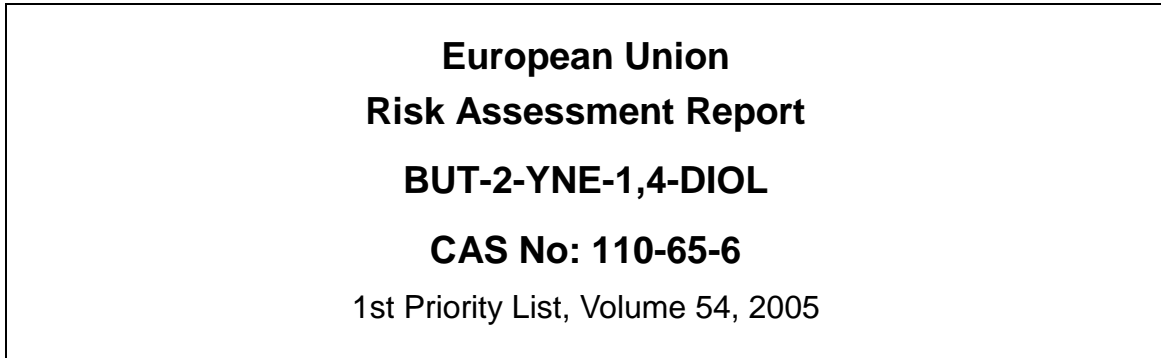


部分翻訳



欧州連合
リスク評価書 (Volume 54, 2005)
ブタ-2-イン-1,4-ジオール [ブチンジオール]

European Chemicals Bureau
Institute for Health and Consumer Protection
European Chemicals Bureau
Existing Substances
CAS No: 110-65-6
EINECS No: 203-788-6
but-2-yne-1,4-diol
OCC#CCO
1st Priority List
Volume: 54
EUROPEAN COMMISSION
Joint Research Centre
EUR 21516 EN

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2013年12月

本部分訳文書は、BUT-2-YNE-1,4-DIOL (CAS No: 110-65-6)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/but2yne14diolreport026.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

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

ブタ-2-イン-1,4-ジオール(ブチンジオール)は、高電子密度の三重結合を有するため、求電子反応を起こしやすい。水溶液(20 g/L)の pH が 4 と比較的低いことから、ヒドロキシ基の水素原子が酸性を帯びていることが示される。

物理化学的データ[20°C における蒸気圧が約 0.17 Pa、水溶性が約 750 g/L、分配係数(log Pow)が-0.73、分子量が 86 g/mol]からは、ブチンジオールが、経口または経皮で、もしくは気道を介して吸収される可能性が示唆されるが、吸収の程度に関する定量的なデータは得られていない。

毒物動態学的な挙動や代謝を具体的に検討したデータは得られていないが、ブチンジオールは、代謝の第一段階で酵素的に活性化され、対応する反応性アルデヒドになることが予想される。この反応性アルデヒドは、生物学的意義のある求核性化合物との反応性を有する。ブチンジオールには、還元型グルタチオンの存在下と非存在下の両方で、酵素活性を阻害する性質があることが、ウマおよびニジマスの肝サイトゾルから精製されたアルコール脱水素酵素(ADH)調製物を用いて確認されている(Bradbury and Christensen, 1991)。また、代謝活性化に ADH が関与していることが、ラットの肝抽出物を用いた阻害試験によって示されている。ADH 阻害剤のピラゾールは、ブチンジオールの酸化を競合的に阻害した(Taberner and Pearce, 1974)。アミノピリン脱メチル化酵素活性の軽度の上昇が検出されたことから、シトクロム P450 依存性に代謝される可能性を除外できない(Komsta et al., 1989)。

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 動物における試験

経口

得られた試験データに基づくと、ブチンジオールは、経口投与により急性毒性を示すと判断される。経口 LD₅₀ 値は、雄ラットで 132 mg/kg 体重、雌ラットで 176 mg/kg 体重と報告されている (Jedrychowski et al., 1992a)。50 mg/kg 体重を経口投与された 2 匹のネコが死亡し、100 mg/kg 体重を経口投与されたウサギは 24 時間以内に死亡した (BASF, 1959)。純粋なブチンジオールを用いて調製した水溶液でも同様の影響が引き起こされるが (Jedrychowski et al., 1992a)、不純物としてヘキサメチレンテトラミンやホルムアルデヒドが含まれている工業等級のブチンジオールを用いて調製された溶液は、純粋なブチンジオールを用いて調製された溶液よりも、強い毒性を示す (BASF, 1959)。

ブチンジオールの毒性により引き起こされる主要な臨床徴候は、活力低下、平衡障害、痙攣、振戦および下痢であり、剖検で認められる顕著な影響は、内部臓器の鬱血、肺の水腫および出血、ならびに肝臓の脂肪浸潤である。

吸入

近年、ラットを用いた急性吸入毒性試験が実施されている。ブチンジオール(水溶液の液体エアロゾル、空気動学的質量中央値(MMAD) 0.5~1.0 μm)への 4 時間単回曝露が、頭部-鼻部吸入システムを用いて実施された。0.69 mg/L の濃度での曝露では、雄ラットは 1 匹も死亡しなかったが、雌ラットは 5 匹中 4 匹が死亡した。1.03 mg/L の濃度では、全例が死亡した。雄ラットおよび雌ラットの LC₅₀ は、約 0.69 mg/L と推定された。剖検で認められた主な影響は、肺における変色(赤色)、肝臓における変色(淡褐色)、腺胃のびらん・潰瘍、ないしは全身性の鬱血であった。曝露後 1 日まで、全ての群で、不規則呼吸や呼吸促進が認められた (BASF 1996a)。

ブチンジオールを加熱(70°C)して毎時 200 L のエアロゾルを産生させ、「時間-飽和度試験 (time-saturation test)」が実施されている。吸入有害性試験における曝露の影響は、曝露空気が調製される際の温度と曝露時間に依存して現れる。このため、ブチンジオールを加え飽和させた 20°C の空気に 8 時間曝露させた場合、供試された 12 匹のラット全例が生存したが、一方、70°C で調製した空気に曝露させた場合には、2 時間の曝露には耐容したものの、8 時間の曝露は供試された 6 匹のラットにとって致死的であり、全例が曝露後 4.5~24 時間で死亡した。試験濃度に関するデータは報告されていない。臨床徴候として、35 分後に

呼吸数増加が認められ、3 時間後に活力低下が認められた。剖検では、肉眼的な変化は認められなかった(BASF, 1959)。

経皮

急性経皮毒性試験がいくつか実施されており、ブチンジオールが、固体(ラット 11 匹を使用)または 40%水溶液(ラット 16 匹を使用)のいずれかの状態で、5,000 mg/kg 体重の用量で、24 時間適用された。固体の状態で皮膚に適用した場合には、死亡例は生じなかった。一方、同じ用量を 40%水溶液の状態で適用した場合には、16 匹中 8 匹のラットが 48 時間以内に死亡した。剖検では、肝臓と腎臓に変化がみられ、重度の充血と様々な段階の変性(壊死を含む)が認められた(Jedrychowski et al., 1992a)。

現行の EU ガイドラインに従って実施された 2 件の試験において、ラットへの皮膚適用が行われ、その結果、ブチンジオールの有害性が判明し、経皮 LD₅₀ 値は 659~1,240 mg/kg 体重であることが示された。そのうち、雌ラットを用いた経皮試験では、各群 5 匹ずつの雌ラットに対し、1,250、1,600 および 2,000 mg/kg 体重の用量が適用された(24 時間閉塞、溶媒は生理食塩液)。その結果、1,250 mg/kg 群および 1,600 mg/kg 群で、それぞれ 5 匹中 3 匹が死亡し、1,240 mg/kg 体重という経皮 LD₅₀ が得られた。呼吸障害、運動障害、眼瞼下垂、および、鼻部ならびに眼瞼の血性痂皮が認められた。剖検において、死亡例では腸内に血液が認められ、肝臓と脾臓の変色が認められたが、生残例では肉眼的変化は認められなかった(Hoechst AG, 1988)。もう一方の試験では、各群 5 匹ずつの雄ラットに対して 50、100、および 200 mg/kg の用量が、各群 5 匹ずつの雌ラットに対して 1,250 および 1,600 mg/kg の用量が、また、各群雌雄 5 匹ずつのラットに対して 400 および 2,000 mg/kg の用量が、それぞれ皮膚適用された(24 時間閉塞、溶媒は生理食塩液)。適用後の各群の死亡数は、50 mg/kg 群が雄 5 匹中 0 匹、100 mg/kg 群が雄 5 匹中 1 匹、200 mg/kg 群が雄 5 匹中 2 匹、400 mg/kg 群が雄 5 匹中 2 匹および雌 5 匹中 0 匹、1,250 mg/kg 群が雌 5 匹中 3 匹、1,600 mg/kg 群も雌 5 匹中 3 匹、2000 mg/kg 群が雄 5 匹中 4 匹および雌 5 匹中 5 匹であった。呼吸障害、運動障害、円背姿勢、眼瞼下垂、および、鼻部ならびに眼瞼の血性痂皮が認められた。剖検において、死亡例では胃内と腸内に血液が認められ、肺、肝臓および脾臓の変色が認められたが、生残例では肉眼的変化は認められなかった。この試験の結果から、雄ラットの経皮 LD₅₀ としては 424 mg/kg 体重という数値が、雌ラットの経皮 LD₅₀ としては 983 mg/kg 体重という数値が得られた(Hoechst AG, 1990)。

4.1.2.2.2 ヒトにおける試験

データは得られていない。

4.1.2.2.3 結論

ブチンジオールは、経口投与や吸入により毒性を示し(ラットの経口 LD₅₀ 値は 132~176 mg/kg 体重、ラットの吸入 LC₅₀ 値は 0.69 mg/L/4 時間)、水溶液の経皮吸収により有害性を示した(ラットの経皮 LD₅₀ 値は 659~1,240 mg/kg 体重)。主要な標的臓器は肝臓と腎臓であり、壊死を含む様々な段階の変性が認められた。吸入および経口投与による急性毒性データに基づくと、有毒物質への分類、ならびに R23/25(吸入または飲み込むと有毒)の表記が妥当である。経皮曝露のデータに照らすと、ブチンジオールには、R21(皮膚と接触すると有害)と表示されるべきである。

4.1.2.3 刺激性/腐食性

4.1.2.3.1 動物における試験

様々な希釈度の様々なブチンジオール調製物を用い、ウサギを対象として、数多くの皮膚刺激試験や眼刺激試験が実施されているが、相違する結果が得られている。これは、通常、試験ではブチンジオールの純物質やその水溶液ではなく、アミンやホルムアルデヒドを含有する混合物が用いられていることに起因する。

純粋なブチンジオールの皮膚刺激性と腐食性を検討した試験が 2 件存在し、いずれも十分な記載を伴っている。これらの試験では、純度が 99%を超えるブチンジオールの固体または水で湿らせた固体が用いられた。このうちの一方の試験は、OECD ガイドライン 404 に準拠して実施され、純粋なブチンジオールの固体 0.5 g を 6 匹のウサギに適用した。4 時間の曝露が実施され、その後 24 時間以内に全例で重度の紅斑および浮腫が認められ、また、6 日以内に壊死が生じた。3 分間曝露の場合には、壊死は生じなかった(Hüls AG 1985a)。もう一方の試験では、水で湿らせた固体 0.3 g の適用、および 40%水溶液または 20%水溶液の閉塞適用による 24 時間曝露が行われ、ウサギの非擦過処置皮膚では刺激症状は現れず、擦過処置皮膚では軽微な発赤が認められた(Jedrychowski et al., 1992a)。

眼刺激性については、適切に実施された 3 件の試験の情報が得られている。OECD ガイドライン 405 に準拠した 1 件目の試験では、100 mg の用量でブチンジオールがウサギに適用

され、6匹中6匹に、虹彩、角膜、結膜に中等度の刺激症状が引き起こされ、6匹中1匹に、不可逆的な角膜混濁が生じた(Hüls AG 1985b)。ウサギ4匹と100 mgのブチンジオールを用いて行われた Draize 試験では、結膜紅斑は軽微であったが、著しい流涙が認められた(Jedrychowski et al., 1992a)。OECD ガイドライン 405 に準拠したもう1件の試験では、ウサギ3匹と容積0.1 mL(47 mg)の業務用ブチンジオールが用いられ、同様の影響(ウサギ3匹中1匹に、3日以内に回復したグレード1の角膜混濁と、2日以内に回復した中等度の結膜刺激症状)が認められた(BASF AG, 1986)。

4.1.2.3.2 ヒトにおける試験

データは得られていない。

4.1.2.3.3 結論

純粋な無希釈のブチンジオールは、接触により皮膚を腐食させることが判明した。ブチンジオールの20%溶液や40%溶液の場合は、ウサギの皮膚に対して刺激性の影響は示されなかった。ブチンジオールは、眼と接触すると、不可逆性の角膜混濁を生じさせ得る。EU ガイドラインに照らして、ブチンジオールは C(腐食性)および R34(熱傷を引き起こす)に分類される。

4.1.2.4 感作性

4.1.2.4.1 動物における試験

ブチンジオールの皮膚感作作用については、モルモットを用いた3件の試験の情報が得られている。

1件目の Magnusson Kligman 試験(OECD ガイドライン 406 に準拠)では、皮内感作誘導には生理食塩水を媒体とした5%ブチンジオール溶液、局所感作誘導には25%溶液(10%ラウリル硫酸ナトリウムで前処置)、感作惹起には25%溶液が使用された。被験動物18匹中1匹で、感作惹起の24時間後に陽性反応が認められた。対照群では皮膚反応は認められなかった(RCC, 1990)。

2件目の Magnusson Kligman 試験では、25%という感作率が報告されている。この試験では、

被験動物に対し、パラフィン油を媒体とした 0.5%溶液で皮内感作誘導を行い、25%溶液で局所感作誘導を行った後、25%水溶液で皮膚感作惹起が実施された。被験動物 20 匹中 5 匹で、感作惹起の 24 時間後および 48 時間後に陽性反応が認められた。対照群では皮膚反応は認められなかった(Hüls AG, 1985c)。

3 件目の Magnusson Kligman 試験では、被験物質処置群として 22 匹、対照群として 8 匹が用いられ、2%ブチンジオール溶液で皮内感作誘導、20%溶液で局所感作誘導、5%溶液および 20%溶液で感作惹起が行われたが、皮膚感作作用はまったく認められなかった(Jedrychowski et al., 1992a)。

ブチンジオールが動物において呼吸器感作を引き起こす可能性については、情報が得られていない。

4.1.2.4.2 ヒトにおける試験

ヒトについては、ブチンジオールが原因の接触アレルギーの事例が 2 件報告されている。41 歳の女性清掃員の事例では、新しい洗剤を数ヵ月間使用した後、顔面、両手および両前腕に、皮膚炎が生じた。皮膚炎は、この洗剤に触れてから約 12 時間後に現れ、使用していないときは治まっていた。この洗剤の成分についてパッチテストを行ったところ、ブチンジオールに対する強い反応が示された。ブチンジオールは、この洗剤中に、腐食防止剤として、低濃度(0.7%)で含まれていた。ブチンジオールの 1%水溶液を使って対照者 55 名にパッチテストを実施したところ、結果は陰性であった(Baadsgaard and Jorgensen, 1985)。

電気めっき部門の貯蔵室での作業に長年従事していた、54 歳の男性作業員の事例が報告されている。この男性は、単純溶媒、界面活性剤、塗料、合成樹脂など、非常に多くの原料と接触する状況にあった。この男性は、ニッケル浴で使用するジアミノジフェニルホルンやブチンジオールの添加剤も扱っていた。この男性は、手と両前腕に痒みを伴う皮膚炎を発症し、皮膚炎は、ゴム手袋を着用しても治らなかった。男性は、様々な物質や化学薬品のパッチテストを受けた。その結果、48 時間の時点で++の陽性反応を示したのは、ブチンジオールの 2%水溶液のみであった(Malten, 1980)。

アレルギー性接触性湿疹の疑いがあり、おそらく偶発的にブチンジオールに曝露されたとされる労働者 10 名の事例が報告されている。これらの人々は、感作性を調べるパッチテストを自由意思で受ける様打診され、このうち 6 名が、この試験を受けることを申し出た。純粋なブチンジオールおよび工業用ブチンジオールが、いずれも 0.5%水溶液として使

用された。また、合成の前駆物質であり、工業用ブチンジオール中の不純物の 1 つでもあるホルムアルデヒドについても、テストが行われた。2001 年に 4 名について行われた試験では、ホルムアルデヒドに対する陽性反応は認められなかったが、ブチンジオールへの感作の明瞭な証拠が、全員に認められた。1990 年および 1994 年に試験を受けた残りの 2 名も、パッチテストの反応は陽性であった(BASF AG, 2001)。

ニッケルめっき関連業務に携わっていた 20 歳の患者の事例が報告されている。左手の甲に痒みを伴う皮膚炎を発症し、上腕にまで拡大していた。ブチンジオール(1%水溶液)を用いたパッチテストによって、この物質が原因物質であることが確認された。ブチンジオールは通常、パッチテストの対象とされていないため、職業性接触性皮膚炎の原因アレルゲンとして、どのくらいの頻度で見落とされているかは不明である。著者らは、曝露を受ける労働者のパッチテストに、ブチンジオールを含めることを推奨している(Blaschke et al., 2001)。

ブチンジオールの呼吸器感作性については、情報が得られていない。

4.1.2.4.3 結論

3 件の Magnusson Kligman 試験の情報が得られており、反応陽性率はそれぞれ、0%、5%、25%であった。これら 3 件の試験のうち、5%の陽性反応率(18 匹中 1 匹が陽性)が認められた 1 件だけが、OECD 試験ガイドライン 406 に準拠して実施されていた。残りの 2 件の試験(陽性反応率は 0%と 25%)は、試験濃度およびラウリル硫酸ナトリウムでの前処理に関して、OECD 試験ガイドライン 406 の試験基準を満たしていない。端的に述べると、この 3 件の動物試験の結果から、ブチンジオールには弱い感作性があると結論付けられる。

ヒトの事例では、職場での接触アレルギーの発生が報告されており、それらに基づき、ブチンジオールは、「感作性あり」に分類され、R43「皮膚接触により感作の恐れあり」と表示されるべきと判断される。

4.1.2.5 反復投与毒性

4.1.2.5.1 経口曝露

Jedrychowski et al.(1992b)の反復投与毒性試験が、適切に実施された試験とみなされた。この試験では、各群雌雄 8 匹ずつの Wistar Imp:DAK ラットに、ブチンジオールを約 99%含

む被験物質を、1、10、および50 mg/kg 体重/日の用量で、28日間強制経口投与した。試験パラメータは、臨床徴候、血液学的検査、生化学的検査(血清ビリルビンを除く)、体重、および臓器重量(副腎、腎臓、肝臓、脾臓および精巣)であった。副腎、心臓、小腸、大腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、脾臓、胃、および精巣については、組織病理学的検査が行われた。

試験期間中に、高用量群において、雄3匹と雌3匹が死亡した。死亡が確認されたのは、雄では26日目、27日目および28日目、雌では7日目、7日目および26日目であった。高用量群の雄では、対照群と比較して、体重増加量が有意に少なく、摂餌量もわずかに少なかった。

血液学的検査では、高用量群の雌ラットにおいて、有意な減少が、赤血球数(-21%)、ヘマトクリット値(-11%)、ヘモグロビン濃度(-11%)に関して認められた。中用量群の雌でも、赤血球数の有意な減少(-11%)が認められた。高用量群では、雌雄ともに、網状赤血球数(雄:+148%、雌:+100%)と白血球数(雄:+50%、雌:+72%)の有意な増加が認められた。白血球数の増加は、好中球数(雄:+68%、雌:+55%)およびリンパ球(雄:+37%、雌:+53%)の有意な増加によるものであった。

高用量群では、血清生化学検査値における以下の有意な変化が報告されている。雌雄ともにソルビトール脱水素酵素活性が上昇、雌で総タンパク質濃度が上昇、および雄でグルコース濃度が上昇。

高用量群では、雌雄ともに、肝臓の絶対および相対重量と腎臓の相対重量が、有意に増加した。また、中用量群の雌で、肝臓の相対重量が有意に増加し、高用量群の雌で、腎臓の絶対重量が有意に増加した。

死亡した個体の病理組織学的検査においては、内臓の鬱血、肺水腫、肝臓の重篤な変化(反応性単核細胞および顆粒球を伴うびまん性肝実質壊死、脂肪変性)、および腎臓の重篤な変化(尿細管変性と間質性単核細胞浸潤)が認められた。

試験終了時に屠殺した動物の組織学的検査では、中用量群と高用量群の肝臓に、病変が認められた。著者らは、観察された病変について、「実質細胞の腫脹、肝細胞核の多形性の増高、一部実質細胞の核肥大とクロマチン辺縁趨向、および多数の二核細胞」として報告しており、肝細胞の過形成を示すものと解釈している。これらの病変は、高用量群では全個体で認められたが、中用量群では雄2匹と雌3匹でのみで認められた。これらの病変以外の変化(核分化の増高、二核細胞の増加、実質内浸潤の増高)の程度は、中用量群と高用量群で同等であった。低用量群では、肝臓の変化は何も認められなかった。赤脾髄における単核

細胞浸潤と多数の巨核球の出現が、中用量群では雄 8 匹中 2 匹および雌 8 匹中 1 匹で、高用量群では雄 5 匹中 2 匹および雌 5 匹中 3 匹で認められた。低用量群(1 mg/kg 体重/日)では有害な影響が認められなかったため、1 mg/kg 体重/日が NOAEL と判断された。

信頼性は乏しいが、以下の試験でも、毒性影響について報告がなされている。

- ラットを用いた用量設定試験では、ブチンジオール(純度 98.8%)が、5、10、および 20 mg/kg 体重/日の用量で 5 日間経口投与された。病理組織学的検査は実施されなかったが、握力測定およびホットプレートテストの結果からは神経毒性の徴候は認められず、その他の毒性影響も特に認められなかった(BASF 1992)。被験物質の実測濃度は、目標濃度の 80%(低用量群)、87%(中用量群)、98.5%(高用量群)であった。高用量群の雄でコレステロール値が有意に上昇したこと以外に、投与に関連した影響は認められなかった。
- ラットを用いた 14 日間経口試験の短報が得られている(Komsta et al., 1989)。この試験では、ラット(各群雌雄 10 匹ずつ)に、ブチンジオールが、0(水)、1、10、および 100 mg/kg 体重/日の用量で、強制経口投与された。全個体について、臨床徴候、体重、血液学的パラメータ、生化学的パラメータ、5 つの臓器の重量、剖検による肉眼的変化、30 の臓器・組織(鼻腔を除く)の病理組織学的変化が検査された。8 回の投与後、高用量群で雄 1 匹、低用量群で雌 1 匹が死亡したが、これらの死亡については、ブチンジオール投与に関連するものではないと報告されている。100 mg/kg 群では、血液を含んだ鼻汁、立毛と下痢、体重増加抑制(雄)、肝臓の相対重量の増加(雄および雌)、コレステロール値の上昇(雄および雌)、血清カルシウム濃度の上昇とグルコース濃度の低下(雌)が認められた。雌の新鮮な肝試料では、複合機能酸化酵素活性(ミクロソーム性アミノピリン脱メチル化酵素活性)の軽微な誘導が認められた。血液学的検査では、赤血球数、ヘモグロビン含有量、およびヘマトクリットの低下が、雌でのみ認められた。臓器(脳を含む)の組織学的検査では、雌雄両方において、投与に関連した変化は特に認められなかった。

原データは入手できなかったが、ブチンジオールが神経系に有害な影響を及ぼすことが、1 件の試験で報告されている(Knyshova, 1968)。この試験では、雄ラット(6 匹/群)に、ブチンジオールが、0、0.04、0.2 ないしは 2 mg/kg 体重/日の用量で 6 ヶ月間経口投与されたが、一般的行動、体重、血液値(ヘモグロビン含量、赤血球数、白血球数、血小板数、凝固時間)のいずれにも変化は認められなかった。高用量群では、条件反射の遅延(潜時の 40%延長)が認められたほか、コリンエステラーゼの減少、スルフヒドリル基(SH 基)量の減少、アミノ基転移酵素活性の上昇、および、血清蛋白分画像の変化も認められた。脳では、ニッスル小体数の減少、神経膠要素の増加、および SH 基量の減少が認められた。肝臓では、脂肪変性、硬化した領域、グリコーゲン量減少が認められた。他の臓器では、限局性の充

血が認められた。被検物質の純度や実測濃度および安定性の情報、検査された中枢神経の部位の情報は、得られていない。

4.1.2.5.2 吸入曝露

Wistar ラットを頭部-鼻部曝露に供した試験が実施されている。各群雌雄 16 匹ずつを、ブチンジオール水溶液(99.5%)の液体エアロゾルに、1 日 6 時間、週 5 日間曝露した(BASF, 1998)。曝露群の目標濃度は 0.5、5、および 25 mg/m³であったが、実測濃度は、いずれもそれらと同等であった(最大較差 ± 4%)。同時対照群には、清浄な空気への曝露が実施された。10 回(試験期間 15 日間)の曝露後に、半数のラット(従属群)を、20 回(試験期間 30 日間)の曝露後に残り半数のラット(主群)を検査した。曝露前、曝露中および曝露後に、OECD 412 の要項に従って、同一の検査が実施された。その内容は、臨床検査(1 日 2 回、または少なくとも 1 日 1 回)、体重測定(週 1 回)、検眼鏡検査(曝露前と曝露終了時)、標準機能観察検査と運動能測定(各群雌雄 5 匹ずつ、曝露前と 8 時間曝露後には全群、18 時間曝露後には主群のみ)、血液学的検査と生化学的検査(各群雌雄 5 匹ずつ、曝露終了時)、剖検、特定の臓器の重量測定、肉眼による病理学的検査、および、いくつかの臓器・組織の病理組織学的検査などであった。さらに、各群雌雄 3 匹ずつを屠殺し、灌流固定によって保存して、神経病理学的検査に供した。

曝露に関連した死亡や神経機能異常は認められなかった。尿検査試験紙を用いた半定量的評価では、25 mg/m³ 群において、試験開始 30 日後に雌雄各 2 匹で、試験開始 15 日後に雌 1 匹で、ウロビリノーゲン値の上昇が認められ、ウロビリノーゲン値上昇を示す個体が増加していることが明らかになった。病理組織学的検査と神経病理学的検査では、曝露に関連した変化は何も認められなかった。

5 もしくは 25 mg/m³ のブチンジオールのエアロゾルに 10 回もしくは 20 回曝露された群では、喉頭の最も頭側の部分に、限局性の扁平上皮化生と炎症が認められた。25 mg/m³ 群では、20 回曝露の場合のみであったが、気管分岐部に限局性炎症が認められた。いずれの変化も、その程度は軽微～軽度であった(**Table 4.5** を参照)。

試験した濃度では、ブチンジオールの吸入曝露により、全身性の毒性影響は誘発されなかった。病変や機能障害といった影響は、ウロビリノーゲンの増加を伴うものではなかった。よって、全身毒性に関する NOAEC は、25 mg/m³ と判断された。5 mg/m³ 以上の濃度で、喉頭における化生と炎症が認められたことから、気道への局所的影響に関する NOAEC は、0.5 mg/m³ と判断された。

Table 4.5 Treatment-related effects of butynediol exposure on the respiratory tract after 10 exposures (satellite groups) and after 20 exposures (main groups)

mg/m ³ *	Males				Females			
	0	0.5	5	25	0	0.5	5	25
Main groups	5	5	5	5	5	5	5	5
Larynx								
Metaplasia squamous			2	4			5	5
Inflammation focal			1	2			1	2
Trachea								
Inflammation focal				2				2
Satellite groups	5	5	5	5	5	5	5	5
Larynx								
Metaplasia squamous			4	4			5	5
Inflammation focal				4				4
Trachea								
Inflammation focal					1			

* Concentration of butynediol

** Number of animals examined

各群雌雄 5 匹ずつの Wistar ラットを用いて、用量設定試験が実施されている (BASF, 1997)。この試験では、ブチンジオールエアロゾルに対する頭部-鼻部曝露が、0、25、100、ないしは 300 mg/m³ 濃度で 5 日間 (1 日 6 時間) 実施された。この試験では、試験デザインと試験パラメータは上述した 30 日間試験とほぼ同じであったが、神経機能についての検査は実施されず、病理組織学的検査は、鼻 (4 領域)、喉頭 (3 領域)、気管、肺、縦隔リンパ節、肝臓、腎臓、脾臓、および胸腺といった主要臓器について実施された。300 mg/m³ 群では、雌雄各 1 匹が、曝露期間中 (試験 2 日目と 3 日目) に死亡した。臨床所見はこの濃度に限られており、上気道刺激症状 (鼻腔の血性痂皮、呼吸促迫) や一般状態の悪化 (立毛、振戦、しゃがみ込み姿勢) が報告されている。300 mg/m³ 群の雌雄から得られた尿試料には変色がみられ、暗黄色ないしは明橙色を呈していた。雌雄とも、体重増加にわずかな遅延が認められ、体重増加量は、対照群と比較して有意に抑制されていた。

臨床病理学的検査では、雌雄ともに、血清中のガンマ・グルタミール・トランスペプチターゼ (γ -GT) 活性、ビリルビンおよびコレステロール値の上昇、ならびに尿素の低下が認められた。また、雌雄ともに、尿ウロビリノーゲン値の上昇が認められた。早期に死亡した 2 匹 (雌雄 1 匹ずつ) については、ともに腺胃粘膜にびらんや潰瘍が認められ、雌にのみ、前胃におけるびらんや潰瘍、肝臓における顕著な腺房像、空腸における暗赤色化した内容物、副腎皮質における少数の赤褐色病巣が認められた。300 mg/m³ 群の残りの個体では、肉眼的な異常は何も認められなかった。肝臓の病理組織学的検査では、軽微～中等度の単細胞

壊死(雌 4 匹)、肝細胞形成異常(雄 2 匹と雌 1 匹)、および有糸分裂像の増加(雌 1 匹)が認められた。高用量群の全個体で、鼻腔や喉頭における炎症や上皮の変化が認められた。具体的には、充血、過剰な粘液沈着や血性粘液沈着、化膿性鼻炎、嗅上皮における片側性または両側性の配列不整(鼻腔のレベル III および IV 領域)が認められ、また、鼻腔嗅上皮の萎縮(雄 1 匹のみ)も認められた。喉頭には、移行上皮の混合細胞性炎症、過形成、限局性またはびまん性化生が認められた。鼻腔のレベル III とレベル IV 領域の嗅上皮に認められた限局性の配列不整は、核の極性配置の喪失、および内腔辺縁の細胞における細胞質の減少や消失を特徴としていた。早期死亡個体の顕微鏡学的所見としては、肝臓、鼻腔、肺、腎臓および縦隔リンパ節におけるうっ血、重度の肝形成不全、腎臓皮髄境界部における空胞変性や異栄養性石灰化、胸腺における重度のリンパ球性壊死、脾臓における重度のリンパ球消失、腺胃や前胃におけるびらんや潰瘍、鼻腔における粘液増加、嗅上皮の配列不整、喉頭蓋の炎症(喉頭のレベル I 領域)、および、縦隔リンパ節における血液吸収が認められた。

100 mg/m³ 群では、尿におけるウロビリノーゲン値の上昇、鼻腔嗅上皮における炎症、粘液増加、血性粘液および限局性の配列不整、ならびに、喉頭粘膜における炎症、過形成および限局性またはびまん性の化生が認められた。

25 mg/m³ 群では、尿中ウロビリノーゲン値上昇を示す個体の増加、また、鼻腔における過剰粘液や血性粘液、喉頭粘膜における炎症や化生が認められた。

4.1.2.5.3 その他の曝露経路

経皮曝露による反復投与毒性に関するデータは、得られなかった。

Table 4.6 Summary of butynediol-related effects in rats after repeated exposure by oral or inhalation route

	Oral studies			Inhalation studies	
	BASF 1992	Komsta 1989	Jedrychoski et al.1992b	BASF 1997	BASF 1998
Study design	0,5,10,20 mg/kg bw/day 5 days	0,1,10,100 mg/kg bw/day 14 days	0,1,10,50 mg/kg bw/day 28 days	0,25,100, 300 mg/m ³ 5 days	0,0.5,5,25 mg/m ³ 30 days
Critical dose for classification Xn			150 mg/kg bw/day		750 mg/m ³
Effect:					
Mortality			*50 mg/kg	300 mg/m ³	
Bad general health status		100 mg/kg		300 mg/m ³	
Body weight gain↓		100 mg/kg	50 mg/kg	300 mg/m ³	
Hematology					
Anemia		100 mg/kg	50 mg/kg		
Leukocytosis			50 mg/kg		
Clinical chemistry					
Gamma-GT↑				300 mg/m ³	
Bilirubin↑				300 mg/m ³	
Cholesterol↑	20 mg/kg	100 mg/kg			
Urinalysis					
Urine discoloration				300 mg/m ³	
Urobilinogen↑				≥25 mg/m ³	25 mg/m ³
Liver					
Weight↑		100 mg/kg	≥ 10 mg/kg		
Degeneration/necrosis/ dystrophy			≥ 10 mg/kg	300 mg/m ³	
Kidneys					
Weight↑			50 mg/kg		
Tubular/vacuolar degeneration			50 mg/kg	300 mg/m ³ §	
Cortico-med. calcification				300 mg/m ³ §	
Spleen					
Lymphocytic depletion				300 mg/m ³ §	
Extramed.haematopoiesis			≥ 10 mg/kg		
Thymus					
Lymphocytolysis				300 mg/m ³ §	

Table 4.6 continued overleaf

Table 4.6 continued Summary of butynediol-related effects in rats after repeated exposure by oral or inhalation route

	Oral studies			Inhalation studies	
	BASF 1992	Komsta 1989	Jedrychoski et al.1992b	BASF 1997	BASF 1998
Stomach/Forestomach					
Mucosa erosion/ulceration				300 mg/m ³ §	
Nasal cavity					
Bloody discharge/mucus		100 mg/kg		≥ 100 mg/m ³	
Increased mucus				≥ 100 mg/m ³	
Inflammation				≥ 100 mg/m ³	
Disarrangement/atrophy olfactory epithelium				≥ 100 mg/m ³	
Larynx					
Inflammation				≥ 25 mg/m ³	≥ 5 mg/m ³
Metaplasia				≥ 25 mg/m ³	≥ 5 mg/m ³
Hyperplasia				≥ 100 mg/m ³	
Trachea					
Inflammation					25 mg/m ³
N(L)OAEL(C)	NOAEL 10 mg/kg bw/day	NOAEL 10 mg/kg bw/day	NOAEL 1 mg/kg bw/day	LOAEC 25 mg/m ³	NOAEC _{loc} 0.5 mg/m ³ NOAEC _{sys} 25 mg/m ³

* Dose/concentration at which the effect was observed

§ Restricted to the unscheduled deaths

4.1.2.5.4 ブチンジオールの毒性影響に関する考察

ブチンジオールを 50 mg/kg 体重/日の用量で 28 日間投与した場合、また、300 mg/m³ の濃度のブチンジオールを 5 日間連続吸入させた場合、死亡例が生じた。経口投与試験において 7 日目から 28 日目までにみられた死亡例や、吸入試験において曝露開始から 2 日目と 3 日目にみられた死亡例は、急性毒性影響に関連するものではなかった。

ブチンジオールへの反復曝露による非特異的な毒性症状は、一般状態の悪化や発育抑制であり、100 mg/kg 体重/日で 14 日間、50 mg/kg 体重/日で 28 日間、または 300 mg/m³ で 30 日間の曝露を受けたラットで認められた。

ブチンジオールに関連した病変が認められた標的臓器は、肝臓(経口および吸入経路)、腎臓(経口および吸入経路)、造血系(経口経路)、および気道(吸入経路)であった(**Table 4.6**)

を参照)。

偶発的に死亡した動物については、重度の肝病変が報告されており、これが 28 日間経口投与試験(Jedrychoswki et al., 1992b)の 50 mg/kg 体重/日群や、5 日間吸入試験(BASF, 1997)の 300 mg/m³ 群でみられた死亡例の原因の 1 つであると考えられた。

Jedrychowski et al.(1992b)の試験では、10 mg/kg 体重/日および 50 mg/kg 体重/日の用量でブチンジオールが経口投与された場合に、肝細胞の変性や壊死が引き起こされた。早期死亡例では肝細胞の細胞死が認められているが、一方で生存例では肝細胞の変化が認められており、著者は、これを過形成を示唆するものとしている。しかし、本評価書作成者としては、この解釈を支持しない。肝細胞の腫脹、クロマチンの辺縁趨向、ならびに核肥大も、細胞死に先行する細胞変性の特徴として知られている。この細胞変性を受けて、二核肝細胞数が増加していた。ソルビトール脱水素酵素活性の上昇が認められているが、この酵素はラットの肝実質に特異性の高い細胞質酵素であり、初発的な膜透過性の変化の後に放出されることから、退行性病変であるとする考えを裏付けるものであると解釈できる。加えて、肝細胞の適応的過形成であるとする解釈を支持する一貫した知見は、他の試験からは得られていない。

ブチンジオールに 2 mg/kg 体重/日の用量で 6 ヶ月間曝露された雄ラットでも、退行性および硬化性の肝病変が報告されている(Kynshova, 1968)。血清タンパク質の変化は、肝臓への影響と関連している可能性がある。ラットでの用量設定のために実施された 5 日間吸入試験では、同時進行的に生じた肝臓への影響に関する知見が報告されている。300 mg/m³ のブチンジオールへの曝露では、 γ -GT 活性の上昇、単細胞壊死、ジストロフィーなどの変化が生じており、これらは肝細胞毒性を示す証拠である。

50 mg/kg 体重/日のブチンジオールを 28 日間経口投与された雌ラットでは、貧血が認められている。他の用量群では赤血球のパラメータに変化は認められなかったが、中用量群と高用量群では雌雄ともに脾臓の巨核球数が増加し、高用量群では雌雄ともに網状赤血球数が増加していたことから、髄外造血活性が代償性に上昇したことが示されている。Komsta et al.(1989)の知見によって、ブチンジオールが血液毒性を示すことが確認された。貧血は、100 mg/kg 体重/日群の雌で顕著であったが、雄では赤血球における変化は何も認められず、この具体的な影響に対する感受性が低いことが示唆された。

貧血の種類を明確に判定することはできないが、この貧血が溶血に起因することを示すデータがいくつか存在する。上述の 5 日間吸入試験では、ビリルビン値の上昇が認められており、これには、ヘモグロビン破壊の亢進が関連している可能性が高い。300 mg/m³ の濃度では血清中ビリルビン濃度の上昇が認められ、25 mg/m³ 以上の濃度では尿中ウロビリノ

ーゲン濃度の上昇が認められた。15 日間および 30 日間の吸入試験では、標準的なスティック法による尿検査によって、25 mg/m³ 群の何匹かで、尿中ウロビリノーゲン濃度が一貫して上昇していたことが示された。健康な動物では、ビリルビンは胆汁を介して胃腸管に排泄され、そこで細菌による還元を受けてウロビリノーゲンに変わる。通常は、ウロビリノーゲンのごく一部が再吸収され、尿中に排泄される。尿中ウロビリノーゲン濃度の上昇は、溶血度の上昇の指標とみなすことができる。しかし、この吸入試験では、重要な赤血球パラメータの変化が報告されていないため、因果関係は不明であると判断される。経口試験からは、これらのパラメータについての情報は得られなかった。

胃や前胃の粘膜病変は、300 mg/m³ での吸入曝露によって死亡した個体でのみ認められた。脾臓および胸腺のリンパ区画に対する抑制性の影響も、これらの死亡個体に限って認められた。他の試験では、これに整合する様な知見は報告されていないため、これらの病変や抑制性の影響は、特異的な免疫抑制作用によるものではなく、瀕死のストレス状態から生じた非特異的な影響である可能性が高いと考えられた。

50 mg/kg 体重/日の経口投与を受けた動物や、300 mg/m³ の濃度でのエアロゾル曝露を受けた動物では、腎臓に尿細管病変が認められた。これらの病変は、皮髄境界部の(空胞)変性と異栄養性石灰化と表現されている。試験期間中に死亡した動物では腎臓が冒されていたため、これらの病変は死亡に関連していると考えられる。

5 mg/m³ 以上の濃度での反復吸入を受けた動物では、気道粘膜に対する有害影響が認められた。ブチンジオール濃度が高いほど、有害影響が認められた部位の数も多かった。

5 mg/m³ 以上の濃度のブチンジオールへの 30 日間曝露において、最も感受性が高かった部位は喉頭であり、扁平上皮化生や炎症が認められた。同様の病変が、25 mg/m³ 以上の濃度のブチンジオールに 5 日間曝露した試験でも報告されている。25 mg/m³ の濃度のブチンジオールに 30 日間曝露した場合には、気管に炎症細胞浸潤が認められた。喉頭部の過形成や炎症、ならびに鼻腔粘膜の退行性病変が、100 mg/m³ 以上の濃度でのみ認められた。

ブチンジオールの経口投与により肝臓、腎臓、赤血球でみられた主要な毒性影響は、それらがいずれもラットに特異的な現象ではなく、また種間外挿を行うことを制限する理由も特に知られていないため、ヒトの健康にも関連性があると考えられる。上述の経口投与での影響に基づいて、ブチンジオールは、「有害:飲み込んで長期曝露された場合、健康に深刻な障害が及ぶ危険性有り」(R-警句 R48/22)に分類される。

ブチンジオールの吸入曝露に関しては、気道に対して局所性の毒性影響が誘発され、喉頭(5 mg/m³ 以上)、気管(25 mg/m³ 以上)、鼻腔(100 mg/m³ 以上)に化生や炎症が認められた。

また、 300 mg/m^3 の濃度のブチンジオール³の反復吸入により、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、胃、前胃でも毒性影響が誘発され、全身性の毒性に加えて死亡や発育遅延も認められた。ブチンジオール³の反復吸入による毒性作用については、吸入経路に対するリスク警句 R48 の適用という観点からは、判断が分かれるところであり、以下の様な賛否両論の議論がなされる。

- 25 mg/m^3 以下の濃度のブチンジオールへの反復または長期曝露によって、「軽微～軽度」と記載される、気道への影響がいくつか誘発された。病変の重症度からすると、リスクに関する分類は必要ないと思われる。
- しかし、喉頭部の化生や炎症といった変化は、非常に低い濃度で生じ始めており(28 日間吸入で 5 mg/m^3 以上)、分類の必要性の基準とされる濃度(750 mg/m^3)の 150 分の 1 である。
- 化生の発生は、粘膜が別の上皮に置き換わったことを意味する。喉頭で最もよくみられる化生である、扁平上皮化生が認められた。気道上皮の化生性変化は、化学物質や慢性炎症の影響に対する再生成の適応反応と考えられる。肝細胞では、代謝活性の上昇という適用により細胞機能が增強されるが、それとは対照的に、気道では、化生による再生性適応の結果、毒物に対する上皮の感受性の低下または保護能の增強が起こる。再生性適応は可逆的であるが、増悪・広範化、長期化した場合には、正常な気道クリアランスや防御機能が妨げられる可能性がある。よって、喉頭の化生は、有害影響であると考えられる。
- 30 日間試験で設定された最も高い濃度(25 mg/m^3)は、リスク分類の基準濃度(750 mg/m^3)の 30 分の 1 である。 25 mg/m^3 以下の濃度における喉頭への影響の重症度は、軽微～軽度であった。曝露時間を長くすると、喉頭に炎症や化生が生じる最小作用濃度が低くなることが示された(5 日間の曝露では 25 mg/m^3 であったのに対し、30 日間の曝露では 5 mg/m^3)。さらに高い用量で試験が行われていれば、病変が重症化・広範化していた可能性がある。
- ブチンジオールへの吸入曝露期間が長くなると、標的部位の数が増える。28 日間の曝露では、気管も 25 mg/m^3 の濃度における標的部位となり、炎症が認められた。この用量設定試験では、これよりも高い濃度で 28 日間の試験が行われれば、気道における標的部位がさらに増えることが示唆されている。 100 mg/m^3 以上の濃度での 5 日間曝露では、鼻腔嗅上皮において、炎症、粘液産生増加、病変が認められた。
- 重要な全身性の毒性影響については、 25 mg/m^3 より高い濃度で起きると予想すべきであ

る。300 mg/m³ のブチンジオールに 5 日間曝露されただけで、かなり早期の死亡、ならびに、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺および胃腸管における重篤な毒性影響が引き起こされている。この試験では 2 日目と 3 日目に死亡が認められたことから、死亡は急性毒性と関連していると考えられた。25 mg/m³ より高く 300 mg/m³ より低い濃度における全身性の毒性影響については、データが得られていない。

- この試験の報告書では、局所毒性や全身毒性が予想されたため、30 日間吸入試験では 25 mg/m³ より高い濃度を設定しなかったと主張している。反復投与試験について予想された最大耐量は、急性吸入毒性試験で得られた LC₅₀ 値(690 mg/m³) よりもかなり低かった。
- 経口および吸入経路の標的臓器の比較から、両経路に共通の標的臓器となるのは、肝臓(死亡例および生存例で確認)および腎臓(死亡例で確認)であることが判明した。
- 経口曝露や吸入曝露による有害な影響は、動物特異性のものではない。このことは、同様の影響がヒトにおいても生じる可能性を十分に示している。
- 300 mg/m³ の濃度での曝露後 2 日目と 3 日目にみられた早期死亡を除き、低濃度でみられた影響は、他の毒性評価において項目として取り上げられていない。

最終的に、ブチンジオールへの長期にわたる吸入曝露により、重大な健康被害が引き起こされる懸念があると結論付けられる。ただし、現状のデータベースによっては、R48/20 の分類・表記は支持されない。

神経毒性に関する懸念

Knysnova (1968) の試験結果から、ブチンジオールが神経毒性を示す可能性がいくらか懸念される。より高い用量での投与が行われた他の試験では、一貫した知見が得られておらず、また、特別なテストや病理組織学的検査の報告も含まれていないため、この懸念を払拭できない。

Jedrychowskiet al. (1992b) の試験には、中枢神経系および末梢神経系の組織学的検査や神経機能障害に関するテストが含まれていない。上述の短期試験 (BASF, 1992) は、曝露期間が 5 日間と短く、用量設定は高用量が 20 mg/kg 体重/日で、組織学的検査も行われていないため、この試験において神経機能検査が陰性であったことを根拠にして、Knysnova (1968) の試験から生じた懸念を排除することは適切ではない。Komstaet al. (1989) では、脳の組織形態学的病変は報告されていないが、脳の切片の数や部位が不明であり、他の神経系の部位

についての検査も実施されていない。ただし、近年に実施された、ラットを用いた 15 日間および 30 日間吸入試験 (BASF, 1998) の知見からは、神経毒性に関する懸念が支持されないことが、明確に示されている。神経機能および運動活性に関する一連の試験、ならびに標準固定や灌流固定で得られた神経組織のいくつかの部位に関する病理組織学的検査では、神経機能への影響や神経毒物学的影響を示す所見は全く認められていない。得られているすべてのデータを基に検討すると、ブチンジオールが神経系に影響を及ぼす可能性への懸念に関しては、現時点では根拠が不足している。

NOAEL(無毒性量)/NOAEC(無毒性濃度)

経口経路

Jedrychowski et al.(1992b) の試験は、適切な内容を有する試験と認められたため、定量的なリスク評価を行う上で有用な、経口経路に関する NOAEL を導出するのに適している。この 28 日間経口投与試験から、ブチンジオールの NOAEL として 1 mg/kg 体重/日という値が導出された。ブチンジオールの 6 ヶ月間試験 (Knysnova, 1968) は、信頼性が乏しいため、NOAEL の導出において考慮しなかった。

吸入曝露

ラットを用いた 30 日間吸入試験 (BASF, 1998) では、全身性の毒性影響が認められていないことから、NOAEC_{sys} は 25 mg/m³ と判断された。

チンジオールによる影響のうち最も感受性が高かったのは喉頭の化生と炎症で、5 mg/m³ 以上の濃度で認められている。気道への局所影響に関する NOAEC は、0.5 mg/m³ と判断された。

4.1.2.6 変異原性

4.1.2.6.1 *in vitro* 試験

細菌系

ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の菌株 TA 1535、TA 1537、TA 1538、TA 98、および TA 100 を用いて適切に実施された細菌突然変異試験では、5,000 µg/plate 以下の濃度で、

S-9 mix の存在下においても非存在下においても陰性であった(BASF, 1981)。

哺乳類細胞を用いた *in vitro* 系

V79 細胞を用いた染色体異常試験[Cytotest Cell Research(CCR), 1989; 1991]は、別々に 2 回実施されているが、S-9 mix 非存在下では、860 µg/mL 以下の濃度で陰性であり、いずれの設定濃度でも有糸分裂指数の大幅な低下は認められなかった。

S-9 mix 存在下では、結果は不明確(equivocal)であり、変異原性の明白な証拠も明快な陰性結果も得られなかった。別々に 3 回実施されており、標本作製は、18 時間および 28 時間目に行われた。1 回目の試験では、100 µg/mL および 300 µg/mL の用量の、18 時間での作製標本において、異常頻度の上昇が認められた(陰性対照において 3.0%であったのに対し、ともに 8.5%)。2 回目の試験では、300 µg/mL の用量の、28 時間での作製標本において、異常細胞の割合は、やはり 8.5%であった(陰性対照が 2.0%)。3 回目の試験は、陰性であった(詳細なデータは得られていない)。最も高い用量では有糸分裂指数の減少が認められたが、有糸分裂活性の大幅な抑制は認められなかった。S-9 mix 存在下での 1 回目と 2 回目の試験は、18 時間目での作製標本について再分析が行われ、1 回目の試験の用量 100 µg/mL と 300 µg/mL の試料において、異常頻度の上昇が再確認された。2 回目の試験の 28 時間での作製標本についての再分析と、3 回目の試験についての再分析は行われなかった。

4.1.2.6.2 *in vivo* 試験

NMRI マウスを用いた *in vivo* の骨髓小核試験が、17.5、35、および 70 mg/kg の単回腹腔内投与で行われているが、結果は陰性であった[Research and Consulting Company(RCC)-CCR, 1998]。この試験は適切にデザインされており、現行のガイドラインの OECD 475 (EU B11) および GLP にも合致している。各用量群につき雄 5 匹と雌 5 匹を用いて、曝露後 24 および 48 時間に、多染性赤血球中の小核の数を記録した。70 mg/kg の濃度で毒性反応が認められ、予備実験では、それよりも高い濃度で重篤な毒性が認められている。

4.1.2.6.3 結論

ブチンジオールは、細菌を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験において、遺伝毒性を示さなかった。染色体異常の誘発性については、陽性とも陰性とも言えない不明確な結果が得られている。*In vivo* 骨髓小核試験は、細胞毒性の閾値以下の用量では、陰性であった。全体的に見て、ブチンジオールの生殖細胞に対する変異原性に関しては、重大な懸念は存在し

ない。

4.1.2.7 発がん性

実験動物を用いた試験データで、ブチンジオールが発がん性が示されているものは見当たらない。

4.1.2.8 生殖毒性

4.1.2.8.1 動物における試験

受胎能障害

化学物質の試験に関する OECD ガイドライン 415 に準拠した試験によって、繁殖成績や受胎能にブチンジオールが及ぼす影響について、検討がなされている。この試験の内容は、出生仔動物の一部について、性周期、精子パラメータ、および性成熟パラメータを検討することにより、補完されている (BASF-Report, Project-No 76R0226795119, 1999)。

この試験では、ブチンジオール(純度：99.5%)を、0、10、80 および 500 ppm の濃度で(平均取り込み量は約 1、7.6 および 40 mg/kg 体重/日と算出)、各群雌雄 25 匹ずつの Wistar/Chbb:THOM ラット(F0 親世代)に、交尾前(76 日以上)、交配期間中、妊娠中および授乳期間中(分娩後 21 日目まで、それまで F1 仔を育てる)に、連続して飲水連続投与した。その後、1 腹当たり雌雄 1 匹ずつの F1 離乳仔を残し、それ以外の F1 離乳仔とすべての F0 親動物を屠殺した。残した F1 離乳仔を、雌雄 25 匹ずつとなるように選抜・群分けし、ブチンジオールを親と同じ用量で飲水投与し、性成熟に至るまで飼育してから屠殺した。飲水量を基に選抜された F1 離乳仔によるブチンジ奥ールの平均取り込み量が求められ、飲料水における濃度 10 ppm、80 ppm および 500 ppm に対して、それぞれ約 1.8、13.7 および 76.9 mg/kg 体重/日と算出された。

親動物(F0)については、交配成績や繁殖成績が調べられた。F0 動物と F1 動物の健康状態は、毎日観察された。餌および水の摂取量を、F0 動物については交尾前、妊娠期間中および授乳期間中、定期的に測定し、選抜した F1 動物については週 1 回測定した。体重は、F0 動物および選抜した F1 動物については週 1 回測定し、F0 の雌については妊娠 0、7、14 および 20 日目と授乳 1、4、7、14 および 21 日目にも測定した。選抜した F1 動物につい

ては、包皮分離日または膣開口日にも体重が測定された。

F0 動物の全てに対し、肉眼による病理学的検査(いくつかの臓器の重量測定を含む)が実施され、また、広範な病理組織学的検査が、生殖系器官に特に留意して行われた。

対照群と高用量群の F0 雄について、精子頭部数と精子形態を予定された屠殺時に検査し、すべての群の F0 雄について、精子運動性を検査した。

F0 のすべての雌について、交配前の 3 週間からその後の交配期間(最大 14 日間、交尾の証拠が確認されるまで)にわたる、発情周期データの評価が行われた。さらに、予定された屠殺日には、個々の雌について、発情周期の位相が検討された。

F1 仔については、雌雄を鑑別し、出生翌日および出生 4、7、14、21 日目に体重を測定し、生存率を記録した。21 日目に屠殺時したすべての F1 仔について、肉眼剖検が行われた。剖検時には、1 腹当たり雌雄 1 匹ずつの仔動物について、脳、脾臓および胸腺の重量測定も実施された。選抜した F1 離乳仔は、飼育を続け、性的成熟(包皮分離日または膣開口日)を確認した後、屠殺して肉眼剖検を行った。

ブチンジオールに関連した死亡、臨床症状、および行動障害の徴候は、F0 親動物においては、雌雄共に、いずれの用量群でも認められなかった。また、妊娠期間中および授乳期間中の F0 雌親においても、特定の臨床所見は認められなかった。F0 雄では、摂餌量について、ブチンジオールに関連した影響は全く認められなかったが、高用量(500 ppm)群の F0 雌では、投与の全期間を通し、摂餌量に統計学的に有意な減少が認められた。飲水量の統計学的に有意な減少が、高用量(500 ppm)群と中用量(80 ppm)群で認められたが、影響が最も顕著であったのは、500 ppm 用量群の妊娠期間中(対照群より最大で 37%減少)および授乳期間中(対照群より最大で 24%減少)の F0 雌であった。F0 雄では、平均体重および体重増加について、ブチンジオールに関連した影響は全く認められなかったが、高用量(500 ppm)群の F0 雌では、投与の全期間を通して体重が低く、体重増加も少なかった。影響が最も顕著であったのは授乳期間中で、体重増加は対照群よりも約 64%少なかった。臓器の病理学的検査では、500 ppm 群において、ブチンジオールに関連した統計学的に有意な絶対および相対臓器重量の増加が、腎臓(F0 雄と F0 雌)および肝臓(F0 雌)に認められ、統計学的に有意な絶対および相対臓器重量の減少が、副腎と胸腺(F0 雌)に認められた。80 ppm 群においては、統計学的に有意な絶対および相対臓器重量の増加が、腎臓(F0 雄と F0 雌)および肝臓(F0 雌)に認められた。いずれの用量群においても、ブチンジオールに関連した生殖器官の障害は、特に認められていない。

均質化抵抗部位の精巣精子細胞(homogenisation resistant testicular spermatids)数ないしは精巣

上体尾部精子数、および異常精子と正常精子の割合は、高用量群と同時対照群間で同様であった。高用量群の F0 雄では、同時対照群と比較して、精子運動性の平均値に、わずかであるが統計学的に有意な低下が認められた(同時対照群で 89%であったのに対し高用量群の F0 雄では 80%)。ただし、試験機関では 16 件の 1 世代および 2 世代試験から背景対照値が得られていて、精子運動性の平均値の範囲は 79%(最小値)から 93%(最大値)となっているため、高用量群の F0 雄におけるこの知見は、ブチンジオールに関連した影響とはみなすことができない。

交配前の 3 週間にわたる観察期間に得られた発情周期データを検討したところ、いずれの試験群についても、ブチンジオールに関連した影響はないことが明らかにされた。

雄の交尾率と受胎率は 96~100%で推移し、用量との関連性は認められなかった。また、雌の交尾率と受胎率も 96~100%で推移し、用量との関連性は認められなかった。妊娠期間の平均値は、いずれの群も非常に近い値を示し、変動(21.8 日~21.9 日)は無視できるものであった。妊娠率はいずれの群も 100%であり、妊娠したすべての雌が、生存 F1 仔を分娩した。雌親 1 匹当たりの平均着床痕数、平均着床後損失率、および平均出産仔数に、ブチンジオールに関連した影響は認められなかった。生存出産率は 98~99%で、用量に関連した群間差は認められなかった。

周産期死亡率、出生後死亡率および生存率については、対照群と 10、80 および 500 ppm の各群の F1 仔の間で差は無く、ブチンジオールに関連した影響はないことが、出生仔の評価によって明らかにされた。また、F1 仔でも、ブチンジオールの投与に起因している可能性のある臨床徴候は、離乳まで認められなかった。生存 F1 仔の性分布および性比は、出生日と分娩後 21 日目で実質的な差は認められなかった。仔動物の平均体重と平均体重増加量は、500 ppm 群において、それぞれ分娩後 7 日目以降および分娩後 14 日目以降、統計学的に有意に減少した。500 ppm 群では、仔の平均体重が有意に減少したことに対応して、脳および胸腺の絶対および相対臓器重量の統計学的に有意な減少も認められた。出生仔の肉眼検査では、剖検所見の種類についても数についても、群間差は全く認められなかった。

性成熟について検討するために離乳後 3~4 週間後まで飼育が続けられた仔動物では、いずれの群においても、死亡、臨床症状、ないしは一般行動の障害の徴候は、投与期間中、認められなかった。飲水量は、500 ppm 群でのみ、統計学的に有意に減少していた(対照群と比較して 22%減少)。摂餌量は、500 ppm 群の雄では投与期間全体を通して、雌では 0~1 週目にのみ、統計学的に有意に減少していた。500 ppm 群では、体重および体重増加量も、雄では投与期間全体を通して、雌では 0~1 週目にかけて、統計学的に減少していた(対照群と比較して雄は 9%、雌は 11%減少)。性成熟のデータに関しては、平均膾開口日齢

が、500 ppm 群において、わずかであるが統計学的に有意に遅延していた(0、10 および 80 ppm 群でそれぞれ 31.1、31.5 および 30.8 日であったのに対し、500 ppm 群では 33.6 日)。また、平均包皮分離日齢も、500 ppm 群において、わずかであるが統計的に有意に遅延していた(0、10 および 80 ppm 群でそれぞれ 44.6、44.9 および 45.6 日であったのに対し、500 ppm 群では 46.2 日)。しかし、離乳までの期間に体重や体重増加が影響を受けており、さらに離乳後の観察期間に体重が統計的に有意に減少していたことから、これらの所見は、ブチンジオールが直接的かつ特異的に性成熟を遅延させたことによるものとはみなされなかった。すなわち、この試験で認められたこれらの影響は、全般的な発育遅延の結果であると考えられた。

結論として、ラットを用いて OECD ガイドライン 415 に準拠して実施された試験からは、生殖能力に対するブチンジオールの有害な影響は、明らかにされなかった。雄の生殖器官や精子形成に対する有害な影響も、雌の生殖器官や発情周期に対する有害な影響も認められなかった。この試験からは、平均取り込み量 40 mg/kg 体重/日に基づき、受胎能に関する NOAEL として、500 ppm という値が導出された。F1 子孫では、発育遅延の徴候(性成熟の遅延を伴う出生後の体重増加の抑制)が認められたが、これらは、親動物や雌親において全身毒性がはっきり認められた用量で生じたものであった。80 ppm 群の F0 親動物で摂水量の減少と臓器重量の減少が認められたことから、平均取り込み量(1 mg/kg 体重/日)に基づいて、一般的な全身毒性に関する NOAEL は、10 ppm と導出された。この値は、ブチンジオールの反復投与が実施された他の試験の評価から導出された NOAEL と、よく整合している(セクション 4.1.2.5 を参照)。

発生毒性

妊娠 Wistar ラットを用い、化学物質の試験に関する OECD ガイドライン 414 に準拠して催奇形性試験が行われており(BASF AG, 1995, Hellwig et al., 1997)、その中で、ブチンジオールの母体毒性や発生毒性が検討されている。加えて、先行して行われた予備試験(BASF AG 1992)のデータも考慮に入れられた。

ブチンジオールを、再蒸留水を溶媒として、0、10、40、および 80 mg/kg 体重の用量で、用量を 10 mL/kg 体重として、主要な器官形成期(妊娠 6~15 日目)に、強制経口投与した。妊娠雌を用いて先行して行われた予備毒性試験の結果から、母体毒性の明白な徴候が出現することが予想されたため、80 mg/kg 体重の用量も設定された。

1 群当たり 18~22 例の妊娠が確認され、試験期間中は、雌親の摂餌量、体重増加量および毒性の臨床徴候がモニタリングされた。妊娠 20 日目に屠殺し、各雌親について、妊娠子

宮の重量、黄体数、着床部位数、再吸収数、胎仔死亡数、および生存胎仔数が記録された。生存胎仔(1 群当たり 222~330 匹)については、体重、性別および肉眼的形態異常の検査、ならびに内臓や骨格の検査が行われた。

この試験の実施条件では、母体毒性の徴候が高用量群(80 mg/kg 体重)で認められ、具体的には、摂餌量減少(対照群より約 21%減少)、統計学的に有意な体重減少、投与期間中の死亡(雌親 1 匹)、別の雌親でのいくつかの臨床徴候(立毛)が認められた。これらの徴候はいずれも、投与期間の初期においてのみ認められた(妊娠 6~8 日目)。この用量群では、内臓や骨格の検査において、形成異常は認められていない。この用量群で報告されている影響は、第 14 副肋骨を有する胎仔の増加、および腎盂拡張や水尿管症を示す胎仔の増加に限定されており、変異や症状を有していた胎仔の数は 1 腹当たりそれぞれ 3.9 匹(第 14 副肋骨)および 20.9 匹(腎盂拡張や水尿管症)で、同時対照群での 1 腹当たりの数と比較して、統計学的に有意に増加していた。ただし、全胎仔数における発生率で見た場合、もしくは変異や症状が認められた腹仔の全腹仔に対する割合で見た場合、これらの 2 種類の変異や症状の発生数には、そのような変化(有意な増加)は認められなかった。変異や症状を有する胎仔の 1 腹当たりの数が上昇したのは、これらの変異や症状の発生数が、同時対照群で例外的に少なかったためである。この試験で得られた第 14 副肋骨ならびに腎盂拡張や水尿管の発生率は、試験機関の背景対照値とも整合している(**Table 4.7** を参照)。したがって、80 mg/kg 体重群で認められた、変異や症状を有する胎仔の 1 腹当たりの数の上昇については、ブチンジオールに関連した特異的な影響ではないと考えられる。

Table 4.7 Incidences of accessory 14th rib and of dilated renal pelvis and/or hydroureter in the teratology study on rats (OECD Guideline 414)

	Laboratory historical control	Test group concurrent control	Test group 80 mg/kg/day
14th rib			
Litter incidence	mean: 6.8% range: 0%-16%	0.0%	14%
Dilated renal pelvis and/or hydroureter			
Litter incidence	mean: 58.7% range: 0%-100%	9.3%	20%

屠殺時、妊娠率は 100%であり、ブチンジオールに関連した、妊娠パラメータの悪化は認められなかった。胎仔生存率は 100%であり、胎仔体重の減少や外観の形態異常も認められなかった。

80 mg/kg 体重以下の用量において、胚毒性、胎仔毒性、催奇形性は、特に確認されなかった。

先行して行われた予備試験(20、40 および 60 mg/kg 体重、妊娠雌 5 匹/群)では、雌親が早期に屠殺されたため、胎仔の評価は非常に限定的なものとなった。妊娠 16 日目の屠殺ではあったが、それでも、高用量群では母体毒性の明らかな徴候が認められ、中用量群と低用量群では母体毒性が疑われる徴候が認められた。

結論として、ラットを用いて OECD ガイドライン 414 に準拠して行われた試験では、胎仔発生に対するブチンジオールの影響は認められなかった。この試験データから、発生毒性に関する NOAEL は、80 mg/kg 体重/日と導出された。また、母体毒性(死亡、体重減少、臨床症状)に関する NOAEL は 40 mg/kg 体重/日、母体毒性に関する LOAEL は 80 mg/kg 体重/日と導出された。

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 結論

ヒトについては、生殖毒性に関するデータは得られていない。動物については、ラットを用いた試験からデータが評価可能であり、経口投与では、あらゆる催奇形性影響も含め、生殖や発生に対するブチンジオールによる有害な影響は、特に認められなかった。また、ブチンジオールに関連した、精液学的障害や発情周期への障害も認められなかった。経口投与以外の投与経路では、検討が行われていない。OECD ガイドライン 415 に準拠した 1 件の一世代試験から、受胎能に関する経口 NOAEL は 40 mg/kg 体重/日と導出され、OECD ガイドライン 414 に準拠した 1 件の試験から、発生毒性に関する経口 NOAEL は 80 mg/kg 体重/日と導出された。