

エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートのラットを用いた吸入による2週間毒性試験報告書

試験番号：0735

CAS No. 111-15-9

2009年12月25日

中央労働災害防止協会  
日本バイオアッセイ研究センター

目次

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| 標題                        | .....   |
| 試験目的                      | .....   |
| 試験法                       | .....   |
| 試験委託者                     | .....   |
| 試験施設及び運営管理者               | .....   |
| 試験日程                      | .....   |
| 試験関係者一覧                   | .....   |
| 試験資料の保管                   | .....   |
| 試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付 | .....   |
| 陳述書                       | .....   |
| 本文                        | .....   |
| TABLES                    | A ~ K   |
| FIGURES                   | 1 ~ 3   |
| APPENDICES                | 1-1 ~ 3 |

## 標題

エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートのラットを用いた吸入による 2 週間毒性試験

## 試験目的

エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートの吸入によるがん原性試験の投与濃度決定試験(13 週間試験)の予備試験として、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートをラットに 2 週間全身暴露(経気道投与)して、その生体影響を検索した。

## 試験法

本試験は OECD 化学品テストガイドライン 412(反復投与吸入毒性:28 日又は 14 日試験 1981 年 5 月 12 日採択)を参考にして実施した。

## 試験委託者

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課  
東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

## 試験施設及び運営管理者

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター  
副所長 長野 嘉介  
神奈川県秦野市平沢 2445

エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートの  
ラットを用いた吸入による 2 週間毒性試験報告書

試験番号：0735

本文

## 本文目次

|                                    | 頁 |
|------------------------------------|---|
| 要約 .....                           | 1 |
| 試験材料 .....                         | 2 |
| - 1 被験物質の性状等 .....                 | 2 |
| - 1 - 1 名称等 .....                  | 2 |
| - 1 - 2 構造式及び分子量 .....             | 2 |
| - 1 - 3 物理化学的性状等 .....             | 2 |
| - 2 被験物質の使用ロット等 .....              | 2 |
| - 3 被験物質の特性・同一性、安定性 .....          | 3 |
| - 3 - 1 特性・同一性 .....               | 3 |
| - 3 - 2 安定性 .....                  | 3 |
| - 4 試験動物 .....                     | 3 |
| 試験方法 .....                         | 4 |
| - 1 投与 .....                       | 4 |
| - 1 - 1 投与経路 .....                 | 4 |
| - 1 - 2 被験物質の投与方法 .....            | 4 |
| - 1 - 3 投与期間 .....                 | 4 |
| - 1 - 4 投与濃度 .....                 | 4 |
| - 1 - 5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由 ..... | 4 |
| - 1 - 6 被験物質の発生方法と濃度調整 .....       | 5 |
| - 1 - 7 被験物質濃度の測定 .....            | 5 |
| - 2 動物管理 .....                     | 5 |
| - 2 - 1 各群の使用動物数 .....             | 5 |
| - 2 - 2 群分け及び個体識別方法 .....          | 6 |
| - 2 - 3 飼育条件 .....                 | 6 |
| (1) 飼育環境 .....                     | 6 |
| (2) 飼料 .....                       | 7 |
| (3) 飲水 .....                       | 7 |

|         |                |    |
|---------|----------------|----|
| - 3     | 観察・検査項目及び方法    | 7  |
| - 3 - 1 | 動物の生死及び一般状態の観察 | 7  |
| - 3 - 2 | 体重測定           | 7  |
| - 3 - 3 | 摂餌量測定          | 8  |
| - 3 - 4 | 血液学的検査         | 8  |
| - 3 - 5 | 血液生化学的検査       | 8  |
| - 3 - 6 | 病理学的検査         | 8  |
| (1)     | 剖検             | 8  |
| (2)     | 臓器重量           | 8  |
| (3)     | 臓器の採取保存        | 8  |
| (4)     | 病理組織学的検査       | 9  |
| - 4     | 数値処理と統計方法      | 9  |
| - 4 - 1 | 数値の取り扱いと表示     | 9  |
| - 4 - 2 | 統計処理           | 9  |
|         | 試験成績           | 11 |
| - 1     | 生死状況           | 11 |
| - 2     | 一般状態           | 11 |
| - 3     | 体重             | 11 |
| - 4     | 摂餌量            | 11 |
| - 5     | 血液学的検査         | 12 |
| - 6     | 血液生化学的検査       | 12 |
| - 7     | 病理学的検査         | 12 |
| - 7 - 1 | 剖検             | 12 |
| - 7 - 2 | 臓器重量           | 13 |
| - 7 - 3 | 病理組織学的検査       | 13 |
|         | 考察及びまとめ        | 14 |
| - 1     | 用量 - 反応関係      | 14 |
| - 2     | 13 週間試験の濃度決定   | 15 |
|         | 文献             | 16 |

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと ..... 17

## 要約

エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートのがん原性試験の投与濃度決定試験（13週間試験）の予備試験として、その生体影響を検索する目的で F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた吸入による2週間の試験を実施した。

本試験は、被験物質投与群5群と対照群1群の計6群の構成で、各群雌雄とも5匹とし、合計60匹を用いた。被験物質の投与は、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートを1日6時間、1週5日間で2週間、動物に全身暴露することにより行った。投与濃度は、雌雄とも0（対照群）、50、100、200、400及び800 ppm（v/v）とした。観察、検査として、生死確認、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートの暴露の結果、動物の死亡はみられず、一般状態の観察でも変化はみられなかったが、体重増加の抑制が雄の800 ppm群と雌の400 ppm以上の群に認められた（最終体重は対照群に対し、雄800 ppm群：88%、雌400 ppm群：93%、800 ppm：89%）。摂餌量の低下が、雄の800 ppm群は投与1と2週目、雌の800 ppm群は投与1週目にみられた。

血液学的検査では、雌の800 ppm群に赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低値がみられ、雄の800 ppm群でもヘモグロビン濃度の低値がみられ、また、網赤血球比の低値が雄の400 ppm以上の群及び雌の200 ppm群と400 ppm群にみられた。さらに、白血球数の低値が雄の400 ppm以上の群と雌の200 ppm以上の群でみられた。

血液生化学的検査では、雄に総蛋白の低値が400 ppm以上の群で、A/G比の高値が200 ppm以上の群で、総コレステロールの低値が800 ppm群で、カルシウムの低値が200 ppm以上の群でみられた。雌では、A/G比とトリグリセライドの高値が800 ppm群で、リン脂質の高値が400 ppm以上の群でみられた。

剖検では、暴露の影響と思われる変化はみられなかった。

臓器重量の測定では、胸腺の重量低下が雌雄の400 ppm以上の群（実重量と体重比）にみられた。また、雄では肝臓の重量低下が800 ppm群（実重量と体重比）と400 ppm群（実重量）に、精巣の重量低下が800 ppm群（実重量と体重比）にみられた。

病理組織学的検査では、800 ppm群の雄の精巣に精細管萎縮が認められた。この精細管萎縮は精母細胞以降のステージにある精細胞の傷害であった。

以上の結果より、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートの13週間試験の投与濃度は雌雄とも、400 ppmを最高濃度とし、以下200、100、50、25 ppm（公比2）とした。



試験材料

- 1 被験物質の性状等

- 1 - 1 名称等

名 称 : エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート  
( Ethylene glycol monoethyl ether acetate )

IUPAC 名 : 酢酸 2-エトキシエチル ( 2-Ethoxyethyl acetate )

CAS No. : 111-15-9

- 1 - 2 構造式及び分子量 ( 文献 1 )

構 造 式 :  $\text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_3$

分 子 量 : 132.16

- 1 - 3 物理化学的性状等 ( 文献 1 )

性 状 : 無色澄明の液体

比 重 : 0.975 ( 20 )

沸 点 : 156.4

蒸 気 圧 : 1.2 torr ( 20 )

溶 解 性 : 水に溶解 ( 23g/100g、20 )、芳香族炭化水素と混和

保 管 条 件 : 室温で暗所に保管

- 2 被験物質の使用ロット等

製 造 元 : 和光純薬工業(株)

規 格 : 和光特級

純 度 : 100.0%(和光純薬工業(株)検査成績データ)

使用ロット番号 : KWR2691

### - 3 被験物質の特性・同一性、安定性

#### - 3 - 1 特性・同一性

被験物質の同一性は、そのマススペクトルを質量分析計（(株)日立製作所 M-80B）を用いて測定し、また、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（(株)島津製作所 FTIR-8200PC）を用いて測定し、それぞれの文献値と比較することにより確認した。

その結果、被験物質のマススペクトルは文献値（文献 2）と同じフラグメントピークを示し、また、赤外吸収スペクトルも文献値（文献 3）と同じ波数にピークが認められ、被験物質はエチレングリコールモノエチルエーテルアセテートであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-1 に示した。

#### - 3 - 2 安定性

被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後にそのガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ（アジレントテクノロジー 5890A）を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

その結果、使用開始前と使用終了後の測定結果に差はみられず、使用期間中の被験物質は安定であることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-2 に示した。

### - 4 試験動物

動物は、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートのがん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせ、日本チャールス・リバー(株)（厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795）の F344/DuCr1Cr1j ラット（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 37 匹を 4 週齢で導入し、検疫、馴化を各 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 30 匹（群構成時体重範囲、雄：115～126g、雌：84～94g）を選別し、試験に用いた。

なお、がん原性試験に F344/DuCr1Cr1j ラット（SPF）を選択した理由は、遺伝的に安定していること、過去に多くのがん原性試験に用いたデータがあり、化学物質による腫瘍発生の感受性が知られていることによる。

## 試験方法

### - 1 投与

#### - 1 - 1 投与経路

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。

#### - 1 - 2 被験物質の投与方法

投与は、試験動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した被験物質を含む空気を送り込み、動物に全身暴露することにより行った。

#### - 1 - 3 投与期間

投与期間は、1日6時間、1週5日の暴露で2週間とし、計10回の暴露を行った。

#### - 1 - 4 投与濃度

投与濃度は、50、100、200、400及び800 ppm（体積比 v/v）の5段階（公比2）に設定した。なお、対照群は清浄空気による換気のみとした。

#### - 1 - 5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由

投与経路は、被験物質を生産、使用する作業環境における労働者への主な暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

投与期間は、がん原性試験の投与濃度決定試験（13週間試験）に使用する投与濃度を決定するため2週間とした。

投与濃度は文献を参考に以下のように決定した。Smythら（文献4）はラットを用いた急性毒性試験において、1500 ppmで4時間の吸入暴露を実施したところ、暴露終了から8時間後に6匹中2匹が死亡したと報告している。また、Ty1ら（文献5）が発生毒性試験に先立って行った実験では、ラットにおける8時間のLC<sub>50</sub>値は1500 ppmであったと述べている。さらにラットを用いた発生毒性試験で、母動物に妊娠6日から15日まで0、50、100、200、300 ppmの吸入暴露を実施したところ、100 ppm以上に肝臓相対重量の増加と血液学的変化、200 ppm以上に体重増加の抑制が観察されたと報告しており、ラットにおける母動物の無影響量（NOEL）は50 ppmであるとしている。

これらの文献を参考に、本試験の最高濃度は、LC<sub>50</sub> 値である 1500 ppm の約 1/2 の 800 ppm が、また、最低濃度は母動物の無影響量である 50 ppm が妥当であると判断した。従って、本試験の投与濃度は雌雄とも 800 ppm を最高濃度とし、以下 400、200、100、50 ppm (公比 2) とした。

#### - 1 - 6 被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質の発生方法は FIGURE 1 に示した。被験物質供給装置 (柴田科学(株)特注) の発生容器内のエチレングリコールモノエチルエーテルアセテートを循環式恒温槽で加熱しながら、清浄空気のパブリングにより蒸発させた。この被験物質の蒸気を清浄空気(搬送空気)と混合しながら、循環式恒温槽で一定温度に冷却、再加温し、一定濃度にした後、流量計を用いて一定量を各吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度はガスクロマトグラフで監視し、その濃度データをもとに設定濃度になるように被験物質の吸入チャンバーへの供給量を調節した。

#### - 1 - 7 被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、自動サンプリング装置付ガスクロマトグラフ ((株) 島津製作所 GC-14A) により、暴露開始前から暴露終了後まで 15 分ごとに測定した。

濃度測定結果を TABLE A に示した。各投与群の被験物質濃度は、その平均値と設定濃度の差 ( $(\text{平均値} - \text{設定濃度}) / \text{設定濃度} \times 100$ ) が 1.0% 以内、変動係数 (標準偏差 / 平均値  $\times 100$ ) が 1.5% 以内であり、高い精度でチャンバー内濃度が管理されていることが示された。

### - 2 動物管理

#### - 2 - 1 各群の使用動物数

投与群 5 群及び対照群 1 群の計 6 群を設け、各群雌雄各 5 匹の動物を用いた。

| 群名称       | 動物数 (動物番号)        |                   |
|-----------|-------------------|-------------------|
|           | 雄                 | 雌                 |
| 対照群       | 5 匹 (1001 ~ 1005) | 5 匹 (2001 ~ 2005) |
| 50 ppm 群  | 5 匹 (1101 ~ 1105) | 5 匹 (2101 ~ 2105) |
| 100 ppm 群 | 5 匹 (1201 ~ 1205) | 5 匹 (2201 ~ 2205) |
| 200 ppm 群 | 5 匹 (1301 ~ 1305) | 5 匹 (2301 ~ 2305) |
| 400 ppm 群 | 5 匹 (1401 ~ 1405) | 5 匹 (2401 ~ 2405) |
| 800 ppm 群 | 5 匹 (1501 ~ 1505) | 5 匹 (2501 ~ 2505) |

## - 2 - 2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めなかった動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（適正層別方式）により実施した（文献 6）。

動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間では尾に油性マーカーによる色素塗布、投与期間では耳パンチにより行った。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した室（604 室）に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

## - 2 - 3 飼育条件

### (1) 飼育環境

検疫期間中は検疫室（606 室）で、馴化期間及び投与期間中は、吸入試験室（604 室）の吸入チャンバー内で動物を飼育した。

検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境条件及び使用したケージを以下に示した。検疫室、吸入試験室の温度、湿度は実測値（平均値 ± 標準偏差）を < > 内に、また、吸入チャンバー内環境の測定結果は APPENDIX 2 に示した。検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境には、動物の健康状態に影響を与えるような大きな変化は認められなかった。

|               |  |
|---------------|--|
| 温 度           | : 検疫室 ; 23 ± 2 < 606 室 ; 23.0 ± 0.0 ><br>吸入試験室 ; 21 ± 2 < 604 室 ; 20.5 ± 0.2 ><br>吸入チャンバー内 ; 20 ~ 24   |
| 湿 度           | : 検疫室 ; 55 ± 15% < 606 室 ; 53 ± 1% ><br>吸入試験室 ; 55 ± 15% < 604 室 ; 62 ± 1% ><br>吸入チャンバー内 ; 30 ~ 70% (投与群の暴露中は除く)   |
| 明暗サイクル        | : 12 時間点灯(8:00 ~ 20:00) / 12 時間消灯(20:00 ~ 8:00)  |
| 換気回数          | : 検疫室・吸入試験室 ; 15 ~ 17 回 / 時<br>吸入チャンバー内 ; 12 ± 1 回 / 時   |
| 圧 力           | : 吸入チャンバー内 ; 0 ~ - 20 × 10Pa   |
| ケージへの動物の収容方法  | : 単飼   |
| ケージの材質・形状・寸法等 | :<br>検疫期間 ; ステンレス製 2 連網ケージ (170(W) × 294(D) × 176(H) mm/匹)<br>馴化期間 ; ステンレス製 6 連網ケージ (125(W) × 216(D) × 176(H) mm/匹)<br>投与期間 ; ステンレス製 5 連網ケージ (150(W) × 216(D) × 176(H) mm/匹) |

## (2) 飼料

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株) (千葉工場：千葉県千葉市美浜区新港 8-2) の CRF-1 固型飼料 (30kGy- 線照射滅菌飼料) を固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、被験物質暴露中及び定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

なお、試験に使用した飼料中の栄養成分と夾雑物についてはオリエンタル酵母工業(株) から分析データを使用ロットごとに入手し保管した。また、飼料中の夾雑物は試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認した。

## (3) 飲水

飲水は、全飼育期間を通して、市水 (神奈川県秦野市水道局供給) をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。ただし、被験物質暴露中は給水しなかった。

なお、飲水は、試験施設として実施している定期サンプリングによる飲水を(財)食品薬品安全センター秦野研究所 (神奈川県秦野市落合 729-5) に依頼して、水道法を参考にして規定した項目について分析し、結果を試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

### - 3 観察・検査項目及び方法

#### - 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察

動物の生死の確認は、検疫及び馴化期間中は毎日 1 回行い、投与期間中は暴露を行った日には暴露前と暴露後の 2 回、暴露をしなかった土曜日と日曜日には午前中に 1 回行った。

一般状態の詳細観察は、検疫及び馴化期間中は検疫開始日 (導入時)、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日 (群構成時) に行い、投与期間中は 2、4、7、10、14 日目の暴露開始前に行った。

#### - 3 - 2 体重測定

体重測定は、検疫及び馴化期間中は検疫開始日 (導入時)、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日 (群構成時) に行い、投与期間中は 2、4、7、10、14 日目の暴露開始前に行った。また、定期解剖動物の搬出時にも体重 (搬出時体重) を測定した。

### - 3 - 3 摂餌量測定

摂餌量は週 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、その値から 1 匹 1 日当たりの摂餌量を算出した。

### - 3 - 4 血液学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採血した血液を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示した。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数、網赤血球比、白血球数、白血球分類

### - 3 - 5 血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示した。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、 $\gamma$ -GTP、CK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

### - 3 - 6 病理学的検査

#### (1) 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

#### (2) 臓器重量

全動物について、下記に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、各臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

測定臓器：胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

#### (3) 臓器の採取保存

全動物について下記に示した器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で

固定した。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髓（大腿骨）、リンパ節（腋窩、腹壁等）、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、陰、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

#### （４）病理組織学的検査

全動物について、精巣と骨髓（大腿骨）を切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡により検査した。

#### - 4 数値処理と統計方法

##### - 4 - 1 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は ppm を単位として、小数点以下第 3 位まで測定し、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

体重は g を単位とし、整数値の 1 の位まで測定し、表示した。

摂餌量は g を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで測定し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を測定期間の日数で除し、1 日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

臓器実重量は g を単位とし、小数点以下第 3 位まで測定し、表示した。臓器重量体重比は臓器実重量値を搬出時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第 4 位を四捨五入し、小数点以下第 3 位までを表示した。

血液学的検査、血液生化学的検査は APPENDIX 3 に示した単位と精度により表示した。

なお、各数値データの平均値及び標準偏差は、上記に示した桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。

##### - 4 - 2 統計処理

各群の有効動物数は、供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数とした。

病理組織学的検査は、臓器ごとに検査不能臓器を除いた臓器数、その他の検査及び測定は、実施できた動物数を検査（測定）数とした。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量の測定値は、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には



一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には、各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較を行った。

各検定は 5%の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5%及び 1%の有意水準の表示を行った。

## 試験成績

### - 1 生死状況

生死状況を TABLE B 1, 2 に示した。

#### - 雌雄 -

動物の死亡はみられなかった。

### - 2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C 1, 2 に示した。

#### - 雌雄 -

特記すべき所見はみられなかった。

### - 3 体重

体重の推移を TABLE D 1 ~ 4 及び FIGURE 2, 3 に示した。

#### - 雄 -

投与濃度に対応した体重増加の抑制がみられた。統計的に有意な体重増加の抑制は 800 ppm 群に認められた。

投与群の最終体重は対照群に対し、50 ppm 群：99%、100 ppm 群：97%、200 ppm 群：96%、400 ppm 群：93%、800 ppm 群：88%であった。

#### - 雌 -

投与濃度に対応した体重増加の抑制がみられた。統計的に有意な体重増加の抑制は 400 ppm 群と 800 ppm 群に認められた。

投与群の最終体重は対照群に対し、50 ppm 群：96%、100 ppm 群：96%、200 ppm 群：96%、400 ppm 群：93%、800 ppm 群：89%であった。

### - 4 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1 ~ 4 に示した。

#### - 雄 -

投与濃度に対応した摂餌量の低下がみられた。統計的に有意な摂餌量の低値は 800 ppm 群の 1 と 2 週目に認められた。

投与群の対照群に対する平均摂餌量は、50 ppm 群：104%、100 ppm 群：99%、200 ppm 群：97%、400 ppm 群：93%、800 ppm 群：83%であった。

- 雌 -

投与濃度に対応した摂餌量の低下が投与 1 週目にみられた。統計的に有意な摂餌量の低値は 800 ppm 群の 1 週目に認められた。

投与群の対照群に対する平均摂餌量は、50 ppm 群：99%、100 ppm 群：104%、200 ppm 群：104%、400 ppm 群：93%、800 ppm 群：89%であった。

#### - 5 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F 1, 2 に示した。

- 雄 -

ヘモグロビン濃度の低値、MCV の高値が 800 ppm 群で、MCHC の低値が 200 ppm 以上の群、網赤血球比の低値が 400 ppm 以上の群でみられた。また、白血球数の低値が 400 ppm 以上の群でみられた。

- 雌 -

赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低値が 800 ppm 群で、MCV の高値が 100 ppm 以上の群で、MCHC の低値が 200 ppm 以上の群、網赤血球比の低値が 200 ppm 群と 400 ppm 群でみられた。また、白血球数の低値が 200 ppm 以上の群で、分葉核好中球比の高値が 800 ppm 群でみられた。

#### - 6 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示した。

- 雄 -

総蛋白の低値が 400 ppm 以上の群で、A/G 比の高値が 200 ppm 以上の群で、総コレステロールの低値が 800 ppm 群でみられた。また、ALT の低値が 800 ppm 群で、LDH と ALP の低値が 400 ppm 以上の群で、CK とカルシウムの低値が 200 ppm 以上の群でみられた。

- 雌 -

A/G 比とトリグリセライドの高値が 800 ppm 群で、リン脂質の高値が 400 ppm 以上の群でみられた。また、AST の低値が 800 ppm 群で、ALT の低値が 400 ppm 以上の群で、ALP の低値が 200 ppm 以上の群でみられた。

#### - 7 病理学的検査

##### - 7 - 1 剖検

剖検所見を TABLE H 1, 2 に示した。

- 雌雄 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

#### - 7 - 2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を TABLE I 1, 2 と TABLE J 1, 2 に示した。

- 雄 -

胸腺の実重量と体重比の低値が 400 ppm 以上の群に、肝臓の実重量の低値が 400 ppm 以上の群に、体重比の低値が 800 ppm 群に、精巣の実重量と体重比の低値が 800 ppm 群にみられた。

その他、腎臓の体重比の高値が 400 ppm 以上の群、副腎の実重量の低値、心臓と脳の体重比の高値が 800 ppm 群にみられたが、これらの変化は搬出時体重の低値によるものと思われる。また、腎臓の体重比の高値が 100 ppm 群にみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

- 雌 -

胸腺の実重量と体重比の低値が 400 ppm 以上の群にみられた。

なお、胸腺の実重量の低値が 50 ppm 群と 100 ppm 群に、体重比の低値が 50 ppm 群にみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

#### - 7 - 3 病理組織学的検査

精巣と骨髄（大腿骨）の病理組織学的検査の結果を TABLE K に示した。

- 雄 -

[ 800 ppm 群 ]

精巣に精細管の萎縮（軽度）が全動物でみられた。

精細管の萎縮は精母細胞以降のステージにある精細胞の減少によるもので、セルトリ細胞には異常を認めなかった。

[ 400 ppm 群、200 ppm 群、100 ppm 群、50 ppm 群 ]

被験物質の影響は認められなかった。

- 雌 -

全ての群で、被験物質の影響は認められなかった。

## 考察及びまとめ

エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートのがん原性を検索する目的で、F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた吸入による2年間(104週間)の試験を実施するに当たり、その予備試験である13週間試験の投与濃度を決定するための予備試験として本試験(2週間試験)を実施した。

本試験は、投与群5群、対照群1群の計6群(各群雌雄各5匹)を設け、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートの投与濃度は、50、100、200、400及び800 ppmとした。投与期間は1日6時間、1週5日間の投与(全身暴露による経気道投与)で2週間とし、投与期間中、生死及び一般状態の観察、体重、摂餌量の測定を行い、投与期間終了後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

### - 1 用量 - 反応関係

エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートの暴露の結果、動物の死亡はみられず、一般状態の観察でも変化はみられなかったが、体重増加の抑制が雄の800 ppm群と雌の400 ppm以上の群に認められた(最終体重は対照群に対し、雄800 ppm群:88%、雌400 ppm群:93%、800 ppm群:89%)。また、摂餌量の低下は、雄の800 ppm群の投与1と2週目、雌の800 ppm群の投与1週目にみられた。

血液学的検査では、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低値が雌の800 ppm群にみられた。雄の800 ppm群でもヘモグロビン濃度の低値がみられ、また、MCVの高値が雄の800 ppm群と雌の100 ppm以上の群で、MCHCの低値が雌雄の200 ppm以上の群でみられた。MCVの高値とMCHCの低値は、大球性で低色素性の貧血を示唆している。また、網赤血球比の低値が雄の400 ppm以上の群及び雌の200 ppm群と400 ppm群でみられた。さらに、白血球数の低値が雄の400 ppm以上の群と雌の200 ppm以上の群で、分葉核好中球比の高値が雌の800 ppm群でみられた。以上のように、被験物質の暴露により血液系へ影響がみられた。エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートのマウスを用いた5週間の強制経口投与試験でも、白血球数の減少を起こすことが報告されている(文献7)。なお、病理組織学的検査では骨髄(大腿骨)に変化はみられなかった。

血液生化学的検査では、雄に総蛋白の低値が400 ppm以上の群で、A/G比の高値が200 ppm以上の群で、総コレステロールの低値が800 ppm群で、カルシウムの低値が200 ppm以上の群でみられた。雌では、A/G比とトリグリセライドの高値が800 ppm群で、リン脂質の高値が400 ppm以上の群でみられた。なお、酵素系の測定ではALT等の低値が雌雄の投与群にみられた。

剖検では、投与の影響と思われる変化はみられなかった。

臓器重量の測定では、胸腺の重量低下が雌雄の 400 ppm 以上の群（実重量と体重比）にみられた。また、雄では肝臓の重量低下が 800 ppm 群（実重量と体重比）と 400 ppm 群（実重量）に、精巣の重量低下が 800 ppm 群（実重量と体重比）にみられた。精巣の重量低下は病理組織学的検査でみられた精巣の変化に対応するものであった。

病理組織学的検査では、800 ppm 群の雄の精巣に精細管萎縮が認められた。この精細管萎縮は精母細胞以降のステージにある精細胞の傷害であった。当センターで本試験と同時に実施されたマウスを用いた吸入による 2 週間毒性試験（文献 8）でも、800 ppm 群で精細管萎縮が認められ、マウスではラットより程度が強い変化であった。本試験結果と類似した精巣毒性は、エチレングリコールアルキルエーテル類の強制経口投与でマウス、ハムスター及びモルモットに起こり、その作用機序はエチレングリコールアルキルエーテル類の細胞増殖抑制作用によるものと報告されている（文献 7）。

## - 2 13 週間試験の濃度決定

本試験の結果より、13 週間試験の投与濃度を以下のように設定した。

本試験では動物の死亡はみられず、一般状態の変化も認められなかった。800 ppm 群は雌雄とも体重増加の抑制がみられた（最終体重、対照群に対し雄：88%、雌：89%）。800 ppm 群で観察された体重増加の抑制は雌雄とも 10%を超え、13 週間試験ではさらに増強される可能性が高いと推測され、この暴露濃度は 13 週間試験の最高投与濃度としては高いと判断した。400 ppm 群では、最終体重は対照群と比較して 10%以内の抑制（対照群に対し雌雄とも 93%）であることから、400 ppm を最高投与濃度とした。

以上のことから、13 週間試験の投与濃度は雌雄ともに 400、200、100、50 及び 25 ppm（公比 2）で実施することとした。

## 文献

- 1) ACGIH. 2001. 2-Ethoxyethyl Acetate. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. Cincinnati: American Conference of Governmental Industrial Hygienists. [CD-ROM 2007].
- 2) McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.
- 3) 和光純薬工業(株). 2009. エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート, 赤外吸収スペクトル.
- 4) Smyth HF Jr. 1956. Hygienic standards for daily inhalation. Am Ind Hygiene. Quarterly 17: 129-185.
- 5) Tyl RW, Pritts IM, France KA, Fisher LC, Tyler TR. 1988. Developmental toxicity evaluation of inhaled 2-ethoxyethanol acetate in Fischer 344 rats and New Zealand white rabbits. Fundam Appl Toxicol. 10: 20-39.
- 6) 阿部正信. 1986. 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立. 薬理と治療14: 7285-7302.
- 7) Nagano K, Nakayama E, Oobayashi H, Nishizawa T, Okuda H, Ymazaki K. 1984. Experimental Studies on Toxicity of Ethylene Glycol Alkyl Ethers in Japan. Environ Health Perspect. 57: 75-84.
- 8) 日本バイオアッセイ研究センター. 2009. エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートのマウスを用いた吸入による 2 週間毒性試験報告書. 神奈川: 中央労働災害防止協会, 日本バイオアッセイ研究センター

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたことはなかつた。