

部分翻訳

**European Union
Risk Assessment Report
Edetic Acid (EDTA)**

CAS No: 60-00-4
1st Priority List, Volume 49, 2004

欧州連合
リスク評価書 (Volume 49, 2004)
エデト酸 (EDTA)

European Union
Risk Assessment Report

Institute for Health and Consumer Protection

European Chemicals Bureau

CAS No: 60-00-4 EINECS No: 200-449-4

Existing Substances

edetic acid (EDTA)

CC(=O)OCCN(CC(=O)O)CC(=O)O

European Union Risk Assessment Report
edetic acid (EDTA)
CAS: 60-00-4
EINECS: 200-449-4
PL-1
49

1st Priority List
Volume: 49

EUROPEAN COMMISSION
EUROPEAN UNION
Joint Research Centre

EUR 21314 EN

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部
2011年3月

本部分訳文書は、Edetic Acid, CAS No: 60-00-4)に関するEU Risk Assessment Report, (Vol. 49, 2004)の第4章「ヒト健康」のうち、第4.1.2項「影響評価：有害性の特定および用量反応関係」を翻訳したものである。原文（評価書全文）は、

http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/REPORT/edtareport061.pdf

を参照のこと。

4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量反応関係

はじめに：異なるEDTA化合物の読み変えの妥当性

一般に、エデト酸 (H_4EDTA) およびEDTA四ナトリウム塩は、類似した特性および曝露パターンを示す。しかし、急性毒性および局所作用について、両者は異なる挙動を示す。そのため、このふたつの物質の危険性については、急性毒性、刺激性、腐食性および感作性といった項目を、それぞれの毒性試験に使われた被験物質を明記して評価されている。したがって、健康への影響に関する記述（影響評価）は、別々の二つの報告書として提示され、これら二つの化合物を区別している。

全身影響性については、 H_4EDTA またはその塩である Na_2H_2EDTA 、 Na_3HEDTA および Na_4EDTA を投与した試験データは、関連性のある情報と考えられた。その理由は、これらの化合物は生理的条件下 (pH 7~9) ではエデト酸のpH依存解離平衡にしたがって、ナトリウムカチオンとそれぞれの組成のエデト酸 ($HEDTA^{3-}$) アニオンに分離するからである (Becke-Göhring and Fluck, 1961)。これらをもとに、 H_4EDTA または Na_4EDTA に関する結論は、利用可能なデータベースを検討して導くこととする。

可溶性ではあるが強固に結合した錯体であるエデト酸カルシウム二ナトリウム塩 ($CaNa_2EDTA$) に関する実験データは、トキシコキネティクスおよび生殖発生毒性に関するもの以外は、この報告書のすべてのセクションから除外した。EDTAカルシウム錯体の安定度定数 (およそ $10^{10} \cdot M^{-1}$) を考慮すると、質量作用の法則に従い $CaNa_2EDTA$ 溶液中の各種遊離EDTAアニオン濃度は < 0.01% と推定される (セクション3.1.3.3.1参照)。このように、 $CaNa_2EDTA$ 錯体の溶液中では大部分が $CaEDTA^{2-}$ として存在しており、遊離EDTAアニオンとして存在しているのは $CaNa_2EDTA$ 錯体のほんの一部に過ぎず、EDTA または Na_4EDTA の一般毒性 (全身作用) を検出するには少なすぎると思われる。

$CaNa_2EDTA$ は Ca^{2+} よりも高い親和性を持つ他の金属とキレートを形成する (例えば鉛、鉄、

亜鉛および銅)。例えば、鉛はCaNa₂EDTAとキレートして、カルシウム錯体よりも親和性が10⁷も高い錯体を形成する。このキレート化する性質を利用して、CaNa₂EDTAを静脈内投与して重金属中毒の治療がおこなわれる。一方、亜鉛はCaNa₂EDTAとキレートして、カルシウム錯体よりも親和性が10⁴高い錯体を形成する。したがって、CaNa₂EDTAを投与した場合亜鉛イオンの錯体が形成されて亜鉛のホメオスタシスを乱し、最終的には発生毒性を惹起する（セクション4.1.2.9参照）。

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝および分布

動物における試験

ラットに¹⁴C-EDTAのカルシウム塩を経口投与（50 mg/kg体重）したても、消化管からはほとんど吸収されなかった（24時間で2～18%）。ほぼ同じ用量を非経口的に投与した場合は、6時間以内に95～98%の放射活性が尿中に排泄され、排出半減期はおよそ50分であった。投与した放射能の0.1%以下が、呼気中にCO₂としてわずかに検出された（Foreman et al., 1953）。

ラットにCaNa₂-¹⁴C-EDTA塩（300-500 mg/kg/day）を10回腹腔内投与した場合、投与した総放射能の66～92%が尿中に回収された。最終投与後24時間の両腎臓内放射能量は投与した総放射能の0.1%以下であった（Doolan et al., 1967; Miller et al., 1986）。

CaNa₂EDTA塩（54時間の間に280 mg/kg/6時間、皮下投与）の亜鉛、銅およびマンガン代謝に及ぼす影響が、イヌで検討されている。この化合物の投与によって鉛、銅およびマンガンの尿中排泄が増加した（Ibim et al., 1992）。

吸入試験データは入手できていない。

ヒトにおける試験

Foreman and Trujillo（1954）は¹⁴C-EDTA（CaNa₂EDTA ; 2 mg）のトキシコキネティクスを、健康若齢成人男子を対象にして検討している。調査は、経口および非経口投与後と皮膚への塗布による投与後に行われた。EDTAは消化管からほとんど吸収されなかった。経口投与後24時間では、最大5%が尿中で検出され、糞便中では3日後まで検出された。全体の回収率は93%であった。¹⁴C-EDTA のカルシウム塩を静脈内投与（2 mg、2 gの非標識CaNa₂ EDTAも同時投与）した場合、24時間以内に尿中に排泄され、最初の1時間で50%、7時間以内に90%が排泄された。皮膚吸収試験では、被験物質（2 mgの¹⁴C-EDTAカルシウム塩および1 gの非標識CaNa₂EDTA）を水溶性基剤で調製した。一つの試験では¹⁴C-EDTAナトリウム塩をカルシウム塩の代わりに使用した。皮膚吸収からの尿中排泄をみる試験では放射活性が非

常に低いために、キャリアーとしてEDTAナトリウム塩を用いた特別な処理を行う必要があった。100 cm²の皮膚に塗布した後の尿中での最大放射活性は、0.001%であった。

吸入試験データは入手できていない。

トキシコキネティクス、代謝および分布の結論

EDTAそのものまたは四ナトリウム塩の経口投与によるトキシコキネティクスおよび経皮吸収に関する試験データは入手できていない。エデト酸の解離定数に基づけば、異なるナトリウム塩の投与では、消化管内のpHに依存していくつかの種類のEDTAアニオンが生成されるであろう。どのような塩であってもEDTAを投与すれば*in vivo*で金属イオンと容易にキレートを形成する。EDTAのナトリウム塩およびその遊離酸の経口および皮膚吸収は、低い吸収が示されたCaNa₂EDTAと同程度であろう。

EDTAのカルシウム塩の消化管吸収はわずかであり（24時間で2～18%）、尿中での検出は、最大で5%であった。皮膚への塗布による吸収は、わずかに0.001%であった。EDTAを静脈内投与した場合は24時間以内に尿中に排泄され、最初の1時間では50%、7時間以内に90%が排泄された。

4.1.2.2 急性毒性

動物における試験

経口投与

ラットにおけるLD₅₀として、>2,000 mg/kg (Akzo Chemicals, 1987) および約4,500 mg/kg (BASF AG, 1973b) という値が報告されている。雌雄各5匹のラット (Wistar) に上限の用量である2,000 mg/kgのエデト酸（純度；99%、媒体は水）を国際的なガイドラインに従って投与した試験では、死亡も一般状態の変化も剖検における変化も認められなかった (Akzo Chemicals, 1987)。エデト酸（純度に関するデータ無し）をカルボキシメチルセルロース水溶液で30%調製物として投与し、LD₅₀が約4,500 mg/kgを示した試験では、呼吸困難、下痢および痙攣性歩行からなる臨床徴候が認められた。剖検では、全体的な充血、心臓の拡張、胃の出血性潰瘍および腸管内での液状物質貯留が認められた (BASF AG, 1973c)。

吸入曝露

吸入毒性試験に類似した試験において、1群12匹のラットを、20または80°Cに加熱したエデト酸（純度に関するデータ無し）を含む粉塵空气中に8時間曝露した。

この試験に用いたチャンバー内の濃度は測定しなかった。粘膜に対する軽度な刺激性が認められた。この試験では、死亡も剖検における異常所見も認められなかった（BASF AG, 1973c）。

皮膚への曝露

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

セクション4.1.2.5を参照のこと。

急性毒性の結論

ラットに経口投与した場合の急性毒性は低い。二つの試験でLD₅₀は> 2,000 mg/kgと報告されている。そのため、経口投与による急性毒性については分類も表示も必要ない。

吸入毒性試験に類似した試験系では、ラット（12匹）を20または80℃に加熱したエデト酸（純度不明）に8時間曝露したが、死亡は認められなかった。

急性吸入毒性のリスクアセスメントには、この結果で十分であると考えられる。LD₅₀の試験を行う必要はなく、急性吸入毒性について分類も表示も必要ない。

急性皮膚毒性についてのデータは得られていない。経皮吸収の低さ（Foremann, 1954）を考慮すれば、急性皮膚毒性試験を行っても、急性皮膚毒性について分類および表示が必要となるような毒性を示すことはないとは推定される。

4.1.2.3 刺激性

動物における試験

それぞれ1羽のウサギを用い、エデト酸（純度に関するデータ無し）の50%水溶液で背中を1、5または15分あるいは20時間、もしくは耳を20時間、曝露した。20時間の曝露後24時間の時点で、耳に軽度な刺激性が認められた。その他に毒性所見はみられなかった（BASF AG, 1973c）。

ウサギの眼を固体のエデト酸（純度に関するデータ無し）50 mgで処置した場合、1時間後に軽度な刺激性、重度な浮腫、軽度な混濁および発赤が認められた。24時間では強度な刺

激性、軽度な浮腫および重度な混濁が認められた。刺激性のスコアについては述べられていない。8日後には異常所見は認められなかった（BASF AG, 1973c）。

ヒトにおける試験

ヒトに関するデータは得られていない。

刺激性に関する結論

エデト酸（純度に関するデータ無し）の50%水溶液は、皮膚を20時間曝露させた場合、軽度な刺激性を示した。この結果からは、皮膚刺激性に関して分類および表示を必要としないと考えられる。

50mgの固体のエデト酸（純度に関するデータ無し）でウサギの眼を処置した場合、強度だが可逆性の刺激性が認められた。このことから、分類は“Xi, 刺激性物質”、表示は“R36, 眼に刺激性有り”となる。

4.1.2.4 腐食性

動物における試験

エデト酸は、皮膚に対して腐食性はないが、眼に対して刺激性がある（BASF AG, 1973b）。

ヒトにおける試験

ヒトに関するデータは得られていない。

腐食性に関する結論

皮膚および眼刺激性について得られた動物における試験データは、皮膚に対する弱い作用および眼に対する刺激作用を示している（セクション4.1.2.3参照）。この物質を腐食性物質として分類する必要はない。

4.1.2.5 感作性

動物における試験

処置群10匹および対照群5匹の被験動物を用いて、OECD テストガイドライン406に基づく

Na₂EDTA (Trilon BD ; 純度99%) のMagnusson Kligmanテストを実施した。皮内投与による感作には0.5%溶液を、塗布による感作には30%溶液を、被験動物に対して使用した。対照群は、媒体のコーンオイルで処置した。惹起には、コーンオイルによる30%溶液を用いた。3/10 (30%) の被験物質処置動物で、パッチ除去24時間後に散在性斑状紅斑が認められたが、48時間後には陽性反応を示した動物はいなかった。対照群は陰性であった。2回目の惹起を7日後にコーンオイルによる30%溶液で行った。1/10 (10%) の動物で24時間後に散在性斑状紅斑が認められたが、48時間後には認められなかった。対照群には皮膚反応は認められなかった (BASF AG, 2000a)。

Na₃EDTAを用いた累積刺激および感作試験 (Repeated Insult Patch Test) は陰性であった (モルモットで0/10)。10日以内に4回、ジプロピレングリコールメチルエーテルに溶解したNa₃EDTA (10%) をモルモットに塗布 (0.1 ml) し、3回目の処置後には0.2 mlの FCAを注射した。最終処置後14日にジプロピレングリコールメチルエーテルに溶解したNa₃EDTA (10%) で惹起した。エチレンジアミンとの交差反応は認められなかった (Henck et al., 1980)。この試験は、OECDの方法に適合したものではなかった。

ヒトにおける試験

皮膚感作性

50人の被験者中3人がEDTAに陽性反応を示した (1%濃度でのパッチテスト, Raymond and Gross, 1969)。これとは別に1%のEDTA濃度でパッチテスト (Rudner, 1977) が行われ、0.9%の陽性反応率 (215人中) であったことが、EDTAや他の被験物質の曝露歴に関するデータを伴わないかたちでNorth American Contact Dermatitis Groupから報告されている。Pevny and Schäfer (1980) およびPevnyら (1981) は、1.7~2.8% (患者743人中13人または患者345人中10人) という陽性反応率を報告している。しかし、通常はワセリンもしくは水に1%の濃度で混ぜて使用される (de Groot, 1986) のに対して、ワセリンに10%の濃度で混ぜて使用されている。したがって、これらのデータは接触アレルギーだけを示しているのではなく、刺激反応をも示しているかもしれない。湿疹性皮膚炎患者529人中2人 (0.4%) が、EDTAに陽性反応を示した。患者がEDTAに曝露されていたかについては述べられていない (Angelini et al., 1985)。

Fisher (1986) によれば、EDTAでテストした多くの患者の中に、陽性反応を示した患者は一人もいなかった。彼は、EDTAに感作性はなく、塩酸エチレンジアミンとの交差反応もないと結論づけている。

呼吸器に対する感作性

安定喘息の患者22人中6人が、保存料としてEDTA (0.5 g/L) および臭化ベンザルコニウム (0.25 g/L) を含む気管支拡張剤の臭化イプラトロピウムを4 mL噴霧吸入した後に、気管支収縮を発症した。これら6人の患者が、EDTAおよび臭化ベンザルコニウムを含まない4 mLの臭化イプラトロピウム溶液を吸入した場合は、すべての患者で気管支拡張が認められた。EDTAおよび臭化ベンザルコニウムを別々に吸入した場合 (EDTAは0.25–10 g/L溶液)、用量に依存した気管支収縮がみられ、それは60分以上持続した。EFV₁ (努力呼気肺活量) が20%低下する累積幾何平均 (範囲) は、エデト酸で2.40 g/L (1.2–12.8) であった。エデト酸が気管支収縮を惹起するメカニズムは不明であるが、カルシウムイオンのキレート剤としての性質に関連すると思われる (Beasley et al., 1987)。Beasley (1989) は喘息患者での別の試験で、フェノテロール (0.31 g/L) および臭化イプラトロピウム (0.13 g/L) を含むデュオベントの単回吸入による気管支拡張作用に対してEDTA (0.5 g/L) が影響しないという成績を再現できなかった。しかしながら、EDTAの反復吸入による気道への影響は検討されていない。

これらのデータは、エデト酸の溶解量に関して試験の詳細が不明確であるために、定性的なリスクアセスメントにおいてできえ、限定的にしか利用できない。

企業からの情報 (BASF, Dow, Akzo Nobel, CEFIC) では、労働者において、EDTA またはNa₄EDTAに対する曝露による急性または慢性の呼吸器系に及ぼす有害作用は認められないと報告されている (BASF-Letter, 2001)。しかしながら、呼吸器に対する作用や曝露方法 (期間、間隔) についての詳細がないため、この情報は妥当性に欠ける。

感作性についての結論

Na₂EDTAのOECD 406に基づくMagnusson Kligmanテストでは、最初の惹起で3/10 (30%)、2回目の惹起で1/10 (10%) のモルモットに陽性反応が認められた。ヒトについては報告が2報あるのみである。この物質が工業製品や消費者製品として長期間大量に使用されているという事実に基づけば、表示をR43の“皮膚接触により感作を引き起こすおそれがある”とするには、陽性反応率は低すぎる。Beasley らの試験結果が再現できなかったことを考慮して、表示をR42 “吸入により感作を引き起こすおそれ有り” とすることは提案しない。

4.1.2.6 反復投与毒性

EDTAそのものまたは四ナトリウム塩を用いた反復毒性試験データは得られていない。どのような塩のEDTAであっても投与された場合、*in vivo*で金属イオンをキレートするだろう。そのようなバイオメカニズムを想定して、Na₂EDTAおよびNa₃EDTAの検討が行われるべきであろう。

ラットに1ヶ月間経口投与した場合のNOAELは、1,125 mg/kg/dayすなわち混餌濃度2.25%であった。これはNa₂EDTAを用いた混餌試験データから計算されたものであり、ここではNa₂EDTAを飼料中に1、2.25および5%の濃度で加えて被験物質とした（ラット1群雌雄各15匹、1ヶ月間）。高用量群で体重が減少し、数例の死亡がみられ、総白血球数およびリンパ球数の減少の他に、尿素窒素（BUN）の増加および血清カルシウムの減少が認められた。剖検では、高用量群で肝臓、脾臓および胸線重量の減少が認められた。病理組織学的検査では、食道および前胃部に蹠角化症が認められた（Kawamata, 1980）。

1群10匹の雄Holtzmanラットに、Na₂EDTAを1、5および10%含有する飼料を90日間投与した（それぞれ500 mg/kg、2,500 mg/kgおよび5,000 mg/kg）。中用量および高用量群で、体重および摂餌量の有意な減少が認められた。用量に依存した死亡率が認められ、5%混餌群では20%、10%混餌群では60%であった。これらの群では下痢および消瘦が認められた。摂水量は増加した。高用量群ではヘマトクリットおよびヘモグロビン値の減少が断続的にみられ、肝臓は褪色していた。組織学的検査では何ら変化を見つけることはできなかった。この試験から、雄ラットに対するNOAELは1%混餌に相当する500 mg/kg/dayと推定された（Wynn, 1970）。この試験については、生化学的検査が不完全であることに注意しなければならない。

Na₃EDTAをラットおよびマウス（各用量群雌雄各50匹）に2年間にわたって投与した試験では、NOAELは500 mg/kg/day（7,500 ppmの混餌に相当）であった。この試験では処置群は2群（3,750 ppmおよび7,500 ppm）であり、いずれの動物種でも被験物質投与に関連した毒性は認められなかった。この試験のための用量設定試験では、1群雌雄各5匹に4,640、6,800、10,000、14,700および21,600 ppmのNa₃EDTA添加飼料を7週間与えており、雄の10,000 ppm以上、雌の14,700 ppm以上で軟便が認められている（NTIS, 1977）。

その他の情報

様々なEDTA化合物の主として錯体形成に関連する薬理学的作用については、非常に多くの情報がある。それらの情報の中には、EDTAの神経および腎毒性に関連する研究もあるが、EDTAの投与経路が腹腔内、皮下または静脈内であるために適当ではないと思われる。その様な投与経路は通常の曝露状況に相当するものではないため、リスクアセスメントでは考慮されない（Doolan et al., 1967; Duhr et al., 1993; Engström et al., 1980）。

反復投与毒性の結論

90日間投与試験および2年間投与試験から信頼できる毒性情報が得られており、ラットおよびマウスに対するNOAELはおよそ500 mg/kg/日（435 mg/kgのEDTAに相当）と考えられた。

90日間投与試験では、雄のみが用いられていることや臨床生化学的検査が今日通常に行われるすべての項目について行われているわけではないこともあるが、このデータは、主として長期試験から得られる病理組織学的情報を提示しており、体重などのパラメータやいくつかの血液学的パラメータは、この無毒性量に根拠を与えている。

高用量で行った用量設定試験では、下痢、消瘦、体重減少、および食道や前胃部の錯角化症が認められ、ヘマトクリットおよびヘモグロビン値の減少も認められた。

4.1.2.7 変異原性

EDTAの遊離酸に関しては、*in vitro*および*in vivo*における変異原性試験のデータが僅かにあるだけである。そのために構造的に関連するEDTAのナトリウム塩 (Na_3EDTA の*in vitro*および Na_2EDTA の*in vivo*) のデータも考慮した。

4.1.2.7.1 *in vitro*変異原性試験

細菌を用いた突然変異試験

Na_3EDTA について細菌を用いた突然変異試験が行われている。

ネズミチフス菌のTA 97、TA 98、TA 100、TA 1535、TA 1537、TA 1538株および大腸菌のWP2uvrA株を用いた突然変異試験で、ラット、マウスおよびハムスターの肝臓のS9を加えた系と加えない系で、 Na_3EDTA は、10,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ まで陰性であった (Dunkel et al., 1985 ; Zeiger et al., 1988)。S9を加えた系と加えない系とも、3,333 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で毒性が認められた。

哺乳類の培養細胞を用いた試験

EDTA (遊離酸) について哺乳類の培養細胞を用いた試験が行われている。

マウスリンフォーマ試験は代謝活性化のない条件でのみ行われており、EDTAの非常に高い濃度である25および30 mmol/Lの4時間処理において、2~6倍高い突然変異が認められ、それらの濃度における相対総増殖率はそれぞれ57%および16%であった。EDTAを培養液 (pHは7.2) に溶解して行った別の実験で、溶液調製後に直接測定したpHは30 mmol/Lでは5.8に、20 mmol/Lでは6.1に低下した。この変異原性がpHの変化によるものか、高濃度の被験物質によるものかは明確ではなかった (Wangenheim and Bolcsfoldi, 1988)。

EURAR V49: Edetic Acid

マウスリンフォーマ細胞を用いるアルカリ溶出法試験において、40 mmol/L以上という非常に高い濃度のEDTAで、DNAの一本鎖切断が認められた。毒性に関するデータはなく、試験は代謝活性化系のない条件のみで行われている（Garberg et al., 1988）。V79細胞を用いたアルカリ溶出法試験において、30 mmol/LまでのEDTA濃度で、S9系の有無にかかわらず作用は認められなかった（Swenberg et al., 1976; Swenberg, 1981）。

Na₃EDTAについては、NTP（2003）が*in vitro*の染色体異常試験、*in vitro*のSCE試験およびマウスリンフォーマ試験を行い、陰性と報告している。それらの試験の詳細は、現時点では不明である。

Table 4.6 Summary of *in vitro* genotoxicity results

Test system	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Test substance	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix					
Gene mutations, Salm. typh. TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538, E. coli WP2 uvrA	10-10'000 µg/plate	10-10'000 µg/plate	negative	with and without S-9 mix at doses of 3,333 µg/plate and higher		Na ₃ EDTA	Dunkel et al. (1985)
Gene mutations, Salm. typh. TA 97, TA 98, TA 100, TA1535	100-10'000 µg/plate	100-10'000 µg/plate	negative	with and without S-9 mix at doses of 6,666 µg/plate and higher		Na ₃ EDTA	Zeiger et al. (1988)
Mouse lymphoma assay	not done	10-30 mmol/l	positive	at doses of 25 mmol/l and higher	4 h treatment; effect only at very high concentrations; possibly the result was due to pH effects	EDTA	Wangenheim and Bolcsfoldi (1988)
DNA damage; alkaline elution; V79 cells	1.0-10 mmol/l	1.0-10 mmol/l	negative	no data		EDTA	Swenberg et al., (1976)
DNA damage; alkaline elution; V79 cells	3.0-30 mmol/l	3.0-30 mmol/l	negative	no data		EDTA	Swenberg et al. (1981)
DNA damage; alkaline elution; L 5178Y cells	10-50 mmol/l	10-50 mmol/l	positive	none	single strand breaks at extremely high concentrations from 40 mmol/l upwards	EDTA	Garberg et al., (1988)

4.1.2.7.2 *In vivo*試験

げっ歯類の骨髄細胞を用いた小核試験

マウス (NMRI系) を用いた多染性赤血球における *in vivo* 小核試験において、Na₂EDTAは500、1,000および2,000 mg/kgの反復経口投与 (24時間間隔で2回) で陰性であった (BASF, 2000b)。この試験はガイドラインおよびGLPに従って行われた。試料採取は2回目の投与後24時間に行われている。一般状態の変化としては、2,000 mg/kg投与群で2回目の投与後にみられた立毛のみであった。死亡も細胞毒性 (PCE/NCE比) も認められなかった。雄 (1群5匹) のみで実験されているが、それは予備試験で雌雄間に症状の差が認められなかったためである。

マウス (BALB/c系) 骨髄細胞を用いた、別の適切に実施された *in vivo* 小核試験では、186 mg/kgのNa₂EDTAを腹腔内投与したが、その結果は陰性であった。この試験では、試料採取は投与後24および48時間後に行っている (Russo and Levis, 1992)。この用量はLD₅₀に近いものであった。細胞毒性 (PCE/NCE) は認められていない。なお、一般状態および死亡に関するデータは示されていない。雄 (24時間群は3匹、48時間群は4匹) のみが使用されている。

MuralidharaとNarasimhamurthy (1991) は、マウス (CFT系) に5.0~20 mg/kgのNa₂EDTA (Sigma Chemicals製) を経口投与した小核試験が陽性であったことを報告している。ただしこの試験は、GLPに従ったものではなかった。試料採取時間が24時間の場合のみ、15および20 mg/kg投与群で用量に依存した小核を持つ多染性赤血球の出現頻度が増加した。最大小核出現頻度は、媒体を投与した対照群では0.35%であったのに対し、1.43% (20 mg/kg) であった。一般状態および死亡に関するデータは示されていない。PCE/NCE比には、EDTA処理による影響は認められなかった。雄 (1群4匹) のみを使用している。予備試験では5.0、10および15 mg/kg/dayのNa₂EDTAを5日間連続経口投与したが、明らかな毒性所見はみられていなかった。使用した系のマウスにおけるプロビット回帰法で計算した経口投与のLD₅₀は、30 mg/kgであった。

総合すると、経口投与 (BASF, 2000) および腹腔内投与 (Russo and Levis, 1992) による小核試験では陰性であったという結果に対して、MuralidharaとNarasimhamurthy (1991) による陽性という結果の信頼性は低いと思われる。15および20 mg/kgのような低用量の経口投与で陽性となることが妥当とは思われない。したがって、EDTAは骨髄細胞で小核形成を惹起しないと結論する。

骨髄細胞を用いた異数性および姉妹染色分体交換試験

Zordan ら (1990) は、雄マウス (BALB/c系) の骨髄を用いてNa₂EDTAの異数性発現作用を検討した。93および186 mg/kgの腹腔内投与 (高用量では死亡が生じた) では、異数性骨髄

細胞の増加は認められなかった。これと並行して骨髄細胞を用いるSCE試験も行ったが、これも陰性であった。

Table 4.7 Summary of *in vivo* genotoxicity results in rodent bone marrow cells

Test system	Doses	Expos. regimen	Sampl. times	Result	Local cytotox.	General toxicity	Remarks	Test substance	Reference
Micronucleus test	500-2000 mg/kg	2 x p.o.	24 hours after second application	negative	no effect	clinical signs at the highest tested dose	application: each dose twice at an interval of 24 hours	Na ₂ EDTA	BASF (2000)
Micronucleus test	186 mg/kg	1 x i.p.	24, 48 hours	negative	no effect	no data		Na ₂ EDTA	Russo and Lewis (1992)
Micronucleus test	5.0-20 mg/kg	1 x p.o.	24 hours	positive	no effect	no data	dose-dependent positive effect at 15 and 20 mg/kg	Na ₂ EDTA	Muralidhara and Narasimhamurthy (1991)
Aneuploidy	93-186 mg/kg	1 x i.p.	20 hours	negative			higher doses resulted in lethality	Na ₂ EDTA	Zordan et al. (1990)
Sister chromatid exchange (SCE)	93-186 mg/kg	1 x i.p.	20 hours	negative			higher doses resulted in lethality	Na ₂ EDTA	Zordan et al. (1990)

げっ歯類の生殖細胞を用いた試験

マウス (BALB/c系) にLD₅₀値相当の高用量である186 mg/kgのNa₂EDTAを腹腔内投与した場合、精子形成の終期の生殖細胞で小核を形成すると報告されている (Russo and Lewis, 1992)。小核の頻度は、精子細胞形成の最も早い二つの時期であるゴルジ期およびキャップ期で分析した。試料採取時間は、投与後24および48時間であった。Na₂EDTAによる小核形成はゴルジ期の精子細胞で認められ (小核を持つ精子細胞は24および48時間でそれぞれ0.30%および0.38%、対照では0.08%)、キャップ期の精子細胞では陰性であった。毒性に関するデータは示されていない。異数性は、二次精母細胞においてNa₂EDTAによって形成された小核の原因となっている可能性が高いと考察されている。その理由は、この物質は他の物質に比べて一般に大きなサイズの小核を形成するためである。さらにNa₂EDTAは、染色体異常を検出するのに最も適切な生殖細胞の時期である精原細胞期において、染色体異常を惹起しない。

Zordan ら (1990) は、マウス (BALB/c系) の一次および二次精母細胞で、Na₂EDTAの異数性誘発作用を検討した。93および186 mg/kgの単回腹腔内投与では、異数性精母細胞の増加は認められなかった。試料採取は投与後6時間および5日であり、高用量では死亡もみられた。

マウス (BALB/c系) の精原細胞を用いる *in vivo* 染色体異常試験では、186 mg/kg の Na_2EDTA の単回腹腔内投与で陰性であった。試料採取は投与後24時間であった (Russo and Levis, 1992)。

優性致死試験において、10 mg/kg/日での Na_2EDTA のマウス (CFT系) に対する5日間連続経口投与では、優性致死は誘発されなかった (Muralidhara and Narasimhamurthy, 1991)。

Table 4.8 Summary of *in vivo* rodent germ cell tests

Test system	Doses	Exposure regimen	Exposure period	Result	General toxicity	Test substance	Remarks	Reference
Micronucleus test in spermatids	186 g/kg	1 x i.p.	24, 48 hours	positive	no data	Na_2EDTA	positive in spermatids of the Golgi phase	Russo and Levis (1992)
Aneuploidy in secondary and primary spermatocytes	93–186 mg/kg	1 x i.p.	6 hours and 5 days	negative	no data	Na_2EDTA	higher doses resulted in lethality	Zordan et al. (1990)
Chromosomal aberrations in spermatogonia	186 g/kg	1 x i.p.	24 hours	negative	no data	Na_2EDTA		Russo and Levis (1992)
Dominant lethal test	10 mg/kg	drinking water	5 days	negative	no data	Na_2EDTA	dose on 5 days consecutive	Muralidhara and Narasimhamurthy (1991)

生殖細胞を用いた試験については結局、 Na_2EDTA は、染色体構造異常誘発能、一次および二次精母細胞における異数性誘発作用および優性致死誘発能において陰性であった。精子細胞を用いる小核試験では陽性であり、異数性誘発作用が精子形成の特殊な時期（精子形成の後期）に惹起されることを示唆している。精子形成の様々な時期における異なる感受性に基づくと、 Na_2EDTA が生殖系細胞で異数性を惹起する可能性を除外することはできない。しかし、この陽性反応は、 LD_{50} に相当する非常に高い用量で生じたものである。異数性の誘発は閾値のある作用機序に基づくものであることから、異数性誘発能は低用量では発現しないと思われる。

キイロショウジョウバエを用いた試験

キイロショウジョウバエを用いた *in vivo* 試験が EDTA（遊離酸）および Na_2EDTA で行われている。

Table 4.9 Summary of *in vivo* tests with *Drosophila melanogaster*

Test system	Doses	Exposure period	Result	General toxicity	Test substance	Remarks	Reference
<i>Drosophila</i> ; aneuploidy in germ line cells	700 ppm (oral feed)	unclear	positive	no data	EDTA	positive for chromosomal loss	Ramel and Magnusson (1979)
<i>Drosophila</i> ; aneuploidy in germ line cells	7.5–25 mmol/l (oral feed)	3 days	positive	no data	Na ₂ EDTA	FIX test for aneuploidy; positive at doses of 7.5 mmol and higher	Zordan et al. (1990)
<i>Drosophila</i> ; somatic cell genotoxicity	7.5–25 mmol/l (oral feed)	24 hours	negative	no data	Na ₂ EDTA	somatic mutation and recombination test (SMART)	Zordan et al. (1990)

キイロショウジョウバエの生殖細胞において化学物質により異数性を誘発させる二つの試験で、陽性という結果が報告されている。性染色体の不分離および欠失に関する試験では、EDTA (基質内で700 ppm)は、染色体欠失の指標について陽性であった (Ramel and Magnusson, 1979)。Zordanら (1990) は雌のキイロショウジョウバエの成虫を用いて遺伝性異数性を検討するFIX試験を行い、Na₂EDTAの遺伝的影響を検討した。Na₂EDTAの濃度は7.5 mmol/Lおよび25 mmol/Lであった。両濃度で遺伝的影響が認められた。

体細胞突然変異および組み換え試験 (SMART) において、7.5 mmol/Lおよび25 mmol/L のNa₂EDTAで幼虫を処理した場合は陰性であった (Zordan et al., 1990)。

4.1.2.7.3 変異原性の結論

細菌を用いた突然変異試験は陰性であったが、マウスリンフォーマ細胞を用いた試験では、非常に高い濃度への曝露で突然変異およびDNAの損傷が認められた。マウスの体細胞 (骨髄細胞) を用いた試験では、小核形成、異数性および姉妹染色分体交換といった指標は陰性であった。生殖系列細胞を用いる試験でも、精原細胞における染色体構造異常誘発、一次および二次精母細胞における異数性誘発、さらに優性致死誘発についても陰性であった。精子細胞を用いる小核試験で結果が陽性であったことは、精子形成の特殊な時期 (精子形成の後期) には異数性が誘発される可能性を示している。しかし、この陽性反応はLD₅₀に相当する非常に高い用量で生じたものである。異数性の誘発は閾値のある作用機序に基づくものであることから、異数性誘発能は低用量では発現しないと思われる。さらに、この作用は必須成分の生物学的利用能低下による間接的なものである可能性もある。

以上をまとめると、EDTAおよびそのナトリウム塩は、非常に高い用量で低い突然変異誘発能を有する。様々な試験で陰性であったという知見および異数性の誘発機序は閾値様式をとるという前提に基づけば、EDTAおよびそのナトリウム塩はヒトに変異原性は示さないと結論できる。

4.1.2.8 発がん性

4.1.2.8.1 動物における試験

EDTAに関する発がん試験データは得られていない。しかしNa₃EDTAについては、ラットおよびマウスで検討されている。Na₃EDTA・3H₂Oのデータを用いることの妥当性についてはセクション4.1.2の“はじめに”に記載した。1群雌雄各50匹のFischer 344ラットに3,750および7,500 ppm（およそ248および495mg/kg体重/日に相当）を毎日混餌で103週間投与した、標準的な発がん性試験が行われた。同様に、1群雌雄各50匹のB6C3F1マウスに同じ用量（3,750および7,500 ppm、これはおよそ469および938 mg/kg/日に相当）を毎日混餌で103週間投与した試験も行われている。それぞれの動物種に、対応する雌雄各20匹の対照群を設けている（NTIS: Bioassay of Trisodium Ethylenediaminetetraacetate Trihydrate (EDTA) for possible Carcinogenicity, CAS No. 150-38-9; NCI-CG-TR-11 (1977) [PB 270 938], 1977）。

ラットの試験では、試験期間中、投与群の雌雄の動物の平均体重はそれぞれの対照群と同等であった。雄マウスでは高用量群でのみ、ほとんどの試験期間中の平均体重が、対照群に比較して低値を示した。雌マウスでは、投与群において試験期間中用量に関連した平均体重の抑制が見られたが、その影響は小さかった。

臨床検査では、ラットおよびマウスの雌雄とも、投与に関連した所見は認められなかった。

ラットおよびマウスで死亡率に投与群と対照群の間および雌雄間に有意な差は認められなかった。

すべての群で同頻度の炎症性および退行性変化が認められた。これらの変化は加齢に伴うものであり、被験物質投与によるものではないと考えられた。

全体としては、495 mg/kg/日までのNa₃EDTAをラットに、938 mg/kg/日までのNa₃EDTAをマウスに投与したこの試験では、Na₃EDTAに実験動物に対する発がん性はないことが示された。しかし、最大耐用量の被験物質で試験されていない。

ラットの腫瘍に関する病理組織学的所見

生殖器系および内分泌系に高頻度の腫瘍が、造血系、呼吸器系、外皮および消化器系に低頻度の腫瘍が認められている。神経系、筋骨格系および泌尿器系には腫瘍は認められなかった。

腫瘍は、どの用量群でも、また雌雄どちらでも統計学的に有意な陽性傾向を示さなかった。内分泌系に様々な腫瘍が認められ、ある種の腫瘍は投与群にのみ認められた。しかし、それらの腫瘍の発生数は少なく、別の試験では非処置群でもしばしば認められている。したがって、それは投与とは関連しないものである。

雄：精巣間質細胞腫が、全群のほとんどすべての雄に認められた。この両投与群および対照群に認められた高頻度の間質細胞腫は、雄のFischer 344ラットでは加齢に伴って生ずる病変であることを反映している（Table 4.10参照）。

雌：対照群および投与群の生殖器系にみられた腫瘍の分布はランダムであるが、主に子宮に認められた。その大部分は子宮内膜間質細胞のポリープであった。しかし、7,500 ppm群で腺がんおよび平滑筋肉腫が各1例認められている。3,750 ppm群では1例に卵巣囊腺腫が検出された（Table 4.11参照）。

その他の組織・器官（造血系、肝臓および肺）でも雌雄両者に多くの腫瘍が認められたが、その頻度は対照群と投与群で同等であった。対照群の頻度の方が投与群よりも高いこともあった。

結論として、この試験ではどの腫瘍のタイプにも有意な増加は認められず、ラットに対する発がん性を示す明確な結果は得られなかった。

Table 4.10 Incidence of primary tumors at specific sites in male rats fed Na₃EDTA in the diet

Topography: Morphology	Matched control	3,750 ppm	7,500 ppm
Hematopoietic system: leukemia, malignant lymphoma, and lymphocytic leukaemia Weeks to first observed tumor:	3/20 76	4/50 104	4/50 102
Adrenal: pheochromocytoma Weeks to first observed tumor:	2/20 104	5/49 104	4/50 67
Thyroid: C-cell adenoma Weeks to first observed tumor:	0/17 -	6/35 104	3/38 67
Pituitary: chromophobe adenoma Weeks to first observed tumor:	0/18 -	3/47 88	5/44 104
Lung: alveolar/bronchiolar adenoma and carcinoma Weeks to first observed tumor:	1/18 104	2/50 95	3/49 67
Liver: hepatocellular adenoma and neoplastic nodule Weeks to first observed tumor:	0/20 -	1/48 104	1/50 104
Testis: interstitial-cell tumor Weeks to first observed tumor:	19/20 88	43/50 85	44/50 95

Table 4.11 Incidence of primary tumors at specific sites in female rats fed NasEDTA the diet

Topography: Morphology	Matched control	3,750 ppm	7,500 ppm
Hematopoietic system: malignant lymphoma, leukemia, and lymphocytic leukaemia Weeks to first observed tumor:	1/20 104	8/50 80	0/50 -
Adrenal: pheochromocytoma Weeks to first observed tumor:	1/20 98	1/49 104	3/48 104
Thyroid: C-cell adenoma Weeks to first observed tumor:	0/11 -	0/36 -	1/37 104
Pituitary: chromophobe adenoma Weeks to first observed tumor:	6/19 95	10/48 104	11/50 104
Lung: alveolar/bronchiolar adenoma Weeks to first observed tumor:	0/20 -	3/48 104	2/48 104
Liver: neoplastic nodule Weeks to first observed tumor:	0/20 -	1/48 104	0/48 -
Uterus: endometrial stromal polyp Weeks to first observed tumor:	5/20 104	6/50 96	7/50 85
Mammary gland: fibroadenoma Weeks to first observed tumor:	4/20 85	3/50 96	3/50 97

マウスの腫瘍に関する病理組織学的所見

投与群および対照群ともに様々な腫瘍が認められ、これらはこの系統のマウスの背景対照からよく知られているものであった。造血系、内分泌系、消化器系および呼吸器系の腫瘍が高頻度であった。その他の系の腫瘍発生頻度は様々であった。すべてのタイプの腫瘍とも、投与群と対照群での出現頻度に統計学的に有意な差は認められなかった。

対照群の雌1例および3,750 ppm群の雄1例にみられた脾血管腫を除き、造血系にみられたすべての腫瘍は悪性リンパ種または白血病であった。

内分泌系の腫瘍の分布は、投与群と対照群との間にほとんど違いはなかった。

肝腫瘍の頻度は、すべての群で雌より雄で明らかに高かった。肝腫瘍は雄の3,750 ppm群 (10/44, 22%) および7,500 ppm群 (10/47, 21%) で認められた。この頻度は対照群 (3/19, 16%) とほとんど同じであった。

呼吸器系の原発性腫瘍も投与群および対照群に認められた。7,500 ppm群の雄で肺腫瘍が高頻度に認められた (対照群で2/18, 11% ; 3,750 ppmで8/44, 18% ; 7,500 ppmで12/45, 26%)。これは投与による影響を示唆するものかも知れない。しかし、この系統および年齢のマウスでは肺腫瘍はしばしば認められるものであり、したがってこのマウスの試験でみられた頻度の増加は投与に関連するものではないと思われる。

結論として、この試験ではどの腫瘍のタイプにも有意な増加は認められず、マウスに対す

る発がん性を示す明確な結果は得られなかった (Tables 4.12および4.13参照)。

Table 4.12 Incidence of primary tumors at specific sites in male mice fed Na₃EDTA in the diet

Topography: Morphology	Matched control	3,750 ppm	7,500 ppm
Hematopoietic system: malignant lymphoma Weeks to first observed tumor:	2/20 91	7/46 73	7/48 87
Lung: alveolar/bronchiolar adenoma and carcinoma Weeks to first observed tumor:	2/18 105	8/44 99	12/45 96
Pituitary: chromophobe adenoma Weeks to first observed tumor:	1/13 105	0/19 -	1/26 105
Liver: hepatocellular adenoma and carcinoma Weeks to first observed tumor:	3/19 103	10/44 84	10/47 105
Thyroid: follicular-cell adenoma and carcinoma Weeks to first observed tumor:	0/10 -	1/29 104	1/33 105

Table 4.13 Incidence of primary tumors at specific sites in female mice fed Na₃EDTA in the diet

Topography: Morphology	Matched control	3,750 ppm	7,500 ppm
Hematopoietic system: malignant lymphoma Weeks to first observed tumor:	5/19 85	11/49 99	12/47 93
Lung: alveolar/bronchiolar adenoma Weeks to first observed tumor:	0/19 -	3/47 105	4/45 102
Pituitary: chromophobe adenoma Weeks to first observed tumor:	2/12 105	6/34 105	4/29 105
Liver: hepatocellular adenoma and carcinoma Weeks to first observed tumor:	0/19 -	1/46 105	1/47 105
Thyroid: follicular-cell adenoma and carcinoma Weeks to first observed tumor:	1/12 105	3/33 99	1/34 105

4.1.2.8.2 ヒトにおける試験

発がん性の評価に有用な疫学的試験データは入手できていない。

In vitro試験：細胞形質転換試験

エドト酸に関するデータは入手できていない。しかし、EDTAのナトリウム塩 (Na₃EDTAおよびNa₂EDTA) のデータを検討する必要がある。

EDTAのナトリウム塩について実施した*in vitro*細胞形質転換試験の結果は陰性であった。Na₃EDTAでは、BALB/c-3T3細胞 (Matthews et al., 1993) およびSHE細胞 (Fukuda, 1987; およびIsfort et al., 1996) とともに、毒性を示す濃度まで細胞形質転換の頻度は増加しなかった。LeBoeufら (1996) は、Na₂EDTAもSHE細胞において毒性を示す濃度まで陰性であったことを報告している。

Table 4.14 *In vitro* tests: Cell transformation

Test system	Concentration range		Result	Toxicity	Remarks	Reference
	with S-9 mix	without S-9 mix				
BALB/c-3T3 cells	not done	1.89 mM (677.0 µg/ml)	negative	'lethal dose' for 50% of the cells at 1.89 mM	Na ₃ EDTA; 48-hour exposure	Matthews et al. (1993)
SHE cells	not done	0.03-0.3 mM (10.7-107.4 µg/ml)	negative	dose-dependent decrease of cell survival up to 63% at 0.3 mM	Na ₃ EDTA	Fukuda (1987) (cited in: Isfort et al., 1996)
SHE cells	not done	50-150 µg/ml	negative	dose-dependent decrease of relative plating efficiency up to 14% at 150 µg/ml	Na ₂ EDTA; 7-day exposure	LeBoeuf et al. (1996)
	not done	25-100 µg/ml	negative	dose-dependent decrease of relative plating efficiency up to 49% at 100 µg/ml	Na ₂ EDTA; 24-day exposure	

4.1.2.8.3 発がん性の結論

EDTAの発がん性を評価することができる疫学的研究データは入手できていない。発がん性の可能性を検討するために、Na₃EDTAをFischer 344ラットおよびB6C3F1マウスに投与したバイオアッセイが行われた。これらの試験では、どちらの動物種についても腎毒性に関する具体的なデータは示されていない。試験中、両動物種で投与群および対照群に様々な腫瘍が認められたが、投与に関連するものではなかった。

総合すると、発がん性試験および細胞形質転換試験における陰性の結果並びに非常に高い用量でのみみられた低い突然変異誘発性から、EDTAに発がん性の懸念はないと結論できる。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 動物における試験

受胎能力への影響

EDTAを用いた世代試験、とくに受胎能試験のデータは入手できていない。

Wistarラットを用いて2年間混餌投与試験が行われた。この試験には、連続4世代にわたる生殖および授乳に関する検討も含まれており、1群雌雄25匹のラットにおよそ50、125および250 mg/kg/日のCaNa₂EDTAを飼料に混ぜて投与した (Oser et al., 1963)。いずれの群のいず

れの世代においても、行動または外観に有意な差異は無く、また成長または生存期間に対する毒性も認められなかった。性腺（精巣）を含む様々な組織および臓器の検査（重量、病理組織学的検査）において、高用量群でも異常は認められなかった。生殖および授乳に及ぼす影響に関する判定項目は、妊娠に至った交配動物の割合（受胎率）、生存仔出産に至った妊娠動物の割合（出産率）、4日以上生存した産仔動物の割合（生存率）、および離乳に至った4日生存産仔の割合であった。生殖に関する項目のいくつかにおいては低下もみられたが、用量に相関するものではなく、投与を継続した世代の数に相関するものでもなかった。連続4世代における2回の交配についての総合的なデータには、いずれの項目においても投与に関連した有意な差異は認められなかった。著者は、繰り返される妊娠および授乳というストレスのかかる実験条件下でも、生殖および授乳能力について普段用いられる指標のいずれについても、CaNa₂EDTAは有害作用を示さなかったと結論している。

1952年という昔に行われた生殖試験で、Na₂EDTAを0.5、1.0および5.0%に飼料に混ぜてWistarアルビノラットに投与した（およそ300、600および3,000 mg/kg/日に相当）予備試験のデータが、不十分ながら要約に記載されている（Yang and Chan, 1964）。低用量の2群の親世代では、初回および2回目とも正常な仔動物の出産が認められたが、最高用量群では2ヶ月間も交配したにもかかわらず仔動物を得ることはできなかったと報告されている。これ以上の詳細は得られていない。次世代に関するデータも得られていない。

さらに受胎能に関する別の報告がある（Muralidhara and Narasimhamurthy, 1991）。5、10および15 mg/kgのNa₂EDTAを、成熟雄Swissアルビノマウスに連続5日間経口投与し、1、3、5および7週間後に検査したが、精巣上体および精巣の絶対および相対重量並びにこの臓器の組織構造にも影響は認められなかった。同様に、精巣上体尾部の精子数にも影響はなく、頭部異常精子出現率にも異常精子の割合にも影響は認められなかった。さらに、雄マウスに10 mg/kgのNa₂EDTAを5日間連続して投与しても、第2週および第3週の交配で有意ではなしに約2倍に増加したことを除いて、8週間にわたる交配期間で着床後胚死亡は増加しなかった。

発生毒性

EDTAおよびそのナトリウム塩ならびにカルシウムまたは亜鉛とのキレート化合物が発生に及ぼす影響については、異なる種類のラットを用いて様々な投与経路で多くの*in vivo*動物試験が行われている。そのほとんどは単回投与である。ガイドラインに従ったEDTAの発生毒性試験データは得られていない。

雌CDラットを用いて、妊娠7～14日に異なる投与経路で投与して、毒性および催奇形性を検討している（Kimmel, 1977）。平均投与量が954 mg/kg/日となるEDTA（ナトリウム塩とし

て) 3%混餌投与を施した場合、投与期間中母動物に摂餌量の減少、顕著な下痢および明らかな体重減少が認められ、胎仔死亡の有意な増加(一腹あたりおよそ33%の胎仔吸収)、胎仔体重の明らかな減少および生存胎仔のおよそ71%に及ぶ肉眼的にわかる外部、内部および骨格の奇形が認められた。1,250または1,500mg/kg/日(それぞれ625 mg/kg または750 mg/kgの1日2回投与)のEDTA(リン酸緩衝液に溶解)の経口投与では、母動物に著しい毒性(1,500 mg/kg投与群では8匹中7匹の死亡)、とくに1,250 mg/kg投与群での36%の母動物の死亡、顕著な体重増加抑制および下痢、さらに生存胎仔における有意に高い奇形発生率(およそ21%)が認められた。375 mgのEDTA(リン酸緩衝液に溶解)の皮下投与で、母動物に重度な疼痛症状(啼鳴およびショック)がみられ、母動物で24%の死亡、顕著な摂餌量および体重減少が投与期間中認められた。この投与経路では、胎仔毒性(胎仔吸収が一腹あたりおよそ32%、胎仔体重の有意な減少)および一腹あたりおよそ4%の生存胎児の奇形も報告されている。

また別の実験(Swenerton and Hurley, 1971)では、妊娠Sprague-Dawleyラットに100または1,000 ppmの亜鉛(炭酸亜鉛として添加)および2または3%のNa₂EDTAを含む精製飼料を、妊娠中の様々な時期に与えた。1群8~16匹の雌ラットに交配前少なくとも5日間是对照の飼料を与え、通常の飼料を与えた雄ラットと交配させた。この試験では、EDTAを含む飼料を与えたすべての雌動物で中等度から重度な下痢が認められたこと以外は、母動物に及ぼす投与の影響は認められなかった。3%Na₂EDTA/100 ppm亜鉛を含む飼料を妊娠0~21日に与えた動物では、生殖が完全に阻害された。一方、2%Na₂EDTA/100 ppm亜鉛を含む飼料を与えた動物では、生殖成績は対照群とほとんど同じであったが、仔動物の平均体重が低く、妊娠末期の胎仔の7%に奇形が認められた。3%Na₂EDTA/100 ppm亜鉛を含む飼料を妊娠6~14日および妊娠6~21日に与えた群では、死亡または吸収胎仔がそれぞれ40%および54%、生存仔出産母動物数の減少、平均胎仔体重の明らかな減少および生存仔のそれぞれ87%および100%に奇形が認められた。肉眼的奇形としては口蓋裂、重度な脳の形態異常、眼球欠損、小顎症または無顎症、合指症、内反足および尾の形態異常が認められた。ここで報告されている胎仔毒性および催奇形性作用は、先に実施された妊娠ラットに亜鉛欠乏飼料を妊娠中の様々な時期に与えた試験(Hurley and Swenerton, 1966; Hurley et al., 1971)と類似するものである。これに対し、1,000 ppmの亜鉛を加えた3%Na₂EDTAの飼料を妊娠6~21日に摂取した母動物から生まれた仔動物には奇形は認められず、一腹あたりの平均生存仔数および平均胎仔体重も対照群と同等であった。著者はこの試験結果から、Na₂EDTAを妊娠期間中に摂取すれば奇形が惹起されるが、亜鉛を同時に摂取することでEDTAの有害な作用から防護できると結論づけている。EDTAによる先天異常はとくに亜鉛欠損に基づくものであることが示唆された。このことは、胎仔における亜鉛分析で支持されている(Hurley and Swenerton, 1966)。すなわち、亜鉛欠乏母動物からの仔動物の亜鉛含量は、亜鉛を補給された母動物からの仔動物と比較して明らかに低く、ここで認められた作用は、胎仔発育に対する母動

物の代謝の間接的な影響よりはむしろ胎仔組織中の亜鉛の直接的な欠乏で生じたことを示している。

EDTAおよびその4種の塩について、CDラットを用いてそれらの催奇形性が検討されている (Schardein et al., 1981)。1群20匹の雌ラットに1,000 mg/kg/日のEDTAを妊娠7～14日に経口投与した。同様に同じモル量のエデト酸2ナトリウム塩、3ナトリウム塩、カルシウム-2ナトリウム塩および4ナトリウム塩 (リン酸緩衝液に溶解または懸濁し最終pH値は3.9～9.2) を投与した。この用量は、同じ条件で行ったエデト酸による予備試験で、母動物および胎仔に毒性がみられたことから選択されたものである。母動物において被験物質投与に関連した顕著な下痢および自発運動の減少等の反応が認められた。下痢はすべての被験物質投与群でみられ、とくに4ナトリウム塩 (90%) およびエデト酸 (80%) で頻度が高く、カルシウム-2ナトリウム塩 (10%) で頻度が低かった。エデト酸2ナトリウム塩投与群で、3匹の母動物が投与期間中に死亡した。すべての実験群で軽度な摂餌量の減少が認められ、被験物質を投与したすべての群で母動物に、投与期間中、体重増加抑制が認められた。着床後の死亡で表した仔動物の死亡率は、すべての投与群において媒体投与無処置対照群と同等であった。どの被験物質でも、対照群と比べて、一腹産仔数および平均胎仔体重に影響はみられなかった。胎仔について外部、内部および骨格の異常を検査した。骨格奇形がみられたが偶発的なものであり、特定の化合物による処置に関して明確なパターンがあるとは思われなかった。著者は、この試験条件では母動物に毒性が見られる用量でも催奇形性はないと述べている。

さらに別の試験において、EDTAのカルシウムおよび亜鉛キレートならびにZnEDTAとCaEDTAの混合物について、妊娠Long Evanラットを用いて検討が行われている (Brownie et al., 1986)。1群20匹の母動物に、2、4、6および8 mmol/m²/日のCaEDTA、ならびにそれぞれ8および20 mmol/m²/日のZnEDTAもしくはZnEDTA/CaEDTA混合物を、妊娠11～15日に皮下投与した (1日の総量を2回に分けて投与)。各群に別の個体を用意して処置し、妊娠16および21日の母動物の血漿と肝臓における亜鉛分析、および妊娠16日の胎仔における亜鉛定量を行った。CaEDTA投与した全群で、母動物に毒性徴候 (下痢、摂水量および尿量の減少、食欲不振、嗜眠、摂餌量の減少、体重増加量の顕著な減少、個別の体重の減少および母動物の死亡) が認められ、用量の増加にともなってより顕著になった。このデータから、CaEDTAの母動物に対するLOAELは2 mmol/m²/日 (およそ90 mg/kg/日に相当) と推定された。また用量に関連した胎仔毒性 (平均胎仔体重および胎仔の頂殿長の顕著な減少) および出産前死亡 (吸収胚の顕著な増加および母体あたりの生存胎仔数の顕著な減少) の増加が認められた。CaEDTAの投与ではまた、用量に関連した異常胎仔数および悪影響を受けた出産例数の増加も認められた。認められた奇形は、口蓋裂、無指症-合指症、小顎症、曲尾、肋骨および脊椎の異常であった。これらのデータから、CaEDTAの胎児毒性/催奇形性につい

でのLOAELは4 mmol/m²/日（およそ180 mg/kg/日に相当）と推定された。体重の顕著な減少のような母動物への毒性と同時に発生毒性も認められていることから、この発生毒性がCaEDTAの直接的な作用によるものか、母動物に対する毒性を介した間接的な作用によるものかを明らかにするために、CaEDTAの最高用量であった8 mmol/m²/日までに対応した同量給餌（ペアフィーディング）試験を行った。同量給餌のため制限摂餌となった母動物（ペアフェド母動物）でも顕著な体重減少が認められたが、それらの母動物の仔動物における出生前死亡や奇形には不断給餌された対照群に比較して差は認められなかった。ZnEDTAの投与では最高用量の20 mmol/m²/日のみで母動物に毒性（摂餌量の減少、有意な体重減少）が認められた。8および20 mmol/m²/日投与では、胎仔に関する検討項目には対照群との差はなかった。ZnEDTAの投与では、いずれの用量でも催奇形性は認められなかった。CaEDTAを投与した母動物における亜鉛の分析では、一過性の用量に関連した尿中亜鉛排泄量の増加および、肝臓および血漿中亜鉛濃度の有意な減少が認められた。さらに、その母動物の胎仔では、胎仔あたりの総亜鉛量がCaEDTA用量の増加に連れて減少した。一方、ZnEDTAの投与では、母動物の血漿亜鉛濃度に明らかな増加が認められた。

その他の情報

EDTAの反復筋肉内投与でも催奇形性が認められている（Tuchmann-Duplessis and Mercier-Parot, 1956）。

*In vivo*スクリーニング試験による検討（Chernoff and Kavlock）がラット（Wickmaratne, 1987）およびマウス（Chernoff and Kavlock, 1983; Gray and Kavlock, 1984）について行われており、またラットの全胚培養による*in vitro*スクリーニング試験（Schmid et al., 1983; Schmid, 1985）も行われたが、EDTAは胎仔毒性/催奇形性を有する物質としては類別されず、別の系統の細胞を用いた短期*in vitro*スクリーニング試験では、一定した結果は得られなかった（Flint et al., 1984; Flint and Orton, 1984; Bournias-Vardiabasis et al., 1983; Mummery et al., 1984）。

4.1.2.9.2 ヒトにおける試験

鉛中毒の治療のために女性にCaNa₂EDTAを処置した2例があり、正常な子供を出産している（Angle and McIntire, 1964; Abendroth, 1971）。この治療は妊娠後期（それぞれ出産前4および12週）に行われているため、これらのデータはリスクアセスメントにはあまり意味を持たないと思われる。

4.1.2.9.3 生殖毒性の要旨

ラットを用いたCaNa₂EDTAの多世代試験のデータでは、生殖行動およびその結果に、250 mg/kg/日まで有害作用は認められなかった。

妥当性は低いが、ラットを用いたエデト酸二ナトリウムの試験では、完全な生殖障害が3,000 mg/kg/日の混餌投与で認められている。

EDTA、そのナトリウム塩、カルシウムキレートおよび亜鉛キレートの発生毒性について、ラットを用いて主として単一用量試験で検討されている。

いくつかの異なる投与経路（混餌、強制経口、皮下、筋肉内）で様々な妊娠期間に反復投与した場合、一つの例外（Schardein et al., 1981）はあるが、胚/胎仔の発生毒性および一定の外表奇形の誘発が認められている。外表奇形としては、口蓋裂、重度な脳の奇形、眼球欠損、小顎症-無顎症、合指症、内反足および尾の異常が認められた。これらの毒性は、ほとんどが母動物に毒性が発現する用量でのみ認められるものであった。

経口投与試験のデータでは、発生毒性は、被験物質を強制経口投与するより混餌投与により顕著であった。これらの試験では主として単一用量であったため、発生毒性および母動物に対する毒性についてのNOAELは明確にできなかった。

しかし、SwenertonとHurleyの研究（1971）は、Na₂EDTAを飼料に2および3%で混ぜて多用量で投与した（1日平均摂取量は1,000および1,500 mg /kg/日と計算される）唯一の試験であり、用量-反応関係を導くことができている。この試験では1,500 mg/kg/日に相当する用量において、死亡または吸収胚の割合の増加（40～54%）、死亡、吸収または奇形胎仔の着床部位の割合の増加（97～100%）、奇形をもった生存仔動物の増加（87～100%）、一腹当たりの平均仔動物数の減少、および平均胎仔体重の減少のような、明らかな発生障害が認められた。1,000 mg/kg/日に相当する混餌投与でも、程度は低い毒性が認められている（死亡、吸収または奇形胎仔の着床部位の割合の増加（11%）、奇形をもった生存仔動物の増加（7%）および平均胎仔体重の減少）。そのため、発生毒性に関する用量-反応曲線はかなりの急勾配であると我々は結論する。

混餌投与の両用量において母動物に対する毒性は催奇形性と同時に認められているが、その仔動物にみられた奇形という明確な結果は、被験物質によって惹起された例えば摂取量の減少、母動物の体重減少、下痢のような母動物への毒性からくる二次的なものではなく、被験物質特有の内因性亜鉛ホメオスタシスに対する障害によるものであると思われた。このことは以下の知見からも支持される：

- EDTAのカルシウムおよび亜鉛キレートを用いた試験でのCaEDTA投与群の摂餌量と同じ量に摂餌制限した試験 (Brownie et al., 1986) における母動物でも、母動物の体重の顕著な減少および胎仔体重の減少がみられたが、仔動物には奇形の有意な増加はみられなかった。同様に、母動物に毒性 (摂餌量の減少, 有意な体重減少) を惹起するような用量のZnEDTAでも、胎仔に毒性も奇形も認められていない。
- 亜鉛欠乏飼料の摂取で体重が顕著に減少したラットと同じ量に制限した正常飼料を与えた試験 (Hurley et al., 1971) における母動物でも、母動物の体重の有意な減少および胎仔体重の減少は認められたが、胎仔に奇形は認められていない。
- 一方SwenertonとHurleyの試験 (1971) では、飼料に十分量亜鉛を添加した場合、EDTA塩を摂取したすべての母動物が中等度から重度な下痢を示したものの、3%のNa₂EDTAによる (胎仔毒性および) 催奇形性が予防された。

さらに、妊娠ラットにエデト酸塩またはEDTAのカルシウムキレートを投与したときに惹起された奇形のパターンは、妊娠期間中の短期間または全期間亜鉛を含有しない飼料で飼育した場合に認められる奇形のパターンと類似することが繰り返し報告されている。

しかしながら母動物および仔動物における亜鉛欠乏とその影響の関係は、一件の試験で検討されているのみで、その試験では、EDTAのカルシウムまたは亜鉛キレートをいくつかの用量で皮下投与している (Brownieら, 1986)。4 mmol/m²/日のEDTAカルシウムの投与で生じた母動物の血漿亜鉛濃度の30~40%の減少は、毒性 (摂餌量および体重増加量の減少) の惹起に重要な意義があると思われた。同じ試験でみられた胎仔組織中の亜鉛濃度がおよそ12 µg/g、胎仔の亜鉛含量がおよそ4 µg/仔動物であったことは、母動物で毒性がみられたのと同じ用量で認められた仔動物での奇形の発現および発生障害に重要な意義があると思われた。しかし、母動物の平均血漿亜鉛濃度と仔動物あたりの亜鉛量の相関性については有意性は何ら示されていない。

EDTAのカルシウムキレートの作用に比べて高いと推定されるEDTA塩の投与中における内因性亜鉛の減少の程度については、今までに検討されていない。

亜鉛欠乏飼料自体が仔動物の発生および器官形成に影響を及ぼすことが示されている (Hurley and Swenerton, 1966; Hurley et al., 1971) ため、飼料中の亜鉛含量の低下ないしはEDTA処置による組織内亜鉛濃度の低下が、胚/胎仔の障害および奇形の誘発に特別な意義をもつと思われる。

十分な亜鉛を摂取することで、胎仔毒性や催奇形性は予防ないし軽減できる。EDTAの亜鉛キレートが特異的な催奇形性を有していないことは明らかである。

4.1.2.9.4 生殖毒性の結論

CaNa₂EDTAに関する動物試験データでは、250 mg/kg/日までの用量において生殖行動およびその結果に有害作用は認められなかった。

2%および3%のNa₂EDTAを含む飼料（およそ1,000および1,500 mg/kg/日）および正常な亜鉛含量（ZnCO₃が100 ppm）の飼料の摂取（モル濃度の比としてNa₂EDTA/ZnCO₃=74 および112）では、出生前毒性における用量-反応曲線の勾配は急なものであった。飼料に過剰な亜鉛を添加した場合（ZnCO₃として1,000 ppm）は、3% Na₂EDTA含有飼料の摂取（およそ1,500 mg/kg/日）でも出生前毒性は認められなかった（モル濃度の比としてNa₂EDTA/ZnCO₃=11.2）。このようにEDTAによる催奇形性は、母動物および胎仔における亜鉛ホメオスタシスの障害によるものであることが示された。しかし、一つの例外を除いてすべての経口投与による試験で、催奇形性を示す用量では常に下痢も認められ、亜鉛欠乏がさらに高まると思われる。したがって、この催奇形性が母動物の非特異的な体重減少が主因なのか、または亜鉛ホメオスタシスへの特異的な障害によるものかの議論の余地がある。胎仔毒性も同様に、母動物の体重減少に関連するものかも知れない。考慮すべき次の問題は、亜鉛欠乏とそれによる催奇形性の作用機序である。亜鉛欠乏による催奇形性には三つの機序が考えられる。すなわち、1) 腸上部における錯体形成による利用可能な亜鉛の減少、2) 尿中排泄の増加、および3) 下痢による亜鉛の腸管内腔への排泄の増加である。催奇形性が認められなかった一つの経口投与試験（単回強制経口投与）以外では、胎仔毒性および催奇形性が、およそ1,000 mg/kg/日以上で発現している。

したがって、次の理由から我々はNa₄EDTA/EDTAを生殖毒性物質に分類することを提案しない。奇形は比較的高い用量（例えば1,000 mg/kg/日以上）の経口投与でみられており、用量-反応曲線の傾きは急であると思われる。発生毒性および母動物に対する毒性の、経口投与におけるNOAELが確立されていない。

様々なEDTA化合物（セクション4.1.2参照）の発生への影響に関するデータベースを完全なものにするべく行われたBrownieらの試験（1986）では、亜鉛の錯体形成の影響を検討するのにCaEDTAを皮下投与している。このデータから、胎仔毒性/催奇形性に対するLOAELは4 mmol /m²/日（およそ180 mg/kg/日に相当）、NOAELは2 mmol /m²/日（およそ90 mg/kg/日に相当）と推定されている。しかし、この用量は母動物に対する毒性のLOAELでもある。皮下という投与経路は、通常の曝露を考える場合は不適切な投与経路であり、したがってEDTA/Na₄EDTAの発生毒性に関する分類を決定するためには不適當である。