

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

部分翻訳

European Union Risk Assessment Report
(3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM
CHLORIDE
(CHPTAC)

CAS No: 3327-22-8

2008

欧州連合

リスク評価書(2008年)

(3-クロロ-2-ヒドロキシプロピル)トリメチルアンモニウムクロライド

(3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM
CHLORIDE

CAS No: 3327-22-8

EINECS No: 222-048-3

RISK ASSESSMENT

Final report 2008

Finland

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、(3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE (CAS No: 3327-22-8)に関する EU Risk Assessment Report, (2008)の、第4章「ヒト健康」のうち、第4.1.2項「影響評価：有害性の特定および用量(濃度)-反応(影響)関係」を翻訳したものである。原文(評価書全文)は、

<http://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/information-from-existing-substances-regulation> を参照のこと。

4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量(濃度)-反応(影響)関係

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

In vitro 試験

経皮吸収

(3-クロロ-2-ヒドロキシプロピル)トリメチルアンモニウムクロライド(CHPTAC)の経皮吸収について、 $2\text{-}^{14}\text{C}$ -放射標識 CHPTAC を用い、また、ヒトやマウスより調製した皮膚細胞膜を用いて、試験が行われている(TNO, 2003)。試験には、0.1、1、20 および 65%の、4濃度の CHPTAC 水溶液が使用された。 ^{14}C -テストステロンが、基準化合物として使用された。曝露の48時間後、受容側の液体(レセプター液)中の CHPTAC 含量および皮膚や角質層に存在する CHPTAC 残量を測定した。放射活性濃度が 2.46 MBq となり、かつ上述の CHPTAC 濃度(パーセント)が得られる様に、標識および非標識被験物質を混合して、試料を調製した。ヒトの皮膚試料は、51歳の女性から、腹部の外科手術の際に入手した。当該試料は、切除の1時間以内に試験施設に運ばれ、その後すぐに培養液に入れられた。マウスの皮膚は、10週齢の NMRI マウスの雄から採集した。皮下脂肪を取り除き、ヒトの皮膚は、厚さが約 0.5 mm となるまで部分的切除を行った。得られた皮膚の厚さは、マウスで 0.437 ± 0.08 mm、ヒトでは 0.531 ± 0.043 mm であった。2分画モデルを採用し、基底膜がレセプター液と接触し、角質層が空気にさらされる様にした。内側の面積が 0.64 cm^2 のガラス管を皮膚に接着させ、そこに $10\text{ }\mu\text{L}/\text{cm}^2$ の割合で被験物質液を適用した。吸収を48時間測定し、その間細胞の活性を、レセプター液中の乳酸塩の存在を指標としてモニターした。レセプター液試料(総容量 1200 μL の内の 500 μL)を、1、2、4、6、8、20、24、28、44 および 48 時間の時点で回収した。ただし、20%液については、24 および 48 時間の時点でのみ試料採取を行い、また、乳酸塩測定のための対照試料の採取は、4、8、20、28 および 48 時間の時点で実施された。レセプター液試料を採取した後は、新鮮なレセプター液を加えて、元の容量に戻した。採取試料の放射活性を合算して、累積吸収量を測定した。流束

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

定数は、 $DC_{Tx-Ty}/(x-y)$ と定義される。ここで、分子は、吸収曲線が線形を示す部分でのレセプター液中濃度の増加を示し、 x は曲線の当該線形部分の始点、 y は終点を示している。透過係数 [$Kp = \text{流束定数} (\mu\text{g} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}) / \text{適用濃度} (\mu\text{g}/\text{cm}^3)$] は、トリチウム標識した水を用いて決定した。物質収支を判定するため、試験終了時に、残留被験物質を綿棒を用いて取り除き、角質層をテープ剥離法により分離した。残余の皮膚細胞膜を KOH を用いて消化し、レセプター液を収集した。シンチレーション計数法により、総放射活性を、それぞれの分画において別々に測定した。

結果

上述の試験の結果を、マウスの皮膚については Table 4.3 に、ヒトの皮膚については Table 4.3b に要約した。

Table 4.3 Results of the skin permeation study in mouse skin

Concentration of CHPTAC	65%	20%	1%	0.1 %
Kp-values [cm h ⁻¹]	0.026	0.107	0.065	0.151
Flux constants $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$	18.5	21	0.61	0.15
Relative absorption (% in receptor fluid)	13.9	40.9	22.6	43.6
Mean total absorption (% of the radioactivity present in the receptor fluid, the receptor compartment wash and the skin (excluding tape strips))	13	44.9	29.2	45.0
Mean total absorption (% of the radioactivity present in the receptor fluid, the receptor compartment wash and the skin (including tape strips))	13.1	45.2	30.8	50.3

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

Table 4.3b Results of the skin permeation study in human skin

Concentration of CHPTAC	65%	20%	1%	0.1 %
Kp-values [cm h ⁻¹]	0.0005 × 10 ⁻³	0.0009 × 10 ⁻³	0.0015 × 10 ⁻³	0.0022 × 10 ⁻³
Flux constants µg cm ² h ⁻¹	0.36	0.18	0.014	0.002
Relative absorption (% in receptor fluid)	0.053	0.148	0.534	0.685
Mean total absorption (% of the radioactivity present in the receptor fluid, the receptor compartment wash and the skin (excluding tape strips))	0.46	0.46	3.74	5.79
Mean total absorption (% of the radioactivity present in the receptor fluid, the receptor compartment wash and the skin (including tape strips))	0.8	1.8	15.2	14.2

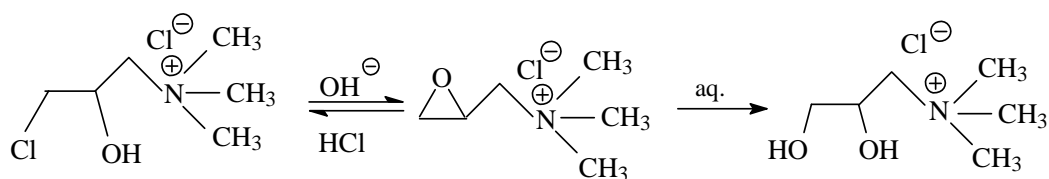
ヒトの皮膚細胞膜においては、テープ剥離実施後の皮膚中の放射活性量は、レセプター液中の放射活性量の 0.5～6.8 倍であった。角質層で検出された放射活性量は、レセプター液で検出された放射活性量の 1.1～21 倍であった。マウスの皮膚においては、テープ剥離実施後の皮膚中の放射活性量は、レセプター液中の放射活性量の 1/5.3～1/17.6 倍であった。放射活性の平均回収率は、マウスやヒトの皮膚細胞膜を用いたこの試験においては、91.2～102.2%の間であった。

CHPTAC の非生物分解の分析

中性から弱アルカリ性の pH 条件下で、40°C における CHPTAC の非生物分解性が検討されている (Raisio Chemicals, 2004a)。当該温度は、*in vitro* 変異原性試験における温度に相応するものである。この試験の目的は、そのようなインキュベーション条件下、すなわち、比較的緩衝液濃度が高く *in vitro* 遺伝毒性試験で用いられる温度の条件下で生じ得る、2,3-エポキシプロピルトリメチルアンモニウムクロライド (EPTAC) の生成を解析することであった。

CHPTAC から EPTAC への反応は、ヒドロキシルイオンに係る非触媒反応である。EPTAC はさらに水と反応して、対応するジオールを生成することができる。CHPTAC の分解率定数 (k_{obs}) および半減期 ($t_{1/2}$) が決定された。試験液に塩化ナトリウムが存在し、それにより分析法に制約が生じたため、精製したジオールの濃度は測定することができなかった。

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE



Conversion of CHPTAC to EPTAC and the corresponding DIOL

HPLC 方が採用されたが、その手法が部外秘であったため、報告書には詳細に記載されていない。被験物質は、精製(再結晶化)3-クロロ-2-ヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウムクロライドであった。被験物質の固体は、この分析のために特別に調製したもので、このような形の市販品は出ていない。試験段階で、メスフラスコ中に 100 mL の水溶液を作製した。開始時の CHPTAC と EPTAC の濃度を測定し、被験溶液を入れたフラスコを目標温度 40°C の恒温槽に入れた。CHPTAC と EPTAC の濃度は、HPLC により、無希釈で測定された。

結果

CHPTAC 濃度の対数 (ln (c)) を、時間に関して点描し、反応速度論的近似を行った。反応速度定数 k_{obs} を、壊変結果に基づいて算出した。算出された定数および各時間の ln (c) 値を、以下の表に示した。

Table 4.3c Ln (c) CHPTAC vs. time

Degradation time	Conc. of CHPTAC	ln (conc.)	k_{obs}	Degradation of CHPTAC	pH
(h)	mg/l		(h ⁻¹)	%	
0	91,8	4,5194		0	7,4
4	83,9	4,4300	0,022	8,6	7,4
5	79,3	4,3734	0,029	13,6	7,4
10	74,7	4,3128	0,021	18,7	7,4
12	74,7	4,3135	0,017	18,6	7,4
15	68,4	4,2260	0,020	25,4	7,4
23	48,5	3,8807	0,028	47,2	7,4

CHPTAC の ln (c)-時間関係は、pH 7.4 において直線状である。したがって、反応は、疑似的に、一次反応速度論に従う。反応速度定数 k_{obs} の平均値は、 $2.3 \times 10^{-2}/h$ である。試験条件 (pH 7.0 ; 温度 40°C) 下での CHPTAC の半減期は、約 30 時間である。TCHPTAC と EPTAC を合わせた濃度が 23 時間で減少していることから、EPTAC が、さらに対応するジオールへと壊変しているものと考えられる。

4.1.2.1.1 他の情報

基本的な物理化学的性質は明らかとなっており、それを基に毒物動態学的挙動を推定することができる。CHPTAC は、内因性のカルニチンに類似しており、カルニチンは、ミトコンドリアでの脂肪酸輸送における担体分子として働く(末端の塩素はアセチル基で置換されている)。CHPTAC の分子の大きさは小さめ(分子量 188 g/mol)であり、そのため膜を介して吸収されやすいと考えられる。毒性学的試験のデータからは、消化管[gastro-intestinal (G-I) tract]や皮膚からかなり吸収されることが示されている。分子が小さいため、CHPTAC は、細胞密着帯の水分子透過孔に受動的に侵入することにより、消化管の膜を通過することが可能である。脂溶性が低く、イオンの性質が強いため、皮膚を通過する速度はそれほど速くないと予想される。*In vitro* 試験で平均流動速度が非常に遅いという知見が得られていることから、この予想が支持される。マウスの皮膚細胞膜における CHPTAC の透過率が、ヒトにおけるよりも 43~117 倍高いという事も、注目に値する。ただし、角質の堅牢性には、閉塞処置や溶媒により水解が生じるなどの様々な理由により、障害が及ぶと考えられる。これは、CHPTAC の皮膚通過の増高に、重要な役割を果たすと考えられる。CHPTAC への吸入曝露は、主に、デンプンの陽イオン化処理中の残留物を介して起こるものと予想される。理論的には、CHPTAC は、エアロゾル化した水溶液(60%まで)の形でも、肺から侵入することができる。粒子の大きさにより、デンプンの粉塵は、呼吸器系の様々な部位に侵入することができる。大きな粉塵粒子の多くは、鼻咽頭の粘膜に留まるものと考えられる。そこで、残留物中の CHPTAC は、粘液中に溶解して、直接的に循環血中に吸収されることも考えられるし、または咽頭に運ばれて、消化管へと入り込むことも考えられる。小さな粒子は、肺の気管気管支や肺胞領域に入り込み、CHPTAC がそこで放出され、血中に吸収されたりリンパ循環により取り除かれたりするものと考えられる。血管腔から細胞外もしくは細胞内分画へ CHPTAC が通過することも考えられるが、膜透過性が低いため、その速度は遅いものと予想される。脂質への移行は、脂質/水分配係数が小さいことから、緩慢であることが予想される。

多くの *in vitro* 試験系で pH 7.4 が採用されるが、その pH では、CHPTAC は 2,3-エポキシプロピルトリメチルアンモニウムクロライド(EPTAC)に転換され得る(Mendrala, 1984a; Raisio Chemicals, 2004a)。一方、pH が 4 に満たないような酸性条件では、このようなエポキシ体への転換は実質上起こらない。このことから、体内に入り込んだ CHPTAC が、小腸(pH 6)や気道もしくは脈管分画(pH 7.4)に達した場合に、EPTAC へと自然的に転換されるかどうかについての疑問が生じる。このような状況が考えられる一方で、その毒性学的な意義は不明確である。また、ジオール化合物の様な他の化合物分子への転換も、除外視することはできない。比較的反応性が低く、脂溶性の低い分子であることから、CHPTAC はおそらく、そのままの形で、または酵素を介したフェーズ II 反応により生成される抱合体

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

の形で、腎臓から排出されると考えられる。

要約

吸入に関しては、データが無いため、75%の吸収を想定することとなる。経口に関しては、50%が想定される。*In vitro*での皮膚透過試験で得られた知見では、ヒトの皮膚における透過率は、最高で0.685%に達した。技術指針書(TGD)により、皮内に保持される量も考慮すべきと提言されていることから、5% $[0.685 + (0.685 \times 6.8)]$ の方がより適切であると思われる。ただし、この係数には、角質層に保持される量は考慮されていない。角質層に保持される量を考慮に入れると、平均吸収率は、0.1~15%の範囲となる。角質層に保持される割合を最も高くすることは、剥離、洗浄、化合物が外部へと失われる他の事象などの要因があるため、あまりにも保護的すぎると思われる。さらに、表皮による吸収は、水溶性が高く(800 g/L)、log Pが負であることから、緩慢であると考えられる。以上の理由から、リスクの総合評価に際し、吸収率を6%とみなすこととする。非生物分解試験の知見に基づくと、pH 7.4では、24時間で最大約50%のCHPTACがEPTACへと転換される。ただし、このような転換反応は、多数の要因による影響を受けるものであり、生物系に及ぼすCHPTACの作用に関して、何らかの直接的な結論をそこから導くことはできないことに留意すべきである。

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 動物における試験

In vivo 試験

吸入

Dow(1984)が実施した試験によれば、4匹のラットをCHPTACに7時間、目標濃度12.05 mg/Lで曝露したが、死亡例は見られず、外観、挙動、飼料消費量に変化は認められなかった。他に情報は得られていない[情報源：米国環境保護庁 化学品有害情報プロファイル (Chemical Hazard Information Profile)]。

経皮

79/831/EECの付属書Vのガイドラインに準拠した試験が実施されており、雌雄5匹ずつの

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

CD ラットにおける CHPTAC の急性経皮毒性が調べられている (Gardner, 1987)。CHPTAC の 65%水溶液が、体表の約 10%に相当する腰背部の剃毛皮膚に適用された。適用部位は直ちにガーゼで覆われ、ガーゼは閉塞包帯によって定位置に保持された。試験は小規模なものであり、試験した用量は 2000 mg/kg だけであった。24 時間の曝露期間の後、適用を受けた部位の皮膚は、水で洗浄された。曝露後の観察期間は 14 日間であった。剖検時には、臓器の肉眼的異常についての検査が行われた。

観察期間全般にわたり、死亡例は無く、臨床症状は何も認められなかった。剖検でも、異常所見は何も観察されなかった。ラットにおける急性経皮致死用量は、2000 mg/kg よりも高いことが判明した。

他にも Wistar ラットを用いた小規模試験が実施されている (Degussa, 1986)。雌雄 5 匹ずつに対し、CHPTAC の 65%水溶液が、2.0 mL/kg の用量で適用された〔1174 mg/mL (65% CHPTAC 水溶液の密度) × 2.0 mL/kg = 2348 mg/kg〕。被験物質は背部の約 30 cm²の皮膚に適用され、24 時間閉塞パッチで被覆が施され、その後適用部位の洗浄が行われた。適用後 14 日間、毒性の徴候に関して被験動物の観察が行われた。体重測定が、0、7 および 14 日目に実施された。観察期間終了時、生残動物は屠殺されて剖検が行われ、臓器は肉眼的検査に供された。経皮 LD₅₀ 値は 2348 mg/kg を超えることが判明した。この値は、純粋な CHPTAC の 1526 mg/kg に相当する。この用量では、死亡例や毒性の徴候は認められなかった。中毒の徴候や症状は何も現れず、局所的な刺激反応も認められなかった。試験終了時の剖検所見からは、被験物質に関連した臓器の肉眼的な変化は何も認められなかった。

経口

Sprague-Dawley ラットを用いた試験が実施されている (Degussa, 1977)。各群雌雄 10 匹ずつに、無希釈の QUAB (60%CHPTAC 液の商品名) が、3.16 mL/kg (3.67 g/kg)、3.83 mL/kg (4.44 g/kg)、4.64 mL/kg (5.17 g/kg) ないしは 5.62 mL/kg (6.52 g/kg) の用量で、強制経口投与された。対照群は設けられなかった。被験物質投与の 15~16 時間前に、給飼は中断されている。Litchfield-Wilcoxon 法を用い、24 時間および 7 日間での LD₅₀ 値を算出した。被験動物の観察が投与後 4 週間行われ、臨床症状、飼料消費量および体重増加量についての検討が実施された。試験期間中に死亡した動物は、肉眼的検死および剖検に供した。最低用量群では死亡例は認められず、最初の 7 日間の体重に有意な変化は現れず、他の毒性徴候も認められなかった。3.83 mL/kg 群では、雌雄各 4 匹が 24 時間後もしくは 7 日後に死亡し、4.64 mL/kg 群では、雄 6 匹と雌 7 匹が 24 時間後もしくは 7 日後に死亡した。これらの中間用量 2 群では、平均体重増加量が 6~12%低下していた。5.62 mL/kg 群では、全例が死亡した。どの群についても、病理学的所見は認められていない。毒性の徴候としては、鎮静状態、縮瞳、呼吸困難、振戦および痙攣が認められた。雄の LD₅₀ は 4.15 mL/kg (60%CHPTAC と

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

して 4.81 g/kg に相当)、雌の LD₅₀ は 4.05 mL/kg (4.70 g/kg) と、それぞれ算出された。純粋 CHPTAC に換算すると、それぞれの LD₅₀ は、約 2800 mg/kg である。

他に、コーン油を媒体とした 20%CHPTAC 液を用い、6 用量を設定した試験が行われている (Kynoch et al., 1982)。各群雌雄 5 匹ずつに、1600、2500、3200、4000、5000 ないしは 6400 mg/kg の用量で(容量は 40 mL/kg を超えないものとした)、強制経口投与が実施された。対照群には、32 mL/kg のコーン油のみが与えられた。すべての用量群で、以下の様な臨床症状が認められた。立毛、異常な姿勢、異常な歩様、嗜眠、呼吸数低下、四肢の蒼白化、唾液分泌亢進。雄における死亡率は以下の通りであった。対照群 0/5 匹、1600 mg/kg 群 1/5 匹、2500 mg/kg 群 4/5 匹、3200 mg/kg 群 3/5 匹、4000 mg/kg 群 5/5 匹、5000 mg/kg 群 5/5 匹、6400 mg/kg 群 4/5 匹。雌における死亡率は以下の通りであった。対照群 0/5 匹、1600 mg/kg 群 0/5 匹、2500 mg/kg 群 4/5 匹、3200 mg/kg 群 4/5 匹、4000 mg/kg 群 5/5 匹、5000 mg/kg 群 4/5 匹、6400 mg/kg 群 5/5 匹。死亡が認められた時期は、雄では投与の 1 時間未満、雌では 1 時間未満～22 時間までの間であった。剖検により、肺の鬱血や出血、および、肝臓や脾臓ならびに腎臓の褪色が判明した。CHPTAC そのものの LD₅₀ として、2170 mg/kg (95%信頼区間値: 830～2940 mg/kg) という値が得られた。

さらに、SPF 化した白色ラットを用いた試験が実施されている [オランダ応用科学研究機構 (TNO), 1982]。各群雌雄 5 匹ずつに、60%CHPTAC 液 [無希釈 Servon XRK (商品名)] が、1.67 (1.92 mg/kg)、2.00 (2.30 mg/kg)、2.40 (2.40 mg/kg)、2.88 (3.31 mg/kg) ないしは 3.46 mL/kg (3.98 mg/kg) 投与された。投与後 14 日間被験動物の観察が行われ、体重測定が 0、7 および 14 日目に実施された。最後の体重測定の後、生残動物は屠殺され、剖検に供された。死亡例数は、それぞれの群の雄/雌で、以下の通りであった。対照群の情報無し、1.92 g/kg 群で雄 1 匹/雌 0 匹、2.30 g/kg 群で雄 0 匹/雌 1 匹、2.76 g/kg 群で雄 2 匹/雌 1 匹、3.31 g/kg 群で雄 4 匹/雌 3 匹、3.98 g/kg 群で雄 4 匹/雌 2 匹。被験動物は、鎮静状態、運動失調、眼球突出を示した。生残動物の肉眼剖検所見からは、投与に関連した肉眼的変化は何も認められなかった。最高用量群では、痙攣、粗毛および昏睡を示すものが多く観察された。LD₅₀ 値は、3.20 mL/kg と算出された (95%信頼区間値: 2.66～3.84 mL/kg)。値を mg/kg に換算し、60%溶液の比重として既定値の 1.15 を用いると、60%溶液に関しては、LD₅₀ が 3688 mg/kg (1.15 × 3.2 mL/kg × 1000 mg/g) となり、95%信頼区間値として 3059～4166 mg/kg が得られる。これを純 CHPTAC に換算すると、LD₅₀ は、約 2213 mg/kg である。

4.1.2.2.2 急性毒性の要約

急性毒性に関しては、2170 mg/kg という経口 LD₅₀ 値と、2348 mg/kg 超 という経皮 LD₅₀ 値が、リスクの総合評価の際に考慮に入れられることになる。経皮毒性に関しては、小規模

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

な試験の結果から、2000 mg/kg より大きいLD₅₀値が導出される。急性吸入毒性に関するデータは比較的乏しいが、得られた情報に基づく、吸入経路での毒性は、分類に該当しないほど十分に低いものであると考えられる。わずかなデータによれば、12.05 mg/LのCHPTACに曝露されたラットにおいて、毒性の徴候は何も認められていない。ただし、詳細な試験内容の記述を欠いているため、吸入経路による急性毒性に関しては、何ら明確な結論を導くことはできない。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.3.1 皮膚

動物における試験

3匹のNZWウサギを用い、EUのガイドラインに準拠した試験が実施されている(Liggett et al., 1987a)。腰背部の剃毛した皮膚領域に、0.5 mLの65%CHPTAC水溶液が適用された。被験物質の密度が1.16 g/mLであることから、適用用量は580 mgとなる。被験物質は、2.5 cm²の区画に適用された。その区画は、接着性の包帯で4時間、半閉塞状態に保持された。半閉塞包帯を除去した後、適用部位を洗浄した。被験物質を除去した30分後、ならびに、2、3および4日目に、皮膚の検査を実施した。いずれの時点でも、皮膚症状のスコアは0であった。すなわち、被験物質は、ウサギの皮膚に対して刺激性を示さなかった。

3匹の白色ウサギを用いて、パッチ法による試験が実施されている(Degussa, 1982)。0.5 mLの60%CHPTAC水溶液が、ウサギの背部の皮膚領域(6.25 cm², その半分には擦過処置が施された)に適用された。被験物質の密度が1.16 g/mLであることから、適用用量は580 mgとなる適用部位をパッチで被覆し、4時間閉塞条件下に保持した。Draizeによって提示された方法に従い、1、24、48および72時間後に皮膚症状を観察し、スコア付けを行った。擦過処置を施した側の剃毛皮膚領域と未処置の側の剃毛皮膚領域のそれぞれ半分には、被験物質を適用せず、パッチでの閉塞被覆のみを行い、対照とした。一次刺激性のスコアは0であり、被験物質は、適用を行ったどちら側の皮膚に対しても、非刺激性であることが判明した。

雌雄6匹ずつのNZWウサギを用いて、皮膚刺激性試験が実施されている(Leuschner, 1977a)。0.5 mLのCHPTAC(濃度不明)が、腰背部の剃毛した皮膚領域に、ガーゼパッチを用いて適用された。被験動物の半数には、適用部位(2.5 cm²)に、擦過処置が施されていた。パッチは接着性の包帯で閉塞され、その状態で24時間保持された。パッチを除去した後、適用部位をスコア付けにより評価した。適用部位を、パッチを除去してから24および72

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

時間後に検査し、紅斑と浮腫に関し、0～4 のスコア付けを行った。すべての検査時点において、擦過処置の有無にかかわらず、スコアは0であった。

Draize 法に則り、6 匹の NZW ウサギを用い、皮膚刺激性試験が実施されている (TNO, 1977)。その結果、55%の CHPTAC により、無処置皮膚については 2 匹のウサギに、擦過処置を施した皮膚については 2/6 匹のウサギに、非常に軽微な刺激症状が生じた。これらの影響は、72 時間後には消失した。これ以上の情報は示されていない。

4.1.2.3.2 眼

動物における試験

6 匹の NZW ウサギに、55%CHPTAC 溶液を適用した試験が行われている (TNO, 1977)。それぞれのウサギの片方の眼に 0.1 mL (116 mg) が滴下され、もう片方は対照とされた。洗眼は行われず、被験物質が滴下されてから 24、48 および 72 時間後、ならびに 7 日後に、検眼が実施された。角膜混濁、虹彩の健全性、ならびに結膜の発赤や浮腫に関して、米国食品医薬品局の評価尺度を用いて、スコア付けが行われた。24 時間の時点で 1 匹が、0～4 までの Draize の尺度に照らしてスコア 1 の発赤を示していたが、それを除くと、24 時間後の時点でも 48 時間後の時点でも、すべてのスコアは 0 であった (TNO)。米国食品医薬品局の基準に基づくと、CHPTAC は眼刺激性物質ではないと考えられる。

各群雌雄 3 匹ずつの NZW ウサギを用いた試験が行われている (Leuschner, 1977b)。ウサギの左眼に、50、25 もしくは 12.5%の CHPTAC が 0.1 mL 適用され、右眼は対照(蒸留水を適用)とされた。1 つの群に対しては、被験物質が「原濃度」のまま、同量適用された。その原濃度および被験物質の密度に関するデータは、いずれも示されていない。CHPTAC の 65% 水溶液の密度を 1.16 g/mL とすると、それぞれの適用用量は、原濃度の溶液の場合 111 mg、希釈溶液の場合 89、45 および 22 mg であったと考えられる。検眼は、被験物質を点眼してから 5、15 および 30 分後、ならびに 1、2、4、24、48 および 72 時間後に実施された。もう片方の対照の眼には、蒸留水が滴下された。原濃度(65%)の溶液の場合には、早い時間帯において、軽微な初期の結膜発赤、結膜浮腫、結膜における分泌過多が認められた。どの時点でも、角膜や虹彩には影響は何も認められなかった。結膜のスコアは、24 時間後には 0 となっていた。同様の反応が 50 および 25%溶液の場合にも認められたが、1 時間後には正常な状態に回復した。12.5%溶液の場合には、どの観察時点においても、スコアは全て 0 であった。

EU のガイドラインに準拠して、眼刺激性試験が実施されている。3 匹の NZW ウサギが用

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

いられ、65%CHPTAC の眼刺激性が検討された (Liggett et al., 1987b)。眼の事前検査を実施した後、被験物質を片方の眼の下眼瞼に滴下し、反対側の眼には処置は行わず、対照の役目を担わせた。点眼の 1 時間後ならびに 1、2、3、4 および 7 日後に、検眼を行った。Draize の基準に則した 0~4 の尺度により、角膜混濁度、虹彩機能、虹彩の解剖学的異常、ならびに結膜の発赤や浮腫に関する評価が行われた。3 匹全てが、点眼から 2 日後の時点で、結膜の発赤や浮腫を示していた。1 匹では 2 日後の時点で、一次的な角膜混濁が観察された。点眼から 4 日後の時点では、全ての被験動物の眼は、正常な状態となっていた。眼における反応のスコアは、以下の通りであった。

Table 4.4. Ocular reactions to CHPTAC (Liggett et al., 1987b)

Rabbit	Eye Region	24h	48h	72h	96h	Mean 24-48-72 h score	
1	Cornea	0	0	0	0	0	
	Iris	0	0	0	0	0	
	Conjunctivae	Redness	2	2	1	0	1.7
		Chemosis	2	1	0	0	1
2	Cornea	0	1	0	0	0.3	
	Iris	0	0	0	0	0	
	Conjunctivae	Redness	2	2	1	0	1.7
		Chemosis	1	1	1	0	1
3	Cornea	0	0	0	0	0	
	Iris	0	0	0	0	0	
	Conjunctivae	Redness	1	2	1	0	1.7
		Chemosis	1	1	1	0	1

3 匹の白ウサギを用い、その片方の眼の結膜嚢に 0.1 mL の 60%CHPTAC 溶液を滴下した試験が行われている。もう片方の眼は、処置を受けず、対照眼とされた (Degussa, 1983)。点眼の 1、24、48 および 72 時間後に、角膜混濁度、虹彩の異常、ならびに結膜の発赤や浮腫に関し、Draize のスコア尺度を用いて、臨床的な検眼が行われた。角膜や虹彩は、被験物質により有害影響を受けることはなかった。結膜は、点眼の 72 時間後までも、発赤、腫脹、分泌過多を示した。しかし、この試験報告の著者は、総合的な刺激性スコアに基づく、CHPTAC を刺激性物質とするのは妥当ではないとみなした。角膜や虹彩に関するスコアは、全てゼロであった。

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

Table 4.5: Mean irritation 24, 48, 72 h -scores of 60 % CHPTAC in rabbit eye (Degussa, 1983)

Rabbit	Eye Region		24h	48h	72h	Mean
1	Cornea		0	0	0	0
	Iris		0	0	0	0
	Conjunctivae	Redness	2	2	2	2
		Chemosis	2	1	2	1.7
2	Cornea		0	0	0	0
	Iris		0	0	0	0
	Conjunctivae	Redness	2	2	2	2
		Chemosis	2	1	1	1.3
3	Cornea		0	0	0	0
	Iris		0	0	0	0
	Conjunctivae	Redness	1	1	1	1
		Chemosis	1	1	0	0.7

4.1.2.3.4 刺激性の要約

皮膚

上述の皮膚刺激性試験に基づくと、CHPTAC は刺激性を示さない。CHPTAC は皮膚刺激症状を引き起こさない。

眼

CHPTAC は、最高濃度の 65% で適用された場合、わずかな刺激症状を引き起こした。刺激性のスコアは、基準に照らすと、刺激性物質に分類するのが妥当なほど高いものではない。もし、純粋な CHPTAC を用いて試験が実施された場合には、刺激性スコアが高くなることが予想され、刺激性物質として分類する根拠となり得る。

4.1.2.4 腐食性

刺激性試験の結果に基づくと、CHPTAC は腐食性を示さない。

4.1.2.5 感作性

4.1.2.5.1 皮膚動物における試験

皮膚

In vivo 試験

CHPTAC が遅延型接触過敏症を引き起こす能力を検討するため、OECD のガイドライン 406 に準じた試験が行われている。皮膚刺激性を検討した予備試験に続いて、65%CHPTAC 水溶液を用い、10 匹の Hartley/Dunkin 系白色モルモットの雌に対して、感作誘導が実施された。対照群にも、10 匹を配した。外科用ガーゼ片を 0.5 mL の被験物質で満たし、肩部の無毛領域に当てて 6 時間閉塞被覆することにより、感作誘導が実施された。その皮膚領域における発赤や浮腫について、被覆を除去した 24 時間後に評価を行った。被験物質の適用は、1 週間に 1 回、合計 3 回繰り返された。対照群の動物は、被験物質が使用されなかった以外、被験物質投与群と同様に処置された。被験動物は、3 度目の感作誘導の 2 週間後、被験物質への感作惹起に供された。感作惹起は、感作誘導の手順と同様に行われた。感作惹起を行った部位は、ガーゼ片を取り除いてから 24、48 および 72 時間後に診査した。感作誘導相の間中は、被験物質に対する反応は何も認められなかった。感作惹起相では、24 時間の時点で 2/10 匹に軽度の紅斑が認められ、これは 48 および 72 時間の時点では、軽度の限局性紅斑に転じていた。さらに、1 匹が 24 時間の時点で、もう 1 匹が 24 および 38 および 72 時間の時点で、限局性紅斑のみを示していた。しかし、感作惹起相での反応は、「決定的ではない」とみなされ、また、EU の分類基準に照らして皮膚感作物質とすることが妥当であるほど十分なものではなかった (Kynoch et al., 1988)。

これとは別に、マキシミゼーション法による感作性試験が、OECD 406 および EU ガイドライン 92/32/EEC (8)に準拠して実施されている。Pirbright White 系のモルモットの雌 10 匹と、2 つの対照群に各 6 匹ずつが、試験に用いられた (Degussa, 1993)。感作惹起は、皮内注射と、表皮における閉塞パッチの両方で行われた。表皮での感作惹起には、CHPTAC を 70%の濃度で含む溶液が適用された。この濃度は、刺激性が生じない最も高い濃度であることが確認されていた。1 回目の感作惹起相では、背中の肩甲骨の部位に、1 匹当たり 6 箇所で行われた。注入液の容量は 0.1 mL とされ、2 箇所では、フロイントの完全アジュバント (FCA) と生理食塩水 (1:1) が、別の 2 箇所では、被験物質溶液 (0.5%) と FCA (1:1) が、残りの 2 箇所では、被験物質のみが注入された。対照群では、被験物質以外はおなじ溶液が注入された。8 日目に、無希釈の被験物質 (70%溶液に相当) が、閉塞パッチを用いて肩甲骨の部位に適用された。パッチは 48 時間定位置に保持され、この処置による適用は 1 度だけであった。対照群の動物には、0.9%生理食塩水が適用された。1 回目の感

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

作誘導から 22 日目に感作惹起が実施され、この際には、0.9%生理食塩水を媒体とした 0.2 mL の 30%CHPTAC 溶液が、閉塞パッチにより適用された。右脇腹に被験物質が適用され、左脇腹には媒体が適用された。感作惹起での適用は、24 時間維持された。1 回目の感作惹起で明確な陰性結果が示されたため、2 回目の感作惹起は実施されなかった。

4.1.2.5.2 感作性のまとめ

CHPTAC は、感作性物質ではない。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1 動物における試験

In vivo 試験

経皮

各群雌雄 50 匹ずつの NMRI マウスを用いた経皮投与試験が実施されている。被験物質として 65.79%の CHPTAC(商品名 QUAB 188)が用いられ、その 0、0.018 ないしは 0.18 mL が、週 2 回投与された。これらは、1 匹当たりの目標用量としては、それぞれ 0、13.8 および 138 mg に相当した。試験期間中のマウスの平均体重を 48 g とすると、1 回の適用において、高用量は 2875 mg/kg、低用量は 288 mg/kg となり、週当たりでは、5750 mg/kg および 575 mg/kg の適用量であった。雄マウスには 105 週間、雌マウスには 89 週間、処置が行われた。被験物質(CHPTAC を 65.79 %、水を 32.36%含有)を 10%エタノールに溶解し、一定容量の 0.2 mL が、背中の剃毛した 2 cm² の皮膚領域に適用された(Degussa, 1997)。

被験物質投与群と対照群との間で、投与に関連した有意な相違は認められなかった。飼料消費量の変化は投与に関連したものではなかったが、高用量群の雄では時折統計学的に有意な変化が観察され、第 3 および 4 週、第 10 および 11 週、第 25 および 26 週、ならびに第 97 および 98 週において、より多くの飼料が消費された。第 49 および 50 週においては、同じ高用量群の雄で、やや飼料消費量が低下していた。低用量群では、第 65 および 66 週において、飼料消費量がやや低下していた。高用量群の雌では、第 3 および 4 週、第 11 および 12 週、第 13 および 14 週において、ならびに第 65 および 66 週から第 73 および 74 週にかけて、飼料消費量がわずかに増加していた。低用量群の雌では、第 3 および 4 週、第 11 および 12 週、ならびに 81 および 82 週において、飼料消費量がやや増加していた。

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

飼料消費量の合計は、低用量群の雌で 3.3%、高用量群の雌で 6.6% 増加していた。これらの変化は全般的に 10%より小さいわずかなものであったため、生物学的変動を反映したものとみなされた。試験期間中、投与に関連したものであるものの体重変化は認められなかった。低用量群の雄の体重は、11~21 週にかけて、57~61 週にかけて、および第 73 週において、軽度の上昇していた(それぞれ最高 6.5%、最高 5.0%、および 6.1%)。低用量群および高用量群の雌の体重は、第 65 週において、軽度の上昇していた(それぞれ 7.4%および 7.7%)。病理学的検査からは、高用量群の雄において、左側精巣の絶対重量および体重に対する相対百分率の、大きくはないが、統計学的に有意な減少が明らかとなった〔絶対重量：対照群では 0.223 g であったのに対し、低用量群では 0.214 g(-4%)、高用量群では 0.192 g(-14%)；相対百分率：対照群で 0.488 であったのに対し、低用量群では 0.477(-2%)、高用量群では 0.414(-15%)〕。高用量群の雌では、肝臓や副腎の絶対および相対重量の増加が示された。右側の腎臓の絶対重量も、高用量群の雌において増加していた。組織病理学的鏡検により、適用部位において、軽微ないしは軽度の限局性表皮肥厚および角質増殖が生じていたことが判明し、これらの発生率は、用量依存的な軽度の上昇を示していた。

経口

4 週間の経口毒性試験が、OECD の小規模試験ガイドラインに沿って、GLP 下で実施されている (Degussa, 1990)。対照群 1 群と被験物質投与群の 2 群が設けられ、両群とも雌雄 5 匹ずつのラット (Bor: WISW) から構成されていた。被験物質投与群には、1085 mg/kg の CHPTAC が強制経口投与され、対照群には水道水が与えられた。被験物質の純度は 69.57%で、28.44%の水、1.14%の 1,3-ビス-トリメチルアンモニウムプロパノール-2-ジクロライド、および 0.63%の 2,3-ジヒドロキシプロピル-トリメチルアンモニウムクロライドが含まれていた。被験物質の pH は 2.5 であった。当該投与量は、先行の用量設定試験の結果に基づいて選択された。臨床検査項目は、死亡率、体重、飼料および水消費量、反射、眼の状態、聴覚、歯牙、ならびに一般状態などであった。赤血球や白血球の基本的なパラメータも測定された。臨床生化学的項目の中では、肝トランスアミナーゼ酵素、コリンエステラーゼ、クレアチンキナーゼ、電解質、ビリルビン、尿素、ならびにコレステロール、トリグリセリドおよびタンパク質が測定された。尿分析では、ビリルビン、ウロビリリン、グルコース、ヘモグロビン、ケトン類、白血球、亜硝酸塩、重量浸透圧濃度、タンパク質、および pH が調べられた。屠殺後、臓器重量の測定を、両側の副腎、脳、心臓、両側の腎臓、肝臓、卵巣、および精巣について行った。肉眼的剖検の後、上記の臓器から組織病理学的検査用の試料を採取した。組織病理学的検査用の試料採取は、胸骨および胸骨髄、盲腸、結腸、十二指腸、回腸、空腸、直腸、皮膚、胃、および脾臓からも行った。

被験物質による処置が行われた唯一の群である第 2 群では、わずかに赤く変色した流涎、

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

前肢や首の脱毛といった臨床症状が認められた。1 匹の雌では、20 日目に、努力性呼吸、振戦および立毛が観察された。雌 2 匹が 2 回目の投与の 10 分後に死亡したため、予備の動物と入れ替えた。ただし、著者は、この死亡例は被験物質投与に関連したものではないとみなした。飼料消費量も体重増加量も、被験物質投与により、有意な影響を受けることはなかった。反射、眼の状態、聴覚および歯牙には、異常は現れなかった。被験物質投与群の血液学的パラメータには、対照群と比べて、統計学的に有意な変化は何も認められなかった。臨床生化学的検査では、対照群と比べ、わずかだが統計学的に有意なグルコース値の減少(-26%)が認められた。雌ラットでは、クレアチニン濃度が減少した一方、クレアチンキナーゼは上昇(202%)し、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)値は軽度に上昇した。しかし、これらの変化は、この系統のラットの正常範囲内に納まっていた。ASAT における変化は、軽度(22%)ではあったが、有意なものであった。クレアチンキナーゼ値は、広範囲にわたってばらつくことが知られており、測定値は背景対照値の範囲内であった。クレアチンキナーゼ値の上昇に相関する様な形態学的な変化は、何も検知されなかった。尿分析からは、被験物質投与に関連した所見は、何も得られなかった。臓器重量において、軽度だが有意性が認められた変化は、雄における心臓の絶対および相対重量の低下(それぞれ-16%および-14%)と、雄における腎臓の相対重量の増加(20%)のみであった。雌には、統計学的に有意な臓器重量の変化は現れなかった。肉眼剖検では、前肢(雄 1 匹)および頸部(雌 1 匹)の限局性脱毛、および、小腸近位部や腺胃部の発赤が認められた。後者は、被験物質投与には関連のない事由で試験の 2 日目に死亡した動物においてのみ、観察された所見である。鏡検では、腎臓の内側皮質領域および外側髓質領域の近位尿細管細胞において、軽度もしくは中等度の空胞化が、雄で 5/10 匹に認められたが、雌では認められなかった。この所見は、対照群の動物では認められなかった。さらに、この領域では、わずかな尿細管過形成(雄で 4/5 匹、雌で 2/5 匹)、および、軽微ないしは軽度の肥厚(雄で 5/5 匹、雌で 0/5 匹)も生じていた。対照群の動物は、過形成所見も肥厚所見も有していなかった。脱毛を示した雌ラットは、影響が及んだ皮膚領域の毛腺や皮脂腺に中等度の萎縮が見られると診断された。第 2 群における雌 2 匹の死因は、剖検からは判明しなかった。

4.1.2.6.2 反復投与毒性のまとめ

28 日間の小規模な経口投与試験では、腎臓の近位尿細管にほんの軽度の形態学的変化が認められた。腎臓における顕微鏡学的変化は、EPTAC でみられたものと同様と思われた。腎臓における組織病理学的変化に加えて、雄では 20%の相対腎重量の増加が認められた。左側の精巣重量の軽度な減少が、最高用量の 5750 mg/kg/週の経皮投与を受けていたマウスで確認された。しかし、有意な重量変化は、最高用量群の 1 個の精巣のみで記録されたものであり、しかも組織学的変化は認められていないため、この所見の毒性学的意義は不明確

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

なままであり、反復投与毒性の NOAEL を確定するためには用いられないと判断された。さらに、この経皮投与試験では、通常用いられない投与スケジュール、すなわち、週 2 回、が採用されている。一方、上述の経口投与試験では被験動物として、マウスより好ましいラットが用いられている。これらの事由から、ラットを用いたこの 28 日間試験のデータが、経口および吸入経路での最小影響量を確定する際に用いられることとなる。この 28 日間試験で観察された腎臓での変化に基づくと、CHPTAC の経口投与での LOAEL は、1085 mg/kg/日となる。吸入による全身影響に関する LOAEL としては、投与量の 50%が消化管から吸収されるとの過程に基づくと、543 mg/kg という値が採用される。

4.1.2.7 変異原性

4.1.2.7.1 *in vitro* 試験

何件ものエームズ試験が、すべて S9 代謝活性系の存在下と非存在下の両方で実施されている。Degussa(1984)による試験ならびに Richold et al(1982b および 1982a)による試験は、GLP に従って実施された。カナダ-米国規制協力評議会(RCC)による試験も、EEC 指令 79/831 の付属書 V、Method 431 に沿って実施された。Richold et al(1982a)の試験においては、S9 非存在下では全ての用量で、細胞毒性が認められたが、変異原性活性は認められなかった。Richold et al(1982b)の試験においては、5000 µg/mL の用量で、変異原性活性と軽度の細胞毒性が認められた。後者の試験では、S9 非存在下の 1500 µg/mL の用量で、変異原性が観察された。Richold et al(1982a)の試験では、媒体として緩衝水溶液(pH 4.0 または 5.5)が用いられたが、一方、Richold et al(1982b)の試験では、水だけが用いられた。Hassack et al.(1976)による試験、Degussa による試験(1982 および 1984)ならびに Mendrala (1984a)による試験では、細胞毒性は報告されていない。これらの試験では、工業等級の CHPTAC が用いられ、その純度は 60~65%であった。細胞毒性が報告されている試験では、被験物質濃度が提示されていない。Hüls(1984)による試験や Degussa(1979b)による試験では、細胞毒性についての言及がない。これら 2 件の試験と Hassack(1976)による試験では、溶媒としてジメチルスルフォキシド(DMSO)が使用された。Mendrala(1984a)による試験だけが、不純物についての記載を有していた。この試験では、工業等級と精製化物の、2 種類の CHPTAC が用いられた。工業等級の被験物質には、変異原性物質である 2,3-エポキシプロピルトリメチルアンモニウムクロライド(EPTAC)が、2.57%含まれていた。精製被験物質には、EPTAC は全く検出されなかった。他の試験とは対照的に、Mendrala(1984)では、突然変異が背景値の 3 倍の上昇を見せた場合にのみ、陽性反応であると判断された。変異原性が示されたすべての試験において、用量と変異コロニー数との間に、正の相関性が認められた。

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

Table 4.6 Microbial mutagenicity tests with CHPTAC

Test system	Concentrations (µg/plate)	Lowest effective dose (LED), (S9 in parenthesis, max LED mutant ratio in square brackets)	Positive strains	Reference
<i>S. typhimurium</i> TA 1535, 100	500, 1500, 5000, 15000 (water buffered to pH 4.0 or 5.5)	- (cytotoxic at all dose levels without S9)	-	(Richold et al., 1982a)
<i>S. typhimurium</i> TA 1535, 1537, 1538, 100, 98	150, 500, 1500, 5000, 15000 (water)	5000 [4.4] (1500, [2.4]) (slightly cytotoxic)	1535, 100	(Richold et al., 1982a)
<i>S. typhimurium</i> TA 1535, 1537, 1538, 100, 98	10, 50, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 (DMSO)	1000 [3.5], (1000, [2.9]) (no data on cytotoxicity)	1535, 100	(Hüls, 1984)
<i>S. typhimurium</i> TA 1535, 1537, 1538, 100, 98	10, 100, 1000, 10000, 50000, 100000	10000 [6.0] (10000, [3.0]) (not cytotoxic)	1535 (a slight but not two-fold increase in strain 100 at the highest dose)	(Mendrala, 1984a)
<i>S. typhimurium</i> TA 1535, 1537, 1538, 100, 98	5, 50, 500, 5000, 25000, 50000 (purified)	25000 [4.0] (25000, [4.8]) (not cytotoxic)	1535 (a slight but not two-fold increase in strain 100 at the highest dose)	(Mendrala, 1984a)
<i>S. typhimurium</i> TA 1535, 1537, 1538, 100, 98	1.58, 5, 15.8, 50, 158, 500, 1580, 5000	1580 [2.6] (1580, 2.1]) (not cytotoxic)	1537 (2.2, S9 only), 1535 (1.9, 500 µg/kg), 98	(Degussa, 1984)
<i>S. typhimurium</i> TA 1535, 1537, 1538, 100, 98, <i>E. Coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	400, 1000, 4000, 12000, 41000, 124000	12000 [2.4] (12000, [3.6]) (not cytotoxic)	1535, 100	(Degussa., 1982)
<i>S. typhimurium</i> TA 1535, 1537, 1538, 100, 98	1000, 5000, 10000, 12500, 20000, 25000 (DMSO)	10000 (10000) (no data on cytotoxicity)	1535, 100	(Degussa, 1979b)
<i>S. typhimurium</i> TA 1535, 1537, 1538	100, 1000, 10000, 100000 (DMSO)	10000 [5.6] (10000, [4.0]) (not cytotoxic)	1535	(Hassack et al., 1976)

リンパ球染色体分析

ヒトのリンパ球における 60%CHPTAC の染色体異常誘発性が調べられている。提供者のリンパ球を、S9 mix の存在下および非存在下で、0.016、0.049、0.148、0.444、1.333、4.000 ないしは 12.000 mg/mL の濃度の CHPTAC に曝露した(Wilmer, 1984)。この試験は、GLP に準拠して実施された。48 時間の予備インキュベーションの後、設定濃度となるように 100 µL の被験物質を添加した。試験は 2 系列で行われ、陰性対照と陽性対照も設けられた。添加の 2 時間前に、CO₂ 濃度は 10%まで上昇され、それにより、pH が下げられ、2,3-エポキシプロピルトリメチルアンモニウムクロライドの生成が極力防止された。被験物質で処置している間の pH は、約 6.8 であった。pH の測定は、被験物質添加の 2 時間後と、インキュベーション全体の終了時に実施された。合計 70 時間のインキュベーションの後、細胞はコルセミドで 2 時間処置され、染色体分析に向けた処理が行われた。S9 mix 添加用の

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

培養物は、48 時間後に遠心分離されて 3.5 mL の無血清培地に移され、それに 100 μ L の被験物質または対照物質が、1.0 mL の S9 mix と共に添加された。2 時間のインキュベーションの後、細胞を遠心分離して回収し、新鮮な培地に移してさらに 22 時間インキュベートした。このインキュベートの内の最後の 2 時間には、コルセミドによる処置が施された。こうして得られた細胞を、S9 処理無しの細胞の場合と同様に、染色体分析ができるように処理した。可能な限り、各培養物(25 細胞/標本)につき、それぞれ 46 個のセントロメアを含む、良く展開した分裂中期像 100 例について、分析を行った。分析項目は、ギャップ、切断、断片化、二動原体性、交換といった構造的異常などであった。

試験の結果、被験物質は、培養リンパ球において、染色体異常誘発活性を示すことが明らかとなった。観察された異常について、下表に列記した。最高濃度の 12.0 mg/mL については、染色体損傷が過度に生じたため、分析不能であった。S9-mix 存在下では、ギャップの頻度は高用量側の 2 群でのみ有意に増加し、切断の頻度は最高用量でのみ有意に増加した。したがって、CHPTAC は、*in vitro* では高用量の場合に染色体変異を引き起こす。

Table 4.7. Chromosome aberrations in human lymphocytes treated *in vitro*

Dose	Number of cells with aberrations			% of cells with aberrations		Mitotic index
	Gaps	Breaks	Exchanges	+ Gaps	- Gaps	
Control	7	1	0	8	1	7.0
0.016	14	1	0	15	1	6.3
0.049	20**	8*	0	27***	8*	4.5
0.148	17*	12**	1	30***	13**	4.7
0.444	24**	24***	0	39***	24***	3.4
1.333	28***	38***	3	55***	40***	2.7
4.000	65***	66***	5*	88***	66***	2.8
12.000	-	-	-	-	-	2.2
MMS	12	11**	12**	33***	22***	5.5

One hundred metaphases were analysed per each dose, * P<0.05; **P<0.01; ***p<0.001

肝細胞不定期 DNA 合成試験

GLP に従って、試験が実施されている。ラットの肝細胞を、コラゲナーゼ溶液を用いた灌流により *in situ* で回収し、初代培養細胞として確立させた。回収された細胞は、ウシ胎仔血清を含む Williams E 培地に移植された (Mendrala, 1984c)。試験手順は、OECD 482 の勧告にほぼ整合していた。0.001、0.00316、0.01、0.0316、0.1、0.316、1.0、3.16 または 10 mg/mL の CHPTAC を含み、10 μ Ci/mL の ³H-チミジンを含む培養物が調製された。これらの濃度が選択された理論的根拠は示されていない。陰性対照の系には培養液のみが含まれ、2-アセチルアミノフルオレンが陽性対照物質として用いられた(4 濃度)。培養液中に被験物質と ³H-チミジンを含む培養物は、3 系列が設けられ、18 時間インキュベートされた。

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

インキュベーションの後、細胞は、1 mM の非標識チミジンを含む培養液で、37°C で 30 分ずつ 3 回洗浄された。それから細胞は、マイクロオートラジオグラフィ用のカバーガラスに固定された。1 用量につき 2 標本、それぞれの標本につき 15 個の細胞が評価され、粒子数が、平均 ± 標準偏差で提示された。

CHPTAC は、0.1 mg/mL よりも高い濃度で、用量関連的に、不定期 DNA 合成を有意に増高させた。しかし、CHPTAC は、それら高用量において、用量依存的に明確な細胞毒性を引き起こし、その現れ方は、0.1 mg/mL での軽度の粒子様状態への変化から 10 mg/mL での完全な剥離まで、多岐にわたっていた。0.1 mg/mL 未満の濃度では、陰性対照の細胞と同等の結果が得られた。著者は、この試験で観察された陽性反応は、CHPTAC からの転換により 2,3-エポキシプロピルトリメチルアンモニウムクロライドが生成されたためと解釈している。著者は、CHPTAC の pH 滴定で試験系の pH が 7.4 であったことに基づき、CHPTAC の EPTAC への転換率は、1~3%であったと考えている。当該エポキシドは消費されやすく、すなわち、細胞の高分子の求核性部位と反応して消費されるため、平衡はさらなるエポキシドの生成に傾く。CHPTAC は不定期 DNA 合成を増高させるが、最高濃度では、顕著な毒性が引き起こされる。

チャイニーズハムスター卵巣細胞における遺伝子突然変異

CHPTAC がチャイニーズハムスター卵巣細胞のヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (CHO/HGPRT) 遺伝子座で前進突然変異を引き起こす能力について、51%CHPTAC 水溶液を用いて、検討が行われている (Mendrala, 1984b)。この試験は、GLP に従って実施された。試験手法は、OECD ガイドライン 476 の勧告に、ほぼ整合していた。被験物質水溶液は、1.3%の 2,3-エポキシプロピルトリメチルアンモニウムクロライド (EPTAC) を含有していた。試験系の pH は 7.4 であったが、これは純粋化合物の滴定曲線に基づく、最大で 50%が EPTAC に転換される可能性があることを意味している。被験物質で処置している間の重量モル浸透圧濃度や pH のモニタリングデータは存在しない。細胞毒性の検討結果に基づき、6 用量、すなわち 0.1、1.0、5.0、10.0、25.0 および 50.0 mg/mL が、試験に際し、選択された。S9 活性系を用いた場合には、添加された被験物質の濃度は、0.09、0.9、4.6、9.1、22.7 および 45.5 mg/mL であった。細胞は約 2×10^4 の密度で接種され、被験物質処置の前に、16~18 時間そのまま培養された。それから、細胞は、無血清培地中で、被験物質と共に、4~5 時間インキュベートされた。被験物質との処置後、細胞は、血清含有培地に移され、16~24 時間培養され、それからトリプシン処理されて、表現型発現を検討するために、 2×10^4 個/cm² の濃度に希釈された。細胞は 8 日目まで継代培養され、その後 5 倍希釈されてから、HGPRT 変異株検出のための選択培地に移植された。コロニーを形成させた後、細胞を固定して、計測された変異コロニー数を総細胞数で除算し、クローン形

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

成率で補正することにより、変異頻度を算出した。代謝活性系を用いた場合の手法は、被験物質との処置中にラット肝ホモジネートの S9 分画が添加されたことだけが、代謝活性系を用いなかった場合と相違していた。メタンスルホン酸エチルが、陽性対照として用いられた。代謝活性系を用いた場合には、3-メチルコラントレンが陽性対照物質として用いられた。陰性対照については、被験物質を除き、代謝活性系非存在下と同等であった。結果は、3 用量で用量依存的に有意な変異原活性がみられた場合、陽性と判断された。また、細胞毒性の検討により本試験の最高用量とされた用量で、変異原性とみなされる有意な反応が、再現性をもって観察された場合にも、結果は陽性と判断された。S9 非存在下の場合は、1 mg/mL を超える濃度において、用量依存性に有意な突然変異頻度の増加が生じた。代謝活性系を用いた場合は、0.9 mg/mL 以上の濃度で、用量依存性に有意な突然変異頻度の増加が引き起こされた。最高用量では、細胞に致死損傷が及んだ。

4.1.2.7.2 *In vivo* 試験

マウス小核試験

OECD のガイドライン 474 に準拠した試験が実施されている。CHPTAC(純度 99.92%)の 60%溶液が突然変異を誘発する能力について、BOR:NMRI マウスの雄 21 匹、雌 24 匹を用いて検討が行われた。CHPTAC の投与用量は 147 mg/kg であった(Degussa, 1992)。陰性対照群には生理食塩水が与えられ、陽性対照群には、51 mg/kg のシクロホスファミドが強制経口投与された。これらの対照群には、雌雄 18 匹ずつが配された。被験物質投与群および陰性対照群に対しては、腹腔内注射により投与が行われた。試験期間中、臨床症状が記録された。試験期間中に死亡した動物は、肉眼剖検に供した。24、48 および 72 時間の時点で、少なくとも雌雄 6 匹ずつを屠殺し、骨髄塗抹標本を作製した。各個体につき、1000 個の多染性赤血球(PCE)を観察対象とし、正染性赤血球(NCE)に対する割合を算出して、試験における毒性効力を判定した。観察された臨床症状は、間代性痙攣、筋緊張性の低下、立ち直り反射の消失による側臥位および仰臥位、横腹の落ちくぼみ、ぎこちない歩様などであった。被験物質投与群の雌 5 匹が、投与後 14 分間以内に死亡した。陰性対照群および陽性対照群の動物は、いずれも異常な臨床症状を示すことはなかった。

雌雄とも、3 時点のいずれにおいても、PCE 中での統計学的に有意な小核形成増加を示さなかった。雌雄における観察結果を合わせて分析した場合には、軽度だが統計学的に有意な小核形成の増加が、48 時間の時点での PCE について確認された。しかし、著者は、この所見について、被験物質に関連したものとは見なさず、陰性対照群の雄における PCE の出現率が試験施設における背景対照と比較して極端に低かったためではないかと推測した。PCE/NCE 比については、48 時間目の試料採取時点における雄 1 匹の例を除き、低下は認

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

められなかった。著者は、マウスに 147 mg/kg の用量で CHPTAC を単回腹腔内投与しても、24、48 ないしは 72 時間後の時点で、染色体突然変異は誘発されないと結論付けている。

Table 4.8 PCEs with micronuclei scored in 1000 PCEs with PCE/NCE in control animals

PCE and PCE/NCE / animal 82.5 mg/kg CHPTAC (i.p.)	24h				48h				72h			
	PCE (M)	PCE/NCE (M)	PCE (F)	PCE/NCE (F)	PCE (M)	PCE/NCE (M)	PCE (F)	PCE/NCE (F)	PCE (M)	PCE/NCE (M)	PCE (F)	PCE/NCE (F)
1	3	2.05	1	1.77	1	1.40	1	2.13	0	2.55	0	2.41
2	0	1.71	1	1.97	2	2.04	2	1.86	1	4.05	0	3.33
3	1	1.93	2	1.67	0	2.09	1	1.72	1	2.70	1	3.47
4	2	2.45	2	1.67	0	1.20	2	1.57	0	2.80	1	3.13
5	2	1.89	1	1.96	0	1.75	2	1.42	0	3.41	1	1.78
Mean	1.6		1.4		0.6		1.6		0.4		0.6	

Table 4.9 PCEs with micronuclei scored in 1000 PCEs with PCE/NCE in CHPTAC treated animals

PCE and PCE/NCE / animal 82.5 mg/kg CHPTAC (i.p.)	24h				48h				72h			
	PCE (M)	PCE/NCE (M)	PCE (F)	PCE/NCE (F)	PCE (M)	PCE/NCE (M)	PCE (F)	PCE/NCE (F)	PCE (M)	PCE/NCE (M)	PCE (F)	PCE/NCE (F)
1	0	1.41	0	1.62	2	1.92	2	1.58	1	3.93	1	2.65
2	2	3.31	1	1.82	0	1.97	3	2.88	2	3.12	2	3.42
3	3	2.53	1	1.21	2	1.89	1	1.64	2	2.39	1	2.38
4	2	1.49	1	1.19	1	0.69	4	2.88	1	1.59	0	1.86
5	1	2.07	3	0.96	3	2.10	4	1.75	2	3.12	0	3.22
Mean	1.6		1.2		1.6		2.8		1.6		0.8	

Table 4.10. The statistical evaluation of mouse micronucleus test (Poisson test)

PCE with micronuclei/Group	24h		48h		72h	
	M	F	M	F	M	F
CHPTAC	8	6	8	14	8	4
Negative control	8	7	3	8	2	3
F	0.8889	0.7500	2.0000	1.5556	2.6667	1.0000
p-value	0.598	0.7090	0.113	0.143	0.055	0.500
Positive control	154	138	94	29	35	19
Negative control	8	7	3	8	2	3
F	17.1111	17.2500	23.5000	3.2222	11.6667	4.7500
p-value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

4.1.2.7.3 変異原性のまとめ

CHPTAC を用いて実施された *in vitro* の変異原性試験では、すべて陽性結果が得られている。しかし、これらの結果の解釈は、CHPTAC の純度の問題がある場合もあったことから、幾分複雑である。エームズ試験の結果をみると、明らかな陽性を示したのは、TA1535 および TA100 株で、これは 2,3-エポキシプロピルトリメチルアンモニウムクロライド (EPTAC) で陽性であった株と同一である。この事象については、少なくとも 2 つの説明が

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

可能である。使用されたのが工業等級の CHPTAC である場合、約 2~3%の EPTAC が不純物として含まれている。精製された CHPTAC が使用された場合でも、pH に応じてより反応性の高いエポキシ体へと転換されてしまう。pH が 9 の場合、約 80%の CHPTAC が EPTAC へと転換され、典型的な *in vitro* 試験系で設定される pH 7.5 では、最大 50%の転換が生じ得る (Mendrala, 1984a; Raisio Chemicals, 2004a)。さらに、Richold et al.(1982a)は、被験物質用の媒体が pH 4.0 または 5.5 に緩衝化されていた場合には、通常陽性を示す TA1535 株において、変異原活性が認められなかったことを報告している。したがって、CHPTAC それ自体が変異原性物質では無くても、体内では変異原性の EPTAC が生じ得る。しかし、CHPTAC が体内に取り込まれる際、どのような挙動を示すのかは明らかではない。CHPTAC がどのような毒物動態学的帰結を迎え得るかについては、情報が得られていない。*In vivo* マウス小核試験では、ほぼ純粋な CHPTAC から pH 3~6 の 69%水溶液を調製し、動物に投与した場合に、陰性結果が得られた。被験物質が腹腔内注射により投与されているため、被験物質の帰結について、少なくとも 2 つの予測が立てられる。腹腔経由で投与された場合、CHPTAC は腹腔から直接的に体循環に取り込まれ、あるいは、門脈を介して肝臓に取り込まれて他の臓器に達する前にそこで生体内変換を受けるものと考えられる。したがって、CHPTAC は未変化のまま体循環に乗るか、あるいは、体循環に乗ることなく、また骨髄に入り込むことなく体内変換を受けて胆汁中に放出されるものと考えられる。CHPTAC の毒物動態学的情報は得られておらず、その *in vivo* での変異原性について、何らかの決定的な結論を導き出すことは困難である。別の組織について *in vivo* 変異原性試験 (UDS など)が行われれば、この問題を解決するのに役立つものと考えられる。

Table 4.11: Mutagenicity of CHPTAC in mammalian cells

Test system	Concentrations	Result	Reference
Clastogenic effects in lymphocyte chromosomes (<i>in vitro</i>)	from 0.016, 0.049, 0.148, 0.444, 1.333, 4.000 12.000 mg/ml	Positive	(Wilmer, 1984)
Rat liver UDS (<i>in vitro</i>)	0.001, 0.00316, 0.01, 0.0316, 0.1, 0.316, 1.0, 3.16 and 10 mg/ml	Positive	(Mendrala, 1984c)
Chinese hamster ovary cell mutation (<i>in vitro</i>)	0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0 and 50.0 mg/ml, 0.09, 0.9, 4.6, 9.1, 22.7 and 45.5 mg/ml with S	Positive	(Mendrala, 1984b)
Mouse micronucleus test (<i>in vivo</i>)	147 mg/kg	Negative	(Degussa, 1992)

結論

CHPTAC は、*in vitro* で変異原性を示す。*In vivo* での変異原性については、マウス小核試験において、陰性結果が示された。1 件の試験しか情報が得られていないため、CHPTAC が

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

in vivo 変異原性物質であるかどうかは不明確である。目下のところ、この評価項目について、断定的な結論を導くことはできない。しかし、リスクの総合評価という本書の目的に照らすと、この評価項目について、さらに *in vivo* データを積み上げる必要はないと思われる。そうしたデータが得られても、リスク削減策の向上には役立たないと考えられるからである。

4.1.2.8 発がん性

4.1.2.8.1 動物における試験

In vivo 試験

経皮

各群雌雄 50 匹ずつの NMRI マウスを用いて、経皮投与試験が実施されている。65.79%CHPTAC(商品名 QUAB 188)が、1 匹当たりの目標用量を 0、13.8 および 138 mg とし、0、0.018 もしくは 0.18 mL の容量で、週 2 回投与された(Degussa, 1997)。被験物質には 32.36%の水が含まれていたと報告されているが、残りの 1.85%の内容については情報が提示されていない。pH は 4 であった。製品提供会社の現行のウェブページによると、CHPTAC 濃度が 65%で pH が 4~6 の QUAB 製品の規格は以下の通りとなっている。エポキシド体含量 500 ppm 以下、グリコール含量 0.8%以下、エピクロロヒドリン含量 10 ppm 以下、および 1,3-ジクロロプロパノール含量 20 ppm 以下(Degussa, 2003)。試験期間中のマウスの平均体重が 48 g であったとすると、1 回の投与あたりの用量は、高用量で 2875 mg/kg、低用量で 288 mg/kg と算出され、1 週間当たりの投与用量としては、それぞれ 5750 mg/kg および 575 mg/kg に相当した。雄マウスには 105 週間、雌マウスには 89 週間、投与が行われた。被験物質(CHPTAC65.79%および水 32.36%)は、適用容量が 0.2 mL となるように 10%エタノールに溶解され、剃毛した背部の 2 cm² の皮膚領域に適用された。適用時の CHPTAC 濃度は、それぞれ 5.9%および 59.2%に相当した。この試験の期間は、背景対照データを得た試験の平均期間よりも長いため、対照群におけるがん発生率が、高めになる傾向があり得ることに留意すべきである。被験動物には臨床的検査が行われて、死亡率や臨床症状が観察され、触診により組織の肥大や変化が調べられ、反射、眼、聴覚および歯牙の検査も実施された。飼料消費量および体重が、定期的に測定された。血液試料が第 52 週(雌)と第 79 週(雄)に採取され、白血球百分率が測定された。試験終了時にも血液試料が採取され、白血球百分率や基本的な赤血球パラメータなどが検討された。被験動物は屠殺後に詳細な肉眼剖検に供され、頭蓋腔、胸腔および腹腔の検査などが行われた。病変

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

がみられた全ての組織を含め、50種類の組織から試料が採取・保存された。副腎、腎臓、肝臓、卵巣および精巣の重量測定が行われた。保存した組織試料から、組織病理標本が作製された。Dunnettの検定を用いて、被験物質投与群と対照群との間の腫瘍発生率の差について、統計学的有意性が調べられた。この試験は、医薬品安全性試験実施基準(GLP)およびOECDガイドライン451(1)に準拠して実施された。

試験期間中、被験物質投与に関連した臨床症状は何も認められなかった。被験物質投与群と対照群との間には、投与に関連した有意な相違は何も認められなかった。雌では投与開始後89週目に、雄では105週目に、生残率が、限度の25%に到達した。飼料消費量は、全般的には投与に関連した変化を示さなかったが、高用量群の雄では、第3および4週、第10および11週、第25および26週、ならびに第97および98週において増加が示され、散発的に統計学的に有意な変化として観察された。第49および50週では、高用量群の雄の飼料消費量は若干減少していた。低用量群では、第65および66週において、飼料消費量が若干低下していた。高用量群の雌では、第3および4週、第11および12週、第13および14週、ならびに第65および66週から第73および74週にかけて、飼料消費量がわずかに増加していた。低用量群の雌では、第3および4週、第11および12週、ならびに第81および82週において、飼料消費量のわずかな増加が示された。飼料消費量の合計は、低用量群の雌では3.3%、高用量群の雌では6.6%増加していた。これらの変化は全て10%を下回るわずかなものであることから、生物学的なばらつきによるものとみなされた。試験期間中、投与に関連したとみられる体重の変化は認められなかった。低用量群の雄の体重は、第11~21週にかけて、第57~61週にかけて、および第73週において、軽度の上昇を示した(それぞれ最高6.5%、最高5.0%、および6.1%)。低用量および高用量群の雌の体重は、第65週において、わずかに増加していた(低用量群で7.4%、高用量群で7.7%)。病理学的検査では、高用量群の雄において、左側精巣の絶対重量および体重に対する相対百分率が、わずかだが、統計学的に有意に減少しているのが観察された[絶対重量：対照群で0.223 gであったのに対し、低用量群で0.214 g(-4%)および高用量群で0.192 g(-14%); 相対百分率：対照群で0.488であったのに対し、低用量群で0.477(-2%)および高用量群で0.414 g(-15%)]。高用量群の雌では、肝臓および副腎の絶対および相対重量の増加が示された。高用量群の雌では、右側腎臓の絶対重量も増加していた。組織病理学的検査では、適用部位に、軽微ないしは軽度の限局性表皮肥厚および角質増殖が生じていたことが判明し、これらの発生率は、用量依存的な軽度の上昇を示していた。適用部位やその周辺で散発的に観察された腫瘍や過形成性変化は、被験物質投与に関連したものではないと判断された。気管支肺胞上皮の腺腫およびがん腫の発生率(両者を合わせた数値)が、雌雄両方において、用量依存的に増加していた。腫瘍の発生率ならびに観察された腫瘍の型を、下表にまとめて示した。

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

Table 4.12: Neoplastic Findings in Lungs (absolute incidence in the study)

Finding	0 mg/kg/week		575 mg/kg/week		5750 mg/kg/week	
	M	F	M	F	M	F
Hyperplasia	4	0	5	2	4	3
Benign Tumour	7	3	8	8	12	7
Malignant Tumour	10	6	14	5	16	10
Benign or Malignant tumour	17	9	22	13	28*	17

All groups had 50 animals. * = $p < 0.05$, incidental analysis (Fisher exact test)

肺がん、肺腺腫および過形成の発生率を別々にみると、統計学的に有意に増加していたものはなかった。別の統計学的分析により、**5750 mg/kg/週**群での発生率増加には、陽性傾向があることが示された。上述の所見の発生率は、低用量群でも幾分高く、傾向検定で陽性結果が得られた要因となった。ただし、群間検定では、いかなる統計学的分析によっても、有意差を示す結果は何も得られなかった。

高用量群の雌雄両方において、胃の腺性粘膜に限局性過形成が高い頻度で認められ、統計学的に有意な陽性傾向 ($p < 0.05$) が示された。高用量の雌だけでとらえた場合もしくは高用量の雌雄を合わせてとらえた場合、群間検定で有意差が示された。悪性度の高い病巣が増加するよりも、過形成の発生率が高くなったことが、この分析結果が得られた主な要因であった。精巣に関しては、過形成と腫瘍の発生率を合わせて統計学的に分析すると、低用量群 (**575 mg/kg/週**) では、精巣腫瘍の発生率が有意に減少していた。しかし、この減少には用量関連性はみられず、被験物質投与に関連した所見ではないと考えられた。被験物質投与群では、ハーダー腺腫瘍が若干多く認められたが、統計学的分析では、被験物質投与との有意な関連性は何も示されなかった。ただし、雌雄両方の結果を合わせて分析した場合、当該腫瘍の発生率には、有意な軽度の陽性傾向が認められた。腫瘍の発生率と過形成の発生率を合わせて分析した場合には、有意性は消失した。全ての腫瘍の発生率を検討した場合、**5750 mg/kg/週**群において、多巣性の悪性腫瘍の発生率が最も高いことが示された。陽性傾向は、この群の雌雄両方の数値を合わせて分析した場合にのみ、有意と判定された。著者は、この群において肺腫瘍や偶発的な腫瘍が高頻度で認められたことにより、偶発的にこのような知見がえられたものと判断した。また、全ての腫瘍に関する分析の結果、標的組織が特に明確ではない非常に発生率の低い腫瘍が合わさって全体の頻度上昇をもたらされた。この頻度上昇は、有意性は高かった ($p < 0.01$) が、いくつかの無関係な腫瘍に関する成績を合算したために生じた人為的な結果であると考えられた。投与に関連した非腫瘍性の毒性変化は、何も認められなかった。

考察

CHPTAC は、マウスに2年間皮膚適用した試験において、皮膚腫瘍を引き起こさなかった。この発がん性試験において、被験物質投与に関連していると思われる唯一の評価項目は、細気管支肺胞腫瘍および過形成の発生率上昇であった。腫瘍発生と被験物質投与との間に正の相関関係があることを支持する所見が挙げられた。

低用量群での腫瘍発生率には対照群との有意差は認められなかったが、陽性傾向があるように思われた。さらに、高用量群での発生率は、有意に高値であったばかりでなく、腫瘍の自然発生率に関してこの動物種で過去に得られた値(別の試験実施者が同じ育種者の同種の動物を利用)も上回っていた。

観察された肺腫瘍は、被験物質投与とは無関係であり偶発的な所見であるとも考えられる。この考えを支持するものとして、この試験の期間が過去の背景データで言及されている試験における典型的な試験期間よりもかなり長く、そのため腫瘍発生率の数値が押し上げられたと思われることが挙げられる。さらに、統計学的分析で得られた有意性の水準がそれほど高くない($p < 0.05$)ことも、この肺における腫瘍に関するデータが偽陽性である可能性を支持している。肺の腫瘍がわずかに増加したことで、腫瘍誘発性よりもむしろプロモータ活性が示されたとも考えられる。この考えの根拠は薄いですが、被験物質がそうして実際に影響をもたらす可能性を完全に排除することはできない。

高用量群では、雌雄両方において、胃の腺粘膜に限局性の腺過形成が高頻度で認められ、この所見は統計学的に有意な用量関連傾向を示すものであった。群間検定では、有意差が示されたのは、高用量群の雌に関してと、雌雄を合わせた数値に関してのみであった。認められた増殖性変化は、ほとんどが軽微もしくは軽度のものであった。この変化は、適用部位を舐めたことによる経口曝露があったことを示しているとも考えられるし、また、老齢マウスに一般的にみられる病変であることから、偶発的に生じたものであるとも考えられる。

CHPTAC は、*in vitro* で実施された変異原性試験のほとんどで、陽性を示した。Richold et al. (1982a) が示したように、pH が、*in vitro* での変異原性に対して、影響力を有するようである。低い pH で実施されたエームズ試験では、変異原性の反応は全く認められなかった。生理学的 pH では、約 1~3% の CHPTAC が、近い関係にあるエポキシド化合物、すなわち 2,3-エポキシプロピルトリメチルアンモニウムクロライド (EPTAC) に転換されると予想され、EPTAC の生成が、*in vitro* 試験の多くでみられた変異原性反応を引き起こしたと考えられる (Mendrala, 1984a)。ただし、これとは対照的に、実施が確認された唯一の *in vivo* 試験、すなわちマウスの骨髄における小核試験では、陰性結果が得られた。

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

CHPTAC の全身投与量の算出

全身投与量に対し、適用部位を舐めること等による、意図しない経口曝露はそれほど意味を持たないものと見なし、皮膚吸収試験の結果を考慮して、皮膚適用試験における全身投与量を算出した。適用された溶液の濃度により吸収量に変化するため、2つの別々の吸収百分率を採用した。

高用量群

外部適用用量: 5750 mg/kg/週

適用溶液濃度: 59%、適用量: 平均体重 48 g の動物 1 匹当たり 138 mg を週 2 回。65%溶液の総吸収百分率(*in vitro* 皮膚吸収試験の結果): 13%。吸収率 13%で算出した用量: 5750 mg/kg/週の適用は、748 mg/kg/週もしくは 107 mg/kg/日(週 7 日間投与で計算)に相当する。

低用量群

外部適用用量: 575 mg/kg/週

適用溶液濃度: 5.9%、動物 1 匹当たり 13.8 mg を週 2 回、平均体重 48 g。総吸収百分率(*in vitro* 皮膚吸収試験の結果、1%溶液): 29.2%。吸収率 29.2%で算出した用量: 575 mg/kg/週の適用は、168 mg/kg/週もしくは 24 mg/kg/日(週 7 日間投与で計算)に相当する。

作用の現れ方には閾値があるものと考えられることから、最小毒性量もしくはベンチマーク用量を導出することができる。ベンチマーク用量(BMD)の導出は、CHPTAC の発がん性を推定するための US EPA の手法を用い、Degussa により実施された(Annex 1 参照)。腫瘍に関して得られた上述のデータを多段階モデルに適用することにより、両方の濃度の被験物質に関し、10%を超過するリスクが生じる場合の BMD(ED₁₀)およびベンチマーク用量安全側限界値(LED₁₀)を推算することができる。ED₁₀ は、10%以上で反応がみられる用量を意味する。LED₁₀ は、当該 BMD の片側 95%信頼区間の最小信頼限界値を示している。こうして得たベンチマーク用量を、発がん物質の作用機序に応じ、線形的な外挿もしくは非線形的な推量の出発点として用いることができる。この様に算出を行ったところ、週 5 日の投与の場合、悪性および良性を合わせた腫瘍に関し、BMD_{0.1}として、465 mg/kg/日という値が得られた。計算の概要については、Annex 1 を参照のこと。

4.1.2.8.2 発がん性の要約

上述の曝露条件下でマウスに経皮適用した場合、CHPTAC は、局所的な発がん性を示さない。一方、気管支肺胞腫瘍の発生率が増加したことから、全身性の発がん物質である可能性がある。しかし、全身性の腫瘍の証拠は比較的弱いもので、一部は試験期間が通常より

EURAR (3-CHLORO-2-HYDROXYPROPYL)TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

も長かったことも影響していた。*In vivo* での変異原性に関する情報が不十分であるため、これらの腫瘍が、閾値の無い遺伝毒性機序により直接的に生じた可能性を除外することはできない。化学物質の分類と表記に関する作業部会は、CHPTAC を、Xn; Carc. Cat. 3; R40 (有害; 発がん性に関しある程度の証拠がある)に分類することを承認した。

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

生殖試験のデータは得られていない。ラットの 28 日間試験では、1085 mg/kg でも、性腺への影響は認められなかった。マウスに 2 年間にわたり皮膚適用が行われた試験では、高用量群で 138 mg の CHPTAC が週 2 回投与され、同群で、軽度だが有意な左側精巣重量の減少(最大 14%)が認められた(Degussa, 1997)。高用量群の被験動物は、対照群と比べ、左側精巣の絶対重量が 14%減少し、左側精巣の体重に対する相対百分率は 15%低下した。低用量群の被験動物は、精巣の絶対重量について、統計学的に有意な減少は示さなかったが、その値は対照群のものよりも、約 4%小さかった。右側精巣の絶対重量は、低用量群で 5%、高用量群で 9%低い値であったが、いずれも統計学的に有意ではなかった。右側精巣の相対重量も同等の減少を示したが、統計学的に有意なものではなかった。これらの重量変化が生殖性へ及ぼす意義については不明である。上述の 28 日間経口投与試験からは、1085 mg/kg という LOAEL (性腺への影響に関する NOAEL) が得られ、消化管からの吸収を 50%とすると、全身投与用量として、543 mg/kg/日という値が算出される。高用量での総吸収百分率を用いると、経皮試験に関しては、LOAEL として 107 mg/kg/日、NOAEL として 24 mg/kg/日 が得られる(前述の算出法による)。

4.1.2.9.2 発生毒性

発生毒性の評価に有用な試験データは得られていない。

4.1.2.9.3 生殖毒性のまとめ

現段階では、生殖毒性に関して決定的な結論を導くことはできない。