

部分翻訳

European Union
Risk Assessment Report
tetrasodium
ethylenediaminetetraacetate
(Na₄EDTA)
CAS No: 64-02-8
1st Priority List, Volume 51, 2004

欧州連合
リスク評価書 (Volume 51, 2004)
EDTA 四ナトリウム

European Union
Risk Assessment Report

CAS No: 64-02-8 EINECS No: 200-573-9

tetrasodium
ethylenediaminetetraacetate
(Na₄EDTA)

[Na+].[Na+].[Na+].[Na+].CC(=O)N(CC(=O)N(CC(=O)N(CC(=O)N)CC(=O)O)CC(=O)O

1st Priority List
Volume: 51

EUROPEAN COMMISSION
Joint Research Centre
EUR 21315 EN

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2014年9月

本部分翻訳文書は、TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE (NA4EDTA) (CAS No: 64-02-8)に関する EU Risk Assessment Report 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/na4edtareport062.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)関係

はじめに：別の EDTA 化合物のデータから類推することの正当性

一般に、エデト酸(H_4EDTA)と EDTA 四ナトリウムは、類似した性質を有し、曝露パターンも類似している。しかし、急性毒性影響および局所的影響に関しては、両者は異なる挙動を示す。このため、この 2 つの物質については、各毒性試験で使用した被験物質を明示しながら、急性毒性、刺激性、腐食性および感作性といった有害影響を、個別に検討している。したがって、この健康への影響(影響評価)の項は、この 2 つの物質を区別し、個別の 2 つの報告により構成して記載する。

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。それは、これらの化合物が、生理的条件(pH 7~9)下で、エデト酸の pH 依存性の解離平衡にしたがって、ナトリウム陽イオンとそれぞれの組成のエデト酸($HEDTA^{3-}$)陰イオンに解離するためである(Becke-Göhring and Fluck, 1961)。すなわち、 H_4EDTA または Na_4EDTA に関する結論は、利用可能なすべてのデータベースを考慮して、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($CaNa_2EDTA$)に関する試験データは、トキシコキネティクスおよび生殖毒性の項目以外は、この報告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 $10^{10} M^{-1}$)を考慮すると、 $CaNa_2EDTA$ 溶液中の各種遊離 EDTA 陰イオン濃度は、質量作用の法則から、 $< 0.01\%$ と推定できる(セクション 3.1.3.3.1 参照)。このように、 $CaNa_2EDTA$ 錯体は、ほとんどすべてが溶液中で $CaEDTA^{2-}$ として存在しており、遊離 EDTA 陰イ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)を検出するには、その濃度はあまりにも低すぎると思われる。

$CaNa_2EDTA$ は、 Ca^{2+} より高い結合親和性をもつ他の金属(例えば鉛、鉄、亜鉛、銅)とキレー

トを形成する。たとえば、鉛は、 CaNa_2EDTA とキレート化して、カルシウム錯体より 10^7 倍も親和性が高い錯体を形成する。このようなキレート化する性質を利用して、 CaNa_2EDTA を静脈内投与することにより、重金属中毒の治療が行われる。一方、亜鉛は CaNa_2EDTA とキレート化して、カルシウム錯体より 10^4 倍も親和性が高い錯体を形成する。したがって、 CaNa_2EDTA を投与すると、亜鉛イオンとの錯体が形成され、これは、亜鉛のホメオスタシスを乱し、最終的には発生・発達毒性を引き起こす(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

動物試験

^{14}C -EDTA のカルシウム塩をラットに経口投与 (50 mg/kg) した場合、その消化管吸収はわずかであった (24 時間で 2~18%)。同じ量を非経口投与したときは、95~98% の放射活性が 6 時間以内に尿中に排泄され、排出半減期はおよそ 50 分であった。非常に少量、すなわち投与量の 0.1% 以下の放射活性が、呼気中に CO_2 として認められた (Foreman et al., 1953)。

ラットに CaNa_2 - ^{14}C -EDTA 塩 (300-500 mg/kg/日) を 10 回腹腔内投与した場合、投与した総放射活性の 66~92% が尿中に回収された。最終投与後 24 時間における両側の腎臓中の活性は、投与した総放射活性の 0.1% 以下であった (Doolan et al., 1967; Miller et al., 1986)。

CaNa_2EDTA 塩 (54 時間にわたる 280 mg/kg/6h の皮下投与) により、亜鉛、銅およびマンガン代謝に及ぼされる影響が、イヌで検討されている。この化合物の投与によって、亜鉛、銅およびマンガンの尿中排泄が著しく増加した (Ibim et al., 1992)。

吸入試験のデータは得られていない。

ヒトにおける試験

Foreman and Trujillo (1954) は、 ^{14}C -EDTA (CaNa_2EDTA ; 2 mg) のトキシコキネティクスを、健康な若年成人男子を対象にして検討している。この試験は、経口および非経口投与と皮膚への塗布で行われた。EDTA は、消化管からは、あまり吸収されなかった。経口投与後 24 時間では、投与量の最大 5% が尿中で検出され、糞便中には 3 日後まで検出された。全体として 93% が回収されている。 ^{14}C -EDTA のカルシウム塩 (2 mg、2 g の非標識 CaNa_2EDTA とともに) を静脈内投与した場合、24 時間以内に尿中に排泄され、その 50% は

EURAR 51 TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE

最初の 1 時間に、90%が 7 時間以内に排泄された。皮膚吸収試験では、被験物質(2 mg の ^{14}C -EDTA のカルシウム塩と 1 g の非標識 CaNa_2EDTA)を水溶性基剤で調製した。カルシウム塩に代えて、 ^{14}C -EDTA のナトリウム塩を用いた試験も行っている。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 のナトリウム塩を用いる特別な処置が必要だった。100 cm^2 の皮膚に塗布した場合の尿中での最大放射活性は、0.001%であった。

吸入試験のデータは得られていない。

トキシコキネティクス、代謝および分布の結論

EDTA そのものあるいはその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、または皮膚吸収に関する試験データは得られていない。エデト酸の解離平衡に基づけば、異なるナトリウム塩の経口投与では消化管内の pH 値に依存して様々な種類の EDTA 陰イオンが形成されるであろう。どのような EDTA 塩であっても、投与されると、*in vivo* では金属イオンと容易にキレートを形成する。EDTA のナトリウム塩またはその遊離酸の経口あるいは皮膚吸収は、低い吸収が示された CaNa_2EDTA と同程度であるとみなされる。

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。皮膚に適用した場合の吸収は、わずか 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 時間には 50%が、7 時間以内に 90%が排泄された。

4.1.2.2 急性毒性

動物試験

経口投与

EDTA 四ナトリウム塩を用いた試験で、以下のようなデータが報告されている。2 件の試験では、 LD_{50} が $>2,000$ mg/kg (BASF AG, 1970 で 2,700 mg/kg ; BASF AG, 1978b で 3,200 mg/kg) と報告されており、他の 3 件の試験では、 LD_{50} は 1,700 mg/kg (BASF AG, 1978a)、1,780~1,913 mg/kg (BASF AG, 1983)、 $>1,210\sim 2,150$ mg/kg (BASF AG, 1982a) であった。その中の 1 試験 (BASF AG, 1978a) では、臨床症状および剖検所見は他の試験と類似するものであったが、それ以外のデータは報告されていない。最も顕著な臨床症状は、呼吸困難、

運動失調、よろめき歩行、振戦および立毛であった(BASF AG, 1970; 1978a; 1978b; 1983)。剖検所見としては、腺胃部の発赤や出血性潰瘍、腸管粘膜の発赤および全般的な充血(BASF AG, 1978b; 1982a; 1983)または腸管の弛緩(BASF AG, 1970)であった。

吸入曝露

EDTA 四ナトリウム塩の試験で、以下のようなデータが報告されている。吸入ハザードテストに類似した試験系で、各群 12 匹ずつのラットを、20 または 80°C に加熱した粉塵に、8 時間曝露した。試験チャンバー内の濃度は測定されていない。粘膜の軽度な刺激症状が認められた。死亡例はみられず、剖検でも被験物質に関連した所見は認められなかった(BASF AG, 1970)。別の同じような試験で、12 匹のラットを 20°C で濃度未知の被験物質に 8 時間曝露した。この試験でも死亡例はなく、臨床症状や剖検所見も特に認められなかった(BASF AG, 1978a)。

皮膚曝露

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。

急性毒性の結論

ラットを用いた 3 件の急性経口毒性試験では、LD₅₀ は 1,700~1,913 mg/kg の範囲であった。別の 2 試験での LD₅₀ は、2,000 mg/kg を超えていた。これらのデータから、この物質の急性経口毒性は中等度と思われる。この物質は「Xn 有害」に分類され、「R 22 飲み下すと有害」と表示される。

吸入ハザードテストに類似した試験系で 2 件の試験が行われているが、死亡は認められなかった。急性吸入毒性のリスク評価のためには、これらのデータで十分であると考えられる。急性吸入毒性に関しては、分類も表示も必要とされない。

急性経皮毒性については、データは得られていない。経皮吸収が極めて低いこと(Foremann, 1954)を考慮すると、急性経皮毒性試験を行っても、急性経皮毒性に関する分

類と表示が必要となるような結果が得られることはないと推定される。

4.1.2.3 刺激性

動物試験

Trilon B Powder (EDTA 四ナトリウム塩、純度 88%) の 80% 水溶液を、ウサギの背部および耳の皮膚に塗布し、背部については 1 分、5 分、15 分および 20 時間、耳については 20 時間の曝露を行った。15 分以内の観察では刺激性は認められなかった。20 時間の曝露により、背部では 24 時間後に高度な紅斑および 8 日後に軽度の鱗屑が、耳では 24 時間後に軽度の発赤、8 日後に軽度の鱗屑が認められた。浮腫は認められなかった (BASF AG, 1970)。Trilon B Powder を用いた別の試験では、6 匹のウサギの皮膚に EDTA 四ナトリウム塩を塗布した (純度や試験条件の記載なし)。紅斑のスコアの最大平均値は、72 時間まで 1~1.5 であった。浮腫は認められなかった。曝露後 8 日には、擦過処置を施さないで塗布した部位では 2/6 匹に鱗屑がみられ、擦過処置を施して塗布した部位では、全動物で壊死が認められた (BASF AG, 1978a)。

OECD ガイドライン 404 に準拠した試験が実施されており、2 匹の雄と 1 匹の雌のウサギの皮膚に、Trilon B Powder (EDTA 四ナトリウム塩、純度不明) の 80% 水溶液 0.5g を塗布し、4 時間閉塞曝露した。紅斑のスコアの平均値は、24/48/72 時間後では 1/0/0.3 であり、発赤は 8 日後には消失した。浮腫は認められなかった (BASF AG, 1982b)。

EDTA 四ナトリウム塩 (純度不明) の 40% 水溶液をウサギの背部および耳に塗布した場合、20 時間の曝露で軽度な発赤が生じた。15 分以内の曝露では、影響は認められなかった (BASF AG, 1978b)。

やはり OECD ガイドライン 404 に準拠した試験が実施されており、3 匹のウサギの皮膚に、EDTA 四ナトリウム塩の 40% 水溶液 0.5 mL を 4 時間閉塞適用したが、皮膚反応は認められなかった (ASTA-Werke AG, 1984a)。

EDTA 四ナトリウム塩を用いた眼刺激性試験からは、以下のデータが得られている。88% 水溶液 50 mg を 1 匹のウサギの眼に滴下した場合、強い刺激症状、非常に重度の浮腫および軽度な混濁が、1 時間後に認められた。24 時間後には、強い刺激症状、非常に重度な浮腫および軽度な混濁に加えて、化膿が認められた。8 日後には、軽度な混濁が認められた (BASF AG, 1970)。別の試験で、この物質 50 mg を 1 匹のウサギの眼に滴下した場合、軽度な発赤、重度の浮腫および軽度な混濁が、1 時間後にみられた。24 時間後には軽度な発

EURAR 51 TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE

赤、軽度な浮腫および軽度な混濁が認められ、8日後には軽度な発赤と軽度な浮腫が認められた。全観察期間を通じて、油脂状の層が認められた(これ以上の詳細は不明; BASF AG, 1978a)。

40%水溶液を1匹のウサギの眼に滴下した場合、1時間後に、軽度の発赤、軽度の浮腫および分泌物がみられた。24時間および8日後にも、軽度な発赤は持続していた(BASF AG, 1978b)。40%水溶液の0.1 mLを3匹のウサギの眼に滴下した場合、24/48/72後のスコアは以下の通りであった。角膜で0.7/1/0.7、虹彩で1/1/1、発赤が2.7/2.3/2.7、結膜浮腫が2/2/3であった。72時間の観察を行った試験終了時には、全被験動物で、角膜混濁がグレード1、虹彩炎がグレード1、結膜発赤がグレード3、結膜浮腫がグレード2~3であった。これ以上の観察期間については報告されていない(ASTA-Werke, 1984b)。

ヒトにおける試験

データは得られていない。

刺激性の要約

この物質の80%水溶液をウサギの無処置の皮膚に適用した場合、刺激症状はあっても軽度であった。これらのデータは、EUの基準では、皮膚刺激性について、分類も表示も必要無いことを示している。ただし、80%水溶液を擦過処置を施した皮膚に適用した場合には、表層壊死および瘡蓋の形成が8日後に認められている。

眼刺激性試験のデータから、この物質を希釈せずに眼に滴下した場合には、重大な損傷が引き起こされることが推測される。したがって、無希釈 Na₄EDTA は、「Xi 刺激性」に分類され、「R41 眼に重度の損傷を及ぼすリスク有り」と表示される。

4.1.2.4 腐食性

動物試験

Na₄EDTA は、ウサギの健常な皮膚には腐食性を示さないが、擦過処置を施した皮膚には表層壊死および瘡蓋の形成を引き起こした(BASF, 1978a)(セクション4.1.2.3参照)。EUの現行の規則に基づくと、Na₄EDTA は、腐食性についての表示は不要である。

ヒトにおける試験

データは得られていない。

腐食性の結論

動物における皮膚および眼に対する刺激性試験のデータから、皮膚に対しては弱い影響、眼に対しては重篤な影響を引き起こすことが示された(セクション 4.1.2.3 参照)。この物質を腐食性物質に分類する必要はない。

4.1.2.5 感作性

皮膚感作性

動物試験

OECD テストガイドライン 406 に準拠して、 Na_2EDTA (Trilon BD ; 純度 99%) を用い、10 匹の投与群と 5 匹の対照群を設けて、Magnusson Kligman 試験が実施されている。被験物質濃度は、皮内感作誘導では 0.5%、塗布感作誘導では 30% であった。対照群の動物は、媒体であるコーン油で処置した。感作惹起には、コーン油を媒体とした 30% 溶液を用いた。パッチの除去後 24 時間に、3/10 匹(30%) のモルモットに斑点状の紅斑がみられたが、48 時間後には、陽性反応を示す動物はいなかった。対照群の動物では陰性であった。2 回目の感作惹起は、コーン油を媒体とした 30% 溶液を用い、7 日後に行われた。24 時間後には、試験群の 1/10 匹(10%) に斑点状の紅斑が認められたが、48 時間後には、陽性反応は認められなかった。対照群の動物には、皮膚反応は認められなかった(BASF AG; 2000a)。

Na_3EDTA を用いて累積刺激・感作試験が実施されているが、結果は陰性であった(陽性を示したモルモットは 0/10 匹)。モルモットに、ジプロピレングリコールメチルエーテルを媒体とした Na_3EDTA の溶液(10%) を 10 日以内の期間に 4 回塗布し、3 回目の塗布後にフロイント完全アジュバントを 0.2 mL 注射した。最終塗布の 14 日後に、ジプロピレングリコールメチルエーテルを媒体とした Na_3EDTA の溶液(10%) で感作惹起した。エチレンジアミンとの交差反応は観察していない(Henck et al., 1980)。この試験は、OECD が承認した試験法に準拠していない。

その他に、モルモットを用いた Draize 試験が 2 件報告されている(Yang and Chan, 1964;

Henck and Lockwoog, 1980)。両者とも陰性の結果であった。

ヒトにおける知見

ヒトに関して 2 件の報告が得られている。再発性下腿潰瘍の 78 歳の婦人が、 Na_4EDTA の 1%水溶液に対し、2 回陽性反応を示した(de Groot, 1986)。健常ボランティアと様々な皮膚病患者を含む、50 人のグループについて調査が行われている。すべての被験者に対して、EDTA をワセリンに 1%または 0.1%の濃度に混ぜて、パッチテストを行った。3 例が EDTA に反応した(EDTA の 0.1%または 1%水溶液に対して)。そのすべての例で、再試験でも陽性反応を確認した。1 例では眼窩周囲浮腫がみられ、眼瞼には小水泡の形成も認められた。この患者は、特に 0.1% Na_4EDTA を含む通常の点眼剤の使用後に、陽性反応を示した。別の 1 例の患者は全身に湿疹様皮膚炎を 4 年間発症していて、確認できない様々な外用剤で治療していた。3 例目の人はボランティアであったが、陽性反応を示した(Raymond and Gross, 1969)。

呼吸器に対する感作性

動物試験

6% Na_2EDTA (エアゾル)の 5 分間の吸入により、気道が過敏な Basenji-Greyhound 犬では気管支収縮が認められたが、雑種のイヌでは認められなかった。肺抵抗(RL)の増加が認められた(吸入前は $2.1 \pm 0.4 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}$ 、吸入後は $9.0 \pm 1.8 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}$)。6%の CaNa_2EDTA に曝露した場合は、肺抵抗に変化はなかった(Downes and Hirshman, 1983)。

別の試験(Lindeman et al., 1993)では、キレート化剤により誘発される気道狭窄のメカニズムを検討するため、麻酔した Basenji-Greyhound 犬を、4%の Na_2EDTA または 4%の CaNa_2EDTA に曝露した。側副路抵抗(collateral resistance)が、 Na_2EDTA への曝露による方が、 CaNa_2EDTA への曝露によるよりも、著しく上昇した(約 1.5 対 0.5 $\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}$)。気管支肺胞洗浄(BAL)後に回収された液量、総細胞数および細胞比率には、顕著な変化は見られなかった。しかし、BAL 液中のプロスタノイド(PGD_2)濃度は、 Na_2EDTA に曝露されたイヌでは、 CaNa_2EDTA に曝露されたイヌに比べ、7 倍に増加していた。 Na_2EDTA への曝露では、側副路抵抗の変化とプロスタノイド(PGD_2)濃度に強い関連性が認められたが、 CaNa_2EDTA への曝露ではそのような関連性は見られなかった。以上から、 Na_2EDTA のようなカルシウムキレート化剤は、気道が過敏なイヌにおいて、気管支収縮性プロスタノイドを刺激・放出させることによって、気道狭窄を誘発し得ると結論される。

ヒトにおける知見

企業(BASF, Dow, Akzo Nobel, CEFIC)の報告では、EDTA あるいは Na_4EDTA に曝露された労働者に、急性および慢性の呼吸器障害はみられていないことが示されている(BASF-Letter, 2001)。しかし、この情報は、気道に対する影響や曝露量の測定方法(持続時間、間隔)に関する詳細事項を示しておらず、妥当性を欠いている。

感作性に関する要約

OECD 406 に準拠した Na_2EDTA の Magnusson Kligman 試験において、1 回目の感作惹起で 3/10 匹(30%)、2 回目の感作惹起で 1/10 匹(10%)のモルモットが陽性反応を示した。ヒトについては 2 報があるのみである。この物質が工業製品や消費財に含まれて長い間大量に使用されてきたことを考慮すると、R43「皮膚接触により感作を引き起こすおそれ有り」と表示するには、この陽性反応の発現頻度は低過ぎる。また、気道が過敏なイヌでは気道狭窄を誘発しうるが、それに基づいて、R42「吸入により感作を引き起こすおそれ有り」と表示することも妥当ではない。

4.1.2.6 反復投与毒性

EDTA そのものあるいは四ナトリウム塩の反復投与毒性試験のデータは、得られていない。どのような塩の EDTA であっても、*in vivo* では金属イオンとキレートを形成する。生物学的メカニズムが類似していると想定して、 Na_2EDTA および Na_3EDTA について検討することとする。

ラットに 1 ヶ月間経口投与した際の NOAEL は、1,125 mg/kg/日 = 飼料中濃度 2.25%であった。これは Na_2EDTA の混餌投与試験から算出されたもので、飼料中の被験物質濃度は 1、2.25 および 5%であった(各群雌雄 15 匹ずつ、1 ヶ月間)。高用量群では、体重減少、死亡例、および総白血球数やリンパ球数の減少が、血中尿素窒素(BUN)の増加および血清カルシウム濃度の減少とともに認められた。この群の病理学的検査では、肝臓、脾臓および胸腺重量の減少がみられた。病理組織学的検査では、食道および前胃に不全角化も認められた(Kawamata, 1980)。

各群 10 匹の雄 Holtzman ラットに、 Na_2EDTA を 1、5 および 10%含む飼料を 90 日間与えた(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は、体重および摂餌量の顕著な減少がみられた。用量に依存した死亡例の増加も認められ、5%群で

EURAR 51 TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE

は 20%、10%群では 60%であった。これらの群の動物は、下痢を示し、消瘦もみられた。摂水量は増加した。高用量群では、ヘマトクリットとヘモグロビン量の断続的な減少、および肝臓の褪色が認められた。組織学的検査では、特に変化は認められなかった。この試験では、雄ラットに対する NOAEL は 500 mg/kg/日であり、これは飼料中濃度 1%に相当するものであった (Wynn, 1970)。なお、この試験における生化学的検査は不十分であったことに留意する必要がある。

ラットおよびマウス (各群雌雄 50 匹ずつ) に Na_3EDTA を 2 年間で与えた試験からは、NOAEL として 500 mg/kg/日 (飼料中濃度 7,500 ppm に相当) という値が得られている。この混餌投与試験は、2 用量群 (3,750 ppm および 7,500 ppm) で実施されたが、被験物質投与に関連した毒性は、どちらの動物種にも認められなかった。この報告書では、雌雄 5 匹ずつの動物に、4,640、6,800、10,000、14,700 および 21,600 ppm の Na_3EDTA を含む飼料を 7 週間与えた用量設定試験の結果も述べられており、雄では 10,000 ppm 以上の群、雌では 14,700 ppm 以上の群に軟便が認められている (NTIS; 1977)。

その他の情報

様々な EDTA 化合物の薬理学的作用について、主に錯体形成の側面に焦点を当てた、非常に多くの情報が得られている。それらの情報には、EDTA の神経毒性および腎毒性といった側面に焦点を当てたものも含まれるが、EDTA が腹腔内、皮下または静脈内経路で投与されているために重要なものではないと思われる。これらの投与経路は通常の曝露条件に即したのではないため、リスクの総合評価に際しては考慮に入れない (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、信頼性の高い毒性学的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 (Na_4EDTA の 565 mg/kg/日に相当) であった。90 日間投与試験は、雄動物のみで行われており、臨床生化学的検査は今日実施される全ての項目について行われているわけではなかったが、主に長期投与試験で得られる病理組織学的所見ならびに体重やいくつかの血液学的パラメータに関する情報を提示しており、この無毒性量に根拠を与えている。

高用量を用いた用量設定試験では、下痢、衰弱、体重減少、食道および前胃の不全角化、ならびに、ヘマトクリットとヘモグロビン量の減少が認められている。

4.1.2.7 変異原性

EDTA の遊離酸については、*in vitro* および *in vivo* での遺伝毒性試験データは僅かしか得られていないため、構造が類似する EDTA のナトリウム塩のデータ (Na_3EDTA の *in vitro* および Na_2EDTA の *in vivo*) も考慮した。

4.1.2.7.1 *In vitro* 遺伝毒性試験

細菌を用いた変異原性試験

Na_3EDTA について、細菌を用いた変異原性試験が行われている。

Na_3EDTA は、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 WP2uvrA を用いた変異原性試験において、ラット、マウスおよびハムスターの肝臓 S-9 mix の存在下および非存在下で、10,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ まで陰性であった (Dunkel et al., 1985; Zeiger et al., 1988)。S-9 mix の存在下および非存在下とも、3,333 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で細胞毒性が認められた。

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が代謝活性化系の非存在下のみで行われ、濃度が非常に高い 25 および 30 mmol/L の EDTA での 4 時間処理により、変異頻度が 2~6 倍に増加した。これらの濃度での相対的な生育率は、それぞれ 57% および 16% であった。並行して行われた試験で、培養液 (pH7.2) に EDTA を溶解して調製した後、pH を直接測定したところ、その値は 30 mmol/L では 5.8、20 mmol/L では 6.1 に低下していた。認められた変異原性が、pH の変化によるものなのか、被験物質が高濃度であったことによるものなのかは不明である (Wangenheim and Bolcsfoldi, 1988)。

マウスリンフォーマ細胞を用いたアルカリ溶出試験において、EDTA は、DNA の一本鎖切断を、40 mmol/L 以上の非常に高い濃度で誘発した。細胞毒性に関するデータは示されておらず、試験は、代謝活性化系が存在しない条件下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試験では、EDTA は、S-9 mix の存在下および非存在下において、30 mmol/L までの濃度で変化を誘発しなかった (Swenberg et al., 1976; Swenberg, 1981)。

EURAR 51 TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE

Na₃EDTA については、NTP(2003)は、*in vitro* 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において、陰性と報告している。これらの試験のデータの詳細は、現時点でも不明である。

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 ug/plate	10-10,000 ug/plate	negative	with and without S-9 mix at doses of 3,333 ug/plate and higher		Na ₃ EDTA	Dunkel et al. (1985)
Gene mutations, Salm. Typh. TA 97, TA 98, TA 100, TA1535	100-10,000 ug/plate	100-10,000 ug/plate	negative	with and without S-9 mix at doses of 6,666 ug/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-hour 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

げっ歯類の骨髄を用いる小核試験

マウス(系統：NMRI)を用いて、*in vivo* 小核試験が行われており、500、1,000 および 2,000 mg/kg の Na₂EDTA を反復経口投与(24 時間の間隔で 2 回)し、多染性赤血球を検査したが、

EURAR 51 TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE

その結果は陰性であった(BASF, 2000b)。この試験は、ガイドラインおよび GLP に従って、適切に行われたものである。2 回目の投与後 24 時間の時点で、試料採取を行った。臨床症状としては、2,000 mg/kg の 2 回目の投与後に、立毛のみが認められた。死亡例や細胞毒性 (PCE/NCE 比の変化) は認められなかった。予備試験で症状に性差がみられなかったため、雄のみ(各群 5 匹)を用いて試験が行われた。

別のマウス(系統: BALB/c)を用いて、*in vivo* 骨髄小核試験が適切に実施されており、Na₂EDTA は、陰性であった。この試験では、186 mg/kg の用量を単回腹腔内投与し、投与後 24 時間および 48 時間の時点で試料採取を行った(Russo and Levis, 1992)。この投与量は LD₅₀ 値に近いものであった。細胞毒性(PCE/NCE 比の変化)はみられず、症状や死亡については示されていない。雄のみが用いられている(24 時間群は 3 匹、48 時間群は 4 匹)。

Muralidhara and Narasimhamurthy (1991) は、マウス(系統: CFT)に 5.0~20 mg/kg の Na₂EDTA (Sigma Chemicals 製)を経口投与して小核試験を行い、陽性の結果を報告している。ただし、この試験は GLP に準拠していない。15 および 20 mg/kg の用量で、24 時間後に採取した試料においてのみ、小核を有する多染性赤血球の増加が、用量依存性に認められた。小核の最高頻度は、媒体対照群では 0.35%であったのに対し、1.43% (20 mg/kg)であった。臨床症状や死亡については記載されていない。PCE/NCE 比には、EDTA 投与による変化は見られなかった。雄のみ(各群 4 匹)が使用された。予備試験では、5.0、10 および 15 mg/kg の Na₂EDTA が 5 日間連続経口投与されたが、明らかな毒性所見は認められなかった。プロビット回帰法で算出した場合、使用した系統のマウスにおける急性経口 LD₅₀ は、30 mg/kg であった。

以上のように、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 and 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 mg/kg や 20 mg/kg のような低い用量の経口投与で得られた陽性反応は、妥当とは思われない。したがって、EDTA は、骨髄細胞において小核形成を誘発しないと結論づけられる。

骨髄細胞における異数性誘発および姉妹染色分体交換試験

Zordan et al. (1990) は、雄マウス(系統: BALB/c)の骨髄細胞における、Na₂EDTA による異数性誘発を検討している。93 および 186 mg/kg (最高用量では死亡例が生じた)の単回腹腔内投与が行われたが、異数性を有する骨髄細胞の増加は観察されなかった。並行して実施した骨髄における SCE 試験でも、結果は陰性であった。

EURAR 51 TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE

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

Test system	Doses	Expos. regime	Sampl. times	Result	Local cytotox.	General toxicity	Remarks	Test subst.	Reference
Micronucleus test	500-2,000 mg/kg	2 • 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 • 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 • 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 • 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 • 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

LD₅₀ 値に近い非常に高い用量である 186 mg/kg の Na₂EDTA をマウス(系統 : BALB/c)に腹腔内投与した場合、精子形成の後期の生殖細胞において、小核形成が誘発されたことが報告されている (Russo and Lewis, 1992)。小核の発現頻度は、精子細胞分化の最も早い二つの段階であるゴルジ期と頭帽期で解析した。試料採取時間は、投与後 24 時間および 48 時間であった。ゴルジ期の精子細胞で Na₂EDTA が誘発した小核が認められた (24 時間および 48 時間でそれぞれ 0.30%および 0.38%、対照群では 0.08%)。頭帽期の精子細胞では、結果は陰性であった。細胞毒性データは示されていない。Na₂EDTA は他の物質に比較して通常大きなサイズの小核を誘発するため、二次精母細胞において Na₂EDTA により形成される小核の原因としては、異数性が最も可能性が高いと論じられている。さらに、生殖細胞の分化の過程では染色体異常の検出に最も適した精原細胞の段階で、Na₂EDTA は、染色体異常を誘発しなかった。

Zordan et al.(1990)は、Na₂EDTA の異数性発現性を、マウス(系統 : BALB/c)の一次および二次精母細胞で検討した。93 および 186 mg/kg の単回腹腔内投与を行ったが、異数性を有する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 日後に行われた。高用量群では死亡もみられている。

EURAR 51 TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE

マウス(系統：BALB/c)の精原細胞を用いた *in vivo* 染色体異常試験では、186 mg/kg の Na₂EDTA を単回腹腔内投与したが、結果は陰性であった。試料採取時間は、投与後 24 時間であった(Russo and Levis, 1992)。

マウス(系統：CFT)に 10 mg/kg の Na₂EDTA を 5 日間連続経口投与した優性致死試験では、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 regime	Exposure period	Result	General toxicity	Test substance	Remarks	Reference
Micronucleus test in spermatids	186 mg/kg	1・i.p.	24, 48 hours	positive	no data	Na ₂ EDTA	positiv in spermatids of the Golgi phase	Russo and Levis (1992)
Aneuploidy in secondary and primary spermatocytes	93-186 mg/kg	1・i.p.	6 hours and 5 days	negative	no data	Na ₂ EDTA	higher doses resulted in lethality	Zordan et al. (1990)
Chromosomal aberrations in spermatogonia	186 mg/kg	1・i.p.	24 hours	negative	no data	Na ₂ EDTA		Russo and Levis (1992)
Dominant lethal test	10 mg/kg	drinking water	5 days	negative	no data	Na ₂ EDTA	dose on 5 consecutive days	Muralidhara and Narasimhamurthy (1991)

以上のように、生殖細胞を用いる試験において、Na₂EDTA は、精原細胞での染色体異常誘発、一次および二次精母細胞での異数性誘発、および優性致死の誘発に関し、いずれも陰性であった。精子細胞を用いた小核試験では結果が陽性であったが、精子形成過程の特定の段階(後期)で異数性変化が誘発された可能性が考えられた。精子形成の様々な段階により感受性が異なることを考慮すれば、Na₂EDTA が、生殖系細胞で異数性を誘発する可能性を完全には排除できない。しかし、この陽性反応は、LD₅₀ 値に近い、非常に高い用量でみられたものである。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 Na₂EDTA で行われている。

EURAR 51 TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE

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

Test system	Doses	Exposure period	Result	General toxicity	Test substance	Remarks	Reference
Drosophila; aneuploidy in germ line cells	700 ppm (oral feed)	unclear	positive	no data	EDTA	positive for chromosomal loss	Ramel and Magnusson (1979)
Drosophila; 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)
Drosophila; 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を用い、本化学物質による異数性誘発を検討した 2 件の試験で、陽性の結果が得られている。性染色体の不分離および欠失に関する試験では、EDTA(基質中濃度 700 ppm)は、染色体欠失について陽性であった(Ramel and Magnusson, 1979)。Zordan et al. (1990) は、Na₂EDTA の及ぼす遺伝的影響を検討するために、キイロショウジョウバエの雌の成虫に処置を施して、遺伝性異数性を調べる FIX 試験を行った。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、幼虫を 7.5 mmol/L および 25 mmol/L の Na₂EDTA で処理した場合は、結果は陰性であった(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。しかし、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。小核形成、異数性および姉妹染色分体交換を指標とした、マウスの体細胞(骨髄細胞)を用いた試験では、結果は陰性であった。生殖系細胞を用いる試験では、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陰性であった。精子細胞を用いる小核試験では陽性であった。この結果は、精子形成の特定の段階(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った。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、低い用量では発現しないと思われる。

以上のように、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。種々な試験における陰性という知見と、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。さらに、これらの影響は、必須成分の生物学的利用能低下により間接的に生じた可能性もある。

4.1.2.8 発がん性

4.1.2.8.1 動物試験

Na₄EDTA の発がん試験データは得られていない。しかし、Na₃EDTA の発がん性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」で述べた。雌雄 50 匹ずつの Fischer 344 ラットを用いた標準的な発がん性試験が行われており、3,750 および 7,500 ppm (およそ 248 および 495mg/kg/日に相当)を 103 週間混餌投与した。同様に、雌雄各 50 匹ずつの B6C3F1 マウスに、同じ用量(3,750 および 7,500 ppm、およそ 469 および 938 mg/kg/日に相当)を、103 週間混餌投与した試験も行われている。それぞれの試験とも、雌雄 20 匹ずつの対応する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、投与群の雌雄の平均体重は、試験期間中、それぞれの対照群と同等であった。マウスの試験では、高用量群の雄でのみ、試験期間のほとんどにわたり、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、試験期間中、投与群において、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。

ラットおよびマウスの雌雄とも、投与に関連した臨床症状は認められなかった。

ラットおよびマウスとも、生存率には、投与群と対照群の間、および雌雄の間で、有意差は認められなかった。

炎症性および退行性変化が、すべての群でほぼ同頻度に認められた。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。

以上のように、Na₃EDTA は、ラットでは 495 mg/kg/日まで、マウスでは 938 mg/kg/日までの用量では、発がん性はないことが示された。しかし、この被験物質の最大耐用量での試験は行われていない。

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は高頻度で腫瘍が認められ、造血系、呼吸器系、外皮および消化器系には低頻度で腫瘍が認められた。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。

いずれの腫瘍も、どの用量群および雌雄どちらにおいても、統計学的に有意な陽性傾向を示すものではなかった。内分泌系には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例数は少なく、別の試験では非処置群でもしばしば認められているものであった。したがって、それらの腫瘍は、投与とは無関係であると考えられる。

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。この間質細胞腫は、投与群および対照群の両方で高頻度で認められ、雄の Fischer 344 ラットで加齢に伴って一般に発現する病変を反映したものである (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に一貫性はなかったが、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 例認められた。3,750 ppm 群では、1 例に卵巣嚢腺腫が検出された (Table 4.11 参照)。

その他の組織・器官 (造血系、肝臓および肺) でも、雌雄両方で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場合もあった。

結論として、この試験ではいくつかの種類腫瘍が観察されたが、有意な発生率増加は認められず、ラットに対する発がん性を示す明確な証拠は得られなかった。

EURAR 51 TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE

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	3/20	4/50	4/50
Weeks to first observed tumor:	76	104	102
Adrenal: pheochromocytoma	2/20	5/49	4/50
Weeks to first observed tumor:	104	104	67
Thyroid: C-cell adenoma	0/17	6/35	3/38
Weeks to first observed tumor:	-	104	67
Pituitary: chromophobe adenoma	0/18	3/47	5/44
Weeks to first observed tumor:	-	88	104
Lung: alveolar/bronchiolar adenoma and carcinoma	1/18	2/50	3/49
Weeks to first observed tumor:	104	95	67
Liver: hepatocellular adenoma and neoplastic nodule	0/20	1/48	1/50
Weeks to first observed tumor:	-	104	104
Testis: interstitial-cell tumor	19/20	43/50	44/50
Weeks to first observed tumor:	88	85	95

Table 4.11 Incidence of primary tumors at specific sites in female rats fed Na₃EDTA in the diet

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

EURAR 51 TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE

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。いずれのタイプの腫瘍も、その発生率に、投与群と対照群との間で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、雌より雄でかなり高かった。肝腫瘍は、雄の 3,750 ppm 群(10/44 匹, 22%)および 7,500 ppm 群(10/47 匹, 21%)で認められたが、この頻度は、対照群(3/19 匹, 16%)とほとんど同じであった。

呼吸器系の原発性腫瘍が、投与群および対照群に認められた。7,500 ppm 群の雄で、肺腫瘍が最も高頻度に認められた(対照群で 2/18 匹, 11% ; 3,750 ppm 群で 8/44 匹, 18% ; 7,500 ppm 群で 12/45 匹, 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、おそらく投与に関連したものではないと思われる。

結論として、この試験ではいくつかのタイプの腫瘍が観察されたが、有意な発生率増加は認められず、マウスに対する発がん性を示す明確な証拠は得られなかった (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	3750 ppm	7500 ppm
Hematopoietic system: malignant lymphoma	2/20	7/46	7/48
Weeks to first observed tumor:	91	73	87
Lung: alveolar/bronchiolar adenoma and carcinoma	2/18	8/44	12/45
Weeks to first observed tumor:	105	99	96
Pituitary: chromophobe adenoma	1/13	0/19	1/26
Weeks to first observed tumor:	105	-	105
Liver: hepatocellular adenoma and carcinoma	3/19	10/44	10/47
Weeks to first observed tumor:	103	84	105
Thyroid: follicular-cell adenoma and carcinoma	0/10	1/29	1/33
Weeks to first observed tumor:	-	104	105

EURAR 51 TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE

Table 4.13 Incidence of primary tumors at specific sites in female mice fed EDTA Trisodium Salt in the diet

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

4.1.2.8.2 ヒトにおける知見

発がん性の評価に有用な疫学的データは、入手できていない。

In vitro 試験：細胞形質転換試験

Na₄EDTA に関するデータは入手できていない。しかし、その他の 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 の両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 et al. (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)

EURAR 51 TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE

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 発がん性の要約

EDTA の発がん性を評価することができる疫学的データは入手できていない。Na₃EDTA の発がん性試験が、Fischer 344 ラットおよび B6C3F1 マウスへの混餌投与により行われている。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。試験では、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。

上記のように、発がん性試験および細胞形質転換試験では結果が陰性であったこと、ならびに非常に高い用量でのみ低い突然変異誘発性が認められたことから、Na₄EDTA に発がん性の懸念はないと結論づけられる。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 動物試験

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。

各群雌雄 25 匹ずつの Wistar ラットに、CaNa₂EDTA を、およそ 50、125 および 250 mg/kg/日の用量で、2 年間混餌投与した試験が行われている。この試験では、連続 4 世代にわたる生殖および授乳に関する検討も実施されている (Oser et al., 1963)。いずれの用量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有害影響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 日以上生存した仔動物の割合(生存率)、および離乳に至った 4 日目生存仔の割合であった。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 回の交配に関する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は認められなかった。著者は、妊娠および授乳の繰り返しというストレスがかかる条件下でも、生殖および授乳能力に関する通常の指標のいずれにも、CaNa₂EDTA は有害作用を示さなかったと結論づけてている。

1952 年に行われた生殖試験について、記載内容は乏しいが、要約が入手されている。予備的なデータとして、飼料に Na₂EDTA を 0.5、1.0 および 5.0% の濃度に混ぜて 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)際の影響について、報告されている(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、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。これ以上の詳細は述べられていない。次世代に関するデータも得られていない。

別の試験から、さらに受胎能に関する情報が得られている(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ならびにこれらの器官の組織構造には、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 日間連続投与しても、着床後胚死亡は、第 2 週および第 3 週の交配期間以外は、8 週間にわたる交配期間で増加しなかった。第 2 週および第 3 週の交配期間では 2 倍に増加していたが、有意ではなかった。

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や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、異なる系統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。それらのほとんどは、単回投与試験である。ガイドラインに準拠した EDTA の発生毒性試験データは得られていない。

妊娠 7~14 日の雌 CD ラットに、様々な経路で投与を行って、EDTA の毒性および催奇形性が検討されている(Kimmel, 1977)。EDTA(ナトリウム塩として)を 3% 含む飼料を与え、平均用量 954 mg/kg/日で投与した場合、投与期間中に摂餌量の減少、重度の下痢および重度の体重減少が母動物に認められ、胎仔死亡の有意な増加(一腹あたりの胎仔吸収がおよそ 33%)、胎仔体重の有意な減少が認められ、さらに生存胎仔のおよそ 71% に外表、内部

および骨格奇形が認められた。1,250 または 1,500mg/kg/日(それぞれ 625 mg/kg または 750 mg/kg を 1 日 2 回)の EDTA(リン酸緩衝液に溶解)の強制経口投与では、母動物に著しい毒性(1,500 mg 群では 8 匹中 7 匹の死亡)が認められた。1,250 mg 群では、36%の母動物が死亡し、有意な体重増加抑制および下痢が認められた。さらに、生存胎仔における奇形発生率が有意に高かった(およそ 21%)。375 mg の EDTA(リン酸緩衝液に溶解)の皮下投与では、母動物に重度な疼痛症状(啼鳴およびショック)がみられ、投与期間中、母動物で 24%の死亡、有意な摂餌量減少および体重減少が認められた。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%の生存胎仔の奇形も報告されている。

別の試験(Swenerton and Hurley, 1971)では、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 Na_2EDTA を含む飼料を、妊娠中の様々な時期に与えた。各群 8~16 匹の雌ラットに、少なくとも交配前 5 日間は対照の飼料を与え、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で中等度から重度の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についての記載はなされていない。妊娠 0~21 日に 3% Na_2EDTA /100 ppm 亜鉛含有飼料を与えた動物では、生殖が完全に阻害された。一方、2% Na_2EDTA /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。妊娠 6~14 日および妊娠 6~21 日に 3% Na_2EDTA /100 ppm 亜鉛含有飼料を与えた群では、胎仔の死亡または吸収がそれぞれ 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)における所見と類似するものであった。これに対し、1,000 ppm の亜鉛を加えた 3% Na_2EDTA の飼料を妊娠 6~21 日に摂取させた母動物では、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、妊娠期間中の Na_2EDTA 摂取により奇形が誘発されるが、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からも支持されている(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、母動物の代謝への影響という胎仔発育に対する間接的な理由よりは、むしろ胎仔組織中での亜鉛欠乏という直接的な理由で生じたことを示している。

EURAR 51 TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE

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)。各群 20 匹の雌ラットに、1,000 mg /kg/日の EDTA を、妊娠 7～14 日に強制経口投与した。同様に、同じモル量のエデト酸二ナトリウム塩、三ナトリウム塩、カルシウム-二ナトリウム塩および四ナトリウム塩(リン酸緩衝液に溶解または懸濁、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、下痢および自発運動の減少が、被験物質投与に関連した顕著な影響として認められた。下痢はすべての被験物質投与群でみられ、とくに四ナトリウム塩(90%)およびエデト酸(80%)で発生率が高く、カルシウム-二ナトリウム塩(10%)で発生率が最も低かった。エデト酸二ナトリウム塩投与群では、3 匹の母動物が投与期間中に死亡した。被験物質投与群の全群で軽度な摂餌量の減少が認められ、いずれの被験物質の場合でも、投与期間中には母動物に体重増加抑制が認められた。着床後の死亡を指標とした仔動物の死亡率は、すべての被験物質投与群において、媒体投与対照群および無処置対照群と同等であった。いずれの被験物質でも、両対照群と比べて、一腹あたりの胎仔数および平均胎仔体重に影響はみられなかった。胎仔の外表、内臓および骨格の異常も検査された。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、催奇形性は証明されなかったと述べている。

さらに別の試験において、EDTA のカルシウムキレート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)。各群 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)。各群に追加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、ならびに妊娠 16 日の胎仔における亜鉛の定量を行った。CaEDTA を投与した全群の母動物に、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、体重減少および母動物の死亡)が認められ、それらの徴候は、用量の増加にともなってより顕著に現れた。このデータから、CaEDTA の母体毒性に関する LOAEL は、2 mmol/m²/日(およそ 90 mg/kg/日に相当)と推定された。また、胎仔毒性(平均胎仔体重および胎仔の頂殿長の有意な減少)の発現、および出産前死亡(吸収胚の有意な増加および母体あたりの生存胎仔数の有意な減少)の増加が、用量に関連して認められた。CaEDTA の投与ではまた、用量に関連した異常胎仔数および異常胎仔をもった母動物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 の胎仔毒性/催奇形性に関する LOAEL は、4 mmol/m²/日(およそ 180 mg/kg/日に相当)と推定された。これらの発生毒性は体重の顕著な減少のような母

動物への毒性と同時に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給餌となった母動物(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、通常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。胎仔に関する検査項目には、8 および 20 mmol/m²/日投与とも、対照群との差異は認められなかった。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、用量に関連した一過性の尿中亜鉛排泄量の増加および、肝臓ならびに血漿中亜鉛濃度の有意な減少が認められた。さらに、それら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ていた。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 の筋肉内反復投与でも、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(Chernoff and Kavlock)がラット(Wickmaratne, 1987)およびマウス(Chernoff and Kavlock, 1983; Gray and Kavlock, 1984)で行われており、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貫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 ヒトにおける知見

鉛中毒の治療のために女性に CaNa₂EDTA を処置した 2 件の報告が得られているが、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、リスクの総合評価においては、あまり意味を持たないと考えられる。

4.1.2.9.3 生殖毒性の要旨

ラットを用いた CaNa_2EDTA の多世代試験のデータでは、250 mg/kg/日の用量まで、生殖行動および生殖の結果に有害影響は認められなかった。

信頼性は低いが、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が、ラットを用いた試験で、主として単一用量で検討されている。

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、1件の例外(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、小顎症または無顎症、合指症、内反足および尾の異常が認められた。これらの影響は、ほとんどが、母動物に毒性が発現する用量で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、被験物質の強制経口投与よりも混餌投与でより顕著に現れた。これらの試験では主として単一の用量であったため、発生毒性および母体毒性に関する NOAEL を、確立することはできなかった。

しかし、Swenerton and Hurley の試験(1971)は、 Na_2EDTA を飼料に2および3%で混ぜて投与(1日平均摂取量は Na_2EDTA として1,000および1,500 mg/kg/日)している。すなわち、2用量が設定された唯一の試験であり、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、胎仔の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が着床した部位の割合の増加(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が着床した部位の割合の増加(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結論づけられる。

混餌投与の両用量において催奇形性と同時に母体毒性が認められているが、その仔動物にみられた奇形という具体的な結果は、被験物質によって母動物に誘発された摂餌量の減少、母動物の体重減少、下痢のような母動物に対する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。

EURAR 51 TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE

- EDTA のカルシウムキレートおよび亜鉛キレートを用いた試験で、CaEDTA 投与群の摂餌量と同じ量に摂餌制限した母動物でも (Brownie et al., 1986)、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) を誘発するような用量の ZnEDTA を与えても、胎仔に毒性も奇形も認められなかった。
- 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母動物の飼料を制限した試験でも (Hurley et al., 1971)、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、仔動物に奇形は認められなかった。
- 一方、Swenerton and Hurley の試験 (1971) では、飼料に十分量の亜鉛を添加した場合、EDTA 添加飼料を摂取したすべての母動物で中等度から重度の下痢が認められたものの、3%Na₂EDTA による (胎仔毒性および) 催奇形性の発現が阻止された。

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誘発される奇形のパターンは、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、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を検討した報告が 1 件あり、その試験では、いくつかの用量の EDTA のカルシウムキレートまたは亜鉛キレートを皮下投与している (Brownie et al., 1986)。4 mmol/m²/日の EDTA カルシウムの投与で母動物の血漿亜鉛濃度が 30~40%減少し、それが毒性 (摂餌量および体重増加量の減少) の発現に重要な意義があると思われた。同じ試験では、胎仔組織中の亜鉛濃度がおよそ 12 µg/g、胎仔 1 匹あたりの亜鉛含量がおよそ 4 µg であり、それらの値が母体毒性用量で認められた仔動物の奇形および発生障害の誘発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含量との相関性については有意性は何ら示されていない。

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、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が、今までのところ検討されていない。

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、255 mg/kg/日までの用量において、生殖行動や生殖成績に有害作用は認められなかった。

2%および3%の Na₂EDTA を含み(およそ 1,000 および 1,500 mg/kg/日)、亜鉛が通常量含まれる(ZnCO₃が 100 ppm)の飼料の摂取では(モル比として Na₂EDTA/ZnCO₃=74 および 112)、出生前生殖毒性の用量-反応曲線の勾配は急なものであった。3%Na₂EDTA 含有飼料の摂取(およそ 1,500 mg/kg/日)でも、飼料に過剰な亜鉛が添加されていた場合(ZnCO₃として 1,000 ppm)には出生前毒性は認められなかった(モル比として 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、1 例を除いたすべての経口投与による試験では、催奇形性を示す用量では常に下痢も認められ、これにより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な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している可能性もある。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) 上部消化管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) 下痢に伴う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 1 件の経口投与試験(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、その用量-反応曲線の傾きは急であると思われる。発生毒性および母体毒性に関して、経口投与での 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 et al.の試験(1986)では、亜鉛の錯体形成の影響を検討するために CaEDTA を皮下投与している。このデータから、胎仔毒性/催奇形性に関する 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)と導出されている。しかし、この用量は同時に、母体毒性に関する 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当と考えられる。