

部分翻訳

**European Union
Risk Assessment Report
2,4,4-TRIMETHYLPENTEN**

CAS No: 25167-70-8

28.05.2008

**欧州連合
リスク評価書(2008年5月28日最終承認版)
2,4,4-トリメチルペンテン**

2,4,4-TRIMETHYLPENTENE

CAS No: 25167-70-8

EINECS No: 246-690-9

RISK ASSESSMENT

28.05.2008

Germany

FINAL APPROVED VERSION

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2014年2月

本部分訳文書は、2,4,4-Trimethylpentene (CAS No: 25167-70-8)に関する EU Risk Assessment Report, (ID 121, 2008)の第4章「ヒト健康」のうち、第4.1.2項「影響評価：有害性の特定および用量反応関係」を翻訳したものである。原文（評価書全文）は、http://esis.jrc.ec.europa.eu/doc/risk_assessment/REPORT/244trimethylpentenereport069.pdfを参照のこと。

4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量反応関係

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

2,4,4-トリメチルペンテンに関するデータは得られていない。

経口、経皮ないしは吸入による吸収に関する試験データは得られていない。物理化学的データ[オクタノール/水分配係数(Log Pow) 5.0, 水溶解性 108 mg/L, 分子量 112 g/mol, 25°Cでの蒸気圧 57.9 hPa]からは、この化学物質は、経口および経皮で良く吸収され、体内に広範囲に分布することが示されている。リスクの総合評価においては、経口、経皮、ならびに吸入による吸収率を 100%とみなすことが提唱される。

構造的に類似した化合物に関する試験データ

短鎖のオレフィン(n-1-オクテン, n-4-オクテン, および 3-エチル-2-ペンテン)に関し、ラットの肝ミクロソームを用いて行われた *in vitro* 試験では、オレフィンがエポキシド化合物を経てジオールに転換することが示されている(Maynert et al., 1970)。今後定量的測定は必要だが、2,4,4-トリメチルペンテンに関しても、同様の反応が生じるものと考えられる。

4.1.2.2 急性毒性

動物における試験

経口

ラットに関して、2,4,4-トリメチルペンテンの急性経口毒性は、低いことが証明されている：

OECD ガイドライン 401 (1987)/ECC ガイドライン B.1 に準拠して、純度 95.19%のジイソブテン(訳注：2,4,4-トリメチルペンテンの別名)(Shell Chemicals Limited 社製)を用いて行われ

た試験では、LD₅₀が2000 mg/kg 体重(bw)を超えているという結果が得られている。この試験では、市販の2,4,4-トリメチルペンテンの急性経口毒性について、1群雌雄5匹のラットに2000 mg/kg bwの用量で投与して検討が行われた。被験ラットは、試験前の一晩は絶食とした。被験物質は、コーン油を媒体として、一定容量10 mL/kgで投与された。死亡例や投与に対する反応は認められなかった。全例が、見込まれた体重増加を示し、目立った剖検所見も認められなかった(Huntingdon Life Sciences, 1996a)。

Wistar ラットの雄(1群15匹;体重160~210 g)に対し、250、500、1000、ないしは2500 mg/kg bw(被験物質はおそらく無希釈)の用量で経口投与した試験が行われている。被験物質は、炭素数8(C8)のオレフィン混合物(約75%が2,4,4-トリメチルペンテン-1、約15%が2,4,4-トリメチルペンテン-2)であった。死亡例は無かった。自発運動性の一時的な低下が、1000および2500 mg/kg bw群で認められた。Wistar ラットの雄30匹(体重160~210 g)に対し、当該化学物質を、毎日用量を漸増させながら(1日目は200 mg/kg、2日目は300 mg/kg、3日目は450 mg/kg、4日目は675 mg/kg、5日目は1015 mg/kg)投与した試験も行われている。最終投与後7日間観察を行った。死亡例は無かった。3日目に臨床症状(具体的な記載は無い)が認められている(Bayer AG, 1972)。

別の市販のオクテン[Neodene 8(登録商標)、直鎖状アルファオレフィン(シェル高級オレフィン法(SHOP)により製造、CAS No. 111-66-0、オクテン含量98.5%超)]を用いた試験では、経口LD₅₀が3550 mg/kg bw(無希釈の被験物質で5 mL)を超えるという結果が得られている。この試験は、方法が明示されていないが、EEC B.1.法による許容範囲テストに整合したものであった:雌雄各5匹のラットに5 mL/kgの無希釈Neodene 8(密度を710 kg/m³とすると3.55 g/kg)を投与し、雌雄各5匹の対照群ラットには5 mL/kgの脱イオン水が与えられた。投与のために死亡した例は認められず、体重増加量にも有意な影響は及ぼされなかった。中毒の主な臨床症状は1時間以内に発現し、背中を丸める、姿勢が不安定になる、つま先歩行をして活動が鈍くなるといった様子が観察され、頻度が低い症状としては多尿症や粘液を伴った糞便の排出が認められた。剖検からは、投与に関連した変化は全く認められなかった(Shell toxbase, 1993a)。

吸入

Wistar ラット(体重160~210 g)を用いて、7.6~44.0 mg/Lの範囲の6段階の蒸気濃度で、4時間曝露試験(全身曝露)が行われている。被験物質は、C8オレフィン混合物(約75%が2,4,4-トリメチルペンテン-1、約15%が2,4,4-トリメチルペンテン-2)であった。1つの濃度について、1群雌雄各20匹ずつが割り当てられた。21~25 mg/Lの濃度で死亡例が出始め、LC₅₀は、雄で31.5 mg/L(6870 ppm)、雌で31.5 mg/L(6870 ppm)であった。雌雄各10匹ずつの

Wistar ラットを1日4時間で連続5日間曝露(21.6 mg/L ; 4900 ppm)させた試験では、雄の10匹中3匹、雌の10匹中2匹が死亡した。死亡が起きたのは24時間以内であった。生残例では痙攣症状が認められ、それに続いて鎮静状態や呼吸困難が現れた(Bayer AG, 1992)。

オクテン(CAS No. 111-66-0)含量が98.5%を超える市販のC8直鎖状アルファオレフィンを用いた試験では、36.87 mg/L/4時間(8050 ppm)というLC₅₀値が得られている。1群10匹の雄ラットを、6050~11580 ppmの範囲の濃度で4時間曝露、ないしは、飽和蒸気(19110 ppm, 87.5 mg/L)で1時間曝露させた。死亡が起きたのは、すべて曝露中であり、飽和蒸気に曝露させた10匹のうち9匹が、1時間の曝露中に死亡した(要約書の記載であり、より詳細な情報は無い)(Shell toxbase, 1993a)。

1993年に存在したC6~C28オレフィンについての全ての毒性学的情報を編集した文書の中で、その著者は、C6~C14オレフィンを誤嚥すると、重大な危険を生じると述べている(Shell toxbase, 1993a)。

経皮

ラットでは、2,4,4-トリメチルペンテンの経皮LD₅₀値が、2000 mg/kg bwより大きいことが見い出されている。これを支持する情報が、C8直鎖状アルファオレフィン(CAS No. 111-66-0)に関してウサギを用いて行われた試験データからも得られている。

OECDガイドライン402(1987)/ECCガイドラインB3.に準拠した、純度95.19%のジイソブテン(Shell Chemicals Limited社製)を用いた試験において、市販の2,4,4-トリメチルペンテンの急性経皮毒性が、1群雌雄各5匹のラットで調べられている。入念に毛刈りされたラットの背中に、無希釈の被験物質を2000 mg/kg bwの用量で塗布し、包帯で覆い、24時間閉塞状態とした。死亡例は無かった。全身性の症状は、被験物質塗布後15分で全ての動物で認められた啼鳴だけであり、局所反応は、極微細もしくは輪郭が明瞭な紅斑、および軽度の皮膚剥離であった。被験動物は全て、11日目でも全く正常であった。見込まれた体重増加を示し、剖検でも肉眼病変は全く見当たらなかった(Huntingdon Life Sciences, 1996b)。

方法が明示されていないが、EEC B.3.に整合した試験が行われており、Neodene 8[直鎖状アルファオレフィン(SHOPにより製造, CAS No. 111-66-0)、オクテン含量98.5%超]に関して、LD₅₀値が、2000 mg/kg bwより大きいことが判明している。雌雄各4匹の白色ウサギの無傷および擦過処置を施した皮膚に、無希釈のオレフィンを塗布し、24時間閉塞曝露状態に置いた。対照群は、2 mL/kgの脱イオン水で処置した。この製品への曝露による臨床症状や死亡は認められなかった。24時間目と14日目に、皮膚の刺激症状を検査した。処置によって、体重増加量への影響は及ぼされなかった。中等度の紅斑や浮腫が24時間目に観察され、あ

る程度の皮膚刺激症状が 14 日目にも明確に認められた。剖検では、皮膚の刺激症状以外には、処置に関連した変化は認められなかった (Shell toxbase, 1993a)。

ヒトにおける試験

データは得られていない。

結論：

2,4,4-トリメチルペンテンのヒトに対する急性毒性に関するデータは得られていない。動物試験において、このオレフィン化合物の急性毒性は、経口、経皮および吸入の経路で低いことが証明されており、ラットの経口曝露での LD₅₀ 値は 2000 mg/kg より大きく、ラットの 4 時間吸入曝露での LC₅₀ 値は 30000 mg/m³ であり、ラットやウサギの経皮曝露での LD₅₀ 値は 2000 mg/kg より大きかった。したがって、EU 規則に則った、急性経口、経皮もしくは吸入毒性を標識するリスク警告文は当てはまらない。C6～C28 オレフィンについての全ての毒性学的情報を編集した文書の中で、C6～C14 オレフィンの誤嚥は、危険を生じ得ると述べてられている。このことから、リスク警告文 R65 の「飲み込んだ場合には肺に損傷を及ぼす可能性がある」が提唱される。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.4 腐食性

動物における試験

2 匹のニュージーランド白ウサギの耳を、C8 オレフィンの混合物(約 75%が 2,4,4-トリメチルペンテン-1、約 15%が 2,4,4-トリメチルペンテン-2)で 1 日 2 回連続 5 日間処置した試験が行われている。処置用量は明示されていない。処置した場所の皮膚が一時的に発赤したこと以外には、情報は得られていない (Bayer AG, 1972)。

ウサギを用いたドレイズ試験では、2,4,4-トリメチルペンテンおよび異性体は、4 時間皮膚接触させた場合に中等度の皮膚刺激性を示し、24 時間皮膚接触させた場合には中等度から重度の皮膚刺激性を示している：

純度 95.19%のジイソブテンが炎症性もしくは腐食性変化を初回の皮膚接触で引き起こす能力について、OECD ガイドライン 404(1992)/ECC ガイドライン B4 に準拠したドレイズ試験によって調べられた。0.5 mL の被験物質を 3 匹のアルビノウサギの念入りに毛刈りした背中に塗布し、4 時間半閉塞状態とした。皮膚反応の状態を、包帯を解いてから 1、24、48 および 72 時間目、および、7、10、13 および 16 日目に観察した。浮腫は認められなかった。非常に軽微な、ないしは輪郭が明瞭な紅斑が、包帯を外した後の最初の 7 日間、全例の被験物質塗布部に出現していた(平均の症状スコアは、24 および 48 時間目で 13 点、72 時間目で 2 点であった)。被験物質を塗布した全箇所において、最初の 72 時間までの間、痂皮形成が認められ、全例で 7 から 13 日目にかけて皮膚剥離が認められ、1 匹については試験終了の 16 日目まで持続した (Huntingdon Life Sciences, 1996c)。

Shell Oil Company 社によって、毒性試験データの編集が行われており、いくつかの C6~18 アルファオレフィンについて行われた多数の毒性試験の結果が要約・記載されている。これらの試験報告書は、いずれも入手不可能である。C8 オレフィンについて行われた試験は、ほとんどが「SHOP アルファオレフィン C8」もしくは「Neodene 8 アルファオレフィン」と呼ばれる物質に関するものである。SHOP アルファオレフィン C8 (CAS No. 111-66-0) については、98.5%超の「C8 オクテン」を含み、その 95.5%超が「アルファオレフィン」であり 3.5%未満が「分枝状ベータオレフィン」であると報告されている。皮膚刺激性試験の結果は、EEC/OECD の基準に照らすと、刺激物質に分類されると概説されている。

98.5%超のオクテンを含む Neodene 8 直鎖状アルファオレフィン (SHOP により製造) を用いたドレイズ試験が行われている。雌雄 3 匹ずつのアルビノウサギの無傷および擦過処置を施した皮膚に、無希釈の被験物質を 0.5 mL 塗布し、24 時間被覆状態とした。塗布した箇所について、包帯を除去した直後と 72 時間目に、紅斑と浮腫に関してスコア評価を行った。個々のスコアを合計し、それを基に被験群における一次刺激性評点を算出した。評点は 3.38 と算出され、中等度の刺激性物質に分類されることが示された。紅斑に関するスコアの中には、皮膚が赤くならず漂白されたために 0 となったものもあった。紅斑に関する最高スコアは、24 時間目と 72 時間目の両方で認められた 4 であった。刺激症状は、72 時間目まで増悪した。観察は 7 日目まで行われ、その時点のスコアからは、重度の刺激性有りと分類され得ることが示された(試験報告書の要約だけが提示されており、それ詳細情報は無い) (Shell toxbase, 1993a)。

OECD ガイドライン 405(1987)/ECC ガイドライン B.5. に準拠して純度 95.19%のジイソブテンを用いて行われたドレイズ眼粘膜試験では、軽度の刺激性が認められたが EU の規則に基づく表示の必要性は無いと判断されている：この市販品級の 2,4,4-トリメチルペンテンが結膜や虹彩、角膜を傷害する能力について、3 匹のアルビノウサギを用いて調べられている。各ウサギは、被験物質を 0.1 mL 点眼された。眼における反応を、処置後 1、24、48 および

72 時間、および 8 日目に観察した。試験期間の初めから終わりまで、角膜病変や結膜浮腫は認められなかった；結膜の非常に軽微な炎症が、点眼後 72 時間目までの間、全例の処置を受けた眼において認められた(結膜発赤の平均スコアは 24 および 48 時間目で 1、72 時間目で 0.7 であった)；1 時間目の観察時に、1 匹において虹彩炎が認められた。8 日目には全例とも全く正常であった。被験物質の点眼により、軽微な疼痛反応が生じた(Huntingdon Life Sciences, 1996d)。

ヒトにおける試験：

3 名のボランティア(女性 2 人 男性 1 人)で、曝露試験が行われている。C8 オレフィン混合物(約 75%が 2,4,4-トリメチルペンテン-1、約 15%が 2,4,4-トリメチルペンテン-2)へ、5 分間曝露した。465 mg/m³ (100 ppm)の場合、鼻および喉の粘膜に対する刺激作用が認められた。279 mg/m³ (60 ppm)の場合には、刺激作用は認められなかったが、臭気が確実に感知された。46.5 mg/m³ (10 ppm)の場合には、ほとんど臭気も感知されなかった(Bayer AG, 1972)。

結論：

2,4,4-トリメチルペンテンのヒトに対する局所刺激に関するデータからは、465 mg/m³ の濃度における、鼻および喉への影響が示された。ウサギを用いて行われた EU の試験ガイドラインに準拠したドレイズ試験では、2,4,4-トリメチルペンテンは、皮膚に塗布した場合には 4 時間半閉塞状態に置いた後に軽度の刺激性を示し、結膜嚢に滴下した場合には軽度の眼刺激性を示した。2 時間の皮膚接触で、病変-すなわち進行性の刺激症状、痂皮形成および皮膚剥離-が生じたことから、主要な有害影響として脱脂の可能性が示される。しかし、Shell Oil Company 社により纏められた非公開の毒性試験データ編纂書からは、C8 直鎖状アルファオレフィン(CAS No. 111-66-0)は、EEC/OECD の基準で刺激物質として分類される要件を満たす程度の皮膚刺激性を示すことが報告されている。この C8 オレフィン製造者の総括に基づき、我々は、2,4,4-トリメチルペンテンを「刺激物質」に分類し、R38 のラベル標記をすることを提唱する。

4.1.2.5 感作性

動物における試験

Dunkin-Hartley 系モルモットを用いて、試験群 20 匹、対照群 10 匹で、動物感作性試験 (Magnusson Kligman 試験) が行われている。各群を、雌雄同数に 2 分した。2,4,4-トリメチルペンテン (純度 95.15%) の 50%パラフィン油希釈液を皮内注入し、7 日目に無希釈の被験物質を局所に適用した。感作惹起は、試験群および対照群の動物に、被験物質をパラフィン油で希釈した 75%組成物および 30%組成物を皮内投与することにより実施した。被験物質の 75%組成物で感作惹起をした場合は、試験群の 20 匹中 3 匹で、有意な皮膚反応 (対照群の動物で見られた最も重篤な例よりも顕著な反応) が認められた。グレード 1 の紅斑が、試験群の 20 匹中 6 匹、対照群の 10 匹中 3 匹で観察された。試験群の 20 匹中、3 匹は痂皮形成を、12 匹は皮膚剥離を発症した。したがって、全体としては、被験物質の濃度が 75% の場合は、陽性反応率は 15% (3/20) であった。被験物質の 30%組成物では、試験群の 20 匹中 3 匹で、また、対照群の 10 匹中 1 匹で軽微な紅斑が生じた。被験物質の 75%組成物では、試験群と対照群の両方で、30%の発症率で、軽微な紅斑が引き起こされた。しかし、試験群の 20 匹中 3 匹 (15%) で認められた反応は、対照群で認められたものよりも重度 (の紅斑) であった。このことより、試験群の 15%が感作反応を示したと考えられる。被験物質の 30%組成物では、対照群の 10 匹中 1 匹 (10%)、試験群の 20 匹中 6 匹 (30%) で軽微な紅斑が引き起こされている。この所見は免疫学的反応によるものではないと考えられた (Shell Chemical Ltd. UK & EC Erdölchemie GmbH, 1997)。

Buehler 試験に関する追加データが、C6~C28 オレフィンに関する全毒性学的情報を編集した文書の中で言及されている (Shell toxbase, 1993a)。しかしながら、短い要約であるため、その情報を適正に評価することはできない。

吸入による感作に関する動物試験データは得られていない。

ヒトにおける試験

皮膚接触ならびに吸入による感作に関するヒトにおける試験データは得られていない。

結論：

皮膚接触ならびに吸入による感作に関するヒトにおける試験データは得られていない。吸

入による感作に関する動物試験データも得られていない。OECD 試験ガイドライン 406 に準拠した皮膚感作試験のデータが得られており、本化学物質の皮膚感作性を判断することができる。Magnusson Kligman 試験では、20 匹中 3 匹の被験動物において、被験物質の 75% 組成物を適用して感作惹起したところ、有意な皮膚反応(対照群の動物で見られた最も重篤な例よりも顕著な反応)が観察された。しかしながら、この反応の出現率の低さでは、感作性有りとする分類やラベル標識対応というまでには至らない。

さらに、Buehler 試験のデータについて、製造会社が言及しているが、短い要約であるため、本化学物質の皮膚感作性について評価することはできない。

4.1.2.6 反復投与毒性

動物における試験

経口

28 日試験(ラット)

OECD TG 407 (1995 年改訂) に準拠して、28 日間の経口毒性試験が適切に行われている。Sprague-Dawley CD-1 ラットに、2,4,4-トリメチルペンテン(製品としては別個の 2,4,4-トリメチルペンテン、すなわち Shell Chemicals UK Ltd.社製のロット No. R11 と EC Erdölchemie GmbH 社製のロット No. 155833 の、純度 99.1%のものを 50:50 で混合した)を 28 日間強制経口投与した(Huntingdon Life Science, 1997a)。1 群雌雄各 5 匹のラットに、2,4,4-トリメチルペンテンが、0、100、300、1000 mg/kg bw/日の用量で投与された。顕微鏡検査のため、組織標本をヘマトキシリン・エオジン染色した。腎近位尿細管細胞中に生じることがある硝子滴の染色像は、特に認められず、また、硝子滴中に存在する α_{2u} -グロブリンに特異的な免疫組織化学的検出においても陰性であった。死亡例は認められなかった。1000 mg/kg bw/日の投与を受けた雌雄それぞれで、背部および腹部の被毛の褐変が観察された。この用量の雌では、毛づくろいが悪い様子も観察された。1000 mg/kg bw/日群では、投与後に流涎を示した例もわずかに認められた。体重増加量、摂餌量、および飼料転換効率の軽微な上昇が、1000 mg/kg bw/日群の雌で示された。摂餌量の上昇は、1000 mg/kg bw/日群の雄でも示され、また、体重増加量および飼料転換効率の軽微な上昇は、300 mg/kg bw/日群の雌でも認められた。オープンフィールド行動の観察では、1000 mg/kg bw/日群の雌雄で、2 週間目から、被毛の黄変もしくは褐変が認められた。感覚反応性テストとして握力と運動活性について 4 週間観察を行ったが、投与に関連した変化は確認されなかった。試験終了時において、毒性的に有意な血液学的所見は全く認められなかった。骨髄の細胞充実度や組成には、2,4,4-

トリメチルペンテン投与は影響を及ぼさなかった。4 週間の中に血液生化学的検査を行ったが、対照群と比較すると、1000 mg/kg bw/日群の雌では血漿グルコース濃度が低下し、1000 mg/kg bw/日群の雄では血漿タンパク量とアルブミンの生化学検査濃度値が上昇していた。また、1000 mg/kg bw/日群の雄では血漿尿素濃度が高値を示したが、300 ないしは 1000 mg/kg bw/日群の雌では尿素濃度は低値であった。対照群と比較すると、1000 mg/kg bw/日群の雄では、腎臓の絶対および相対重量値が有意に高く、1000 mg/kg bw/日群の雌雄で、肝臓の絶対および相対重量値が有意に高かった。投与に関連した顕微鏡的もしくは組織学的所見は、投与 4 週間後の時点で全く異常がなかった。

肝臓や腎臓は、標的器官であることが判明している。1000 mg/kg bw/日群の雌雄で肝臓の絶対および相対重量が、対照群と比べて有意に増加していたが、病理組織学的変化は伴われていなかった。血漿タンパク量およびグルコース濃度にみられた変化は、2,4,4-トリメチルペンテン投与により肝臓における代謝に変化が生じたためかも知れない。1000 mg/kg bw/日群の雄では、対照群と比べ、腎重量の明瞭な増加が示されたが、これも何ら病理組織学的変化を伴うものではなかった。尿素濃度の上昇は、腎機能の小さな変化に関連したものかも知れない。この試験では、肝臓に対する影響から導き出された 300 mg/kg bw/日が、NOAEL であると考えられた (Huntingdon Life Science, 1997a)。

現行のガイドラインに準拠していない別の経口投与試験が行われている (要約のみで詳細な記載はない；非 GLP 試験であり、性別ごとの被験動物数のデータも無く、また、方法や結果についても詳述されていない)。2,4,4-トリメチルペンテン-1 を 75%、2,4,4-トリメチルペンテン-2 を約 15% 含む混合液を、雄の Wistar ラットに 5 日間、用量を増やししながら (1 日目:200 ; 2 日目:300 ; 3 日目:450 ; 4 日目:675 ; 5 日目:1015 mg/kg bw) 投与し、1 週間の回復期間を設けた。死亡例は無かった。450 mg/kg bw 以上になると全個体が臨床症状を示したということだが、具体的な記載は無く、さらなるデータも入手不能である。この試験からは NOAEL を導出することはできなかった (Bayer AG, 1972)。

OECD TG 421 に準拠した、生殖・発生毒性に関するスクリーニングテストが行われている。Sprague Dawley CD-1 ラットに、2,4,4-トリメチルペンテンが経口投与され、その影響が調べられている。この試験のデータは、2,4,4-トリメチルペンテンへの反復曝露試験のデータに含まれており、毒性に関する情報を補足するものである。この試験では、2,4,4-トリメチルペンテン (製品としては別個の 2,4,4-トリメチルペンテン、すなわち Shell Chemicals UK Ltd. 社製のロット No. R11 と EC Erdölchemie GmbH 社製のロット No. 155833 の、純度 99.1% のものを 50:50 で混合した) を、1 群雌雄 10 匹ずつのラットに、交配前の 15 日間、100、300、ないしは 1000 mg/kg bw/日の用量で強制経口投与した。雌に対しては、授乳 3 日目まで、交配、妊娠、授乳期間を通して投与が続けられ、雄に対しては、約 6 週間後に打ち切るまで投与を継続した (Huntingdon Life Science, 1997b)。テストの手順や生殖への影響についての

詳細情報は、セクション 4.1.2.9 に記載されている。

投与に関連した、取り上げるべき影響は、雄ラットでのみ観察された。腎毒性が、主として近位尿細管細胞において認められた。2,4,4-トリメチルペンテンに 300 ないしは 1000 mg/kg bw/日の用量で反復経口曝露された雄では、腎臓の絶対および相対重量の増加が示された。腎臓の鏡検では、100 mg/kg bw/日 (LOAEL) 以上で皮質部尿細管の好塩基性変化が見られ、300 mg/kg bw/日以上でタンパク質性円柱や間質の炎症性細胞が見られた。1000 mg/kg bw/日の投与を受けた雌でも腎重量の軽微な増加が認められたが、問題となる鏡検像は伴われなかった。

この試験で作成した腎臓の切片を、抗 α_{2u} -グロブリンマウスモノクローナル抗体を用いて免疫染色を施し、 α_{2u} -グロブリンの存在を検証した。 α_{2u} -グロブリンは、雄ラットに硝子滴形成や腎毒性をもたらす(雌では生じない)。腎臓(雄の 0、100、300、1000 mg/kg bw/日群と雌の 0 および 1000 mg/kg bw/日群から採取)をホルマリンで固定し、包埋して、 α_{2u} -グロブリン染色用の切片とした。本試験では、雄の F344 ラットに *d*-リモネンを強制投与(150 mg/kg bw/日、4 日間)して、腎臓の陽性対照切片を得た。 α_{2u} -グロブリンの存在に関して、無し(グレード 0)から強い染色陽性(グレード 4)までの評点付けを行った。鏡検前に標本の並びを無作為化した。そして、これらの標本を、 α_{2u} -グロブリン腎症に関して経験が豊富な、獣医師資格を有する病理学者が検査した(Swenberg and Schoonhoven, 2004, 未発表報告)。この試験から、100、300、1000 mg/kg bw/日の用量で 2,4,4-トリメチルペンテンを Sprague Dawley CD-1 ラットに経口投与すると、雄では α_{2u} -グロブリン腎症が誘発されるが雌では誘発されないことが示された。この免疫組織化学的検査の結果を、以下の Table 4.1 に要約した。

Table 4.1: Results of α_{2u} -Globulin immunohistochemistry of male and female rat kidneys from a reproductive developmental screening test (OECD TG 421) on 2,4,4-trimethylpentene (Swenberg and Schoonhoven, 2004, unpublished report)

Exposure group	Negative	Grade 1 minimal	Grade 2 Mild	Grade 3 moderate	Grade 4 Strong	Average grade
Females, vehicle control	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0
Females, 1 000 mg/kg bw/d	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0
Males, vehicle control	0/10	8/10	2/10	0/10	0/10	1.2
Males, 100 mg/kg bw/d	0/10	0/10	8/10	2/10	0/10	2.2
Males, 300 mg/kg bw/d	0/10	0/10	1/10	2/10	7/10	3.6
Males, 1 000 mg/kg bw/d	0/10	0/10	0/10	2/10	8/10	3.8

対照群や 1000 mg/kg bw/日群の雌から得た腎臓の切片では、 α_{2u} -グロブリン染色の陽性例は無かった。それに対し、雄から得た腎臓は全て α_{2u} -グロブリン染色陽性を示した。ただし、対照群の雄と 2,4,4-トリメチルペンテンを投与された雄との間には、歴然とした差異があった。免疫染色強度は、明確に用量依存的に増高していた。対照群の雄における α_{2u} -グロブリン蓄積所見は僅かなものであり、平均スコアは 1.2 であった。一方、1000 mg/kg bw/日群の雄での染色強度は中等度から高度であり、平均スコアは 3.8 であった。300 mg/kg bw/日群の雄の平均スコアは 3.6 (2.0~4.0 の範囲) であり、100 mg/kg bw/日群の雄では軽度から中等度 (スコア 平均 2.2, 2.0~3.0 の範囲) の α_{2u} -グロブリン染色が示された。300 mg/kg bw/日群や 1000 mg/kg bw/日群の雄の多くでは、多数の特異的染色陽性滴や多様な顆粒円柱を伴って、強い染色性が示された。

以上の様に、免疫組織化学的検査により、本試験で観察された雄における腎臓への影響は、 α_{2u} -グロブリンが形成された結果であることが確認された。2,4,4-トリメチルペンテンが雄ラットに誘発する α_{2u} -グロブリン腎症の症状は中等度から重度であり、多数の試験データがある *d*-リモネンや、構造的に類縁する 2,4,4-トリメチルペンタンやその主要代謝産物である 2,4,4-トリメチルペンタノールといった、他の化学物質によるものに匹敵する。雌ラットの腎臓では、 α_{2u} -グロブリン染色陽性例は 1 つも認められなかった。

総括すると、2,4,4-トリメチルペンテン投与を受けた雄ラットでは、いずれの用量でも腎近位尿細管細胞中の硝子滴の数や大きさが増し、用量が多くなるとともにその程度も増高し、それら硝子滴中に蓄積したタンパク質は α_{2u} -グロブリンであり、さらに、100 mg/kg bw/日

(LOAEL)以上の用量で α_{2u} -グロブリン腎症が誘発されることが実証された。このことは、抗 α_{2u} -グロブリンマウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的染色を用いて確認された(Swenberg and Schoonhoven, 2004, 未発表報告)。雄ラットにおける、 α_{2u} -グロブリンの蓄積を伴う腎病変は、種特異的な影響であり、同様の有害性がヒトに対しても予想されるというわけではない。

吸入

2,4,4-トリメチルペンテンの吸入曝露については、適切な動物試験データが得られていない。

現行の亜急性吸入試験ガイドラインによる通常の手順に整合していない吸入試験が行われている(要約のみ；非 GLP 試験；用いた方法や結果についての詳述無し)。1 群雌雄 10 匹の Wistar ラットを 2,4,4-トリメチルペンテン-1 を 75%、2,4,4-トリメチルペンテン-2 を約 15% 含む混合物に、13.2 ないしは 21.6 mg/L の濃度で 1 日 4 時間、5 日間曝露させ、2 週間の回復期間を設けた。21.6 mg/L 群のラットでは、試験終了時に安楽死させるよりも前に、雄で 3/10 例、雌で 2/10 例が、曝露に関連して死亡した。13.2 mg/L 群では、全ての個体が臨床症状を示した(具体的な記載無し)が、他のデータは得られなかった。この試験データから全身作用や局所作用に関する NOAEC を導出することはできなかった(Bayer AG, 1972)。

経皮

動物を用いた 2,4,4-トリメチルペンテンの経皮反復曝露試験データは得られていない。

経口、吸入、経皮投与による、亜慢性および慢性毒性試験のデータは得られていない。

その他の情報

• 雄ラットにおける腎毒性の発現機序

α_{2u} -グロブリン腎症は、様々な工業用化学物質や環境化学物質への曝露により、雄ラットに生じる影響であり、雌ラットや、イヌ、モルモットおよびマウスなどの他の動物種にはその様な影響は及ぼされない。それらの化学物質としては、例えば、無鉛ガソリン、分枝状脂肪族炭化水素(2,4,4-トリメチルペンテンなど)、環状脂肪族炭化水素(*d*-リモネン、イソホロンなど)、ハロゲン化脂肪族/芳香族化合物(テトラクロロエチレン、1,4-ジクロロベンゼンなど)が挙げられる(Hard et al., 1993)。 α_{2u} -グロブリン腎症は、近位曲尿細管におけるタンパ

ク小滴の数や大きさの増大、近位尿細管とヘンレ係蹄の接合部における顆粒円柱の形成、および皮質部尿細管上皮の散発的な再生を特徴とする (Stonard et al., 1985, Short et al., 1986)。化学物質への曝露により蓄積するタンパク小滴は、低分子タンパク質である α_{2u} -グロブリンを含有することが明らかとされている。正常なラットやそれらの化学物質への曝露を受けたラットにおいて、この様な小滴と α_{2u} -グロブリンにどのような関係が見られるかについて、いくつかの試験が行われている。

15 種類の炭化水素化合物について調べたところ、ガソリンによる腎症は、主としてアルカン成分によるものであり、腎症を引き起こす能力は、その炭素鎖の分枝度が増すほど強くなることが明らかとなっている (Halder et al., 1985)。そのため、2,4,4-トリメチルペンタン (CAS No. 540-84-1) は、無鉛ガソリンが誘発する α_{2u} -グロブリン腎症の発現機序を調べるのに適した純粋化合物として用いられている。以下に示したデータは、2,4,4-トリメチルペンタンに構造的に類似している 2,4,4-トリメチルペンタンを用いて行われた試験から得られたものである。

• 構造類縁化合物を用いた試験データ :

2,4,4-トリメチルペンタン

ここで取り上げている腎症は、急性もしくは亜慢性段階においては、タンパク小滴(リソゾーム)中への α_{2u} -グロブリンの蓄積、それに続く、近位尿細管の第 2 分節部の内側を覆う固有の細胞の変性や壊死を特徴とする。第 2 分節部の上皮細胞が失われると、これらの細胞の修復性過形成が導かれる。この細胞増殖の程度は、曝露の用量や回数、ラットの週齢、および最後の曝露からの経過時間によって変化する。この影響は、雄ラット(成体に限る)で示されており、雌ラットやマウス(雌雄とも)では示されていない (Short et al., 1989a,b; Swenberg et al., 1989)。

2,4,4-トリメチルペンタンは、雄ラットの腎臓において、タンパク小滴の蓄積を誘発すると同時に、雄ラット特異的なタンパク質である α_{2u} -グロブリンの濃度を 2~3 倍に増加させる。これは、 $[^{14}\text{C}]$ 2,4,4-トリメチルペンタンを F344 ラットに単回強制経口投与(4.4 mmol/kg; 502 mg/kg bw, 2 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$)して、24 時間および 48 時間後に測定することにより得られた知見であるが、雌ラットでは影響は認められなかった。2,4,4-トリメチルペンタンの尿中代謝産物を同定・定量したところ、雄ラットも雌ラットも、2,4,4-トリメチルペンタンを同様の経路・速度で代謝することが明らかとなった。一貫して見られた顕著な差異は、2,4,4-トリメチル-2-ペンタノールの体内動態に見られた。この物質は、雄ラットの腎臓で保持される。一方、雌では、雄よりも多量の 2,4,4-トリメチル-2-ペンタノール抱合物が、尿中に排泄された。2,4,4-トリメチル-2-ペンタノールは、雄ラットの腎臓に存在する主要な代謝産物であったが、

雌ラットの腎臓からは消失していた。雄ラットの腎臓には、 α_{2u} -グロブリンとみられる特異的な成分が存在し、雄ラットに特異的に、2,4,4-トリメチル-2-ペンタノールを保持させる (Charbonneau et al., 1987a,b)。

腎症の生化学的・病理組織学的パラメータを、1群5匹の雄F344ラットに、0または346 mg/kgの2,4,4-トリメチルペンタンを2週間(1週間に5日)強制経口投与した試験の中で、測定した。光学顕微鏡検査に関するパラメータとしては、近位尿細管細胞の細胞質中の硝子滴の存在(アゾカルミン染色による)、近位尿細管内腔における顆粒円柱の存在(ヘマトキシリン・エオジン染色による)、および尿細管細胞の再生の有無(ヘマトキシリン・エオジン染色による)を採用した。病理組織学的検討により、いわゆる炭化水素誘発性腎症に特徴的な尿細管病変が発現していることが示された (Gerin et al., 1988)。2,4,4-トリメチルペンタンに関するこれらの結果は、雄ラットを用いた他の反復投与毒性試験で得られた知見と同等のものであった (Halder et al., 1985)。

その他の試験でも、 α_{2u} -グロブリンが用量および曝露時間依存的に雄ラットの腎臓で増加し、一方、雌ラットの腎臓では検出限界以下のままであったことが示された (Stonard et al., 1986; Charbonneau et al., 1987a,b)。これらの試験では、2,4,4-トリメチルペンタンの用量は、5~50 mg/kg bw/日の範囲であった。腎 α_{2u} -グロブリン量の増加は、2,4,4-トリメチルペンタンの増加に比し、3.5倍を示した。50 mg/kg bw/日の場合は、重度のタンパク小滴腎症および高度の再生性過形成が雄ラットで観察されたが、雄ラットの腎臓内の α_{2u} -グロブリンの多く(約70%)が非結合状態であることも示された。残りの、吸収されなかったタンパク質は、尿中に排泄された (Short et al., 1987)。

2,4,4-トリメチル-2-ペンタノールは、2,4,4-トリメチルペンタンの主要な代謝産物であり、 α_{2u} -グロブリンに高い親和性をもつ配位子であることが判明しており (Borghoff et al., 1991)、雄ラットの腎臓で検出され、腎臓における α_{2u} -グロブリン濃度の上昇に関与している；この代謝産物は、雌ラットの腎臓では検出されない (Charbonneau et al., 1987a)。血中および腎臓中の2,4,4-トリメチル-2-ペンタノール濃度および腎 α_{2u} -グロブリン濃度の経時変化を調べた試験がさらに行われており、 α_{2u} -グロブリンの腎臓への蓄積は、単にタンパク分解能が低下したたことによるだけではなく、肝臓での α_{2u} -グロブリン生成が一時的に増加することも関係していると思われる (Kohn and Melnick, 1999)。

2,4,4-トリメチルペンタンが α_{2u} -グロブリンの蓄積や腎臓の細胞複製を誘発する能力を調べるための試験が行われている。各群雄5匹のF344ラット(13週齢)に、0、0.95、3、6ないしは30 mg/kg bw/日の用量で、連続10日間強制経口投与した。細胞の複製度を測定するために、ラットを曝露期間の最後の7日間にわたり、 $[^3\text{H}]$ チミジンに連続的に曝露させた。腎臓試料中の α_{2u} -グロブリンを、ラットの尿中 α_{2u} -グロブリン精製物に対して作製したマウス

モノクローナル抗体を用いた酵素結合免疫測定法(ELISA)により測定した。最終投与から24時間後、タンパク小滴の蓄積量、 α_{2u} -グロブリン濃度、および細胞複製の指標となる核標識率を、対照群および処置群のラットの腎臓において測定した。2,4,4-トリメチルペンタン処置群のラットの腎臓では、タンパク小滴の蓄積量、 α_{2u} -グロブリン濃度、および細胞複製が、用量依存的に増高した。

オレフィン類に関するデータ

Shell 社毒性データベース(Shell toxbase)には、C8 直鎖状アルファオレフィンを始めとするオレフィン類(C6~C18 ないしは C6~C28)に関するデータが存在する。オレフィン類については、多くの吸入、経口、経皮試験が行われている。これらの試験で得られたデータに関しては、内容の記載が非常に簡略である(要約しか公表されていない)ため、評価が行われていない。しかし、そうしたデータには付加的な情報が含まれている(Shell toxbase, 1993b, 1993c, 1993d)。

これらのデータの信頼性や妥当性は不明確である。引用した試験には不適切な部分もあるが、それらの中の1つについて、以下に記載する。

C8 直鎖状アルファオレフィン(1-オクテン)を用いて、90日間強制経口投与試験(OECD TG 408と同様)が行われている。1群雌雄各20匹のラットに、0、5、50、もしくは500 mg/kg bw/日の1-オクテンを毎日経口投与した(要約の報告のみで詳細情報は無い)。腎臓の障害を示す軽微な変化が、500 mg/kg bw/日群でのみ観察された。それらの変化は、腎重量の増加、尿容量の減少、雄ラットの腎臓における不特定の顕微鏡的变化、および雌ラットにのみ見られた血漿クレアチニンの増加などである。13週間の(強制経口)投与試験であったが、1-オクテンのNOAELは、50 mg/kg bw/日であった。腎臓は、高用量での標的組織であった(Shell toxbase, 1993e)。

動物における反復投与毒性データの要約

適切に実施され、十分な報告がなされている、2,4,4-トリメチルペンテンを28日間投与した毒性試験では、肝臓および腎臓が標的器官であることが確認された。1000 mg/kg bw/日を投与された雌雄のラットにおいて、肝臓重量(絶対および相対値)の有意な増加が、血漿タンパク質濃度(雄)や血漿グルコース濃度(雌)の変化を伴って認められたが、組織学的には裏付けとなるような所見は無かった。また、2,4,4-トリメチルペンテンを1000 mg/kg bw/日の用量で投与された雄では、対照群と比較して腎重量の明らかな増加が示されたが、これも何らかの病理組織学的変化を伴うものではなかった。尿素濃度の上昇も認められ、これは

腎機能の軽度の変化に関係するものと思われた。300 mg/kg bw/日の用量では、関連付けられるような毒性影響は認められなかった(Huntingdon Life Science, 1997a)。

2,4,4-トリメチルペンテンの生殖・発生毒性スクリーニング試験が、OECD TG 421 に準拠して経口投与で行われている。雄の Sprague Dawley CD-1 ラットに投与したところ、100 mg/kg bw/日 (LOAEL) 以上の用量で、腎臓の病変(重量増加、および α_{2u} -グロブリン蓄積量の用量依存的増加による腎症)が認められた。この所見は、抗 α_{2u} -グロブリンマウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色により追認された。この誘発病変の重症度は、中等度から重度であり、やはり中等度から重度の α_{2u} -グロブリン腎症を引き起こすことが明らかとなっている d-リモネンや構造的に非常に類似している 2,4,4-トリメチルペンテンなどの、他の化学物質によるものと同等であった。1000 mg/kg bw/日の投与を受けた雌では、腎重量の軽微な増加が示されたが、前述のような顕微鏡学的変化は伴われていなかった。

この 2,4,4-トリメチルペンテンの生殖・発生毒性スクリーニング試験において、雄ラットで観察された腎臓への影響は、 α_{2u} -グロブリンの蓄積と結びついたものであり、この低分子量タンパク質は、雄ラットによってのみ産生される。したがって、当該影響はヒトに当てはまるものではない(Huntingdon Life Sciences, 1997b; Swenberg and Schoonhoven, 2004, unpublished report)。

2,4,4-トリメチルペンテンへの、経口以外の経路による曝露に関しては、有効なデータは得られていない。

無毒性量(NOEL):

経口投与

定量的なリスク評価を推進するという目的に照らすと、前述のラットでの 28 日間毒性試験と生殖・発生毒性スクリーニング試験(Huntingdon Life Sciences, 1997a,b)は、2,4,4-トリメチルペンテンが全身毒性を及ぼす量について、最も信頼できるデータを提示していると考えられる。両試験とも、Sprague Dawley CD-1 ラットを用いて、同じ用量設定で行われている。28 日毒性試験の方は、OECD TG 407(1995 年改訂)の要件に沿う諸設定で行われている。この試験では、100 および 300 mg/kg bw/日の 2,4,4-トリメチルペンテン投与では、雌雄どちらにおいても有害影響は観察されなかった。したがって、肝臓への影響から導出された 300 mg/kg bw/日が、2,4,4-トリメチルペンテンの NOEL であると考えられる。

前述の生殖・発生毒性スクリーニング試験は、OECD TG 421 に準拠したものであり、2,4,4-

トリメチルペンテン処置群の雄ラットの全てで腎症が観察されており (LOAELは 100 mg/kg bw/日)、雄ラットと雌ラットの間に明確な差異があることを示している。皮質部尿細管の好塩基性変化が、2,4,4-トリメチルペンテン処置群の雄ラットの全てで見られたが、タンパク質性円柱や間質性炎症性細胞は、100 ないしは 300 mg/kg bw/日群でのみ検出された。皮質部尿細管の好塩基性変化は、100 mg/kg bw/日群の雄よりも、300 ないしは 1000 mg/kg bw/日群の雄で顕著であった。この試験で行われた雌雄の腎臓における α_{2u} -グロブリンに対する免疫組織化学染色からは、雄ラットでみられた腎臓の病変は、 α_{2u} -グロブリン形成の結果生じたものであることが示された (Huntingdon Life Sciences, 1997b; Swenberg and Schoonhoven, 2004, 未発表報告)。

上述の 4 週間強制経口投与毒性試験では、同じ用量設定で 2,4,4-トリメチルペンテン投与を行っているにも関わらず、雄への腎毒性は示されなかった。対照的に、生殖・発生毒性スクリーニング試験では、雄の腎臓の α_{2u} -グロブリンに対する免疫組織化学染色の結果から、2,4,4-トリメチルペンテンが α_{2u} -グロブリン関与による腎症を引き起こすことが示された。このような差異が生じた理由として、生殖・発生毒性スクリーニング試験で 2,4,4-トリメチルペンテン投与を受けた雄ラットが性成熟に達していたのに対し、4 週間毒性試験の雄ラットは春機発動期であったことが挙げられる。 α_{2u} -グロブリンは、雄ラットが春機発動を終えないと産出されない (Short et al., 1989 a,b; Swenberg et al., 1989) ため、4 週間毒性試験では存在しなかったものと考えられる。

前述の評価において、ヒトではこのような特殊なタイプの腎症を発症するリスクは無いと考えられると述べた。それは、ヒトが α_{2u} -グロブリンを合成することはできないと思われ、また、タンパク質の尿中排泄量も、一般にラットよりも少ないからである。さらに、そうしたタンパク質は、 α_{2u} -グロブリンと構造的に類縁してもおらず、また、 α_{2u} -グロブリンが結合するような化合物と結合することもない (Borghoff et al., 1991; Kohn and Melnick, 1999; Swenberg and Lehmann-McKeeman, 1999)。したがって、2,4,4-トリメチルペンテンの生殖・発生毒性スクリーニング試験で免疫組織化学染色によって明らかとなった、雄ラットにおける α_{2u} -グロブリン介在性の腎臓への影響は、ヒトでのリスク評価という目的では、信頼性のある指標とみなすことはできない。

これまで述べてきたことから、28 日間経口毒性試験で得られた、雌雄ラットにおける肝臓への影響に基く 300 mg/kg bw/日という NOAEL を、リスクの総合判定の起点として採用することとする。

NOAEL

CD-1 ラットの雄および雌〔28 日間(強制)経口投与試験〕 300 mg/kg bw/日

吸入/経皮投与

2,4,4-トリメチルペンテンの動物における適正な吸入試験データは得られていない。現在のところ、2,4,4-トリメチルペンテンの経皮投与に関する試験データは得られていない。

ヒトにおけるデータ

データは得られていない。

反復投与試験に関する結論/分類

提出されたデータは、指令 67/548/EEC の Annex VIIA に規定されている基本要件に関して適切なものである。

分類および標記

分類の必要は無い：

反復投与毒性試験で認められた影響からは、2,4,4-トリメチルペンテンを、指令 93/21/EEC の基準に照らして Xn や R 48 に分類することが正当であるとは言えない。

4.1.2.7 変異原性**4.1.2.7.1 *In vitro* 試験**

In vitro 試験：細菌突然変異試験

2,4,4-トリメチルペンテン(別個の 2 つの 2,4,4-トリメチルペンテン製品を 50:50 で混合したロット No. 2 - 詳細は次のとおり：Shell 社製のロット No. R11 と Erdölchemie 社製のロット

No. 155833)の、ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌 WP2 *uvrA* 株における変異原性を、OECD ガイドライン 471/472 に準拠して試験した(Shell 1996)。試験は、アロクロール 1254 で誘導したラット肝 S9-mix の存在下ないしは非存在下で、5000 µg/plate までの用量で行われた。2,4,4-トリメチルペンテンによる突然変異種は検出されなかった。

In vitro 試験：ヒトリンパ球を用いた細胞遺伝学的試験

2,4,4-トリメチルペンテン(別個の2つの2,4,4-トリメチルペンテン製品を50:50で混合したロット No. 2 - 詳細は次のとおり：Shell 社製のロット No. R11 と Erdölchemie 社製のロット No. 155833)の染色体異常誘発性を、ヒトリンパ球を用いて、OECD ガイドライン 473 に準拠して試験した(Shell 1997)。S9-mix 非存在下では、2,4,4-トリメチルペンテンの用量を5、10 および 25 µg/mL に設定し、細胞を20時間および44時間曝露させた。S9-mix 存在下では、2,4,4-トリメチルペンテンの濃度を10、25 および 75 µg/mL に設定し、細胞を3時間曝露させた後、処置開始から20時間目と44時間目に分取した。この試験条件下では、2,4,4-トリメチルペンテンは、ギャップを除いた異常を増加させることはなかった。染色体異常誘発性を調べるために設定した最高濃度では、(分裂指数の測定に基づく)軽度な毒性しか認められなかったが、より高濃度にすると(S9-mix 無しで75 µg/mL; S9-mix 有りで100 µg/mL)、有糸分裂が100%抑制された。この結果は、独立して行われた別試験により検証されている。

In vivo 試験：

In vivo 試験データは得られていない。

結論

細菌を用いた変異原性試験やヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常誘発性試験の結果が陰性であったことに基づくと、2,4,4-トリメチルペンテンが遺伝毒性を有するという証拠は無い。また、遺伝毒性を警戒させるような化学的構造も有していない。

4.1.2.8 発がん性

動物における試験：

2,4,4-トリメチルペンテンの発がん性試験データは得られていない。変異原性試験のデータは、2,4,4-トリメチルペンテンの発がん性に関する懸念を生じさせるものではない。

以下では、構造類縁化合物である 2,4,4-トリメチルペンタン(CAS No. 540-84-1)に関して得られたデータを、代替として検討する。

過去に実施された試験から、ガソリンによる腎症は、アルカン成分が主因であること、ならびにアルカン化合物の腎毒性は、アルカンの分枝度とともに増高することが判明している(Halder et al., 1985)。したがって、2,4,4-トリメチルペンタンは、混合物であるガソリン中に存在する最も腎毒性が高い化合物の 1 つと考えられ、無鉛ガソリンによる腎毒性の機序を調べるにあたっての純粋化合物として選択・使用されることとなった。以下に示すデータは、2,4,4-トリメチルペンテンの構造的類縁化合物として 2,4,4-トリメチルペンタンを用いて実施された、主要な試験から得られたものである。

2,4,4-トリメチルペンタンのいくつかの代謝中間体を、雄の F344 ラットに投与し；腎臓の切片を作製し、 α_{2u} -グロブリンの蓄積の有無を調べた(Charbonneau et al., 1987a)。カルボン酸代謝産物を含め、2,4,4-トリメチルペンタンのあらゆる代謝産物で試験した(Charbonneau et al., 1987a,b)。これらの代謝産物は、 α_{2u} -グロブリンへの結合性を示すことなく、 α_{2u} -グロブリンの蓄積を誘発した。この結果は、 α_{2u} -グロブリンとの結合だけが、2,4,4-トリメチルペンタンが腎臓において誘発するこのタンパク質の蓄積に関与する経路であるというわけではないことを示唆している。これらの化合物は、 α_{2u} -グロブリンが属する化合物群の他の化合物に対しても、結合性を示さない。さらに、2,4,4-トリメチルペンタンの主要代謝産物である 2,4,4-トリメチル-2-ペンタノールが、ヒトの男性の腎臓から単離したどの低分子量タンパク質とも特異的に結合しないことが判明しており、 α_{2u} -グロブリンに類似したタンパク質は、ヒトの腎臓に恒常的には存在しないことが示されている。

3 週間の 2,4,4-トリメチルペンタン処置を受けた雄の F344 ラットでは、腎臓のタンパク小滴の蓄積に関する用量-反応曲線が、腎近位尿細管第 2 分節における上皮細胞の複製の増高に関する用量-反応曲線と、相関性を有していた(Short et al., 1987)。

無鉛ガソリンや 2,4,4-トリメチルペンタンが、細胞増殖の慢性的な増高を引き起こしたり、腎臓の新生組織形成を助長したりする能力について評価を行うため、大規模な試験が計画された。細胞増殖の計測は、50 ppm の 2,4,4-トリメチルペンタンに 3~50 週間曝露された雌雄の F344 ラットにおける、近位尿細管の 3 分節(第 1、第 2 および第 3 分節)と、慢性的な

進行性ネフローゼの影響を受けた近位尿細管内の部位について実施した。雌ラットでは、ネフロン内の部位、週齢、曝露回数に関係なく、細胞増殖の増高は認められなかった。対照的に雄ラットでは、第2分節での細胞分裂度数が増高(最高11倍)し、それは慢性的な曝露中持続した。この細胞増殖反応は、第2分節において免疫組織化学的に検出された α_{2u} -グロブリンの広がりや蓄積度と、密接に相関していた。 α_{2u} -グロブリンや細胞毒性は、第1および第2分節の細胞においては発現しなかった。しかし、第3分節では、細胞増殖が、最長22週間曝露まで、増高(最高8倍)していた。慢性的な進行性ネフローゼの影響を受けた近位尿細管の数は、対照群と比較して、2,4,4-トリメチルペンタンに22週間ないしは48週間曝露を受けた雄において増加していた。これらの病変には、高い増殖性を示す上皮細胞が含まれていた(Short et al., 1989a)。

無鉛ガソリンや2,4,4-トリメチルペンタンによる、腎臓における発がんイニシエーションプロモーションを調べる試験が行われており、その結果、異型細胞巣や腎細胞腫瘍と分類される、腎臓の新生物病変の数が増加したことが示された。これらの腎病変は、170 ppmのN-エチル-N-ヒドロキシ-エチルニトロソアミンの2週間飲水投与によりイニシエート処置され、続いて50 ppmの2,4,4-トリメチルペンタンに24週間もしくは59~61週間吸入曝露された、F344ラットの雄に存在し、雌では存在しなかった。プロモーションの程度は、2,4,4-トリメチルペンタンが示した慢性的な細胞増殖の影響と相関していた(Short et al., 1989b)。

このイニシエーション-プロモーション試験により、2,4,4-トリメチルペンタンなどが、腎尿細管の発がんプロモーターとして作用し、また、このプロモーター作用が α_{2u} -グロブリン要求性であるという、確固とした証拠が提示された。さらに、この試験では、雌ラットでは過形成性病変も腎腫瘍も増加しておらず、 α_{2u} -グロブリン蓄積に対する腎臓の反応が雄ラット特有のものであることが、ここでも明示された。

- α_{2u} -グロブリン:

雄ラットで化学的に誘発された腎毒性や新生物形成との関係

遺伝毒性を有さない種々の化学物質が、腎近位尿細管細胞のファゴリソーム中での α_{2u} -グロブリンタンパク質の蓄積により発現する、腎臓における急性変化を誘発することが示されている。 α_{2u} -グロブリン腎症は、雄ラットの腎臓においてのみ生じる病的現象である。 α_{2u} -グロブリン腎症候群は、通常、外因性化学物質によって誘発される α_{2u} -グロブリンの過負荷に続発する。このタンパク質の過負荷により、腎細胞傷害が誘発され、代償性の細胞増殖や、最終的には腎尿細管腫瘍が低い有意な発症率で引き起こされる(Swenberg and Lehman-McKeeman, 1999)。 α_{2u} -グロブリンは、低分子量のタンパク質で、ほとんど雄ラット

のみで産生される。このような分泌は、ヒトの腎臓や尿では確認されていない(Borghoff et al., 1992)。 α_{2u} -グロブリン腎症を引き起こすいくつかの化学物質は、雄ラットの腎臓において、自然発生的ないしは化学的にイニシエートされた尿細管上皮細胞が前新生物ないしは新生物病変に変化するのをプロモートすることが判っている。さらに、持続性の腎細胞増殖と前新生物ないしは新生物病変のプロモーションとの間には、量的な相関関係があることが判明しており、このことは、持続性の腎細胞増殖が雄ラットにおける腎臓腫瘍の進展に寄与しているという結論の裏付けとなっている(Melnick and Kohn, 1999)。この種の腎発がん物質の作用機序が一義的であることは、 α_{2u} -グロブリンの肝 mRNA を欠く NBC-Black-Reiter 種のラット(Chatterjee et al., 1989)において、他の種の雄ラットに硝子滴形成を誘発する化学物質によって、硝子滴形成や腎臓における他の病的様相が誘発されないという事実からも、さらに支持される(Dietrich and Swenberg, 1991a,b)。

ニトロソアミン類のいくつかの様な、典型的な腎発がん性物質は、ラットやマウスにおいて、高率に、僅かな曝露期間で、明確な用量-反応関係を示しながら、腎尿細管がんを誘発する。 α_{2u} -グロブリン腎症が関与する腎臓がんは、少なくとも 18 か月連続投与を必要とするほど潜伏期間が長く、雄に固有の腎臓腫瘍を引き起こすそれらの化合物は遺伝毒性は示さないという点で、典型的な腎発がん性物質と区別される(Hard et al., 1993, Swenberg et al., 1989, Swenberg and Lehman-McKeeman, 1999)。

上述の試験(4.1.2.6 節も参照)から、 α_{2u} -グロブリン腎症が発現する上で必須の段階は、化学物質(もしくは代謝産物)が α_{2u} -グロブリンに結合することであることが示されている。 α_{2u} -グロブリンは、様々な配位子を結合・輸送するタンパク質群に属している。このようなタンパク質の多くは、ヒトを含む哺乳動物種において合成される。しかし、ヒトの腎臓におけるこのようなタンパク質の組成は、ラットの腎臓のものと非常に異なっており、 α_{2u} -グロブリン配位子がヒト腎臓のタンパク質に特異的に結合することは無い。ヒト尿中のタンパク質も、高分子量のものが優勢を占めており、ヒトの血漿中や尿中には α_{2u} -グロブリンと同等のタンパク質は存在しない。雄ラットで多量に分泌され、上述の種特異的な腎症に関連する α_{2u} -グロブリンを、ヒトは欠いているのである。

上述の試験について以下に記載した結果から、2,4,4-トリメチルペンタンは、IARC(国際がん研究機関)の基準を満たし、 α_{2u} -グロブリン腎症を経て単独で作用する発がん性物質であると判断されることが示唆されている。

- この化学物質およびその代謝産物は、遺伝毒性活性を欠いている。 α_{2u} -グロブリン腎症を誘発する化学物質が遺伝毒性的機序によらず二次的に腎尿細管腫瘍を引き起こすという考えは、いくつかのイニシエーション-プロモーション試験により、さらに裏付けられている。

- α_{2u} -グロブリン腎症は、雄の腎臓においてのみ発現する病的現象である。
- α_{2u} -グロブリン腎症候群は、通常外因性化学物質により誘発される α_{2u} -グロブリンの過負荷により生じる。
- この化学物質や代謝産物は、腎近位尿細管において、 α_{2u} -グロブリンと可逆的に結合を生じる。
- 化学的に誘発された細胞毒性によって生じた細胞増殖反応の増高は、雄ラットにおける腎尿細管腫瘍の発現の原因として、妥当なものであると考えられる。

ヒトにおける試験データ：

データは得られていない。

結論

2,4,4-トリメチルペンテンに関する発がん性試験データは得られていない。変異原性試験のデータは、この化学物質が遺伝毒性を有しているという懸念を生じさせるものではない。

生殖・発生に関するスクリーニング試験では、種および性特異的な現象として知られている腎尿細管における硝子滴の蓄積が、雄ラットにおいて観察されており、これは、腎近位尿細管上皮細胞における α_{2u} -グロブリンの過剰な蓄積に起因する。この試験では、雌雄のラットに腎臓について、 α_{2u} -グロブリンの免疫組織化学的検査を行っており、その結果から、2,4,4-トリメチルペンテンを 100、300、もしくは 1000 mg/kg bw/日で経口投与すると、 α_{2u} -グロブリン腎症が引き起こされることが示された。腎症の重症度は、他の化学物質と同等で、例えば、*d*-リモネンを用いた諸試験や、構造類似物質である 2,4,4-トリメチルペンタンに関する諸試験で示されているもの等と同様であった。2,4,4-トリメチルペンタンを用いた試験が数多く行われており、雄ラットにおいて α_{2u} -グロブリンが関与する反応を経て、腎毒性や腎皮質腫瘍が誘発される機序が調べられている。2,4,4-トリメチルペンタンは、遺伝毒性は示さないが α_{2u} -グロブリン腎症を引き起こすことが知られている化学物質の 1 つである。2,4,4-トリメチルペンタンに関する主要な試験で得られた生化学的データおよび病態生理学的データから、 α_{2u} -グロブリン腎症と発がんとの間に介在する、タンパク小滴形成、 α_{2u} -グロブリン増加、 α_{2u} -グロブリンとの結合、細胞増殖、イニシエーション/プロモーションなどの重大な事象が明らかとなっている。これらのデータは、 α_{2u} -グロブリン腎症と腎尿細管新生物との関連、すなわち雄ラットのみにおいて生じる機序を裏付ける、説得力のある根拠を

提示している。

ヒトは、雄ラットで分泌され、そのような種特異的な腎症に関連する α_{2u} -グロブリンを欠いている。したがって、雄ラットの腎臓でみられた 2,4,4-トリメチルペンテンへの反応は、ヒトでのリスク評価とは関連性が無い。変異原性に関して陰性というデータが得られていることを考慮すると、発がん性は、ヒトで懸念される評価項目ではないと結論される。

4.1.2.9 生殖発生毒性

動物におけるデータ:

F₀ 世代の生殖腺機能、交尾行動、受胎能、および出生 4 日までの F₁ 仔動物の性向に対する 2,4,4-トリメチルペンテンの影響が、性成熟した雌雄の CD 系ラットを用いて行われた OECD ガイドライン 421 準拠の生殖・発生スクリーニング試験の中で評価されている (Huntingdon Life Sciences, 1997b)。この試験で用いられた被験物質は、2,4,4-トリメチルペンテンの異なる 2 製品、すなわち Shell Chemicals UK Ltd.社製のロット No. R11 と EC Erdölchemie GmbH 社製のロット No. 155833 の、50:50 混合物である。この試験の目的のため、各群雌雄 10 匹のラットに、共飼前 15 日間、2,4,4-トリメチルペンテンを、コーン油を媒体として、100、300 もしくは 1000 mg/kg bw/日の用量で、容量 5 mL として強制経口投与した。対照群には、コーン油のみを投与した。雌に対する投与は、交配期、妊娠期、授乳期にわたって続けられ、授乳 3 日目、すなわち雄への投与終了後約 6 週間で終了された。全ての雌が分娩でき、出生 4 日目まで仔動物を哺育できるように設定した。対照群の動物には、それらと同じ期間、媒体であるコーン油が与えられた。

投与に関連した死亡例は認められなかった。投与に関連した臨床症状は、高用量 (1000 mg/kg bw/日) 群でのみ認められ、投与後の一時的な流涎や被毛の褐変もしくは黄変などであった。体重増加量や飼料消費量には、全試験期間を通じて投与の影響はみられなかった。試験終了時の剖検では、高用量群の全ての雄と雌 4 匹で肝葉の腫脹が観察され、雄の 2 匹では腎肥大も認められた。肝臓や腎臓の絶対および相対重量は、300 もしくは 1000 mg/kg bw/日群の雄、ならびに 1000 mg/kg bw/日群の雌で有意に増加していた。生殖器官に関しては、高用量群でも、絶対および相対重量に変化はみられなかった。投与に関連すると考えられる病理組織学的所見が、被験物質投与を受けた全群の雄の腎臓で観察され、具体的には、100 mg/kg bw/日以上群で皮質尿細管の好塩基性変化が、300 mg/kg bw/日以上群でタンパク質性円柱の形成や間質への炎症性細胞浸潤が認められた。発情周期、交配成績、受胎能、分娩、黄体数や着床部位数、一腹仔数、仔の性比、および 4 日齢までの仔の生残率や体重

動向には、2,4,4-トリメチルペンテン投与を受けたいずれの群でも、影響は認められなかった。同様に、出生4日後に行った仔動物の肉眼剖検でも、親動物に2,4,4-トリメチルペンテンを投与したことに起因すると考えられる所見は認められなかった。

ヒトにおけるデータ:

データは得られていない。

結論

CD ラットに、40～46 日間(交配前、交配期、妊娠期および授乳 4 日目までの期間)2,4,4-トリメチルペンテンを、最大 1000 mg/kg bw/日の用量で経口投与したが、生殖成績や能力の低下の徴候は全く認められず、仔動物でも、周産期や出生後(4 日目まで観察)の生育力や能力に関して判定検査成績の低下は全く認められなかった。(生殖毒性影響に関する NOAEL: 1000 mg/kg bw/日)。