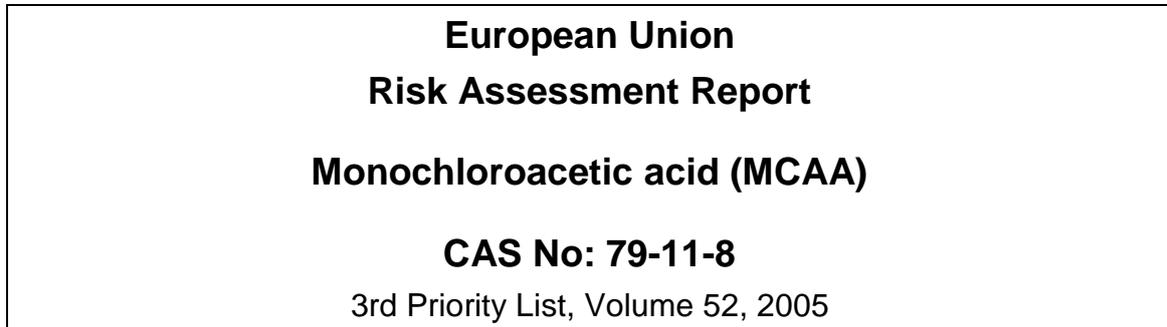


部分翻訳



欧州連合
リスク評価書 (Volume 52, 2005)
クロロ酢酸

The cover features a vertical yellow bar on the left with the text: "European Union Risk Assessment Report monochloroacetic acid (MCAA)", "CAS: 79-11-8", "EC: 201-178-4", "PL 3", and "52". The main grey area contains the following information:

- Institute for Health and Consumer Protection
- European Chemicals Bureau
- Existing Substances
- European Union Risk Assessment Report
- CAS No: 79-11-8
- EINECS No: 201-178-4
- monochloroacetic acid (MCAA)
- Chemical structure: ClCC(=O)O
- 3rd Priority List
- Volume: 52
- EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL Joint Research Centre
- EUR 21403 EN

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部
2016年8月

4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量（濃度）－反応（影響）評価

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 動物での研究

経口

[1-¹⁴C]-MCAA（monochloroacetic acid、クロロ酢酸、1.0 μCi、強制経口投与）を 35 匹の Sprague Dawley 雄ラットに 0.06 mg/kg の用量で単回経口投与すると、血漿、肝臓、腎臓、心臓、精巣ならびに脾臓の放射能は投与 1～2 時間後にピークとなり、その後速やかに減衰した（ $t_{1/2}$ = 2～7 時間）。しかしながら、脳の放射能は他の臓器より低いながら投与後 8 時間まで上昇を続け、その後プラトーに達し 24 時間まで続いた。このデータは MCAA が経口経路により速やかに吸収されることを示している。

尿中排泄は主として最初の 24 時間に起こる（投与量の 51%）（Berardi and Snyder, 1983; Berardi, 1986a）。

実験 2 では、[1-¹⁴C]-MCAA（1.0 μCi）を Swiss-Webster 雄マウス（6 匹/用量群）に 0.6、150 または 250 mg/kg の用量で単回経口投与した。MCAA は経口経路により速やかに吸収され、非神経系組織では 12 時間、中枢神経系組織では 26 時間を超えない半減期で体内より速やかに排出された。腸および腎臓では排出相が他の組織より早いように見えた。投与 24 時間後には投与された MCAA の 32.0～59.3% が尿中に排出され、72 時間後には 33.7～60.8% の MCAA-相当物が尿中に排出された。尿中の主要代謝物は S-カルボキシメチル-L-システイン（S-carboxymethyl-L-cysteine）および硫化二酢酸（thiodiacetic acid）であった。マウスにおける MCAA の分布パターンは、MCAA のトキシコキネティクス特性が用量依存的事であることを示している。150 および 250 mg/kg の用量では、マウス脳領域の組織内最高濃度は血漿濃度に極めて近かった（Berardi, 1986a）。

Buphendra et al.（1992）は、0.1 mmole/kg bw（9.5 mg/kg bw に相当）の [1-¹⁴C]-MCAA を 15 匹の Sprague-Dawley 雄ラットに単回経口投与（媒体は未記載）して MCAA の体内分布を調べた。投与後 4、8、12、24 ならびに 48 時間目に動物（3 匹/時点）を屠殺した。MCAA の尿中排泄物やその代謝物は、24 時間で投与量の 90% が認められた。尿中排泄物および様々な組織で見られた ¹⁴C-標識の分布（Table 4.5 参照）は、MCAA が速やかに吸収されて体内から排出されることを示唆している。腸および腎臓では排出相が他の組織より早いよ

うに見える。放射能の最高レベルは投与 4 および 8 時間後の腸および腎臓で検出され、これより低いレベルで降順に肝臓、脾臓、精巣、肺、脳および心臓と続いた。

Table 4.5 Distribution of ^{14}C -label in different tissues of rats treated with a single oral dose of 0.1 mmole/kg bw [^{14}C]CAA

Tissues	Hours after treatment				
	4	8	12	24	48
Intestine	192.1 ± 8.8	154.0 ± 4.5	16.1 ± 0.8	8.5 ± 0.6	4.0 ± 0.1
Kidney	191.5 ± 13.8	156.3 ± 4.8	33.6 ± 1.3	16.1 ± 0.3	10.5 ± 0.6
Liver	79.0 ± 0.9	90.5 ± 3.0	35.4 ± 1.3	21.1 ± 0.8	15.5 ± 0.2
Spleen	53.7 ± 2.0	42.4 ± 5.3	19.3 ± 0.5	9.4 ± 0.4	6.2 ± 0.4
Testes	26.0 ± 1.1	21.0 ± 1.2	8.7 ± 0.7	4.2 ± 0.2	3.8 ± 0.1
Lung	24.0 ± 0.6	24.6 ± 0.9	14.8 ± 2.0	8.4 ± 0.5	7.6 ± 0.1
Brain	16.4 ± 0.9	18.9 ± 0.5	14.5 ± 0.5	7.8 ± 0.6	4.5 ± 0.4
Heart	12.3 ± 0.2	10.6 ± 0.5	6.1 ± 0.3	4.6 ± 0.5	4.3 ± 0.2

The values are mean ± SD of three animals expressed as nmole/g tissue

2つの異なるグループの雄ラット（3匹/群）に1 mmole/kg bw（95 mg/kg bwに相当）の [^{14}C]-MCAAを1日あるいは3日間毎日強制経口投与した（媒体は未記載）。単回あるいは3回投与の24時間後に動物を屠殺し、組織内の[^{14}C]-MCAAの分布を調べた。単回投与24時間後の様々な組織での ^{14}C -標識は、1 mmole/kg bwの [^{14}C]-MCAA を投与したラットが0.1 mmole/kg bwを投与したラットより、1.4から3.8倍高かった（Table 4.6参照）。分布パターンは類似していた。高用量の[^{14}C] MCAAを3回投与した24時間後の各組織における ^{14}C -標識は、肝臓と脾臓を除いて単回投与のそれより有意に増加していた。データは組織におけるMCAAの用量依存的な蓄積を示している。高用量投与後の尿中排泄に関しては報告されていない。さらに、高用量3日間投与の組織分布に関する詳細なデータも報告されていない。

Table 4.6 Distribution pattern of ^{14}C -label in different tissues after 24 hr of single oral doses of 0.1 and 1.0 mmole/kg bw [$1\text{-}^{14}\text{C}$] MCAA to rats (Buphendra et al., 1992)

Tissues	Doses (mmole/kg bw)		Ratio of ^{14}C -label (1.0/0.1)
	0.1	1.0	
Kidney	16.1	57.7	3.6*
Liver	21.1	53.7	2.5*
Intestine	8.5	32.1	3.8***
Lung	8.4	18.9	2.3**
Spleen	9.4	17.8	1.9*
Heart	4.6	13.5	2.9**
Brain	7.8	10.7	1.4*
Testes	4.2	8.0	1.9

Values are mean values of 3 animals in each group and expressed as nmole/g tissue.
P-values: * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001 for differences between the two dose levels.

皮膚

融解 (65°C) したMCAAの400 mg/kgをマウス (Swiss-Webster) の皮膚に2分間前処理すると、同じ箇所には $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -MCAAの0.6 mg/kgを3分間曝露させた場合の皮膚吸収が、前処理しない場合に比べて有意に増加した。しかしながら、 $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -MCAAの282 mg/kgを 25°C または 65°C の水溶液として3分間皮膚に曝露した6時間後では、 65°C 溶液で処理したマウスの血漿、全脳、皮膚および尿における放射能が 25°C で処理したそれと比べて有意に高いということはない (Berardi, 1986a)。

皮下

Sprague-Dawley雄ラット (3匹) に $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -MCAA (媒体は未記載) の162 mg/kg bwを単回皮下投与すると、肝臓および腎臓の放射能が血漿より高かった (投与後4~128分)。心臓および脳の総放射能は血漿と同程度であった。

53 mg/kg bwの $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -MCAA 単回投与は高用量と同様の分布を示した。低用量投与では32分後に血漿濃度がピークとなった。低用量 (53 mg/kg) 投与では、放射能の血漿からの消失は二相性を示した (早い相の半減期: 約90分、遅い相の半減期: 約500分)。腎臓の皮質と髄質は同様の ^{14}C -MCAAレベルを示した。投与した放射能 (53 mg/kg bw) の約50%は、

MCAA投与後の17時間で尿中に回収された (Hayes et al. 1973)。

腹腔内

Yllner (1971) は、雌マウス (系統および匹数は未記載) に $[1-^{14}\text{C}]$ -MCAA (水に溶解) の70、90または100 mgを腹腔内投与すると、その後の3日間で投与量の82~88%が尿中に排出され、8%が呼気中の二酸化炭素として排出され、0.2~3%が糞便として排出され、投与した2~3%が動物に残存することを報告している。MCAAの2つの主要代謝物、S-カルボキシメチル-L-システイン (33~43%のフリー体および1~6%の抱合体) と硫化二酢酸 (33~42%)、および少量のグリコール酸 (glycolic acid) (3~5%) とシュウ酸 (oxalic acid) (0.1~0.2%) が尿のペーパークロマトグラフィー試験により検出された。著者は、MCAAの2つの代謝経路を提案した (Figure 4.1参照 [訳注: 下図Figure 1のこと]) : 1) はじめにS-カルボキシメチルグルタチオン (S-carboxymethyl glutathione) が生成しそれがS-カルボキシメチルシステイン (S-carboxymethylcysteine) に変換され、その一部はさらに硫化二酢酸に代謝される主要経路。および2) おそらく炭素-塩素結合の酵素的加水分解によりグリコール酸 (glycolic acid) が生成し、さらに酸化されて主として二酸化炭素になるマイナーな経路。

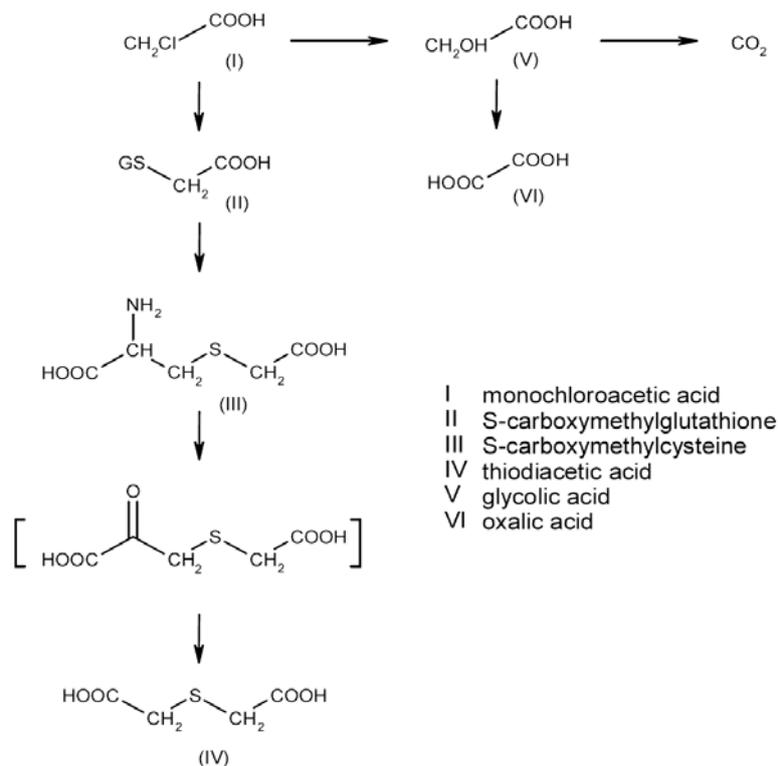


Figure 1 Suggested metabolic pathways of MCAA in the mouse. The compounds in brackets were not isolated (Yllner, 1971)

静脈内

Bhat et al. (1990) は、Sprague Dawleyラット（3匹/群、性別は不明）に0.07 mg/kg bwの [1-¹⁴C]-MCAA（10% 炭酸ナトリウムに溶解）を単回静脈内投与し、5分、1、4、12、24ならびに48時間後に屠殺して全身オートラジオグラフィー法により調べた。放射能は血液循環から速やかに除去された。肝臓と排泄系の¹⁴C-活性は5分後には既に高レベルであった。MCAAやその代謝物は、副腎皮質や胃壁のような排泄器官壁や、首の上部背面領域にあるような褐色脂肪の特定の領域に認められ、また、高レベルの¹⁴C-活性が心筋組織に認められた。[¹⁴C]-MCAA投与1時間後には、放射能は小腸管腔に広範囲に排泄された。1時間では、脳、胸腺、唾液腺ならびに舌における[¹⁴C]-MCAAの存在が顕著であった。4時間後には、肝臓および他の組織は放射能の大部分を排出し始めた。他の組織とは対照的に、中枢神経系、胸腺ならびに膵臓では放射能は遅い時間に現れた。これらのことは、MCAAやその代謝物は、早い時期には親水性組織に蓄積し、遅い時期にはカルボキシメチルシステイン組織 [訳注：「高脂質組織」と解される]に蓄積することを示唆している。限定された研究報告なので、種々の組織におけるMCAA実濃度の情報は提供されていない。

雄の成熟ラットに[¹⁴C]-MCAAの準毒性および毒性用量（それぞれ10および75 mg/kg bw）を静脈内投与し、MCAAの分布、代謝ならびに排泄を調べた（Saghir et al., 2001）。また、胆管カニューレションした追加のラットにより胆汁排泄を調べた。カニューレションしていないラットでは、血漿および他の組織、臓器およびその内容物（胃、小腸ならびに結腸）の放射能標識を分析した。血漿および尿（膀胱内容物を含む）についてもMCAAと同様に分析した。さらに、胆汁と尿の代謝物について分析した。血漿のデータはコンパートメントモデルにより解析した。データに最も適合していたのは、1-あるいは3-コンパートメントモデルよりむしろ2-コンパートメントモデルを用いた解析であった。試験に含まれていた用量範囲設定試験（10～125 mg/kg bw）において、毒性の発現は極めて急激だった。50 mg/kg bwまでは毒性徴候は全く認められなかったが、60 mg/kg bwでは昏睡に続いて43%の死亡率が、70 mg/kg bwでは50%を超える死亡率が認められた。昏睡および死亡までの平均時間はそれぞれ70および75分であった。70～100 mg/kg bwの用量の死亡率はほぼ同じであり、用量反応は認められなかった。100 mg/kg bwを超える用量では100%の死亡率であった。昏睡に陥ったが死亡しなかった動物のほとんどは、投与後90分以内に急激に昏睡から覚醒し回復した。

体内動態を調査するために10および75 mg/kg bwを静脈内投与すると、MCAAと同様に放射性標識が非常に早く組織に分布するのが認められた。5分後には、低用量および高用量で用量/mLの0.6および1.0%がそれぞれ体内循環に残存しているに過ぎなかった。血漿に関連した放射性標識のほとんどは親MCAAであり、赤血球と結合した放射能はごく僅かであった（用量/gの0.08%より小さい）。多くの臓器において、15分より短いあるいは5分よりさらに短い最高濃度到達時間（ t_{max} ）が認められた。小腸内容物および尿の t_{max} 値だけは大きく、それぞれ45分、および16時間より大きかった。さらに、75 mg/kg bwでの血漿（対時間）の総および親MCAAのAUC（濃度曲線下面積）は、（用量比率からすれば）10 mg/kg bwと比べて7~8倍高いことが予想されたが、高用量における遅い分布や排泄を反映して22~23倍高かった。準毒性用量では毒性用量と比べてより高い割合の放射性標識が肝臓および腎臓に認められた。特に10 mg/kg bw用量群では、血漿、肝臓、心臓、肺ならびに褐色脂肪の放射性標識濃度は互いに近似していたが、脳および胸腺では血漿に比べて幾分遅れた。肝臓中の濃度は、低用量および高用量群でそれぞれ5分以下および15分でピークに達した。腎臓ではそれぞれ45分および4時間がピークであった。毒性用量では消失速度定数および分配速度定数は大きく減少した。多くの組織で平均滞留時間の増加が示しているように、末梢分画中にMCAAの滞留が増加したため毒性用量での排泄は更に遅れた。これは投与量の非常に大きな部分を反映しており、そのほとんどが再吸収された消化管内容物中に見られた。活性炭やコレスチラミンにより腸肝循環を（新たな曝露から）遮断して100 mg/kg bwでの毒性を軽減する試みを行ったが、失敗に終わった。MCAA代謝物の胆汁排泄が解毒の1ステップであることが判明した。胆汁で認められた放射能は、親化合物より極性の強い1つの代謝物と関連していた。用量の非常に大きな割合（低用量群および高用量群でそれぞれ73%および59%）が尿中でみられ、それは親MCAAの55~68%であった。MCAAに曝露されたラットの突然の昏睡/死亡の発現は肝臓の解毒能力を急激に越えるためであることをデータが明確に示しており、MCAAによる毒性の律速段階は肝臓での解毒であることが確認された。

酵素の阻害

Hayes et al. (1973)はMCAAによる[1- 14 C]-酢酸の酸化抑制に関する*in vitro*での研究を報告している。MCAAは酢酸酸化の非競合的阻害剤であることが報告された。

Bryant et al. (1992)は、モノフルオロ酢酸（MFAA）がミトコンドリア酵素の既知の阻害剤であることから、F344雌ラット（3匹/投与群；6匹/対照群）にMCAAの24、48および96 mg/kg

bwを単回強制経口投与し、心臓および肝臓のアコニターゼ活性を調べた。アコニターゼ活性は投与1.5～2時間後に摘出した肝臓および心臓で測定した。MCAAは心臓のアコニターゼ活性を抑制したが肝臓では抑制しなかった。著者によれば、アコニターゼ活性の抑制は、ラット13週間反復投与毒性試験（NTP, 1992）でみられた心筋症の発症に影響を与えた可能性がある。

ラット肝臓スライスを用いた*in vitro*実験において、ケトン体あるいは $^{14}\text{CO}_2$ の生成に影響することなく、MCAAは0.1 mMで [U- ^{14}C]-アラニンからグルコースへの標識の取り込みを抑制した。このことは、MCAAがピルビン酸カルボキシラーゼを特異的に抑制することによりグルコース生成を抑制することを示唆している（Doedens and Ashmore, 1972）。

Dierickx (1984)はMCAAとラット肝臓グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）との相互作用について*in vitro*で研究した。この研究ではグルタチオンおよび1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼンを基質として用いた。MCAAは粗抽出物中のGST活性を用量依存的に抑制した。異なるGSTアイソザイムのそれぞれが抑制された。抑制は用量に依存していたが直線的ではなかった。GSTとの直接的な共有結合が相互作用の主要メカニズムであると結論された。この結合はMCAAに対して防御機能を有するかもしれない。トキシコキネティクスおよび代謝のデータは、GSTとの結合はMCAAの代謝の一過程であることを示していた。従って、MCAAはそれ自身の代謝の阻害剤であると結論されるかもしれない。

MCAAは、ラット摘出心臓ミトコンドリアのピルビン酸脱水素酵素（PDH）および α -ケトグルタル酸脱水素酵素（KGHD）の両方を、長時間インキュベーションした時に限り抑制する。抑制の正確なメカニズムは不明である。PDHおよび α -KGHDを同時に抑制することは細胞のエネルギー産生に重大な影響を及ぼすことから、細胞は嫌気性解糖に転換し、その結果乳酸が蓄積することになる（ECETOC, 1991を参照）。

脂質との相互作用

Bhat and Ansari (1988) は、 [^{14}C]-MCAAを用い、コエンザイムAおよびアデノシン三リン酸の存在下でMCAAと共にラット肝臓ミクロソームを*in vitro*でインキュベーションすることで、MCAAと脂質との相互作用について調べた。大部分の放射能はリン脂質に取り込まれていることを見出した。

次の研究では、Bhat and Ansari (1989) は、MCAAとラット肝臓の脂質との共有相互作用について *in vivo* で検討した。[1-¹⁴C]-MCAAの8.75 mg/kg (50 μCi) をラットに単回経口投与した。動物は24時間後に屠殺した。肝臓より脂質を抽出し、Sep-Pakシリカカートリッジを用いた固相抽出により中性脂肪とリン脂質に分離した。MCAAはコレステロールと抱合しコレステリルクロロ酢酸エチル (cholestryl chloroacetate) を生成することが示された。MCAAは中性脂肪と選択的に反応する。そのような細胞膜での抱合反応の影響およびそれらの毒性への関与は現時点では不明であるが、抱合体はより脂溶性の高い物質なので、排泄より滞留し易くなるのであろう。

スルフヒドリル基との相互作用

Hayes et al. (1973) は、MCAAとシステインスルフヒドリル基との相互作用について *in vivo* および *in vitro* で検討した。MCAAは、*in vitro* ではシステインのスルフヒドリル基を著しくアルキル化することはなかった。一方 *in vivo* では、LD90に相当するMCAAの用量をラットに経口投与すると、肝臓中のスルフヒドリル基の総量が30%減少した。経口のLD90の用量では脳および心臓のスルフヒドリル基の値に影響しなかった。ラット肝臓中でのMCAAとの結合はタンパクおよび非タンパク分画の両方で起こった。ラット肝臓中の総スルフヒドリル基とのMCAAの結合は時間と共に増加した。総スルフヒドリル含量は120分で対照群の約50%に減少した。ラット副腎皮質および髄質の総スルフヒドリル含量はMCAA投与後84～120分で有意に減少した。脳および心臓のスルフヒドリル基のアルキル化はこれらの時間では影響されなかった。

4.1.2.1.2 ヒトでの研究

Dancer et al. (1965) は¹⁴Cで標識したMCAAに汚染されたヒト皮膚の症例について報告している。事故後、水泡ができた汚染皮膚を測定し、血液、呼気および尿の¹⁴C-標識の検出を行った。紅斑あるいは他の損傷は認められず、通常の時間内で傷は治癒した。約300 μCiの¹⁴C-標識 (0.002mLのMCAAに相当) が尿中に排泄され、また同様の量が呼吸で排出されたことが計測された。尿中のMCAAの半減期は約15時間であった。事故発生17.5時間後に採取した血液サンプルでは、分離赤血球では20%以下の活性であり、大部分は血漿中に残っていた。血液サンプルの¹⁴C濃度は、最初の24時間に集めた尿のそれよりはるかに低いことから、血中から尿への排泄が非常に早いことが示唆された。6日後では血中からは極めて少量が検出

されたに過ぎなかった。経皮吸収率は推測できなかった。

4.1.2.1.3 結論

MCAAのトキシコキネティクス、代謝および分布に関する入手可能な研究のほとんどは限定された報告であり、そのほとんどは比較的高用量（LD50値に近い）で実施されたことに留意すべきである。吸入曝露によるMCAAのトキシコキネティクス、代謝ならびに分布に関して利用できる情報は無い。経皮曝露による限定された定性的なヒトのデータが1例の症例研究から得られただけである。

ラットに¹⁴C-MCAAを経口投与すると90%以上は消化管から吸収される。利用可能な毒性データ（4.1.2.2参照）は、ラット、ウサギおよびヒトの皮膚から速やかに吸収されることを示している。利用可能なデータからは経皮吸収率や割合は確定されていない。それゆえ、リスク判定には経皮吸収率を100%と仮定する。吸入毒性のデータでは吸入曝露での吸収率や割合に関して何も結論できなかった。1つの吸入試験での強い毒性作用およびMCAAが低分子であることを考慮し、リスク判定には吸入曝露の吸収率として100%を用いる。

吸収後、放射性標識は速やかに分布した。腸、腎臓ならびに肝臓に最高濃度の放射性標識が認められた。中枢神経系にも放射性標識が認められたことから血液脳関門を通過した。分布のパターンは、むしろ低脂質の組織に最初に速く分布し、その後脳などの高脂質組織に分布する。異なる用量および投与経路で試験したが分布パターンの違いを示さなかった。高用量の¹⁴C-MCAAの反復投与では、単回投与に比べ組織内放射能の顕著な増加が認められた。皮下投与では、放射能の血漿中からの消失は二相性を示した。

¹⁴C-MCAAをラットに静脈内投与すると、放射性標識の分布は極めて早かった（ほとんど全ての臓器で $t_{max} < 15$ 分）。さらに、75 mg/kg bwでの血漿（対時間）の総および親MCAAのAUC（濃度曲線下面積）は、（用量比率からすれば）10 mg/kg bwと比べて7～8倍高いことが予想されたが、高用量における遅い分布や排泄を反映して22～23倍高かった。さらに毒性用量での解毒および排泄能力がそれぞれ圧倒されたことを反映して、高用量群では用量に比例した以上の量のMCAAが肝臓および腎臓で認められた。

放射性標識は主として尿を介して速やかに排出された。他の排泄経路は呼吸および糞であ

った。ラットに経口投与すると24時間以内に投与量の90%が、静脈内投与（100%吸収）では3日以内に82~88%が、皮下投与では投与後17時間で50%がそれぞれ尿中に回収された。マウスに経口投与すると投与後72時間で34~61%が尿中に排泄された。ヒト（1例）では、¹⁴C-標識 MCAAに皮膚が汚染された場合、尿中に排泄された放射性標識の半減期は約15時間であり、尿および呼吸を介して同程度の量が排泄された。

MCAAには2つの代謝経路が示唆されている。主要経路では、最初にS-カルボキシメチルグルタチオンが生成しそれがS-カルボキシメチルシステインに変換し、その一部はさらに硫化二酢酸に代謝される。これに加えてマイナーな代謝経路では、炭素-塩素結合の酵素的加水分解によりグリコール酸が生成し、さらに主として二酸化炭素に酸化される。

MCAAは種々の酵素を抑制する：酢酸酸化、アコニターゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸脱水素酵素、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素ならびにグルタチオンS-トランスフェラーゼ。アコニターゼ活性の抑制は心筋症の発症に影響する可能性が示唆された。さらに、ピルビン酸カルボキシラーゼの抑制は糖新生を抑制することが示唆された。さらに、MCAAはピルビン酸脱水素酵素および α -ケトグルタル酸脱水素酵素を抑制して、少なくとも*in vitro*においては、両方の酵素を共に抑制することで細胞のエネルギー産生を阻害して嫌気性解糖への転換を誘導し、その結果乳酸が蓄積する。グルタチオンS-トランスフェラーゼの抑制に関しては、MCAAの主要な相互作用はGSTとの直接的な共有結合である。この結合はMCAAに対して防御機能を有するかもしれない。なぜなら、GSTとの結合はMCAAの代謝の一過程であり、MCAAはそれ自身の代謝を抑制する可能性がある。

またMCAAは脂質と相互作用する。MCAAの大部分はリン脂質に取り込まれる。さらに、MCAAはコレステロールと抱合しコレステリルクロロ酢酸エチルを生成することが示されている。抱合体はより脂溶性の高い物質なので、このような抱合反応作用は排泄より滞留し易いことが示唆された。

高用量 (LC90) のMCAAはラットの肝臓および腎臓の総スルフヒドリルをアルキル化する。

4.1.2.2 急性毒性

関連する急性毒性試験の結果をTable 4.7.に要約した。

Table 4.7 Acute toxicity

Route	Species	LD50/LC50	Unity	Reference
Oral (gavage, 1% conc. in water)	rat (female, Wistar)	90	mg/kg bw	Hoechst AG (1979a)
Oral	rat (sex and strain unknown)	277.5	mg/kg bw	Kurcatov and Vasileva (1976)
Oral (gavage, 10% concentration)	rat (sex and strain unknown)	55	mg/kg bw	Maksimov and Dubinina (1974)
Oral	mouse (male, Swiss-Webster)	260	mg/kg bw	Berardi et al. (1987)
Oral	mouse (male, strain unknown)	300	mg/kg bw	Berardi and Snyder (1983)
Inhalation (exposure time not reported, according to KEMI (1994) 4 hours)	rat (sex and strain unknown)	180	mg/m ³	Maksimov and Dubinina (1974)
Inhalation (1 hour)	rat (male and female F344)	>259	mg/m ³	Streeter et al. (1987)
Dermal (1%, 5%, and 40% concentration in 0.9% NaCl)	rat (female, Wistar)	1% c.: >100 5% c.: >400 40% c.: 305	mg/kg bw	Hoechst AG (1979b)
Dermal (50% concentration in 0.9% NaCl)	rabbit (sex unknown, Albino-Himalayan)	250	mg/kg bw	Hoechst AG (1979c)
Subcutaneous (50% concentration in 0.9% NaCl)	rat (female, Wistar)	97.4	mg/kg bw	Hoechst AG (1979d)
Subcutaneous	rat (male, Sprague-Dawley)	5	mg/kg bw	Hayes et al. (1972)
Subcutaneous	rat (sex and strain unknown)	108	mg/kg bw	Hayes et al. (1973)
Subcutaneous	mouse (male, Swiss Webster)	130	mg/kg bw	Berardi (1986a)
Subcutaneous	mouse (male)	150	mg/kg bw	Berardi and Snyder (1983)
Intravenous	rat (male, Sprague-Dawley)	75	mg/kg bw	Elf Atochem (1995)

4.1.2.2.1 動物での研究

経口

ラットのLD50値は55～277.5 mg/kg bwの範囲で異なった (Hoechst AG, 1979a; Kurcatov and Vasileva, 1976; Maksimov and Dubinina, 1974)。また、マウスのLD50値は260～300 mg/kg bwの範囲で異なった (Berardi et al., 1987; Berardi and Snyder, 1983)。

ほとんどの報告で詳細な記述を欠いており、また引用文献の幾つかは、古いかまたは要約だけが入手可能である。しかしながら、MCAAは飲み込むと毒物と分類すべきであると結

論することができる。

1群10匹のWistar雌ラットに40、63、100または160 mg/kg bwを単回強制経口投与すると、投与後120分から24時間の間に死亡が認められた (LD50: 90 mg/kg bw)。瀕死動物に見られた臨床症状としては、神経行動学的症状、流涙およびパルス状の呼吸であった。軽度の同じ症状が生存動物にも認められたが、48時間以内に回復した。死亡した動物の肉眼的な変化としては、肝臓、肺、胃および脾臓の変色であった。生存動物では肉眼的変化は認められなかった (Hoechst AG, 1979a)。MCAAの10%溶液を単回 (強制) 経口投与した場合のLD50値は55 mg/kg bwであった。著者によれば死因は局所の損傷によるものとされたが、詳細は説明されていない (Maksimov and Dubinina, 1974)。マウスに320~380 mg/kg bwを単回経口投与すると、生存例の10%に前肢の硬直が認められた。前肢の硬直した動物はMCAA投与後、48時間、2、5および8週目に屠殺した。脳組織の組織学的な検査では、幾つかの脳領域、特に小脳で毛細血管外に赤血球が認められたことから、投与後48時間のような早い時期に血液脳関門 (BBB) に損傷が生じた可能性が示唆された。このことは、静脈内投与した [¹⁴C]-イヌリンおよび [³H]-ドーパミンの取り込みが、300 mg/kg bwのMCAAを経口投与したマウスの全脳領域で増加したことにより確認された。著者によれば、マウスBBBの損傷は神経学的な機能障害および死の両方と関連するものであった。この研究におけるLD50は260 mg/kg bw、LD80は380 mg/kg bwと算出された (Berardi et al., 1987; Berardi, 1986a+b)。雄マウスにMCAAの300 mg/kg bw (LD50値に相当) を経口投与すると、振戦、呼吸抑制、そして時折強直性および間代性痙攣が認められた。生存例のあるものは、投与24時間後に挙尾、重度の振戦、および前肢の麻痺が認められた (Berardi and Snyder, 1983)。

吸入

白色ラット (Charles River)、白色マウス (Swiss) およびモルモット (English) を用いた2つの蒸気吸入急性毒性試験がHercules Inc. (1969c+d) により報告されている。この試験では、MCAAの蒸気は希釈していないMCAAを75°Cに熱して発生させた。24°Cの温度環境下で平均濃度 3.1×10^4 mg/m³で1分間 (2匹/種)、および 2.7×10^4 mg/m³で3、5および10分間 (3匹/種) 動物を曝露した; 対照群は設けなかった。試験した動物に死亡は認められなかった。1分間の曝露では曝露後5~60分で、5分間および10分間の曝露では曝露後直ちに全ての動物に中等度の流涙および鼻汁が認められた。剖検により肺の充血が明らかになった。曝露時間が短いことおよび試験群の動物数が少ないことから、本試験結果はMCAAのEC分類に用

いることはできないとした。

F344雌雄ラット（6匹/性）を用いた急性曝露実験がStreeter et al（1987）により報告された。MCAAの物理的特性により分析蒸気濃度は66 ppmに限定された；飽和大气（20°C）は約137 ppmのMCAAを含有する。66 ppmで1時間曝露後、動物の症状および体重を常時モニターした。曝露中、全てのラットは目を細め幾分嗜眠状態になった。曝露後、会陰の一過性尿着色および体重減少が認められ、曝露によるストレスに関係した典型的な非特異的反応であることが示された。曝露後2週間経過しても、死亡あるいは曝露に関係した病理学的変化は認められなかった。MCAAの1時間曝露のLC50は66 ppm（259 mg/m³）以上であると結論された。

別の試験でラットのLC50値は180 mg/m³と報告された（曝露時間が示されていない；KEMI, 1994では4時間曝露と記載されている）（Maksimov and Dubinina, 1974）。この試験の詳細は毒性症状の記述も含めて欠如している。これらの急性毒性試験の結果から、MCAAは吸入曝露では極めて毒性が強いと分類されるべきである。

経皮

Hoechst AG（1979b）の研究において、1群6匹のWistar雌ラットに異なる用量のMCAA（1%濃度で50および100 mg/kg bw；5%濃度で200および400 mg/kg bw；40%濃度で200、280、400および2,000 mg/kg bw）を同一表面積（約30 cm²）に経皮曝露した。試験は閉鎖系で実施した。1%または5%濃度で曝露した動物に死亡例はなかった（それぞれ、LD50>100 mg/kg bw およびLD50>400 mg/kg bw）。死亡は40%濃度を280、400、2,000 mg/kg bwで曝露後、3.5～24時間以内に認められた（詳細は記載されてない）。瀕死状態のラットは神経行動学的症状、流涙および呼吸困難を示した。死亡した全ての動物に肺および腸管に肉眼的変化が認められた。さらに、2,000 mg/kg bw群では曝露部位の皮膚に変色が認められた。生存例では曝露後48時間以内では何ら影響は認められず、また48時間後の剖検でも肉眼的変化は認められなかった。この試験においてLD50は305 mg/kg bw（40%濃度の結果に基づく）とされた。経皮毒性は濃度（%）と曝露用量（mg/kg bw）の両方に依存することが指摘された。

Hoechst AG（1979c）の2番目の経皮急性毒性試験では、6匹の白色ヒマラヤウサギ（性別不明）に50%濃度のMCAAを様々な用量（63、125、250および500 mg/kg bw）で曝露した。曝露部位は報告されていない。試験は閉鎖系で実施した。この試験では、死亡は曝露後260分

から24時間の間に起こった（詳細な記載無し）。最高用量群（500 mg/kg bw）では、神経行動学的症状、流涙、重度の呼吸困難および皮膚の局所刺激/腐食が認められた。それより下の用量（63、125、250 mg/kg bw）でのみ見られた用量依存的な作用は、頻呼吸、局所刺激/腐食および腹部着床であった。生存例では臨床症状は全く認められなかった。この試験においてLD50は250 mg/kg bwとされた。これらの試験に基づき、40%および50%濃度のMCAAは皮膚との接触において有毒と分類すべきとされた。

Millischer et al. (1988) は、溶解した60°CのMCAA原液（用量は未記載）を5～10匹のニュージーランド白色ウサギの剃毛した皮膚（背部、100 cm²）に直接塗布した研究を報告している。接触時間は90～300秒で、曝露後120秒間皮膚を水で洗浄した。実験条件は、労働者の皮膚に偶発的に飛散したのと同様な状況とした。曝露後、数時間以内に全ての動物が死亡した（90秒では曝露後5～12時間以内、300秒では曝露後2.5～7.5時間以内）。瀕死動物に見られた生化学的変化は、高血糖および重度のアシドーシスであった。これらの作用はヒトで見られたものと類似していた（Millischer, 1987、関連セクション参照）。ヒトとは対照的に、ウサギでは軽度の高カリウム血症が認められた。MCAAを洗い落とす前の皮膚接触時間が長くなると、動物の死亡時期は早まった。

Hercules Inc. (1969a) において2つの試験が実施された。1番目の試験では、1群2匹のニュージーランド白色雄ウサギの剃毛した腹部の皮膚（体表面積の約10%）に、非溶解のMCAAを79.0、118.5、177.8および266.7 mg/kg bwの用量で密閉系にて曝露した。被験物質（固形）は水あるいは媒体に湿潤しなかった。塗布24時間後にプラスチックシートを取り除き、全ての残存物質を除去した。生存性、局所皮膚反応および行動異常について、皮膚曝露後14日間継続して観察した。2つの低用量群では死亡は見られなかったが、177.8 mg/kg bw群では1匹が、最高用量群では2匹とも死亡した。高用量の2群では曝露後1時間以内に活動過多が全動物で認められた。24時間後には全生存例とも正常に復していた。曝露期間終了時点ではMCAAの接触部分に壊死が認められ、14日後でも改善しなかった。用量群が少ないこと、および皮膚への曝露前に被験物質を湿潤させなかったことから、この試験結果をLD50値の決定に使うことはできない。2番目の試験では、非溶解MCAAの200 mg/kg bwを10匹の白色ウサギ（雄5匹および雌5匹）の背部に曝露した。被験物質は水あるいは媒体に湿潤しなかった。曝露局所はガーゼでゆるく閉塞した。24時間の接触後、ガーゼおよび残存物を除去した。動物は48時間より幾分短い時間生存性について観察した。雌は5匹中2匹が死亡したが雄は全て生き残った。Hercules Inc. (1969b) による2番目の試験では、1群2匹のニュ

ージーランド白色雄ウサギに、異なる用量の溶解MCAAを異なる表皮面積に経皮曝露した。0.2～10 mLの用量を体表面積の1、3、5、10、20または40%に曝露した。異なる曝露時間でも実施し、一部の動物については曝露終了後に炭酸ナトリウムを治療的に用いた。1つの実験では、溶解MCAA曝露前に1.0 mL/kg bwのウレタンを静脈内投与して麻酔した。同じ実験において、1匹の雑種犬に2.6 mL/kg bw (4,108 mg/kg bwに相当) の溶解MCAAを20%の体表面積に15分間経皮曝露すると4時間以内に死亡した。ウサギでの様々な実験で得られた死亡データの要約をTable 4.8に示した。

Table 4.8 Summary of mortality data observed in the study of Hercules Inc. (1969b)

Exposed surface area % of total body surface area exposed	Dose total dose in mg/kg bw	Mortality			
		I 15-minute contact + wash with sodium carbonate	II 1-minute contact + wash with sodium carbonate	III 15-minute contact + wash with sodium carbonate (other sample)	IV 1-minute contact + wash with sodium carbonate (other sample)
1.0	126-174	0/2	-	0/2	-
3.0	395-490	2/2	0/2	2/2	0/2
5.0	600-901	2/2	½	-	-
10.0	1,580-2,054	2/2	2/2	-	-
20.0	3,318-4,108	3/3*	2/2	-	-
40.0	5,372-6,636	2/2	2/2	-	-

* the additional animal in this group was a mongrel dog

0.25 mL/kg bw (395 mg/kg bwに相当) のMCAAを総体表面積の3%以上に15分間、あるいは0.57 mL/kg bw (901 mg/kg bwに相当) を総体表面積の5%以上に1分間曝露すると死亡が認められた。曝露部分を石鹼と水で洗浄し、さらに重炭酸ナトリウム処理、無処理、あるいは麻酔前処理のいずれにおいても何ら有用な効果は得られなかった。MCAAに曝露すると直ちに自発運動抑制が全ての動物に見られた。2または3時間後に呼吸困難および虚脱が認められた。重度の浮腫、しわおよび壊死が、曝露後15分以内にMCAAの接触部位に認められた。死亡例の剖検で血管系の広範囲な拡張が明らかになった。MCAA接触部位の皮膚には壊死が認められた。物質に起因する特異的な組織学的変化はなかった。死亡データに基づくMCAAのLD50値は、用量群が少ないことから決定できなかった。

Hercules Inc. (1971) による別の実験では、非経口の重炭酸ナトリウムによる即時処理が、MCAAの局所曝露による致死に変化や改善をもたらすかどうかについて検討した。6匹のニ

ユージーランド白色ウサギ（性別不明）には溶解MCAAの2,000 mg/kg bwを死ぬまで皮膚曝露し、6匹のウサギには2,000 mg/kg bwを5分間曝露し、また6匹のウサギには溶解MCAAの1,000 mg/kg bwを5分間曝露した。曝露5分後に生理食塩液（3匹）あるいは重炭酸ナトリウム（3匹）を静脈内投与した。重炭酸ナトリウム処理をしなかった全ての動物は3時間以内に死亡した。重炭酸ナトリウム処理をした全ての動物は5.5時間以内に死亡した。この3つの実験結果から、致死用量のMCAAを局所曝露したウサギに重炭酸ナトリウムを非経口で与えても、実施した実験条件下では致死に対してなんの改善をもたらさないと結論された。

エタノールがMCAAによる毒性の解毒剤になるかどうかの実験（Millischer et al., 1988）では、MCAAのウサギ皮膚曝露が動物に対して常に致死性であるような高用量が使われた。試験デザインの詳細は報告されていない。この実験条件では、エタノール処理可能最大量（血中に3 g/L）を注入してもエタノールは致死に対して防御的に働かなかった。MCAA曝露後エタノールをウサギに静脈内投与すると、死亡遅延の平均値が投与しないウサギよりも高かった。このことは、エタノール処理した動物では、血糖、カリウムおよび炭酸水素イオン（ HCO_3^- ）に対する修飾が、処理しない動物に比べて幾分少ないように思えた。

皮下

ラットのLD50値は5～108 mg/kg bwの範囲で異なった（Hayes et al., 1972; Hoechst AG, 1979d; Hayes et al., 1973）。また、マウスのLD50値は130 mg/kg bw（Berardi, 1986）および150 mg/kg bw（Berardi and Snyder, 1983）であった。ほとんどの試験で詳細が欠けているか、または要約が入手できるだけであり、また引用文献の多くは古いものであった。また、幾つかの試験はMCAAの急性毒性を決定することを目的としたものではなかった。

Wistar雌ラットのLD50は97.4 mg/kg bwであることがHoechst AG（1979d）により報告されている。この試験では1群10匹のラットに80、100、125、200または315 mg/kg bw（50%MCAAに基づく）を皮下投与した。投与後172分および3日以内に死亡が認められた。観察された作用としては、神経行動学的症状、頻呼吸、投与部位の局所作用（皮膚および筋肉の灰褐色着色）、および肝臓（茶色着色および重度流血）および小腸（赤色着色）の肉眼的変化であった。生存例では臨床症状および肉眼的変化は全く認められなかった。

静脈内

Sprague-Dawley雄ラットのLD50は75 mg/kg bw (95%信頼区間限界：53～117 mg/kg bw) であることがElf Atochem (1995) の研究により報告されている。この試験では、1群5匹からなるSprague-Dawley雄ラット6群に、MCAAの30、50、70、80または90 mg/kg bwを静脈内投与した。50、70、80または90 mg/kg bwを投与したほとんどの動物に、運動機能低下、鎮静、呼吸困難、横臥、窒息や昏睡が投与後30～40分で認められた。30 mg/kg bwを投与した動物では運動機能低下および鎮静だけが認められた。これらの症状は中枢神経系毒性を示しているものと考えられた。死亡は、30、50、70、80および90 mg/kg bw群で、それぞれ0/5、1/5、1/5、2/5および5/5例であった。ほとんどの死亡は投与した日に起こった。体重減少が70および80 mg/kg bw群の生存動物4匹中1匹に認められた。死亡した全ての動物は肉眼的に検査した。投与に関連した変化は認められなかった。

静脈内投与のトキシコキネティクス試験に含まれる用量設定試験(10～125 mg/kg bw)では、毒性症状の発症は極めて急激であった。50 mg/kg bwまでは毒性徴候は認められなかったが、60 mg/kg bwでは43%、70 mg/kg bwでは50%を超えるラットが昏睡に続いて死亡した。昏睡から死亡への平均時間は、それぞれ70および75分であった。70から100 mg/kg bwの用量ではほぼ同じ死亡率であり用量反応はみられなかった。110 mg/kg bwを超える用量では致死率は100%であった。昏睡したが投与後90分以内に死亡に至らなかった動物のほとんどは、急激に意識を取り戻し回復した (Saghir et al., 2001)。

4.1.2.2.2 ヒトでの研究

経口

Feldhaus et al. (1993) とRogers (1995) は、5歳女児の経口経路による中毒症例を簡単に報告している。茶さじ1杯の80%MCAAを含有するイボ除去剤を女児が誤って飲んだ。女児は直ちに嘔吐しそして直ぐさま虚脱状態に陥った。誤飲1.5時間後、管理不能な代謝性アシドーシスおよび心不整脈になった。誤飲8時間後に女児は死亡した。剖検の結果、肺および脳の浮腫、肝臓の脂肪浸潤、および顕著な胃粘膜充血が認められた。

皮膚

Ruty et al. (1988) は経皮吸収による全身中毒症の症例について報告している。事故により、47歳の労働者が両足(体表面積の約6%)に加圧下で溶解したMCAAを突然浴びた。曝露後、

1度の熱傷が現れた。一般的な健康状態は良好であった。しかし4時間後には、消化器系症状として嘔吐を伴う吐き気が30分以内に徐々に現れた。その後、意識の喪失および興奮と抑制が交互する神経症状の亢進を伴う心臓血管性ショックが起こった。患者は昏睡状態となり心不整脈が認められた。最高血圧は70、脈拍は120であり、体温は正常であった。非常に持続性の高い代謝性アシドーシスが観察された。古典的な蘇生処置および緩衝液の大量投与に加え、エタノールによる解毒処理を行った。血中エタノール濃度の定常状態は観察されなかったが、健康状態の改善は認められた。24時間後には患者は救命されたと考えられた。熱傷は長期間（2～3ヵ月）後に治癒した。

エタノールはアセテート供与体として働くと考えられる。エタノールの代謝過程で生ずるアセテートはクロロアセテートと競合し、クレブス回路への取り込みを阻害するのである。なお健康が改善したのは解毒処置の結果によるものかどうかは結論できない。

他の症例がKusch et al. (1990) により報告されている。45歳の男性が溶解した90%MCAAを事故により両足に噴霧した。事故後直ちに安全シャワーを起動し10分間シャワーの中に留まった。シャワー後熱傷部分を氷冷しベッドに寝かされた。関与した体表面積の推定値は10%であった。その後35～40分は吐き気と嘔吐が発現した。医療施設での処置および観察の間は意識レベルは正常であった。病院に搬送される間に3回嘔吐した。入院後最初の6時間は100～120/分の頻拍および不定期心室性期外収縮（PVC）が認められた。また初期低カリウム血症が認められた。

足の熱傷は部分的に肥厚（1度および2度）したが、入院後は広がらず深度も増さなかった。患者には塩化カリウム、高用量副腎皮質ステロイドおよび利尿剤を静脈内投与し、その後2日間カリウムおよびプレドニゾンを経口投与した。患者の生存は採用した治療計画によるものなのか、あるいは曝露後の迅速な洗浄あるいはその幾つかの組合せが関係しているのかは不明である。嘔吐、頻拍および「不定期心室性期外収縮」が患者に発現したことは、このレベルの曝露は、皮膚曝露が全身毒性が起こすのに十分であるという証拠になる。

Kulling et al. (1992) は、MCAA皮膚曝露による致死性全身中毒の症例について記述している。38歳の男性が体表面積の25～30%に80%MCAA溶液を浴びた。表皮および真皮浅層の熱傷に加え、数時間内に見当識障害、興奮、心不全および昏睡を含む全身中毒の特徴を示した。患者は後に重度の代謝性アシドーシス、横紋筋融解症、腎不全および脳浮腫を発症し、

8日目に脳ヘルニアにより死亡した。曝露4時間後の血漿中MCAA濃度は33 mg/Lであり経皮吸収が確認された。

Kulling et al. (1992) は、25歳の男性が60°CのMCAA（濃度未記載）の飛沫を浴びた別の症例を報告した。男性は顔、首、胸部上部、股間および両足の表皮に広範囲な熱傷を負った。事故1時間後、血痰を伴う咳および痙攣を発症した。意識不明となり4時間後に死亡した。剖検の結果、肺胞損傷、心膜および胸膜の点状出血、および右肺拡張が明らかになった。患者は恐らく物質を吸い込み、それが重度の症状と致命的な結果の急速な進展に関与したものと推察された。

Millischer et al. (1987) は、溶解あるいは高濃度MCAA溶液を事故により皮膚接触して全身中毒症になった7例について報告している。接触した体表面積はほとんどが10%程度だが、それ以下の症例もあった。主に足に被害を受けた。熱傷は1～3度の範囲であった。概して、事故直後の診断では熱傷はそれほど広範囲でも重度でもなかった。数時間後、熱傷の程度は2または3度になり、損傷部分は拡大した。臨床症状は初め消化器症状（嘔吐）が、次に神経症状（筋振位相、痙攣）が発現した。心臓血管ショックに続いて意識消失の亢進による昏睡を発症した。最初の症状は皮膚接触後1～3時間以内に起こった。生物学的変化は、主に高血糖および低カリウム血症を伴う重度のアシドーシスであった。低尿量およびクレアチンホスホキナーゼ（CPK）の上昇が認められた。7日後に死亡した1例を除いて、死亡の大部分は皮膚接触後4～18時間の間に起こった。剖検による臓器の損傷は非特異的であった；肝臓、脳、腎臓および肺を含む種々の臓器が作用を受けた。

Braun and Walle (1987) は、右手および前腕の背面にMCAAをこぼした23歳の科学技術者の症例について報告している。溶液は94%エタノール中に1.5MのMCAAを含有していた。腕を10分間水で洗浄した；それにも拘わらず、1時間以内に紅斑および小水疱が発現した。損傷は10日以内に小さな痕跡を残して治癒した。14日後には掻痒水疱が痕跡部分に出現した。

28日目に国際標準シリーズおよび70%メタノールに溶解したMCAA溶液1%を用いてパッチテストを行った。MCAA溶液に対して強い4+の反応が得られた。2人の対照者は陰性であった。著者によれば、MCAAのエチルエステル（EMCA）が原因物質と疑われた（MCAAとエタノールが反応してEMCAと水になる）。49日目にアセトンとエタノールに溶解した1%EMCA（純度99.9%）および1%MCAA水溶液でパッチテストを行った。強い4+の反応が

EMCAで認められたがMCAAでは陰性であった。

4.1.2.2.3 結論

動物実験はOECDあるいはEUガイドラインに則って実施されていないと考えられ、また多くのデータは古いか限定された報告であったが、本報告者は、利用可能なデータの量は急性毒性のAnnex VIIAの必要条件を十分に満たしているものと考えた。

急性毒性に関する利用可能なデータに基づき、危険物分類に関する議会作業グループ（Commission Working Group on the Classification of Dangerous Substances）は、MCAAは吸引、皮膚接触および飲み下すと毒性がある（T）と分類すべきであると結論した。

100%のMCAAにはR-phase 23/24/25（「吸引、皮膚接触および飲み下すと毒性がある」）を適用する。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.3.1 動物における研究

皮膚および眼

MCAAは提供された全ての試験で皮膚刺激性あるいは腐食性、および眼刺激性を起こすことが報告されている（Hoechst AG, 1979e; Maksimov and Dubinina, 1974; Christofano et al., 1970）。ほとんどの試験で詳細が不足している。Hoechst AG（1979）が実施した試験では、6匹の白色ヒマラヤウサギの剃毛・擦過した皮膚（2.5 cm²）に500 mgのMCAAを含む塩化ナトリウム溶液（0.9%）0.05 mLを閉鎖系で曝露した。曝露後全ての動物が死亡したので、2回目の実験では6匹のウサギの皮膚（閉鎖系、無傷の皮膚）に150～250 mgのMCAA（100 mg/kg bwの用量、体重1.5～2.5 kg、および50% MCAA溶液を含む0.9% NaCl）を24時間曝露した。曝露により重度の皮膚刺激性および腐食性が発現した（作用は不可逆的であった）。皮膚刺激スコアは報告されていない。この報告書において、6匹のウサギを用いた眼刺激性試験も報告されている。100 mgのMCAAを含有する塩化ナトリウム溶液（0.9%）0.01 mLを

眼に注入した結果、重度の眼刺激性が観察された。眼刺激スコアは報告されていない。これらのデータに基づくと、MCAAは皮膚腐食性および眼に重度の損傷を起こす危険性があると考えられる。

気道

Hercules Inc. (1969c+d; Section 4.1.2.2.急性毒性参照) による2つの急性蒸気吸入毒性試験において、試験した全ての動物に軽度の流涙および鼻汁が報告されている。

ラット急性吸入試験の限定的な報告では、気道刺激性は23.7 mg/m³の濃度で観察された。更なる詳細については報告されていない (Maksimov and Dubinina, 1974)。

4.1.2.3.2 ヒトでの研究

MCAAの刺激性特性についてはSection 4.1.2.2‘急性毒性’で既に記述している。MCAAのヒトでの全ての症例で皮膚の熱傷が報告されており、溶解または濃縮MCAA溶液が事故により皮膚接触すると1～3度の化学熱傷が起こる (Millischer et al., 1987)。90%溶解MCAAが事故により皮膚接触した後、直ちに安全シャワーを起動しても接触部位での1～2度の熱傷を防ぐことはできなかった (Kusch et al., 1990)。Maksimov and Dubinina (1974) は、ヒトにおける呼吸 (感覚) 刺激の閾値は5.7 mg/m³であることを報告している。更なる詳細は報告されていない。

4.1.2.3.3 結論

利用可能な動物試験はOECDあるいはEUガイドラインに則って実施されていないと考えられ、また多くのデータは古いか限定された報告であったが、利用可能なデータは眼および皮膚に対するMCAA刺激性試験の必要条件を十分に満たしていると本報告者は考えている。MCAAは皮膚に対して腐食性 (R34) があり、かつ眼に重度な損傷のリスクがある (Xi, R41) と考えられる。リスク警句R34による腐食性の分類があるので、記号Xiおよび警句R41はラベルには記載されない。その場合、眼に重度な損傷リスクは潜在的に含まれていると考える。

MCAAの気道刺激性に関する利用可能な情報は限定されている。ラットにおける呼吸器刺激は 23.7 mg/m^3 で認められた。Maksimov and Dubinina (1974) は、ヒトにおける呼吸器（感覚）刺激の閾値は 5.7 mg/m^3 であることを報告している。

4.1.2.4 腐食性

Section 4.1.2.3（刺激性）で既に記載したように、MCAAは皮膚に腐食性があると考えられる。

4.1.2.5 感作性

4.1.2.5.1 動物での研究

MCAAの感作性について入手できた唯一の情報としては、Maksimov and Dubinina (1974) により書かれた報告書のオランダ語翻訳に感作性試験の短い記載があるだけである。この報告書ではウサギ（動物数は不明）を用いた開放皮膚試験について記載している。ウサギ皮膚に5%MCAA溶液を1日1回30日間処理し（惹起）、その後異なる濃度のMCAA（0.1、1、5、10および50%MCAA溶液を1滴：チャレンジ）で処理した。この報告書ではMCAAは感作性を持たないものと結論された。しかしながら、この試験の報告は限定的であり、MCAAの感作性を評価するには信頼性がないと考えられる。

MCAAの呼吸器感作性に関するデータはない。

4.1.2.5.2 ヒトでの研究

Section‘急性毒性’において、Braun and Walle (1987) による1つの症例研究でMCAAおよびそのエチルエステル（EMCA）のパッチテストが報告されている。エタノール中のMCAA（用量不明）で曝露28日後に、国際標準シリーズおよび70%メタノールに溶解した1%MCAA溶液を用いてパッチテストを行った。MCAA溶液に対して強い4+の反応が得られた。

2人の対照者は陰性であった。著者によれば、MCAAのエチルエステル（EMCA）が原因物質と疑われた（MCAAとエタノールが反応してEMCAと水になる）。49日目にアセトンとエタノールに溶解した1%EMCA（純度99.9%）および1%MCAA水溶液でパッチテストを行い、強い4+の反応がEMCAで認められた；MCAAは陰性であった。この症例研究に基づきMCAAの感作性は排除できないと考えられる。

一方、40年以上に及ぶMCAAの生産および取り扱いの中で、MCAAの接触アレルギーの症例は1例もない。比較的多数のヒトが、2度から3度の熱傷となる軽微あるいは重度の皮膚損傷を受けている。このような状況では接触アレルギーを誘発することが想定されるが、アレルギーの報告は未だない。加えて、MCAAはイボ除去剤として使われているが、接触アレルギーの報告は1例もない（Industry Risk Assessment Group, 2000）。

4.1.2.5.3 結論

提示されたデータはAnnex VIIA of Directive 67/548/EECに規定される基本要件に照らすと受け入れ難いものと考えられる。しかしながら、MCAAの広範囲な実用経験、および接触アレルギーの誘発が想定できる状況でもアレルギーに関する症例報告が1例もないことから、更なる試験の必要は無いと結論された。なおMCAAの感作性に関する適切な評価は、この物質の腐食性により阻害されるであろう。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1 動物での研究

リスクアセスメントに最も関連した反復投与毒性試験の結果をTable 4.9に要約した（Section 4.1.2.8‘発がん性’も参照）

Table 4.9 Oral repeated-dose toxicity

Study	NOAEL (mg/kg bw/day)	LOAEL (mg/kg bw/day)	Effects	Reference
Oral toxicity				
study 1: subacute, rat (5 d/wk, 12 doses over 16 days, gavage; 0, 7.5, 15, 30, 60, 120 mg/kg bw/day)	7.5	15	Lacrimation	NTP, 1992
study 2: subacute, male mice (5 d/wk, 12 doses over 16 days, gavage; 0, 15, 30, 60, 120, 240 mg/kg bw/day)	120	240	mortality, clinical signs	NTP, 1992
study 3: subacute, female mice (5 d/wk, 12 doses over 16 days, gavage; 0, 30, 60, 120, 240, 480 mg/kg bw/day)	60	120	Lacrimation	NTP, 1992
study 4: semichronic, rat (13 wk, 5 d/wk, gavage; 0, 30, 60, 90, 120, 150 mg/kg bw/day)	<30	30	changes in heart, liver, and kidney weights and clinical chemistry values; at doses ≥ 60 mg/kg bw/day: cardiomyopathy and mortality	NTP, 1992
study 5: semichronic, mice (13 wk, 5 d/wk, gavage; 0, 25, 50, 100, 150, 200 mg/kg bw/day)	100	150	increased liver weight, decreased serum cholinesterase activity	NTP, 1992
study 6: carcinogenicity (*), rats (103 wk, 5 d/wk, gavage; 0, 15, 30 mg/kg bw/day)	<15	15	decreased survival, acute inflammation of the nasal mucosa	NTP, 1992
study 7: carcinogenicity (*), mice (103 wk, 5 d/wk, gavage; 0, 50, 100 mg/kg bw/day)	<50	50	acute inflammation of the nasal mucosa	NTP, 1992
study 8: carcinogenicity (*), rats (104 wk, daily, drinking water; 0, 3.5, 26.1, 59.9 mg/kg bw/day)	3.5	26.1	changes in body weight	DeAngelo et al., 1997

* Description of study is provided in Section 4.1.2.8 'Carcinogenicity'.

経口

NTP (1992; **Table 4.9**のstudy 1) による用量設定試験において、5～6週齢のF344/Nラット (5匹/性/群) に脱イオン水に溶解したMCAAを16日間強制経口投与した (投与スケジュール: 5日間/週)。用量は0、7.5、15、30、60および120 mg/kg bw/dayであった。高用量群の雄が3日目に1例死亡した。この動物は投与4時間後に、流涙、虚脱、緩徐呼吸、四肢緊張度減少、運動失調、および把握反射低下を示した。流涙については、60および120 mg/kg bw/dayの雄、15～120 mg/kg bw/dayの雌にもそれぞれ認められた。この作用が用量依存的だったかどうかについては記載されていない。体重 (増加) の有意な変化は認められなかった。剖検による肉眼的検査および組織病理学検査においてMCAAに起因する病変は認められなかった。限定された試験デザインの範囲内で、無毒性量 (NOAEL) は高用量での流涙に基づき7.5 mg/kg bw/dayである。

別の16日間投与試験 (NTP, 1992; **Table 4.9**のstudy 2および3) では、7～8週齢のB6C3F1雄マウス (5匹/群) に0、15、30、60、120および240 mg/kg bw/dayを、B6C3F1雌マウス (5匹/群) に0、30、60、120、240および480 mg/kg bw/dayを同一投与デザインで投与した (NTP, 1992)。240 mg/kg bw/dayを投与した雄マウス、および、240または480 mg/kg bw/dayを投与した雌マウスは2日以内に全て死亡した。これらの動物にみられた臨床症状としては、流涙、運動失調、自発運動抑制、緩徐呼吸、徐脈、低体温、虚脱、立毛、四肢緊張度減少、および把握反射低下であった。平均最終体重、絶対および相対臓器重量、ならびに肉眼および顕微鏡検査に於いて、雌雄共に投与に関連した作用は認められなかった。また、120 mg/kg bw/day群 (雌) で流涙が認められた。限定された試験デザインの範囲内で、NOAELは雌マウスでは流涙に基づき60mg/kg bw/day、雄マウスでは臨床症状および死亡率に基づき120 mg/kg bw/dayである。

ラット13週間投与試験がNTPで実施されている (NTP, 1992; **Table 4.9**のstudy 4)。脱イオン水に溶解したMCAAをF344/Nラット (6～7週齢) に13週間強制経口投与した。1群20匹の雌雄ラットにMCAAを0、30、60、90、120および150 mg/kg bw/dayの用量で投与した。4および8週目に中間評価を行った (5匹/性/群)。血液検査、臨床化学検査および尿検査を中間評価時と試験終了時に実施した。120および150 mg/kg bw/day群の全てのラット、90 mg/kg bw/day群では20匹中19匹、60 mg/kg bw/day群では2匹の雄および1匹の雌が試験終了前に死亡した。投与に関連し用量依存性のある心筋症が死因と考えられた。高用量群での高い死亡率のため

め、主として0、30および60 mg/kg bw/day群の成績が報告された。平均体重（増加）および臨床症状には投与に関連した作用は認められなかった。60 mg/kg bw/day群で雌雄共に心臓の絶対重量が減少し、また60 mg/kg bw/day群の雄、ならびに30および60 mg/kg bw/dayの雌で（用量に依存して）心臓の相対重量が減少した。肝臓の絶対重量が60 mg/kg bw/dayの雄で増加し、また相対重量が30および60 mg/kg bw/dayの雄（用量依存的）、および60 mg/kg bw/dayの雌で増加した。腎臓の相対重量が30および60 mg/kg bw/dayの雄（用量依存的）で増加した。血中尿素窒素は、90～150 mg/kg bw/dayの雄、および60～150 mg/kg bw/dayの雌で用量依存的に増加した。60～150 mg/kg bw/dayの雌雄で、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ASAT）およびアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALAT）の用量依存的な増加が認められた。この増加は、全用量群および全測定時点ともに統計学的な有意差は認められなかった。チロキシン（T4）濃度が雄ラットの90、120および150 mg/kg bw/dayの4週目、および90 mg/kg bw/dayの8週目で増加した。血清コリンエステラーゼ活性は、雄の30および60 mg/kg bw/dayの13週目、および雌の全投与群の4および8週目と60 mg/kg bw/dayの13週目で減少した。血清コリンエステラーゼ活性の低下は、肝毒性の結果あるいはMCAAまたは代謝物によるこの酵素の直接阻害による可能性がある。更に雌で、総タンパク（30 mg/kg bw/day以上）、アルブミン（60 mg/kg bw/day）、カルシウム（30および60 mg/kg bw/day）、およびナトリウム（30 mg/kg bw/day以上）の血清中濃度の減少が8週や13週で認められた。血清カリウムの増加が、60 mg/kg bw/dayの雌、および30および60 mg/kg bw/dayの雄のそれぞれ13週目に認められた。ヘマトクリット値、ヘモグロビン、および赤血球数の増加が50 mg/kg bw/dayの雄の4週目に認められた。好中球数は、90、120および150 mg/kg bw/dayの雄の4週目で増加した。MCAA投与8週後には、30、60、90および120 mg/kg bw/dayの雄でリンパ球数の減少が認められた。試験中に死亡した動物の剖検では、胸腔に血液または透明な赤色液体、および肺の鬱血が認められた。用量に依存した心筋症が60 mg/kg bw/day以上の用量で雌雄共に認められた。本試験の結果からNOAELを導くことはできなかった。

脱イオン水で溶解したMCAAをB6C3F1マウス（7～8週齢）に0、25、50、100、150および200 mg/kg bw/dayの用量で13週間強制経口投与した（20匹/性/群；NTP, 1992; **Table 4.9**のstudy 5）。200 mg/kg bw/day群では全ての雄および2匹の雌が死亡したが、うち雄2匹と雌1匹は強制経口投与による外傷に起因するものだった。肝細胞の細胞質空胞変性が最高用量で死亡した5匹の雄および1匹の雌で認められた。最高用量群で生存した雌の平均体重増加が減少した。絶対および相対肝臓重量の増加（用量依存性なし）が100および200 mg/kg bw/day群の雌で認められたが、150 mg/kg bw/day群では認められなかった。100 mg/kg bw/day群での

肝臓重量の変化は軽微なものであり他の肝臓パラメータにも変化がないことから、毒性学的な意義はないものと考えられた。血清コリンエステラーゼ活性の低下が150および200 mg/kg bw/day群の雌の8および13週目で認められ、肝毒性の結果、あるいはMCAAまたは代謝物によるこの酵素の直接阻害による可能性が示された。生存動物では、用量依存性のある肉眼的あるいは組織病理学的変化は認められなかった。限定された試験デザインの範囲内でNOAELは100 mg/kg bw/dayであった。この試験においてマウスでの標的臓器は肝臓であることが示された。

上記NTP試験において、ラットの方がマウスよりMCAAの毒性作用に感受性が高かった。また明瞭な性差は認められなかった。組織病理学検査が実施されているが、詳細は報告書に記載されていない。

DeAngelo et al. (1989) はMCAAによるペルオキシソーム増殖誘導の感受性の種差について検討した。B6C3F1雄マウスおよびSprague-Dawley雄ラットにMCAAを14日間飲水投与した。投与濃度は、マウスでは0、11、21および32 mM（算出平均投与量は0、265、386および482 mg/kg bw/day；飲水量は未計測）、ラットでは0、11、21および32 mM（算出平均投与量は0、170、321および501 mg/kg bw/day；飲水量は未計測）であった。生存し解析に用いた動物数は、用量順にそれぞれマウスでは6、5、6および6匹であり、ラットでは6、6、6および5匹であった（初期動物数は未記載）。マウスでは、体重、相対肝臓重量およびペルオキシソーム増殖に関してMCAAによる著しい作用は認められなかった。一方ラットでは、体重および相対肝臓重量の用量に依存した統計学的に有意な減少が全ての用量群で認められた。しかしラットにおいてもペルオキシソーム増殖パラメータには投与に関連した作用は認められなかった。この試験では他の観察は実施されていない。限定された試験デザインの範囲内で、MCAA飲水投与に対する感受性は、雄マウスの方が雄ラットより低いことが示された。

Fuhrman et al. (1955) は以下に示す3つの試験で、MCAAを餌に混ぜてWistarラットに投与した。飼料中のMCAAの安定性に関するデータを著者が報告していないことを注記する。NTPの反復投与毒性試験（NTP, 1992）では、ガスクロマトグラフィー分析により飼料中のMCAAは不安定であったことから強制経口投与経路を選択している。それゆえ、Fuhrmanの試験結果の解釈については注意する必要がある。

Fuhrman et al. (1955) は白色Wistarラットの雄の離乳児に、MCAAを餌に混ぜて208日間（6匹/群）投与した。投与量は0.005、0.01、0.025、0.05および0.1%（2.5、5、12.5、25および50 mg/kg bw/dayに相当）であった。対照群は含まれていた。試験デザインは限定的であった。以下のパラメータを調べた：体重、摂餌量、外観、行動、および心臓、脾臓、副腎、腎臓、肺、胃、腸、膵臓、甲状腺、膀胱ならびに精巢の肉眼および顕微鏡検査。血液検査および臨床化学検査は試験デザインに含まれていなかった。臓器重量は測定していない。統計学的に有意な成長率の低下が最高用量群で認められたが、日々の個体毎の摂餌量は幾分多かった。0.005、0.01、0.025および0.05%群で5匹の動物が、負傷（特定されていない）あるいは肺炎により死亡した。剖検の結果、投与に関連した肉眼および顕微鏡検査での損傷は認められなかった。限定された試験デザインの範囲内で、最高用量群での成長率の低下に基づき、NOAELは25 mg/kg bw/dayとした。

二番目の試験では、Fuhrman et al. (1955) は、ランニングケージに収容した2.5ヵ月齢のWistarラット（2群、6匹/群）の活動に関して、0.1% MCAAを含む餌の影響について調べた。40日間の訓練と調整（Day 1～40）後、第1試験期間を開始した（Day 41～60）。61日目に餌を交換した。各ラットはそれぞれ独自の摂餌コントロールを行った。再調整期間（Day 61～67）後、第2試験期間（Day 68～88）を開始した。僅かだが統計学的に有意な平均走行距離の減少が、対照群と比べてMCAA投与群で認められた。

三番目の試験では、Fuhrman et al. (1955) は0.1% MCAAを90日間餌に混ぜて投与し、肝臓グリコーゲン、および肝臓、大脳皮質、腎臓皮質および骨格筋サンプルの酸素消費量に対する作用を調べた。6匹の若い成熟Wistar雄ラットにMCAAを含む餌を与え、6匹にはMCAAを含まない餌を与えた。MCAA混餌投与は肝臓グリコーゲンにも酸素消費量にも影響しなかった。

Sprague-Dawley雄ラット（5匹/投与群、5匹/対照群）にMCAAを90日間飲水投与した（Bhat et al., 1991）。投与濃度は1.9 mM（19 mg/kg bw/dayに相当）であった。投与液は各ラットの約1/4LD50となるよう調製した。投与群の体重は対照群の95.2%であった。臓器重量には統計学的な有意差はなかった。主要臓器の光学顕微鏡検査では、肺（血管周囲炎の病巣）および肝臓（軽微なコラーゲン沈着、軽度～中等度の門脈膨張/拡張）に様々な程度の変化が認められた。他の臓器に形態学的な変化は認められなかった。血液検査および臨床化学検査は実施していない。限定された試験デザインのため、この試験をリスクアセスメントのため

めのNOAEL/LOAELを導くのに使うことはできない。しかしながら、試験結果はNTP (1992)の試験結果と相反するものではなかった。

MCAAをラットおよびマウスに飲水または経口投与しても発がん性の証拠は認められなかった。2年間の飲水投与試験がDeAngelo et al.により実施され、NOAELは3.5 mg/kg bw/dayであることが示された (1997; Section 4.1.2.8 'Carcinogenicity'参照)。この用量レベルでは生存性、体重、あるいは(非)腫瘍性病変に何ら影響を与えなかった。

吸入

信頼できる吸入曝露反復投与毒性試験は入手できなかった。

経皮

信頼できる経皮曝露反復投与毒性試験は入手できなかった。

4.1.2.6.2 ヒトでの研究

MCAAのヒトでの反復曝露による毒性データは入手できなかった。

4.1.2.6.3 結論

提出されたデータはAnnex VIIA of Directive 67/548/EECに規定される基本要件に照らして受け入れられるものと考えられる。利用可能な経口反復投与毒性データは反復曝露のリスク判定を可能にする。反復経皮および吸入曝露の毒性評価に利用可能な適切な試験はない。

いくつかの試験で死亡率の増加が認められた。死亡のみられた用量レベルはLD50値に近似していた。死亡率は投与最初の日/週に高かったが、これは単に急性毒性作用によるものと考えられている。

MCAAに16日間および13週間曝露した経口反復投与毒性試験が利用可能である。16日間毒性試験(強制経口投与)の限定された試験デザインの範囲内で、流涙の症状に基づき、

NOAELはラットでは7.5 mg/kg bw/day、マウスでは60 mg/kg bw/dayであった。ラット13週間反復投与毒性試験（強制経口投与）の結果からは、NOAELを導くことはできなかった。肺、肝臓および腎臓の重量変化、ならびに臨床化学値の変化が最小用量の30 mg/kg bw/dayで認められた。用量依存性のある心筋症が60 mg/kg bw/day以上の両性で認められた。13週間経口投与したマウスで肝臓重量の増加および血清コリンエステラーゼ活性の低下が認められ、NOAELは100 mg/kg bw/dayであった。DeAngelo et al. (1997) により実施されたラットの2年間飲水投与試験より導かれたNOAELは3.5 mg/kg bw/dayであり、この数値はリスク判定の起点として用いられる（Section 4.1.2.8 ‘Carcinogenicity’参照）。この用量レベルでは、生存性、体重、あるいは（非）腫瘍性病変に何ら影響を与えなかった。

長期経口投与した場合のMCAAの主要標的臓器はラットおよびマウスともに肝臓であり、さらにラットでは肺および腎臓である。更に、成長抑制、生存性の低下、および鼻粘膜の炎症が発がん性試験で認められた。反復投与毒性試験において試験期間が長くなると、低用量レベルでは心臓に対する作用は発現しなかった。利用可能なデータに基づき、MCAAの毒性作用に対してラットはマウスより感受性が高いことが示された。

4.1.2.7 変異原性

変異原性試験の詳細はTable 4.10に要約されている。

4.1.2.7.1 In vitro試験

細菌を用いる試験

MCAAは*S. typhimurium* (TA 98, TA100, TA 102, TA 104, TA1535, TA1537およびTA1538) および*E. coli* (WP2uvrAおよびWP2uvrA/pKM101) に対して外部の代謝活性化 (S9) の有無に拘わらず変異原性を示さなかった (Giller, 1997; JETOC, 1996; Hoechst AG, 1979f; Bartsch et al., 1975; Malaveille et al., 1975; McCann et al., 1975; NTP, 1992; Mortelmans et al., 1986; Rannung et al., 1976; Bartsch and Montesano, 1975; Bartsch et al., 1976)。MCAAは、*E. coli* DNA修復欠損株 (WP100) に対して野生株WP2を超えた選択的殺菌作用を示さず (NTP, 1992; Mamber et al., 1983)、また*E. coli* K12 溶原菌でのプロファージ誘発にも不活性であった (NTP, 1992)。これらの所見はMCAAがこれらの試験系でDNA損傷を起こさないこと示し

ている。更に、MCAAは*S.typhimurium* TA1535/psK1002 の*umu*遺伝子発現を誘導しなかった (NTP, 1992; Nakamura et al., 1987; Ono et al., 1991)。 *E. coli* PQ37を用いたSOSクロモテストにおいて、MCAAは陽性反応を示さなかった (代謝活性化処理無し) (Giller, 1997)。

動物培養細胞試験を用いる試験

チャイニーズハムスター肺線維芽細胞に対して、S9による代謝活性化の有無に拘わらず、MCAAは染色体異常あるいは姉妹染色分体交換を誘発しなかった (NTP, 1992; Sawada et al., 1987)。チャイニーズハムスター卵巣由来細胞に対して、S9処理無しで姉妹染色分体交換の用量依存的な増加が認められたが、S9処理の有無に拘わらず染色体異常誘発作用は認められなかった (Galloway et al., 1987; NTP, 1992)。チャイニーズハムスターV79細胞を用いた*in vitro* HGPRT試験において、MCAAは8-アザグアニンおよびウワバイン抵抗性突然変異を誘発しなかった (Huberman et al., 1975)。ラットおよびマウス肝細胞の初代培養細胞、あるいはヒトCCRF-CEM細胞に対して、MCAAはDNA鎖切断作用を示さなかった (Chang, 1992)。マウスリンフォーマL5178Y細胞を用いたトリフルオロチミジン抵抗性突然変異誘発を調べる試験において、S9の存在下および非存在下の両方で、細胞毒性を示す濃度で陽性反応が認められた (Amacher and Turner, 1982; McGregor et al., 1987)。細胞毒性を示す濃度以下では反応は概して陰性であり、細胞毒性濃度でpHの酸性シフトが認められた。pHの変化が突然変異頻度を増加させることは良く知られているが、マウスリンフォーマ細胞を用いた2つの突然変異試験では、実施した試験条件下でのpH変化の影響を調べる適切な対照を設定していなかったことから、陽性の試験結果に対する妥当性の評価ができない。

細胞毒性およびpHシフトでの培養条件下では遺伝毒性と関連のない作用が起こることは既知のことである (Oberly and Garriott, 1996; Clive et al., 1995; Cifone et al., 1987)。従って、バクテリアを用いた変異原性試験での陰性結果、およびマウスリンフォーマ試験での陽性反応が細胞毒性濃度でのみ認められたことを考慮すると、MCAAのマウスリンフォーマ試験での変異原性活性は疑わしい。

4.1.2.7.2 In vivo 試験

両生類を用いる試験

MCAAはイペリアトゲイモリ (*Pleurodeles waltl*) の幼生を用いた小核試験において染色体異常誘発作用を示さなかった

ショウジョウバエを用いる試験

MCAAを雄のキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) に混餌投与しても、生殖細胞に伴性劣性致死突然変を誘発しなかった；一方、注射により投与した場合は擬陽性 (equivocal) の結果が得られた (Foureman, 1994; NTP, 1992)。

動物を用いる試験

MCAAを腹腔内、経口あるいは皮下投与したSwissマウス骨髄細胞の染色体異常誘発および精子の形態異常誘発に関する研究の抄録が1件ある (Bhunya and Das, 1987)。Bhunya and Das (1987) は、用量および投与経路に関連して様々な骨髄細胞染色体異常および様々な精子頭部形態異常がMCAAにより誘発されると結論した。しかしながら、試験、試験結果、および異常の分類の記載が極めて限られていることから、これらの試験結果を評価することができない。

MCAAを経口投与しても、マウスの脾臓、十二指腸および胃、あるいはマウスおよびラットの肝臓にDNA鎖切断を起こさなかった (Chang et al., 1992)。

4.1.2.7.3 結論

報告の不備が指摘されたが、利用可能なデータは変異原性に関するAnnex VIIA の必要条件を満たしていた。特に明記しない限り大部分の変異原性データは有効な試験に基づいており、最近のガイドラインに従うかあるいは範囲内であった。

MCAAは細菌に遺伝子突然変異またはDNA一次損傷を引き起こさず、また*in vitro*での動物細胞に染色体異常あるいはDNA鎖切断を起こさなかった。MCAAは*in vitro*での動物細胞を用いた幾つかのTK+/TK-試験で陽性結果をもたらした。しかしながら、陽性結果はMCAAの直接的な変異原性作用ではなくpHの影響による可能性が示唆された。MCAAを生体に経口投与した場合、マウスの脾臓、十二指腸、胃、あるいはマウスおよびラットの肝臓にDNA

鎖切断を起こさなかった。MCAAはマウスに対し精子形態異常および骨髄細胞に染色体異常を起こすことが報告されている。しかしながら、試験に関する記載が限定されていることから、これら陽性結果の妥当性は明確ではない。MCAAの全体的な毒性プロファイルは発がん性を示唆するものではなく、また警告部分構造 (structural alert) がないことから、更なる遺伝毒性試験は必要ないと結論した。

入手可能なデータに基づき、MCAAは遺伝毒物ではないと結論される。

Table 4.10 Relevant *in vitro* and *in vivo* mutagenicity tests

I Bacterial tests

Cell type	Protocol	metabolic activation	Concentration	toxic concentration	result	comments	reference
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537	Ames test (plate incorporation)	with and without (rat liver S9)	0.8-1,000 μ g/plate	not reported	-		Hoedchst AG (1979)
<i>S. typhimurium</i> TA1530	Ames test	with and without (rat liver S9)	1.1-108 μ mol/plate	10.8 μ mol/plate	-		Bartsch et al. (1975)
<i>S. typhimurium</i> TA1530	Ames test	with and without (rat liver S9)	0.4-40 μ mol/ml	4 μ mol/ml	-		Malaveille et al. (1975)
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537	Ames test	with and without (rat or human liver S9)	not reported	not reported	-		McCann et al. (1975)
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537	Ames test	with and without (rat or hamster liver S9)	10-3,333 μ g/plate	>3,333 μ g/plate	-		NTP (1992)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	Ames test	without	0.1 -1,000 mM (3 plates/conc.)	>10 - <500 mM	-		Rannung et al. (1976)
<i>S. typhimurium</i> TA1530	Ames test	with and without (mouse liver fraction)	0.4-40 μ mol/ml	<4 μ mol/ml	-		Bartsch and Montesano (1975)
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537, and TA1538/ <i>E. coli</i> WP2uvrA and WP2uvrA/pKM101	Ames test (pre incubation)	with and without (rat liver S9)	9.77-5,000 μ g/plate	2,500 μ g/plate	-		JETOC (1996)

Table 4.10 continued overleaf

Table 4.10 continued Relevant *in vitro* and *in vivo* mutagenicity tests

Cell type	Protocol	metabolic activation	Concentration	toxic concentration	result	comments	reference
S. typhimurium TA100	Ames fluctuation test	with (rat liver S9) without (rat liver S9)	0.3-300 µg/ml 30-10,000 µg/ml	100 µg/ml 3000 µg/ml	- -		Giller (1997)
S. typhimurium TA1535/pSK10 02	<i>Umu</i> test	with and without (rat liver S9)	≤330 µg/ml	not reported	-	primary DNA damage	Nakamura et al. (1987); NTP (1992)
S. typhimurium TA1535/pSK10 02	<i>Umu</i> test	with and without (rat liver S9)	485.4 µg/ml	not reported	-	primary DNA damage	Ono et al. (1991)
E coli WP2 (wild type)/WP100 (uvrA- recA)	rec assay, qualitative and quantitative spot tests and quantitative suspension	with and without (rat liver S9)	3 conc. (conc not reported)	not applicable	-	primary DNA damage	Mamber et al. (1983); NTP (1992)
E coli PQ 37	SOS-chromotest	with and without (rat liver S9)	1-3,000 µg/ml 3-3,000 µg/ml	300 µg/ml 1,000 µg/ml	- -	maximum induction factor 1.05 maximum induction factor 1.16	Giller (1997)

II Mammalian cells, *in vitro*

Cell type	protocol	metabolic activation	Concentration	toxic concentration	result	comments	reference
Chinese hamster lung fibroblast cells	CA	with and without (rat liver S9)	60-500 µg/ml	500 µg/ml (+S9)	-		NTP (1992); Sawada et al. (1987)
	SCE	with and without (rat liver S9)	60-500 µg/ml	not reported	-		

Table 4.10 continued overleaf

Table 4.10 continued Relevant *in vitro* and *in vivo* mutagenicity tests

Cell type	protocol	metabolic activation	Concentration	toxic concentration	result	comments	reference
CHO cells	CA SCE	with and without (S9) with and without (S9)	50-500 µg/ml 50-500 µg/ml (-S9) 50-1,600 µg/ml (+S9)	not reported not reported	- + -	A dose related increase in SCE was observed without S9.	Galloway et al. (1987), NTP (1992)
Chinese hamster V79 cells	HPRT assay (8-azaguanine- and ouabain resistance)	without	<2.1mM (ca. 200 µg/ml)		*	MCAA did not induce an increase of 8-azaguanine or ouabain-resistant mutants up to the highest concentration tested. The number of mutants was expressed per number of survivors. The highest concentration resulted in a cloning efficiency of 94%. The publication does not give further details on concentrations tested and results obtained with MCAA. The highest concentration tested was not sufficiently high for the assessment of possible mutagenic properties of MCAA in this test system.	Huberman et al. (1975)
Mouse lymphoma L5178Y cells	TK-/TK- assay	with (rat liver S9), uninduced 5% in activation mix	exp. 1: 330.0- 784.9 µg/ml (dilution factor 0.93) exp. 2: 139.4-1048.2 µg/ml (dilution factor 0.75)	exp. 1: 330.0 µg/ml (=LC50) exp. 2: 139.4 µg/ml (LC50=186.0 µg/ml)	* *	Exposure time: 3 hours. Steep dose response curve in cytotoxic concentration range, i.e., a doubling in mutants was seen at survival ≤ 18% at concentration ≥ 546.7 µg/ml (exp. 1) and ≤ 19% at concentrations ≥ 589 µg/ml and above (exp. 2). Positive results could be a pH-effect Inappropriate study design for assessment of this possible effect.	Amacher and Turner (1982)

Table 4.10 continued overleaf

Table 4.10 continued Relevant *in vitro* and *in vivo* mutagenicity tests

Cell type	protocol	metabolic activation	Concentration	toxic concentration	result	comments	reference
Mouse lymphoma L5178Y cells	TK+/TK- assay	without	31.3-800 µg/ml	125-800 µg/ml	*	Exposure time: 4 hours Lowest observed effect dose: 400 µg/ml The MF _{test} /MF _{control} ratio's amounted to 2.7 and 3.1, and the relative total growth values to 15 and 8% in experiment 1 and 2, respectively. Positive result may well be a pH-effect as the phenol red indicator in the Fischer's medium changed colour from pink to yellow at 400 µg/ml.	McGregor et al. (1987); NTP (1992)
Rat hepatocytes (Fischer 344, male) and mouse hepatocytes B6C3F1, male)	DNA strand breaks (alkaline elution)	not applicable	0, 1, 5, and 10 mM for 4 hours	5 mM	1 mM: - ≥ 5 mM: see comments	The results obtained at 5 mM (rat hepatocyte) and 10 mM (rat and mouse hepatocyte) pointed to an increase in DNA strand breaks occurring secondarily to cytotoxicity as demonstrated by the concurrent LDH release in the culture medium.	Chang (1992)
human lymphoblastic cell line (CCRF-CEM)	DNA strand breaks (alkaline elution)	without S9	0, 1, 5, and 10 mM for 2 hours	> 10 mM	-		Chang (1992)

III Amphibia, *in vivo*

Species	Test	concentration	toxic concentration	Result	Comments	reference
Pleurodeles waltl larvae (blood erythrocytes)	newt micronucleus test (15 larvae/concentration)	10, 20, 40 µg/ml in swimming water	80 µg/ml	Result: -	No increase in the incidence of micronucleated erythrocytes was observed.	Giller (1997)

Table 4.10 continued over leaf

Table 4.10 continued Relevant *in vitro* and *in vivo* mutagenicity tests

IV *Drosophila melanogaster, in vivo*

Species	Test	experimental	Result	Comments	reference
<i>Drosophila melanogaster</i>	Sex-linked recessive lethal test	dose: 900 ppm (injection) dose: 400 ppm (feed, 72 hours)	Result: +/- Result: -	MCAA injected induced an equivocal response.	Fourman (1994); NTP (1992)

V Mammals, *in vivo*

Species	Test	Experimental	Result	Comments	reference
Swiss mice (n and sex not reported)	Chromosome aberrations in bone marrow cells (n = 300 cells/group)	dose i.p. (sacrifice time): 1*12.5 mg/kg (24 hrs after treatment); 1*25 mg/kg (24 hours after treatment); 1*50 mg/kg (6, 24, 48 hours after treatment); 5*10 mg/kg (120 hrs after treatment) dose p.o. (sacrifice time): 1*50 mg/kg (24 hours after treatment) dose s.c. (sacrifice time): 1*50 mg/kg (24 hours after treatment)	*	% of cells with aberrations including "breaks" and "chromatid deletion including rings" (no further details) increased in all treatment groups. Test not suitable for evaluation a.o. due to limited description of the experiment, the results, and the classification of the abnormalities (only abstract available).	Bhunya and Das (1987)
Swiss mice (n= 3 males/dose group)	Sperm abnormality test	dose: 1* 12.5 mg/kg ; 1*25 mg/kg; 1*50 mg/kg, route unknown Sacrifice time 35 days after treatment	*	Test not suitable for evaluation a.o. due to limited description of the experiment, the results, and the classification of the abnormalities (only abstract available).	Bhunya and Das (1987)
Charles River mice (B6C3F1, male, n=2)	DNA strand breaks in liver, spleen, duodenum, and stomach	dose p.o. (sacrifice time): a single dose of 1-10 mmole/kg in distilled water (4 hours after treatment)	-		Chang (1992)
rat (Fischer 344, male, n not reported)	DNA strand breaks in liver	dose p.o. (sacrifice time): a single dose of 1, 5, 10 mmole/kg in distilled water (4 hours after treatment)	- (at 1 mmol/kg)	No data were available on mutagenicity at higher doses. The animals of the 5 and 10 mmole/kg dose groups did not survive.	Chang (1992)

* test not suitable for evaluation

4.1.2.8 発がん性

動物での研究

経口

1群雌雄各70匹のF344/Nラットに、脱イオン水に溶解したMCAAを0、15および30 mg/kg bw/dayの用量で週5日103週間強制経口投与した（NTP, 1992； **Table 4.9**のstudy 6）。中間評価として6および15ヵ月目に、各群雌雄各10および7匹をそれぞれ屠殺した。

6ヵ月目の評価（10匹/性/群）では、高用量群雌の心臓の相対重量増加、高用量群雄の腎臓の相対重量増加、および低用量と高用量群雌の腎臓の相対重量の減少が認められた。脳の絶対重量は低用量および高用量群の雌で減少したが、相対重量は低用量群の雌でのみ減少した。これらの変化は15ヵ月目の評価（7匹/性/群）では認められなかった。MCAA投与に関連した腫瘍は中間評価の屠殺動物では認められなかった。高用量群の雄、および低用量と高用量群の雌で生存率が低下した（試験終了時の平均生存日数および生存率：それぞれ雄：577、570、528日；53、40、32%、および雌：591、544、545日；70、38、51%）。どの死亡動物にも肉眼的および顕微鏡的に重大な病変は認められず、また投与による損傷の徴候も認められなかった。高用量群の雄の平均体重が2年目で減少した。子宮内膜間質ポリープの統計学的に有意な増加傾向が認められた（0、15および30 mg/kg bw/day群でそれぞれ1/53、7/53および9/53）。この病変はバックグラウンドに通常みられる所見であり、また今回の対照群での出現頻度が異常に低かったことから、この所見は発がん性の明確な証拠ではないと考えている。さらに、出現時期の短縮あるいは悪性形質転換の証拠はなかった。試験群にさらに多く発現した非腫瘍性病変としては、肺鬱血（0、15および30 mg/kg bw/day群でそれぞれ、雌：1/53、6/53、13/53、雄：2/53、6/53、10/53）、雌の急性鼻粘膜炎症（0、15および30 mg/kg bw/day群でそれぞれ0/52、6/53、5/48）、および雄の鼻の扁平上皮化生（0、15および30 mg/kg bw/day群でそれぞれ0/52、0/53、6/53）であった。肺および鼻のこれらの変化は投与液の逆流による結果かも知れない。この試験結果に基づき、F344/N雌雄ラットに対して発がん性の明確な証拠はない。生存率低下および急性鼻粘膜炎症に基づき、NOAELは15 mg/kg bw/dayより低いとした。血液検査および臨床化学検査は試験デザインには含まれていなかった。完全な組織病理学検査が実施されていた。

1群雌雄各60匹のB6C3F1マウスに、0、50および100 mg/kg bw/dayをラットと同じ投与計画

で投与した（NTP, 1992 ; **Table 4.9**のstudy 7）。高用量群雌の平均体重が2年目で減少した。投与に関連した臨床症状はなかった。高用量群の雄の生存率が統計学的に有意に減少した（試験終了時の平均生存日数および生存率：0、50および100 mg/kg bw/dayでそれぞれ、683、627、530日、および79、65、38%）。雄に投与と関連性がない腫瘍性病変が認められた（完全な組織病理学検査を実施した）。雌では悪性リンパ腫の用量依存的な減少が認められた。すなわち、0、50および100 mg/kg bw/day群でそれぞれ、29/60、18/60および13/60であった。高用量群の2匹の雌の前胃に扁平上皮乳頭腫が認められた。高用量の雌雄で、前胃の扁平上皮過形成が統計学的に有意に増加した。急性鼻炎の増加が、高用量の雄（0、50および100 mg/kg bw/day群でそれぞれ、3/60、7/59および24/60）、および低用量と高用量群の雌（0、50および100 mg/kg bw/day群でそれぞれ、5/60、15/60および31/60）で認められた。加えて、高用量の雌では鼻の嗅上皮化生および肺の経脈管リンパ球浸潤の増加が認められ、高用量の雄では肺鬱血がより頻繁に認められた。鼻の嗅上皮化生および肺鬱血は、経口経路による全身作用ではなく投与液の逆流による結果と考えられる。この試験結果に基づき、B6C3F1雌雄マウスに対する発がん性の明確な証拠はない。他の作用は何も認められなかった。血液検査、臨床化学検査および臓器重量測定はこの試験デザインには含まれていなかったことを注記する。限定された試験デザインの範囲内では、前胃での所見、および体重と生存率の低下にそれぞれ基づき、局所毒性のNOAELは50 mg/kg bw/dayより低く、また全身毒性のそれは50 mg/kg bw/dayであるとした。

DeAngelo et al. (1992) は、MCAAのF344雄ラットに対する発がん性を評価するために飲水投与試験を実施した。試験濃度はMCAAの0.05、0.5および2 g/L（時間を考慮した平均1日投与量は3.6、28および69 mg/kg bw/dayに相当）であった。MCAAを100～104週間投与した。死亡率、体重増加、臓器重量、肉眼所見、および選択された組織（不特定）の組織病理学検査により評価した。MCAA投与に関連した病変は認められなかったが、用量に依存した体重増加抑制および高用量群での死亡率の増加が認められた。MCAAは雄ラットに対して発がん性を持たないことがこの試験では結論された。しかしながら、この試験は抄録しか入手できなかった。

DeAngelo et al. (1997 ; **Table 4.9**のstudy 8) はMCAAのラット発がん性について飲水投与により検討した。F344/N雄ラット（50匹/群）に0、0.05、0.5および1.1 g/L（時間加重平均1日投与量は0、3.5、26.1および59.9 mg/kg bw/dayに相当）を104週間投与した。15、30、45および60週目に中間検査として、身体、肝臓、腎臓、脾臓および膀胱の肉眼検査、および肝臓、

腎臓、脾臓および精巣の顕微鏡検査を行った（屠殺した動物総数は0、0.05、0.5および1.1 g/L群でそれぞれ21、18、18および21匹）。104週後の生存性に影響は認められなかった。体重および飲水量が0.5および1.1 g/L群で有意に抑制された。体重は対照群に比べ、それぞれ13%および38%低かった。飲水量は対照群の77 mg/kg bw/day（時間加重平均）に対し、中間用量および高用量群では共に56 mg/kg bw/dayであった。肝臓の相対および絶対重量、および腎臓の絶対重量が0.5および1.1 g/L群で減少した（用量依存的に）。精巣の相対重量が0.5および1.1 g/L群で有意に増加したが、絶対重量は対照群と比べ統計学的な有意差はなかった。肝臓、腎臓、および精巣の重量変化は、投与に関連した組織病理学変化を伴っておらず、これら投与群における成長抑制の二次的なものと考えられた（Feron et al., 1973; Oishi et al., 1979）。脾臓の平均相対および絶対重量が0.05 g/L群で統計学的に有意に増加したが、一方0.5および1.1 g/L群の脾臓重量は減少した（1.1 g/L群でのみ有意差）。群間および群内の脾臓重量の変動はこれらの群の単核細胞白血病の発症率の変動と平行していた（すなわち、0、0.05、0.5および1.1 g/L群の単核細胞白血病の発症率はそれぞれ24、48、17および4%）。0.05 g/L群での平均脾臓重量の増加は、MCAAの脾臓に対する直接的な毒性作用ではなく、白血病を発症した動物の脾臓重量増加を反映していることが示唆された。1.1 g/L群での脾臓重量の大きな減少は、この用量での顕著な成長抑制によるものとする事ができる。組織病理学検査では腫瘍性病変の有病率の有意な増加は認められなかった。高用量群の104週目において、心筋変性の増加および鼻腔の慢性炎症が認められた。血漿ASATおよびALATレベル（104週目に測定）、あるいはペルオキシゾームおよび肝細胞増殖（中間および最終屠殺時測定）には投与に関連した影響は認められなかった。この試験は肝臓の発がん性/毒性の検出に焦点を絞っており、血液検査および臨床化学検査（血漿ASATおよびALATを除く）は含まれていなかったことを注記する。肝臓の腫瘍形成の証拠はなかったことを論文の著者は結論している。104週投与後のNOAELは、成長抑制および飲水量の減少に基づき0.05 g/L（3.5 mg/kg bw/day）である。中間評価においても腫瘍あるいは投与に関連した変化は検出されなかった。

吸入

吸入曝露による発がん性試験は入手できなかった。

皮膚

MCAAの発がん性についてVan Duuren et al. (1974)により研究された。ICR/Ha Swiss雌マウス（6～8週齢）にMCAAを皮膚塗布（実験1）あるいは皮下投与（実験2）により曝露した。動物は定期的に検査した。頭蓋部を除き完全な剖検を行った。異常の見られた全ての組織および臓器について組織病理学検査を実施した。血液学検査および臨床化学検査は実施しなかった。両試験とも生存性に対する影響は認められなかった。実験1では、0.1 mLのアセトンに溶解した2.0 mgのMCAAを50匹のマウスの肩甲骨間部に週3回の割合で580日間塗布した。いずれのマウスにおいても局所性の乳頭腫あるいは癌腫は認められなかった。実験2では、MCAA（0.5 mgを0.05 mLのトリカプリリンに溶解）を50匹のマウスの左脇腹に週1回で580日間注射した。局所性肉腫の統計学的に有意でない増加が認められた（MCAA投与群：3/50に対し対照群：1/50）。他の局所性悪性腫瘍、扁平上皮癌あるいは腺癌は認められなかった。両試験には溶媒対照群（50匹）および無処理群（100匹）が含まれていた。例えば実施された組織病理学検査の結果が示されないなど、結果の更なる詳細については提供されなかった。実験2で使用された投与経路は、リスク判定には適切でないと考えられていることを注記する。

実験1の結果に基づき、雌マウスに対する発がん性の証拠は認められない。

4.1.2.8.1 ヒトでの研究

MCAA曝露によるヒトでの発がん性のデータは入手できなかった。

その他

MCAAはニューカッスル病ウイルスによるマウス I 型インターフェロン誘導に重大な影響を及ぼさなかった。I 型インターフェロン誘導はいくつかの発がん性化学物質により抑制されることが示されている（Sonnenfeld et al., 1980）。

4.1.2.8.2 結論

MCAAの発がん性について、ラットおよびマウスへの強制経口投与、および雄ラットへの飲水投与による経口曝露の試験が行われた。これらの試験結果に基づき、経口投与による

MCAAの発がん性の証拠は見つからなかった。

経口曝露の他に皮膚接触による発がん性試験が入手できた。MCAAを雌マウスの肩甲骨間部皮膚に反復塗布しても、局所性の乳頭腫または癌腫は認められなかった。この試験結果に基づき、雌マウスへの反復皮膚曝露による発がん性の証拠は認められないと結論される。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 動物での研究

生殖（繁殖）毒性

生殖毒性試験は入手できなかった。反復投与毒性試験より以下の情報が入手できた。16日間（ラットは最大120 mg/kg bw/dayまで；マウスは最大240 mg/kg bw/dayまで）、13週間（ラットは最大150 mg/kg bw/dayまで；マウスは最大200 mg/kg bw/dayまで）および103週間（ラットは0、15または30 mg/kg bw/day；マウスは0、50または100 mg/kg bw/day）強制経口投与試験において、B6C3F1マウスおよびF344/Nラットの雌雄の生殖器官には投与に関連した作用は認められなかった。陰核腺または包皮腺（ラット）、乳腺、卵巣、前立腺、精巣上体と精巣、および子宮を調べたが生物学的に重大な所見はなかった。103週間投与試験の雌ラットで、子宮内膜間質ポリープ発生率に用量依存性のある統計学的に有意な増加が認められた（それぞれ、2/60、7/57および10/60）。しかしながら、対照群のこれら病変の発生率は異常に低く、またMCAA投与の雌の発生率はヒストリカルコントロールの平均発生率（116/252または20.6%、範囲10-38%）より低かった。さらに、唯一の悪性子宮内膜間質腫瘍が対照群で発生した。これらの理由から、投与群雌ラットにみられた子宮内膜間質ポリープの僅かな増加は、MCAA投与に関連するとは考えられなかった（NTP, 1992）。Bhat et al. (1991) は、MCAAを90日間飲水投与（濃度1.9 mM：19 mg/kg bw/dayに相当）したラットの精巣に形態的变化を認めなかった。MCAAを104週間飲水投与（0.05、0.5または1.1 g/L）したラットの精巣重量に毒性学的に関連した変化は認められなかった。飲水中の最高濃度は、最初2.0 g/Lで毒性症状発現時には1.1 g/Lに下げた（1.1 g/Lは時間加重平均1日投与量）（DeAngelo et al., 1997）。

発生毒性

胎児の心臓催奇形性を調べる目的の試験において、10匹のHsd:Sprague Dawley雌ラットにMCAAを妊娠期間中（20日間）飲水投与した。濃度レベルは1.57 ppm（193 mg/kg bw/dayに相当）であった。試験には55匹の妊娠ラットの対照群を含んでいた。投与に関連した母動物死亡は認められなかった。妊娠期間中の平均体重増加は減少した。着床数、吸収胚数、ならびに生存および死亡胎児数に影響は認められなかった。胎児体重、胎盤重量、頭殿長および外部形態について調べた。心臓も含めて、影響は認められなかった。骨格奇形および脳に対する影響は、限定された試験デザインのこの試験では調べなかった（Johnson et al., 1998）。

さらに、別の発生毒性試験の短報が1報入手できただけである（Smith et al., 1990）。蒸留水に溶解したMCAAを0、17、35、70または140 mg/kg bw/dayの用量でLong-Evans妊娠ラット（動物数は不明）の妊娠6～15日に経口投与した。最高用量群で母動物体重増加が統計学的に有意に減少した。投薬に関連した母動物死亡は認められなかった。さらに、臓器重量、同腹児当たりの平均吸収胚率および生存児体重には投薬に関連した影響は認められなかった。短報によれば、軟組織奇形発生率が増加したが用量依存的ではなかった。骨格奇形は認められなかった。最高用量群で、主として左胸心を含む心臓血管系の奇形が統計学的に有意に増加した。限定された報告のため、リスク判定に用いる発生毒性および母体毒性のNOAELは確立することができなかった。この試験の完全な報告はなかった。

CD-1マウス胚（3～6体節期）をMCAAに*in vitro*で24～26時間曝露した（Hunter et al., 1996）。蒸留水中のMCAA試験濃度は、0、50、100、175、250、350および500 μM であった。各濃度における培養胚の数は、それぞれ34、5、21、28、34、10および10であった。この試験において発生毒性の徴候が観察された。2つの高用量群では全ての胚が死亡した。250 μM 群では34の胚のうち14の胚が死亡した。眼に対する作用および体節の異形は観察されなかった。統計学的に有意な奇形の増加が175および250 μM で、それぞれ39.3%および70%みられた。神経管欠損が175および250 μM 群でそれぞれ胚の39.3%および50%に認められた。また、体節数の統計学的に有意な減少もこれらの処理群で認められた（それぞれ19.4および19.6）。250 μM 群で咽頭弓および心臓の異常がそれぞれ40%および65%の胚に認められた。神経管欠損発生率5%に基づく基準濃度は90 μM であった。

Yuan-Tang et al. (1998) は塩素化消毒飲料水副生成物の催奇形性について、ヒドラ消化器領

域の再生試験により検討した。MCAAは試験した物質の1つであった。陽性および陰性対照を含んでいた。72時間曝露後のポリプの50%毒性濃度 (T50) および50%再生抑制濃度 (I50) はそれぞれ955および155 mg/Lであった。陰性対照群の値はそれぞれ2,500および2,450 mg/Lであった。また、陽性対照群の値はそれぞれ95および35 mg/Lであった。この試験結果に基づき、MCAAはヒドラ消化器領域に対し、催奇形性を伴う強い再生毒性を持つと結論された。

4.1.2.9.2 ヒトでの研究

ヒトでの生殖毒性に関するデータは入手できなかった。

4.1.2.9.3 結論

提出されたデータはAnnex VIIA of Directive 67/548/EECで規定された基本的要件を満たしていない。経口（皿）慢性曝露による雌雄動物の生殖器官に影響は見られなかった（4.1.2.6 Repeated-dose toxicity参照）。心臓奇形を調べる目的の試験では、193 mg/kg bw/dayで妊娠期間中の母動物体重増加の減少が認められたただけであった。この試験で発生毒性は認められなかった。しかしながら、骨格奇形あるいは脳への影響を調べてないので、この試験に基づいてMCAAの発生毒性の可能性について明確な結論は出すことはできない。MCAA経口曝露による発生毒性（心臓血管系の作用）が短報（Smith et al., 1990）で報告されているが、残念なことに完全な報告書は公表されなかった。さらに、ヒドラの再生試験およびCD-1マウス全胚培養試験において発生毒性の徴候が認められた。概して言えば、発生毒性の評価項目が十分にカバーされていなかった。また、心臓に対する作用の徴候も認められた。発生毒性試験が実施されるべきである：**結論 (i)**。発生毒性試験の結果に基づき、1世代または2世代試験の実施が考慮されるであろう。すでに要求された発生毒性試験はリスク削減戦略（Risk Reduction Strategy）を待って「保留」となる可能性がある：**結論 (i)** 「保留」

4.1.2.10 その他のデータ

4.1.2.10.1 毒性メカニズム

MCAAはピルビン酸脱水素酵素および α -ケトグルタル酸脱水素酵素を抑制するので、少なくとも*in vitro*では、両酵素の同時抑制は細胞のエネルギー産生を抑制して嫌気性解糖に転換し、その結果乳酸が蓄積する。MCAAの分布パターンは、低脂質組織に最初に速い分布を示し、その後に脳のような高脂質組織に取り込まれる (ECETOC, 2001; Section 4.1.2.1参照)

ヒトにおけるMCAA中毒の時間的経過およびパターンは、齧歯類を含む他の動物種に類似している。MCAAの分布パターンの特徴および遅発性乳酸アシドーシスは、偶発的なヒトでの皮膚接触と最初の中枢神経症状発現の間で観察されるタイムラグを説明できるかもしれない。これまで臨床医は、脳および全身性乳酸アシドーシスの可能な役割に気付かず、その結果、脳脊髄液 (CSF) や血清乳酸濃度を測定していなかった。しかし、重度の代謝性アシドーシスが数人の犠牲者で見つかった。また、*in vitro*でのMCAAの作用は、他の細胞 (例えば肝臓上皮細胞) よりヒト内皮細胞で非常に高いことが報告されている (ECETOC, 2001参照)。

全体として、脳乳酸アシドーシスがその後発症する全身性乳酸アシドーシスと組み合わさって致死の主原因となることが示唆される (ECETOC, 2001)。

血液脳関門／解毒剤の影響

Mitroka (1990) は動物モデル (ラットおよびマウス) を用いてMCAAのヒト曝露に対する解毒剤の効果を検討した。ジクロロ酢酸 (DCAA) およびフェノバルビタール (PB) は、MCAAに対する効果的な解毒剤であることがラットで認められたが、エタノールやフェントインでは認められなかった。LD80のMCAA (80 mg/kg、静脈内投与) をラットに投与した15分後にDCAA (100 mg/kg、腹腔内投与) を投与すると死亡率は常に0%に減少したが、PBでの死亡率減少は20%未満であった。マウスではDCAAおよびPBはともに同様の効果が認められた。MCAAの体内薬物動態を変えることによりラットでのMCAAの致死率をPBが減少させるという仮説は検証され否定された。彼らは、血液脳関門透過性の変化とMCAA投与ラットの死亡との関係についても検討した。MCAA (80 mg/kg、静脈内投与) 投与は、 $[^{125}\text{I}]\text{-BSA}$ (ウシ血清アルブミン) に対するラット血液脳関門透過性の有意 (50%) な増加と関連していた。PB投与ではこの作用に変化はなかったが、血液脳関門透過性の変化はMCAAによるラット致死作用に重要な役割を持っていないことが示唆されている。さらに、

彼らは脳の糖代謝に対するMCAAの影響について*in vivo*で調べた。MCAA投与したラットで脳脊髄液 (CSF) および血中乳酸濃度が増加し、またCSF濃度の増加は用量依存的であった。MCAA投与した個々のラットでは、CSF乳酸濃度は運動失調の時間的経過と平行関係があり、また死亡 (18 mmol/L) に対する個別の閾値が認められた。MCAA投与ラットにおける脳の過剰乳酸濃度と死亡との関係は更に研究された。低酸素症はMCAA投与ラットでの脳乳酸と致死率を増加させた。PBおよびDCAAは共にMCAA投与ラットの死亡率を減少させ、またMCAA投与ラットの脳乳酸濃度を減少させた。

これらの試験結果に基づき、PBおよびDCAAはラットおよびマウスにおけるMCAA中毒の解毒剤として有効であり、ラットにおけるMCAAの致死作用はCSFでの乳酸の過剰な蓄積と基本的に関連していると著者は結論した。血液脳関門機能に対するMCAAの作用と死亡とは別のものであることが示唆されたが、Berardi (1986 and 1987) により報告されたマウス急性毒性試験の結果とは相反するものであった (Section 4.1.2.2参照)。この試験では、マウスの血液脳関門の損傷は神経機能障害および致死の両方に関連していると結論している。

4.1.2.10.2 結論

ジクロロ酢酸 (DCAA) およびフェノバルビタール (PB) はラットにおいてMCAAの有効な解毒剤であることが明らかになった。PB投与は血液脳関門 (BBB) 透過性を変化させなかったため、BBB透過性の増加はMCAA高用量でのラット致死作用に重要な役割を持たないことが推測された。MCAA投与ラットでの脳の過剰な乳酸濃度と死亡の間には関係があることが明らかになった。両解毒剤 (PBおよびDCAA) はMCAA投与ラット脳の乳酸濃度を減少させた。

脳における乳酸濃度の増加は、必ずしもMCAAの直接作用とは言えない。酸化プロセス (例えばミトコンドリア内) の抑制結果の可能性もあり得る。乳酸濃度の増加は他の臓器でも明らかであるが、脳に対してはさらに重大な影響を及ぼすのであろう。