原 著

エチレングリコールモノアルキルエーテル類
によるマウス精巣の萎縮長野 嘉 介*, 中山 栄 基*, 小谷野 道子*
大林 久 雄*, 安 達 秀 美*, 山 田 勉*TESTICULAR ATROPHY OF MICE INDUCED BY ETHYLENE
GLYCOL MONO ALKYL ETHERSKasuke NAGANO†, Eiki NAKAYAMA†, Michiko KOYANO†,
Hisao OOBAYASHI†, Hidemi ADACHI† and Tutomu YAMADA†

Toxicities of ethylene glycol (EG) and 6 ethylene glycol mono alkyl ethers administered orally were studied. Mice were given various doses (62.5, 125, 250, 500, 1,000, 2,000 and 4,000 mg/kg body weight) of the compounds daily for 5 days/week, for 5 weeks. High doses of ethylene glycol mono methyl ether (EGM), ethylene glycol mono methyl ether acetate (EGMA), ethylene glycol mono ethyl ether (EGE) and ethylene glycol mono ethyl ether acetate (EGEA) produced marked testicular atrophy and leucopenia. Dose-response relation was found in these effects. EGM was more effective than EGE, while ethylene glycol mono butyl ether and ethylene glycol mono phenyl ether had but slight effect and EG had no detectable action on testis and leucocytes.

Toxic doses being expressed as mg/kg body weight, esterification seemed to weaken the atrophic action of EGM and EGE, but when expressed as mol/kg, significant difference was found neither between EGM and EGMA nor between EGE and EGEA. The mechanism of testicular atrophy induced by low ethylene glycol mono alkyl ethers is likely to be an inhibitory action on cell division.

I. 緒 言

エチレングリコールの誘導体は、水溶性などの特性により、近年水溶性の有機溶剤等としての用途がひろげ、その使用量は漸次増加する傾向がある。これに伴ってそれらの毒性についての研究結果が発表されるようになったが^{1,2)}、精巣に及ぼす作用については研究が少なく、わずかに Wiley (1938)³⁾ がエチレングリコールモノメチルエーテル, Morris (1942)⁴⁾, Stenger (1971)⁵⁾ がエチレングリコールモノエチルエーテルについて記述し、また今宮ら⁶⁾ がエチレングリコールモノメチルエーテルアセテートを投与したマウスの精巣に萎縮を見だしているにすぎない。今回、われわれはエチレングリコール

とその誘導体の数種について精巣に及ぼす影響の程度を比較し、その間に差のあること、およびその差とそれらの化学構造との間に一定の関係があることを明らかにしたので報告する。

II. 実 験 方 法

実験動物は日本クレア(株)より導入した JCL-ICR 系の雄性マウス (6週齢) を1群当り5匹使用した。これらの動物は恒温 (22±0.5°C), 恒湿 (60±5%) の飼育室内で、ステンレス製弁当箱型ケージと床敷 (日本チャールズリバー株式会社, ホワイトフレーク) を用いて飼育し、飼料としてはマウス・ラット用固型飼料 (日本クレア株式会社, CE-2) を自由に摂取させた。

被検試料は Fig. 1 に構造式を示したエチレングリコール (EG), その誘導体であるエチレングリコールモノメチルエーテル (EGM), 同じくモノエチルエーテル (EGE), モノブチルエーテル (EGB), モノフェニルエーテル (EGP), それに EGM のアセテート (EGMA),

* 中央労働災害防止協会労働衛生検査センター
昭和53年6月12日受付

† Occupational Health Service Center, Japan Industrial Safety Association

Received for publication, June 12, 1978

Fig. 1. Structural formulae of ethylene glycol and ethylene glycol mono alkyl ethers used in the present investigation.

EGE のアセテート (EGEA) であり、すべて和光純薬株式会社の試薬を使用した。

この実験では、後述の考察に記したように体内に入る試料の量を正確に定める必要があるので強制経口投与の方法をとることとした。各試料は1回当たりの投与量が体重 10 g 当たり 0.1 ml となるように水で希釈 (EGEA の 4,000 mg/kg 群と EGP の全群はオリーブ油で希釈) して、1週間に5回、5週間にわたり計 25 回、胃カニューレを用いて経口的に投与した。その投与量は、1回当たり、EG, EGE と EGEA は 4,000, 2,000, 1,000, 500 mg/kg, EGM と EGMA は 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5 mg/kg, EGB と EGP は 2,000, 1,000, 500 mg/kg とした。また、対照マウス (20匹) には同様の方法で水を投与した。

最後の投与の翌日、マウスをペントバルビタールナトリウム麻酔下で解剖し、後大静脈より採血した。精巣は重量を測定した後、10% 緩衝ホルマリンで固定し、病理組織標本作製した。また、貯精嚢と凝固腺の合計重量を測定した。血液については白血球数、赤血球数、血球容積、血色素量を測定した。

測定結果はすべて *t* 検定 ($p=0.05, 0.01$) を用いて対照群との差を検定した。

III. 結 果

1. 精巣と副生殖腺の変化

精巣と副生殖腺 (貯精嚢と凝固腺の合計とした) の重量を Table 1 に示した。精巣の重量は EG では 4,000 mg/kg までの投与量で、対照とくらべて有意の差は見いだされなかった。EGB と EGP では 2,000 mg/kg 以上の投与量で動物は死亡し、1,000 mg/kg 以下の投与量では精巣重量の有意な低下がみられなかった。ところ

Fig. 2. Relationship between daily oral dose (mol) of ethylene glycol derivatives and mean testis-body weight ratio (in percentage).

が、EGM, EGE, EGMA, EGEA を投与した動物では投与量が増加するにしたがって精巣重量の低下が観察され、対照にくらべて被検動物の精巣重量が有意に低下したのは EGM では1回の投与量が 250 mg/kg 以上、EGMA では 500 mg/kg 以上、EGE と EGEA では 1,000 mg/kg 以上であった。精巣重量の減少がみられた4試料の作用の程度を比較すると、EGM が最も強く、EGMA, EGE, EGEA の順に弱くなっていた。

メチル基の場合でもエチル基の場合でもエステル化すると精巣の萎縮作用は弱くなるようであるが、1回の投与量を mg/kg 単位から mmol/kg 単位に換算して投与量と精巣重量 (体重比) との関係を見ると (Fig. 2), どちらの基についてもエステル化したものの曲線はそれぞれエステル化しないものとおおよそ重なっていた。

Table 1. Mean and standard deviation of absolute and relative organ weights of mice treated with several dose levels of ethylene glycol and ethylene glycol mono alkyl ethers for 5 weeks.

Compound	Daily dose (mg/kg)	Number of mice	Testes		Vesicular and coagulating glands	
			Absolute (mg)	Relative (%)	Absolute (mg)	Relative (%)
EG	4,000	5	274±9	0.70±0.03	392±27	1.04±0.05
	2,000	5	262±36	0.69±0.09	414±48	1.08±0.15
	1,000	5	285±13	0.75±0.02	346±59	0.91±0.14
	500	5	298±18	0.78±0.04	368±35	0.97±0.12
EGM	2,000	1 ^{b)}	54	0.15	258	0.71
	1,000	5	74±8**	0.10±0.02**	287±25**	0.75±0.08**
	500	5	82±13**	0.22±0.03**	323±66	0.86±0.17
	250	5	162±37**	0.42±0.10**	361±26	0.94±0.09
	125	5	300±28	0.79±0.10	373±30	0.98±0.06
	62.5	5	263±57	0.68±0.14	354±73	0.95±0.12
EGE	4,000	0 ^{a)}	—	—	—	—
	2,000	5	85±8**	0.22±0.02**	330±48	0.85±0.12
	1,000	5	220±27**	0.58±0.07**	331±37	0.87±0.16
	500	5	290±32	0.75±0.07	351±50	0.92±0.14
EGB	2,000	0 ^{a)}	—	—	—	—
	1,000	5	266±82	0.73±0.22	339±48	0.93±0.10
	500	5	292±31	0.81±0.07	324±19	0.90±0.06
EGP	2,000	0 ^{a)}	—	—	—	—
	1,000	5	248±76	0.71±0.24	367±88	1.04±0.24
	500	5	296±32	0.84±0.09	376±38	1.06±0.14
EGMA	2,000	4 ^{d)}	69±5**	0.19±0.02**	244±26**	0.67±0.04**
	1,000	5	73±7**	0.19±0.02**	328±48	0.92±0.15
	500	5	106±10**	0.27±0.01**	356±86	0.90±0.19
	250	5	289±56	0.71±0.12	331±40	0.87±0.13
	125	5	270±23	0.68±0.09	353±53	0.89±0.09
	62.5	5	315±22	0.82±0.03	369±70	0.93±0.17
EGEA	4,000	2 ^{c)}	83±7**	0.21±0.01**	299±44*	0.76±0.07
	2,000	5	173±39**	0.44±0.10**	367±36	0.93±0.09
	1,000	5	231±66**	0.66±0.11*	341±52	0.87±0.14
	500	5	269±62	0.69±0.18	366±80	0.94±0.22
Control		20	291±25	0.76±0.08	376±59	0.99±0.16

Relative organ weight is the ratio *i.e.* organ weight/body weight, in percentage.

^{a)} All five animals were dead before examinations. ^{b)} Four animals out of five were dead before examinations. ^{c)} Three animals out of five were dead before examinations. ^{d)} One animal out of five was dead before examination. * $p < 0.05$ by student's *t* test, ** $p < 0.01$ by student's *t* test

Table 2. Mean and standard deviation of hematological values of mice given orally several dose levels of ethylene glycol and ethylene glycol mono alkyl ethers for 5 weeks.

Compound	Daily dose (mg/kg)	Number of mice	White cell counts (/mm ³)	Red cell counts (10 ⁴ /mm ³)	Packed cell volume (%)	Hemoglobin (g/dl)
EG	4,000	5	4,663± 594	785± 50	38.3±1.2	12.6±0.3
	2,000	5	3,613±1,220	766± 52	38.5±2.1	12.6±0.1
	1,000	5	4,790±1,259	790± 90	39.7±2.4	13.0±0.9
	500	5	4,760± 610	840±120	39.3±2.9	12.7±0.6
EGM	2,000	1 ^{b)}	900	517	29.0	7.8
	1,000	5	1,000± 221**	617± 43**	37.3±4.8	11.6±1.0**
	500	5	1,770± 392**	760±111	40.7±1.2	12.4±0.5
	250	5	3,470±2,164	771± 93	39.5±2.3	12.6±0.1
	125	5	4,250±2,100	694± 93	39.0±2.1	12.8±0.6
	62.5	5	3,270±1,714	772± 31	39.2±1.7	12.7±0.5
EGE	4,000	0 ^{a)}	—	—	—	—
	2,000	5	2,090±1,459*	780± 40	39.9±2.2	12.8±0.8
	1,000	5	2,810± 610	688± 96	40.9±1.8	12.8±1.0
	500	5	3,700±1,863	718± 62	40.9±3.1	13.2±1.4
EGB	2,000	0 ^{a)}	—	—	—	—
	1,000	5	3,180± 567	654± 53**	37.7±1.1	12.0±0.6
	500	5	3,560±1,006	676± 25*	40.2±2.8	12.6±1.1
EGP	2,000	0 ^{a)}	—	—	—	—
	1,000	5	5,900±3,133	778± 94	39.4±1.3	12.7±0.9
	500	5	3,360± 704	767± 71	35.1±4.1	11.6±1.1
EGMA	2,000	4 ^{d)}	750± 287**	679±130	33.0±3.6	11.4±0.4*
	1,000	5	1,030± 452**	712±100	38.9±2.2	12.0±0.7
	500	5	2,940± 634	686± 95	38.9±3.1	12.7±1.3
	250	5	3,890±1,634	797± 34	38.3±3.4	12.8±1.2
	125	5	3,980± 990	769± 25	39.5±2.6	12.5±0.4
	62.5	5	3,430± 849	812± 25	38.6±2.9	12.9±0.5
EGEA	4,000	2 ^{c)}	1,100± 245**	679± 32	35.0±0.8*	11.7±1.0
	2,000	5	2,030± 606*	719± 71	37.8±1.7	12.6±1.1
	1,000	5	3,940±1,380	701± 60	39.7±3.1	12.8±1.0
	500	5	2,940± 482	685± 84	37.5±3.1	12.4±0.7
Control		20	3,840±1,572	764± 79	39.3±2.7	12.7±0.9

^{a)} All five animals were dead before examinations. ^{b)} Four animals out of five were dead before examinations. ^{c)} Three animals out of five were dead before examinations. ^{d)} One animal out of five was dead before examination. * $p < 0.05$ by Student's t test, ** $p < 0.01$ by Student's t test.

Fig. 3. Control mouse. H.E., $\times 200$.

Fig. 4. EGM, 250 mg/kg/day: Very few spermatozoa and spermatids are seen in the epithelia. Spermatocytes are somewhat reduced in number. H.E., $\times 200$.

Fig. 5. EGM, 500 mg/kg/day: Note reduced size and cellularity of tubules. H.E., $\times 200$.

Fig. 6. EGM, 1,000 mg/kg/day: Inside the tubules no cells except Sertoli cells are seen. H.E., $\times 200$.

精巣重量の減少が認められた EGM, EGE, EGMA, EGEA 投与マウスの精巣は、組織学的には投与量に応じて種々の程度の精細管の萎縮像が観察された。すなわち、比較的低用量である EGE 1,000 mg/kg 群, EGEA 2,000, 1,000 mg/kg 群ではその変化は軽度であり、一部の精細管に精子、精子細胞、精母細胞の減少が観察された。EGM 250 mg/kg 群, EGMA 500 mg/kg 群では、精子と精子細胞は一部の精細管に少数みられるだけであり、精母細胞の減少も明らかであった (Fig. 4)。EGM 500 mg/kg 群, EGE 2,000 mg/kg 群, EGMA 1,000 mg/kg 群, EGEA 4,000 mg/kg 群では、精細管の径は減少し、精細管内には精祖細胞は残存するものの、精子と精子細胞はまったく消失し、精母細胞も一部の精細管にきわめて少数存在するだけであり、また、間質の増加も観察された (Fig. 5, 8, 10)。EGM 2,000, 1,000 mg/kg 群, EGMA 2,000 mg/kg 群では、精細管内にはセルトリ細胞が存在するだけであり、精細胞

はまったく消失していた (Fig. 6, 7, 9)。EGB と EGP ではおおよそ 1,000 mg/kg 群の 1 例に精細管の萎縮像が観察された。

貯精嚢と凝固腺の合計重量は EGM 1,000 mg/kg 群, EGMA 2,000 mg/kg 群, EGEA 4,000 mg/kg 群で、対照群とくらべて有意な低下がみられた。

2. 血液の変化

血液学的検査の結果を Table 2 に示した。調べた項目のなかでは白血球数の減少が顕著であった。白血球数が対照にくらべて有意に低下したのは EGM で、1 回当たりの投与量が 500 mg/kg 以上、EGMA で 1,000 mg/kg 以上、EGE と EGEA では 2,000 mg/kg 以上であり、その減少の強さは EGM と EGMA において、EGE と EGEA におけるより大であった。EG, EGB, EGP では白血球数の有意な低下は認められなかった。

赤血球数、血球容積、血色素量の変化は、白血球数の減少にくらべると軽度であり、EGM 1,000 mg/kg 群の

Fig. 7. EGM, 2,000 mg/kg/day: Note irregular-shaped tubules without any cells except a few Sertoli cells. H.E., $\times 200$.

Fig. 8. EGE, 2,000 mg/kg/day: Tubules are decreased in size and cellularity. In the seminal epithelia spermatozoa, Sertoli cells and a few spermatocytes are seen. H.E., $\times 200$.

Fig. 9. EGMA, 2,000 mg/kg/day: There found only Sertoli cells in seminal epithelium. H.E., $\times 200$.

Fig. 10. EGEA, 4,000 mg/kg/day: There are Sertoli cells and few spermatogonia in the seminal epithelia. H.E., $\times 200$.

赤血球数と血色素量, EGMA 2,000 mg/kg 群の血色素量, EGEA 4,000 mg/kg 群の血球容積, そして EGB 1,000, 500 mg/kg 群の赤血球数の減少が観察された。

IV. 考 察

EG ではほとんど認められない精巣の萎縮作用が, それにメチル基, エチル基, プチル基などのアルキル基がエーテル結合することによって現われ, その作用の強さはアルキル基の種類により異なり, メチル基の場合に最も大で, エチル基, プチル基と分子量が大となるにつれて小となっていた。化学物質とその薬理作用についてはかなり多くの報告があり, 化学物質の物理化学的性質と毒性の間の関係についても, ソビエト連邦などで研究され, 化学構造や物理化学的性質から毒性を推定する試みがなされている⁷⁾。われわれの研究では同族列の化合物

の数が少ないが, マウス精巣の萎縮作用が, EG にメチル基の入った EGM で最も強く, エチル基の入った EGE では EGM より弱く, プチル基の加わった EGB ではさらに弱くなること, つまりエーテル結合のアルキル基が長くなるにつれて精巣の萎縮作用が弱くなっていたのは興味あることである。これに対して, エステル化による作用の強さの変化については, エステルとなった EGMA および EGEA は投与量を mg/kg として示すとおのの EGM および EGE に比較して精巣への作用が減弱しているように見えたが, 投与量を mol/kg に換算して比較してみたところ, EGMA は EGM と, EGEA は EGE とおののほとんど等しくなることから, 投与量を mg/kg としたときに見られたエステル化による作用の減弱はたんに見かけの変化であると考えられた。

次にエチレングリコールモノアルキルエーテル類による精巣萎縮作用の作用機作について検討する。Werner⁸⁾の報告によれば、吸入後3週間の死亡状況から算出したLC₅₀はEGMで4.5 mg/l, EGEで6.8 mg/l, EGBで3.4 mg/l程度となっており、精巣萎縮の順とは一致していないことからEGの誘導体でみられる精巣萎縮作用と致死作用とは同じ機序によるものとは考えられず、また、本実験の条件下では体重低下、肝臓あるいは腎臓等の障害もほとんど認められていない⁹⁾。一方、血液系の変化として、白血球数の減少が顕著に観察され、白血球の減少が著しいものでは精巣萎縮の程度も強いことから、この二つの作用のメカニズムは同じであろうと推定されるし、精巣の萎縮が強くて副生殖腺の変化が軽度な点を考慮すると、そのメカニズムはアルキル化剤などで見られる細胞分裂阻害作用ではないかと思われる。

エチレングリコールの誘導体による貧血の発現とそのメカニズムについて、従来より多くの報告があるが^{1,2)}、本実験の結果は、EGM, EGMA, EGEA投与では赤血球系の変化は精巣重量低下と白血球数減少が著明にみられる高用量でのみ観察され、これに対してEGBでは逆に精巣重量低下と白血球減少がみられず、赤血球数の低下が認められた。

V. 結 論

EGにアルキル基がエーテル結合すると、マウスの精巣に萎縮作用が現われ、その強さはメチル基のEGMで最も強く、エチル基のEGEがその次で、ブチル基(EGB)、フェニル基(EGP)はきわめて弱かった。また、エステル化してもその作用に変化はみられなかった。同時に測定された白血球数の減少の順は精巣の萎縮の順によく一致していた。

稿を終えるに当たり、ご校閲賜った久保田重孝先生ならびに芝田敏勝先生および実験に協力いただいた検査センター実験検定室の各位に感謝いたします。本報告の要旨は昭和52年4月の第50回日本産業衛生学会で発表された。

文 献

- 1) Patty, F. A.: *Industrial Hygiene and Toxicology*, 1537—1592, Interscience Publishers, New York, 1963.
- 2) Browning, E.: *Toxicology and Metabolism of Industrial Solvent*, 601—623, Elsevier, Amsterdam, 1965.
- 3) Wiley, F. H., Hueper, W. C., Bergen, D. S. and Blood, F. R.: The formation of oxalic acid from ethylene glycol and related solvents, *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, 20: 269—277, 1938.
- 4) Morris, H. J., Nelson, A. A. and Calvery, H. O.: Observations on the chronic toxicities of propylene glycol, ethylene glycol, diethylene glycol, ethylene glycol mono-ethyl-ether, and diethylene glycol mono-ethyl-ether, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 74: 266—273, 1942.
- 5) Von Stenger, E. G., Aeppli, L., Müller, D., Peheim E. und Thomann, P.: *Zur Toxikologie des Äthylenglykol-Monoäthyläthers*, *Arzneim.-Forsch.*, 21: 880—885, 1971.
- 6) 今宮俊一郎, 中山栄基, 長野嘉介, 小谷野道子, 大林久雄, 安達秀美: エチレングリコールモノメチルエーテルアセテートの毒性に関する研究, 日本産業衛生学会講演集, 98—99, 1976.
- 7) WHO: *Methods Used in the USSR for Establishing Biologically Safe Levels of Toxic Substances-Papers*, presented at a WHO Meeting held in Moscow from 12 to 19 December 1972, 19—44, WHO, Geneva, 1975.
- 8) Werner, H. W., Mitchell, J. L., Miller, J. M. and von Oettingen, W. F.: The acute toxicity of vapors of several monoalkyl ethers of ethylene glycol, *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, 25: 157—163, 1943.
- 9) 長野嘉介, 中山栄基, 安達秀美, 山田 勉: セロソルブ類による精巣障害, 労働衛生, 18(11): 24—27, 1977.

著者への通信先: 長野嘉介, 〒108 東京都港区芝 5-35-1 中央労働災害防止協会 労働衛生検査センター *Reprint requests to* Occupational Health Service Center, Japan Industrial Safety Association, 35-1, Shiba 5-chome, Minato-ku, Tokyo, 108 Japan (K. Nagano)