

European Union
Risk Assessment Report
2-Methoxy-2-methylbutane (TAME)
CAS No: 994-05-8
4th Priority List, Volume: 70, 2006

EU
リスク評価書 (Volume 70, 2006)
2-メトキシ-2-メチルブタン (TAME)

European Chemicals Bureau
Institute for Health and Consumer Protection
European Chemicals Bureau
Existing Substances
CAS No: 994-05-8
EINECS No: 213-611-4
2-methoxy-2-methylbutane (TAME)
4th Priority List
Volume: 70
EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE
EUR 22236 EN

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部
2008年3月

本部分翻訳文書は、2-Methoxy-2-methylbutane (TAME, CAS No: 994-05-8)に関する EU Risk Assessment Report (Vol. 70, 2006)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)評価」を翻訳したものである。原文（評価書全文）は、

http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/REPORT/tamereport413.pdf

を参照ください。

4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量(濃度)- 反応(影響)評価

4.1.2.1 トキシコキネティクス，代謝および分布

4.1.2.1.1 動物試験

In vivo 試験

吸入および経口投与

試験1：ヒトおよびラット - 動態および生体内変換

方法

TAME (2-Methoxy-2-methylbutane, *tert*-Amyl methyl ether (TAME), CAS No: 994-05-8, *tert*-アミルメチルエーテル, 純度>97%) を暴露したボランティア (被験者) および F-344 ラットの呼気中 TAME の代謝を比較した。男性被験者 3 例および雌雄ラット各 5 匹に、TAME を 4 および 400 ppm の濃度で 4 時間、暴露装置を用いて暴露した。被験者は試験開始の 2 日前から試験期間中の喫煙、飲酒および給油行為が禁止された。尿サンプルを 6 時間間隔で 72 時間採取した。被験者では 48 時間ごとに採取した血液サンプルについて、TAME および *tert*-アミルアルコール (*tert*-Amyl alcohol, TAA) を測定した。ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) 法で定量した尿中の TAME 代謝物は、TAA, 2-methyl-2,3-butanediol (2-メチル-2,3-ブタンジオール), 2-hydroxy-2-methylbutyric acid (2-ヒドロキシ-2-メチル酪酸) および 3-hydroxy-3-methylbutyric acid (3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸) であった。

結果 - ヒト

対照被験者および TAME 暴露前に採取した被験者の尿中に認められた 2-メチル-2,3-ブタンジオールが、暴露被験者の尿にも背景値レベルで少量検出された。さらに、高濃度だが変動の大きい 2-ヒドロキシ-2-メチル酪酸および 3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸も検出された。TAME あるいは TAA は背景値として検出されなかった。

最高血漿中 TAME 濃度は暴露終了直後に検出された。平均最高血漿中 TAME 濃度は、4 および 40 ppm 群でそれぞれ 0.63 および 4.4 μmol であった。TAME は速やかに減少し、両濃度群で 12 時間後に検出限界まで減少した。血液からの TAME の消失は速やかで、半減期は 1.2 時間および 3.5 時間の 2 相性が認められた。TAA は、40 ppm 暴露の被験者の血液サンプルでは暴露後 36 時間で検出限界濃度に達したが、4 ppm 暴露では僅か 6 時間であった。TAA のクリアランスは一次反応の動態に従い、TAME よりも遅かった。

TAME を 4 および 40 ppm の濃度で暴露し、72 時間後までに採取したすべての尿サンプルで 2-メチル-2,3-ブタンジオールの有意な増加がみられた。2-メチル-2,3-ブタンジオールの消失は緩やかで、観察期間終了時においてもなお検出された。統計学的に有意な 2-ヒドロキシ-2-メチル酪酸濃度の増加が 40 ppm の暴露終了後の 0~30 時間でのみ検出された。尿中 3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸濃度は 40 ppm の暴露 12 時間後でのみ有意に増加した。4 ppm の TAME 暴露の尿では、背景値濃度が高く変動も大きいため、2-ヒドロキシ-2-メチル酪酸および 3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸のいずれも有意な増加はみられなかった。

回収された総排泄代謝物に基づくと、2-メチル-2,3-ブタンジオール (40 ppm で 261.3 μmol)、2-ヒドロキシ-2-メチル酪酸 (40 ppm で 291.8 μmol) および 3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸 (40 ppm で 330.9 μmol) が主代謝物であった。遊離 (5.7 μmol) および抱合 TAA (13.6 μmol) ならびに抱合 TAME (1.5 μmol) はマイナーな尿中代謝物であった。被験者では、TAME の生体内変換の程度および排泄速度、ならびに 2-ヒドロキシ-2-メチル酪酸および 3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸の尿中濃度は個人差が大きかった。3 例の個人間で統計学的に有意な代謝物の排泄の差はみられなかった。消失半減期には暴露 2 群で有意差はなかった。

結果 - ラット

試験結果から、ラットの血中 TAME 濃度 (40 ppm で 9.6 μmol および 4 ppm で 1.3 μmol) はヒトより高いことが示された。これはおそらくラットは呼吸率が高いため、摂取量がより大きくなることによる。TAME のラット血液からの消失半減期は約 1 時間あるいはそれ以下であった。4 (8.1 μmol) および 40 ppm (1.8 μmol) の暴露後の TAA 濃度にヒトとラットの間で有意差はなかった。ラットおよびヒトで同一の代謝物が生成された。ラットでは主として TAME は 2-メチル-2,3-ブタンジオールおよびその抱合体として排泄される。TAA の更なる酸化による他の生成物は、速やかな消失およびグルクロニド形成により重要な意味をもたない。ヒトでは、2-メチル-2,3-ブタンジオールの消失はラットより遅い。これらに加えて、ヒトでは TAA がより効果的に 2-ヒドロキシ-2-メチル酪酸および 3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸に酸化されると考えられる。この代謝経路はラットではそれ程重要ではない。ヒトにおける生体内変換の程度は、尿中相対代謝物濃度を投与量と比較した場合、有意に高かった。算出した TAME の投与量の約 60% がヒト尿中に回収された。ラットでは 40% であった。残りの TAME は呼気として排出されると考えられる。

試験 2 : ヒト - 動態

男性被験者 6 例を、チャンバーで安静な状態で 4 時間、15 および 50 ppm の濃度で暴露した (Johanson ら, 1997)。チャンバー内気体および呼気、尿および前腕静脈から採取した血液は IR を用いた分光光度法で分析した。血液、生理食塩液およびオリーブ油の液体/気体分配係数は 37°C で *in vitro* 測定した。これは、抄録以外の情報がなかったからである。

In vitro での TAME の血液/気体分配係数は 18, オリーブ油/血液分配係数は 19 であった。吸気量の百分率としての純摂取は TAME で 51% および MTBE (Methyl *tert*-butyl ether, CAS No: 1634-04-4, メチル *tert*-ブチルエーテル) では 42% であった。純摂取の百分率として表した排泄%は呼吸中のエーテル 35%, 尿中エーテル 0.1% および尿中アルコール (TAA) 0.3% であった。TAA の $t_{1/2}$ は血中で 5.5 時間 および尿中で 7.6 時間であった。

試験 3 : ヒト - 動態

各群 6 例の男性に 15 m³ の暴露チャンバーで TAME を 0, 15 あるいは 50 ppm の濃度で 4 時間暴露した (Pekari ら, 1997)。これら男性の平均年齢は 24.2 歳であった。暴露した被験者の身体活動は軽い事務作業程度に相当する。各暴露時間中に 3 回チャンバー内の空気を採取した。被験者の血液および吸気からの生体サンプルは暴露前、暴露中および暴露後に採取した。これらに加え、暴露開始の 48 時間尿を蓄積採取した。呼気、血液および尿はヘッドスペースガスクロマトグラフ (GC) 法で分析した。吸収キネティクス、代謝および排泄のようなトキシコキネティクスの項目を測定した。試験では急性毒性所見 (感覚器の刺激性および前麻酔様症状)、姿勢検査 (立位姿勢の着実性) および反応時間 (視覚的シグナルへの反応) 計測値を記録した。

TAME の血液/気体分配係数は 16.2 であった。血中 TAME 濃度は速やかに増加し、4 時間の暴露時間終了時には緩やかとなり定常状態に近づいた。50 ppm では血中 TAME 濃度は 13.2 μmol/L に達し、15 ppm の暴露時の最高血中濃度は 4.8 μmol/L であった。気体濃度に関係なく、4 時間暴露中の肺保持率は 51% であった。保持率は、定常状態に近づき組織の容量が低下したため、暴露開始時では平均値よりも高く、終了時では平均よりも低かった。TAA の血中濃度は 1 時間遅れで TAME と同レベルまで増加した。定常状態は暴露終了時であると推測すると、クリアランスは理論的には約 1 L/min と計算される。しかし、算出した半減期に基づくと、暴露開始の 25~30 時間後にしか定常状態に到達しえない。いずれの場合においても、推定クリアランスは TAME の代謝が極めて効率的でないことを示している。血中濃度と時間の関係をグラフで見ると、血中からのクリアランスは 2~3 の分離した相がみられる。TAME の半減期は約 6.3 時間だが、TAA は約 5.5 時間であった。被験者間ではかなり大きな個人差もみられた。TAME の 34% が未変化体として呼気中に排出されたのに対し、約 2/3 は他の生成物に代謝された。僅か 0.3% が主要代謝物 TAA として尿中に排泄された。

試験 4 : ラットおよびマウス - 代謝および分布

F-344 ラットおよび CD-1 マウスに ^{14}C 標識 TAME を経口または吸入投与し、TAME の代謝および分布を調べた (Sumner ら, 1997)。試験は GLP 基準に準拠して実施した。経口投与試験では、投与量は 100 mg/kg (ラット, マウス), 10 mg/kg (ラット) および 20 mg/kg (マウス) とし、各群ともに雌雄各 4 例を使用した。吸入投与試験では、鼻部暴露法を用い、目標濃度 100, 500 あるいは 2,500 ppm で 6 時間暴露した。各濃度で雌雄各 1 例のラットおよびマウスを用いた。非標識 500 ppm の TAME を 4 日間全身吸入暴露した後、500 ppm ^{14}C 標識 TAME を 1 日鼻部暴露する追加のラットを設けた。500 ppm の 1+4 日間吸入試験のラット 3 例および他の投与群のラット 4 例は 6 時間暴露直後に屠殺して保持用量を測定した。経口および鼻部暴露試験のその他のラットおよびマウス各 4 例は代謝ケージに移し、呼気、尿および糞を 48 時間、経時的に採取した。暴露終了の 48 時間後に組織を採取した。血中および尿中の TAME および TAA は ^{14}C 標識 TAME 当量として定量し、また、3 種類の尿中代謝物を定量した (TAA の直接のグルクロン酸抱合体, TAA 酸化物および酸化物のグルクロニド生成物)。血中濃度および半減期は、合算した TAME および TAA の%とともに ^{14}C 標識 TAME 当量として記録した。

TAME は全身に均等に分布した。吸入あるいは経口暴露後には殆どの組織の ^{14}C 標識 TAME 当量も血中濃度と同程度であった。100 あるいは 500 ppm を 6 時間暴露したラットでは性差はみられなかった。5 日間暴露したラットおよびマウスでは 1 日暴露に比べ、一般的に組織の ^{14}C 標識 TAME 当量が有意に高かった。吸入暴露後の組織濃度は暴露濃度の増加の割合よりも高い増加の程度を示したが、高用量ではその程度は低かった。経口投与では、組織中の ^{14}C 標識 TAME 当量は血中濃度よりも高いが有意な差はなかった。最も高濃度の分布は肝臓、腎臓および腸管であった。ラットのいずれの投与量においても組織中 TAME 当量に性差はなかった。雄マウスでは、両投与経路ともに心臓、腎臓および血液で高い当量であった。

吸入暴露試験では、95%以上の用量が回収された。2,500 ppm を暴露した雄ラットの ^{14}C 標識 TAME 当量の回収率は尿中 (48%) および呼気中 (45%) で最も高く、糞中 (1%) ならびに $^{14}\text{CO}_2$ (3%) としての回収率は低かった。雌では呼気中 (57%) で回収率は高く、尿中 (36%)、糞中 (1%) ならびに $^{14}\text{CO}_2$ (4%) では低かった。雌雄ラットおよびマウスでは、吸入および経口暴露の 24 時間以内に >84% が消失した。500 および 2,500 ppm 暴露では 1 コンパートメントモデルで推定すると、雌雄ラットの半減期 (5~9 時間) は雌雄マウス (2~3 時間) よりも長かった。100 ppm 暴露時の半減期は雄ラットでは 18 時間、雌ラットでは 3 時間、およびマウスでは 2 時間であった。経口投与の中間用量および高用量における半減期は、ラットで 15~16 時間、マウスで 7~12 時間であった。

全投与経路で、回収された放射活性の 72~94% が尿中に排泄された。投与終了 1~2 時間後には、回収された放射活性の 87% 以上を TAME および TAA が占めた。時間の経過とともにこれら構成要素の寄与は減少し、TAME および TAA の代謝がさらに進行した。残りの放

射活性は $^{14}\text{CO}_2$ として、あるいは糞中に回収された。ラットにおける呼気放射活性の割合は 100 ppm で約 30% および 2,500 ppm で約 55% であった。一方、排泄率は 60% 以上から 40% 以上に減少した。マウスでは呼気中の放射活性量においてラットと同様の傾向がみられた。ラットは、マウスとは異なり、500 ppm の 5 日間暴露後の排泄物中の TAME 濃度は 1 日暴露に比べ約 20% 低かった（訳注：原文では“more”と記載されているが、前後の文意から“less”の誤記と判断した）。これはおそらく、TAME または TAA の酸化に必要な代謝物濃度が 1 日暴露後よりも 5 日暴露後で増加するため、TAME から TAA への酸化が進行したことによる考えられる。ラットでは 100 mg/kg 経口投与後の呼気中の放射活性は排出物中よりも 20~40% 高かったが、10 mg/kg では差はなかった。また、マウスでは両投与量の排泄物中の放射活性量に約 2 倍の開きがあった。吸入暴露あるいは経口投与期間終了の 0~48 時間後に尿中に排泄された代謝物を調べた結果、TAA チトクローム P-450 の酸化生成物（2,3-ジヒドロ-2-メチルブタンあるいは 2-メチル-2,3-ブタンジオール）およびそのグルクロニドの関与が、吸入暴露量あるいは経口投与量が大きくなるとともに少なくなることが明らかになった。おそらくこれは尿中の代謝経路の飽和を示すものと考えられる。

試験 5：ラットおよびヒト - 生体内変換

F-344 ラットおよび被験者 1 例に ^{12}C -および ^{13}C -標識（C2 の位置）TAME を吸入暴露して TAME（純度>98%）の生体内変換を調べた（Amberg ら、1999）。さらに、ラットに経口投与して TAME の代謝物である TAA の生体内変換を調べた。尿中代謝物は GC/MS および ^{13}C -核磁気共鳴分析法（ ^{13}C -NMR）で同定した。 ^{13}C -NMR シグナルの相対強度に基づき、 ^{13}C -NMR、GC/MS および液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置（LC/MS/MS）で、遊離およびグルクロン酸抱合 2-メチル-2,3-ブタンジオールならびに TAA のグルクロニドを尿中主代謝物として同定した。ラット（雌雄各 2 例）を個別に 2,000 ppm の ^{12}C -および ^{13}C -TAME に 6 時間暴露し、48 時間尿を採取した。代謝物は ^{13}C -NMR、GC、LC ならびに質量分析法で同定した。被験者は 27,000 ppm の ^{13}C -TAME を 2 L ガスサンプルバッグから 4 分間暴露し、尿中代謝物を測定した。TAA の生体内変換を調べるため、雄ラット 3 例にコーン油に溶解した 250 mg/kg の TAA を経口投与し、48 時間尿を採取した後、代謝物を ^{13}C -NMR で同定した。代謝物の定量は実施しなかった。

結果 - ラット

ラットで同定された主代謝物の 1 つは 2-メチル-2,3-ブタンジオールであり、そのグルクロニドはそれより多かった。これらの化合物はチトクローム P450（CYP450）の酸化およびグルクロニル転移酵素によって TAME から生成される。3 つ目の主代謝物は、P450 を介してエーテルの一部が水酸化されて生成される TAA のグルクロニドであった。P450 の酸化からアルコールへの反応を介して生成される 2-ヒドロキシ-2-メチル酪酸および 3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸はマイナーな代謝物として同定された。雌雄ラットで代謝物濃度の大きな差はなかった。さらに、排泄の動態も雌雄で類似していた。24 および 48 時間後の尿サンプルで同一の代謝物がみられたが、代謝物の相対濃度は、0~24 時間尿と比べて 24 および 48 時

間サンプルの間で差があり、代謝物間の排泄動態に差があることを示した。TAA をラットに経口投与した結果、代謝物は TAME 投与ラットと同じであることが確認された。

結果 - ヒト

ラットとは異なり、ヒト尿サンプルでは、¹³C-TAME 吸入暴露後にかなりの量の ¹³C-TAA が検出された。ラットの主代謝物 2-メチル-2,3-ブタンジオールは僅かであった。ヒト尿サンプルでその他に検出されたすべての代謝物はラットと同様の濃度であった。TAME 吸入 48 時間後の尿サンプルでは TAME の代謝物も検出された。

その他のデータ

代謝

正常なヒト肝臓から得たミクロソーム 15 サンプルを使用して、ETBE (Ethyl *tert*-butyl ether, CAS No: 637-92-3, エチル *tert*-ブチルエーテル), MTBE および TAME の肝臓中での代謝を調べた (Hong ら, 2001)。試験では、主代謝物 MTBE の生成はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) に依存しており、また、P450 (CYP) 酵素を阻害する一酸化炭素で著しく阻害されることが明らかとなった。異なるエーテルを代謝するミクロソーム活性は互いに良好な関係があり、ETBE, MTBE および TAME は同じ酵素で代謝されることを示唆している。CYP アイソフォーム 2A6 は最も高い代謝活性をもつようである。バキュロウイルス発現系によると、2A6 は CYP アイソフォーム 2E1 よりも、ETBE, MTBE および TAME の変換において高い活性を示す。2A6 のモノクローナル抗体は 75~95% の阻害を生じた。さらに、エーテル代謝は、よく知られた 2A6 の基質であるクマリンにより濃度依存的に阻害された。MTBE とともにアイソフォーム 2A6 は代謝の第一段階、すなわち、脱メチル化によるホルマリンおよび *tert*-ブチルアルコールの生成に関与する酵素である (EURISK 評価書, 2001)。これを示す試験成績はないが、論理的にはこの酵素も TAME の 2-メトキシメチル基を脱メチル化してホルムアルデヒドと *tert*-ブチルアルコールを生成することが予測される。

13.2~13.6 mmol/kg の TAME あるいは 13.3~14.0 mmol/kg の MTBE を Wistar ラットの胃内に単回投与して、代謝および肝臓への影響を調べた (Elovaara ら, 1996)。投与 18 時間後にラットを屠殺して血液と肝臓サンプルを採取した。MTBE, *tert*-ブチルアルコール, TAME および TAA はヘッドスペース GC 法で測定した。チトクローム P450 酵素 2E1 および 2B1 の誘導プロフィールについて、*N*-ニトロソジメチルアミンデメチラーゼ (NDMAD) および 7-ペントキシレゾルフィン *O*-デアアルキラーゼ (PROD) 活性を測定して特徴を明らかにした。試験の結果、ラットにおける全体的なエーテル代謝および消失速度は TAME より MTBE の方が速かった。また、ラットではチトクローム 2E1 は MTBE 代謝に、チトクロームアイソフォーム 2E1 および 2B1 は TAME 代謝にそれぞれ関与することも明らかとなった。

皮膚および経口吸収

TAME の皮膚吸収に関するデータはない。しかし、Miller ら (1997) は MTBE の皮膚吸収を調べた。40 および 400 mg/kg の MTBE を、閉塞皮膚暴露装置を用いて Fischer ラットに投与した。暴露時間は 6 時間であった。暴露された皮膚の面積は報告されていない。暴露終了 10 分～45 時間後に屠殺して血液を採取し、MTBE 濃度を測定した。暴露後の血漿中 MTBE 濃度は低く、投与 2～4 時間後に最高濃度に到達した。マスバランス試験に基づいて、皮膚吸収は低用量および高用量でそれぞれ 16% および 34% と推定された。この試験では、静脈内投与量 (40 mg/kg) と経口投与量 (40 および 400 mg/kg) の AUC の比較も行なったが、MTBE は胃腸管から速やかに、かつ完全に吸収された (血漿中 t_{max} は 15 分)。

水道水に溶解した 51.3 $\mu\text{g/mL}$ およびゲータレード 250 mL に溶解した 2.8 mg の MTBE を被験者 14 例の皮膚に約 1 時間暴露した (Prah ら, 2004)。血液および呼気からサンプルを採取した。最高血中濃度 0.17 $\mu\text{mol/L}$ は皮膚暴露終了 15 分後にみられた。消失は 3 コンパートメントモデルとして記述されている。算出された各コンパートメントの血中半減期は 14.9 分, 102.0 分および 417.3 分であった。呼気中のそれぞれの半減期は 13.0 分, 63.1 分および 254 分であった。皮膚暴露における最高血中濃度は暴露終了 65 分後の 0.05 $\mu\text{mol/L}$ であった。血中の 3 つの半減期は 5.5 分, 126.6 分および 403.1 分であった。呼気中の 2 つの半減期は 58.4 分および 256.0 分であった。皮膚浸透係数の計算値は 0.028 cm/hr であった。24 時間後の MTBE 濃度は検出限界以下であった。

吸入による吸収

5, 25 あるいは 50 ppm の MTBE を軽作業負荷条件下で 2 時間暴露した被験者 10 例の呼吸による実質取り込み量を調べた (Nihlén, 1998)。吸収量は実質呼吸取り込み量と呼気の合計として算出した。暴露 2 時間後に MTBE 濃度は 14 $\mu\text{mol/L}$ に達した。これは 40 ppm の TAME を 4 時間暴露した被験者でみられた濃度よりも高かった (最高 TAME 濃度 = 4.4 μM)。本試験の MTBE 呼吸取り込み量は 45% であった。安静状態の被験者に 25 および 75 ppm を 4 時間暴露したもう 1 つの試験の呼吸取り込み量は 40% であった。前節で記載した Prah らの試験 (2004) では 3 ppm (10.8 mg/m^3) の MTBE を被験者 14 例に 1 時間暴露した。最高血中濃度は暴露終了時で 0.28 $\mu\text{mol/L}$ であった。MTBE 濃度は暴露後には速やかに減衰し、24 時間後には MTBE は実質的に消失した。3 コンパートメントの血中半減期は 1.9 分, 59.0 分および 313.7 分ならびに呼気中のそれぞれの半減期は 30.2 分, 265.7 分であった。

4.1.2.1.2 トキシコキネティクス、代謝および分布の要約

得られたデータからは、TAME はラット腸管で効率的に吸収される。TAME は肺で速やかに吸収される; 被験者試験における実質呼吸取り込み量は 50% であった。ヒトへの TAME 濃度 50 ppm の 4 時間暴露における最高血中濃度は 13.2 $\mu\text{mol/L}$ であった。ラットにおける MTBE の吸収試験データは、TAME 経皮投与量のおそらく 3 分の 1 以下が吸収されたこと

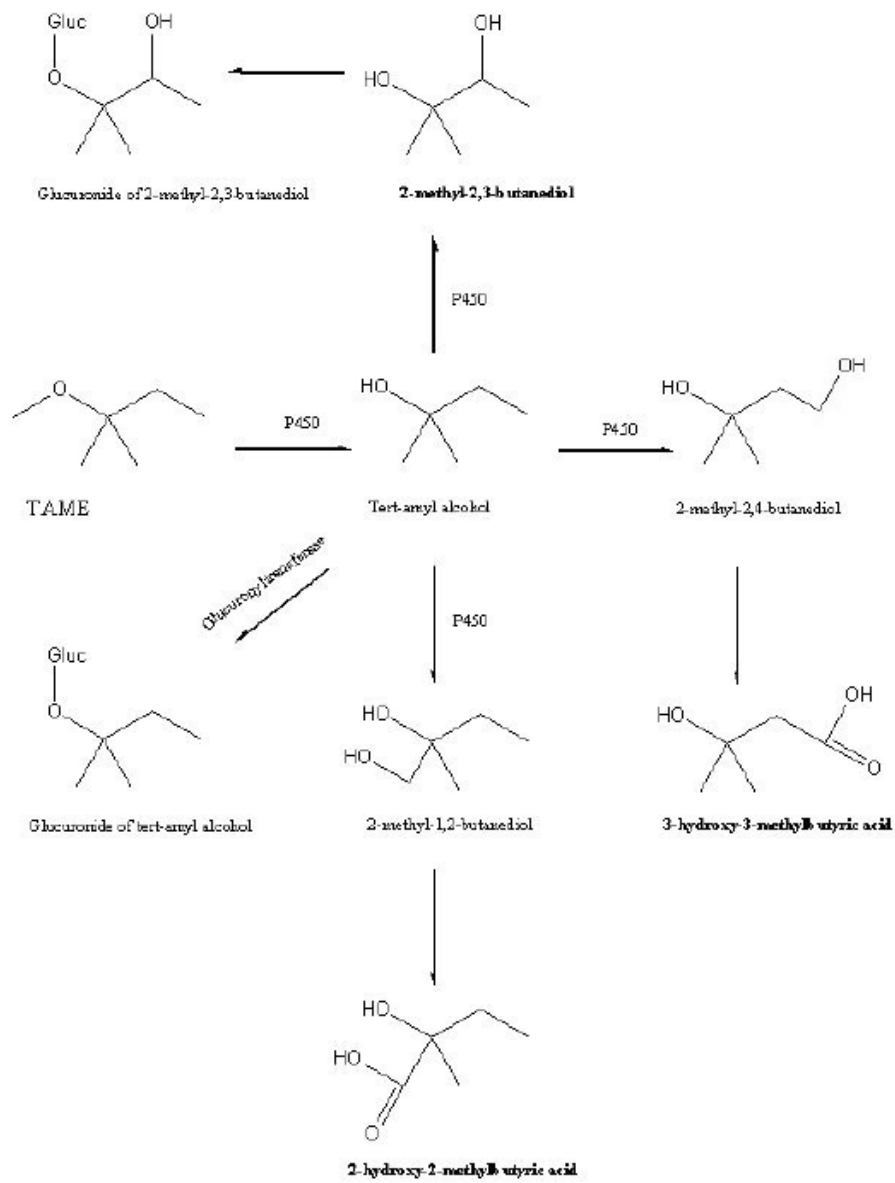
を示唆している。被験者試験では、MTBE は皮膚から速やかに吸収され、皮膚浸透係数は 0.028 cm/hr であった。

ラットでは TAME は全身で均等に分布し、主要消失経路である呼吸中、尿中および糞中に消失するが、糞中への排泄は最大値の数%に過ぎない。

吸入暴露終了後、ヒト血液からの消失は速やかであり、2 相性を示した。血中半減期は 1.2 時間から 6.3 時間であったが、被験者間における個体差が比較的大きかった。検出限界値には 12 時間後に到達した。呼吸を介した消失が高用量で増加した。ヒトにおいて TAME の TAA への代謝を担う重要な酵素は、主に肝臓におけるチトクローム 2A6 である。これは、MTBE から TAA およびホルムアルデヒドに変換する酵素と同様である。ヒトの尿中主代謝物は 2-メチル-2,3-ブタンジオール、2-ヒドロキシ-2-メチル酪酸および 3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸である。遊離および抱合 TAA および TAME は尿中ではマイナーな代謝物であった。

リスク判定に採用される吸収率は経口暴露で 100%、皮膚暴露で 30%、吸入暴露では 50% である。

Figure 4.1 TAME's biotransformation in mammals (Amberg et al., 2000)



Major human urine metabolites are in bold.

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 *In vitro* 試験

急性神経毒性

Martin ら (2002) はガソリン燃料の酸素添加物およびそれらの代謝物と γ -アミノ酪酸 (GABA) 受容体との結合を比較した。この結合を調べるために、ラット脳の膜における GABA 受容体への放射性リガンド [^3H]-*t*-butylbicycloorthobenzoate ([^3H]TBOB) の阻害を測定した。その結果、第三級エーテルの TAME, ETBE および MTBE, ならびに第三級アルコールの TAA および *tert*-ブチルアルコール (TBA) は GABA 受容体の痙攣薬結合部位との結合を阻害した。同数の炭素をもつ分子に関しては、アルコールはエーテルよりも強く結合を阻害した。結合能力の順位は、上から TAA, TAME, ETBE, TBA, MTBE およびエタノールの順であった。

4.1.2.2.2 動物試験

吸入

雌雄各 5 例の Sprague-Dawley ラットに平均 TAME 蒸気濃度 5,400 mg/m³ で 4 時間、1 m³ の暴露チャンバーで暴露した (IIT, 1991)。ラットをチャンバーから取り出した直後、暴露のおよそ 2~3 時間後および暴露後の 14 日間では少なくとも 1 日 1 回、一般状態の変化を観察した。体重は暴露前、1 週間後および剖検前に測定した。

TAME 暴露による死亡は認められなかった。一般状態の変化として、暴露直後に全動物で呼吸夾雑音が認められた。呼吸夾雑音は暴露の約 2 時間では 10 例中 7 例に認められたが、3 時間 15 分後にはすべて正常に回復した。試験期間中、10 例中 7 例に鼻部周囲の赤色化が観察された。剖検では、肺外側の出血巣が 7 例でみられた。しかし、これらの大部分の出血巣の大きさおよび数は対照群でみられた病巣と類似していたが、雌 1 例では多数の出血巣が、また、雄 1 例では肺に広範な赤色部が観察された。下顎リンパ節の拡張が 6 例にみられた。

その他の情報

F-344 ラットに噴霧濃度 250, 1,500 および 3,500 ppm の TAME をチャンバー内で 1 日 6 時間、週 5 日、65 回以上暴露した (Huntington Life Sciences, 1997)。対照群および 3,500 ppm 群は雌雄各 51 例、250 および 1,500 ppm 群は雌雄各 41 例で試験を開始した。急性毒性症状は最高用量群で顕著であった。殆どのラットが TAME 暴露中に虚脱を示した。中間用量群においても暴露の最初の 1 ヶ月間には虚脱および嗜眠がみられた。この群の試験期間の後半には、努力性呼吸および嗜眠が数例に観察された。低用量群では試験期間中に異常な症

状はみられなかった。高用量群では回復期間中、対照群と同様に異常はなかった。

90 日試験の一部として雌雄各 10 例のサテライト群を設け、TAME を 250, 1,500 あるいは 3,500 ppm (1,060, 6,360 あるいは 14,840 mg/m³) の濃度で 6 時間暴露して機能観察総合評価法 (FOB) により検査した (Huntington Life Sciences, 1997)。用量相関的な神経筋機能障害および中枢神経系の抑制が暴露 1 時間後にみられた。これらの作用は TAME の暴露 6 時間あるいは 24 時間後およびその後の暴露後にはみられなかった。

同じプロトコールを用いてマウスで試験を実施した。暴露量も同濃度とした。3,500 ppm 暴露群では死亡が多数みられたため、TAME 噴霧濃度を低く設定し、新たな高暴露群として 2,500 ppm 群を対照群とともに設けた。対照群および高用量群 (3,500 および 2,500 ppm) は雌雄各 46 例、250 および 1,500 ppm 群は雌雄各 36 例で試験を開始した。マウスでは神経行動あるいは神経病理学的試験は実施しなかった。

雄 10 例と雌 12 例が試験第 1 週に死亡した。高濃度暴露では一般状態の変化として努力性呼吸および虚脱がみられた。低用量群での死亡の発現頻度は対照群と同様であった。1,500 ppm 群では試験期間中に嗜眠および数例で虚脱が観察された。

Sprague-Dawley ラットに TAME 目標噴霧濃度 0, 500, 2,000 および 4,000 ppm を 1 日 6 時間、週 5 日で 4 週間暴露した (White ら, 1995)。暴露開始の 1 週間前および 1, 5 あるいは 20 回目の暴露後に FOB により神経筋機能および知覚認知に関する検査を実施した。最終の暴露後にラットを絶食させ、その後麻酔処理した。

この試験で観察された急性作用は高用量 (4,000 ppm) 暴露による雌 4 例および雄 3 例の死亡であった。死亡の原因はおそらく重篤な中枢神経系の抑制によると考えられた。4,000 ppm 群でみられたその他の急性作用として、2,000 ppm 群でもみられた鎮静、昏睡、運動失調、触知できる体の冷たさ、眼瞼下垂、過敏性亢進、活動性低下および体位への影響が観察された。暴露 1 時間後に実施した FOB 評価においてこれらの症状が確認された。すなわち、体温低下、ロータロッド遂行障害および着地時後肢開脚の増加とともにテイルピンチ反応、正向反射、背走地性の低下が認められた。試験終了の 18 時間後に検査したラットでは中枢神経系抑制の症状はみられなかった。

経皮

経皮投与に関するデータはない。

経口

1 群雌雄各 5 例の Sprague-Dawley ラットに 2,000, 2,500 または 3,000 mg/kg の TAME を経口投与した (Exxon Biomedical Sciences Inc, 1989a)。試験施設は被験物質 (Btch: MRD-89-374) の純度の情報を入手していなかったが、投与目的としては十分な純度があると推察した。

投与量は予備試験の結果に基づいた。一般状態の変化は投与 1, 2, 4 および 6 時間後ならびに投与終了後の 14 日間は毎日 1 回記録した。投与前日, 投与日 (day 0), 7 日目, 14 日目および試験終了時に体重を測定し, その後剖検した。LD₅₀ 値は, データポイントの重みを均等化して Litchfield-Wilcoxon 法を用いて算出した。

2,000 mg/kg 群では 4 例, 2,500 mg/kg 群では 7 例および 3,000 mg/kg 群では 8 例が死亡した。投与日に 1 例の死亡が発見されたが, これは投与過誤によると考えられた。投与後の観察では運動失調, 削瘦, 虚脱, 体温低下, 活動性低下, 呼吸困難, 呼吸低下, 湿性および乾性呼吸雑音, 透明および赤色の鼻汁および流涎, 被毛の汚れおよび立毛などの典型的な鎮静の症状がみられた。これらは全群で投与日および 1 日目に多くみられた。2 日目からはいずれの生存動物にも異常な症状はみられなかった。死亡動物の剖検では胃腸管 (G-I) および膀胱の異常, 胸腺, 肺および肝臓の褪色ならびに被毛の汚れが観察された。また, 心房の拡張および左右腎臓の腎盂拡張がそれぞれ 1 例ずつに観察された。生存動物では, 1 群で腎臓の拡張および肝臓の異常がそれぞれ 1 例にみられたのみであった。推定 LD₅₀ 値は雌で 1,602 mg/kg, 雄で 2,417 mg/kg, ならびに雌雄合算では 2,152 mg/kg であった。

4.1.2.2.3 ヒト試験

各群平均年齢 24.2 歳の男性 6 例に 0, 15 (64 mg/m³) または 50 ppm (212 mg/m³) の TAME を 15 m³ の暴露チャンバーで 4 時間暴露した (Pekari ら, 1997)。被暴露者の身体活動は軽度の事務就業に相当した。暴露前, 暴露中および暴露後に血液および呼気を採取した。さらに, 暴露前から 48 時間までの全尿を採取した。これらの呼気, 血液および尿サンプルはヘッドスペース GC 法を用いて分析した。急性毒性症状 (感覚の刺激性および前麻酔様症状) は被験者の報告に基づいて記録した。回答を分析して 4 つの密接に関連した症状の複合群を作成した。すなわち, 「刺激性」, 「頭中感覚」および「気分」である。調査票は暴露開始から 1 および 3 時間, 暴露終了 1 時間後に回収した。姿勢検査 (立位姿勢の着実性) を実施し, 反応時間 (視覚的信号に対する反応) を測定した。姿勢検査は暴露前, 暴露開始 1, 2.5 および 3.5 時間後ならびに暴露終了 1 時間後に行い, 反応時間については暴露前の午前中, 暴露開始 1, 2.5 および 3.5 時間後ならびに暴露終了 1 時間後に測定した。

報告された症状は極めて少なかった。2 例が眼, 鼻および喉の軽度な刺激性, 口渇を報告した。1 例は高濃度群のみでの報告であったが, もう 1 例ではすべての刺激性症状が対照日にも報告された。暴露 1 時間後に「頭中感覚」に属する症状を聞いたところ, 15 および 50 ppm 暴露の各 1 例が軽度の頭痛を報告した。3 時間後, 15 ppm 暴露の 1 例および 50 ppm 暴露の 2 例が軽度の頭痛を報告した。「頭重感」と記述した症状が暴露開始 1 時間後の 2 例および 3 時間後の 3 例で報告された。予想に反して, 暴露日で, 5 例が 50 ppm 暴露 1 および 3 時間後のいずれにおいても「頭重感」を報告しなかった。15 ppm 暴露では, 3 例が 1 時間後および 2 例が 3 時間後に「頭重感」を報告しなかった。気分の変化が報告されたとき, 15 ppm 暴露の 1 例と 50 ppm の他の 1 例が気分の悪さを報告した。対照日には気分の悪さの報告はなかった。

TAME は気分、反応時間および姿勢に対して重要な影響は及ぼさなかった。

要約すると、TAME の作用における報告は決して一貫したものではなく、試験から確かな結論を引き出すことはできなかった。しかし、これらの成績は TAME が低用量で軽度な急性毒性作用を引き起こすことを示しているようである。

4.1.2.2.4 急性毒性の要約

ラットの吸入等暴露による LC₅₀ 値は 5,400 mg/m³ 超であった。経皮試験は実施しなかった。推定経口 LD₅₀ 値は雌で 1,602 mg/kg, 雄で 2,417 mg/kg ならびに雌雄合算では 2,152 mg/kg であった。ラット雌の推定経口 LD₅₀ 値に基づき、分類は R22 と判断される。TAME は噴霧濃度 60 mg/m³ で眼および上気道の軽度な刺激性ならびに口渇を引き起こすが、これらは重要な作用ではなく、リスク評価の無毒性濃度 (NOAEC) は 50 ppm (212 mg/m³) と判断される。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.3.1 皮膚

動物試験

白色ウサギ 3 例を用い、GLP 基準および OECD ガイドライン 404 に準拠して実施した試験で TAME (純度 98.4%) の皮膚刺激性を評価した (Märtins, 1991)。被験物質 500 µL を塗布して体幹の背側部に貼付したパッチを覆うため半閉塞パッチを使用した。パッチはその場所に 4 時間留置し、その後、暴露した皮膚表面を注意深く洗浄した。反対の側面を対照に用いた。皮膚刺激性を採点し、紅斑および浮腫の程度を他の傷害とともに記録した。被験物質適用の 24, 48 および 72 時間後の各動物について Draize の評点を記録した。紅斑/痂皮および浮腫形成の指数を別々に計算した。

全時間ポイントにおける評点はすべて 0 であった。

4.1.2.3.2 眼

動物試験

上記試験とともに、OECD プロトコール 405 (GLP) に準拠して眼刺激性試験を実施した (Märtins, 1991)。白色ウサギ 3 例を使用し、片方の眼の結膜嚢に 100 µL の TAME を滴下した。残る眼は無処置対照とした。滴下の 24 時間後、投与した眼の被験物質を生理食塩液で洗い落とした。眼刺激性は Draize に従って採点し、投与の 1, 24, 48 および 72 時間後、な

らびに 7, 14 および 21 日後に記録した。

Table 4.13 TAME eye irritation summarised

Observed effect/ Duration from application	Conjunctiva						Damage to Iris			Cornea Clouding		
	Redness			Swelling								
Animal number	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1 hour	0	0	0	4	2	1	0	0	0	0	0	0
24 hours	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
48 hours	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72 hours	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	1.7	1.7	1.7	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0

4.1.2.3.3 刺激性の要約

TAME は皮膚刺激性を誘発しなかった。眼刺激性試験では結膜の軽度な赤色化および腫脹がみられた。しかし、これらは被験物質滴下の 7 日後には回復し、可逆性の変化であった。平均 24-48-72 時間スコアから、TAME は刺激性物質に分類されないことが明らかであった。トキシコキネティクスおよび急性毒性の項に記載した男性被験者 6 例による試験では、軽度な眼、喉および鼻の刺激性が噴霧濃度 60 mg/m³ でみられている。

4.1.2.4 腐食性

刺激性試験の結果から、TAME が腐食性を示す可能性はないと予測される。

4.1.2.5 感作性

4.1.2.5.1 動物試験

皮膚感作性

In vivo 試験

モルモットにおける皮膚感作性誘発能を GLP 基準および米国環境保護庁 (US EPA) の有害物質規制法の規格に準拠して Bühler 試験により評価した (American Petroleum Institute, 1993)。TAME を 100% 溶液として 20 例 (雌雄各 10 例) のモルモットに塗布した。誘発処置はモルモットの剃毛した背部に閉鎖チャンバーを留置して実施した。0.3 mL の TAME をチャンバーに入れ、その位置で 6 時間留置した。暴露時間終了後、チャンバーおよび余分な被験物質はすべて取り除いた。誘発投与は週 1 回とし、3 回繰り返した。最終の誘発暴露

の 14 日後に誘発処理と同じ方法で、しかし位置は反対側の背部の中心線で惹起を行なった。惹起の刺激反応の対照には先の無処置動物 10 例を供し、誘発処理した動物と同じ惹起処置を行なった。陽性対照には 1-シクロ-2,4-ジニトロベンゼン (DNCB) を用いた。Table 4.14 に試験計画を詳述した。結果の評価において、刺激対照動物よりも明らかに広範な惹起個所の赤色化はアレルギー反応と判断した。惹起刺激対照動物に反応がなく、1 あるいはそれ以上の皮膚評点は「明確に感作性あり」と判断した。「かろうじて認知できる紅斑」に相当する評点 0.5 は「疑わしい」と判断した。指数として発現頻度および重篤度の 2 つを用いた。発現頻度指数は陽性反応、すなわち 24 または 48 時間の評点が 1 以上の動物数の割合である。重篤度指数は 24 および 48 時間の両方の評価を計算した雌雄動物の皮膚評点の平均値である。

Table 4.14 Experimental design of the Bühler test

Group	Number of animals	Concentration (%)	
		Induction	Challenge
Light mineral oil	10	100	100
Light mineral oil irritation control ^c	10	-	100
DNCB	10	0.5 ^a	0.3 ^b
DNCB (irritation control) ^c	10	-	0.3 ^b
TAME	20	100	100
TAME (irritation control) ^c	10	-	100

DNCB 1-chloro, 2,4-dinitrobenzene,
a) Vehicle 80% ethanol,
b) Vehicle acetone,
c) Treated at challenge only. The same animals served irritation control for all three materials.

誘発時には、鉱物油あるいは TAME 処理動物は刺激性を示さなかったが、0.5%DNCB は最初の誘発後に軽度の刺激性を示した。惹起時では、鉱物油で誘発および惹起した全動物ならびに刺激対照動物（鉱物油での誘発処置未実施）は皮膚反応を示さなかった。陽性対照動物の全 10 例は、刺激対照動物（24 時間で 0.2 および 48 時間で 1.4）よりも重篤な皮膚反応（24 時間で 1.8 および 48 時間で 2.1）を示した。陽性対照動物の発現頻度指数は 100% であった。TAME 誘発および惹起動物は皮膚反応を示さず、頻度および重篤度の評点は 0 であった。

4.1.2.5.2 感作性の要約

TAME はモルモットの Bühler 試験では感作性はないと判断された。

4.1.2.6 反復投与毒性試験

4.1.2.6.1 動物試験

In vivo 試験

吸入投与

ラット, 90 日間

全身暴露法 (6 m³ のチャンバー) を用い, F-344 ラットに TAME を 250 (1,060 mg/m³), 1,500 (6,360 mg/m³) および 3,500 (14,840 mg/m³) ppm の蒸気濃度で暴露した (Huntingdon Life Sciences, 1997)。試験は GLP 基準に準拠して実施した。暴露濃度は入手した毒性データに基づいて設定し, その上限は被験物質に対する蒸気爆発限界の 75%以下とした。1 日 6 時間, 週 5 日間で少なくとも 65 回暴露した。対照群および 3,500 ppm 群の動物数は雌雄各 51 例, 250 および 1,500 ppm 群は雌雄各 41 例で試験を開始した。

体重を投与開始前, 週 1 回および最終剖検時に測定した。摂餌量を投与 1 週間前およびその後は週ごとに記録した。1 日 2 回動物の状態を観察し, 投与開始前, 14 週および全投与終了時ならびに回復期間中に眼科学的検査を実施した。血液学的検査サンプルを 5, 14 および 18 週 (回復期間) に採取した。血液化学的検査サンプルを 5, 6, 14 および 18 週に採取した。各群雌雄各 5 例を同様に暴露する群として別途設け, 1, 4 および 13 週目に腎症および腎臓の増殖試験に供した。これらは他の施設で実施した。増殖試験では 5-ブロモ-2'-デオキシ尿素含有の浸透圧ポンプを外科的に埋め込んだ。さらに, 採取した組織について α -2u-グロブリンおよび近位尿細管の硝子滴を染色した。各群雌雄 10 例ずつのサテライト群について, 6 時間単回暴露の 1, 6 および 24 時間後に FOB に基づく評価を行なった。他の反復暴露群の雌雄各 10 例においても FOB を 2, 3, 5, 9 および 14 週に実施した。Schulze 法の修正版を用い, 各群雌雄各 10 例について 5, 9 および 14 週に自発運動を検査した。自発運動評価の前に全動物の FOB を実施した。神経病理学的検査を 6/10 例で実施した。剖検および病理組織学的検査を 14 週 (各群 16 あるいは 10 例) および回復群は 19 週 (各群 10 例) に実施した。19 週では, 低用量および中間用量群動物の剖検または病理組織学的検査は実施しなかった。病理組織学的評価は高用量群および対照群の 39 器官について実施した; 肺は全群で検査した。神経病理学的検査に供した動物から以下の器官を採取した: 脳, 脊髄, 坐骨神経, 腓腹神経, 脛骨神経, ガッサー神経節後根神経節, 後根および前根線維。

結果

死亡および一般状態の観察

高用量群の雌雄各 1 例が 36 および 33 日目に死亡した。これらの動物は 32 日目の採血後に死亡したが, 投与に関連した死亡と考えられた。しかし, 死亡の原因は剖検および病理

組織学的評価においても特定できなかった。高用量群では、TAME 暴露期間中に大部分の動物が虚脱を示した。中間用量群においても暴露の最初の 1 カ月間に虚脱あるいは嗜眠が観察された。試験後半では、この群の数例に努力性呼吸および嗜眠がみられた。低用量 (250 ppm) 群では試験期間中に異常な症状はみられなかった。回復期間中の高用量群の観察所見は対照群と同様であった。

眼科学的検査

試験終了時、1,500 および 3,500 ppm の雌雄動物では用量相関的な角膜の癒痕形成が増加した。高用量群の発現頻度は雄で 20% および雌で 28% であり、中間用量群では雌雄ともに 12.5% であった。250 ppm 群では癒痕形成は観察されなかった。対照群の発現頻度は雌雄それぞれ 3.8% であった。4 週間の回復期間終了後における発現頻度は高用量群雄で 30% および雌で 20% であったが、対照群では認められなかった。しかしながら、F-344 ラットでは加齢とともに癒痕形成が増加する。本試験では、TAME は 1,500 および 3,500 ppm 暴露群における発症を増加させた。

体重および摂餌量

3,500 ppm 群では平均体重および体重増加量が有意に減少した。この減少は雌よりも雄でやや強く、平均体重は雌では 6.9% 低く、雄では 10% 低かった。平均体重は回復期間終了後の 18 週でもなお雄で 9.4% および雌で 3% 減少した。250 および 1,500 ppm の平均体重および体重増加量が高用量群と同じ規模で有意に増加したが、この変化は毒性学的には意義はないと判断される。最高用量群の雌雄動物で最初の 2 週間の暴露で摂餌量が統計学的に有意に減少した。低用量および中間用量群の雌雄で摂餌量の散発的な減少および増加がみられた。

神経行動試験

サテライト群の各群雌雄各 10 例への 6 時間単回暴露 (3,500 ppm) では、暴露の 1 時間後で中枢神経系および神経筋接合部に投与に関連した影響がみられた。この影響は中枢神経系の抑制および神経筋接合部の障害であった。単回暴露の 6 あるいは 24 時間後にはこの影響は消失し、TAME 反復暴露後にはみられなかった。FOB における単回暴露の無影響量 (NOEL) は 250 ppm であった。神経毒性の証拠は、3,500 ppm 群雌雄動物でみられた 4~5% の体重減少のみであった。雄では回復期間後においても 3% 減少のままであった。

血液学的検査

3,500 および 1,500 ppm 群の雌雄動物では、血小板数が 5 および 14 週で統計学的に有意に増加した。これらの値は 4 週間回復期間後には正常に回復した。その他に、対照群と比較して軽度ではあるが統計学的に有意なヘモグロビン量、ヘマトクリット値あるいは赤血球数の減少が投与全群の雄でみられた。しかしながら、これらはすべて正常な生理学的範囲内にあり、また、変化は暴露濃度に関連していないことから、著者らはこれらの変化が毒性学的に重要であるとは判断しなかった。総白血球数に減少はみられなかったが、5 週目の高用量群の雌雄および 14 週目の高用量群雄で絶対好中球数が増加し、同時にリンパ球の絶

対数が減少した。著者らは、それらが総白血球数の変化を伴っていないので、ストレスを暗示する通例の変化とみなした。高用量群雌の総白血球数およびリンパ球の絶対数が僅かではあるが統計学的有意に増加した以外は、好中球およびリンパ球の値は対照群のレベルに戻った。

血液化学的検査

1,500 および 3,500 ppm 群の雌雄動物で総たん白が有意に増加した。この変化はアルブミンとグロブリンの増加およびアルブミン/グロブリン比の低下を伴っていた。これらは 4 週間回復期間後には正常に回復した。投与全群の雄では 5 週目で、また、250 および 3,500 ppm 群では 14 週目でアルカリホスファターゼ活性が有意に低下した。さらに、1,500 および 3,500 ppm 群の雌では 14 週目でアルカリホスファターゼ活性が有意に低下した。高用量群の雄を除き、回復期間後の活性は正常であった。これらの変化は正常な変動の範囲内にあり、毒性的に意義があるとは判断しなかった。低用量および中間用量群の雄では 5 週目で、高用量群の雄では 19 週目で血中尿素窒素 (BUN) が軽度に増加した。その他にも散発的なあるいは一貫性を欠く血液化学測定値の変化がみられたが、これらはすべて毒性的には重要な変化ではなかった。

器官重量および病理組織学的所見

暴露期間終了時、3,500 ppm 群の雌雄動物に統計学的に有意な平均脳絶対重量の 4~5% の減少がみられた。3,500 ppm 群の雄では脳 - 体重比の有意な増加を伴っていた。この雄の脳相対重量増加は、絶対重量が 3% 増加したにもかかわらず、回復期間後においてもみられた。雌の脳の絶対および相対重量は回復期間後には正常であった。雄の脳重量減少の所見は、脳重量が対照群と類似していた神経病理試験動物の脳面積計測とは一致しなかった。しかし、これは全身暴露によるデータであり、固定過程で気づかない僅かな変化が生じたのかもしれない。

肝臓重量 (絶対重量, 体重および脳重量に対する相対重量) が投与全群 (250, 1,500 および 3,500 ppm) の雄ならびに 1,500 および 3,500 ppm 群の雌で増加した。対照動物と比較した絶対重量の%変化は 19% (250 ppm), 18% (1,500 ppm) および 22% (3,500 ppm) であった。脳に対する相対重量で表すと、対照群と投与群間の差は 13% (250 ppm), 17% (1,500 ppm) および 26% (3,500 ppm) であった。肝臓重量は回復期間後には正常に回復した。重量変化との関連性を窺わせるような肝臓の病理組織学的所見は認められなかった。

腎臓の体重および脳重量に対する重量比が 3,500 ppm 群の雌雄動物で増加した。雌では体重に対する腎臓相対重量の対照との差は 15% で、脳に対する相対重量の差は 13% であった。雄におけるこれらの差はそれぞれ 21% および 13% であった。1,500 ppm 群の雌の腎臓絶対および相対重量が増加した。1,500 ppm および 250 ppm 群の雄の腎臓絶対重量および脳に対する重量比は対照と比較して統計学的に有意に増加した。1,500 ppm 群の雄の対照群との差は絶対重量で 18%, 脳との相対重量で 15% であり、250 ppm 群の雄ではそれぞれ 12% および 8% であった。後者の群の増加は最終体重の増加と一致していた (250 ppm では ~9% および 1,500 ppm では 15% それぞれ対照より高い)。病理組織学的検査では、細胞増殖および雄ラットに特異的な α -2u-グロブリン症候群の証拠が認められた。これらの所見は雄の腎臓重

量増加に寄与したが、雌ラットでは現れなかった。

心臓の相対重量（体重）についても 3,500 ppm 群の雄（15%）および雌（7%）で統計学的に有意な増加がみられた。また、雄は回復期間終了時においても高値のままであった（10%）。250 ppm 群の雄では絶対重量が増加した（11%）。1,500 ppm 群の雄では絶対重量（17%）および脳に対する相対重量（14%）が増加した。しかし、これらの変化は、脳に対する相対重量には対照群との差はみられなかったことから、体重の増加に起因するものであった。

副腎重量（絶対および相対（体重）重量）が 3,500 ppm 群の雄（55%）および雌（45%）で統計学的に有意に増加した。1,500 ppm 群では絶対重量が雄で 20%および雌で 16%増加した。また、相対重量も雄で 17%および雌で 15%増加した。250 ppm 群では雄の絶対重量が 14%および脳に対する相対重量が 10%増加した。4 週間の回復期間終了後には、高用量群の雌の副腎絶対重量の増加は 11%まで低下した。高用量回復群の雄の平均副腎絶対重量値は対照群と類似した値であった。高用量群の雄では、副腎の絶対重量および脳に対する相対重量のみが統計学的有意に増加した。これは、高用量群の雄動物の最終体重および脳重量が低かったことに起因していた。副腎の病理組織学的検査では損傷はみられず、副腎重量の変化は暴露によるストレスが原因であった。

全身暴露あるいは試験の神経病理の部分のいずれにおいても、暴露に関連した病理組織学的な毒性所見は認められなかった。

考察

3,500 ppm 群の雌雄および 250 ppm 群の雄の副腎の絶対および相対重量の増加は、著者らの説明によれば被験物質暴露によるストレス反応であった。病理組織学的な損傷がなかったことから、著者らはこれが被験物質の直接的な影響とは判断しなかった。雄のみの所見であるが、 α -2u-症候群に関連した腎尿細管の細胞増殖がみられ、これが 3,500 ppm 群の雄の腎臓重量の原因となったものと考えられる。3,500 および 1,500 ppm 群の腎臓重量増加は毒性学的な事象として説明することはできない。4 週間回復期間終了時には、高用量群の雌雄の腎臓絶対重量および脳に対する相対重量に対照群との差はなかったが、体重に対する相対重量は増加した。

投与全群に肝臓重量の増加がみられたため、雄動物の無影響濃度（NOEC）は設定されなかった。著者らは 1,500 ppm の肝臓および腎臓重量の増加に基づいて雌の NOEC を 250 ppm に設定した。肝臓重量の増加は典型的な適応の型であり毒性ではないといえるが、副腎や、特に腎臓、あるいは体重増加を単純に適応現象と説明することはかなり難しい。副腎重量が組織的な毒性変化を伴わずに増加したか、あるいは血液学的検査値が「間接的」または「ストレスに関連」として割り引いて考えられるかどうか問題が残る。しかし、雄の腎臓/脳相対重量で 8%および副腎/脳相対重量で 10%増加したにもかかわらず、以下の論拠に基づいてこの用量は最低毒性濃度（LOAEC）として適切ではないとしている。重量増加は絶対重量または器官/脳相対重量で表した場合のみ統計学的に有意であった。低用量群の雄の体重も増加（+9%）していることから、この因子が寄与あるいは混乱の役目を演じている。

これらの動物に病理組織的な傷害がないことから、250 ppm の暴露濃度は最低限ではあるが NOAEC と判断される。

結論

雌雄動物の肝臓、副腎および腎臓の器官重量の増加に基づき、NOAEC は 250 ppm に設定する。

マウス、90 日間

全身暴露法を用い、CD-1 マウスに TAME を 250、1,500 および 3,500 ppm の濃度で暴露した (Huntingdon Life Sciences, 1997)。試験は GLP 基準に準拠して実施した。1 日 6 時間、週 5 日間で 65 回以上暴露した。試験計画書は先に記載した F-344 ラット試験とほぼ同じ方法とした。暴露濃度は入手した毒性データおよび爆発限界の 75% 以下の最高暴露限度に基づいて設定した。3,500 ppm 暴露群の死亡率が高かったため、TAME 濃度を減じ、高用量群 2,500 ppm を対照群とともに追加した。対照群および高用量群 (3,500 および 2,500 ppm) の動物数は雌雄各 46 例、250 および 1,500 ppm 群は雌雄各 36 例で試験を開始した。マウスを用いた試験では、各群雌雄各 8 例のサテライト群を用いて肝細胞増殖に対する TAME 暴露の影響を調べた。マウスの神経行動あるいは神経病理学的試験は実施しなかった。

結果

一般状態の観察

最初の高用量濃度の 3,500 ppm では、雄 26/46 例および雌 14/46 例が 3 回の暴露までに死亡した。新たに設定した暴露濃度 2,500 ppm では雄 14/46 例および雌 13/46 例が死亡した。これに対し、試験期間中の対照群の死亡は採血による雄 3 例および雌 2 例であった。高濃度の雄 4 例および雌 1 例の死亡は採血に関連していた。その他の死亡は主に TAME に起因するものであり、試験第 1 週目に発生した。高濃度暴露動物の一般状態の変化は主として努力性呼吸および虚脱であった。1,500 ppm 群の大部分のマウスでは嗜眠、数例に虚脱が観察された。低濃度群の死亡頻度は対照群と類似していた。

血液化学的検査

2,500 ppm 群の雌のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) および BUN が 14 週目に、1,500 および 2,500 ppm 群の雄の総たん白および雌のグロブリンが 5 週目にそれぞれ上昇あるいは増加した。これらの変化の多くは 4 週間の回復期間終了後には正常に回復した。

器官重量および病理組織学的検査

肝臓の絶対重量および脳に対する相対重量が 2,500 ppm 群の雌雄および 1,500 ppm 群の雄で有意に増加した。病理組織学的検査では、肝臓重量の増加と一致する肝小葉中心性肥大および増殖の亢進がみられた。肝臓の肥大は 2,500 ppm 群のマウスだけにみられた。雌の肝

臓相対重量（体重および脳）が僅かに高かったことを除き、これらの変化は回復期間終了後には正常に回復した。肝細胞増殖が 250 および 1,500 ppm 群の雌および 1,500 ppm 群の雄で統計学的に有意に増加した。これらは主に第 1 週のみに見られたが用量相関性はなかった。なお、2,500 ppm 群の雄では上記の統計学的有意差はなかった。この影響は 4 および 13 週にも見られたがその程度は小さくまた一貫性を欠いていた。標識指数の増加は 1,500 および 2,500 ppm 暴露マウスの肝細胞の小葉中心性および中間帯の腫脹との相互関係を示した。

結論

雌動物における肝臓の増殖所見には用量相関性がないこと、およびそれらは一過性的の変化であったことを考慮し、本試験の NOAEC は雌雄マウスともに 250 ppm である。

ラット, 4 週間

Sprague-Dawley ラットに目標 TAME 蒸気濃度 0, 500, 2,000 および 4,000 ppm を毎日 6 時間、週 5 日間で 4 週間暴露した (White ら, 1995)。暴露は 1 m³ の立方形チャンバーで実施した。体重は試験開始時および終了時ならびに試験期間中は週ごとに測定した。毎日の一般毒性学的な評価に加え、暴露開始 1 週間前および 1, 5 あるいは 20 回目の暴露後にラットの神経筋機能および知覚認知を FOB により評価した。最終暴露後、18 時間絶食させた後、麻酔した。血液学的検査のためのサンプルを採取した。各群 10 例について剖検し、下記の器官の重量を測定し固定した：脳、副腎、生殖腺、心臓、腎臓、肝臓、肺および脾臓。対照群および 4,000 ppm 群の器官のみを病理組織学的検査に供した。

結果

高用量 4,000 ppm 群の雌 4 例および雄 3 例が死亡した。死因は重度の中枢神経系 (CNS) の抑制に起因すると考えられた。4,000 ppm 群における一般状態の変化は鎮静、昏睡、運動失調、冷感触、眼瞼下垂、過敏、活動性低下および体位に対する影響であり、これらは 2,000 ppm 群でも観察された。暴露 1 時間後に実施した FOB 評価では上記一般状態の変化が確認された：4,000 ppm を暴露したラットでは、体温低下、ロータロッド遂行障害および着地時後肢開脚の増加とともにテイルピンチ反応、正向反射および背走地性の低下がみられた。試験期間終了 18 時間後に検査したラットでは CNS 抑制はみられなかった。4,000 ppm 群の雄のみで体重増加量が有意に減少した。この群の平均体重は 14% 低かった。2,000 および 4,000 ppm 群の雌雄の肝臓相対重量が有意に増加した。4,000 ppm 群の雄はこれらに加え、脳、肺、精巣、副腎および腎臓の相対重量が増加した。4,000 ppm 群の雌では肝臓重量の増加に加え、副腎相対重量が増加した。血液化学的検査値では軽微の変化がみられ、2,000 および 4,000 ppm 群の雄および 4,000 ppm 群の雌で血清コレステロールが増加した。アラニンアミノトランセフェラーゼ活性の上昇が 4,000 ppm の 1 例にみられた。この動物は肝トランスフェラーゼ活性の上昇と一致する多巣性肝細胞壊死を示した。しかしながら、これは 1 例だけの発生であり、毒性学的な意義は不明である。

結論

雌雄動物の肝臓重量が増加したことから、本試験の NOAEC は 500 ppm である。

皮膚投与

試験は実施されていない。

経口投与

ラット, 4 週間

Sprague-Dawley ラットの雌雄各 5 例にコーン油に溶解した TAME を 0, 125, 500 および 1,000 mg/kg の用量で経口投与した (Daughtrey ら, 1995)。陰性対照動物にはコーン油のみを投与した。投与は毎日 1 回, 週 7 回の 29 日間とした。ラットの一般状態を毎日観察し, 初回投与前とその後は週ごとに体重を測定した。剖検時に採取した血液サンプルを用い血液学および血液化学的検査項目を測定した。腎臓, 副腎, 肝臓, 精巣および卵巣重量を測定した。対照群および高用量群の動物では, これらに加え, 心臓, 脾臓あるいは異常のみられた器官について組織切片を作製して染色を施し, 病理組織学的検査に供した。

結果

高用量群では 4 例が死亡した。死亡は 6~9 日目に発生し, これらの 2 例は, 正確な死因は特定できなかったが, 被験物質に関連すると類推された。試験期間中, 大部分の動物は異常な症状を示さなかった。呼吸夾雑音および生殖器・肛門周囲の汚れが 1,000 mg/kg 群で数回観察された。1,000 mg/kg 群の雄の平均体重が 7 日 (-14%), 21 日 (-18%) および 28 日 (-19%) で有意に減少した。雌の体重は対照動物と差がなかった。摂餌量は 1,000 mg/kg 群の雌雄では 1 週で, また, 1,000 mg/kg 群の雄では 2 週で有意に減少した。副腎の絶対および相対 (体重) 重量が用量相関的に増加し, 500 (中間用量) および 1,000 (高用量) mg/kg 群の雄では統計学的に有意であった。各群の平均副腎重量値を以下に示す (g) :

対照 : 0.057 ± 0.010 , 125 mg/kg : 0.074 ± 0.015 , 500 mg/kg : $0.082 \pm 0.008^*$,

1,000 mg/kg : $0.100 \pm 0.010^{**}$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

中間用量群および高用量群の雄の腎臓相対重量も増加したが, 肝臓重量には統計学的な有意差はなかった。雌の器官重量はいずれも統計学的な有意差を示さなかった。高用量群の雄では活性化部分トロンボプラスチン時間および血糖値の増加がみられたが, これらの生物学的意義については不明である。腎臓および肝臓の肥大がみられた高用量および中間用量群の雄を含め, いずれの群および器官においても投与に関連した病理組織学的傷害は認められなかった。

結論

雄動物の副腎重量が増加したことから、本試験の無毒性量（LOAEL）は 125 mg/kg である。副腎重量の増加が 125 mg/kg から始まる用量反応であるとしても、この用量でみられた影響に統計学的な有意差がなかったことが偶発的な所見であるように見える。したがって、LOAEL は 125 mg/kg と設定されたが、この LOAEL は問題が残る。

4.1.2.6.2 反復投与毒性の要約

呼吸器系暴露に対する NOAEC は、雌雄 F-344 ラットを用いた 90 日間投与試験でみられた器官重量の増加に基づいて 250 ppm (1,060 mg/m³) が選択される。経口投与では、28 日間投与試験の雄 125 mg/kg 以上でみられた副腎重量の用量相関的な増加に基づき、NOAEL は 125 mg/kg が選択される。認められた影響からは有害性分類の必要性を認めない。

4.1.2.7 変異原性

4.1.2.7.1 *In vitro* 試験

微生物細胞

試験 1

OECD ガイドライン 471 に従って *Salmonella*/ミクロソーム試験により TAME の点突然変異（遺伝子突然変異）誘発能を調べた（Herbold, 1991）。TAME（純度 98.4%）濃度を 0, 8, 40, 200, 1,000, 2,000 および 5,000 µg/plate とし、試験菌株 TA98, TA100, TA1535 および TA1537 を使用した。40 µg/plate までの濃度は毒性を示さなかった。高濃度の TAME は菌株特異的な弱い毒性を示した。それでも、これらの濃度はすべて評価に有用であると判断された。Sprague-Dawley 雄ラット肝 S9 分画の代謝活性化の有無にかかわらず、5,000 µg/plate までの濃度で変異誘発性はみられなかった。

試験 2

試験菌株 TA98, TA100, TA1535, TA1537 および TA1538 を用いた変異原性試験を GLP 基準に準拠して（ガイドライン名の記載なし）実施した（Exxon Biomedical Sciences Inc, 1989c）。濃度は 0, 100, 316, 1,000, 3162 および 10,000 µg/plate を使用した。Sprague-Dawley ラットの肝臓を S9 分画の試料に用いた。被験物質の純度は約 93%であった。TA98 を用いた毒性予備試験では 10,000 µg/plate の濃度まで毒性はみられなかった。試験は 2 回実施した。TAME は、*Salmonella* において代謝活性化系の有無にかかわらず 10,000 µg/plate の濃度まで変異原性を示さなかった。

試験 3

TAME (94.5%) の 5 段階の濃度で *Salmonella* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および TA1538

における変異原性試験を非 GLP 適用下で実施した (ガイドライン名の記載なし)。TAME 濃度は 0, 100, 316, 1,000, 3,162 および 10,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とした (Daughtrey ら, 1995)。10,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の濃度まで毒性はみられなかった。いずれの菌株あるいは濃度においても突然変異発現頻度の増加はみられなかった。

哺乳類細胞

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞/ヒポキサンチンフォスホオリボシルトランシフェラーゼ (HGPRT)

HGPRT 遺伝子座への前進突然変異誘発能を評価するため、CHO 細胞における TAME の変異原性試験を実施した (American Petroleum Institute, 1996a)。TAME (純度の情報未入手) を CHO 細胞 (CHO-K1-BH4) の培養液に加え、ラット肝 S9 代謝活性化系非存在下で 1,000 ~ 5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ あるいは存在下で 500 ~ 5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度とした。これらの濃度はコロニー形成率に基づいて選択した。溶媒対照に対するコロニー形成率は、S9 代謝活性化非存在下の 5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 89% および S9 代謝活性化存在下の 5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は 42% であった。細胞毒性は細胞のコロニー形成率により評価した。変異頻度は、総変異体コロニー数をコロニー形成率で補正した生存細胞数で割ることにより算出し、 10^6 生存細胞数あたりの TG-抵抗性変異体で表した。生存率 10% 以下の用量のコロニー形成率は根拠の確実なデータポイントとは判断しなかった。コロニー形成細胞 10^6 中に変異コロニーが 40 個以上ある場合に陽性と判定した。試験施設の最近 3 年間における溶媒対照の変異コロニー発現頻度背景値の範囲は 0 ~ 20 あるいは S9 mix 添加で 0 ~ 40 である。陽性対照にはメタンスルホン酸エチルを使用した。

結果

いずれの被験物質処理培養においてもコロニー形成細胞 10^6 中に 40 以上の変異体はみられず、したがって、結果は陰性であった。

Table 4.15 Mutants frequencies per 10^6 clonable cells in the CHO/HGPRT assay

Treatment ($\mu\text{g}/\text{ml}$), exposure for 5 hours at 37 C	-S9	+S9
1,000	3.9	4.5
2,000	< 0.5	5.4
3,000	1.6	6.8
4,000	6.4	4.4
5,000	0.6	11.6

CHO を用いた染色体異常試験

CHO 細胞を用い、TAME の染色体異常誘発能を調べた (American Petroleum Institute, 1996a)。

試験は GLP 基準に準拠したが、ガイドライン名は記載されていない。被験物質の純度のデータも入手していない。濃度段階は溶媒対照に対する細胞増殖抑制に基づいて選択した。代謝活性化系非添加あるいは添加のいずれにおいても 5,000 µg/mL で少なくとも 50% の抑制がみられたことから、濃度は 313, 625, 1,250, 2,500 および 5,000 µg/mL とした。平均世代時間が代謝活性化系添加の最高濃度で約 24 時間遅れた。これに基づき、細胞採取時間は 20 時間に調整した。代謝活性化系非添加では 12 時間とした。

結果

染色体異常評価の最高濃度 (5,000 µg/mL) における毒性は約 43% であった。代謝活性化存在下での毒性は 5,000 µg/mL で 72% であった。染色体異常の統計学的に有意な増加が、代謝活性化系非添加の 2,500 µg/mL でみられた。しかし、この異常頻度は背景対照値の範囲内にあり、生物学的に重要とは判断しなかった。代謝活性化系存在下での 1,250, 2,500 および 5,000 µg/mL では異常細胞頻度の統計学的に有意な増加が観察された。この所見に基づき、TAME は CHO 細胞において、染色体異常誘発性が陽性と結論された。異常の型は主としてギャップを伴う染色分体切断および交換であった。代謝活性化系存在下での CHO 細胞の背景対照の異常頻度は 0~6% と報告されている。異常の分析には 200 細胞を用いた。

Table 4.16 Cytogenetic analysis of CHO cells with TAME

Treatment	Mitotic index	Aberrations/Cell	Cells with aberrations (%)
Untreated (harvest 12 hours)	5.3	0.010 ± 0.100	1.0
Ethanol (harvest 12 hours)	5.7	0.000 ± 0.000	0.0
625 µg/ml TAME -S9 (harvest 12 hours)	5.0	0.010 ± 0.100	1.0
1,250 µg/ml TAME -S9 (harvest 12 hours)	5.1	0.000 ± 0.000	0.0
2,500 µg/ml TAME -S9 (harvest 12 hours)	3.1	0.040 ± 0.196	4.0**+
5,000 µg/ml TAME -S9 (harvest 12 hours)	4.3	0.015 ± 0.122	1.5
Mitomycin C 0.08 µg/ml (harvest 12 hours)	2.8	0.100 ± 0.317	9.5
Untreated (harvest 20 hours)	10.1	0.000 ± 0.000	0.0
Ethanol (harvest 20 hours)	6.3	0.005 ± 0.071	0.5
625 µg/ml TAME +S9 (harvest 20 hours)	10.2	0.020 ± 0.140	2.0
1,250 µg/ml TAME +S9 (harvest 20 hours)	5.3	0.120 ± 0.395	10.0**
2,500 µg/ml TAME +S9 (harvest 20 hours)	4.6	0.290 ± 0.631	21.0**
5,000 µg/ml TAME +S9 (harvest 20 hours)	1.1	0.900 ± 1.742	39.5**
Cyclophosphamide 10 µg/ml (harvest 20 hours)	3.2	0.630 ± 1.528	32.5**

** p ≤ 0.01; Fisher's exact test

+ Statistically significant but within range of historical controls.

4.1.2.7.2 In vivo 試験

GLP 基準適用試験として、CD-1 マウス雌雄各 5 例にコーン油に溶解した TAME を 150, 375

あるいは 750 mg/kg の用量で単回腹腔内投与した (Exxon Biomedical Sciences Inc, 1989b)。投与量は予備試験結果に基づいて設定したが、予備試験では 1,000 mg/kg 投与で死亡が発生した。陰性対照群および TAME 投与群各群の雌雄各 5 例から投与 24, 48 および 72 時間後の 3 回、骨髄を採取した。陽性対照 (シクロフォスファミド) マウスのサンプリングは投与 24 時間後の 1 回とした。多染性赤血球 (PCE) 1,000 個から小核を有する PCE 数を求め、また、全赤血球 1,000 個から PCE と正染性赤血球 (NCE) の比を算出した。標準一元分散分析および回帰分析を行なった。

結果

TAME は CD-1 雌雄マウスの小核形成において統計学的に有意な増加を誘発しなかった。

Table 4.17 Mouse bone marrow micronucleus assay

Sacrifice time	End point	Sex	Control	150 mg/kg	375 mg/kg	750 mg/kg
24 hours	Micronuclei ¹	M	1.6 ± 1.3	0.8 ± 0.8	1.8 ± 1.1	2.0 ± 1.4
	Micronuclei	F	1.2 ± 0.4	1.4 ± 1.1	0.6 ± 0.9	2.2 ± 1.8
	%PCE ²	M	53 ± 6.3	52 ± 6.7	56 ± 3.6	54 ± 5.2
	%PCE	F	54 ± 5.0	60 ± 7.0	53 ± 7.9	52 ± 11
48 hours	Micronuclei	M	1.4 ± 1.3	1.6 ± 1.7	1.2 ± 0.4	1.6 ± 0.8
	Micronuclei	F	1.2 ± 1.3	1.2 ± 0.8	1.2 ± 0.8	1.6 ± 1.1
	%PCE	M	52 ± 7.7	54 ± 8.6	59 ± 6.0	61 ± 7.0
	%PCE	F	57 ± 6.3	60 ± 3.7	59 ± 5.6	61 ± 4.6
72 hours	Micronuclei	M	0.8 ± 0.4	0.8 ± 0.8	1.8 ± 1.3	0.6 ± 0.9
	Micronuclei	F	1.0 ± 0.7	2.0 ± 1.2	0.4 ± 0.5	1.0 ± 0.7
	%PCE	M	55 ± 6.2	58 ± 4.5	60 ± 3.2	65 ± 6.4
	%PCE	F	62 ± 6.6	60 ± 7.7	61 ± 4.6	65 ± 3.1

1) Mean micronuclei ± SD per 1,000 polychromatic erythrocytes

2) Mean percentage PCEs ± SD; PCE/(PCE+NCE) · 100

考察

TAME の変異原性についてはいくつかの点が明らかでない。細菌を用いたいずれの試験においても、あるいは TAME の点突然変異誘発能を調べた CHO 細胞においても遺伝毒性活性はみられなかった。しかしながら、TAME は *in vitro* における代謝活性化系存在下で CHO 細胞に用量依存的な染色体異常の明らかな増加を誘発した。しかし、マウスで実施した小核試験はすべての試料採取時間で陰性の反応を示した。

Sumner ら (1997) のトキシコキネティクス試験によると、100 あるいは 10 mg/kg 経口投与後、TAME および TAA は CD-1 マウスの大腿骨も含め、全身に均等に分布した。染色体異常が S9 mix 添加時でのみ引き起こされるように、TAME 代謝物の 1 つが染色体異常試験において陽性反応を誘発するように見える。MTBE から TBA への変換に関与するチトク

ロームのアイソフォーム 2A6 およびホルムアルデヒドもまた TAME の酸化的な脱メチル化に関与している。代謝経路の第 1 段階で TAA そしておそらくホルムアルデヒドが生成される。MTBE に対しては *in vitro* 遺伝毒性におけるホルムアルデヒドの役割がアルデヒド脱水素酵素との共インキュベーションで証明された。さらに、MTBE は前進突然変異頻度を計測した *in vitro* マウスリンフォーマ試験では陽性結果であった。これは細胞外でのホルムアルデヒド生成によって誘発されたと推測された。ホルムアルデヒドは *in vivo* および *in vitro* で染色体異常を誘発すると報告されている (IARC Monograph 62)。しかし、この場合、ヒトではホルムアルデヒドはいくつかの組織に存在するホルムアルデヒド脱水素酵素によって速やかに消失することから、ホルムアルデヒドが *in vivo* 試験において重要な役割を果たしている訳ではないようである (IARC Monograph 62)。学究的興味に資するためには、ホルムアルデヒド脱水素酵素およびその補助因子ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) の存在下で *in vitro* 染色体異常に関する試験を実施し、染色体異常誘発におけるホルムアルデヒドの役割についてさらに研究する必要がある。

40 ppm の TAME 暴露後の TAA (これは尿中主代謝物ではない) の血中半減期は、約 7 時間であった。TAA は血中では暴露 36 時間後においても検出されたが、TAME は 12 時間後に消失した。入手可能な TAA の変異原性データはない。

4.1.2.7.3 変異原性の要約および結論

要約

In vitro CHO 染色体異常試験において S9 活性化条件下で明らかな陽性結果が得られたが、おそらく代謝の過程で一時的に生成されるホルムアルデヒドがこの原因であろうと考えられる。しかし、ホルムアルデヒドはホルムアルデヒド脱水素酵素によって組織から効率的に消失することから、*in vivo* においては懸念の対象とはならないと判断される。このことは、TAME が *in vivo* で染色体異常を誘発しなかったマウス小核試験結果によって支持される。さらには、化合物の構造からも変異原性誘発の懸念はない。

Table 4.18 Summary of mutagenicity studies

Study type	Doses	Result with S9	Result without S9	Reference
Ames	0, 8, 40, 200, 1,000, 2,000 and 5,000 µg/plate	Negative	Negative	(Herbold, 1991)
Ames	100, 316, 1,000, 3,162 and 10,000 µg/plate	Negative	Negative	(Exxon Biomedical Sciences Inc, 1989c)
Ames	100, 316, 1,000, 3,162 and 10,000 µg/plate	Negative	Negative	(Daughtrey et al., 1995)
CHO/HGPRT	to 5,000 (no S9) or 500 to 5,000 µg/ml (S9)	Negative	Negative	(American Petroleum Institute, 1996b)
CHO/chromosome aberrations	313, 625, 1,250, 2,500 and 5,000 µg/ml	Positive	Negative	(American Petroleum Institute, 1996a)
In vivo: Micronucleus in CD-1 mice (i.p.)	150, 375 or 750 mg/kg (sampling at 24, 48 and 72 h)	Negative	-	(Exxon Biomedical Sciences Inc, 1989b)

結論

TAME は変異原誘発物質ではないと判断される。これ以上の試験実施の必要はないと判断される。

4.1.2.8 がん原性

8 週齢の Sprague-Dawley ラット雌雄各 100 例に、TAME (98%) を 0, 250 および 750 mg/kg の用量で経口投与した (Belpoggi ら, 2002)。TAME 試験と同時にジイソプロピルエーテルの試験を実施した。投与は週 4 日で 78 週間とした。動物が自然死するまで試験を継続した。試験は最後の動物が死亡した投与 135 週目に終了した。この時点での動物は 143 週齢であった。公表するには GLP 適用状況の記述が要求されるが、OECD データベースには GLP の陳述書がなく、また、施設名の記録もなかった。投与群と対照群間の腫瘍発生頻度の差を評価するために χ^2 検定により統計解析を行なった。用量関係の評価には Cochran-Armitage 検定を用いた。より詳細なプロトコルの記述については同じ号にある Soffritti ら (2002) のメチルアルコールおよびエチルアルコールのがん原性試験の論文を参考にした。その試験に使用したプロトコルを以下に記載する。

飲水量および摂餌量は最初の 13 週間では週 1 回、およびその後 104 週までは週 2 回測定した。試験期間は 104 週間とした。体重は試験終了まで 8 週ごとに測定した。臨床検査を 2 週ごとに実施した。死亡動物について剖検し、以下の組織および器官の検査を行なった：皮膚および皮下組織、脳、下垂体、ジンバル腺、耳下腺、ハーダー腺、顎下腺、頭蓋、舌、甲状腺、副甲状腺、咽頭、喉頭、胸腺、縦隔リンパ節、気管、肺および気管支幹、心臓、横隔膜、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、副腎、食道、胃、腸管、膀胱、前立腺、生殖腺および肩甲骨間脂肪体。

体重、毎日の飲水量および摂餌量ならびに行動には、投与および対照動物間に差はみられなかった。被験物質に関連した毒性症状は認められなかった。対照動物と比較して、40 および 104 週における雄動物の生存数が減少した。

すべての悪性腫瘍の発生頻度の比較では、TAME 投与動物および対照動物間に差はなかった。下記の腫瘍の発生頻度が増加したが、これらの多くには統計学的な有意差がなかった。

Table 4.19 Tumour incidences after oral TAME exposure

	0 mg/kg/d M	0 mg/kg/d F	250 mg/kg/d M	250 mg/kg/d F	750 mg/kg/d M	750 mg/kg/d F
Ear duct carcinomas	1/100	2/100	4/100	4/100	5/100	4/100
Interstitial tumours of the testis	0/100	-	3/100	-	4/100	-
Oligodendroglioma of the brain	0/100	2/100	4/100	2/100	3/100	2/100
Haemolymphoreticular neoplasias (lymphomas and leukaemia)	17/100	7/100	7/100	14/100 +	21/100	27/100 +*

* p < 0.01 using χ^2 -test

+ p < 0.05 using Cochran-Armitage test for dose-relationship

雌の血液リンパ細網系腫瘍を組織球型で分類してみると、750 mg/kg 群でもっとも頻度の高かった腫瘍はリンパ免疫芽球性リンパ腫（77.8% vs 対照群 42.9%）であり、リンパ芽球性リンパ腫は 3.8%（対照群 42.9%）、およびリンパ球性リンパ腫（LCL）が 3.7%であったのに対し、対照群では発生しなかった。LCL は中間用量群雌でもみられ 14.3%であった。中間用量群雌のリンパ芽球性リンパ腫の発生頻度は 14.3%、およびリンパ免疫芽球性リンパ腫は 42.9%であった。全群で細網肉腫が発生したが、用量相関性はなかった。雌動物の細網肉腫の発生頻度は対照群で 14.3%、250 mg/kg で 28.6% および 750 mg/kg で 18.6%であった。

考察

腫瘍発生頻度で唯一有意な増加がみられたのは 750 mg/kg 群の雌の血液リンパ細網系腫瘍であった。250 および 750 mg/kg の両投与群の雌で有意な用量反応がみられた。発生頻度の増加がみられた他の腫瘍は統計学的有意差あるいは用量相関性がなく、偶発性の所見と考えられる。試験に用いた投与群は 2 群のみであり、用量相関性を求めるのは困難である。

試験では報告されていないものがあり、例えば、死亡動物数の記述がなく、影響のあった群数と腫瘍発生頻度の評価が困難である。さらに、データがないため、一般毒性症状の評価が困難である。しかし、試験では対照群動物と比較して TAME 投与の雄では 56~88 週で死亡率が減少したとしている。

同じ計画で実施した試験（Belpoggi, 1995）では、化学構造的に TAME と密接に関連する

化学物質 MTBE の投与により血液リンパ細網系腫瘍の発生頻度に同じような増加がみられた。この試験においては精巣の間質細胞腺腫の有意な増加もみられた。TAME では統計学的有意差のない増加であったが、今回の試験の著者らも増加は僅かであることを示唆している。MTBE 誘発の組織球型血液リンパ細網系腫瘍は、TAME で誘発されたのと同じ腫瘍であった。TAME の最高用量（雌、750 mg/kg）でもっとも典型的な腫瘍はリンパ免疫芽球形リンパ腫（77.8%）であった。一方、MTBE の最高用量（雌、1,000 mg/kg）のこの組織球型の発生頻度は、すべての血液リンパ細網系腫瘍（12/60）の 66.7%であった。Bird らが実施した MTBE の吸入による 2 年間試験（1997）では血液リンパ細網系腫瘍の増加はみられなかったが、3,000 および 8,000 ppm の濃度で精巣の腫瘍が増加した。しかし、著者らは対照群の発生頻度が異常に低かったことから、これが被験物質に関連した所見であるとは判断しなかった。

TAME あるいは MTBE の Belpoggi の試験では、腫瘍発生頻度に関する背景対照の正確なデータは記述されていないが、オリジナルの MTBE 報告書には、ラット雌の血液リンパ細網系腫瘍の背景データは 10%未満であると記載されている。TAME 試験報告書は、同じ系統のラットおよび試験法が両試験に用いられたと述べている。

MTBE 試験の結果の記述では、総動物数を白血病が最初に観察された時点の動物数に補正している。この方法は白血病罹病前に死亡した動物はなかったとみなしているが、ラットの年齢がその時点では僅か 1 年であったことから、この考えは適正である。補正した結果、Cochran-Armitage 傾向検定で明らかな陽性および有意な用量相関性がみられた。通常、高用量動物では他の毒性により高い死亡率がみられるため、高用量群の分母が他の群よりも極めて少なくなり、このことが偽陽性の相関関係を招くことになる。しかし、TAME 試験では、生存動物数の減少は 40 週から 104 週の間で TAME 投与の雄のみに発生し、また、腫瘍の有意な増加は雌でしかみられなかったと報告している。

腫瘍は肺に局在するリンパ系由来であった。多能性幹細胞からリンパ系前駆細胞への分化は骨髄で起こる。被験物質による骨髄細胞の染色体損傷誘発能を試験したマウス小核試験の結果は陰性であった。その上、マウス試験では、1,000 mg/kg までの MTBE を 3 週間経口投与した結果、脾臓のリンパ球には重要な影響はみられなかったと結論している。脾臓のリンパ球は全リンパ球の約 25%を占める。

生涯投与試験ではリンパ腫や白血病のような自然発生性および特発性の腫瘍が発生することが知られており、これらの腫瘍の解釈を困難にしている。この施設でのこの腫瘍の背景発生頻度の正確なデータが大きな助けとなる。また、極めて近い関係にある MTBE の CD-1 マウスおよび Fisher ラットのがん原性試験ではリンパ球の腫瘍性変化の症状はみられなかった。公表された報告は毒性学的所見、統計解析および方法など多くの面で適切さを欠いており、結果の信頼性を低いレベルに終わらせている。MTBE と異なり、TAME 試験ではリンパ系および白血病腫瘍の分化に関する解析が行なわれなかった。米国の国家毒性プログラム（NTP）ガイドラインは、単核細胞性白血球と悪性リンパ腫および悪性リンパ腫と

組織球性リンパ腫のいずれをも生物学的あるいは統計学的評価の目的で組み合わせるべきではないと勧告している。今回の試験の情報に基づく、腫瘍の関連性の評価は困難である。

MTBE と同様に、TAME の分子構造はがん原性に関する懸念を生じるような特性をもつようには見えない。両化合物は共通の代謝物ホルムアルデヒドを持つが、ホルムアルデヒドはヒトの大部分の組織における代謝が速いため、これが問題とは考えられない。MTBE は EU あるいは国際がん研究機関 (IARC) では発癌物質としては分類されていない。TAME の疫学データはない。

結論

経口投与によるがん原性試験結果は 1 試験のみである。試験に用いた投与形態は通常とは異なり、2 用量段階しか設けなかった。その上、自然に生涯を全うするまで動物試験を継続し、予め設定した期間の終了後に屠殺する方法は採らなかった。本試験で発現した腫瘍は骨髄から生ずる細胞に由来するリンパ系由来の腫瘍であったが、骨髄細胞の染色体損傷誘発能を試験した TAME のマウス小核試験の結果は陰性であった。公表された報告はさまざまな面で適正とはいえず、結果の信頼性のレベルは低いものとなった。したがって、影響のあった群数および腫瘍発生頻度の解析は困難であった。TAME の変異原性試験の陰性結果は、変異原性が腫瘍発生における作用機序には寄与していないことを示している。分子構造の面からの警告はないことおよび関連物質 MTBE のがん原性試験結果は、がん原性が懸念のエンドポイントにはならないことを示唆している。試験結果に信頼が置けないことから、がん原性をエンドポイントとするリスクの特徴づけはできなかった。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 生殖能に対する影響

動物試験

Sprague-Dawley ラットを用いた 2 世代生殖毒性試験

GLP 適用の 2 世代生殖毒性試験において、離乳した雌雄の *Sprague-Dawley* ラット (F₀) に 0, 250, 1,500 および 3,000 ppm の TAME 蒸気を毎日 6 時間の週 5 日間で 10 週間吸入暴露した (Welsch ら, 1998, Tyl ら, 2003)。1 群雌雄各 30 例を使用した。体重、摂餌量および一般状態を毎日記録した。交配前の 3 週間、膣スメアを観察した。その後 F₁ 児を得るため、同群内で無作為に交配させた。交配期間、妊娠期間および授乳期間の毎日 6 時間、週 7 日間暴露した。出産後に F₀ 雄動物を剖検し、生殖系器官およびその他の選抜した器官 (高用量群と対照群) を調べた。すべての雄親動物についてアンドロゲン検査を行なった。F₁ 同腹児は出生後 4 日 (PND 4) に各群 10 例に調整し、出生後 28 日目に離乳させた。各 3 例ま

での雌雄同腹児を選んで剖検し、各群雌雄 30 例ずつを F₂ 児の親動物として選抜した。その後、F₀ 雌の剖検を行い、高用量群と対照群については生殖器系およびその他に選抜した器官の病理組織学的検査を実施した。選抜 F₁ 離乳児については 10 週間暴露し、最後の 3 週間には膣開口および包皮分離時期を調べ、膣スメアを観察した。これらの検査の結果、F₂ 動物の出生時に生殖器・肛門間距離を計測した。F₀ 動物を用いた手順に従い 2 週間交配させた。離乳後暴露されていない雌の膣開口および雄の包皮分離時期を検査するために、離乳時に各群雌雄 30 例を選抜した。各 3 例までの雌雄同腹 F₂ 児を選抜して剖検し、プロトコールに記載された器官の重量測定を実施した。

結果

成熟 F₀ および F₁ 動物の全身毒性

成熟後の F₀ および F₁ 動物の 1,500 および 3,000 ppm 暴露群で毒性所見が観察された。3,000 ppm 群の雌雄動物に運動失調および継続的な体重減少がみられた。3,000 ppm 群の妊娠期間では F₀ (妊娠 0~7 日, ~6%) および F₁ (妊娠 0~20 日, ~9%), また、授乳期間では F₀ (出産後 0~4 日, 5~9%) および F₁ (出産後 0~14 日, 7~10%) でそれぞれ体重が減少した。F₀ の 1,500 ppm 群では運動失調が観察されたが、体重および摂餌効率への影響はみられなかった。F₁ 母動物は授乳期間で体重が増加した。剖検では、F₀ および F₁ 雄で肝臓重量 (絶対および相対重量) が増加したが、雌の増加は雄よりも少なかった。F₀ 雄の相対 (体重) 重量が 1,500 ppm で 29% および 3,000 ppm で 33% 増加し、F₀ 雌の増加は 3,000 ppm で 24% であった。F₁ 雄の肝臓相対重量は 1,500 および 3,000 ppm 群ともに 22% 増加した。F₁ 雌の増加は 3,000 ppm で 14% であった。腎臓の相対重量が F₀ 雄 1,500 ppm で 21%、3,000 ppm 群の雄で 26% および雌で 9% それぞれ有意に増加した。一方、絶対重量は雄の全暴露群で 8~19% および雌では 3,000 ppm 群で 9% それぞれ有意に増加した。F₁ 雄では腎臓重量が 1,500 (18%) および 3,000 ppm (22%) で増加した。F₁ 雄の脾臓相対重量が 1,500 および 3,000 ppm 群で有意に増加したが、絶対重量には変化はなかった。副腎の相対および絶対重量が 3,000 ppm 群の雌雄で有意に増加した。

F₀ および F₁ 動物の生殖毒性

F₀ および F₁ 雄では 3,000 ppm で生殖腺に対して軽微な影響がみられた。この群でみられた最終体重の低値によると考えられる精巣の相対重量が増加した。3,000 ppm の F₁ 雄では前立腺絶対重量が有意に減少したが、F₀ では変化はなかった。また、3,000 ppm の F₁ 雄では精巣上体の精子数が減少した。F₀ では変化はなかった。F₀ 雄の異常精子数が対照群の 2.26% および 250 ppm 群の 2.40% に対し、1,500 ppm 群では 3.13% および 3,000 ppm 群では 5.49% であり、両群で増加したが、背景値の範囲内 (2.0±0.3%~6.1±3.3%) であった。F₁ 雄においても、異常精子数には対照群との間に有意差はなかったものの (0 ppm: 2.5%, 250 ppm: 2.7%, 1,500 ppm: 3.9%, 3,000 ppm: 3.5%), 増加傾向がみられた。交配率あるいは生存率、精巣の絶対重量、精巣上体あるいは精囊+凝固腺の絶対あるいは相対重量、前立腺

相対重量、精子の運動性あるいは精子形成に対する暴露の影響はみられなかった。病理組織学検査においても暴露の影響は認められなかった。

雌の膣上皮細胞周期あるいは性周期の長さに対する被験物質投与の影響はなかった。妊娠期間はF₁の1,500 ppm群で有意に延長したが、これはF₁の3,000 ppm群およびF₀雌ではみられなかったことから、おそらく毒性学的に重要な影響ではないと判断される。その他、同腹児当たりの着床数、胎児死亡率あるいは出生時(PND 0)の生存または死亡児数に有意な変化はみられなかった。

出生児では、1,500 および 3,000 ppm 群の F₁ および 3,000 ppm 群の F₂ 雄の包皮分離時期が有意に遅れた。3,000 ppm 群の F₁ ならびに 250 および 3,000 ppm 群の F₂ 雌の膣開口時期が有意に遅れた。これらの作用が F₂ 動物での生殖器・肛門間距離 (AGD) 計測のきっかけとなったと考えられた。3,000 ppm 群の F₂ 動物で AGD が有意に短縮した。これはおそらく出生時 (PND 0) の F₂ 児における同腹児当たりの体重の有意な減少 (~8%) に伴うものと考えられた。3,000 ppm 群 F₁ 児体重/同腹児が出生後 4, 7, 14, 21 および 28 日目まで有意に低かったにもかかわらず、哺乳期間中の F₁ 出生児の生存率には影響はみられなかった。1,500 ppm 群の F₁ 児体重は出生後 4, 7 (雌), 14, 21 および 28 日で減少した。250 ppm 群の F₁ 児体重/同腹児は出生後 14, 21 および 28 日 (28 日は雄のみ) で減少した。3,000 ppm 群では、F₂ 児の出生後 4 および 21 日目の生存率が低下し、哺乳期間中の体重が出生後 0, 4, 7, 14, 21 および 28 日目まで有意に減少した。1,500 ppm 群では出生後 14 および 21 日目の体重が低下した。250 ppm 群の F₂ 児に対する影響はみられなかった。1,500 および 3,000 ppm 群における死亡の増加は母動物の「明白な毒性および状態の悪化」によると考えられた。臨床観察では胃内の乳汁の欠乏による嗜眠あるいは低体温、噛み切られた尾、薄い被毛および数个所の血腫がみられた。

内分泌かく乱能

著者らは生殖毒性の目印としてみられた TAME による包皮分離および膣開口の獲得時期の遅れは内分泌かく乱活性として解釈できないとした。これは、仮にアンドロゲン活性あるいは抗アンドロゲン活性またはエストロゲン活性あるいは抗エストロゲン活性をもつとしたら、活性および性別に依存して問題とされる目印 (包皮分離および膣開口の獲得時期の遅れ) の 1 つが遅れる一方で、他の 1 つは速まるかあるいは影響を受けないことになるからである。例えば、TAME がエストロゲン拮抗物質であれば膣開口は遅れ、包皮分離時期は変わらないであろう。AGD についても同じことがいえる。TAME が例えば抗アンドロゲン物質であるならば、雄でのみ AGD の短縮が予想され、雌では AGD に変化がないかあるいは長くなるであろう。この場合はどちらも正しくない。一方、以前に著者らが包皮分離および AGD の有意な差は出生 0 日の有意な低体重によるとの理由で、これらを生殖毒性の証拠として簡単に片づけていたが、彼らが内分泌かく乱の否定的な証拠として用いたことには問題がある。

要約

TAME は 1,500 および 3,000 ppm 暴露で肝臓、副腎および腎臓重量の変化ならびに体重減少などの全身的影響を生じた。さらに、運動失調のような中枢神経系に対する一般毒性症状もみられた。雄生殖腺における毒性症状は軽度で、F₀雄の 1,500 ppm (3.13%) および 3,000 ppm 群 (5.49%) の異常精子数は有意に増加した。これらの変化は F₁ 雄においてもみられたが、統計学的な有意差はなかった。これらは背景データの範囲内にあることおよび生殖機能には影響がなかったことから、精子の異常の毒性学的な意義については疑問である。出生児の毒性として 1,500 および 3,000 ppm で、F₁ および F₂ 児における授乳期間中の体重減少や死亡率の増加、3,000 ppm 群の F₂ 雄における包皮分離時期の遅れおよび F₁ および F₂ 雌における膣開口時期の遅れがみられた。さらに、3,000 ppm 群の雌雄動物に体重減少とともに AGD の短縮がみられた。

その他の試験

ラットにテトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、ETBE、MTBE および TAME、ならびに MTBE と ETBE の 2 代謝物を 2 週間飲水投与した後、卵母細胞の受精能を検討した (Berger および Horner, 2003)。卵母細胞回収の 2 週間前に 0.3% TAME, MTBE および ETBE を Sprague-Dawley 幼若雌ラット (28~45 日齢) に投与した。対照群には飲用水だけを与えた。ゴナドトロピンで排卵を誘発した。投与期間終了後に屠殺し、卵管を取り出して卵母細胞を単離し、受精培養液に移した。受精前に透明帯を取り除いた。100 μL の培養液中の卵母細胞を 7×10^6 精子/mL または 0.5×10^6 精子/mL に希釈した 10 μL の精子で受精させた。 7×10^6 精子/mL および 0.5×10^6 精子/mL とともに 3 回の試験を行った。37°C で 20 時間インキュベートした後、卵母細胞をすすぎ、カバーグラスに移して検査に供した。エーテル類は雌の最終体重に影響を及ぼさなかったが、MTBE 暴露では対照群に比べ体重増加量が低かった。いずれの投与も卵母細胞の脆弱性に影響を与えなかった。しかし、今回の結果はエーテル類投与群において卵母細胞の受精能が TAME 摂取により低下したことを示した。卵母細胞の受精率は対照群で 84% および TAME 投与群では 64% であった。トリクロロエチレン暴露動物の卵母細胞においても受精能が低下し、精子の形質膜たん白結合能も低下した：穿通精子/卵母細胞の比は対照群の 1.84 に対して 0.3% TAME 投与群では 1.54 に低下した。

結論

1,500 ppm および 3,000 ppm で精子数に統計学的に有意な変化がみられたが、これらの変化は背景値の範囲内であった。さらに、生殖パラメータに影響はみられなかった。親動物に対する NOAEC は 250 ppm であった。生殖毒性に対する NOAEC は 3,000 ppm と設定された。出生児の毒性が 1,500 ppm でみられ、発生に関する影響に対する NOAEC は 250 ppm となった。

In vivo 投与した TAME は *in vitro* ラット卵母細胞の受精能に対する抑制作用をもつようで

ある。しかながら、この所見は2世代生殖毒性試験の所見と一致しなかった。したがって、今回の受精能所見の意義については不明である。

4.1.2.9.2 発生毒性

動物試験

ラット

Sprague-Dawley ラットに予備試験の結果に基づいて設定した TAME 目標濃度 250, 1,500 および 3,500 ppm を暴露した；予備試験の 7,000 ppm では死亡率が高く、4,000 ppm では母体毒性が現れたが、1,000 ppm では軽微な母体毒性のみであった（Welsch および Tyl, 1997b）。交配で精子が確認された雌ラット 25 例/群を妊娠（GD）6～19 日の 14 日間、毎日 6 時間暴露した。暴露開始前（GD 0～5）には毎日 1 回および暴露日では暴露前後に一般状態を観察した。母動物の摂餌量は GD 0～6, 6～9, 9～12, 12～15 および 18～20 日にそれぞれ測定した。出産の 1～1.5 日前に母動物を屠殺し、子宮の着床痕を調べた。精子が確認された雌の体重、肝臓および子宮重量を測定し、卵巣については黄体、また、子宮では着床数、吸収数ならびに死亡および生存胎児数を記録した。生存胎児の性別を調べ、体重を測定し、口蓋裂を含め外表の異常を観察した。同腹児ごとに生存胎児の約半数は内臓検査に供し、性別を確認した。内臓検査以外の胎児はすべて内臓を取り出し、内生殖器で性別を確認し、浸漬して染色後、骨格異常および変異の検査に供した。試験は GLP 基準に準拠し、有害物質規制法および汚染防止農薬有害物質局の試験ガイドライン案（US EPA, 1995b）に従って実施した。

結果

母体毒性

死亡、流産あるいは早産の母動物はみられなかった。評価対象同腹児母動物数（胎児数）は対照で 23 例（330 例）、250 ppm で 24 例（354 例）、1,500 ppm で 24 例（349 例）および 3,500 ppm で 21 例（298 例）であった。母動物の体重は 3,500 ppm でのみ減少し、GD12, 15, 18 および 20 日で有意であった。体重増加量が 1,500 および 3,500 ppm の GD 6～9 および 3,500 ppm の GD 6～20 で有意に減少した。肝臓絶対重量は群間で差はなかったが、3,500 ppm の相対重量（屠殺時の体重に対する）が増加した。3,500 ppm で発現した一般状態の変化は他試験と同様であり、TAME に典型的な運動失調、嗜眠、呼吸遅延およびあえぎ呼吸ならびに体重減少（測定期間内で ≥ 5 g）が暴露開始の最初の 10 日間に観察された。1,500 ppm 群の母動物においても嗜眠（GD 6 および 7 にそれぞれ 1 回）および立毛（GD 15）がみられた。摂餌量は 3,500 ppm 群の GD 6～9, 12～15, 15～18 および 18～20 日（暴露期間）ならびに GD 0～20（妊娠期間）で有意に減少した。1,500 ppm 群の摂餌量が GD 9～12 でのみ有意に減少した。以上を要約すると、GD 6～9 における母動物体重の減少に基づいて、1,500 ppm における母体毒性は明らかであった。

発生毒性

卵巣の黄体数，子宮内総着床数，着床前および着床後死胚数，同腹児当たりの生存胎児数および同腹児当たりの性比（%雄胎児）を含む妊娠測定項目に有意な変化はなかった。全胎児あるいは雌雄別ともに，3,500 ppm 群の胎児体重が有意に減少した。同腹児あるいは同腹の胎児ごとにみても，投与に関連した内臓あるいは骨格の奇形あるいは変異の増加はみられなかった。3,500 ppm での胎児体重の減少に基づき，Sprague-Dawley ラットにおける発生毒性に対する NOAEC は 1,500 ppm である。

マウス

上記と同施設と同じ研究者により，CD-1 マウスを用いた発生毒性試験が実施された (Welsch および Tyl, 1997b)。暴露濃度 250, 1,500 および 3,500 ppm を用いた。各群 5 例のマウスを妊娠 6～16 日の 11 日間，毎日 6 時間暴露した。母動物の体重を GD 0, 6, 9, 12, 15 および 17 日に測定した。摂餌量を GD 0～6, 6～9, 9～12, 12～15 および 15～17 日ごとに測定した。卵巣の黄体を計数し，着床数を記録した。子宮内の全胎児について胎児数および胎児体重を記録し，性別を調べ，外表異常の検査を行なった後，固定して染色した。各暴露群の同腹児の半分は内臓の奇形および変異について検査した。残りの半分は骨格の奇形および変異の検査を行なった。安全上の理由から，暴露中の動物の観察は行なわなかった。

結果

母体毒性

3,500 ppm 群の母動物 4 例が GD 6, 7, 8 および 9 日目に死亡した。1 例は暴露開始前に死亡した。流産はなかった。250 ppm 群の 1 例が早産した。3,500 ppm 群では，摂餌量 (g/day, g/kg/day) が GD 0～6 日で有意に増加したが，GD 9～12, 12～15 および 15～17 日ならびに GD 6～17 日（暴露期間）には有意に減少した。妊娠期間 0～17 日の摂餌量は群間で差はなかった。1,500 ppm 群の摂餌量が GD 6～9 日でのみ有意に減少した。データを g/kg/day で表した場合，3,500 ppm 群の母動物摂餌量の減少は GD 9～12 日のみであり，1,500 ppm 群では影響はみられなかった。妊娠測定項目に投与に関連した影響はなかった。母動物の体重減少が 3,500 ppm だけにみられ，GD 15 および 17 日では有意であった。体重増加量は 3,500 ppm の GD 9～12, 12～15, 15～17, 6～17 日（暴露期間）および GD 0～17 日（妊娠期間）で有意に減少した。250 および 1,500 ppm 群では体重増加の有意な変化はみられなかった。3,500 ppm 群では運動失調，腹臥位，嗜眠，頭部の振戦，斜視眼，あえぎ呼吸および呼吸遅延などの投与に関連した一般状態の変化が観察された。頭部の振戦および半閉眼は 1,500 ppm 群においても観察されたが，1 例および 1 日のみ (GD 10 日) の所見であった。1,500 および 3,500 ppm 群の肝臓絶対および相対重量が増加した。肝臓の絶対重量が 1,500 ppm で増加したが，3,500 ppm では変化はなかった。肝臓絶対重量は以下のとおりである (g) : 0 ppm: 2.72 ± 0.06 , 250 ppm: 2.81 ± 0.06 , 1,500 ppm: $2.96 \pm 0.06^*$, 2.86 ± 0.06 。また，肝臓相対重量 (帝王切開時の体重) を同様に記述した (g) : 0 ppm: 5.78 ± 0.12 , 250 ppm: 5.61 ± 0.05 , 1,500 ppm: $6.41 \pm$

0.13**, 6.91 ± 0.12** (*p<0.05, **p<0.01)。全体的にみると、3,500 ppm 群では明らかに母体毒性が発現し、1,500 ppm 群では肝臓に軽度な適応反応がみられた。

発生毒性

全妊娠動物で 1 例以上の胎児がみられた。評価した同腹児母動物数（胎児数）は 0 ppm で 23 例（252 例）、250 ppm で 21 例（258 例）、1,500 ppm で 22 例（244 例）および 3,500 ppm で 19 例（193 例）であった。3,500 ppm 群では同腹児の後期胎児死亡が有意に増加（対照群：8.7%，3,500 ppm 群：36.8%）し、胎児体重/同腹児が対照群と比べ有意に減少（-40%）した。奇形および変異では、口蓋裂および側脳室の拡張の発現頻度が増加した。口蓋裂は 3,500 ppm 群では 6 同腹児中 11 胎児、1,500 ppm 群では 3 同腹児中 3 胎児に発現した。側脳室拡張の発現頻度は濃度に相関して増加した：対照群では 8 胎児/ 8 同腹児、250 ppm 群では 4 胎児/6 同腹児、1,500 ppm 群では 7 胎児/7 同腹児および 3,500 ppm 群では 38 胎児/16 同腹児であった。

考察

著者らは口蓋裂の発生は高濃度 TAME の麻酔作用からのストレスに起因するコルチコステロンの上昇に関連しているとした。一般に、母動物のストレスが口蓋裂の説明に用いられているが、この奇形の病変形成には極めて複雑な多因子過程があり、母動物のストレスにより引き起こされるコルチコステロン誘導に伴う生体異物作用もその 1 つであろう。しかしながら、この試験では、この仮説を支持するコルチコステロンあるいはその他のストレス症状の測定は実施されていない。そのうえ、1,500 ppm 群では母動物に現れた臨床毒性症状は極めて少ない。一般状態の変化は母動物 1 例で妊娠 10 日目に発現した「半閉眼」と「頭部の振戦」だけである。この母動物の胎児では口蓋裂は発現していない。口蓋裂奇形児がみられた母動物 3 例はこれらの奇形に関連するようないかなる特別な毒性症状も示さなかった。暴露中の観察ができなかったため、母動物のストレスに関連するような症状が記録されなかったのかも知れない。反復投与毒性の項で再評価した 90 日間試験で、試験期間中大部分の動物が嗜眠を示し、また、数例で虚脱が観察されたと報告している。これは Welsch の試験でもよくみられているが、一般状態の変化は暴露の前後しか観察されていないため、嗜眠あるいは虚脱の症状が消失した可能性がある。これは時には口蓋裂と関連づけて考えられるが、もう 1 つの仮説は食餌制限であり (Daston ら, 1991)、時折肝臓で亜鉛メタロチオネイン酵素を誘導し、奇形をもたらす亜鉛分布に影響を及ぼすことがある。奇形胎児をもつ母動物を個々に詳しく調べても、これらの母動物は異常に低い摂餌量あるいは体重減少を示さなかった。摂餌データを g/kg/day で表した場合、1,500 ppm 群は対照群と比べて摂餌量に差を示さなかった。口蓋再配向の妨害における神経伝達物質の役割が知られている (Zimmermann, 1985)。例えば、セロトニンあるいはアセチルコリンは口蓋再配向過程に刺激性に作用するのに対して、 γ -アミノ酪酸 (GABA) は抑制的に働く。非ニューロンの、すなわち口蓋上皮の GABA 作用系が口蓋発生に関係していることが最近の研究で示された (Homanics ら, 1997)。しかし、このデータは、現状において GABA や他の化学伝達物質の役割について結論を引き出すには十分とはいえない。Welsch および Tyl の試験

(1997)の施設背景対照データセットでは、1991年および1993年に実施した2試験で奇形を調べた対照群 589 胎児の所見が載っている。観察された口蓋裂は1例であった。要約すると、現在の知識に照らして、口蓋裂発生機序がヒトに当てはめられるとの確かな結論を引き出すには至らないが、これらの奇形は極めて高用量で発生していることから、ヒトとの関連性は低いと考えられる。

平均胎児体重（雌雄別および雌雄合計）が対照胎児の約 60%であり、内臓検査で観察された大脳の変異は発達の遅れと一致していた。

4.1.2.9.3 生殖に対する毒性の要約

ラットを用いた2世代試験

NOAEC は、親動物の全身毒性に対して 250 ppm、生殖毒性に対して 3,000 ppm および出生児に対して 250 ppm である。TAME にみられた影響は内分泌かく乱物質で予想される影響とは一致していなかった。

ラットを用いた発生毒性試験

1,500 および 3,500 ppm で母体毒性が現れ、特に最高濃度では体重の減少、体重増加量の減少および種々の一般状態の変化が顕著であった。母動物に対する NOAEC は 250 ppm である。3,500 ppm の同腹児でみられた体重減少および 250 あるいは 1,500 ppm では胚・胎児に対する影響がみられなかったことに基づき、Sprague-Dawley ラットの発生毒性に対する NOAEC には 1,500 ppm が選択される。

マウスを用いた発生毒性試験

暴露開始4日間で 3,500 ppm 群の母動物 4 例が死亡した。1,500 ppm 群 (11%) および 3,500 ppm 群 (20%) では、肝臓の絶対および相対重量が有意に増加した。1,500 ppm でみられた毒性 (11%の肝臓重量増加) は、それが胎児奇形の原因となる母体毒性を表すというより、むしろ肝臓の軽度な適応を表すものであろう。したがって、母体毒性に対する NOAEC は 1,500 ppm とする。発生への影響に対する NOAEC は、CD-1 マウスでは 1,500 ppm およびより高頻度に 3,500 ppm でみられた奇形 (口蓋裂) に基づいて、250 mg/kg とする。

結論

生殖能に対する毒性

NOAEC は 3,000 ppm (12,720 mg/m³) である。1,500 ppm および 3,000 ppm の F₀ 雄動物で異常精子数の統計学的に有意な増加がみられたが、この異常精子への影響はこれらの濃度において強い全身毒性を伴って発現した。そのうえ、生殖行動の遂行におけるその他の重

要な影響はこれらの濃度では報告されていない。したがって、このエンドポイントがリスクを特徴づけることにはならないと判断される。

発生毒性

マウスの 1,500 ppm および 3,500 ppm における奇形（口蓋裂）ならびに 2 世代試験の出生児にみられた体重減少に基づき、NOAEC は 250 ppm (1,063 mg/m³) とする。軽度の母体毒性が 1,500 ppm でみられたが、このことだけでマウスの奇形発現を説明するのは十分ではない。