

部分翻訳

**European Union
Risk Assessment Report
4-TERT-BUTYLBENZOIC ACID**

CAS No: 98-73-7

July 2009

欧州連合
リスク評価書（2009年7月最終承認版）
4-tert-ブチル安息香酸

**European Union Risk Assessment Report
4-TERT-BUTYLBENZOIC ACID**

CAS No: 98-73-7

EINECS No: 202-696-3

RISK ASSESSMENT

July 2009

FINAL APPROVED VERSION

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2014年9月

本部分訳文書は、4-tert-butylbenzoic acid (CAS No: 98-73-7)に関する EU Risk Assessment Report, (2009)の第4章「ヒト健康」のうち、第4.1.2項「影響評価:有害性の特定および用量(濃度)-反応(影響)関係」を翻訳したものである。原文(評価書全文)は、
http://esis.jrc.ec.europa.eu/doc/risk_assessment/REPORT/ptbbareport405.pdf
 を参照のこと。

4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量(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

動物やヒトが、4-tert-ブチル安息香酸(para-tert.-butylbenzoic acid, PTBBA)を経口、経皮もしくは吸入摂取した際の、トキシコキネティクス、代謝および分布に関するデータは、得られていない。そのため、物理化学的データや毒性学的検討の結果に基づいて、吸収についての推測を行った。

物理化学的特性(水への溶解性: 47.1 mg/L、分子量: 178.23 g/mol、オクタノール-水分配係数 $\log Pow = 3.4$)から、PTBBA は、経口摂取された場合、良好な生体内分布を示すものと考えられる。ただし、酸解離定数 pKa が 4.36 であるため、小腸における pH 値 [EU 技術指針書 (TGD) によれば 4~6] では、非電離型で存在するのは少量であると思われる。このことから、小腸から完全に吸収されることは予想しにくい。毒性影響が、PTBBA の急性もしくは亜急性経口投与の後に認めることができる (NOAEL は導出できないが LOAEL は存在する) ことから、消化管吸収があることが示唆されるが、それを定量することはできない。そのため、経口吸収率を、100% (デフォルト値) とみなす。

分子量が 500 に満たず、 $\log Pow$ 値が -1~4 の間にあるため、TGD に基づくと、経皮吸収率を 100% とみなすことができる。この想定は、Potts and Guy (1992) による計算結果からも支持される。毒性影響が、PTBBA をラットの皮膚に急性もしくは反復経皮適用した後に認めることができることから、経皮吸収があることが示唆される。経皮吸収に関する定量はできない。そのため、経皮吸収率を、100% (デフォルト値) とみなす。

20°C における蒸気圧が 0.057 Pa であることとその物理的状态(室温で結晶性固体)から、粒子粉塵(粒子径は十分小さい)に曝露された場合には、吸入摂取が生じ得る。毒性影響が、ラットを PTBBA の粒子粉塵(最大質量中央径: 5.5 μm) に、急性および反復曝露した後に認めることができたことから、吸入吸収があることが示唆される。PTBBA の吸入摂取に関する定量はできない。そのため、吸入による吸収率を、100% (デフォルト値) とみなす。

4.1.2.1.1 動物における試験

経口

PTBBA をラットに 5 日間経口投与した(12.5 ないしは 50 mg/kg 体重/日)ところ、最後の投与からの 24 時間尿中に、グルクロン酸抱合体型と思われる PTBBA 代謝物が検出された。未同定の代謝物も分離されたことから、副次的な生物学的変換経路(*tert*-ブチル部位の酸化)も生じ得たことが示されている(著者不明 1982)。

4.1.2.1.2 ヒトにおける試験

データは得られていない。

4.1.2.1.3 トキシコキネティクス、代謝および分布の要約

動物やヒトが、4-*tert*-ブチル安息香酸に吸入、経口もしくは経皮曝露された際の、トキシコキネティクス、代謝および分布に関するデータは、得られていない。PTBBA の物理化学的特性(分子量: 178.23 g/mol、水への溶解性: 47.1 mg/L、オクタノール-水分配係数 $\log P_{ow} = 3.4$ 、蒸気圧: 0.057 Pa)、電離状態および得られた毒性学的情報を勘案すると、吸入、経皮および経口曝露時の吸収は、100% (デフォルト値)程度であるとみなされる。

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 動物における試験

In vivo 試験

吸入

各群雌雄 6 匹ずつの Fischer ラットを、PTBBA の粉塵(純度 99.4%)に曝露した試験が行われている。曝露濃度は、0.0、0.495、0.668、0.958 ないしは 1.802 mg/L で、曝露期間は 4 時間であった。空気動学的質量中央径(mass median aerodynamic diameter, MMAD)は、4.0~5.5 μm の範囲であった。最高濃度の 1.802 mg/L では、雄が 2/6 匹、雌が 1/6 匹死亡した。このことから、 LC_{50} が 1.802 mg dust/L を超えることが示されている。しかし、他の主要な毒性

学的影響は、全ての濃度でみられており、4時間の単回曝露での無影響量を断定することはできなかった。最低濃度の0.495 mg/Lでは、精巣、脊髄、体重増加率に対する影響が認められている。とりわけ精巣への影響は際立っており、精子数の減少、および精細管多核細胞の減少などの顕微鏡学的病巣を特徴としていた。前肢の神経障害がみられ、鏡検により多巣性の灰白脊髄障害が確認された。体重増加率の低下は、PTBBAに曝露された全群で、4日目と14日目に両性で観察された(Darmer et al., 1982; Darmer et al., 1984; Lu et al., 1987)。

経皮

各群雌雄2匹ずつのCarworth Farm E(CFE)系統のラットに、75、150、300ないしは900 mg/kg体重の用量で、PTBBAを単回経皮投与した。この試験では、ジメチルスルホキシド(DMSO)を媒体としたPTBBA(純度のデータ無し)の30% (w/v)溶液が投与された。この結果、PTBBAの急性単回経皮投与によるLD₅₀は、約300 mg/kg体重であると判明した。75 mg/kg体重の投与では、死亡例はみられず、150 mg/kg体重の投与では、2日目に雄で0/2匹、雌で1/2匹が死亡した。300 mg/kg体重の投与では、4日以内に雄で2/2匹、雌で0/2匹が死亡し、900 mg/kg体重の投与では、4日以内に全てのラットが死亡した。これ以上の情報は提示されていない(Shell Research Ltd. London, 非公表報告 1975)。

一方、New Zealand White ウサギを用いた試験では、経皮LD₅₀として、DMSOを媒体とした30% (w/v)溶液については900 mg/kg体重超、乾燥粉末については2000 mg/kg体重超という値が得られている。DMSO中30% (w/v)溶液としたPTBBA(純度のデータ無し)の急性単回経皮投与によるLD₅₀は、できる限り高濃度かつ高用量で投与した場合である、900 mg/kg体重よりも高値であった。乾燥粉末を用いた場合のLD₅₀値は、2000 mg/kg体重を超えていた。乾燥粉末で曝露されたウサギの組織中に、病理学的変化は認められなかった。これ以上の情報は提示されていない(Shell Research Ltd. London, 非公表報告 1975)。

経口

アルビノCarworth Farmラットに、アセトン-DMSO混合液(3:7, w/v)を媒体としたPTBBAの10% (w/v)溶液を投与した試験では、735 (642-8457) mg/kg体重という経口LD₅₀値が得られている。雌雄各4匹を標準数としたのラットの群に、500、630、800、1000ないしは2000 mg/kg体重の用量で、投与が行われた。LD₅₀量の2倍を投与されたラットは、投与60分後には腹臥位をとるようになった。過剰な流涎や、尾の垂直方向への跳ね上がりが認められた。後肢は、伸展状態となった。ラットのそばの実験台を軽く叩くと、痙攣が引き起こされた。最終的に、ラットは後肢を引っ込めて側臥位をとるようになり、喘ぎ呼吸となった後、死亡した。死因は、呼吸不全と思われた。最終的な死亡率を、投与の18日後に記録した。結果は、500 mg/kg体重の投与では雄で0/5匹、630 mg/kg体重の投与では雄で1/5匹、

800 mg/kg 体重の投与では雄で 4/4 匹、1000 mg/kg 体重の投与では雄で 3/5 匹が死亡というものであった。2000 mg/kg 体重の投与での雄の死亡率、ならびに雌における死亡率は報告されていない。500～2000 mg/kg 体重を単回経口投与した後、18～24 日で死亡もしくは屠殺した雌雄の若齢ラットの一部 36 匹を、剖検に供した。曝露により死亡した全てのラットは、雌 1 匹を除き、急性中毒で通常みられる肉眼所見だけを示しており、内臓や静脈循環での鬱血がみられ、これらは組織学的にも裏付けられた。消化管では、損傷の徴候は、粘膜鬱血と死後変性だけであった。投与後 48 時間での唯一死亡例である雌ラットは、肝臓において、類洞の鬱血と共に、小葉外側部の実質に軽度の中毒性変性所見を示していた。一方、生残した雄 18 匹を、投与後 18 日ないしは 24 日に剖検したところ、雄性腺における損傷がはっきり表れていた。500 mg/kg 体重の単回投与を受けた雄ラットの 4/5 匹で、精巣の萎縮が起こった。雄ラットと共に飼養されていたが、どの雌ラットも妊娠はしておらず、生残した雄ラットの 8/10 匹が、両側性の精巣萎縮を示していた。精巣は縮小し、その実質は桃色を帯びていて、「ゼリーバッグ」の様な感触を示していた。それらの萎縮精巣の重量は、正常の 50～60% であった。生残した雌の卵巣は、外観は正常であり、異常な卵子形成を示す組織学的所見は認められなかった。要約すると、致死用量の PTBBA の投与を受けた後死亡したラットにおいては、特異的な構造的損傷の徴候は認められなかったが、生残した雄においては、精細管の生殖細胞が変性し、それによる精巣の重度の両側性萎縮が認められた (Hunter et al., 1965)。

Sprague-Dawley アルビノラットを用い、上げ下げ法により用量を設定して、急性経口毒性試験が行われている。1 モル濃度の NaCl 溶液を媒体とした PTBBA (純度 99% 超) の 7.5% (w/v) 懸濁液を強制経口投与した。その結果、経口 LD₅₀ として、雄では 720 (540～980) mg/kg 体重、雌では 720 mg/kg 体重未満という値が得られている。まず、1 匹の雄ラットに、初期用量の 700 mg/kg 体重が投与された。次の段階の用量は、前段階での 24 時間死亡率の結果に基づき、係数 1.3 を用いて増減させた。生残率が回復した始点用量が決定できたら、前述の手順により用量を定め、新たな 4 段階の群を設けた。その後、次の様な試験手順がとられた。1) 6 匹の雌に、雄の LD₅₀ を投与した。2) LD₅₀ を挟む上下 2 段階のそれぞれの用量について、雄 1 匹を供試した。ただし、この際、被験物質として水を媒体とした PTBBA の 40% (w/v) 懸濁液を用いた。これらの手順で進めた結果、NaCl 水溶液を媒体とした 7.5% 懸濁液の投与により、0/1 匹の雄ラットが 500 mg/kg 体重の用量で、1/3 匹の雄ラットが 700 mg/kg 体重の用量で、2/2 匹の雄ラットが 900 mg/kg 体重の用量で死亡した。この懸濁液を 700 mg/kg 体重の用量で投与された雌は、6/6 匹が死亡した。水を媒体とした 40% 懸濁液で、500 mg/kg 体重ないしは 900 mg/kg 体重の用量で投与を受けた雄 2 匹は、共に生残した。全ての動物について、被験物質投与の 0.5、2 および 4 時間の時点で、臨床症状や生死の状態の観察が行われた。その後は、7 日間毎日、臨床症状や生死の状態が観察された。試験期間中みられた臨床症状は、活動性低下、運動失調、削瘦、円背姿勢、前肢の動作障害、肛門周囲の黄色

EURAR 35: 4-TERT-BUTYLBENZOIC ACID

い汚染、振戦、衰弱、過剰な唾液分泌、触れた際の低温感、緩慢呼吸、疼痛反射の消失、痙縮、瞳孔散大、弛緩、呼吸器の鬱血、および死亡などであった。1 匹では、チアノーゼ、疼痛反射の消失、および顔面や前肢端での赤色物質の出現も認められた。死亡例は、すべて投与の 24 時間以内に認められた。試験終了時に、生残動物を安楽死させた。試験中に死亡した例も安楽死させた例も含め、全ての動物を、肉眼的剖検に供し、異常な点は全て記録した。以下の観察結果が得られた。透明液状の胃内容物、胃の拡張、腺粘膜の瀰漫性発赤、小腸内の茶褐色～黒のタール状粘液物質、鼻周囲の赤色排出物、右顎下リンパ節の拡大(Procter & Gamble Comp., 非公表報告 1986a)。

追加試験が実施されており、雄の Sprague-Dawley アルビノラット 10 匹に、PTBBA (純度 99% 超)が、720 mg/kg 体重の用量で、1 モル濃度の NaCl 水溶液を媒体とした懸濁液として強制経口投与された。全ての動物について、生死の状態の観察が、被験物質投与の 0.5、2 および 4 時間後、ならびにその後 14 日間毎日実施された。体重測定は、試験開始前の被験物質投与直前、試験の 7 および 14 日目、ならびに死亡時に実施された。試験期間中にみられた臨床症状は、活動性低下、運動失調、緩慢呼吸、腹部の黄色い汚染、前肢の動作障害、および死亡などであった。2/10 匹の雄ラットが、被験物質投与後 2 時間以内に死亡した。生残ラットは、1 匹を除き、試験 6 日目には、全例正常状態に回復した。全ての動物について、一通りの肉眼剖検を行い、異常な点は全て記録した。14 日間の観察期間を生残した全ての動物と切迫屠殺した全ての動物から、肝臓、腎臓および精巣を摘出し、重量を測定した。肉眼観察により、1 匹で精巣萎縮を認め、顕微鏡観察により、精巣における精子形成低下が確認された。この所見は、投与を受けた全ての動物に見受けられた。これらの動物では、精巣の細胞の外観は正常であったが、精細管中の精原細胞の数が、対照群の動物よりも減少していた。精巣の絶対および相対重量の平均値は、投与を受けた動物において低下しており、その低下の程度は、これらの動物で鏡検により観察された、精巣における精子形成低下の所見と良く相関していた(Procter & Gamble Comp., 非公表報告 1986b)。

さらに追加試験が実施されており、雄の Sprague-Dawley アルビノラット 10 匹に、PTBBA (純度 99% 超)が、700 mg/kg 体重の用量で、アセトン-DMSO 混合液(3:7, w/v)を媒体とした懸濁液として強制経口投与された。全ての動物について、生死の状態の観察が、被験物質投与の 0.5、2 および 4 時間後、ならびにその後 14 日間毎日実施された。体重測定は、試験開始前の被験物質投与直前、試験の 7 および 14 日目、ならびに死亡時に実施された。試験期間中にみられた臨床症状は、活動性低下、運動失調、緩慢呼吸、疼痛反射の消失、呼吸器の鬱血、衰弱、肛門周囲の黄色い汚染、流涙、触れた際の低温感、および死亡などであった。7/10 匹のラットが、被験物質投与後 1 日以内に死亡した。生残ラットは全て、試験 5 日目には、正常状態に回復した。全ての動物について、一通りの肉眼剖検を行い、異常な点は全て記録した。14 日間の観察期間を生残した全ての動物と切迫屠殺した全ての動物か

EURAR 35: 4-TERT-BUTYLBENZOIC ACID

ら、肝臓、腎臓および精巣を摘出し、重量を測定した。肉眼観察により、1匹で精巣萎縮を認め、顕微鏡観察により、精巣における精子形成低下が確認された。この所見は、投与を受けた全ての動物に見受けられた。これらの動物では、精巣の細胞の外観は正常であったが、精細管中の精原細胞の数が、対照群の動物よりも減少していた。精巣の絶対および相対重量の平均値は、投与を受けた動物において低下しており、その低下の程度は、これらの動物で鏡検により観察された、精巣における精子形成低下の所見と良く相関していた(Procter & Gamble Comp., 非公表報告 1986b)。

各用量につき2匹ずつの雌の Long-Evans ラットを用い、メタ化合物(3-tert-ブチル安息香酸、Shell 社製品等級)を5%含む PTBBA を、エタノール、水およびアカシアガムの混合液に懸濁して、550ないしは800 mg/kg 体重の用量で、直接胃に投与した。その結果、550 mg/kg 体重より大きく、800 mg/kg 体重より小さいという、おおよその経口 LD₅₀ が得られている。550 mg/kg 体重の投与では、ラットは2匹とも生残したが、800 mg/kg 体重の投与では、ラットは2匹とも投与日に死亡した。活動の著しい低下が認められ、800 mg/kg 体重の投与を受けたラットの1匹では、肢端か尾をつままなければ覚醒させることができなかった。800 mg/kg 体重の投与を受けたラットを解剖したところ、肺における重度の刺激症状が2匹両方でみられ、一匹では胃粘膜皺の出血も認められた(Shell Development Company, 非公表報告 1950)。

Swiss 近交系白色マウスを用い、メタ化合物(Shell 社製品等級、純度のデータ無し)を5%含む PTBBA を、アカシアガムに混ぜた水性懸濁液として、直接胃に投与した。その結果、568 mg/kg 体重という経口 LD₅₀ が得られている。各群10匹のマウスに、350、400、550、600、650、700ないしは800mg/kg 体重の用量で、投与が行われた。死亡数は、以下の通りであった。350 mg/kg 体重では、1/10匹が2日目に死亡した。400 mg/kg 体重では4/10匹が、550、600および650 mg/kg 体重ではそれぞれ5/10匹が、700 mg/kg 体重では7/10匹が、800 mg/kg 体重では全例が、24時間以内に死亡した。マウスは、投与後20分以内に、軽度の沈鬱症状を示した。1時間以内に、筋肉疲労、顕著な協調運動不能およびストラウブ挙尾反応(脊髓興奮)の徴候が現れた。5時間後には、マウスの3分の2で、前肢の麻痺が発現した。これらのマウスの内3匹は、疼痛刺激に対する尾や肢端の反応が、鈍化もしくは消失したが、この影響は重度であったにも関わらず、回復する例も散見された。22匹のマウスを剖検したところ、肺の刺激症状、肺出血、肝臓の色素沈着増高、腸粘膜剥離、腸の充血といった、病理学的変化が認められた(Shell Development Company, 非公表報告 1950)。

4.1.2.2.2 ヒトにおける試験

In vivo 試験

吸入

データは得られていない。

経皮

データは得られていない。

経口

データは得られていない。

4.1.2.2.3 急性毒性のまとめ

4-tert-ブチル安息香酸の急性毒性に関するヒトにおけるデータは、得られていない。マウスを用いた試験では、550 mg/kg 体重より大きく 800 mg/kg 体重より小さいという経口 LD₅₀ が得られ、雌の方が雄よりも若干感受性が高かった (Hunter et al., 1965; Procter & Gamble Comp. 1986; Shell Comp. 1950)。500 mg/kg 体重の用量で単回投与を受けた雄ラットでは、精巣の萎縮が生じ、精細管の生殖細胞の変性が観察された。生残した雌ラットの卵巣は、外観は正常で、組織学的所見でも卵子形成異常は示されなかった (Hunter et al., 1965)。マウスの LD₅₀ は、568 mg/kg 体重と判断された (Shell Comp. 1950)。吸入曝露での LC₅₀ は導出されなかったが、ラットを 1.802 mg/L の粉塵に 4 時間曝露した際には、2/6 匹の雄と 1/6 匹の雌が死亡した。この結果から、LC₅₀ は 1.8 mg/L を超えることが示された。これらの試験では、精巣や CNS における変化や体重の変化が、最低用量の 0.495 mg/L で認められた (Darmer et al., 1982; Darmer et al., 1984; Lu et al., 1987)。急性経皮毒性の検討は、得られたデータから大きな種差があることが示されており、困難である (Shell Research Ltd. London, 未公表報告 1975)。ラットでは、DMSO を媒体とした 30% 溶液で試験した場合に、約 300 mg/kg 体重という経皮 LD₅₀ が得られた。ウサギでは、乾燥粉末を適用した場合に、経皮 LD₅₀ は 2000 mg/kg 体重を超えることが判明した。上述のデータに基づくと、4-tert-ブチル安息香酸は、「Xn、有害」に分類され、「R 22、飲み込むと危険」の表記が求められる。2007 年 9 月、化学物質の分類と表記に関する技術委員会 (TC C&L) は、急性吸入毒性に関して得られた LC₅₀ や急性経皮毒性の LD₅₀ のデータでは、分類を行うには不十分であるということで、意見の一致をみた。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.3.1 皮膚

動物における試験

雌雄 1 匹ずつのアルビノウサギを用いたドレイズ皮膚刺激性試験では、皮膚刺激の徴候は全く認められなかった。この試験では、ウサギの脱毛した皮膚領域に、5%のメタ化合物(3-tert-ブチル安息香酸、Shell 社製品等級)を含む固体の 4-tert-ブチル安息香酸を、8 時間適用した。また、4-tert-ブチル安息香酸とアルコールおよび鉱油の混合物の適用も、ゴムシートで密閉して実施した。固体の適用は、800 mg/kg 体重で、アルコール-鉱油を媒体とした懸濁液の適用は、300 mg/kg 体重で行われた。どちらの調製物によっても、全身的变化や皮膚の変化は引き起こされなかった(Shell Development Company, 非公表報告 1950)。

EU の試験ガイドライン B4 に準拠して試験が実施されており、500 mg の 4-tert-ブチル安息香酸(純度のデータ無し)を水で湿らせて、4 時間単回適用した。その結果、皮膚刺激の徴候は全く認められていない。6 匹の New Zealand ウサギを毛刈りして、その部位に被験物質を適用し、半閉塞被覆を施して、皮膚との接触を 4 時間保った。被覆を除去してから 1、24、48 および 72 時間後に、皮膚反応を観察した。皮膚反応は、全く認められなかった(Hoechst AG, 未公表報告 1988)。

ヒトにおける試験

データは得られていない。

4.1.2.3.2 眼

動物における試験

雌雄 1 匹ずつのアルビノウサギを用いたドレイズ眼刺激性試験では、「極軽微な刺激症状」だけが認められたと報告されている。この試験では、5%のメタ化合物(3-tert-ブチル安息香酸、Shell 社製品等級、純度のデータ無し)を含む、100 mg の固体の 4-tert-ブチル安息香酸を、結膜嚢に投与した。「極軽微な刺激症状」が認められたのは 1 例で、もう 1 匹では認められなかった(Shell Development Company, 非公表報告 1950)。

EU の試験ガイドライン B5 に準拠して試験が実施されており、軽度の眼刺激症状が認めら

れたが、3日以内に回復するものであった。この試験では、無希釈の4-tert-ブチル安息香酸(純度のデータ無し)100 mgが、6匹のNew Zealandアルビノウサギの左眼に、単回投与された。投与後1、24、48および72時間後に眼の反応を観察し、反応が可逆的か不可逆的かを検討した。被験物質投与の1時間後に、結膜において中等度の反応(2度の充血や浮腫)ならびに軽度の分泌物流出が、全てのウサギで観察された。24時間後には、結膜の反応は減退し、全個体で軽度となったが、2匹において、1度ないしは2度の角膜混濁が認められた。48時間後には、1匹において軽度の結膜病変が持続しているのみとなり、72時間後には、眼における反応は全く認められなかった(Hoechst AG, unpublished report 1988)。

ヒトにおけるデータ

データは得られていない。

4.1.2.3.3 気道

データは得られていない。

4.1.2.3.4 刺激性の要約

4-tert-ブチル安息香酸による皮膚や眼に対する刺激に関して、ヒトのデータは得られていない。ウサギを用いたドレイズ試験では、皮膚に対する刺激の徴候は何も認められておらず(Hoechst AG, 未公表報告 1988)、ウサギの眼に関しては、軽度の可逆的な刺激症状が認められただけであった(Hoechst AG, 未公表報告 1988)。これらのデータに基づくと、4-tert-ブチル安息香酸は、刺激性や腐食性を有する化合物には分類されず、警句 R の表記も妥当ではない。

4.1.2.4 腐食性

4-tert-ブチル安息香酸は、ウサギに対して皮膚刺激性を示さないことが明らかとされている(4.1.2.3.1 項参照)。ウサギの眼に軽度の刺激性を示したが、可逆的であった(4.1.2.3.2 項参照)。したがって、PTBBA は、腐食性を有していない。

4.1.2.5 感作性

4.1.2.5.1 動物における試験

皮膚

純度 99.6%の PTBBA を用いて、アルビノモルモット(斑紋のある Himalayan の系統)において、マキシミゼーション試験(Magnusson Kligman 法)が実施されている。被験群に 10 匹、対照群に 5 匹を用いた。皮内注射は 25%、皮膚感作誘導は 50%、感作惹起は 25%の濃度で実施した。媒体として、ポリエチレングリコール(PEG)300 を用いた。皮膚感作誘導の後に、軽微な刺激症状が現れた。被験群でも対照群でも、感作惹起処置の後に、皮膚反応を示すものは見られなかった(Clariant, 2003)。

4.1.2.5.2 ヒトにおけるデータ

皮膚

データは、得られていない。

4.1.2.5.3 感作性についての結論

マキシミゼーション試験(Magnusson Kligman 法)が実施されたが、モルモットは、感作惹起処置の後に全く皮膚反応を示さなかった。4-tert-ブチル安息香酸の皮膚感作性に関しては、ヒトのデータは得られていない。目下のところ、皮膚感作性に関する表記を求めることは妥当ではない。

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

吸入

用量設定のための試験[英国ハンティンドン研究所(HRC), 1994]において、各群雌雄 3 匹ず

つの Sprague Dawley ラット 3 群が、4-tert-ブチル安息香酸に、1 日 6 時間で連続 5 日間、鼻部だけ曝露された。目標濃度は 1.5、5.0 および 15.0 mg/m³ とされ、実際に達成された曝露容器内濃度は、1.6、4.58 および 14.83 mg/m³ であった。粒子状エアロゾルは、4-tert-ブチル安息香酸の粉を、平均粒子径が 4.1~4.4 μm(MMAD) となるように、そして 65%以上の粒子の径が 7 μm(MMAD) 未満となるように微粉化して生成させた。空気だけに曝露される対照群も設けられた。全てのラットを、8 日目に屠殺した。

PTBBA への曝露が原因と考えられるような臨床症状、体重変化、飼料や水の消費量への影響、肉眼的病理所見、臓器重量の変化は、何も認められなかった。多くの臓器試料が保存されたが、病理鏡検用には調製されなかった。

神経毒性を評価するために特別にデザインされた 28 日間吸入試験が実施されており、4-tert-ブチル安息香酸(99.5%)の目標濃度を前述の試験と同様とし、ラットの鼻部のみの曝露を行った(HRC, 1995)。実際に達成された曝露容器内濃度は、1.5、4.7 および 15.7 mg/m³ であり、73~80%の粒子が 7 μm 未満の径を有していた。PTBBA の粒子状エアロゾルへの曝露は、3 群のラットに対して、1 日 6 時間、4 週間の中で 5 日間実施された。平均粒子径(MMAD)は、低用量で 3.2 μm、中用量および高用量で 3.9 μm であり、また、73~80%の粒子の径は、7 μm 未満であった。他に対照群を設け、空気のみで曝露を行った。各群雌雄 8 匹ずつのラット全てについて、曝露前、および試験の 1 週目と 4 週目の終わりに、標準機能観察検査(FOB)の項目の範囲内で、神経行動学的検査を実施した。各群から雌雄 5 匹ずつを、臓器重量分析、副腎、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、精巣および精巣上体の肉眼的ならびに顕微鏡学的検査、および、肉眼的異常検査に供した。残りの各群雌雄 3 匹ずつは、灌流固定を施し、脳(6 段階)、脊髄後根神経節、後根および前根線維、坐骨神経(それぞれ 2 段階)、ガッセル神経節、腓腹神経および脛骨神経について、標準的な染色法(ヘマトキシリン&エオジン、トルイジンブルー)を用い、神経組織病理学的検査を実施した。この試験の欠点は、設定濃度が低いこと、組織病理学的検査を行った臓器の数が少ないこと、ならびに、神経組織の顕微鏡的検査に供した動物数が少ないことである。

高用量群の雌の肝臓重量は、対照群の値を有意に上回っていた(+9%)。しかし、他には、5 匹ずつ選択したラットにおいて、PTBBA への曝露が原因と考えられるような臨床症状、体重変化、飼料や水の消費量への影響、肉眼的もしくは顕微鏡学的病理所見は、何も認められなかった。行動学的観察では、1 週目の曝露の後、低用量群および高用量群の雄において、体の振戦の発生率がわずかに上昇した。4 週目では、振戦の発生率は、高用量群の雄で上昇していた。高用量群の雄では、活動度が有意に低下し、後ろ足で立ち上がる回数も減少する傾向がみられた。さらに、高用量群の雄では、顔の汚れや脱毛が、やや頻繁に起こっていた。運動場にいる間の覚醒状態および排尿/排便回数が減少する雄の数が、中用量群および高用量群で増加した。同様の所見は、曝露を受けた雌では全く認められなかった。

5匹ずつ選択したラットにおいて行われた臓器の顕微鏡的検査でも、残りの3匹ずつで行われた神経組織の検査でも、4-tert-ブチル安息香酸に起因する病変は、何ら認められなかった。

体の振戦の発生が、最も鋭敏で最も早期に現れる神経行動学的影響であるとも考えられる。4週間の曝露後に、低用量群の雄で行動学的変化が認められておらず、中用量群の雄でも振戦が観察されなかったことから、雄ラットのNOAECは、 5 mg/m^3 と考えられた。著者は、雌ラットのNOAECとして、 15 mg/m^3 を推している。他の反復投与試験において、肝臓が標的臓器であることが知られていることに基づくと、本文書の作成者の意見としては、肝臓重量が増加していることから、雌ラットでも 5 mg/m^3 がNOAECと考えるべきである。

4-tert-ブチル安息香酸の神経毒性は、もっと以前の吸入試験で明らかにされている(Shell, 1982)。各群雌雄8匹ずつのF344ラットを、平均実測濃度0、12.5、106ないしは 525 mg/m^3 のPTBBAの粉塵に、1日6時間で4日間曝露し、その後、3日(雄)もしくは4日(雌)の休止期間において、さらに3日間曝露した。10日目に雄を、11日目に雌を屠殺する予定とした。平均粒子径は、対照群、低用量群、および中ならびに高用量群で、それぞれ4.1、3.6および $4.3\text{ }\mu\text{m}$ (MMAD)であった。

106 および 525 mg/m^3 群では、予期しない死亡例が発生した。 106 mg/m^3 群では、2日目と8日目に雄が1匹ずつ死亡し、8日目に雌が1匹死亡した。 525 mg/m^3 群では、1~6日目までに合計7匹の雄の死亡が確認された(このため、いくつかの評価項目に関して統計学的比較ができなくなった)。 525 mg/m^3 群の雌が、合計3匹、3日目~11日までに死亡した。

泌尿生殖器部の尿汚染や異常な神経行動学的所見が曝露を受けた動物で認められ、後肢の麻痺、円背姿勢、振戦、痙攣、歩様異常、陰茎突出、活動性低下、呼吸の異常といった症状が、中用量群では試験3日目から、高用量群では試験1日目から出現し始めた。高用量群の雌は、ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の有意な低下を示した。中および高用量群の雌雄で、平均白血球数が、用量に関連した増加を示した。臨床生化学的検査からは、全用量群の雌と中および高用量群の雄におけるアルカリホスファターゼの低下、中および高用量群の雌におけるアルブミンと総タンパク質量の低下、全用量群の雌におけるコレステロール濃度の低下、高用量群の雌と高用量群で生残した雄におけるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)活性の増大が明らかとなった。アラニンアミノトランスフェラーゼ活性は、中および高用量群の雌と高用量群で生残した雄において、上昇を示した。

肉眼的所見は、主に、中ないしは高用量での曝露を受けた動物で認められた。認められた所見は、会陰部および腹部の尿汚染、脱水症状、被毛上の白色粉体、萎縮し赤色化した胸腺、鮮赤色化した肺、胃における点状の赤色病巣尾、萎縮し軟化した精巣、精巣上体の限局性病変、肥大し褐色化した肝臓、消化管内容物や体脂肪貯蔵量の減少であった。

中および高用量群の雌雄は、試験期間中、用量依存的な有意な体重減少を示した。肝臓や腎臓の絶対および相対重量は、これらの用量群の動物で増加した。同様の傾向が、体重に対する肺重量の比率においても認められた。精巣の絶対および相対重量は、中および高用量群の雄で低下した。精巣 1 個(全ての生残ラットの左側精巣)あたりの平均精子数が、対照群と比べ、全ての曝露群で、用量関連的に低下した。

顕微鏡学的には、全ての曝露群において、腎臓に、曝露に関連した病変が認められた。また、中および高用量群のラットでは、肝臓、脊髄、精巣、精巣上体および胸腺にも病変が認められた。

腎臓の病変は、両側性の皮質尿細管細胞質の多巢性好酸性化(蒼白化)を特徴とするもので、中および高用量群のラットでは、空胞化も認められた。肝細胞の空胞変性(脂肪染色で陰性)も、小葉辺縁性/門脈周囲性もしくは汎小葉性に認められた。さらに高用量群のラットでは、影響が少なかった肝細胞の領域で、有糸分裂細胞の割合が増加していた。限局的もしくは局所的な重度の灰白質軟化症が、中ないしは高濃度の曝露を受けたラットの脊髄で観察された。胸部およびそれより遠位の脊髄が影響を受けたことの現れである、対麻痺の臨床症状を示したラットにおいては、中枢神経系の病巣についても報告されている。神経細胞の変性や減少、空胞化、小膠細胞、細胞群過密化などの神経病理学的病巣が、灰白質病巣の中心部や白質の腹索領域に存在していた。生殖上皮の多巢性ないしは瀰漫性変性が、精巣において認められた(Lu et al., 1987)。中用量群の雄では、後期精子細胞の欠損、精原細胞の種類減少、巨大細胞体や細胞片、および精巣上体の萎縮や炎症からなる、重度の精細管変化が生じていた。高用量群では、中用量群よりも病変が広範にわたっており、試験の初期の段階で、高用量群において予期しない死亡例が生じたことを反映しているものと考えられた。

胸腺の皮質領域におけるリンパ球壊死や萎縮、ならびに髄質の鬱血や出血が、高濃度の曝露を受けた雄 3 匹と中濃度の曝露を受けた雌雄 1 匹ずつで観察された。胸腺に病巣を有していたラットのほとんどは、試験期間中に死亡した例であった。

反復吸入試験に関する実際の試験ガイドライン(OECD 412, 付属文書 V の B.8 法など)に沿った試験デザインと比較すると、この試験は、主に、以下の点で欠点を有する。まず、曝露期間が短いこと。神経機能の標準観察検査項目のデータに欠落があること。水や飼料の消費量データおよび尿分析データが無いこと。そして、組織病理学的検査用に処理された臓器の種類が少ない(脊髄、鼻腔、気管、喉頭、肺、肝臓、腎臓、右側精巣、および肉眼病変全て。脊髄や鼻腔組織についてどの段階まで検査したのかは不詳である)ことである。それでもなお、上で示したデータは、評価項目の結果が他の試験のデータと整合しており、被験物質の毒性に関する有効な情報を提供するものと考えられる。

この 11 日間吸入試験からは、NOAEC を導出することはできず、LOAEC は 12.5 mg/m³ (1 日 6 時間で 7 日間曝露) とされた。

経皮

4-tert-ブチル安息香酸とジエタノールアミン (DEA) の比率が 1.7:1.0 の塩を含む水溶液 (1 mL/kg 体重) の亜慢性経皮毒性が、F344 ラットを用いて検討されている (Cagen et al., 1989, Lu et al., 1989)。各群雌雄 20 匹ずつのラットに、4-tert-ブチル安息香酸の 1 日量が 0、17.5、35、70 ないしは 140 mg/kg 体重となるように、塗布液を週 5 日、局所適用した。これらの用量では、DEA への 1 日平均曝露量は、0、11.7、21.6、41.3 ないしは 82.6 mg/kg 体重となる。7 週間の適用処置の後、各群から雌雄 7 匹ずつを剖検に供した。残りのラットについては適用処置を続け、13 週間の適用処置の後、剖検を施した。この試験では、以下の検査が行われた。毎日の臨床毒性徴候の観察、飼料および水消費量測定、体重測定、肉眼的観察、気管を含む肺、喉頭、肝臓、腎臓、脳、心臓、精巣または子宮、ならびに脾臓の重量測定、および 26 以上の臓器/組織の組織病理学的検査 (前述の重量を測定した臓器および坐骨神経ならびに脊髄を含む)。適用処置の 7 週および 13 週目に、尿および血液試料を採取し、標準的な血液学的項目の検査、臨床生化学的検査および尿分析を行った。7 および 13 週間の適用処置の後、雄ラットについては、右側精巣の組織病理学的検査を行った他、精巣重量の測定を行い、さらに左側精巣について、精子数を測定し、生残精母細胞および精子細胞の指標となる LDH-x 酵素活性を測定した。

適用処置により、明らかな毒性の臨床徴候は生じることはなく、皮膚適用箇所刺激性を示すこともなかった。最高用量とそれより 1 段階下の用量の群では、体重増加量の減少がみられたが、平均飼料消費量は、対照群における量と差はなかった。高用量側 2 群では、小球性低色素性貧血が発症した。低用量側 2 群では、赤血球数は正常であったが、赤血球は小球性を示した。高用量側 2 群の雄および最高用量群の雌で、13 週目の期間に、有意な排尿量増加が認められた。7 および 13 週間の処置期間の後では、全ての群でコレステロール濃度が低下しており、また、高用量側 2 群の雌雄で BUN やリンの量が増加していた。全ての濃度群で、肝臓や腎臓の相対および絶対重量が、用量に関連して有意に増加していた。高用量側 2 群の雄では、相対精巣重量、精子数および LDH-x 酵素活性の有意な低下が生じていた。

高用量側 2 群のラットでは、3 つの臓器系に限局した、処置に関連する病理学的変化が生じ、具体的には、肝臓における細胞質空胞化、遠位曲尿細管上皮の褪色化、膨張、変性および再生、腎臓における尿細管円柱、間質性腎炎および乳頭壊死、ならびに、後期精子細胞の消失、精原細胞の種類減少および精巣中での巨大細胞の生成を伴う中等度から重度の瀰漫性精細管変性が観察された。肝細胞の空胞化は、17.5 ないしは 35 mg/kg 体重の PTBBA

EURAR 35: 4-TERT-BUTYLBENZOIC ACID

で処置された雌ラットでも認められた。この病変は、多巣性ないしは瀰漫性の、小葉辺縁性または汎小葉性の、肝細胞の脂肪陽性空胞化を特徴としていた。臨床生化学的検査値に異常がみられたことから、肝臓や腎臓機能に変化が生じたことが示唆された。70 mg/kg 体重/日以上の PTBBA で処置された雄では、精巣における影響が顕著であったが、17.5 ないしは 35 mg/kg 体重の PTBBA で処置されたラットでは、影響は何も認められなかった。

この試験において、ラットは、4-tert-ブチル安息香酸と DEA の組成物に経皮曝露されているが、DEA の影響度を、特に肝臓の代謝活動に関しては、排除することはできない。しかし、同じ標的臓器では、反復経口曝露でも反復吸入曝露でも影響が同等であったという観察結果からすると、上述の経皮曝露での影響は、4-tert-ブチル安息香酸によるものと考えられる。

この経皮試験では、LOAEL は、17.5 mg/kg 体重/日とされる。

別の経皮試験(Shell, 1975)では、各群雌雄 8 匹ずつのラット (Carworth Farm E 系統)の剃毛皮膚に、0、7.5、15、30 ないしは 60 mg/kg 体重/日の用量で、4-tert-ブチル安息香酸が、28 日間局所適用された (DMSO を媒体とした 4-tert-ブチル安息香酸の 3.75、7.5、15 または 30% w/v 溶液を被験液として 0.2 mL/kg 体重適用)。体重を毎日記録した。各群雌雄 4 匹ずつを、試験終了時に剖検し、肝臓、腎臓および生殖腺について、組織学的検査を行った。

30 ないしは 60 mg/kg 体重/日群の雄では体重増加率が低下し、そのため最終体重がこれらの群の雄で有意に低値であった。体重率の低下は、これら 2 群の雌でも、最初の 2 週間認められた。

肝臓の絶対および相対重量が、全ての群の雌で、用量に関連した有意な増加(それぞれ+11、23、27、30%)で認められた。この有意な増加は、雄では 15 mg/kg 体重/日以上群で認められた(それぞれ+8、11、17%)。腎臓の相対重量の増加が、高用量側 2 群の雌ラットで観察された。また、精巣の相対および絶対重量の低下が、60 mg/kg 体重/日の処置を受けた雄ラットで観察された。

精巣の組織病理学的検査から、60 mg/kg 体重/日群の雄における生殖上皮の変性が明らかとなった。この他には、肝小葉中心性の肝細胞の好塩基性化が認められた以外、検査に供した各群雌雄 4 匹ずつのラットの肝臓や腎臓には、何も毒性影響は観察されなかった。肝細胞の好塩基性化の意義は、不明である。

この試験では、LOAEL が 7.5 mg/kg 体重/日とされたが、評価パラメータの数が少なく、供試動物数も少なく、また記載内容も乏しい(要約書であり、2 表と 1 図が得られたのみである)ことから、妥当性が低い。

経口

90 日間の経口投与試験が実施されている。アルビノ Carworth Farm ラット (各群雌雄 10 匹ずつ) に、0、100、316、1000、3160 ないしは 10000 ppm の 4-tert-ブチル安息香酸を含む餌が 90 日間投与された (1000 ppm までについて、飼料摂取量から計算すると、雄では 0、6、21 ないしは 75 mg/kg 体重/日、雌では 0、8、27 ないしは 89 mg/kg 体重/日の用量となるが、高用量側 2 群では計算は行われていない) (Hunter et al., 1965)。飼料消費量および体重が定期的に測定され、尿分析、血液学および臨床生化学的検査 (項目は少なかった)、肉眼および顕微鏡学的観察が実施された。

最高用量群の雄の 10 匹中 9 匹が、34 日目までに死亡し、10000 ppm の混餌投与を受けていた雌が全て、53 日目までに死亡した。3160 ppm の混餌投与を受けていた群では、42 日目までに 2 匹の雄が死亡し、さらに 6 匹が切迫屠殺された。3160 ppm 群の雌でも、2 匹が死亡し、1 匹が切迫屠殺された。3160 ppm 群の雄 1 匹と雌 2 匹で、血尿が観察された。3160 ppm の混餌投与を受けていた雄 1 匹と雌 1 匹、ならびに 1000 ppm の混餌投与を受けていた雌 1 匹で、後肢の麻痺が認められた。脊柱後弯症が、3160 ppm 群の 3 匹で観察され、慢性的な腎臓の機能障害に続発したものと推測された。

最終体重の抑制が、316 ppm 以上の混餌投与を受けた雄と 1000 ppm 以上の混餌投与を受けていた雌で、有意に認められた。飼料消費量は、高用量側の 2 群で対照群の値の 50~70% に低下したが、他の群ではその影響は見られなかった。10000 ppm の混餌投与を受けていた雄の生残ラットで赤血球数の減少が認められ、3160 ppm の混餌投与を受けていた雌雄の生残ラットと 10000 ppm の投与を受けていた雄の生残ラット 1 匹では、好中球の割合が増加してリンパ球数が減る方向に白血球分画が移行した。それ以外には、血液学的パラメータにおいて、投与に関連した影響は認められなかった。臨床生化学的検査所見としては、100~1000 ppm の混餌投与を受けていた雄で総タンパク質量の低下がみられ、1000 ppm 以上の混餌投与を受けていた雌雄のラットでは、用量に関連した様相で尿濃度が上昇した。

尿分析からは、3160 ppm 以上の混餌投与を受けていたラットにおいて、尿量が増加し、尿浸透圧が低下したことが明らかとなった。また、10000 ppm 群のラットでは、タンパク質濃度が上昇していた。

肝臓と腎臓の相対重量は、すべての投与群で増加した。精巣の相対重量は、すべての投与群の雄で低下した。

死亡したラットや屠殺したラットの肉眼剖検では、肝臓の鬱血および小斑が認められ、尿路において、水腎症、尿管水腫、尿路閉塞、血尿が認められた。全ての投与群の雄で、両

EURAR 35: 4-TERT-BUTYLBENZOIC ACID

側性の精巣萎縮が認められた。顕微鏡学的には、類洞の鬱血と小葉中心部の肝細胞の脂肪変性が認められた(「脂肪」の実体について、特異的な染色法による確認は行われていない)。水腎症については、組織病理学的検査により、3160 ppm 以上の群の雄と 10000 ppm 群の雌で確認された。尿管内への細胞片の蓄積、尿管上皮の壊死および腎乳頭壊死が、尿路閉塞病変の原因として挙げられた。

腎尿細管の壊死と腎乳頭壊死は、全ての投与群の雌雄で認められた。精巣の萎縮は、精細管の上皮変性との関連性を示していた。

この試験は古く、NOAEL を導出することはできなかった。4-tert-ブチル安息香酸の亜慢性経口投与に関する LOAEL は、100 ppm(雄ラットで 6 mg/kg 体重/日、雌ラットで 8 mg/kg 体重/日)である。

Table 4.2 Repeat-dose toxicity of 4-tert-butylbenzoic acid in rats

Study design (Reference)	Delayed mortalities	Growth retardation	Neurotoxicity	Liver toxicity	Urinary tract toxicity	Toxicity in reproductive organs	Haemo-toxicity	Immuno-toxicity	NOAEL (C)
Inhalation									
28d-study, rat, 0, 1.5, 5, 15 mg/m ³ (HRC, 1995)	-	-	15 mg/m ³ : Tremor, hypoactivity	15 mg/m ³ : Liver weight↑	-	-	-	-	NOAEC 5 mg/m ³
11d-study, rat, 0, 12.5, 106.1, 525.2 mg/m ³ (Shell, 1982)	≥106mg/m ³ :	≥106 mg/m ³ : Emaciation	≥106 mg/m ³ : Tremor, paralysis, convulsions, ataxia, prolapsed penis, hypoactivity. Severe focal/ regional poliomyelo-malacia + gliosis of spinal cord	≥12.5 mg/m ³ : Serum cholesterol↓, alkaline phosphatase↓, ≥106 mg/m ³ : serum ALAT↑, prot↓, liver weight↑, vacuolar degeneration of hepatocytes 525 mg/m ³ : serum ASAT↑	≥12.5 mg/m ³ : Pallor of cortical tubules ≥106 mg/m ³ : kidney weight↑ vacuolar degeneration of cortical tubules	≥12.5 mg/m ³ : Hypospermia ≥106 mg/m ³ : Testes: atrophy weight↓, degeneration of germinal epithelium. Epididymides: atrophy	525 mg/m ³ : Hb↓, Htc↓, WBC↑	≥106 mg/m ³ : Thymus: cortical atrophy	LOAEC 12.5 mg/m ³
Oral									
90d-study, rat 0, 100, 316, 1000, 3160, 10000 ppm (Hunter et al., 1965)	≥3160 ppm	≥316 ppm Final body weight↓ ≥3160 ppm Feed consum↓	1000 ppm on Day 90 and at 3160 ppm after Day 70: hind leg paralysis, no data on nervous tissue morphology	≥100 ppm Serum prot↓, liver weight↑ ≥3160 ppm: speckled liver, degeneration of hepatocytes	≥100 ppm: Kidney: weight↑, tubular cell + papillary necrosis ≥1000 ppm: serum urea↑ ≥3160 ppm:	≥100 ppm: Testes weight↓, atrophy, degenerated tubuli	10000 ppm: RBC↓, neutrophiles%↑	Nd	LOAEL 100 ppm (≈ 6 mg/kg bw/d in male rats, 8 mg/kg bw/d in female rat)

EURAR 35: 4-TERT-BUTYLBENZOIC ACID

					diuresis↑, hematuria, hydro- nephrosis, hydroureter, tubular damage				
Dermal									
7/13 wk-study, rat, 0, 17.5, 35, 70, 140 mg/kg bw/d (Cagen et al., 1989)	-	≥70 mg/kg: Body weight gain↓	-	≥17.5 mg/kg: Serum cholesterol↓, liver weight↑, vacuolar degeneration of hepatocytes	≥17.5 mg/kg: Kidneyweight↑ ≥70 mg/kg: Urine:volume↑ serum BUN↑, phosphorus↑ Kidney: degeneration + regeneration of distal convoluted tubules, interstitial inflammation, papillary necrosis	≥70 mg/kg: Testis weight↓ hypospermia, degeneration of germinal epithelium	≥17.5 mg/kg: Microcytosis of RBC ≥70 mg/kg: hypochromic anemia	-	LOAEL 17.5 mg/kg bw/d
28 d-study, rat 0, 7.5, 15, 30, 60 mg/kg/d, (Shell, 1975)	-	≥30 mg/kg Body weight gain↓	Nd	≥7.5 mg/kg: Liver weight↑	≥30 mg/kg Kidney: weight↑,	60 mg/kg Testes weight↓, degenerated tubuli	Nd	Nd	LOAEL 7.5 mg/kg bw/d

- no adverse effect observed Nd: no data available

4.1.2.6.2 ヒトにおける試験

試験データは得られていない。

4.1.2.6.3 反復投与毒性の要約

ヒトにおいては、反復曝露による影響に関する情報は、得られていない。

- 反復吸入、経口、経皮曝露による動物への全身毒性影響について：動物においては、全ての曝露経路について、データが揃っている。実施された動物試験はいずれも、試験デザインや記述内容に不十分な点があり、反復投与毒性試験に関する現行の実施要項と十分な整合性も取れていない。しかし、標的臓器に関する所見や全身毒性影響の特性に関する所見は首尾一貫しており、反復投与毒性の判断を十分に可能とする信頼性を提供していると考えられる。

4-tert-ブチル安息香酸の反復投与毒性に対する標的臓器は、中枢神経系、肝臓、腎臓、精巣、精巣上体、造血系および胸腺である(影響については Table 4.2 にまとめて示した)。

肝臓、腎臓、雄の生殖器官および末梢血においては、全ての試験にわたって、曝露経路によらず、同等の影響が認められた。反復吸入や反復経口投与の場合は、神経毒性が生じた。神経行動学的に異常な臨床症状や、神経組織の形態学的異常は、経皮試験においては何も報告されていない。

作用機序に関するデータには、動物種特異的な影響が生じることを根拠立てて示すものは無く、4-tert-ブチル安息香酸に反復曝露されたラットで観察された全ての毒性影響は、ヒトの健康に対しても、毒性学的意義を持つものと考えられる。

データが得られた試験 (Table 4.2 参照) において観察された最も鋭敏な有害影響に基づいて、全身毒性に関する 4-tert-ブチル安息香酸の無(もしくは最小)毒性量が導出された。

吸入

NOAEC_{sys} は 5 mg/m³ である。 (28 日間試験より、HRC, 1995)

LOAEC_{sys} は 12.5 mg/m³ である (90 日間試験での 1.5 mg/m³ に相当)。

(11 日間試験より、Shell Development Company, 1982)

EURAR 35: 4-TERT-BUTYLBENZOIC ACID

ハーバーの法則に従って 90 日間試験デザインに外挿を行うと、12.5 mg/m³ の PTBBA は 1.5 mg/m³ に相当し、この値は、有害/R48/20 の分類に関する限界濃度の 166 分の 1 である。

気道への局所影響は、11 日間吸入試験での観察で示唆されているだけである (Shell, 1982)。この試験では、106 mg/m³ 以上の濃度で曝露されたラットで、肺の鮮紅色化や肺の相対重量の増加傾向が認められた。鼻腔、喉頭、気管および肺といった気道組織について顕微鏡学的検査を実施したが、PTBBA に関連した影響は検出されなかった。28 日間吸入試験 (HRC, 1995) においては、全てのラットについて、肺の試料が組織病理学的検査に供され、他の気道組織は検査されていない。結果として、PTBBA に曝露されたラットの肺に、曝露に関連した影響は認められなかった。

得られた数少ないデータに基づくと、PTBBA の反復吸入によって気道への毒性は生じないと結論付けられる。

気道への毒性影響に関する LOAEC_{local} は 525 mg/m³ である。

(11 日間試験より、Shell, 1982)

経口

LOAEL は 100 ppm (6 mg/kg 体重/日) である。 (90 日間試験より、Hunter et al., 1965)

6 mg/kg 体重/日の PTBBA により、腎臓および精巣への毒性が生じたが、この値は、有害/R48/22 の基準濃度である 50 mg/kg 体重/日よりも極めて小さい。

経皮

LOAEL は 7.5 mg/kg 体重/日である。 (28 日間試験より、Shell, 1975)

7.5 mg/kg 体重/日は、90 日間試験にすると 2.3 mg/kg 体重/日に相当する。この値は、有害/R48/21 の基準用量である 100 mg/kg 体重/日よりも極めて小さい。この LOAEL は、Cagen et al. (1989) の 7/13 週間試験で得られた LOAEC により支持される。その LOAEC は 17.5 mg/kg 体重/日 (試験における最低用量) で、限界濃度の 100 mg/kg 体重/日よりも有意に低い。

上述のデータに基づくと、4-tert-ブチル安息香酸は、「T, R48/23/24/25、吸入、皮膚との接触および飲み込んだ場合に有毒」に分類すべきである。影響を及ぼす量は、有害との分類を下

す際の指針値よりもはるかに小さい。したがって、これまで適用されてきた分類は、改められるべきである。2007年9月、TC C&Lは、T; R48/23/24/25 への分類を承認した。

- 標的臓器毒性に関する議論

生育遅延

4-tert-ブチル安息香酸投与により飼料消費量は変化しない(Cagen et al., 1989)、もしくは高用量の場合にのみ飼料消費量が減少する(Hunter et al., 1965)という観察結果が得られている。これらの観察結果から、体重増加量の減少や最終体重の低下は、PTBBAによる特異的な毒性影響ではないと解釈されるという結論が支持される。

神経毒性

Shellの試験(1982)において、脊髄の限局性の灰白質軟化症と神経膠症が報告されており、これらは、11日間吸入試験において106 mg/m³以上の粒子濃度で観察された前肢および後肢の麻痺や歩行異常と関連付けることができる。90日間試験(Hunter et al., 1965)において1000 ppm以上の混餌投与を受け、後肢の麻痺を示していた動物についても、同様の病変が生じていた可能性が考えられる。経皮試験では神経組織の損傷は認められていないが、これは神経学的影響が無かったという証拠にはならない。というのは、全ての反復曝露試験で、慣例的な手法の染色しか行われておらず、それだけでは神経系細胞の各部位における特異的な病変を検出するには不十分だからである。

尿路毒性

4-tert-ブチル安息香酸は、どの曝露経路によっても、泌尿器系に影響を及ぼした。遠位皮質尿管および腎乳頭領域(腎盂)の尿管上皮は、4-tert-ブチル安息香酸が毒性を及ぼす主要部位であると思われた。尿量増加、血尿、尿管円柱、修復性上皮、間質性炎症、水腎症および尿管水腫は、Hunter et al.の経口投与試験(1965)において死亡例を生じさせた原因として考えられる病変と、関連付けられる。

肝毒性

血清トランスアミナーゼ活性の上昇(Shell, 1982)、肝臓の小斑出現や肥大した外観は、情報が得られた全ての反復曝露試験で観察された肝細胞毒性と整合していた。肝重量の増加は、これらの試験(HRC, 1995, Shell, 1975)における肝毒性を示唆するものと考えられる。明らかな形態学的病変や生化学的所見は、検査不足により観察できていない、も

しくは不明であるが、他の試験では、肝細胞毒性とそれらの試験における肝重量の増加との関連が確立されているからである。血清コレステロールの低下と肝細胞の脂質空胞化は、脂質代謝の攪乱を反映するものとみなすことができる。こうした仮定は、分離肝細胞において、PTBBA が、脂肪酸合成を阻害し、中鎖および長鎖のアシル CoA エステルを増加させたことを示す、*in vitro* のデータ (McCune et al., 1982) によって支持される。

生殖器官における毒性

ラットにおいて、4-tert-ブチル安息香酸への曝露により、精巣の病巣が、あらゆる曝露経路で生じている。情報が得られた様々な試験において、同様の影響が観察されており、生殖上皮が変性して精原細胞の諸段階で精子形成が障害されていることを特徴としていた。精巣の精細管内腔に多核巨大細胞が出現しており、より慢性的な進行過程が示唆された。二次的変化に相当するものは、精巣上体の萎縮と炎症性反応であった。

造血系に対する毒性

小球性低色素性貧血の徴候が、4-tert-ブチル安息香酸の、10000 ppm の混餌投与 (Hunter et al., 1965)、525 mg/m³ の粒子吸入 (Shell, 1982)、70 mg/kg 体重/日の局所適用 (Cagen et al., 1989) において認められた。赤血球の破壊増高を示す証拠は得られておらず、他の要因によるのではないかと思われるが、不明である。

白血球数の増加と好中球の割合の増加が、Shell (1982) の吸入試験において 525 mg/m³ で、Hunter et al. の経口投与試験 (1965) において 10000 ppm で認められたが、これらはおそらく、標的細胞における損傷に対する炎症反応と関連するものと考えられた。

免疫毒性

データベースの内容が不十分であるため、リンパ球壊死に続く胸腺皮質の萎縮の毒性学的意義は、未だ不明である (Shell, 1982)。この影響を示したラットの多くは、自然死したものである。

4.1.2.7 変異原性

4.1.2.7.1 *In vitro* 試験

細菌系

細菌を用いた突然変異試験においては、陰性であった (Hoechst AG, 1978)。この試験では、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の TA98、TA100、TA1535 および TA1537 株を用い、アロクロールで誘導した S-9 mix の存在下および非存在下において、4~2500 µg/plate の範囲の 5 用量で実施された。最高用量では、菌株によっては細胞毒性影響が現れた (復帰変異率の低下)。確認試験は行われていないが、十分に信頼性が得られており、PTBBA はほとんど遺伝子変異を誘発することはなさそうだと結論付けることができる。

哺乳類細胞を用いた *in vitro* 系

チャイニーズハムスター V79 細胞を用いた *in vitro* 小核試験では、4-tert-ブチル安息香酸は、代謝活性化系の存在下で陽性を示した [The Swiss Research and Consulting Company, Cytotest Cell Research GmbH (RCC-CCR), 2007]。この試験では、細胞を、ジメチルスルホキシドを媒体とした 375.0、750.0 ないしは 1500.0 µg/mL の PTBBA で処理した。培養細胞を、代謝活性化系 (アロクロール誘導ラット肝 S-9 mix) の存在下および非存在下で 4 時間曝露し、その 20 時間後に回収した。最高用量では、代謝活性化系の存在下において、沈殿の生成が肉眼で確認された。しかし、S-9 の存在下でも非存在下でも、明らかな細胞毒性は観察されなかった。S-9 mix 存在下で曝露した場合は、750 および 1500 µg/mL において、小核発生率がわずかに増加した (それぞれ 3.2% および 4.95%、対照値は 1.6%)。S-9 mix 非存在下では、孤発的に 375.0 µg/mL で小核発生率が増加した (2.15%) が、それより高用量側では増加は観察されず、陰性と判断された。代謝活性化系の存在下で陽性結果が得られたため、確認試験は実施されなかった。この *in vitro* 小核試験は、OECD による化学物質の試験ガイドライン「*In vitro* 小核試験」(No. 487) の試案に準拠して実施された。

4.1.2.7.2 *In vivo* 試験

哺乳類細胞を用いた *in vivo* 系

OECD TG 475 に準拠して、ラットを用いた *in vivo* 染色体異常試験が実施されている。雄には 600 mg/kg 体重が、雌には 300 mg/kg 体重が単回強制経口投与され、結果は陰性であった (RCC-CCR, 2000)。各群 5 匹が配され、投与後 24 時間後および 48 時間後に骨髄の試料を採

取した。投与により、雌雄両方において毒性反応が生じ、雄では致死的影響も現れた(2/6匹)。毒性に関して行われた予備試験において、雄への致死的影響は 900 mg/kg 体重(1/2 匹)および 1000 mg/kg(1/2 匹)で観察され、雌への致死的影響は 500 mg/kg 体重(1/2 匹)、600 mg/kg 体重(1/2 匹)および 800 mg/kg(2/2 匹)で観察されていた。有糸分裂指数のわずかな低下が、24 時間後に採取した雌の試料で観察された(対照群で 7.24%であったのに対し、投与を受けた雄で 6.76%、投与を受けた雌で 5.02%)。

4.1.2.7.3 変異原性の要約

4-tert-ブチル安息香酸は、ネズミチフス菌の様々な菌株に対して、遺伝子変異を惹起しなかった。チャイニーズハムスターV79 細胞を用いた *in vitro* 小核試験において、4-tert-ブチル安息香酸は、代謝活性化系の存在下で弱い陽性を示した。

ラットを用いた *in vivo* 染色体異常試験では、最大耐量(MTD)に匹敵する用量において、陰性を示した。経口投与後の分布については、物理化学的性質に関するデータから推定することができる。毒性影響は、低用量でも急性および亜急性経口投与で観察されており、同時に、*in vivo* 染色体異常試験でみられたような、弱い局所的影響(有糸分裂指数の低下)も認められた。分布についての推定結果は、これらの事実と整合している。得られた証拠から、PTBBA の染色体異常誘発性が *in vitro* で観察されても、*in vivo* で生殖細胞において発現する可能性は低いと、確固として結論付けられる。

ただし、*in vitro* 小核試験で陽性であったことと、この試験において染色体異常誘発性と異数性誘発性が区別されていなかったことから、染色体異常や異数性に関する局所的な影響が及ぼされる懸念を排除することはできない。このため、追加試験を行って解明することが推奨される。好ましくは、*in vivo* コメットアッセイ法(直接的に曝露された組織や肝臓について)と骨髄小核検定法を組み合わせた試験が推奨される。

4.1.2.8 がん原性

4.1.2.8.1 動物における試験

In vivo 試験

データは得られていない。

4.1.2.8.2 ヒトにおける試験

データは得られていない。

4.1.2.8.3 がん原性の要約

目下のところ、4-tert-ブチル安息香酸のがん原性については、ヒトの集団においては検討されておらず、また、動物試験も実施されていない。そのため、PTBBA のがん原性についての結論を導き出すことはできない。ただし、*in vitro* 小核試験で陽性データが得られており、PTBBA の遺伝毒性に関する懸念材料となるかも知れない。さらなる試験が求められた場合には、その結果を考慮に入れなくてはならない。

安息香酸のナトリウム塩を用いてがん原性試験が実施されているが、マウスにおいて(Toth, 1984)も、ラットにおいて(Sodemoto & Enomoto, 1980)も、腫瘍の発生率は上昇しなかった(ただし Sodemoto & Enomoto の試験は、感染性肺炎のためラットが多数死亡し、妥当性が低い)。

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

雄の受胎能に焦点を当てた試験が Wistar ラットを用いて実施されている(Hoechst, 1987)。各群 10 匹ずつの雄に、0、20、100 または 500 ppm の PTBBA を含む飼料が、交配期間の開始前に、連続 70 日間与えられた。飼料消費量のデータから、これらの飼料中濃度は、PTBBA の 1 日平均摂取量としては、それぞれ 1.6 mg/kg 体重(20 ppm)、7.9 mg/kg 体重(100 ppm)および 41 mg/kg 体重(500 ppm)に相当すると計算された。曝露期間中、各個体の一般状態、行動、体重および飼料消費量が、定期的に観察された。その後、各雄は、曝露を受けていない未交配の 2 匹の雌と 1 週間同居させ(第 1 交配期間)、それらの雌については、性周期や交尾の有無を、毎日観察した。2 匹の雌の内、少なくとも 1 匹で妊娠が成立した場合に、受胎能有り と判断した。第 1 交配期間では受胎能有り とされなかった雄は、PTBBA を含まない餌でさらに 70 日間飼養し、未交配の雌と再び 1 週間同居させた(第 2 交配期間)。これらの雄を、回復群とした。以下の評価項目について記録した。妊娠期間、生産仔数、死産仔数、性別、新生仔の重量および肉眼的な外表異常。新生仔は、最終的に屠殺した。雄は、

EURAR 35: 4-TERT-BUTYLBENZOIC ACID

交配相手の妊娠雌が出産した際、もしくは交配期間が終了した際に屠殺し、肉眼的剖検を行った。臓器重量の測定は、脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、精巣および精巣上体について実施した。精巣、精巣上体、前立腺および精嚢は、組織病理学的検査に供した。雌は、出産の1日後もしくは最終交配期間の25日後に屠殺し、肉眼的剖検を施し、着床痕数を測定した。

20 および 100 ppm といった低濃度の PTBBA の混餌投与では、ラットの体重増加量に何ら障害は及ぼされなかった。500 ppm では、被験動物に、可逆性の体重低下が観察された。曝露期間中、雄の体重増加は低減し、70 日間の曝露期間後では、対照群と比較して体重が 14% 少なかったが、通常の飼料による飼養に変えた後は、正常に生育し続けた。

20 ppm の曝露を受けた雄 10 匹と、100 ppm の曝露を受けた雄 9 匹では、第 1 交配期間で受胎能有りと判明した (Table 4.3)。20 ppm 群の雄 8 匹、100 ppm 群の雄 7 匹および対照群の雄 9 匹では、雌が 2 匹とも妊娠した。100 ppm 群の雄 1 匹については、2 匹の雌のうち、1 匹では妊娠が成立しなかったが、もう 1 匹では仔が産まれた。500 ppm の飼料で曝露された雄では、第 1 交配期には、1 例も妊娠が成立しなかった。雄 3 匹については、それぞれ 1 匹ずつの雌で射精が確認されたが、妊娠には至らなかった。残りの雄 7 匹については、交配相手の雌の膣垢塗抹標本において、精子が検出されなかった。

Table 4.3 Outcome of the 1st mating trial (Hoechst, 1987)

1. Mating trial	Controls	Treatment groups		
		20 ppm	100 ppm	500 ppm
Males investigated (n)	10	10	10	10
Fertile males [successful in impregnation] (n)	10	10	9	0
Female partners investigated (n)	20	20	20	20
Females sperm positive/pregnant	19	18	16	0
Females sperm positive/nonpregnant	0	0	2	3
Females neither sperm positive nor pregnant	1	2	2	17

Table 4.4 Outcome of the 2nd mating trial (Hoechst, 1987)

2. Mating trial			Recovery groups	
			100 ppm	500 ppm
Males investigated (n)			1	10
Fertile males [successful in impregnation] (n)			1	10
Female partners investigated (n)			2	20
Females sperm positive/pregnant			1	18
Females sperm positive/nonpregnant			1	1
Females neither sperm positive nor pregnant			0	1

曝露期間の最終日から 70 日後からの第 2 交配期間において、回復群の雄は、全て受胎能ありと判定された (Table 4.4)。500 ppm 群由来の雄 8 匹では、それぞれの交配雌が 2 匹とも妊娠し、同群由来の残りの雄 2 匹と 100 ppm 群由来の雄 1 匹では、それぞれの交配雌の 1 匹だけが妊娠した。

妊娠期および分娩期にわたり、曝露に関連した影響は何も観察されなかった。1 腹当たりの生産仔数、性比および新生仔の平均体重には、対照群と処置群との間で差異は認められなかった。新生仔の肉眼的外表異常は、何も認識されなかった。

雄親の臓器重量は、脳、心臓、肝臓、脾臓および腎臓に関して、処置群と対照群とで差異は認められなかった。20 および 100 ppm 群の精巣重量も、対照群の値と相違しなかった。しかし、500 ppm 群の雄では、70 日を超える回復期間の後の時点で、平均精巣重量は対照群 (3.14 g) と比較して低下していた (2.76 g)。

雄の生殖器官の組織病理学的検査では、対照群と比較して、20 や 100 ppm の混餌投与を受けたラットに特段の変化は認められなかった。500 ppm の混餌投与を受けたラットでは、生殖上皮に小さな病変が見つかったが、数個の精細管だけに限局するものであった。500 ppm 群では、前立腺、精囊および精巣上体とその部位の精子に関して、組織病理学的変化は何も認められなかった。

100 ppm の混餌投与 (PTBBA 7.9 mg /kg 体重/日に相当) で受胎不能/妊娠不成立の所見が得られていることに基づき、NOAEL/_{male fertility} としては、20 ppm (PTBBA 1.6 mg /kg 体重/日に相

当)が導出される。

雌の受胎能障害に関するデータや、他の機能に関する試験データは、得られたデータベース中には見つけることができなかった。

PTBBA の生殖器官への毒性に関する追加情報は、この化合物の亜/慢性毒性を検討した試験のデータベースで得ることができる(4.1.2.6 項参照)。

試験施設で繁殖させたアルビノ Carworth Farm ラットを用いた、亜慢性経口毒性試験が実施されている(Hunter et al., 1965)。各群雌雄 10 匹ずつに、PTBBA を、0、100、316、1000、3160 もしくは 10000 ppm の濃度で、90 日間混餌投与した(飼料摂取量から、雄では 0、6、21 および 75 mg/kg 体重/日、雌では 0、8、27 および 89 mg/kg 体重/日と算出されたが、高用量側 2 群での算出は行われていない)。3160 や 10000 ppm での混餌投与では、中途死亡例や切迫屠殺例が高率で起こったが、低用量側 3 群では、死亡例は観察されなかった。1000 および 316 ppm で曝露した群では、試験終了時の最終体重が、対照群よりも統計学的に有意($p < 0.01$)に低かった。肝臓は腎臓の絶対および相対重量が低下したほか、平均絶対および相対精巣重量も、対照群(3.45 g)と比較して、1000 および 316 ppm 曝露群で(それぞれ 1.21 g および 2.67 g まで)低下した。1000、316 および 100 ppm 曝露群では、腎尿細管および腎乳頭の壊死が見られたほか、組織病理学的検査により、精細管の上皮が破壊されて生じた、精巣の萎縮も明らかとなった(データは提示されていない)。著者は、この精巣の萎縮が、最低用量の 100 ppm 群でも認められたことを示している。したがって、雄の生殖器官に対する毒性に関する NOAEL は、導出することができなかった。

この試験からは、精巣重量低下や生殖上皮への影響の所見に基づき、LOAEL/*testes toxicity* を、100 ppm (PTBBA 6 mg /kg 体重/日に相当)と導出できる。

各群雌雄 20 匹ずつの Fischer 344 ラットを用いた亜慢性経皮毒性試験が行われている(Lu et al., 1987, Cagen et al., 1989)。動物の毛を刈り、無毛状態にし、脱イオン水を媒体とした PTBBA とジエタノールアミン塩の適切な組成物(切削油を模したものを)、1.0 mg/kg 体重の用量で、7 週間(各群雌雄 7 匹ずつ)または 13 週間(各群雌雄 13 匹ずつ)のいずれかの期間、局所適用した(1 日 1 回、1 週間に 5 日)。この処置による PTBBA への 1 日当たりの曝露量は、0(脱イオン水)、17.5、35、70 および 140 mg/kg 体重と算出された(ジエタノールへの 1 日当たりの曝露量は、それぞれ 11.7、21.6、41.3 および 82.6 mg/kg 体重)。この試験期間中、精巣の絶対および相対重量が測定され、さらに、精子数や LDH-x 酵素活性(右側精巣より試料採取)の測定も実施された。140 mg/kg 体重/日という高用量の PTBBA への経皮曝露でも、曝露に関連した死亡は起こらず、毒性の臨床徴候も何ら認められなかった。140 mg/kg 体重/日で曝露された雌雄と 70 mg/kg 体重/日で曝露された雌において、体重と体重増加量の低下

EURAR 35: 4-TERT-BUTYLBENZOIC ACID

が有意に認められた。肝臓の絶対および相対重量の減少が、17.5 mg/kg 体重/日での経皮曝露において、7 および 13 週間の両処置期間の場合にすでにみられるようになっていた。また、精巣の絶対および相対重量の減少も観察され、この影響の程度は、70 および 140 mg/kg 体重/日での 7 および 13 週間の経皮曝露の場合に、対照群と有意に相違していた (Table 4.5)。さらにこの 2 用量群では、精子数と LDH-x 酵素活性も、経皮曝露期間が 7 週間の場合でも 13 週間の場合でも、対照群と比べて減少していた。曝露に関連した顕微鏡学的病変は、原則的に、肝臓、腎臓および精巣に局限して見られた。PTBBA に起因する精巣の変化は、主に 70 ないしは 140 mg/kg 体重/日で曝露された群のラットで認められた。中等度から重度の、瀰漫性精細管変性を特徴とする病変について、報告されている。最もひどく変性していた精細管には、精原細胞、一次および二次精母細胞、初期精子細胞およびセルトリ細胞が存在していたが、後期精子細胞は存在していなかった。同じ精巣の精細管には、セルトリ細胞とわずかな精原細胞しか存在しないものも散見された。これら 2 つの曝露群のラットの変性精細管では、巨大細胞が非常に数多く存在し、精巣上体管腔内には、さらに多数生じていたことが報告されている。精原細胞の種類減少と後期精子細胞の欠如は、PTBBA に 7 もしくは 13 週間曝露されたラットにおける、最も際立った所見であった。

Table 4.5 Influence of dermal application of PTBBA to rats on testes parameters
(Studies by Lu et al. (1987) and Cagen et al. (1989))

	PTBBA in males (mg/kg bw/d)				
	0.0	17.5	35	70	140
Week 7, n=7					
Mean body weight (g)	289.4	289.6	296.3	277.6	261.0 ^{*)}
Mean abs. left testis weight (g)	1.45	1.40	1.49	0.85 ^{*)}	0.48 ^{*)}
Mean abs. right testis weight (g)	1.40	1.52	1.47	0.8 ^{*)}	.059 ^{*)}
Mean rel. Testis weight (g)	0.99	1.10	1.00	0.61 ^{*)}	0.41 ^{*)}
Mean sperm count (Mio)/testis	181	163	204	14	0.1
Week 13, n=13					
Mean body weight (g)	334.1	324.2	319.7	311.4 ^{*)}	277.7 ^{*)}
Mean abs left testis weight (g)	1.54	1.52	1.55	0.85 ^{*)}	0.62 ^{*)}
Mean abs right testis weight (g)	1.52	1.51	1.54	0.84 ^{*)}	0.65 ^{*)}
Mean rel. Testis weight (g)	0.92	0.94	0.97	0.54 ^{*)}	0.46 ^{*)}
Mean sperm count (Mio)/testis	174.4	166.3	175.3	7.8	0.08

^{*)} (p<0.01)

この試験からは、高用量の曝露で、精巣重量の減少、精液減少および生殖上皮の変性が見られたことに基づいて、PTBBA の NOAEL_{testes toxicity} として、35 mg/kg 体重/日を導出することができる。〔訳注：この段落は、英語の原文では、以下 4 段落の後に存在したが、その内容、数値から推すと、この位置が適切だと思われる。〕

他にも、4.1.2.6 項で示したように、各群 8 匹の雄ラット (Carworth Farm E 系統) を用いて、経皮試験が実施されている (Shell, 1975)。4-tert-ブチル安息香酸が、0、7.5、15、30 ないしは 60 mg/kg 体重/日の用量 (DMSO を媒体とした 4-tert-ブチル安息香酸の 3.75、7.5、15 または 30% w/v 溶液を被験液として 0.2 mL/kg 体重) で、剃毛皮膚に 28 日間局所適用された。体重の計測が、毎日実施された。各群 4 匹ずつを試験終了時に剖検し、肝臓、腎臓および生殖腺について、組織学的検査を行った。

30 および 60 mg/kg 体重/日で曝露された雄ラットで体重増加率が低下し、これらの群では、最終体重が有意に低くなった。

60 mg/kg 体重/日の処置を受けていた雄ラットでは、精巣の相対および絶対重量の低下が認められた。その精巣の組織病理学的検査により、60 mg/kg 体重/日で曝露された雄ラットにおける生殖上皮の変性が明らかとなった。

この試験からは、60 mg/kg 体重/日で精巣重量の減少と生殖上皮に対する影響が見られたことに基づいて、NOAEL_{testes toxicity} として、30 mg/kg 体重/日を導出することができる。

やはり、4.1.2.6 項で示したが、Fischer 344 ラットを用いて、短期間の吸入毒性試験が実施されている (Shell, 1982; Lu et al., 1987)。曝露は、次のいずれかにより実施された。(i) 1 m³ 中に 495、668、958 ないしは 1802 mg の PTBBA の粉塵を含む空気に 4 時間曝露 (各群 6 匹ずつ)。(ii) 1 m³ 中に 12.5、106 ないしは 525 mg の PTBBA の粉塵を含む空気に、1 日 6 時間で 4 日間曝露し、3 日間の休止期間の後、さらに 3 日間曝露 (各群 8 匹ずつ)。対照群は、粉塵への曝露を受けておらず、空気だけに曝露されていたため、妥当とはいえない可能性がある。粉塵に 4 時間急性吸入曝露されたラットは、14 日後に屠殺された。一方、反復的に粉塵に曝露された群は、最終曝露の翌日に屠殺された。予定通り屠殺されたラットのそれぞれについて、精巣重量測定、精子数計測および精巣の組織学的検査が実施された。

粉塵への 4 時間急性吸入試験では、全ての曝露群で、用量に関連した精巣への影響が観察された。粉塵に曝露された全ての群で、14 日後の平均精巣重量の低下が見られ、対照群で 1.25 g であったのに対し、0.66、0.67、0.58 g という値が得られ、統計学的に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。精巣中の平均精子数も減少し、対照群で 184.6×10^6 個であったのに対し、曝露群では 14 日後、それぞれ 27.6、29.2、15.8 および 2.6×10^6 個であった。組織病理学的解析により、精細管における後期精子細胞の欠如が、低濃度曝露群 (粉塵濃度 495 mg/m³) で明らかとなった。最高濃度曝露群 (粉塵濃度 1802 mg/m³) については、あらゆる分化段階の精子細胞が欠如していたと報告されている。さらに、セルトリ細胞しか存在しない精細管や、多核性の巨細胞を有する精細管が、いたる所に認められた。

連日で反復投与を行った試験については、1 m³ 中に PTBBA の粉塵を 106 mg 含む空気で曝露された群では、8 匹のうち雄 2 匹が死亡し、525 mg 含む空気で曝露された群では、8 匹のうち雄 7 匹が死亡した。最低濃度群では、死亡は起こらなかった。精巣重量の低値がみられたのは、致死的事実であることが判明した中および高濃度での曝露においてのみであり、生残ラットの数匹が該当した。しかし、精巣における精子数の低値は、粉塵に曝露された全ての群で認められ、0、12.5、106 および 525 mg/m³ 曝露群で、精巣 1 個当たり、それぞれ 236.5、188、93 および 9.7×10^6 個であった。初回曝露の 10 日後に剖検が実施され、組織病

理学的解析が行われたが、低濃度の粉塵で曝露された群では、精子形成に対する明らかな影響は認められなかった。中濃度群(106 mg/m³)の生残ラットの精巣では、後期精子細胞の欠如、多核巨大細胞の存在、および精原細胞の種類減少が観察された。

この試験からは、中および高濃度群でみられた、精巣 1 個当たりの平均精子数の 21%減少および精巣重量の低下、精液減少および精細管の変性といった所見に基づき、PTBBA の LOAEC_{testes toxicity} として、12.5 mg/m³ という値を導出できる。

ヒトにおける試験

PTBBA への職業曝露に関連して生じ得る精巣への影響について、PTBBA 製造施設の 90 人の男性ボランティアを対象集団として、調査が行われている (Whorton et al., 1980, 1981)。103 人のボランティアから成る対照群を設けた。これらの人々は、その製造施設で働いておらず、また、精巣毒性を有する既知の物質には全く曝露されたことはなかった。PTBBA 製造施設の調査対象群は、別々の 5 つの職種に従事する人々から成っていた。すなわち、作業員/反応槽操作員 (n=39)、補修管理員 (n=22)、運搬員 (n=2)、研究員 (n=4) および管理職/現場監督者 (n=22) であった。曝露集団は、その時期により 3 つに分け、指標化を(重み付けされた相対曝露点数係数を使用して)行い、それぞれの業務に関する審査を行った。第 1 期は、1954 年から 1964 年(調査した時期には使用されていた粉塵採取システムの導入前)で、第 2 期は 1964 年から 1978 年(保護マスクの使用、着衣交換、シャワー浴などの対人保護対策の開始前)で、そして、第 3 期は 1978 年から 1979 年で、この時期は、作業員や反応槽操作員の現場での濃度は、0.1mg/m³ 未満~0.5 mg/m³ の範囲にあった。空中の粉塵中における、呼吸され得る粒子の分画の割合は、21~21%であった。各自の曝露指数は、相対曝露点数と、所定の業務での勤務時間量に基づいて算出した。医学的評価は、以下の項目に基づいて実施した。(i) 婚姻、授精歴および喫煙歴に関する自己記入による問診。(ii) 職歴および泌尿生殖器科の既往歴。(iii) 男性生殖器の簡易診察。(iv) 静脈血試料を用いた血液学的検査(赤血球数および白血球数)および臨床生化学的検査(クレアチニン、血中尿素、SGOT、ビリルビン、アルカリホスファターゼ、コレステロール、トリグリセリド)ならびに FSH、LH およびテストステロンといったホルモンの血清中濃度測定。および、(v) 2 系列の精液試料を用いた容量、精子数および精子の形態の測定・観察。精子産生に影響を及ぼし得る化学物質に曝露されたことのない健康な男性では、精子数が広範な範囲にばらついていることが判明したことから、より良い評価を行うため、各被験者群で測定された精子数の分布を、精巣に障害が加えられた可能性に関する判定の基準とした。

90 人の被験者のうち、33 人が精管切除術を受けており、それらの人々については精液分析を行うことができなかった。精液試料を 1 つだけでも提出できたのは、90 人の被験者中、

合計 51 人のみであった。39 人について、2 系統の精液試料を得ることができた。曝露指数は、精液試料を提出できた男性の群と、提出できなかった男性の群とで、同様の値であった。調査対象群の 51 人(被験者数は、職種ごとに精子数測定結果を評価するには少なすぎた)の精子数測定データを分析したところ、平均精子数は、精液 1 mL 中、7200 万個であった。一方、対照群の数値は、7800 万個であった。精子数が精液 1 mL 中 2000 万個未満(すなわち低受胎能レベル)だったのは、調査対照群では 8 人(15.7%)、対照群では 7 人であった。著者は、この差が有意でないことを計算して確認し、その施設で生じた曝露の限りでは、従業員の精巣機能に対し、PTBBA は医学的に検知可能な影響を及ぼさなかったと結論付けた。また、この調査に参加した男性において、PTBBA が不妊を引き起こしたことを示す所見も得られなかった。肝臓や腎臓の機能、および血液組成への有害影響は、何も観察されなかった。調査項目に挙げられたホルモンの濃度は、精液を提供できた被験者でも、できなかった被験者でも、正常範囲にあった。この調査のデータからより良い統計学的分析結果を得るため、著者は、対照群に、他の同様の調査(Ross, 1982)で対照として扱われた男性 232 人を追加することとした。曝露をうけていない男性の群(したがって 335 人)のうち、精子数が 2000 万個/mL であったのは、25 人(7.5%)であった。報告によれば、調査対象群と非曝露群との間でみられたわずかな相違は、統計分析で用いる手法により、有意と考えられたり有意でないと考えられたりしたという事である。製造施設に所属する調査対象群の男性の中で、精子減少症であった人の泌尿器科臨床データから、精子密度減少の原因として考えられる要因が、流行性耳下腺炎による精巣炎、睾丸ヘルニアおよび陰茎硬化症など、他に多数考えられることが判明した。対照群の泌尿器科臨床データは、評価することができず、さらに良好な統計学的分析結果を得ることはできなかった。調査対照群の規模が小さく、泌尿器に関する所見も多様であったことから、対照群との相違に生物学的意義があるかどうかは疑問である。

4.1.2.9.2 発生・発達毒性

動物における試験

データは得られていない。

ヒトにおける試験

データは得られていない。

4.1.2.9.3 生殖毒性の要約

データベースからヒトや実験動物のデータが得られなかったため、PTBBA の発生・発達毒性に関して何らかの有害性評価を行うことは不可能であった。

男性/雄の受胎能に関しては、ラットを用いて様々な曝露経路(経口/混餌、吸入、経皮)でいくつかの試験が行われており、それらにより、精巣における病巣の誘発、精子形成への毒性影響および(可逆的な)不妊症状といった、PTBBA による毒性が、比較的低い用量や濃度でも発現することが判明した。精巣の障害は、曝露経路によらず一貫したものであり、絶対および相対重量の低下、精細管変性による萎縮、精子形成の阻害につながる生殖上皮の崩壊、および特に後期精子細胞の欠如を特徴としていた。PTBBA がヒトにおいても精子形成に毒性影響を及ぼす可能性についての懸念は、職業曝露を受けていた従業員に関する調査から、詳しく検討することができる。その調査からは、曝露を受けていた群において、曝露を受けていなかった群と比較して、精子数が少ない(精液 1 mL 当たり 2 千万個未満)ヒトの数が、若干多いことが示された。

データが得られていないため、女性/雌の受胎能に関する PTBBA の有害性評価を行うことはできない。

実験動物試験に由来し、リスクの総合評価に有用な NOAEL/LOAEL 値を、Table 4.6 に示す。

Table 4.6 NOAEL/LOAEL values from different administration routes for fertility risk characterisation

Route of application	NOAEL/C	LOAEL/C	Reference
Oral	1.6 mg/kg bw/d	7.9 mg/kg bw/d	Hoechst, 1987
Oral/ 90 days	-	6 mg/kg bw/d	Hunter et al., 1965
Dermal/ 7 and 13 weeks	35 mg/kg bw/d	70 mg/kg bw/d	Lu et al., 1987, Cagen et al., 1989
Dermal / 28 days	30 mg/kg bw/d	60 mg/kg bw/d	Shell, 1975
Inhalation/ 4 days (3 days rest) 3 days	-	12.5 mg/m ³	Shell, 1982, Lu et al., 1987

ラットを用いて様々な曝露経路で実施されたいくつかの試験において、再三に一貫して、雄の生殖腺に対する特異的な有害性・毒性が明示されており、また、雄の受胎能が損なわれる結果が得られている。したがって、PTBBA は、生殖毒性物質 T、生殖毒性カテゴリー2 に分類すべきであり、R60(受胎能を損なう恐れ有り)の表記を行うべきである。2007 年 9 月、TC C&L は、受胎能に関して、生殖毒性カテゴリー2 への分類と R60 の表記を承認した。