

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がん原性試験報告書

試験番号：0775

CAS No. 111-15-9

2014年3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	i
試験目的	i
試験法	i
GLP 対応	i
動物福祉	i
試験委託者	i
試験施設及び運営管理者	ii
試験日程	ii
試験関係者一覧	ii
試資料の保管	iii
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付	iii
陳述書	iv
信頼性保証証明書	v
本文	vi
TABLES	A~R2	
FIGURES	1~6	
PHOTOGRAPHS	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マウスを用いた吸入によるがん原性試験

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をマウスに 104 週間全身暴露し、がん原性を検索した。

試験法

本試験は、平成 9 年 3 月 11 日付け、基発第 144 号「がん原性試験による調査の基準」に準拠し、OECD 化学品テストガイドライン 451（発癌性試験 2009 年 9 月 7 日採択）を参考にして実施した。

GLP 対応

本試験は、昭和 63 年 9 月 1 日付け、労働省告示第 76 号「試験施設等が具備すべき基準（安衛法 GLP）」（一部改正。平成 12 年 3 月 29 日付け、労働省告示第 13 号）に準拠し、OECD GLP（1997 年 11 月 26 日採択）に準じて実施した。

動物福祉

本試験は、平成 18 年 4 月 28 日付け、環境省告示第 88 号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、平成 18 年 6 月 1 日付け、厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本方針」及び平成 18 年 11 月 27 日付け、日本バイオアッセイ研究センター制定「動物実験に関する指針」を遵守した。また、本試験は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で承認された。

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
東京都千代田区霞が関 1-2-2

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がん原性試験報告書

試験番号：0775

本文

本文目次

	頁
要約	1
試験材料	3
- 1 被験物質の性状等	3
- 1 - 1 名称等	3
- 1 - 2 構造式及び分子量	3
- 1 - 3 物理化学的性状等	3
- 2 被験物質の使用ロット等	3
- 3 被験物質の特性	4
- 3 - 1 同一性	4
- 3 - 2 安定性	4
- 4 試験動物	4
試験方法	5
- 1 投与	5
- 1 - 1 投与経路	5
- 1 - 2 被験物質の投与方法	5
- 1 - 3 投与期間	5
- 1 - 4 投与濃度	5
- 1 - 5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由	5
- 1 - 6 被験物質の発生方法と濃度調整	6
- 1 - 7 被験物質濃度の測定	6
- 2 動物管理	7
- 2 - 1 各群の使用動物数	7
- 2 - 2 群分け及び個体識別方法	7
- 2 - 3 飼育条件	7
(1) 飼育環境	7
(2) 飼料	8
(3) 飲水	8

- 3 観察・検査項目及び方法	8
- 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察	8
- 3 - 2 体重測定	9
- 3 - 3 摂餌量測定	9
- 3 - 4 血液学的検査	9
- 3 - 5 血液生化学的検査	9
- 3 - 6 尿検査	9
- 3 - 7 病理学的検査	10
(1) 剖検	10
(2) 臓器重量	10
(3) 病理組織学的検査	10
- 4 数値処理と統計方法	10
- 4 - 1 数値の取り扱いと表示	10
- 4 - 2 統計処理	11
試験成績	12
- 1 生死状況	12
- 2 一般状態	12
- 3 体重	12
- 4 摂餌量	13
- 5 血液学的検査	13
- 6 血液生化学的検査	13
- 7 尿検査	13
- 8 病理学的検査	14
- 8 - 1 剖検	14
- 8 - 2 臓器重量	14
- 8 - 3 病理組織学的検査	14
- 8 - 4 死因	15
考察及びまとめ	16
- 1 生存率、一般状態、体重、摂餌量	16
- 2 腫瘍性病変及び腫瘍関連病変	16
- 3 その他の影響	17
- 4 他文献との比較等	17

結論	19
文献	20
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	22

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を検索する目的で B6D2F1/Crlj マウスを用いた吸入による 2 年間 (104 週間) の試験を実施した。

本試験は、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、各群雌雄とも 50 匹とし、合計 400 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、104 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)、11、66 及び 400 ppm とした。観察、検査として、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、尿検査、剖検、臓器重量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、雄の投与群の生存率がやや低値であったが、特定の死因は認められなかった。雌の生存率に暴露の影響はみられなかった。一般状態にも暴露の影響はみられなかった。体重は、雄では 400 ppm 群で投与期間前半に増加の抑制がみられ、それ以降も対照群に比べやや低値で推移した。また、雌でも、400 ppm 群は試験期間を通じて対照群に比べやや低値であった。摂餌量は、雌雄とも 400 ppm 群でやや低値であった。

病理組織学的検査の結果、雌雄とも投与群に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による腫瘍の発生増加及び腫瘍関連病変の発生増加は認められなかった。非腫瘍性病変としては、雌雄とも鼻腔 (嗅上皮、嗅上皮の固有層の腺、呼吸上皮) に暴露の影響がみられた。嗅上皮には、呼吸上皮化生と萎縮が雌雄ともに 66 ppm 以上の群で認められた。また、嗅上皮の固有層には腺の呼吸上皮化生が雄の 400 ppm 群と雌の 66 ppm 以上の群で認められ、呼吸上皮にはエオジン好性変化が雌の 66 ppm 以上の群で増加を示した。

以上のように、B6D2F1/Crlj マウスを用いて、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートの 2 年間 (104 週間) にわたる吸入によるがん原性試験を行った結果、以下の結論を得た。

雌雄とも腫瘍の発生増加は認められず、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に対するがん原性はなかった。

エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートのがん原性試験における主な腫瘍発生
(マウス 雄)

	投与濃度 (ppm)		0	11	66	400	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性 腫瘍	肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	4	3	7	5		
	肝臓	肝細胞腺腫	4	8	10	9		
	ハーダー腺	腺腫	4	0	2	3		
悪性 腫瘍	肺	細気管支-肺胞上皮癌	4	3	6	6		
	リンパ節	悪性リンパ腫	14	8	11	13		
	肝臓	肝細胞癌	5	4	11	5		
	肝臓	肝芽腫	0	1	0	0		
	肝臓	血管肉腫	3	4	2	4		
	肝臓	肝細胞腺腫 + 肝細胞癌	9	11	20 *	13		

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における主な腫瘍発生
(マウス 雌)

	投与濃度 (ppm)		0	11	66	400	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性 腫瘍	肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	2	3	0	2		
	肝臓	肝細胞腺腫	4	6	1	7		
	肝臓	血管腫	0	1	0	2		
	下垂体	腺腫	2	7	7	6		
悪性 腫瘍	リンパ節	悪性リンパ腫	17	16	19	10		
	脾臓	組織球性肉腫	0	3	0	0		
	肝臓	組織球性肉腫	3	0	0	4		
	肝臓	血管肉腫	0	2	2	2		
	子宮	組織球性肉腫	10	12	6	10		
	肝臓	血管腫 + 血管肉腫	0	3	2	4		

* : p 0.05 で有意 ** : p 0.01 で有意 (Fisher 検定)
: p 0.05 で有意増加 : p 0.01 で有意増加 (Peto, Cochran-Armitage 検定)
: p 0.05 で有意減少 : p 0.01 で有意減少 (Cochran-Armitage 検定)

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)
I U P A C 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、暗所に保管

- 2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : EPF1259 (2011.2.16 ~ 2011.8.8)
DCM1007 (2011.8.9 ~ 2012.5.14)
TLN6888 (2012.5.15 ~ 2013.2.12)
製 造 元 : 和光純薬工業(株)
規 格 : 和光特級
純 度 : 99.6 ~ 99.7% (和光純薬工業(株) 試験成績書データ)

- 3 被験物質の特性

- 3 - 1 同一性

被験物質の同一性は、ロットごとに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）にて測定し、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、ロットごとに使用開始前及び使用終了後に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ズ 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、各ロットとも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、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 B6D2F1/Crlj マウス（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 220 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 200 匹（群構成時体重範囲、雄：22.4～25.6g、雌：18.5～21.6g）を選別し、試験に用いた。

なお、B6D2F1/Crlj マウス（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、原則として1週5日の暴露で104週間とし、計490回の暴露を行った。

- 1 - 4 投与濃度

投与濃度は、11、66及び400 ppm (体積比v/v)の3段階(公比6、少数点以下切り捨て)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、がん原性試験による調査の基準(安衛法)(文献4)及びOECD化学剤テストガイドライン451(発癌性試験)(文献5)に従い、2年間(104週間)とした。

投与濃度は13週間試験(試験番号0744)の結果(文献6)をもとに決定した。13週間試験は0、50、100、200、400及び800 ppm(公比2)の濃度で行った。その結果、各群とも動物の死亡はみられなかったが、400 ppm以上の群で雄に体重増加の抑制(最終体重、400及び800 ppm群とも対照群の93%)が認められ、雌雄で血液学的検査及び血液生化学的検査にも変化がみられた。臓器重量では、800 ppm群の雄に精巣、雌に胸腺の重量低下がみられ、病理組織学的検査では400及び800 ppm群の雌雄で鼻腔の病変(嗅上皮の萎縮、呼吸上皮化生、空胞変性等)、また、800 ppm群の雄で精巣(精細管萎縮)と精巣上体(精

子減少等)の病変がみられた。400 ppm 群の最終体重は対照群の 90%以上であり、また鼻腔の病理組織学的変化はいずれも軽度で、動物の生死に影響を与えるものではないと考えられることから、がん原性試験の最高濃度は 400 ppm が妥当と考えられた。がん原性試験の最低濃度については、13 週間試験で最低濃度の 50 ppm でも鼻腔に病理組織学的変化がみられたことから、50 ppm 未満のより低い濃度が望ましいと考えられた。

以上のことから、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも 400 ppm を最高濃度とし、以下、66、11 ppm (公比 6、少数点以下切り捨て)と決定した。

- 1 - 6 被験物質の発生方法と濃度調整

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-14B)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($(\text{平均値} - \text{設定濃度}) / \text{設定濃度} \times 100$)及び変動係数(標準偏差 / 平均値 $\times 100$)とも 1.0%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 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、各群雌雄各 50 匹の動物を用いた。

群 名 称	動物数 (動物番号)	
	雄	雌
対 照 群	50 匹 (1001 ~ 1050)	50 匹 (2001 ~ 2050)
11 ppm 群	50 匹 (1101 ~ 1150)	50 匹 (2101 ~ 2150)
66 ppm 群	50 匹 (1201 ~ 1250)	50 匹 (2201 ~ 2250)
400 ppm 群	50 匹 (1301 ~ 1350)	50 匹 (2301 ~ 2350)

- 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 7)。

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 (511 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 (517・518 室) で、馴化期間及び投与期間中は、吸入試験室 (511 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 < 517 室 ; 22.6 ± 0.1 、 518 室 ; 23.1 ± 0.1 >
吸入試験室 ; 22 ± 2 < 511 室 ; 22.0 ± 0.3 >
吸入チャンバー内 ; 23 ± 2

湿 度 : 検疫室 ; $55 \pm 15\%$ < 517 室 ; $54 \pm 2\%$ 、 518 室 ; $51 \pm 1\%$ >
吸入チャンバー内 ; $50 \pm 20\%$ (ただし、投与群の湿度は暴露中及び暴

露終了後 1 時間まで測定しなかった。)

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；15 ~ 17 回 / 時

吸入試験室；7 ~ 9 回 / 時

吸入チャンバー内；12 ± 1 回 / 時

圧力： 吸入チャンバー内；0 ~ - 15 × 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：

検疫期間；ステンレス製 2 連網ケージ (112(W) × 212(D) × 120(H) mm/匹)

馴化期間；ステンレス製 6 連網ケージ (95(W) × 116(D) × 120(H) mm/匹)

投与期間；ステンレス製 5 連網ケージ (100(W) × 116(D) × 120(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、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、保管した。

(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。

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

動物の生死及び瀕死の確認を毎日 1 回、また、一般状態の詳細な観察は週 1 回行った。

- 3 - 2 体重測定

体重測定は、投与開始後 14 週間は週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（104 週にも測定）行った。また、動物の死亡発見時、切迫屠殺時及び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、投与開始後 14 週間は週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（104 週にも測定）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、 γ -GTP、CK、尿素窒素、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

- 3 - 6 尿検査

投与 104 週の検査時まで生存した動物から、新鮮尿を採取し、尿試験紙（ウロラプスティックス、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社）を用いて、下記の項目について検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン

- 3 - 7 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

定期解剖時まで生存した動物について、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：副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(3) 病理組織学的検査

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後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

なお、鼻腔については切歯の後端(レベル1)、切歯乳頭(レベル2)、第一臼歯の前端(レベル3)の3ヶ所の横断面で切り出し(文献8)、検査した。

検査器官・組織：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髓(大腿骨)、リンパ節(腋窩、鼠径等)、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、胆嚢、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、膣、乳腺、脳、脊髓、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 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、小数点以下第1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 に示した単位と桁数により表示した。
 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。

病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変については、所見のみられなかった動物をグレード
 0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲などを基準にしてグレード 1～4 に分
 け、² 検定を行った。また、尿検査についても対照群と各投与群間との² 検定を行った。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの総担腫瘍臓器数について、Peto
 検定（文献 9）、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。また、Peto 検定は病理
 組織学的検査時に付与されたコンテックス(注)を用いて、死亡率法（コンテックス 3, 4 を
 付与された腫瘍についての検定）、有病率法（コンテックス 0, 1, 2 を付与された腫瘍に
 ついての検定）、死亡率法 + 有病率法（コンテックス 0～4 の総計で検定）を行った。

各検定は 5%の有意水準で、Peto 検定、Fisher 検定は片側検定、その他の検定は両側検
 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。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

- 0：定期解剖動物にみつかった腫瘍
- 1：死亡 / 瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍
- 2：多分 1 だと思いが、確かでない腫瘍
- 3：多分 4 だと思いが、確かでない腫瘍
- 4：死亡 / 瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に係わっていた腫瘍

試験成績

- 1 生死状況

生死状況を TABLE B 1, 2 及び FIGURE 1, 2 に示した。

- 雄 -

投与群の生存率がやや低値であった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：40 匹（80%）、11 ppm 群：33 匹（66%）、66 ppm 群：29 匹（58%）及び 400 ppm 群：30 匹（60%）であった。

- 雌 -

投与群の生存率に被験物質の影響はみられなかった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：26 匹（52%）、11 ppm 群：21 匹（42%）、66 ppm 群：31 匹（62%）及び 400 ppm 群：31 匹（62%）であった。

- 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 -

被験物質の影響と思われる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 3, 4 に示した。

- 雄 -

400 ppm 群で 58 週まで体重増加の抑制がみられ、それ以降も対照群に比べ体重はやや低値であった。

最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 11 ppm 群：97%、66 ppm 群：101%及び 400 ppm 群：96%であった。

- 雌 -

400 ppm 群で 7 週まで体重増加の抑制がみられ、それ以降も対照群に比べ体重はやや低値であった。

最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 11 ppm 群：103%、66 ppm 群：98%及び 400 ppm 群：95%であった。

- 4 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1~4 及び FIGURE 5, 6 に示した。

- 雌雄 -

400 ppm 群で投与期間中、摂餌量の低値が散見された。

- 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 -

赤血球数の高値が 400 ppm 群でみられた。なお、血小板数の高値が 66 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

- 雌 -

MCV の高値と赤血球数の低値が 400 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 -

カリウムの低値が 400 ppm 群でみられた。

- 雌 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

- 7 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

- 雄 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

- 雌 -

蛋白の陽性度の増加が 400 ppm 群でみられた。なお、蛋白とケトン体の陽性度の増加が 11 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

- 8 病理学的検査

- 8 - 1 剖検

剖検所見を TABLE I 1 ~ 6 に示した。

- 雌雄 -

被験物質の影響と思われる所見の増加は認められなかった。

- 8 - 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 J 1, 2 と TABLE K 1, 2 に示した。

- 雄 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

- 雌 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。なお、腎臓の体重比の高値が 400 ppm 群でみられたが、搬出時体重の低値によるものと考えた。また、卵巣の体重比の低値が 11 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

- 8 - 3 病理組織学的検査

検査結果のうち非腫瘍性病変を TABLE L 1 ~ 6 に示した。腫瘍性病変の結果は、担腫瘍動物数と腫瘍数を TABLE M 1, 2 に、腫瘍の種類別の発生数を TABLE N 1, 2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を TABLE O 1, 2 に、転移性病変を TABLE P 1, 2 に示した。また、腫瘍のうち統計学的に有意差が認められた腫瘍について、日本バイオアッセイ研究センターにおけるヒストリカルコントロールデータ (検査総匹数と腫瘍発生匹数、試験ごとの平均発生率 (%) と発生率 (最小% ~ 最大%)) を TABLE Q 1, 2 に示し、病理組織所見の代表例を写真 1 ~ 3 に示した。

- 雄 -

1) 腫瘍性病変

被験物質の投与による腫瘍の発生増加はみられなかった。なお、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生の増加が 66 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した発生を示さず、66 ppm 群でみられた肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生 (20 匹、40%) は、ヒストリカルコントロールデータの範囲 (平均 35.3%、最低 8% ~ 最高 68%) 内であったことから、投与の影響とは考えなかった。

2) 非腫瘍性病変

鼻腔で嗅上皮とその固有層の腺に病変の増加が観察された。嗅上皮には、上皮の呼吸上皮化生と萎縮の発生匹数の増加が 66 ppm 以上の群で認められた。嗅上皮の呼吸上皮化生は、主にレベル 2 の背側に認められた。嗅上皮の萎縮は、嗅細胞の数の減少により嗅上皮の丈が低くなった変化であり、固有層の嗅神経の萎縮を伴ってレベル 2 の背側に認められた。また、固有層にある腺の呼吸上皮化生の発生匹数の増加が 400 ppm 群で認められた。これらの病変のうち嗅上皮と腺の呼吸上皮化生は、400 ppm 群で程度の増強もみられた。その他、脳の鉍質沈着の発生が 400ppm 群で減少した。

- 雌 -

1) 腫瘍性病変

被験物質の投与による腫瘍の発生増加はみられなかった。なお、肝臓の血管腫と血管肉腫を合わせた発生が Peto 検定(有病率法)で増加傾向がみられたが、血管腫と血管肉腫を合わせた発生(対照群:0匹(0%)、11ppm群:3匹(6%)、66ppm群:2匹(4%)、400ppm群4匹(8%))はいずれもヒストリカルコントロールデータの範囲(平均3.5%、最低0%~最高12%)内であったことから投与の影響とは考えなかった。

2) 非腫瘍性病変

鼻腔で呼吸上皮、嗅上皮及びその固有層の腺に病変の増加が観察された。嗅上皮には、上皮の呼吸上皮化生と萎縮の増加が 66 ppm 以上の群で認められた。また、固有層の腺には呼吸上皮化生の増加が 66 ppm 以上の群で認められた。さらに、呼吸上皮には、エオジン好性変化の発生匹数の増加が 66 ppm 以上の群で認められた。これらの病変の特徴は雄と同様であった。エオジン好性変化は、呼吸上皮や嗅上皮の細胞質内にエオジン好性に染色される滴状物質が貯留した変化である。発生部位については対照群と投与群に差はみられなかった。これらの病変のうち嗅上皮と腺の呼吸上皮化生は、400 ppm 群では程度の増強もみられた。その他、嗅上皮のエオジン好性変化、小腸のアミロイド沈着、腎臓の癒痕の発生が 11 ppm 群で減少し、副腎の紡錘形細胞の増生の程度が 400 ppm 群で減弱した。

- 8 - 4 死因

病理学的にみた死亡/瀕死の原因を TABLE R 1, 2 に示した。

- 雌雄 -

投与群に特定の病変あるいは腫瘍による死亡の増加はみられなかった。

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マウスを用いた 2 年間の全身暴露による吸入試験（投与濃度：0（対照群）、11、66 及び 400 ppm）を行ったが、エチレングリコールモノエチルエーテルアセレートによる腫瘍性病変の発生は認められなかった。

- 1 生存率、一般状態、体重、摂餌量

雄の投与群の生存率がやや低値であったが、特定の死因は認められなかった。雌の生存率にエチレングリコールモノエチルエーテルアセレートの暴露による影響はみられなかった。一般状態には暴露の影響はみられなかった。

体重は、雄では 400 ppm 群で投与期間前半に増加の抑制がみられ、それ以降も対照群に比べやや低値で推移した。また、雌でも、400 ppm 群は試験期間を通じて対照群に比べやや低値であった。

摂餌量は、雌雄とも 400 ppm 群でやや低値であった。

- 2 腫瘍性病変及び腫瘍関連病変

雌雄ともエチレングリコールモノエチルエーテルアセレートの暴露による腫瘍の発生増加及び腫瘍関連病変の発生増加は認められなかった。

IARC（文献 10）は、がん原性試験の最高投与濃度を、亜慢性試験の結果からある程度の毒性影響が起きることが推定される濃度であり、腫瘍発生の結果以外で動物の寿命の長さを短縮させず、対照群と比較して 10%以上の体重増加の抑制を引き起こす毒性兆候を惹起させないことが推定される濃度と定義した。米国国立がん研究所（NCI）の小動物発がん性試験ガイドラインでは（文献 11）、小動物を用いるがん原性試験の最高投与濃度として、対照群と比較して 10%以下の体重抑制を引き起こす濃度で、かつ発がん性に関係する反応以外に、毒性的兆候、病理学的障害による死亡率の上昇を引き起こさないと推定される最高濃度、即ち、最大耐量（Maximum Tolerated Dose (MTD)）を最高投与濃度として用いることと定義した。

本がん原性試験においては、最高濃度群の 400 ppm 群では雄の最終体重は対照群の 96%、雌は同 95%であり、鼻腔にエチレングリコールモノエチルエーテルアセレートの毒性影響と考えられる病理組織学的変化がみられた。また、雄の生存率は投与群でやや低値であったが、エチレングリコールモノエチルエーテルアセレートの暴露によると思われる特定の死因は認められなかった。雌でも投与群の生存率に暴露による低下はみられなかった。従って、最高濃度を 400 ppm とした本がん原性試験の投与濃度の設定は、上記の MTD に関する基準を満たし、適切であると判断した。

- 3 その他の影響

血液学的検査では、雄で赤血球数の高値、雌で MCV の高値と赤血球数の低値、血液生化学的検査では、雄でカリウムの低値、尿検査では、雌で蛋白の陽性度の増加が、いずれも 400 ppm 群でみられた。しかし、これらの血液学的検査、血液生化学的検査あるいは尿検査でみられた変化に対応した病理組織学的変化はみられなかった。

剖検と臓器重量では、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートの影響と思われる変化はみられなかった。

病理組織学的検査では、雌雄の鼻腔にエチレングリコールモノエチルエーテルアセテートの影響がみられた。嗅上皮には、呼吸上皮化生と萎縮が雌雄ともに 66 ppm 以上の群で認められた。また、嗅上皮の固有層には腺の呼吸上皮化生が雄の 400 ppm 群と雌の 66 ppm 以上の群で認められ、呼吸上皮にはエオジン好性変化が雌の 66 ppm 以上の群で増加を示した。

嗅上皮の呼吸上皮化生は、嗅上皮が呼吸上皮に置き換わる変化、萎縮は嗅細胞の数の減少により嗅上皮の丈が低くなった変化であり、いずれも鼻腔に対する傷害を示す変化である。従って、66 ppm 以上のエチレングリコールモノエチルエーテルアセテートの 104 週間の吸入暴露は嗅上皮に毒性影響を引き起こすことが示された。一方、嗅上皮の固有層の腺の呼吸上皮化生や呼吸上皮のエオジン好性変化は加齢に伴って発生が増加することが報告されている（文献 12）。今回、雄の 400 ppm 群と雌の 66 ppm 以上の群で腺の呼吸上皮化生、雌の 66 ppm 以上の群で呼吸上皮のエオジン好性変化の増加がみられたことから、加齢性変化に加えてエチレングリコールモノエチルエーテルアセレート暴露による病変の増加があったと考えられる。エオジン好性変化はタバコ、塩素、ジメチルアミン等の刺激性のある化学物質の吸入暴露により発生することが報告されているが、毒性的意義は現在のところ不明である（文献 13、14、15、16）。

本試験の予備試験として当センターで実施した 13 週間試験（文献 6）でも、鼻腔の嗅上皮や呼吸上皮に対する影響が雌雄とも暴露濃度に対応してみられた。嗅上皮の萎縮、呼吸上皮化生、空胞変性、壊死及び呼吸上皮のエオジン好性変化が最低濃度の 50 ppm 群までみられた。本試験においても、嗅上皮の呼吸上皮化生や萎縮が 66 ppm 以上の群にみられたが、13 週間試験でみられた鼻腔の変化は、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートの長期暴露により腫瘍性病変へ進展することはなかった。

- 4 他文献との比較等

がん原性：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がん原性試験または長期試験に関する文献はなかった。また、IARC で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について評価を行っていない。

変異原性：エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートの変異原性については、当センターで実施した微生物変異原性試験の報告（文献 17）と、Slesinski らによる複数の変異

原性試験系の報告（文献 18）がある。

当センターで実施した微生物変異原性試験は、試験菌株にネズミチフス菌 TA98、TA100、TA102、TA104、TA1535、TA1537、及び大腸菌 WP2uvrA、WP2uvrA/pKM101 を使用し、試験方法にプレインキュベーション法、溶媒に水を用い、1.22～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量でラット S9 を用いた代謝活性化による場合とよらない場合の両方で試験を実施した。試験結果は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性であった。

Slesinski らは、Ames 試験、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を用いた HGPRT 遺伝子変異試験、CHO 細胞を用いた姉妹染色分体交換 (SCE) 試験、Swiss-Webster マウスの腹腔内に投与した末梢血小核試験の結果は、それぞれ陰性であったが、CHO 細胞を用いた染色体異常試験は陽性の結果であり、その染色体異常誘発性は代謝活性化（ラット S9）による場合で強く、代謝活性化によらない場合で弱かったと報告している。

以上、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートは、細菌（ネズミチフス菌、大腸菌）、ほ乳類の培養細胞（CHO 細胞）に対しては遺伝子突然変異を誘発しないと推測される。in vitro の染色体異常試験では培養細胞に対して染色体異常誘発性を示したが、in vivo の末梢血小核試験で陰性であったことから、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートの染色体異常誘発性が in vitro 条件下に限定した結果である可能性が考えられた。

結論

B6D2F1/Crlj マウスを用いて、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートの2年間（104週間）にわたる吸入によるがん原性試験を行った結果、以下の結論を得た。

雌雄とも腫瘍の発生増加は認められず、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に対するがん原性はなかった。

文献

1. ACGIH. 2001. 2-Ethoxyethyl Acetate. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH: 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. 労働省労働基準局長. 1997. がん原性試験による調査の基準. 基発 第 144 号 , 平成 9 年 3 月 11 日.
5. OECD. 2009. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451 "Carcinogenicity Studies". Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
6. 日本バイオアッセイ研究センター. 2011. 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 13 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.
7. 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.
8. Nagano K, Katagiri T, Aiso S, Senoh H, Sakura Y, Takeuchi T. 1997. Spontaneous lesions of nasal cavity in aging F344 rats and BDF1 mice. *Exp Toxic Pathol.* 49: 97-104.
9. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S, et al. 1980. Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in long-term animal experiments. In: *Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal.* Lyon: IARC. IARC Monographs Suppl 2: 311-426.
10. Bannasch P, Griesemer RA, Anders F, Becker R, Cabral JR, Della Porta G, et al. 1986. Long-term assays for carcinogenicity in animals. In: *Long-Term and Short-Term Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal.* (Montesano R, Bartsch H, Vainio H, Wilbourn J,

- Yamasaki H. eds.). Lyon: IARC. IARC Scientific Publications No. 83: 13-83.
11. Sontag JM, Page NP, Saffiotti U. 1976. Guidelines for carcinogene bioassay in small rodents. NCI-CG-TR-1. DHEW Publication No.(NIH)76-801. Bethesda,MD: National Cancer Institute. 13-15.
 12. Nagano K, Katagiri T, Aiso S, Senoh H, Sakura Y, Takeuchi T. 1997. Spontaneous lesions of nasal cavity in aging F344 rats and BDF1 mice. *Exp Toxic Pathol.* 49: 97-104.
 13. Buckley LA, Morgan KT, Swenberg JA, James RA, Hamm TE Jr, Barrow CS. 1985. The toxicity of dimethylamine in F-344 rats and B6C3F1 mice following a 1-year inhalation exposure. *Fundam Appl Toxicol.* 5: 341-352.
 14. Monticello TM, Morgan KT, Uraih L. 1990. Nonneoplastic nasal lesions in rats and mice. *Environ Health Perspect.* 85: 249-255.
 15. Renne R, Brix A, Harkema J, Herbert R, Kittel B, Lewis D, March T, Nagano K, Pino M, Rittinghausen S, Rosenbruch M, Tellier P, Wohrmann T. 2009. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse, respiratory tract. *Toxicol Pathol* 37: 5S-73S.
 16. Wolf DC, Morgan KT, Gross EA, Barrow C, Moss OR, James RA, et al. 1995. Two-year inhalation exposure of female and male B6C3F1 mice and F344 rats to chlorine gas induces lesions confined to the nose. *Fundam Appl Toxicol.* 24: 111-131.
 17. 日本化学物質安全・情報センター. 2000. 「既存化学物質 変異原性試験データ集 (補遺 2版)」. 東京: 日本化学物質安全・情報センター. 63-65.
 18. Slesinski RS, Guzzie PJ, Tyler TR. 1988. Cytotoxicity and genotoxic potential of ethylene glycol monoethyl ether acetate (EGEE · Ac) in a battery of short term test systems. *Environ Mol Mutagen*, 11 Suppl 11: 97

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。