mg/kg/日の投与を受けていた F344/N ラットの雄では、66 週の時点で、肝臓の絶対および相対平均重量が有意に増加していた (Matthews 1990, NTP 1991)。3000 ppm 以上の濃度で 3 ヶ月間混餌投与を受けていた雌雄の Sprague-Dawley CD ラットでは (用量は、雄で 191.87 mg/kg/日以上、雌で 214.62 mg/kg/日以上)、肝臓の平均相対重量の有意な増加が示された (Stauffer Chem. Company 1980)。B6C3F1 マウスでは、175~700 mg/kg/日の投与を受けていた雌や、700 mg/kg/日の投与を受けていた雄において、肝臓の平均絶対重量が有意に ( $p \leq 0.01$ ) 増加した (Matthews 1990, NTP 1991)。Slc:ddY マウスを用いた試験では、全ての用量群 (12 mg/kg/日以上) において、肝臓の形態学的変化、すなわち、限局性壊死、肝細胞の空胞化および髓外造血像が認められた。一方、対照群では、この様な所見は認められなかった。

リン酸トリス (2-クロロエチル) の投与を受けた F344/N ラットおよび B6C3F1 マウスで観察された、肝臓への影響は、臓器重量の増加に限られ、補完的な所見 (形態学的変化や臨床生化学的変化) を伴っていない。したがって、臓器重量の変化は、毒性学的に有害な影響とはみなされなかった。

実験動物における、吸入による反復投与毒性試験データは、得られていない。経皮投与についても、現行の反復投与毒性試験プロトコルの要項に適合した毒性試験の報告は見当たらない。4.1.2.8 項に、Swiss マウスを用いてイニシエーション/プロモーション活性を調べ

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

た短期および長期経皮試験について記載したが、それらからは、確固たる結論を導くことはできなかった。

### 無/最小毒性量(N/LOAEL)

提示されたデータは、指令 67/548/EEC の付属書 VIIA に規定された基本要項を満足していると考えられる。得られたデータから、反復経口毒性に関する NOAEL<sub>sys</sub> を導出することができる。反復吸入および経皮曝露による毒性を評価するのに有用な試験データは、得られていない。

### 経口曝露:

実験動物においては、反復経口投与により有害影響を受ける主要な器官は、中枢神経系、腎臓および肝臓である。重要な毒性影響は、脳および腎臓で認められた。

動物の経口投与試験から導出された、リン酸トリス(2-クロロエチル)による脳や腎臓への影響に関する NOAEL<sub>sys</sub> 値を、様々な曝露期間について、Table 4.12 にまとめた。

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

Table 4.12

Summary table: NOAEL<sub>sys</sub> values for relevant non-neoplastic effects in the brain and kidneys derived from animal studies to tris(2-chlorethyl)phosphate

Species, strain (m/f)	Exposure route	Exposure duration	NOAEL <sub>sys</sub> for relevant non-neoplastic effects	Reference
F344/N rat (5m/5f)	Oral by gavage	16 days 5 d/wk	m/f: 350 mg/kg bw/d m: for brain and kidney effects	NTP 1991 Matthews 1990
F344/N rat (10m/10f)	Oral by gavage	16 weeks 5 d/wk	f: 88 mg/kg bw/d m: 175 mg/kg bw/d for neurotoxicological effects	NTP 1991 Matthews 1990
Sprague-Dawley CD rat (10m/10f)	Oral in feed	3 months daily	m/f: 3000 ppm (m: 192 mg/kg bw/d; f: 215 mg/kg bw/d) for kidney effects	Stauffer Chemical Company 1980b
F344/N rat (60m/60f)	Oral by gavage	103 weeks 5 d/wk	m/f: 44 mg/kg bw/d for brain lesions m/f: not established for kidney effects	NTP 1991 Matthews 1993
B6C3F1 mouse (5m/5f)	Oral by gavage	16 days 5 d/wk	m/f: 175 mg/kg bw/d for convulsion and ataxia	NTP 1991 Matthews 1990
B6C3F1 mouse (10m/10f)	Oral by gavage	16 weeks 5 d/wk	m/f: 350 mg/kg bw/d for kidney effects	NTP 1991 Matthews 1990
B6C3F1 mouse (10m/10f)	Oral by gavage	66 weeks 5 d/wk	m/f: 350 mg/kg bw/d for brain lesions m/f: 175 mg/kg bw/d for kidney lesions	NTP 1991 Matthews 1993
B6C3F1 mouse (60m/60f)	Oral by gavage	103 weeks 5 d/wk	m/f: 350 mg/kg bw/d for brain lesions m/f: not established for kidney effects	NTP 1991 Matthews 1993
Slc:ddY mice (50m/50f)	Oral in feed	18 months, daily	m/f: not established for kidney effects	Takada et al. 1989

m: male; f: female; NOAEL<sub>sys</sub>: No observed adverse effect level for systemic effects

脳への影響に関する NOAEL の導出:

リン酸トリス(2-クロロエチル)は、F344/N ラットの雌において脳病変を生じさせ、これより程度は低いものの雄ラットでも脳病変を生じさせたが、マウスでは生じさせなかった(NTP 1991, Matthews 1990)。脳病変は、ガイドラインに準拠して行われた、投与期間を異にする複数の試験で認められた。F344/N ラットの雌では、神経毒性は、16 週間にわたり、リン酸トリス(2-クロロエチル)が 175 mg/kg/日以上用量で投与された場合に誘発されており、88 mg/kg/日の用量では、脳病変が無かったことが判明している。しかし、リン酸トリス(2-クロロエチル)の用量が 88 mg/kg/日であっても、生涯曝露の場合には、雌ラットの

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

脳に、退行性病変が生じた。F344/N ラットの雄では、350 mg/kg/日で 16 週間投与された場合に同様の病変が認められており、88 mg/kg/日で 103 週間投与された場合にも、非常に少数ではあるが、同様の病変が認められた。88 mg/kg/日を投与された F344/N ラットの雄における脳の病変については、発生率や重症度が有意に増高したわけではなかった。しかし、リン酸トリス(2-クロロエチル)の投与に関連した増高を示していることから、毒性学的に意義のあるものと見なされた。したがって、F344/N ラットの雌雄における無毒性量 (NOAEL) は、その 103 週間(強制経口投与)試験に基づいて、44 mg/kg/日と導出された (NTP 1991, Matthews 1993)。マウスは、脳への影響に関して、ラットよりも、リン酸トリス(2-クロロエチル)に対する感受性が低かった。B6C3F1 マウスに最高 350 mg/kg/日の用量で 103 週間投与した場合でも、対照群との比較において、リン酸トリス(2-クロロエチル)に関連した脳の顕微鏡学的変化は認められなかった。したがって、雌雄の B6C3F1 マウスにおける、脳病変に関する NOAEL は、350 mg/kg/日である (NTP 1991, Matthews 1993)。白色レグホンの雌においては、非常に高用量(14200 mg/kg)のリン酸トリス(2-クロロエチル)を投与した場合でも、行動学的影響や神経毒性を示唆する神経障害は引き起こされなかった (Stauffer Chem. Company 1979)。

### 脳への有害影響(海馬領域):

103 週間(強制)経口投与/F344/N ラット

NOAEL<sub>sys</sub> 44 mg/kg/日 (NTP 1991; Matthews 1993)

103 週間(強制)経口投与/B6C3F1 マウス

NOAEL<sub>sys</sub> 350 mg/kg/日 (NTP 1991; Matthews 1993)

### 腎臓への影響に関する N/LOAEL の導出:

腎臓への影響は、雌雄のラットやマウスを用いた、投与期間が異なる複数の試験において観察されている。それらは、ガイドラインに準拠した試験、あるいは許容範囲内の制約はあるもののガイドライン準拠と同等の試験であった。腎臓組織の形態学的変化は、特に発がん現象との関係の観点から、ラットやマウスのリン酸トリス(2-クロロエチル)への反復投与における、最も鋭敏な評価項目と思われた。慢性毒性試験では、これらの腎臓所見に関して、F344/N ラットや B6C3F1 マウスの雌雄における NOAEL を導出することはできなかった。F344/N ラットでは、腎臓における変化のほとんどは、44 mg/kg/日以上リン酸トリス(2-クロロエチル)を投与した場合に現れた。この用量で、16 週間の反復強制経口を受けた F344/N ラットの雌では、投与腎臓の相対重量の増加が観察され、一生涯(強制)経口投与を受けた F344/N ラットの雌雄では、腎尿細管上皮の限局的な過形成が認められた (NTP 1991, Matthews 1990)。Sprague-Dawley CD ラットに 3 ヶ月間混餌投与を行った試験では、腎臓の相対重量の有意な増加が、雄では 1000 ppm(約 65 mg/kg/日)以上の用量で、雌

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

では 3000 ppm(約 215 mg/kg/日)以上の用量で認められた。8000 ppm(約 506 mg/kg/日)のリン酸トリス(2-クロロエチル)を投与された雄ラットでは、腎皮質における再生性過形成の発生率上昇が観察され、そして、Sprague-Dawley CD ラットの雌雄における腎臓への影響に関する NOAEL は、3000 ppm(雄で 192 mg/kg/日、雌で 215 mg/kg/日に相当)であった (Stauffer Chemical Company 1980b)。B6C3F1 マウスを用いて適切に実施された 16 週間強制経口投与試験からは、雌雄のマウスの NOAEL として、350 mg/kg/日という値が導出された (NTP 1991, Matthews 1990)。しかし、B6C3F1 マウスに 175 もしくは 350 mg/kg/日のリン酸トリス(2-クロロエチル)を長期間投与した場合には、腎尿細管上皮細胞の巨核化が、低用量側の 175 mg/kg/日群の雌雄で認められ、350 mg/kg/日群では、約 80%の雌雄に同所見が認められた。この 2 年間試験では、雌雄の B6C3F1 マウスにおける、腎病変に関する NOAEL を確定することができず、したがって、175 mg/kg/日は、雌雄の B6C3F1 マウスにおける、腎病変における LOAEL と考えられる (NTP 1991, Matthews 1993)。核の肥大を伴った、尿細管上皮の過形成や肥厚といった腎病変が、12 mg/kg/日以上リン酸トリス(2-クロロエチル)を 18 ヶ月間混餌投与された、雌雄 Slc:ddY のマウスにおいて認められている。残念ながら、投与を受けた群における、腎臓でのそれら顕微鏡学的所見の発生率については、報告されていない。Slc:ddY 系マウスについては、公表された背景対照データが見当たらない。しかし、Slc:ddY 系マウスを用い、1,2,4-トリクロロベンゼンを経皮投与して、慢性毒性や発がん性を調べた 2 年間試験が行われており (Yamamoto, 1982)、そこから同時対照群のデータが得られている。その同時対照群では、雌雄 50 匹ずつに、アセトンのみの皮膚への塗布が実施された。腎尿細管上皮の再生性過形成を伴う細胞壊死、もしくは核肥大は、この試験の同時対照群では認められなかった。腎臓における主たる顕微鏡学的変化としては、炎症やアミロイド症が認められた。発生率は、以下の通りであった。炎症は、雄で 12/50 匹、雌で 2/50 匹。アミロイド症は、雄で 4/50 匹、雌で 5/50 匹。

また、上述の 18 ヶ月間混餌投与試験では、その系統のマウスの MTD(最大耐量: maximum tolerated dose)を明らかに超えている最高用量の 1500 mg/kg/日のみにおいて、雌雄のマウスでの腎臓組織の形態学的変化が認められたというわけではない。投与を受けた全ての群において、再生性過形成を伴う細胞壊死へとつながる細胞毒性の徴候が認められた。それらは、核肥大を伴う尿細管上皮の過形成や肥厚であり、異常分裂像、変性および壊死が、いくつも認められた。投与を受けた群の腎臓におけるこれらの顕微鏡学的所見については、定量的情報は報告されていないが、前述の同時対照群でその様な腎臓所見が認められていないことから、毒性学的に意義のある影響とみなされる。したがって、雌雄の Slc:ddY マウスにおける、腎臓病変に関する LOAEL は、12 mg/kg/日であると考えられる (Takada et al., 1989)。

## 腎臓病変に関して:

103 週間(強制)経口投与/F344/N ラット

LOAEL<sub>sys</sub> 44 mg/kg/日 (NTP 1991; Matthews 1993)

3 カ月間経口投与(混餌)/雄 Sprague-Dawley CD ラット

NOAEL<sub>sys</sub> 3000 ppm (192 mg/kg/日) (Stauffer Company 1980b)

103 週間(強制)経口投与/B6C3F1 マウス

LOAEL<sub>sys</sub> 175 mg/kg/日 (NTP 1991; Matthews 1993)

18 カ月間経口投与(混餌)/Slc:ddY マウス

LOAEL<sub>sys</sub> 12 mg/kg/日 (Takada et al., 1989)

ラットやマウスで実施された、情報が入手できた試験のほとんどは、肝臓における影響についても報告している。F344/N ラットや B6C3F1 マウスで観察された肝臓での変化は、臓器重量の増加に限られ、形態学的な他の変化により補完されるものではなかった。したがって、臓器重量におけるこれらの知見は、毒性学的に意義のあるものとはみなされなかった。一方で、Slc:ddY マウスでは、投与を受けた全ての群(12 mg/kg/日以上)について、肝臓の形態学的変化が報告されている。肝細胞の巣状壊死や空胞化、および髄外造血が認められた。ただし、これらの変化は、対照群においても認められた。

結論としては、提示した試験は全て、十分な品質のデータを提供するものと見なされた。脳における退行性病変は、ラットにおいて、用量関連性に発現し、さらに、その出現頻度、重症度や規模は、明確な時間-反応関係を示した。雄ラットは、脳への有害影響に対して、雌ラットよりも感受性が低かった。全身影響/脳への影響に関する NOAEL の、最も低い値は、44~88/175 mg/kg/日の範囲で、いずれもラットを用いた亜慢性および慢性試験から導出されている。マウスは、脳への影響に関しては、ラットよりもリン酸トリス(2-クロロエチル)に対する感受性が低かった。雌雄のマウスにおける、脳への影響に関する NOAEL は、175~350 mg/kg/日の範囲の値で確定された。

ただし、最も鋭敏な NOAEL/LOAEL は、腎病変に関するものである。なぜならば、腎臓への影響は、リン酸トリス(2-クロロエチル)への反復曝露において、最も感受性の高い評価項目と思われ、また、ラットとマウスはどちらも、リン酸トリス(2-クロロエチル)に対する感受性が最も高い動物種であるためである。ラットやマウスで観察された腎臓への影響は、用量および曝露時間に関連して、発生率や重症度が変動した。腎臓の形態学的変化は、Sprague-Dawley CD ラットと F344/N ラット、および B6C3F1 マウスと Slc:ddY マウスで認められた。認められた形態学的変化は、過形成、および、細胞壊死の徴候を伴った、腎臓の皮質尿細管上皮の核肥大であった。どちらの系統のラットにも、どちらの系統のマウスにも、これと同様の腎病変が観察された。亜慢性毒性試験においてのみ、腎病変に関する

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

NOAEL を導出することができ、Sprague-Dawley CD ラットの雌雄では、3000 ppm(雄で 192 mg/kg/日、雌で 215 mg/kg/日に相当) (Stauffer Chemical Company 1980b)、B6C3F1 マウスでは、350 mg/kg/日 (NTP 1991, Matthews 1990)であった。しかし、雌雄の F344/N ラットでは、リン酸トリス(2-クロロエチル)に 44 mg/kg/日以上で曝露を行ったが、腎臓組織の変化に関する NOAEL を導出することはできなかった。また、B6C3F1 マウスを 175 mg/kg/日で長期一生曝露させた場合 (NTP 1991, Matthews 1993)や、Slc:ddY マウスに 18 ヶ月間 12 mg/kg/日以上で混餌投与した場合 (Takada et al. 1989)でも、NOAEL の導出には至らなかった。Slc:ddY マウスを用いたこの試験は、発がん性試験であるが(4.1.2.8.1 項参照)、いくつかの点で、公のガイドラインと相違した所がある。しかし、記載された手法は、許容範囲内の制約はあるもののガイドラインと同等であり、一般的に容認される科学水準に沿って実施されており、この試験は、証拠として認められる。したがって、Slc:ddY マウスにおいて得られた、腎病変に関する最も低い LOAEL 値である 12 mg/kg/日が、リスクの総合評価における基準として選択されることになる。

リン酸トリス(2-クロロエチル)への反復曝露による、局所的影響に関するデータは、得られていない。

### 反復投与試験に関する結論および分類:

得られたデータに基づくと、指令 67/548/EEC に示された基準に沿って、リン酸トリス(2-クロロエチル)を、有害物質に分類する必要はなく、Xn, R 48/22(有害：飲み込んで長期曝露されると健康に重大な影響を生じる危険有り)と表示する必要もない。

#### 4.1.2.7 変異原性

##### 4.1.2.7.1 *In vitro* 試験

##### 細菌を用いる試験 (Table 4.13)

細菌を用いる遺伝子突然変異試験において、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の試験株 TA 100、TA 1535 および TA 1538 では、約 10,000 µg/plate の濃度まで、試験株 TA 98、TA 1537 では、3333 µg/plate の濃度まで、陰性結果が得られている (Stauffer Chemical Company 1976; Prival et al. 1977; Haworth et al. 1983; NTP 1991)。Nakamura et al.(1979)だけが、1 試験株(TA 1535)について、S-9 mix 存在下で 280 µg/plate から 2800 µg/plate の濃度での陽性結果を報告しており、また、これより高濃度では、強い細胞毒性影響が現れたというこ

とである。

#### 哺乳類細胞を用いる試験(Tables 4.14-4.17)

マウスリンパ腫細胞を用いた哺乳類細胞の突然変異試験では、S-9 mix の存在下でも非存在下でも、細胞毒性が現れる 1.07  $\mu\text{L}/\text{mL}$  の濃度まで、陰性という結果が得られている (Stauffer Chem. 1978)。V79 細胞を用いた遺伝子突然変異試験が、S-9 mix 非存在下においてのみ行われており、2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度まで陰性であったが、細胞毒性に関する情報は示されていない (Sala et al. 1982)。

Chinese ハムスター卵巣細胞を用いた染色体異常試験では、S-9 mix の存在下でも非存在下でも、1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度まで、陰性結果が得られている。細胞毒性影響に関する情報は示されていない (Galloway et al. 1987: NTP 1991 でも引用)。

V79 細胞を用いた姉妹染色分体交換 (SCE) 試験 (Sala et al., 1982) では、S-9 mix 存在下の場合は試験した最高濃度の 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で、S-9 mix 非存在下の場合は 700~3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で、わずかに陽性を示した (1 細胞中の SCE の頻度は、S-9 mix 存在下では、対照で 7.1 であったのに対し 9.7、S-9 mix 非存在下では、対照で 5.5 であったのに対し最高 9.0)。S-9 mix 非存在下では、最高用量において、非常に強い細胞毒性が示された。別の SCE 試験がやはり S-9 mix の存在下および非存在下で行われているが、陽性とも陰性ともつかない結果が出ている。この試験では、2 回の試行が実施されたが、そのうちの一方だけで、S-9 mix の存在下、500~1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において、SCE の頻度が軽度に上昇した。S-9 mix の非存在下では、最高 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度まで陰性であった (Galloway et al. 1987)。細胞毒性影響に関する情報は示されていない。

ヒト WI-38 細胞を用いた不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 (液体シンチレーション計数) では、S-9 mix 存在下の場合、最高 0.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  の濃度まで、S-9 mix 非存在下の場合、最高 0.1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  の濃度まで、陰性であった (Stauffer Chem. 1979)。細胞毒性影響に関する情報は示されていない。

#### **4.1.2.7.2 *In vivo* 試験**

##### げっ歯類の骨髄における小核試験 (Table 4.18)

2 件の *in vivo* 小核試験が実施されており、最大耐量に相当する量を最高として、被験物質をマウスに経口投与もしくは腹腔内投与し、骨髄細胞を観察したが、結果は陰性であった。

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

Otto(1984)は、1000 mg/kg の経口投与により実施し、陰性の知見を報告している。この用量では、臨床症状や致死影響が生じている。局所毒性に関するデータ(多染性赤血球/正染性赤血球比 = P/N 比など)は、報告されていない。IRI〔Inveresk Research International : インバレスクリサーチインターナショナル(英国)〕による試験(1993)では、最高 700 mg/kg の用量が腹腔内投与され、陰性の結果が得られた。毒性徴候が、350 mg/kg 以上の用量で認められた。試験における最高用量の 700 mg/kg では、致死影響が引き起こされ、48 時間で採取した試料において、細胞毒性影響(P/N 比減少)も認められた。

また、Sala et al. (1982) は、Chinese ハムスターを用いた *in vivo* 小核試験について報告している。最高 250 mg/kg の用量で単回腹腔内投与を行ったところ、125 および 250 mg/kg において、小核含有多染性赤血球の頻度は、自然発現頻度の約 2 倍であった。小核含有細胞は軽微な増加を示したが、著者らは、総合的な結果としては不明瞭であると判定した。著者らはまた、同じもしくは異なる動物種におけるデータがさらに必要であると結論付けている。

### キイロショウジョウバエ(Table 4.19)

Vogel and Nirvard(1991)は、ショウジョウバエの体細胞における有糸分裂組み換え試験(最高濃度 40 mmol/L の被験物質溶液を試料の表面に滴下)を行い、陰性の結果を得ている。

#### 4.1.2.7.3 結論

全般的に、細菌を用いた遺伝子突然変異試験は陰性であった。哺乳類の細胞を用いた *in vitro* の遺伝毒性試験が、マウスリンフォーマ試験や UDS 試験により行われているが、遺伝子や染色体の突然変異は陰性であった。*In vitro* の SCE 試験では、非常に弱い影響が見られたが、変異原性との関連性は無いものと考えられた。*In vivo* のマウス小核試験 2 件では、最大耐量まで投与しても陰性であったが、ハムスターを用いた別の 1 件では妥当性が疑わしい陽性結果が得られた。ショウジョウバエでの試験も陰性であった。これらより、リン酸トリス(2-クロロエチル)の変異原性の根拠は得られていないと結論付けられる。

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

Table 4.13 *In vitro* tests: Bacterial genotoxicity

Test system	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix				
Gene mutation; TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538	0.001 - 1.0 µl/plate  (1.0 – 1000 µg/plate)	0.001 - 1.0 µl/plate  (1.0 – 1000 µg/plate)	negative	no toxic effects	plate incorporation method  purity: no data	Stauffer Chemical Company, 1976
Gene mutation; TA 100, TA 1535 TA 1538	1.0 – 10 µl/plate  (1000 - 10'000 µg/plate)	1.0 – 10 µl/plate  (1000 - 10'000 µg/plate)	negative	no toxic effects	plate incorporation method  purity: no data	Prival et al., 1977
Gene mutation;  TA 98, TA 100,  TA 1535, TA	33 – 3333 µg/plate	33 – 3333 µg/plate	negative	with and without S-9 mix at the highest tested dose	preincubation method  purity: 99.5 %	Haworth et al., 1983
Gene mutation;  TA 98, TA 100, TA 1537, TA 1538	330 – 3330 µg/plate	33 – 3333 µg/plate	negative	with and without S-9 mix at the highest tested dose	preincubation method  purity: 98.0 %	NTP, 1991
Gene mutation;  TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538	1.0 – 30 µmol/plate  (285.5 - 8565 µg/plate)	1.0 – 30 µmol/plate  (285.5 - 8565 µg/plate)	positive	with and without S-9 mix at the highest tested dose	strongly positive only in TA 1535 from 1.0 µmol/plate up to 10 µmol/plate (higher doses were strongly toxic); dose-dependent effect  purity: no data	Nakamura et al., 1979

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

Table 4.14 *In vitro* tests: Mammalian cell gene mutations or Mouse-lymphoma-assay

Test system	Concentration range		Result	Remarks	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix			
mouse lymphoma assay; L5178Y cells; tk locus	0,09 - 1.07 µl/ml (90 – 1070 µg/ml)	0,09 - 1.07 µl/ml (90 – 1070 µg/ml)	negative	toxicity: with S-9 mix clear effect at the highest tested dose; without S-9 mix clear effects from 0.8 µl/ml upwards  purity: no data	Stauffer Chemical Company, 1978
HPRT locus; V79 cells	no tested	500 – 2000 µg/ml	negative	no information on toxicity  purity: substance was purchased from Hoechst	Sala et al., 1982

Table 4.15 *In vitro* tests: Chromosomal aberrations

Test system	Concentration range		Result	Remarks	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix			
chromosomal aberrations; CHO cells	160 – 1600 µg/ml	160 - 1600 µg/ml	negative	treatment / sampling time:  2/14 h (with S-9 mix) and 12/14 h (without S-9 mix)  no information on toxicity  purity: 98 %	Galloway et al., 1987 (also cited in NTP, 1991)

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

Table 4.16 *In vitro* tests: sister chromatid exchanges (SCE)

Test system	Concentration range		Result	Remarks	Reference																						
	with S-9 mix	without S-9 mix																									
V79 cells	490 – 700 µg/ml	343 – 3000 µg/ml	positive	<p>marginally positive with and without S-9 mix:</p> <p>1. <u>experiment/without S-9 mix</u></p> <p>dose SCE/cell (µg/ml)</p> <table> <tr><td>neg.co.</td><td>5.6</td></tr> <tr><td>343</td><td>6.8</td></tr> <tr><td>490</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>700</td><td>8.2</td></tr> <tr><td>1000</td><td>7.4</td></tr> </table> <p>1. <u>experiment/with S-9 mix</u></p> <p>dose SCE/cell (µg/ml)</p> <table> <tr><td>neg.co.</td><td>7.1</td></tr> <tr><td>490</td><td>8.5</td></tr> <tr><td>700</td><td>9.7</td></tr> </table> <p>2. <u>experiment/without S-9 mix</u></p> <p>dose SCE/cell (µg/ml)</p> <table> <tr><td>neg.co.</td><td>4.6</td></tr> <tr><td>2000</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>3000</td><td>9.0</td></tr> </table> <p>with and without S-9 mix no positive controls</p> <p>without S-9 mix strongly toxic at the highest tested dose</p> <p>purity: substance was purchased from Hoechst</p>	neg.co.	5.6	343	6.8	490	7.0	700	8.2	1000	7.4	neg.co.	7.1	490	8.5	700	9.7	neg.co.	4.6	2000	7.0	3000	9.0	Sala et al., 1982
neg.co.	5.6																										
343	6.8																										
490	7.0																										
700	8.2																										
1000	7.4																										
neg.co.	7.1																										
490	8.5																										
700	9.7																										
neg.co.	4.6																										
2000	7.0																										
3000	9.0																										

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

CHO cells	160 – 1600 µg/ml	5.0 – 160 µg/ml	equivocal	<p>slight increase of SCE in one out of two experiments with S-9 mix; negative without S-9 mix</p> <p>1. <u>experiment/with S-9 mix</u> dose SCE/cell (µg/ml)</p> <table> <tr><td>neg.co.</td><td>8.3</td></tr> <tr><td>160</td><td>9.2</td></tr> <tr><td>500</td><td>10.1</td></tr> <tr><td>1600</td><td>9.9</td></tr> <tr><td>po.co.</td><td>22.6</td></tr> </table> <p>2. <u>experiment/with S-9 mix</u> dose SCE/cell (µg/ml)</p> <table> <tr><td>neg.co.</td><td>9.2</td></tr> <tr><td>1200</td><td>9.3</td></tr> <tr><td>1400</td><td>10.1</td></tr> <tr><td>1600</td><td>10.6</td></tr> <tr><td>po.co.</td><td>21.2</td></tr> </table> <p>no informations on toxicity</p> <p>purity: substance was purchased from NTP chemical repository</p>	neg.co.	8.3	160	9.2	500	10.1	1600	9.9	po.co.	22.6	neg.co.	9.2	1200	9.3	1400	10.1	1600	10.6	po.co.	21.2	Galloway et al., 1987 (also cited in NTP, 1991)
neg.co.	8.3																								
160	9.2																								
500	10.1																								
1600	9.9																								
po.co.	22.6																								
neg.co.	9.2																								
1200	9.3																								
1400	10.1																								
1600	10.6																								
po.co.	21.2																								

Table 4.17 *In vitro* tests: unscheduled DNA syntheses (UDS)

Test system	Concentration range		Result	Remarks	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix			
human WI-38 cells	0.0005 - 0.5 µl/ml  (0.5 - 500 µg/ml)	0.001 - 0.1 µl/ml  (1.0 - 100 µg/ml)	negative	liquid scintillation counting  toxicity: no data  purity: no data	Stauffer Chemical Company, 1979

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

Table 4.18 In vivo tests: Rodent bone marrow tests with mice

Test system	Doses (mg/kg bw)	Expos. regimen	Sampl. Times	Result	Local cytotoxicity	General toxicity	Remarks	Reference
CD-1 mice; bone marrow erythrocytes	175 - 700	1 x i.p.	16, 24 and 48 h	negative	decreased P/N ratio at highest tested dose at 48 h - sampling	lethal effects at the highest tested dose  clinical signs from 350 mg/kg upwards	highest tested dose corresponds to the maximum tolerated dose  5 males and 5 females per group  purity: 99.2 %	IRI, 1993
NMRI mice; bone marrow erythrocytes	1000	1 x p.o.	24, 48 and 72 h	negative	no data	toxic signs  lethal effects (3/30)	tested dose corresponds to the maximum tolerated dose  5 males and 5 females per group  purity: 99.0 %	Otto, 1984
Chinese hamsters; bone marrow erythrocytes	62.5 - 250	1 x i.p.	24 h	equivocal	no data	no data	although a slight increase of micronucleated cells was observed the overall result was characterized as questionable by the authors  dose MN cells (%) neg. co. 0.35 62.5 0.52 125 0.66 250 0.70 po.co. 7.06  2 males and 2 females per group  purity: no data	Sala et al., 1982

Table 4.19 *In vivo* tests: Tests with *Drosophila melanogaster*

Test system	Exposure	Result	Remarks	Reference
mitotic recombination	feeding: 2.5 - 40 mmol/l were dropped on the surface of the food	negative	purity - the only information: substance was commercially available	Vogel and Nirvard, 1991

#### 4.1.2.8 発がん性

現行の規制基準に沿って実施された、ラットやマウスへの強制経口投与による発がん性試験の情報が得られている。これらの試験から、リン酸トリス(2-クロロエチル)がそれら 2 種類の動物において発がん性を示すことが、明確に示されている。リン酸トリス(2-クロロエチル)は、ラットやマウスの様々な器官部位において、良性および悪性腫瘍を誘発する。

##### 4.1.2.8.1 動物における試験

###### *In vivo* 試験

- 経口

###### **強制経口投与試験(ラットおよびマウス)**

###### ラット

各群雌雄 60 匹ずつの F344/N ラットに、コーン油を媒体としたリン酸トリス(2-クロロエチル)を、1 週間に 5 日、最長 103 週間強制経口投与した(NTP 1991; Matthews 1993)。各群から雌雄 10 匹ずつを、第 66 週における中間評価に供した(剖検、血液学および臨床生化学的検査を実施)。

雌雄のラットは共に、0、44 ないしは 88 mg/kg/日のリン酸トリス(2-クロロエチル)(純度 98%)を投与された。中間屠殺(66 週)時および 103 週時における、非腫瘍性変化に関する結果については、4.1.2.6 項に詳述した。

生残率は、対照群と比べ、88 mg/kg/日の投与を受けていた雌ラットで減少し、それより程度は低い、雄ラットでも減少した。雌におけるこの生残率の減少の一部分は、リン酸トリス(2-クロロエチル)の神経毒性や、単核細胞白血病の発生率がわずかに増加したことに

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

よるものであった。生残ラットの最終的な平均体重は、対照群と同等であった。リン酸トリス(2-クロロエチル)による主要な影響は、投与を受けたラットの腎臓と脳に現れた(脳病変については 4.1.2.6 項を参照)。リン酸トリス(2-クロロエチル)をラットに最長 2 年間経口投与した場合には、腎臓における腫瘍性病変の発生率が顕著に増加し、それらは主として尿細管の増殖性病変や腺腫であった。これらの病変は、雌雄両方において、用量関連的な発生率増加を示した。過形成や腺腫は、88 mg/kg/日の投与を受けた雄の 50%近く、44 mg/kg/日の投与を受けた雄の 10%で発生した。雄ラットでは、尿細管の過形成は、対照群で 0/50 匹、低用量群で 2/50 匹、高用量群で 24/50 匹に認められ、尿細管腺腫は、対照群で 1/50 匹、低用量群で 5/50 匹、高用量群で 24/50 匹で認められた。雌ラットでは、これより発生率が低めで、尿細管の過形成は、対照群で 0/50 匹、低用量群で 3/50 匹、高用量群で 16/50 匹に観察され、尿細管腺腫は、対照群で 0/50 匹、低用量群で 2/50 匹、高用量群で 5/50 匹に観察された。88 および 44 mg/kg/日群における腎臓の腺腫の発生率は、この病変に関する NTP の背景対照値の範囲を超える高値であった。1989 年までに行われた過去の 2 年間試験から、対照群における(コーン油を強制経口投与)腎尿細管腺腫の背景発生率を調べると、雄では 0.2% (0~2%の範囲)、雌では 0.1% (0~2%の範囲)である(NTP 1991; Matthews 1993)。別の概説において、NTP が実施した最近の 2 年間発がん性試験についての報告がなされており、溶媒対照群の F344/N ラットにおける腎尿細管腺腫の一般的な平均背景発生率は、同様の範囲であったことが述べられている(Eustis 1994)。1%未満の値も得られている[雄で 0.75% (0~2%の範囲)、雌で 0.19% (0~2%の範囲)]。腎尿細管の増殖性病変の背景発生率は低かった。溶媒を強制経口投与された対照群の F344/N ラットで得られた、腎臓における過形成の背景発生率は、雄で 1.18% (0~6%の範囲)、雌で 0.10% (0~2%の範囲)である(Eustis 1994)。腎尿細管肉腫は、対照群と高用量群の雄でそれぞれ 1 匹ずつ認められた。NTP によれば、溶媒を強制経口投与された F344/N ラットにおける、肉腫の一般的な背景発生率も非常に低く、雄で 4/1,069 匹(0.37%)、雌で 0/1,068 匹(0.00%)であった(Eustis 1994)。したがって、ラットにおいては、腎臓の反応は、過形成と良性腫瘍に絞られる。腎尿細管の腺腫と肉腫は、形態学的に連続したものであり、良性な腫瘍と転移能を備えた腫瘍とを、明確かつ一義的に区別する細胞学的特性は存在しない。腎臓腺腫は、がん発生の初期段階を示すものとみなされる。したがって、リン酸トリス(2-クロロエチル)を強制経口投与された F344/N ラットにおいて、腎尿細管腫瘍の発生率が顕著に増加したことは、発がん性を示す、妥当で明確な根拠となると考えられる。

雌雄のラットにおける甲状腺濾胞細胞腫瘍は、リン酸トリス(2-クロロエチル)投与が関係している可能性がある。甲状腺濾胞細胞腫瘍(腺腫)の発生率は、軽度の上昇を示した(雄ラットでは、対照群が 1/50 匹、低用量群が 2/48 匹、高用量群が 3/50 匹、雌ラットでは、対照群が 0/50 匹、低用量群が 1/50 匹、高用量群が 1/50 匹)。甲状腺濾胞細胞腫瘍の発生は、雌ラットにおいて、有意な増加傾向を示し、濾胞細胞の腺腫と肉腫を合わせた発生率は、88

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

mg/kg/日群の雌では、対照群よりも有意に高かった。濾胞細胞腫瘍の発生率は、88 mg/kg/日群の雄でも増加したが、この増加は統計学的に有意ではなかった。88 mg/kg/日群の雌雄を合わせた濾胞細胞腫瘍の発生率は、1989年までに実施された過去の2年間試験から得られたNTPの背景対照値(雄では51/2,106匹、2.4%、0~10%の範囲、雌では34/2,107匹、1.6%、0~6%の範囲)の上限と同等か、それを上回っている。しかしながら、濾胞細胞の過形成の発生率は低く、リン酸トリス(2-クロロエチル)が甲状腺に影響を及ぼすことを裏付けるに至らない。雄では過形成は認められておらず、雌では投与群の1匹と対照群の1匹が、濾胞細胞の過形成を示したに過ぎない。甲状腺のがんを引き起こす発がん物質の多くは、過形成も引き起こすことから、ラットにおいて過形成が見られなかったことは、濾胞細胞腫瘍がリン酸トリス(2-クロロエチル)に関連して生じたとする考えに反している。したがって、F344/Nラットにおける甲状腺濾胞細胞腫瘍が、リン酸トリス(2-クロロエチル)投与に関連しているかどうかは不明確である。

雌雄のラットにおける単核細胞白血病に、リン酸トリス(2-クロロエチル)投与が関係している可能性がある。単核細胞白血病の発生率は、雄と雌の両方で増加した(雄ラットでは、対照群が5/50匹、低用量群が14/50匹、高用量群は13/50匹、雌ラットでは、対照群が14/50匹、低用量群が16/50匹、高用量群は20/50匹)。雄雌両方で有意な増加傾向が認められ、44もしくは88 mg/kg/日の投与を受けた雄や88 mg/kg/日の投与を受けた雌における発生率は、それぞれ対応する対照群よりも高かった。しかし、これらがリン酸トリス(2-クロロエチル)投与に関連するものかどうかは不明確である。それは、投与群の雌雄で観察された単核細胞白血病の発生頻度が、1989年までに実施された過去の2年間試験から得られた背景対照値(雄で2~44% [訳注: Table 4.20では0~44%と記載]、雌で0~33%の範囲。Table 4.20の最後の表項目を参照)の範囲内に収まっているからである。つまり、雄に関しても雌に関しても、最高発生率は、背景対照範囲内にある。したがって、雌雄のF344/Nラットでみられた白血病のわずかな増加を、リン酸トリス(2-クロロエチル)投与に明らかに関連しているとはみなせない。脳に関しては、良性の顆粒細胞腫瘍が、88 mg/kg/日群の雄で3/50匹に観察されたのみである。雌では、脳における腫瘍発生率に、投与に関連した増加は認められなかった。リン酸トリス(2-クロロエチル)の2年間強制経口投与試験で、F344/Nラットで観察された主要な腫瘍性病変の発生率を、以下のTable 4.20に示した。

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

Table 4.20

Summary table: Incidence of neoplastic lesions in F344/N rats after life-time exposure to tris(2-chloroethyl)phosphate (NTP 1991, Matthews 1993)

Doses	0	44 mg/kg bw/d	88 mg/kg bw/d
<b>Male</b>			
<b>Kidney: Renal tubule</b>			
Hyperplasia, overall rates <sup>a</sup>	0/50 (0%)	2/50 (4%)	24/50 (48%)
Historical control data <sup>b</sup> :	12/1,019 (1.18%); range 0%-6%		
Adenoma, overall rates <sup>a</sup>	1/50 (2%)	5/50 (10%)	24/50 (48%)
Carcinoma, overall rates <sup>a</sup>	1/50 (2%)	0/50 (0%)	1/50 (2%)
Adenoma or Carcinoma, overall rates	2/50 (4%)	5/50 (10%)	25/50 (50%)
Historical control data <sup>b</sup> :	12/2,142 (0.6% ± 0.9%); range 0%-2%		
<b>Thyroid Gland: Follicular Cell</b>			
Hyperplasia, overall rates <sup>a</sup>	0/50 (0%)	0/50 (0%)	0/50 (0%)
Adenoma, overall rates <sup>a</sup>	1/50 (2%)	2/48 (4%)	3/50 (6%)
Carcinoma, overall rates <sup>a</sup>	0/50 (0%)	0/50 (0%)	2/50 (4%)
Adenoma or Carcinoma, overall rates	1/50 (2%)	2/50 (4%)	5/50 (10%)
Historical control data <sup>c</sup> :	51/2,106 (2.4% ± 2.3%); range 0%-10%		
<b>Hematopoietic System: Mononuclear Cell Leukemia</b>			
Overall rates <sup>a</sup>	5/50 (10%)	14/50 (28%)	13/50 (26%)
Historical control data <sup>d</sup> :	321/2,149 (14.9% ± 10.8%); range 0%-44%		
<b>Female</b>			
<b>Kidney: Renal tubule</b>			
Hyperplasia, overall rates <sup>a</sup>	0/50 (0%)	3/50 (6%)	16/50 (32%)
Historical control data <sup>b</sup> :	1/1,019 (0.10%); range 0%-2%		
Adenoma, overall rates <sup>a</sup>	0/50 (0%)	2/50 (4%)	5/50 (10%)
Historical control data <sup>e</sup> :	1/2,144 (0.1% ± 0.3%); range 0%-2%		
<b>Thyroid Gland: Follicular Cell</b>			
Hyperplasia, overall rates <sup>a</sup>	1/50 (2%)	0/50 (0%)	1/50 (2%)
Adenoma, overall rates <sup>a</sup>	0/50 (0%)	1/50 (2%)	1/50 (2%)
Carcinoma, overall rates <sup>a</sup>	0/50 (0%)	2/50 (4%)	3/50 (6%)
Adenoma or Carcinoma, overall rates <sup>a</sup>	0/50 (0%)	3/50 (6%)	4/50 (8%)
Historical control data <sup>f</sup> :	341/2,107 (1.6% ± 1.6%); range 0%-6%		
<b>Hematopoietic System: Mononuclear Cell Leukemia</b>			
Overall rates <sup>a</sup>	14/50 (28%)	16/50 (32%)	20/50 (40%)
Historical control data <sup>g</sup> :	329/2,150 (15.3% ± 10.6%); range 0%-33%		

<sup>a</sup> Number of tumor-bearing animals/number of animals examined at site; <sup>b</sup> 2-year historical incidence for vehicle control groups in NTP corn oil gavage studies (mean ± standard deviation); <sup>c</sup> 2-year historical incidence for vehicle control groups in NTP corn oil gavage studies (mean ± standard deviation); <sup>d</sup> 2-year historical incidence for vehicle control groups in NTP corn oil gavage studies (mean ± standard deviation); <sup>e</sup> 2-year historical incidence for vehicle control groups in NTP corn oil gavage studies (mean ± standard deviation); <sup>f</sup> 2-year historical incidence for vehicle control groups in NTP corn oil gavage studies (mean ± standard deviation); <sup>g</sup> 2-year historical incidence for vehicle control groups in NTP corn oil gavage studies (mean ± standard deviation)

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

全体として、F344/N ラットを用いた標準的な発がん性試験(2年間強制投与試験)からは、リン酸トリス(2-クロロエチル)の投与を受けた雌雄における発がん性を示す明確な証拠が得られ、44 mg/kg/日(最大耐量, MTD 未滿)以上では腎尿細管腺腫の発生率が上昇し、88 mg/kg/日では、発生率は有意に高かった。さらに、腺腫の前兆の可能性のある限局性の腎尿細管過形成も、88 mg/kg/日群の雄の約半数で認められた。

### マウス

ここで取り上げている B6C3F1 マウスの2年間発がん性試験では、各群雌雄 60 匹ずつに、コーン油を媒体として、リン酸トリス(2-クロロエチル)(純度 98%)が、0、175 ないしは 350 mg/kg/日の用量で、週 5 日で最長 103 週間強制経口投与された(NTP 1991, Matthews 1993)。各群から雌雄 10 匹ずつを、第 66 週における中間評価に供した(剖検、血液学のおよび臨床生化学的検査を実施)。中間屠殺(66 週)時および 103 週時における、非腫瘍性変化に関する結果については、4.1.2.6 項に詳述した。

雌雄共に、生残率には、対照群と投与群とで有意差は認められなかった。また、最終平均体重は、どの群も同等であった。リン酸トリス(2-クロロエチル)に関連した最も重要な影響は、腎臓に現れた。最初の診断では、腎臓の左側(縦断面)および右側(横断面)の単独切片が鏡検され、以下の腫瘍性病変が観察された。すなわち、対照群の雄 1 匹、低用量群の雌 1 匹および高用量群の雄 1 匹における尿細管細胞腺腫、および、高用量群の別の雄 1 匹における腺がんである。近位曲尿細管における巨大核細胞(核の肥大)が、350 mg/kg/日の投与を受けていたマウスの約 80%の腎臓に認められ、これより発生率は低いが 175 mg/kg/日の投与を受けていたマウスでも見うけられた。前腫瘍性病変の可能性のある限局性の過形成が、高用量群の雄で認められた。したがって、リン酸トリス(2-クロロエチル)長期一生涯投与により、マウスでも、腎尿細管腫瘍がわずかでも増加し、腎尿細管過形成の発生率が増加する可能性があるという前提に立って、検討を行わなければならない。しかし、動物における発がん性試験の解釈は、旧来よりほぼ例外なく、特定のがんの発生率について、投与を受けた動物と対照群(たいていは背景対照動物群)との間で比較することに依拠している。データの解釈に役立つ別の手法として、腎臓について複数の切片を検査することが考えられた。F344/N ラットにおいてリン酸トリス(2-クロロエチル)に関連した腎臓の腫瘍が発生しており、他の化学物質では腎臓の腫瘍と核肥大との関連性が知られており、そして、背景対照データでは腎臓腫瘍の自然発生率が低いことから、腎臓の切片を対照群と投与群のそれぞれで新たに作製して評価を行い、リン酸トリス(2-クロロエチル)が腎臓に及ぼし得る影響についての明確な指標を得、また、投与群と対照群のさらなる比較データを得ることとした。こうしたことにより、同時対照群とのより厳密な統計学的比較を行うことができる。こうして全てのマウスの腎臓について階段切片の検査が実施され、

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

高用量群の雄 2 匹と低用量群の雌 1 匹で、さらに腺腫が確認された。また、限局性の過形成も、対照群の雄でさらに 1 匹、高用量群の雄でさらに 4 匹(2 匹は第 66 週の中間屠殺群、残りの 2 匹は 2 年間投与群)で見つかった。

このリン酸トリス(2-クロロエチル)2年間強制経口投与試験(NTP 1991, Matthews 1993)で観察された、B6C3F1 マウスにおける主要な腎尿細管細胞病変およびハーダー腺の腫瘍性変化について、以下の表 Table 4.21 に、その発生率を調べた結果を示した。

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

Table 4.21

Summary table: Incidence of selected renal tubule cell lesions and neoplastic findings in the Harderian gland in B6C3F1 mice after life-time exposure to tris(2-chloroethyl)phosphate (NTP 1991, Matthews 1993)

Doses	0	175 mg/kg bw/d	350 mg/kg bw/d
<i>Male</i>			
<b>Kidney: Renal tubule</b>			
Karyomegaly, overall rates <sup>a</sup>	2/50 (4%)	16/50 (32%)	39/50 (78%)
Hyperplasia, original and step sections combined <sup>a</sup>	1/50 (2%)	0/50 (0%)	3/50 (6%)
Adenoma, original and step sections combined <sup>a</sup>	1/50 (2%)	1/50 (2%)	3/50 (6%)
Adenocarcinoma, original and step sections combined <sup>a</sup>	0/50 (0%)	0/50 (0%)	1/50 (2%)
Historical control data <sup>c</sup> :	5/2,183 (0.2%), 0-2% range		
Historical control data <sup>d</sup> :	4/949 (0.42%), 0-2% range		
<i>Female</i>			
<b>Kidney: Renal tubule</b>			
Karyomegaly, overall rates <sup>a</sup>	0/50 (0%)	5/49 (10%)	44/50 (88%)
Hyperplasia, original and step sections combined <sup>a</sup>	0/50 (0%)	1/49 (2%)	2/50 (4%)
Adenoma, original and step sections combined <sup>a,e</sup>	0/50 (0%)	1/49 (2%)	0/50 (0%)
Historical control data <sup>d</sup> :	0/949 (0.00%)		
<b>Harderian Gland</b>			
Hyperplasia, combined <sup>a,b</sup>	1/58 (2%)	4/59 (7%)	2/59 (3%)
Adenoma, combined <sup>a,b</sup>	3/59 (5%)	7/60 (12%)	9/60 (15%)
Adenoma or carcinoma, combined <sup>a,b</sup>	3/59 (5%)	8/60 (13%)	10/60 (17%)
Historical control data <sup>c</sup> :	53/2,193 (2.4%), 0-10% range		
Historical control data <sup>f</sup> :	18/609 (3.0%)		
Historical control data <sup>g</sup> :	(2.8%)		
Historical control data <sup>h</sup> :	(5.1%)		

<sup>a</sup> Number of tumor-bearing animals/number of animals examined at site; <sup>b</sup> combined data from the 66-week interim evaluation and 104-week terminal evaluation; <sup>c</sup> 2-year historical incidence of renal tubule adenomas for vehicle control groups in NTP corn oil gavage studies up to 1989 (NTP 1991); <sup>d</sup> 2-year historical incidence of renal tubule adenomas for vehicle control groups data, analyzed from 16 recent NTP studies (Eustis et al. 1994); <sup>e</sup> 2-year historical incidence of Harderian gland tumors for vehicle control groups in NTP corn oil gavage studies up to 1989 (NTP 1991); <sup>f</sup> Morphology of spontaneous Harderian gland tumors in aged B6C3F1 mice (Ihara M et al., 1994); <sup>g</sup> Spontaneous tumors in aging (C57BL/6N X C3H/HeN)F1 (B6C3F1) mice (Tamano et al., 1988); <sup>h</sup> Frequency and time of spontaneous tumors found in B6C3F1 mice oncogenicity studies over 10 years (Eiben R, 2001)

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

雄の B6C3F1 マウスについて、最初に作製した単独切片の検査結果と後に作製した階段切片の検査結果とを合わせ、腎臓腫瘍の再評価を行ったところ、腎尿細管腫瘍の発生率は、対照群で 1/50 匹(2%)、低用量群で 1/50 匹(2%)、高用量群で 4/50 匹(8%)であることが判明した。雌マウスでは、最初の単独切片の検査では、低用量群に腺腫 1 例が認められていた。雌の階段切片からは、腫瘍の例は確認されなかったが、低用量群の 1 匹および高用量群の 2 匹で過形成が確認された。350 mg/kg/日群の雄マウスの腎臓に観察された腺腫の発生率は、この病変についての NTP の背景対照値の範囲を上回っていた。溶媒(コーン油)を強制経口投与された対照 B6C3F1 マウスでは、腎尿細管腫瘍の発症は稀である。溶媒(コーン油)を強制経口投与された対照 B6C3F1 マウスの雄での腎尿細管腺腫の背景発生率については、この NTP の試験報告の中で、1989 年までの過去の 2 年間試験において、0.2% (5/2183 匹;0~2%の範囲)と述べられている(NTP 1991)。別の報告書では、最近の NTP 試験 16 件の検討が行われており、溶媒(コーン油)を強制経口投与された対照 B6C3F1 マウスにおける腎尿細管腺腫の背景発生率は、雄で 4/979 匹(0.42% ; 0~2%の範囲)、雌で 0/943 匹(0.00%)であった(Eustis et al. 1994)。B6C3F1 マウスの雄における尿細管腺腫の発生率の増加はわずかであり、統計学的に有意ではなかったが、尿細管細胞の過形成と尿細管細胞腫瘍の両方がわずかに増加しており、化学物質に関連して生じた影響であることが示唆される。350 mg/kg/日群の雄における 8%という腎尿細管腫瘍の発生率は、複数の切片での評価が行われた対照溶媒強制経口投与群全体における背景発生率である 0.2~0.42%を上回っている。これらの知見に加えて、腎尿細管過形成の発生率と異型腎尿細管上皮細胞の発現率も、上昇を示していた。核小体は、大きさや数が増大したり、細胞の大きさにくらべて大きすぎたり(核:細胞質比が上昇)していた。対照群に比べ、175 mg/kg/日以上の投与を受けたマウスでは雌雄とも、腎尿細管上皮細胞の核肥大化の発生率が、用量関連性の増加を示していた。リン酸トリス(2-クロロエチル)を投与されたマウスにおいて得られた、切片を作り直して再検査した結果、腎臓の増殖性病変の増加所見、さらには腎尿細管上皮の異型細胞の増加所見に基づき、また、腎尿細管腫瘍が対照の B6C3F1 マウスにおいて稀にしかみられないことから、腎臓に関して得られたデータは、リン酸トリス(2-クロロエチル)が B6C3F1 マウスの雄に対し、発がん性を有することを明確に示す根拠とみなされる。

さらに、B6C3F1 マウスの雌に対する発がん性についても、ハーダー腺腫の発生率のわずかな上昇というかたちで、あいまいな結果が得られている。350 mg/kg/日でリン酸トリス(2-クロロエチル)の投与を受けていた雌では、同時対照群に比べ、ハーダー腺における腫瘍、主として腺腫の発生率が、わずかに上昇していた。腺腫もしくは腺がんの発症は、対照群では 3/50 匹であったのに対し、低用量群では 8/50 匹、高用量群では 7/50 匹であり、加えて、第 66 週で評価に供した 350 mg/kg/日群のマウスの内、3 匹でハーダー腺腫瘍が発生していた。中間屠殺群における発生率と 2 年間投与群における発生率を合わせると、有意な増加傾向が見られ、350 mg/kg/日群での発生率は、対照群よりも有意に高かった(腺腫

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

または腺がん:対照群 3/59 匹、低用量群 8/60 匹、高用量群 10/60 匹)。マウスにおけるハーダー腺腫瘍の自然発生率については、わずかしか報告が得られていない。しかし、全ての系統において、発生率は低い。溶媒(コーン油)を強制経口投与された対照 B6C3F1 マウスの雌でのハーダー腺腫瘍の背景発生率については、この NTP の試験報告の中で、1989 年までの過去の 2 年間試験において、2.4% (53/2193 匹;0~10%の範囲)と述べられている(NTP 1991)。別の調査では、B6C3F1 マウスの生残雌 609 匹の内、18 匹(3%)でハーダー腺腫瘍の自然発生が認められており(Ihara et al., 1994)、また、79~104 週の試験期間中に屠殺した雌では、2.8%という報告がなされている(Tamano et al., 1988)。さらに別の報告では、10 年にわたる発がん試験が検討され、B6C3F1 マウスにおける腫瘍の自然発生率や発生時期が調べられており、ハーダー腺腫は、雌の 5.1%で確認された(Eiben 2001)。この観点からすると、低および高用量群の雌におけるハーダー腺腫瘍の発生率は、同時対照群ならびに背景対照群における値の範囲を上回っていることになる。しかし、雌マウスのハーダー腺では、この所見に呼応するような、リン酸トリス(2-クロロエチル)に関連した過形成の増加は見られなかった。そのため、ハーダー腺腫瘍の発生率のわずかな増加は、リン酸トリス(2-クロロエチル)の発がん性の証拠としては、肯定的でもあり否定的でもあるとみなされた。

総括すると、B6C3F1 マウスにおける標準的な発がん性試験(2 年間強制経口投与試験)において、350 mg/kg/日を投与されていた雄で腎尿細管腫瘍の発生率がわずかに増加し、低用量の 175 mg/kg/日以上を投与されていた雌でハーダー腺腫の発生率が顕著に増加し、リン酸トリス(2-クロロエチル)が発がん性を有するとする証拠がいくつか示された。

### **混餌投与試験(マウス)**

各群雌雄 50 匹ずつの Slc:ddY マウスを、リン酸トリス(2-クロロエチル)(純度 98%)をおよそ 0、0.012、0.06、0.3 ないしは 1.5%(体重を 20 g、1 日あたりの飼料消費量を体重の 10%として計算すると、それぞれ 0、12、60、300、1500 mg/kg/日に相当)含む飼料で、18 ヶ月間飼養した(Takada et al., 1989)。この試験は、いくつかの点で OECD TG 451 で公表されているガイドラインから逸脱している。しかし、一定の制約を加味した場合、そのガイドラインに相応する基礎データが得られる。この試験で検討されているパラメータは、全般的に、その発がん性試験ガイドラインを満たしていない。しかし、報告内容は適切であり、基本的な科学水準を満たしている。提示されたデータをリスク評価のために使用することは、妥当であるとみなされる。

1500 mg/kg/日のリン酸トリス(2-クロロエチル)を混餌投与された雌雄のマウスにおいて、死亡率は明らかに高く(対照群で生残率が約 65%であったのに対し、約 40%の生残率)、ま

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

た、体重増加は、他の群よりも顕著に抑制されていた(対照群の値より約 60%低下)。雌雄のマウスとも、300 mg/kg/日以下の用量群では、生残率に対照群との有意差は認められず、毒性の徴候も全く観察されなかった。飼料消費量については、雌雄のどの群との比較においても相違は認められなかった。血液学的検査では、300 mg/kg/日群の雄で血小板数が有意に増加した以外には、変化は認められなかった。臓器重量の有意な低下が、1500 mg/kg/日群において、雄では心臓と精巣、雌では腎臓で認められた。組織病理学的検査では、核肥大を伴った尿細管上皮の過形成や肥厚が、投与を受けた全ての群の腎臓で観察された。それらの核は多形性を示し、異常分裂像、変性および壊死が散見された。残念ながら、これらの変化の発生率については報告されていない。また、腎臓における嚢胞形成や、壊死および間質の線維化が、1500 mg/kg/日群のマウスでのみ認められた。腎臓におけるこれらの変化は、対照群では報告されていない。

腎臓では、腫瘍発生率が、同時対照群と比べて上昇していた。腎臓でみられた腫瘍は、腫瘍細胞が尿細管へと増殖して異型細胞や分裂性が低下した細胞を伴う腎細胞腺腫、および、腫瘍細胞がかなり増殖して多形性や分裂像を示す腎細胞がんなどであった。腎腺腫の発生率上昇は、300 mg/kg/日以上群の雄と、最高用量群の雌で認められた。腺腫の発生率は、対照群を含め低用量側から、以下の通りであった。雄では、0/50、0/49、0/49、2/47 および 9/50 匹、雌では、0/49、0/49、0/50、0/49 および 2/50 匹。腎臓がんの発生率の上昇については、雄で 2/20、0/49、2/49、3/47、32/50 匹、雌では 1500 mg/kg/日群で 1/50 匹であった以外は 0 匹であった。300 mg/kg/日群の雄で観察された腎腫瘍の数は、同時対照群の値と比べて小さかったが、マウスでは腎腫瘍の自然発生が稀であるという観点から、この所見は意義のあるものとみなされた。マウスに腎腫瘍が発生するのは、一般的に若くとも 12 ヶ月齢であり、大体は 18 ヶ月齢を超えている(Cohen and Friedell, 1982)。腎腺腫や腎がんの自然発生は、BALB/cf/Cd マウスや Swiss マウス系の何種類か(CD-1、CF-1、Swiss-Webster、Swiss-E1)を除き、全ての系統のマウスで稀有である。雄の方が、雌よりも発生率が高い様である。雄マウスで腎皮質に上皮腫瘍が自然発生する頻度について、以下の様に報告されている。B6C3F1 : 0.1%、3/2543 匹(Ward et al., 1979) ; C57BL/6CrSlc : 0.4%、2/463 匹(Nakamura et al., 1992) ; SWR/J : 0.1%、1/671 匹(Rabstein et al., 1973) ; CD1 Ha M/ICR : 0.2%、2/1000 匹(Percy and Jonas, 1971) ; Swiss Webster 由来 SPF 品種 : 1.9%、2/101 匹(Sher, 1974) ; CF-1 Swiss : 3/55 匹、5.4% (Tomatis et al., 1972) ; BALB/cf/Cd : 60~70%、215~251/358 匹(Rabstein and Peters, 1973)。雌ではさらにもっと稀であり、発生率は以下の様に報告されている。B6C3F1 : 0.08%、2/2522 匹(Ward et al., 1979) ; C57BL/6CrSlc : 0.2%、1/463 匹(Nakamura et al., 1992) ; SWR/J : 0(Rabstein et al., 1973) ; CD1 Ha M/ICR : 0(Percy and Jonas, 1971) ; Swiss Webster 由来 SPF 品種 : 0(Sher, 1974) ; CF-1 Swiss : 1/56 匹、1.8% (Tomatis et al., 1972) ; BALB/c : 0.5%、4/791 匹(Frith, 1986) ; BALB/cf/Cd : 40%、— (Claude, 1958)。残念ながら、Slc:ddY 系統のマウスについては、背景対照の公表データが得られて

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

いない。しかし、Slc:ddY 系統のマウスを用い、1,2,4-トリクロロベンゼンを皮膚に適用して慢性毒性や発がん性を調べた 2 年間試験から、同時対照群のデータが得られている (Yamamoto, 1982)。雌雄 50 匹ずつの対照群に対しては、アセトンのみが皮膚適用された。雌雄共に、腎腫瘍の発生率はゼロであった。同時対照群のデータは、マイコトキシンの 1 種であるオクラトキシン A による、ddY マウスにおける腎腫瘍や肝腫瘍の誘発を検討した試験からも得られている (Kanisawa and Shigetoshi, 1978)。対照群の雄 10 匹は、50 週間基礎飼料で飼育されたが、腎細胞腫瘍や尿細管の異型細胞は認められなかった。Slc:ddY マウスを用いた混餌投与試験のデータから、同時対照群での腎腫瘍の発生率は非常に低いことが示されており、また、1,2,4-トリクロロベンゼンの 2 年間試験では、同時対照群における発症率はゼロであり、これは、いくつかの系統のマウスについて文献で報告されている腎腫瘍の自然発生率の低さと整合している。

腫瘍発生率は、雄マウスでは、同時対照群と比べると、肝臓においても上昇していた。腺腫が確認されており、病変では腫瘍細胞が増殖し、周囲の肝細胞を圧迫していた。腫瘍病変は、細胞質が肥大し細胞分裂活性が低く、がんを伴っていた。がんにおいては、腫瘍細胞は、多形性であり、異常な大きさであるかまたは複数の核を有し、2 もしくはそれ以上の細胞層による索状構造を示していた。良性の肝細胞腺腫の発生率は、300 mg/kg/日以上群の雄で有意に上昇していた。さらに、雄においては肝臓がんの発生率も、用量関連的ではなかったが、わずかに上昇していた (低用量側からそれぞれ 1/50、1/49、4/49、2/47、3/50 匹)。肝臓は、変異原物質についても非変異原物質についても、マウスにおいては最も標的部位になりやすい器官である。肝細胞腺腫や肝細胞がんは、多くの系統のマウスで自然発生する。肝腫瘍の自然発生率は、マウスの系統間で大きな相違がみられる。全般的には、同系統のマウスにおいては、雌よりも雄の方が、肝細胞腫瘍の自然発生率が高い。肝腫瘍の自然発生率については、以下の様に報告されている。B6C3F1 : 雄で 7~58%、雌で 0~21% (Tarone et al., 1980) ; C57BL/6CrSlc : 雄で 9.5%、雌で 1.8% (Nakamura et al., 1992) ; CF-1 : 雄で 21~39% (Turusov et al., 1973)。先に引用した 1,2,4-トリクロロベンゼンの 2 年間皮膚適用試験では、使用した同時対照群の Slc:ddY マウスにおいて、雄でも雌でも肝腫瘍は認められていない (Yamamoto, 1982)。もう一方のオクラトキシン A の長期試験では、ddY マウスの雄が使用されているが、基礎飼料だけで 50 週間使用された対照群の 10 匹のマウスの内、2 匹の肝臓で、過形成結節が見つかっただけである (Kanisawa and Shigetoshi, 1978)。したがって、Slc:ddY マウスを用いた上記の混餌投与試験における、同時対照群の肝臓腫瘍発生率は、これらの公表データを支持するものと言える。これらの結果から、リン酸トリス(2-クロロエチル)は、Slc:ddY マウスの肝臓に腫瘍を誘発する可能性がある発がん物質であると結論付けられた。

雌では、1500 mg/kg/日群において、前胃の乳頭腫および扁平上皮細胞がん(合計)の発生率

EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

が有意に上昇した。また、白血病の発生率も、300 および 1500 mg/kg/日群で有意に上昇した。ただし、ヒトは前胃を持たないため、これらの知見がヒトの健康リスク評価にとって意義があるかどうかは疑問である。しかし、げっ歯類の前胃に発がん性を示す物質は、ヒトにおいて、他の解剖学的に異なる部位で、がん発生をプロモートする可能性はある。雌ではさらに、肺腺腫や乳がんなどの他のいくつかの腫瘍や白血病が、リン酸トリス(2-クロロエチル)投与群で多く発生した。しかし、その発生率には、投与群と対照群との間で、有意な差異は認められなかった。リン酸トリス(2-クロロエチル)を 18 ヶ月間混餌投与された Slc:ddY マウスにおいて、肝臓と腎臓での腫瘍発生率を調べた結果を、以下の Table 4.22 に示した。

Table 4.22

Summary table: Incidence of renal cell tumors, and hepatocellular tumors seen in Slc:ddY male mice after an 18 months exposure period via the diet to tris(2-chloroethyl)phosphate (Takada et al., 1989)

Doses (mg/kg bw/d)	0	12	60	300	1500
<b>Male</b>					
<b>Kidney</b>					
Adenoma, overall rates <sup>a</sup>	0/50 (0%)	0/49 (0%)	0/49 (0%)	2/47 (4.3%)	9/50 (18%)
Carcinoma, overall rates <sup>a</sup>	2/50 (4.1%)	0/49 (0%)	2/49 (4.1%)	3/47 (6.4%)	32/50 (64%)
Adenoma and Carcinoma, combined <sup>a</sup>	2/50 (4%)	0/49 (0%)	2/49 (4.1%)	5/47 (10.6%)	41/50 (82%)
<b>Liver</b>					
Adenoma, overall rates <sup>a</sup>	3/50 (6%)	4/49 (8.2%)	3/49 (6.1%)	10/47 (21.3%)	16/50 (32%)
Carcinoma, overall rates <sup>a</sup>	1/50 (2%)	1/49 (2%)	4/49 (8.2%)	2/47 (4.3%)	3/50 (6%)
Adenoma and Carcinoma, combined <sup>a</sup>	4/50 (8%)	5/49 (10.3%)	7/49 (14.3%)	12/47 (25.5%)	19/38 (82%)

<sup>a</sup> Number of tumor-bearing animals/number of animals examined at site

総括的に言うと、リン酸トリス(2-クロロエチル)は、経口投与により、Slc:ddY マウスの雄に、明らかに発がん性を示す。同時対照群に比べ、腎臓や肝臓における腫瘍発生率が上昇

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

した。Slc:ddY マウスの雄に対してリン酸トリス(2-クロロエチル)が発がん性を有することは、300 mg/kg/日以上群において腎腫瘍の発生率上昇が用量に関連して観察された(1500 mg/kg/日群では統計学的に有意に高い上昇)ことから、また、60 mg/kg/日以上群において肝腫瘍の発生率上昇が観察された(300 mg/kg/日以上群では統計学的に有意に高い上昇)ことから、明確に示されている。

端的に述べると、最高用量の1500 mg/kg/日群のデータは、その用量がこの系統のマウスのMTD(最大耐量)を上回っており、生残率や体重増加抑制(10%超)が生じていることから、以降の検討では除外された。採用された用量範囲で示された結果に基づくと、Slc:ddY マウスの腎臓や肝臓における腫瘍発生率の上昇は、18ヵ月間の混餌投与では、300 mg/kg/日以上群の用量で生じたということになる。この用量範囲では、腫瘍発生率の増加は、B6C3F1 マウスを用いた試験においても認められている。また、マウスを用いたこの試験で報告されている同時対照群の腫瘍発生率は、他の系統のマウスの腎臓や肝臓腫瘍の自然発生率に関するデータを支持するものであった。提示されたデータから、Slc:ddY マウスは、試験済みの他の系統のマウスと比べて、腎臓や肝臓の腫瘍発生に関して、特別に感受性が高いということはないと思われる。同時対照群のデータや、同系統のマウスを用いた他の2件の生物試験における対照データを考慮すると、300 mg/kg/日以上群における腎腫瘍や肝細胞腫瘍の発生率が、背景データの枠を超えたものであることは明白である。腎臓や肝臓におけるこれらのデータは、リン酸トリス(2-クロロエチル)がSlc:ddY マウスにがんを生じさせる能力があることを、明確に証明するものと考えられた。腎臓の増殖性病変や腎尿細管上皮の異形細胞の発生率が、12 mg/kg/日以上群の用量を投与されたマウスで上昇を示したことから、腎臓における腫瘍形成に関するNOAELは、確定することができなかった。一方、肝臓における腫瘍形成に関するNOAELは、この試験では、60 mg/kg/日であると考えられる。

### ● 経皮

#### マウス

各群25匹ずつの45日齢のSwiss マウスを用い、*in vivo*の短期皮膚試験が実施され、皮脂腺の抑制や表皮過形成の誘発について検討されている。マウスの背部に、リン酸トリス(2-クロロエチル)(純度不詳)が、アセトン溶液として、1、3および5日目に、0、31.9、53.2ないしは74.5 mgの用量(3回の合計用量)で適用された。陽性対照として、ベンゾ(a)ピレンが使用された。8日目に適用した箇所の皮膚が切り出され、皮脂腺の数と表皮の厚さが、標準的な手法で測定された。リン酸トリス(2-クロロエチル)を適用したマウスの皮膚に、皮脂腺の抑制や表皮の過形成は誘発されなかった。しかし、リン酸トリス(2-クロロエチル)

ル)に関する全データベースの中において、このデータの意義は乏しい(Sala et al., 1982)。

リン酸トリス(2-クロロエチル)(純度不明)をマウスの皮膚に適用した試験の短報が得られている。各群 32 匹の雌マウスの剃毛した皮膚に、アセトンを経皮投与した被験物質が、21 mg/日の用量で、78 週間、1 週間に 2 回適用された。その結果、皮膚に腫瘍は生じなかった。肝臓がんと子宮内膜肉腫が 1 例ずつ見つかり、肺腺腫が高い発生率(12/32 匹)で認められた。この試験結果からは、リン酸トリス(2-クロロエチル)の経皮投与における発がん性を示す証拠は得られなかった。試験デザインに制限があり(対照群が置かれていない)、報告内容も十分ではないため、確固たる結論を導くことはできない(Sala et al., 1982)。

### 腫瘍プロモータ性

また、リン酸トリス(2-クロロエチル)を皮膚適用した場合の腫瘍イニシエータ/プロモータ活性についても、Swiss マウスを用いた試験で検討されている(Sala et al., 1982)。各群 35 匹の 9 週齢 Swiss マウスの雌に、リン酸トリス(2-クロロエチル)(純度不明)がアセトンを溶媒として皮膚適用され、そのイニシエータ能が調べられた。1 群には、1 匹当たり 71 mg のリン酸トリス(2-クロロエチル)を単回適用し、その後 78 週間にわたり、1 匹当たり 1 µg のテトラデカノイルホルボールアセテート(TPA)を、週 2 回適用した。対照群には、TPA の適用だけを行った。被験動物を定期的に検査し、皮膚に乳頭腫や悪性腫瘍が出現した時期を記録した。全ての被験動物について、全身の剖検および組織学的検査を実施した。皮膚における扁平上皮乳頭腫の発生率は、リン酸トリス(2-クロロエチル)と TPA の適用を行ったマウスでは 17/33 匹(52%)であり、TPA のみの適用を行ったマウスでは 12/28 匹(48%)であった。皮膚における扁平上皮がんは、リン酸トリス(2-クロロエチル)と TPA の適用を行ったマウスでは 2/33 匹に発生したが、TPA のみの適用を行ったマウスでは発生はみられなかった。肺腺腫の発生率は、リン酸トリス(2-クロロエチル)と TPA の適用を行ったマウスでは 7/33 匹、TPA のみの適用を行ったマウスでは 5/28 匹であった。リン酸トリス(2-クロロエチル)は、マウスの皮膚や肺に対して、有意で完全ながんイニシエータ/プロモータ活性を示さなかった。だが、この試験では、陰性対照が置かれていなかったため、リン酸トリス(2-クロロエチル)がプロモータ活性や完全ながん性を有する可能性を拭い去ることはできない。

全体として、リン酸トリス(2-クロロエチル)については、現行の試験デザインに準拠した経皮発がん性試験の情報は得られていない。皮脂腺抑制性や表皮過形成誘発性を調べた皮膚試験では、皮脂腺の減少や表皮の肥厚は認められなかった。リン酸トリス(2-クロロエチル)の腫瘍イニシエータ/プロモータ活性を調べた試験の結果からは、マウスの皮膚や肺に対する有意ながんイニシエータ/プロモータ能は示されなかった。しかし、試験デザインや報告内容に制約があり、確固とした結論を導くことはできない。

- 吸入

データは得られていない

### リン酸トリス(2-クロロエチル)の発がん性に関する *in vivo* 動物試験データの要約

実験動物におけるリン酸トリス(2-クロロエチル)の発がん性については、それを肯定する十分な証拠が得られている。2種類の動物で、陽性という結果が得られている。標的臓器には類似性がみられた。ラットとマウスの両方で、腎臓における発がん性を示す所見が観察されている。ラットやマウスにおける発がん性は、経口投与の場合に関して証明されている。F344/N ラットや B6C3F1 マウスを用いて、(強制)経口投与による標準的な発がん性試験が実施されている(NTP 1991, Matthews 1993)。F344/N ラットの雌雄において、発がん性の明確な証拠が得られている。F344/N ラットでは、リン酸トリス(2-クロロエチル)の最長2年間の経口投与により、44 mg/kg/日以上用量で、腎尿細管腺腫の発生率が、雌雄両方において上昇した。腎尿細管腺腫は、88 mg/kg/日の投与を受けていた F344/N ラットの雄ではその50%近くに、44 mg/kg/日(最大耐量, MTD 未満)の投与を受けていた F344/N ラットの雄ではその10%に発生した。これよりもわずかなものであったが、F344/N ラットの雌でも有意な発生率上昇が観察された(88 mg/kg/日群で10%、44 mg/kg/日群で4%)。B6C3F1 マウスを用いた同様の試験では、設定用量がラットへの投与量の約4倍であり、マウスはラットよりもリン酸トリス(2-クロロエチル)による影響に対し、感受性が低いと思われた。B6C3F1 マウスにおける発がん性試験の1つでは、雄に対する発がん活性の証拠は、350 mg/kg/日(MTD 未満)の用量で腎尿細管腫瘍の発生率がわずかに上昇したことであった。この発がん性の証拠は、腎切片を作り直して再評価し、尿細管細胞腫瘍(350 mg/kg/日群の雄で、腺腫の追加事例2件および過形成2例)の発生率上昇という結果が得られたことで示されている。尿細管細胞腫瘍の発生率は8%に増加し、この値は、対照強制経口投与群の雄における0.2~0.42%および背景対照値の範囲である0~2%の全てを上回っていた(NTP 1991)。腎細胞腫瘍のわずかな増加は、統計学的に有意なものではなかったが、175 mg/kg/日以上を投与された雌雄両方において、腎尿細管上皮における細胞異形を伴った尿細管細胞の過形成や尿細管細胞腫瘍は、明らかに増加しており、これらのことは、投与に関連した影響であることが示唆され、また、B6C3F1 マウスの雄に対する発がん活性の証拠を示すものと考えられた。B6C3F1 マウスの雌については、最低用量の175 mg/kg/日およびそれを上回る用量の群で、ハーダー腺腫発生率のわずかな上昇が確認されたが、発がん性の証拠としては、不確定的であった。175 および 350 mg/kg/日群におけるハーダー腺腫瘍の発生率は、同時対照群の値および背景対照値(NTP 1991 では2.4%、Ihara et al. 1994 では3.0%、Tamano et al. 1988 では2.8%、Eiben, 2001 では5.1%)よりも高かった。

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

別の発がん性試験では、Slc:ddY マウスに 18 ヶ月間リン酸トリス(2-クロロエチル)が混餌投与され、雄において、腎臓と肝臓における腫瘍発生率の有意な上昇が認められている。この試験は、公の試験ガイドラインからはいくつかの点で逸脱しているが、一定の制約を加味した場合、OECD TG 451 に相応している。得られた結果から、リン酸トリス(2-クロロエチル)の雄 Slc:ddY マウスに対する発がん性が、明確に示された。すなわち、300 mg/kg/日以上用量群で、腎腫瘍の発生率が用量に関連して上昇した。また、肝臓における腫瘍発生率が、60 mg/kg/日以上用量群で上昇した[300 mg/kg/日 (MTD 未満)での腫瘍発生率上昇は統計学的に有意]。これらの発生率は、他の系統のマウスにおける、同時対照群の値や背景対照値のどちらの範囲も上回っていた(Takada et al., 1989)。

リン酸トリス(2-クロロエチル)を吸入した場合の発がん性に関しては、報告が得られていない。

リン酸トリス(2-クロロエチル)の経皮発がん性試験の情報は、ガイドライン試験法(OECD 法など)に準拠して実施されたものについては、得られていない。情報が得られたものにおいては、陰性という結果が示されているが、試験デザインや報告内容が不十分であり、確固とした結論を導くことはできない。

### In vitro 試験

#### 細胞形質転換試験

リン酸トリス(2-クロロエチル)に関する細胞形質転換試験の情報が、2件得られている。

Syrian ハムスター胚細胞(SHE 細胞)を用いた試験(S-9 mix 非存在下)で、形質転換率の増加が観察されたが、用量-反応関係性を伴うものではなかった。形質転換率は、400 µg/mL のリン酸トリス(2-クロロエチル)で 3.3% (プレート当たりの形質転換コロニー数 1.4)、500 µg/mL のリン酸トリス(2-クロロエチル)で 1.2% (プレート当たりの形質転換コロニー数 0.6)であり、対照値を上回っていた。600 µg/mL のリン酸トリス(2-クロロエチル)では、陰性という結果であった。800 µg/mL では、細胞毒性が生じた(Sala et al., 1982)。

別の試験では、C3H10T1/2 細胞を用い、S-9 mix の存在下および非存在下で、リン酸トリス(2-クロロエチル)の最高濃度を 1500 µg/mL として検討された(タイプ III の形質転換細胞を対象とした)が、結果は陰性であった。ただし、試験の方法論や結果についての記載が不十分である(Sala et al., 1982)。

**細胞形質転換試験についての要約:**

2 件の細胞形質転換試験からは、リン酸トリス(2-クロロエチル)に関して、判断が難しい結果が示された。SHE 細胞を用いた試験系(S-9 mix 非存在下)では、形質転換率の上昇が認められたが、C3H10T1/2 細胞を用いた別の試験では、S-9 mix の存在下および非存在下で陰性という結果が示された。しかし、SHE 細胞を用いた *in vitro* 試験において認められた反応は非常に弱く、変異原性に関する意義は無いものと考えられた。

**変異原性のデータに関して:**

リン酸トリス(2-クロロエチル)の変異原性を支持する証拠は無いという結論が導かれている。細菌を用いた遺伝子突然変異試験の結果は陰性であった。また、哺乳類の細胞を用いた *in vitro* 遺伝毒性試験の結果は、遺伝子および染色体突然変異に関して陰性であった。さらに、哺乳類において適切に行われた *in vivo* 小核試験 2 件、およびショウジョウバエを用いた試験の結果も陰性であった。

**発がん性に関する考察**

ラットやマウスで誘発された腫瘍が、直接的な遺伝毒性作用と関連しているとするデータは得られていない。別の(非遺伝毒性的)機序によるものと考えられる。

**腎腫瘍**

ラットにおける根拠 *F344/N* ラット(雄および雌)

マウスにおける根拠 *B6C3F1* マウス(雄)、*Slc:ddY* マウス(雄)

げっ歯類を用いた生物試験では、腎臓は、化学物質によって最もがんが生じやすい部位の 1 つとなっている。対照的に、ヒトの場合は、腎臓では、がんの原発はまれである。上述の試験の主要部では、ラットの雄における腎腫瘍に関して陽性の証拠が示されている。それに比べてマウスにおいては、腎臓腫瘍の誘発は非常に低頻度である。一方、ラットでの 2 年間試験の結果からは、*F344/N* ラットの雄についてだけでなく、雌についても腎臓腫瘍誘発の証拠が示されている。さらに、投与に関連した腎臓腫瘍発生は、2 系統のマウスの雄でも、すなわち、*B6C3F1* マウスへの 2 年間投与や、*Slc:ddY* マウスでの 18 ヶ月間試験でも観察されている。

げっ歯類の腎臓に発がん性を示す物質(もしくはその反応性代謝物)の全てが、直接的に腎臓の DNA との付加体を形成して遺伝毒性を示すわけではない。ラットの腎臓において、2

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

次的な機序により化学発がんを起こす例も挙げられている。腎皮質の尿細管は、腎血流の80%を受け入れている部位であり、影響を特に受けやすいことがわかっている。さらに、腎臓の近位尿細管細胞は、有機化合物イオンと他の特定の基質を、尿細管周囲の血流から尿細管液中に、あるいはその逆に直接的に移送する能力が高い。この過程で、かなりの量の腎毒性物質が尿細管細胞中に引き込まれ得る。腎臓は、多様な化学物質の生物学的転換に関し、肝臓に続いて重要な部位であり、広範な酸化的、還元的、加水分解的ならびに抱合的処理に関与する酵素経路を備えている。ラットやマウスにおける代謝試験の情報から、リン酸トリス(2-クロロエチル)が、腎臓を標的器官として作用する条件や作用機序について、手掛かりが得られる。つまり、腎臓は、循環系によって体内分布したリン酸トリス(2-クロロエチル)のかなりの分量に対して、優先的に曝露されたものと考えられる。げっ歯類の腎臓において腫瘍原性を示す化学物質の多くは、究極発がん物質と呼ばれる反応種となるには、代謝活性化を必要とする。げっ歯類の腎臓に発がん作用を示す物質の、生化学的および分子的メカニズムに関する知見は、完全からは程遠い。腎臓には、多くの酵素機能系があり、それらは、解毒や合成機構において働くばかりではなく、化学物質の代謝活性化の能力も有する。近位尿細管における代謝経路の1つは、チトクロム P450 モノオキシゲナーゼ系である。

持続的な組織の損傷およびそれに続く細胞の増殖は、げっ歯類におけるがん発生の一般的な素因であり、ハロゲン化アルケン類など、特定の物質に対する代謝過程に依存すると論じられてきている。これらの化学物質は、細胞質内酵素  $\beta$ -リアーゼが関与する多段階経路を介して、腎毒性を有する代謝産物に生物内変換される。これらの化合物は、肝臓において、グルタチオン S-抱合体となり、腎臓に対する選択的な作用が開始される。そのグルタチオン S-抱合体は、腎臓に運ばれて、主として  $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼなどの、刷子縁に存在するいくつかの酵素の内の1つにより、システイン S-抱合体へと代謝され、最終的にシステイン S-抱合体  $\beta$ -リアーゼにより腎臓内生物的活性化を受け、細胞毒性あるいは変異原性を有する代謝産物が生成される。持続的な細胞毒性刺激により、代償性の組織修復と細胞増殖が誘発され、やがて良性の腎腫瘍が形成される。

個々の酵素の量には動物種差があると思われるが、これらの様々な素因は、ヒトにもげっ歯類にも同等に当てはまる。しかし、ヒトの腎臓にはあてはまらないが、雄ラットの腎臓がある種の化学物質の発がん活性の影響を受けやすくなるような生理学的特異性として、雄ラットの尿に高濃度で存在する特異的タンパク質、すなわち  $\alpha_{2u}$ -グロブリンの存在が挙げられる。このタンパク質は、リポカリン群に属し、雄の肝臓で多量に合成され、ラットの腎臓における独立した2次的な腫瘍誘発メカニズムに関与している。こうしたメカニズムは、 $\alpha_{2u}$ -グロブリン腎症を生じ得る様々な化学物質で確認されている。腎臓に対して発がん性を示すこのような物質には、主として燃料に使用される軽質炭化水素や、食品に含

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

まれる *d*-リモネンなど、多様な化学物質が含まれ、これらは、硝子滴腎症と呼ばれる、雄ラットに特異的な尿中タンパク質である、 $\alpha_{2\mu}$ -グロブリンの蓄積が伴われる腎症候群を誘発することが知られている。この多様な化学物質による腎尿細管腫瘍の誘発が雄だけに見られることは、雌ラットでは  $\alpha_{2\mu}$ -グロブリンは高濃度で体循環していないこと、ならびにマウスでは雌雄で全く  $\alpha_{2\mu}$ -グロブリンを欠いていることと関連性を有する。このことから、リン酸トリス(2-クロロエチル)が  $\alpha_{2\mu}$ -グロブリンと相互作用して腎腫瘍を発生させていると考えられない。

雄ラットに腎腫瘍を形成しやすくさせると考えられる別の要因は、事実上すべての発がん性試験でみられる自然発生的な加齢による症状、すなわち慢性進行性腎症(CPN)である。CPN は、退行性症状であり、雌ラットよりも雄ラットの方がより大きな影響を受ける。CPN には、持続的な再生を示す側面もあり、発症した尿細管の多くは、増殖活性の顕著な上昇を特徴とし、また、症状が非常に進行した段階では、例えばハイドロキノンなどでは、異形性尿細管過形成(前腫瘍病変)が生じることが報告されている。

一般に、ヒトとげっ歯類では、腎臓に発生する腫瘍の種類は同様である。ラットやマウスにおける主要な腎腫瘍の種類は、腎尿細管腺腫および腺がんである。尿細管の腫瘍は、ヒトの腎臓腫瘍においても最も重要である。リン酸トリス(2-クロロエチル)に曝露された F344/N ラットや B6C3F1 マウスおよび Slc:ddY マウスの腎臓では、同じ解剖学的部位で腫瘍発生率の増加が認められた。腎尿細管腺腫が主であったが、腺がんも発生していた。しかし、リン酸トリス(2-クロロエチル)を投与された F344/N ラットや B6C3F1 マウスの腎臓における、腫瘍発生のメカニズムは不明確なままである。遺伝子突然変異試験や遺伝毒性のデータからは、リン酸トリス(2-クロロエチル)は遺伝毒性を有していないと思われることが示唆されている。毒性代謝物の候補の 1 つである 2-クロロエタノールを用いた発がん性試験では、皮膚への塗布が行われたが、発がん性を示すことはできなかった。しかし、2 次的影響もしくは非直接的に DNA に影響を及ぼすことによって腎臓にがんを発生する物質は、ヒトにおいても同等のリスクを示すとみなすことができる。リン酸トリス(2-クロロエチル)が毒性および発がん性を発揮するメカニズムに関しては、データが得られていない。発がんは、非遺伝毒性(DNA 配列の変化を伴わない)メカニズムを介していると思われる。しかし、腎臓における腫瘍形成の動物種特異的なメカニズムは、断定されていない。腎臓の発がんを担っている大きな要因は、おそらく、腎臓を通過する血流の割合である。このことが、反応性の高い代謝能力と合わせて、リン酸トリス(2-クロロエチル)に反応して腫瘍が形成される過程の 1 段階と考えられる。リン酸トリス(2-クロロエチル)は、F344/N ラットにおいて、ハイドロキノンやハロゲン化アルケン類などによる細胞毒性とそれに続く細胞増殖メカニズムを介して、2 次的に腎腫瘍を誘発したのではないかと想定される。しかし、雌のラットや 2 系統のマウスの雄に対しても、リン酸トリス(2-クロロエチル)

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

ル)が、慢性曝露により、発がん性を有することを示唆するデータが得られている。したがって、リン酸トリス(2-クロロエチル)への曝露による腫瘍形成のメカニズムは、決定的には判明していない。

2 次的あるいは非直接的メカニズムを経て発がん性物質が腎臓に作用する場合、がん誘発性影響や腎毒性影響に関して、閾値現象が伴われる。しかし、問題は、リン酸トリス(2-クロロエチル)を投与されたラットやマウスの腎臓における腫瘍形成には、多くの異なる作用機序が関与していると考えられることである。今まで、動物を用いた発がん試験における腫瘍の発生を考える中で、この重要な事象、特にリン酸トリス(2-クロロエチル)で懸念される 1 次毒性影響に関する閾値については、不確実なものとして認識されている。一方、非遺伝毒性発がん物質の閾値用量の決定は、その物質と生物学的標的との相互作用に続く連鎖的な影響が、完全に理解されていることに基づくため、困難である。このため、目下のところ、リン酸トリス(2-クロロエチル)による腎腫瘍発生毒性に関して、閾値を判定することは、非常に困難であるか不可能であると考えられる。F344/N ラットでは、投与を受けた全ての群、すなわち 44 mg/kg/日以上用量の投与を受けた雌雄において、腫瘍形成が認められた。このデータに基づく、雌雄の F344/N ラットについては、腎腫瘍形成に関する NOAEL を確定することはできない(NTP 1991; Matthews 1993)。腎腫瘍発生率の上昇および腎尿細管過形成の発生率上昇は、350 mg/kg/日という高用量の投与を 2 年間受けた B6C3F1 マウスの雄で認められたが、核肥大などの腎尿細管上皮細胞における異形の発生率は、175 mg/kg/日以上投与を受けた雄と雌の両方で認められた(NTP 1991, Matthews 1993)。Slc:ddY マウスの雄では、B6C3F1 マウスの雄で腎臓に腺腫が見られたのと同様の用量範囲にある、300 mg/kg/日のリン酸トリス(2-クロロエチル)を 18 ヶ月間混餌投与した場合に、腎尿細管腺腫の発生率増加が認められている。しかし、Slc:ddY マウスでは、対照群と比較して、核の肥大と共に尿細管上皮の過形成や肥厚といった変化が観察されたのは、12 mg/kg/日以上投与を受けた雄の群であった(Takada et al., 1989)。したがって、腎臓における腫瘍形成に関する NOAEL を確定することはできなかった。全体としては、これらの腫瘍のヒトとの関連性については、適切な作用機序に関する知見を欠くため、結論を導くことはできない。しかし、得られたデータを全て考慮すると、ヒトとの関連性は、おそらく非常に高いと考えられる。

### 肝腫瘍

#### マウスにおける根拠 Slc:ddY マウス(雄)

肝臓は、解剖学的な位置と酵素含有量の多さから、げっ歯類を用いた毒性学的試験で最も影響を受けやすい臓器であり、ラットやマウスを用いた発がん性試験においても、最も発がんしやすい臓器となっている。リン酸トリス(2-クロロエチル)を投与された Slc:ddY マ

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

マウスの肝臓における、腫瘍発生のメカニズムは検討されていない。

マウスの肝臓に対する非遺伝毒性発がん物質には、異なる作用機序が存在することが知られている。文献では、非遺伝毒性発がん物質については、肝臓の持続的な損傷と肝腫瘍発生との関連が論じられている。この現象は、肝臓に限ったものではない。壊死や再生は、特に尿路上皮など、他の器官においても腫瘍発生率を上昇させるからである(Grasso 1987a, 1987b)。細胞損傷が肝細胞の代謝回転率にどのような影響を及ぼすかについては、提示したマウスを用いた試験の中では、特に検討されていない。

さらに、非遺伝毒性物質の中には、明瞭な肝毒性の徴候を示すことなく、肝臓の肥大や有糸分裂促進を誘発するものもある。肝肥大の初期には、有糸分裂促進作用が伴われるという考察もなされており、それは、投与後の最初の数日間以内に、S期にある細胞を指標として測定することができる。肝肥大の後期では、さらに細胞の肥大も伴われると考えられている。また、化学物質に誘発された持続的な肝肥大では、滑面小胞体(SER)の増殖、ペルオキシソームの増殖、および広範な肝酵素の誘導が生じる。リン酸トリス(2-クロロエチル)をマウスに投与した試験において、この様な作用機序もしくは作用機序の潜在的な相互作用が生じている可能性を示す結果は得られていない。

要約すると、目下のところ、リン酸トリス(2-クロロエチル)による **Slc:ddY** マウスの雄における肝臓がん発生のメカニズムに関して、明瞭なデータは得られていない。しかし、リン酸トリス(2-クロロエチル)に反応して肝細胞が損傷を受けること、および肝臓における特徴的な修復反応が生じることが、腫瘍発生の要因になっていると考えることは理に適っている。**Slc:ddY** マウスを用いた試験において、局所の壊死および肝細胞の空胞化が、投与を受けた全群(12 mg/kg/日以上)で観察され、これらは対照群でも観察されたが、一方、他のマウスを用いた試験では、これらの所見は報告されていない。提示されたこれらの試験結果に基づくと、リン酸トリス(2-クロロエチル)は、**Slc:ddY** マウスの雄の肝臓に腫瘍を誘発する可能性のある、発がん性物質であると言える。60 mg/kg/日が、肝臓における腫瘍形成に関する **NOEL** であると考えられる。全体的には、作用機序に関する知見が不十分であるため、この腫瘍のヒトにおける意義に関しては、結論を導くことはできない。しかし、得られたデータ全てを考慮すると、ヒトに対してもおそらく相当の関連性があるものと考えられる。

### ハーダー腺腫瘍

マウスにおける根拠: **B6C3F1** マウス(雌)

ハーダー腺は、限られた動物種に特有の、めずらしい器官の1つである。霊長類などは、ハーダー腺を持たない。ハーダー腺腫瘍は、**B6C3F1** マウスでは一般的な所見ではなく、

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

この腫瘍の発生率は、B6C3F1 マウスにおける他の多くの腫瘍と同様に、加齢とともに上昇する。ハーダー腺は、眼窩後方に位置しているため、腫瘍が大きくなると、眼球が突出する可能性がある。B6C3F1 マウスを用いた 2 年間試験では、発がん性に関して判断がつかない結果が得られている。すなわち、試験での最低用量である 175 mg/kg/日もしくはそれ以上のリン酸トリス(2-クロロエチル)が投与された雌において、ハーダー腺腫の発生率が、わずかな上昇を示した。しかし、この試験においては、肉眼で認識できる病変を有するハーダー腺についてのみ、鏡検が行われており、腫瘍の発生率は、低く報告されていると考えられる(NTP 1991, Matthews 1993)。結論としては、両方の投与群の雌におけるハーダー腺腫瘍の発生率は、同時対照群の値や背景対照値(NTP 1991 では 2.4%、Ihara et al., 1994 では 3.0%、Tamano et al., 1988 では 2.8%、Eiben, 2001 では 5.1%)よりも高かった。

ヒトにはハーダー腺に相当する器官が無く、また、発生機序に関する詳細な情報が得られていないため、これらの腫瘍は、ヒトとは無関係であると考えられた。

### 4.1.2.8.2 ヒトにおけるデータ

データは得られていない。

### 4.1.2.8.3 発がん性の要約および結論

動物におけるデータから、リン酸トリス(2-クロロエチル)が発がん性を有することは明らかである。F344/N ラットや B6C3F1 マウスを用いてガイドラインに準拠して実施された試験から、妥当なデータが得られている(NTP 1991, Matthews 1993)。さらに、Slc:ddY マウスを用いて実施された 18 ヶ月間の混餌投与試験のデータが得られており(Takada et al., 1989)、これは許容範囲内の制約の下でガイドラインに整合するものとみなせた。

ラットやマウスにおけるリン酸トリス(2-クロロエチル)の発がん性が、経口経路に関して証明された。

リン酸トリス(2-クロロエチル)は、F344/N ラット(雄および雌)と 2 系統のマウス(B6C3F1 および Slc:ddY)の雄の腎臓において、主として良性腫瘍を誘発し、また悪性腫瘍も誘発した。ラットおよび両方の系統のマウスで、腎臓に、同様のタイプの腫瘍が発生した。さらに、リン酸トリス(2-クロロエチル)投与による腫瘍発生は、Slc:ddY マウスの雄の肝臓、および B6C3F1 マウスの雌のハーダー腺において、それぞれ認められた。腎臓に関して得られたデータは、Slc:ddY マウスの雄において、リン酸トリス(2-クロロエチル)により発がん

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

活性が誘発されることを明確に示している。最低用量の 12 mg/kg/日およびそれ以上の投与を受けたマウスで、腎臓の増殖性病変と腎尿細管上皮の細胞異形の発生率が上昇していたことから、腎臓における腫瘍形成に関する NOAEL を確定することはできなかった。したがって、リスクの総合評価の目的のためには、腫瘍形成に関する LOAEL として、12 mg/kg/日が提示される。

44 mg/kg/日 (MTD より少ない) 以上の投与を受けた雌雄の F344/N ラットにおいて、腎尿細管細胞の腺腫およびがんの発生率が上昇した。88 mg/kg/日群での腫瘍発生率は、統計学的に有意に高かった (NTP 1991, Matthews 1993)。B6C3F1 マウスの雄では、腎尿細管細胞腺腫および腎尿細管細胞過形成の発生率が、350 mg/kg/日 (MTD より少ない) 群で上昇していた。さらに、核肥大などの腎尿細管上皮細胞における異形の発生率が、175 mg/kg/日以上の投与を受けたマウスの雌雄両方で上昇していた (NTP 1991, Matthews 1993)。腎臓の腫瘍発生率が、300 mg/kg/日 (MTD より少ない) 以上の濃度で 18 ヶ月間混餌投与を受けた Slc:ddY マウスの雄において、用量依存的に上昇した。また、300 mg/kg/日 (MTD より少ない) 以上の投与を受けた Slc:ddY マウスの雄で、肝臓における腫瘍 (腺腫およびがん) の発生率が、統計学的に有意に上昇した。B6C3F1 マウスの雌では、最低用量の 175 mg/kg/日群およびそれ以上の用量群で、ハーダー腺腫の発生率がわずかに上昇した (NTP 1991, Matthews 1993)。

リン酸トリス (2-クロロエチル) による発がんに関して、動物種特異的な発生機序は認められなかった。

閾値効果に相応する現象は、全ての腫瘍ならびに全ての腫瘍発生部位に関して、認められなかった。細胞毒性が、腎臓における発がん機序の根本と考えられたが、細胞毒性、炎症、またはアポトーシスの関与を示唆するデータは、目下のところ得られていない。しかし、腎尿細管上皮細胞の増殖および核肥大が増加する徴候が、44 mg/kg/日以上投与を受けた F344/N ラットの雌雄、および 175 mg/kg/日以上投与を受けた B6C3F1 マウスの雄で認められ (NTP 1991, Matthews 1993)、核肥大を伴った尿細管上皮の過形成ならびに肥厚も、12 mg/kg/日以上投与で 18 ヶ月間混餌投与された Slc:ddY マウスの雄で確認されている (Takada et al., 1989)。他に、非遺伝毒性的作用機序は確認されなかった。

肝臓についても、持続的な細胞損傷からの腫瘍発生が、非遺伝毒性的機序として考察された。Slc:ddY マウスを用いた試験では、肝細胞の局所壊死や空胞化が、投与を受けた (12 mg/kg/日以上) 全ての群で観察された。他の非遺伝的機序も想定され得るが、現段階では立証されていない。NOAEL は、細胞毒性影響に関して、細胞増殖現象に関して、確定することができなかった。

リン酸トリス (2-クロロエチル) の発がん作用には、非遺伝的 (DNA 配列の変化を伴わない)

メカニズムが関与していると考えられる。

EU の化学物質の分類および表示作業部会の決定に従い、リン酸トリス (2-クロロエチル) は、カテゴリー3 の発がん物質に分類され、「有害、Xn, R40」と表示される。

#### 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

生殖性評価のための連続飼育手順 (reproductive assessment continuous breeding protocol; RACB protocol) に従い、リン酸トリス (2-クロロエチル) (純度 98% 超) を 175、350 ないしは 700 mg/kg/日の用量で CD-1 マウスに (強制) 経口投与し、生殖能や受胎能に対する障害性が検討されている (Gulati et al., 1991)。この試験で採用した用量は、先に実施した 14 日間の用量設定試験の結果から決定された。連続繁殖相開始時には、対照 (コーン油投与) 群には 40 組を、被験物質投与群には 20 組ずつを割り当てた。マウスは、合計で 18 週間の投与を受けた (交配前 1 週間、つがいとして 14 週間、およびその後 3 週間)。連続飼育相後の維持期間に産まれた最後の腹仔を、離乳まで母雌に哺育させ、その後、それら F1 動物に対して、F0 親動物と同じ用量で同じ経路による投与を開始した。74 ± 10 日齢時に、各被験物質投与群について、親が同じでない F1 動物を 20 匹ずつ選択して 1 週間交配させ、そのまま出産まで飼養した。さらに、別途 1 週間の交差交配を実施し、雌雄どちらがより大きな影響を受けるかを調べた。この交差交配相では、以下の 3 群が設けられ、各群に 20 組が割り当てられた。すなわち、対照群の雄×対照群の雌、対照群の雄×700 mg/kg/日群の雌、および、700 mg/kg/日群の雄×対照群の雌であった。この連続繁殖相で検討された評価項目は、毒性の臨床症状、親動物の体重、特定の期間について算出した親動物の平均飲水量、受胎能 (出産に至ったつがいの数: 繁殖に供したつがいの数の比)、1 つがい当たりの出産数、1 腹あたりの生産仔数、生産仔数の割合、生産仔の性別、および、出生直後の仔動物体重であった。供試動物の剖検時には、肝臓、腎臓、精巣、精巣上体、前立腺、凝固腺が付随した精嚢、および卵巣について、重量測定が行われ、また、組織病理学的評価のために固定が施された。F1 動物および交差交配相で検討された評価項目は、連続繁殖相で検討されたものと同じであった。さらに、F1 動物と交差交配相については、精巣上体精子の運動性、精子の形態、精子数および発情周期も検討された。

**F0 動物(連続繁殖相):**

投与に関連した死亡例は認められず、臨床症状も別段報告されていない。飲水量は、被験物質投与群と対照群とで同等であった。平均体重(雌雄合わせて算出)は、交配期間、維持期間を通じて、被験物質投与群と対照群とで同等であった。全てのつがいは、少なくとも1回は出産したという観点からすると、受胎能を有していた。しかし、連続繁殖相の期間中、5回継続的に出産に至ったつがいの数は、175 mg/kg/日群と対照群との間に相違はみられなかったが(対照群で35/38組であったのに対し17/19組)、350 mg/kg/日群では、5回目の出産に至ったつがいの数は、統計学的に有意に減少した(対照群で35/38組であったのに対し13/18組)。この影響は、最高用量群では一層顕著であった。700 mg/kg/日群では、4回もしくは5回目の出産に至った例は全く認められず、3回目の出産に至ったのは18組中2組だけで、2回目の出産に至ったつがいの数も統計学的に有意に減少していた(対照群で37/38組であったのに対し12/18組)。TCEPの投与用量に関連した、1腹当たりの平均生産仔数の減少も明らかとなった。350 mg/kg/日群において、3回目の出産(対照群では13.1 ± 0.7匹であったのに対し9.3 ± 0.9匹)、4回目の出産および5回目の出産について、統計学的に有意な減少が示された。また、700 mg/kg/日群においても、2回目の出産(対照群では13.1 ± 0.6匹であったのに対し4.3 ± 1.1匹)および3回目の出産で、統計学的に有意な減少が示された。仔動物の出生時の個別重量は、中用量群と高用量群において増加がみられたが、1腹当たりの値に修正すると、その増加は統計学的に有意ではなかった。2回目の出産に至るまでの累積日数は、700 mg/kg/日群では、対照群と比べて有意に長かった(対照群で40.8 ± 0.3日であったのに対し65.9 ± 6.4日)。

**F1 世代(連続繁殖相での最後の腹仔):**

700 mg/kg/日群では、受胎能が低下し、生残仔数が少なかったため、第2世代の検討に十分な動物数が確保できず、175 および 350 mg/kg/日群だけで検討を実施した。父動物および母動物の両方において、体重や飲水量に、投与に関連した影響は認められなかった。175 mg/kg/日群における、妊娠ないしは受精したつがいの割合(それぞれ90%)は、対照群の値(それぞれ85%および89%)と同等であった。350 mg/kg/日群では、妊娠ないしは受精したつがいの割合は減少した(それぞれ70%)が、この割合は対照群の値と比べて、統計学的に有意に低いものではなかった。1腹当たりの平均生産仔数は、350 mg/kg/日群で統計学的に有意に減少し(対照群で11.4 ± 0.5匹であったのに対して7.6 ± 1.1匹)、また、両投与群とも、雄の仔の数が、対照群と比べて少なかった。

**交差交配相：**

高用量群の雄×対照群の雌の群では、対照群の雄×対照群の雌の群もしくは対照群の雄×高用量群の雌の群と比べて、妊娠指数や受胎指数が統計学的に有意に低かった。高用量群の雄×対照群の雌の群では、18組の内1組だけが出産した。1腹当たりの平均生産仔数は、父または母動物が投与を受けていた群では共に、対照群同士の群と比べ、統計学的に有意に少なかった(対照群同士の群では  $10.3 \pm 0.7$  匹であったのに対し、父動物が投与を受けていた群では  $3.0$  匹、母動物が投与を受けていた群では  $7.2 \pm 0.9$  匹)。

**臓器剖検結果：**

700 mg/kg/日の用量では、交差交配に使用した雄において、肝臓の絶対および相対重量の統計学的に有意な増加、腎臓/副腎および右側精巣の絶対および相対重量の統計学的に有意な低下、および右側精巣上体の絶対重量の統計学的に有意な低下が認められた。350 mg/kg/日の用量では、親動物とした F1 の雄において、右側精巣上体の絶対および相対重量が、統計学的に有意に低下していた。175 mg/kg/日の用量では、親動物とした F1 の雄において、右側精巣上体尾部、右側精巣上体および右側精巣の重量に、対照群の重量との相違は認められなかった。700 mg/kg/日の用量では、交差交配に使用した雌において、腎臓/副腎の絶対および相対重量が、統計学的に有意に低下していた。350 mg/kg/日用量では、親動物とした F1 の雌において、腎臓/副腎の絶対重量が、統計学的に有意に増加していた。175 mg/kg/日群では、検査した臓器の重量には、影響はみられなかった。

**精子の検査：**

700 mg/kg/日の用量については、交差交配に供した雄を検査したところ、精巣上体尾部組織1グラム当たりの精巣上体精子数は  $810 \times 10^6$  個で、対照群の値 ( $1223 \times 10^6$  個) と比べて、統計学的に有意に低下していた。また、精巣上体精子の運動性は、約 35% で、対照群の値 (約 78%) と比べて、統計学的に有意に低下していた。さらに、異常な精子の割合は、統計学的に有意に増加し、約 32% であった(対照群:9%)。また、精巣の精子細胞の測定データからは、精巣組織1グラム当たりの平均精子細胞数および頭帽部を有する合計精子細胞数が、統計学的に有意に減少していることが示された。350 および 175 mg/kg/日の用量については、親動物とした F1 の雄を検査したところ、精巣上体精子の運動性、精巣上体精子密度、および異常精子の割合は、対照群と比較して、相違は認められなかった。

**膣の細胞学的検査:**

700 mg/kg/日の用量については、交差交配期間中の雌、350 および 175 mg/kg/日の用量については、F1 の雌を検査対象としたが、いずれにおいても、平均発情周期長や性周期への影響は示されなかった。

別の試験 (Gulati and Russel, 1985, Morrissey et al. 1988) において、F344 ラットや B6C3F1 マウスを用いて、リン酸トリス(2-クロロエチル)が、精子パラメータや膣の細胞学的所見に対して及ぼす影響が調べられている (sperm morphology and vaginal cytology evaluations; SMVC evaluations)。この試験は、NTP の支援により行われた、げっ歯類における 13 週間亜慢性試験の一部であることが示されている。各群雌雄 10 匹ずつの動物に、44、175 ないしは 700 mg/kg/日(マウス)、および 22、88、ないしは 175 mg/kg/日(ラット)の被験物質が、約 18 週間強制経口投与された。剖検時に検討された評価項目は、雄については、右側精巣重量、右側精巣上体重量、右側精巣上体尾部重量、精子運動性、精巣上体尾部組織 1 グラム当たりの精子数、精子の形態など、雌については、性周期であった。リン酸トリス(2-クロロエチル)を 44 もしくは 175 mg/kg/日の用量で投与された B6C3F1 マウスの雄では、全体重、右側精巣上体尾部や右側精巣上体および右精巣重量、精子運動性、精子数、異常精子の出現率について、対照群と比較して有意な影響は認められなかった。しかし、700 mg/kg/日群では、右側精巣上体および右側精巣の重量に、有意な低下が認められた。この用量ではまた、対照群の値に比べ、精巣上体尾部組織 1 グラム当たりの平均精子数が、統計学的に有意に減少し、異常精子の出現率は、統計学的に有意に増加した。リン酸トリス(2-クロロエチル)の投与を受けた F344 ラットの雄では、最高用量の 175 mg/kg/日群も含めて、全体重、右側精巣上体尾部や右側精巣上体および右側精巣重量、および異常精子の出現数に関して、有意な影響は示されなかった。175 mg/kg/日群では、精子数が対照群と比べて有意に多かったが、精子の運動性はわずかに低下していた(対照群の 89% に対して 77%)。F344 ラットの雌では、リン酸トリス(2-クロロエチル)投与により、性周期への明らかな影響は生じなかった。B6C3F1 マウスの雌では、44 および 175 mg/kg/日群において、発情周期長の延長や発情期の相対頻度にばらつきが認められたが、最高用量群ではこれらの所見は認められなかった。

TCEP の反復投与が行われた 3 件の試験 (Stauffer 1980a, Takada et al., 1989 および NTP 1991) からも、雄の生殖器系が標的となる可能性があることが、ある程度示唆されている(4.1.2.6 章 Table 4.11 参照)。

#### 4.1.2.9.2 発生・発達毒性

##### 動物における試験

リン酸トリス(2-クロロエチル)の催奇形性が、Wistar ラットの胎仔や仔動物において検討されている(Kawashima et al., 1983, 要約が得られているのみ)。被験物質(オリーブ油に懸濁)は、母動物に、妊娠 7~15 日にかけて、強制経口投与された。各群には 20~30 匹が割り当てられ、50、100 ないしは 200 mg/kg/日の用量で投与が行われた。50 および 100 mg/kg/日群では、母動物の体重増加量、飼料消費量および一般状態に、全く変化は見られなかった。最高用量の 200 mg/kg/日群では、30 匹の母動物の内、7 匹が死亡した。母動物の飼料消費量も著しく減少し、立毛や全身的な衰弱といった臨床症状が確認された。妊娠 20 日目の時点で、リン酸トリス(2-クロロエチル)投与による胚/胎仔死亡や肉眼的奇形の増加は、どの用量においても認められなかった。高用量側 2 群において、骨格変異(頸肋、胸骨分節変異、腰肋)が、わずかに増加した。出生後検査では、被験仔動物の発達は、全群で順調であり、投与による異常は、形態学的検査でも、オープンフィールドテスト、水迷路テスト、回転棒テスト、スロープテスト、疼痛反射テスト、Preyer の反射テストなどの機能検査でも、認められなかった。著者は、リン酸トリス(2-クロロエチル)にはラットに対する催奇形性は無く、母動物に毒性量投与しても催奇形性影響は示されないと結論付けている。

Kawashima et al.(1983)の発生・発達試験では、30 匹の母動物の内 7 匹の死亡は、妊娠 10~14 日の間に起こったことが報告されている。後の方の死亡例では、軽微な立毛と虚弱がみられたが、中毒症状は全くなかったと報告されている。動物の剖検や、さらに詳しい検査は行われなかった。しかし、200 mg/kg/日群の投与を続けられた残り 23 匹の母動物の胎仔の発生や、それらが出産した仔動物の発達には影響が及ばなかったことから、母動物の死亡は、明らかに、重要な事象とは考えられない。

合計 60 種類の化学物質について、CD-1 マウスを用い、Chernoff-Kavlock 法によりスクリーニング評価が実施されているが、その中に、リン酸トリス(2-クロロエチル)も含まれていた(Hardin et al., 1987)。母動物は、妊娠 6~13 日にかけて、940 mg/kg/日を強制経口投与された。母動物の体重増加量は、対照群と比べ、投与を受けた母動物で有意に低値であった。しかし、生存仔を出産した妊娠例数、1 腹あたり生産仔数、仔動物の生残率や出生時体重ならびに体重増加量は、全く影響を受けなかった。

##### ヒトにおけるデータ

データは得られていない。

## 他の情報

報告内容が非常に乏しい試験の情報が得られている (Shepel'skaja and Dyschinewitsch, 1981)。この試験では、雄ラット(系統、群の大きさ、試験手法の詳細について述べられていない)を、容積 200 L の吸入チャンバーに入れ、0.5 ないしは 1.5 mg/m<sup>3</sup> の濃度の TCEP(化学的同一性/純度や蒸気発生法についての詳細情報無し)に、4 か月間にわたって曝露した。試験を進める中で、雄ラットを交配に供して(詳細情報無し)生殖機能を検査し、妊娠した雌ラットを、妊娠 21 日目に検査した。その結果、1.5 mg/m<sup>3</sup> 曝露群の雄の精液学的検査では、精子数の変化は認められず、運動の持続期間も損なわれなかったが、活発に運動する精子の数が減少した。0.5 mg/m<sup>3</sup> 曝露群については、何の変化も報告されていない。精子の形態学的異常をある程度示唆する報告もなされているが、精子頭部は形態学的な影響を受けていなかった。精巣の組織学的検査では、両曝露群で精子形成指数が軽度上昇したこと、輸精管中の精原細胞の数が上昇したこと、精細管間質における脱落上皮細胞の発生率が上昇したこと、および成熟分裂期にある細胞を有する輸精管の数が減少したことが報告されている。0.5 または 1.5 mg/m<sup>3</sup> 曝露群の雄と交配させた雌については、着床前および着床後胚死亡が増加し、仔動物の数が少なかったと報告されている。0.5 mg/m<sup>3</sup> 曝露群の雄と交配させた雌では、着床後胚死亡が増加していたこと伴に、胎仔の重量および大きさが、対照群と比べて小さかったことも報告されている。報告内容や考証が非常に乏しいため、この試験は、リスク評価の目的に使用するには不十分であると考えられる。

### 4.1.2.9.3 生殖毒性の要約

リン酸トリス(2-クロロエチル)は、連続繁殖中のマウスの雌雄両方において、また、後に続く 2 世代において、その受胎能を有意に損なわせることが判明した。生殖障害が観察されたのは 700 mg/kg/日群で、多くともわずか 3 回しか出産に至らず、しかも、最後の 1 回では、生産仔が得られなかった。この知見は、同じ用量で別途行われたマウスの交差交配の結果からも、実質的に裏付けられている。雄マウスの生殖器系は、以下の所見から、リン酸トリス(2-クロロエチル)投与に対して、より感受性が高いと思われた。ひとつには、投与を受けた雄の連続生殖性が、投与を受けた雌と比較すると低かったこと、さらには、雄の生殖器官重量が有意に低下し、異なる 2 系統のマウスにおいて、精子パラメータの悪化が認められたことである。F0 世代の妊娠腹数が統計学的に有意に減少したこと、F1 世代で妊娠指数や受胎指数が低下したこと、および F0 と F1 世代の両方で 1 腹仔数が統計学的に有意に減少したことに基づくと、受胎能に関する NOAEL は、CD-1 マウスに経口投与を行ったこの試験からは、175 mg/kg/日と導出された (Gulati and Chapin, 1991)。

発生・発達毒性については、要約のみで幾分古いがわずかなデータと、スクリーニング試

## EURAR: TRIS (2-CHLOROETHYL) PHOSPHATE

験データが得られているが、それらの結果から、確固たる結論付けを行うことはできない。しかし、リン酸トリス(2-クロロエチル)は、マウスやラットにおいて、母動物に毒性を示す用量を投与した場合でも、胚/胎仔毒性や、特定の催奇形性を示さないと考えられる。ラットを用いた経口投与試験(Kawashima et al., 1983)から、発生・発達毒性に関する NOAEL としては 200 mg/kg/日、母体毒性に関する NOAEL としては 100 mg/kg/日が導出された。

得られた動物データに基づき、リン酸トリス(2-クロロエチル)は、受胎能に有意な毒性を示す生殖毒性物質であると判断される。マウスに投与した場合は、雄でも雌でも有意な繁殖障害が生じ、雄の生殖器官障害や精子パラメータ悪化も、有意な水準で認められた。したがって、リン酸トリス(2-クロロエチル)は、カテゴリー2 の生殖毒性物質に分類され、「R60」と表示される。妊娠ラットにリン酸トリス(2-クロロエチル)を投与した試験からは、胚/胎仔発生に対する有意な毒性は示されなかった。