

亜慢性 ETBE 吸入ばく露によるマウス脾臓細胞への影響

李 卿*1, 小林 麻衣子*1, 稲垣 弘文*1, 平田 幸代*1, 平田 紀美子*1
清水 孝子*1, 王 瑞生*2, 須田 恵*2, 川田 智之*1

ETBE は自動車のバイオ燃料として使用されており, 現在その使用量がそれほど多くないが, 増加している傾向である. 本研究は ETBE による免疫毒性を検討する目的でまずは ETBE による脾臓細胞への影響を検討した. C57BL/6J と 129/SV 雄性マウスは 6 時間/日, 5 日/週のスケジュールで 0 ppm (対照), 500 ppm, 1,750 ppm および 5,000 ppm の ETBE にそれぞれ 6 と 13 週間吸入ばく露し, 最終ばく露の 20 時間後に解剖して脾臓を採取し, 脾細胞を調製し, Flow cytometry 法を用いて以下の脾細胞表面マーカーを測定・解析した. (1) T 細胞 (PerCP-Cy5.5-CD3e), (2) T 細胞サブセット (FITC-CD4 と PE-CD8a), (3) B 細胞 (PerCP-Cy5.5-CD45R/B220), (4) NK 細胞 (PE-NK1.1) 及び (5) マクロファージ (FITC-CD11b). 末梢血 Hb 濃度, 赤血球数, 白血球数, 血小板, 体重及び脾臓対体重比も測定した.

その結果, ETBE ばく露は一時的に末梢血 Hb 濃度, 赤血球数を増加させたが, 体重及び脾臓対体重比には影響を及ぼさなかった. ETBE ばく露は, ばく露量に依存して脾臓 CD3+ T 細胞, CD4+ T 細胞, CD8+ T 細胞, CD4+ T 細胞陽性率及び CD4+/CD8+ T 細胞比を有意に減少させることが明らかとなった. 一方で ETBE ばく露は, 脾臓 NK 細胞, B 細胞, マクロファージ及び脾臓細胞総数に影響を及ぼさなかった. 結論として本研究は, ETBE 単独ばく露による免疫毒性を初めて明らかにしたと共に, ETBE が選択的にマウス脾臓 T 細胞数を減少させることが判明した.

キーワード: B 細胞, ETBE, flow cytometry, NK 細胞, 脾臓細胞, T 細胞.

1 はじめに

ETBE は, 二酸化炭素及び揮発性有機物の排出を減少するために, 酸素添加剤としてガソリンに添加し, MTBE (methyl tertiary butyl ether) の代替物として使用されている. ガソリン添加剤として ETBE が 17% までガソリンに添加されると提案され, 今後大量の ETBE が市場に流通されると予測される. ETBE は主に皮膚と呼吸を経由して生体内に入るが, 飲用水を経由して経口ばく露も予想される¹⁾. ヨーロッパではガソリン添加剤として ETBE の使用量が増加しており, 2010 年では少なくともバイオ燃料の 5.75% を占めていると報告されている²⁾. 日本の石油業界は, 約 84 万 kL の ETBE (約 63 万トン, バイオエタノールとして原油換算 21 万 kL 相当) を平成 22 年に導入することを目指している. ETBE がガソリンに混合使用された場合, ETBE は他のガソリン成分とともに大気に排出される. 現在のガソリンに関する VOC 排出量の既存データをもとに, 蒸気圧とモル濃度を元に ETBE の総排出量を推計し, 推計された排出源別の総排出量は, 製油所, 油槽所では約 2,100 t/年, 給油所では約 4,700 t/年, 自動車から約 6,300 t/年と試算されており³⁾, ヒトへ潜在的なばく露が十分に考えられる. 単回ばく露毒性試験では ETBE の一般毒性が低

く, 皮膚と目への刺激性及び感作性も認められず, 遺伝毒性も神経毒性も確認されていない^{4,5)}. しかし, ラットにおいて ETBE ばく露による腎臓及び肝臓への影響が観察された^{6,7)}. Medinsky ら⁶⁾の報告では 13 週間 ETBE 吸入ばく露によって腎臓毒性, 臓器重量 (雌ラットの心臓) 変化の lowest-observed adverse effect level

(LOAEL) は 500 ppm (2,090 mg/m³) で, 肝臓毒性の LOAEL は 1,750 ppm (7,315 mg/m³) である. 経口ばく露では生殖毒性と発生毒性が認められなかった⁸⁾. 一方で 13 週間 1,750 ppm (7,315 mg/m³) と 5,000 ppm (20,900 mg/m³) の ETBE 吸入ばく露はラットの精子異常を起こした⁶⁾. さらに ETBE ばく露による血中テストステロン及びエストロゲンレベルへの影響も報告されている⁹⁾. ETBE の免疫毒性について White ら¹⁰⁾は雌 Sprague-Dawley ラットにガソリン/ETBE 混合物

(2,000, 10,000 及び 20,000 mg/m³) を 4 週間 (6 時間/日, 5 日/週) 吸入ばく露させた結果, 抗体産生細胞 (AFC) が有意に減少し, ETBE の潜在的な液性免疫毒性が示唆された. Yamaki と Yoshino¹¹⁾は ETBE が *in vitro* では IgE 誘発肥満細胞活性化を抑制することを報告したが, しかし, *in vivo* において ETBE 単独ばく露による免疫毒性に関する研究が見当たらない. この背景の下に, 我々は ETBE による免疫毒性を検討する目的で, まずは ETBE による脾臓細胞への影響について検討した.

*1 日本医科大学衛生学公衆衛生学

*2 労働安全衛生総合研究所 健康障害予防研究グループ

連絡先: 〒113-8602 東京都文京区千駄木 1-1-5

日本医科大学衛生学公衆衛生学 李 卿

E-mail: qing-li@nms.ac.jp

2 材料と方法

1) 動物

本研究は、雄性 C57BL/6J 系（日本 Charles River Laboratories から購入）と 129/SV 系（名古屋大学より提供）の SPF マウスを用いた。8 週齢のマウスを、それぞれ 5-6 匹ずつ対照群、500 ppm ETBE, 1,750 ppm ETBE, 5,000 ppm ETBE ばく露群に分けた（表 1）。

マウスは 6 時間/日、5 日/週のスケジュールで 6 と 13 週間 ETBE にそれぞれ吸入ばく露し（表 1）、最終ばく露の 20 時間後に解剖して脾臓を採取し、脾臓重量を測定した後、脾細胞を調製した。Flow cytometry 法を用いて以下の脾細胞表面マーカーが測定・解析された¹²⁾。

2) ばく露経路とばく露期間

ETBE（純度 97%以上）は東京化成から購入した。

3) 測定項目

(1) T 細胞：PerCP-Cy5.5 標識ラット抗マウス CD3e

表 1. 実験デザイン及び ETBE ばく露濃度

ETBE の標的濃度 (ppm)	129/SV マウス 6 週間ばく露		C57BL/6J マウス 6 週間ばく露		C57BL/6J マウス 13 週間ばく露	
	ETBE の実測濃度 (ppm) (Mean±SD)	マウス 数	ETBE の実測濃度 (ppm) (Mean±SD)	マウス 数	ETBE の実測濃度 (ppm) (Mean±SD)	マウス 数
0	0	6	0	6	0	5
500	474.5 ± 25.2	6	474.7 ± 24.5	6	500.1 ± 24.7	5
1,750	1,743.6 ± 101.2	6	1,742.0 ± 100.0	6	1,757.2 ± 101.1	5
5,000	4,927.8 ± 314.7	6	4,922.8 ± 312.4	6	4,999.0 ± 239.3	5

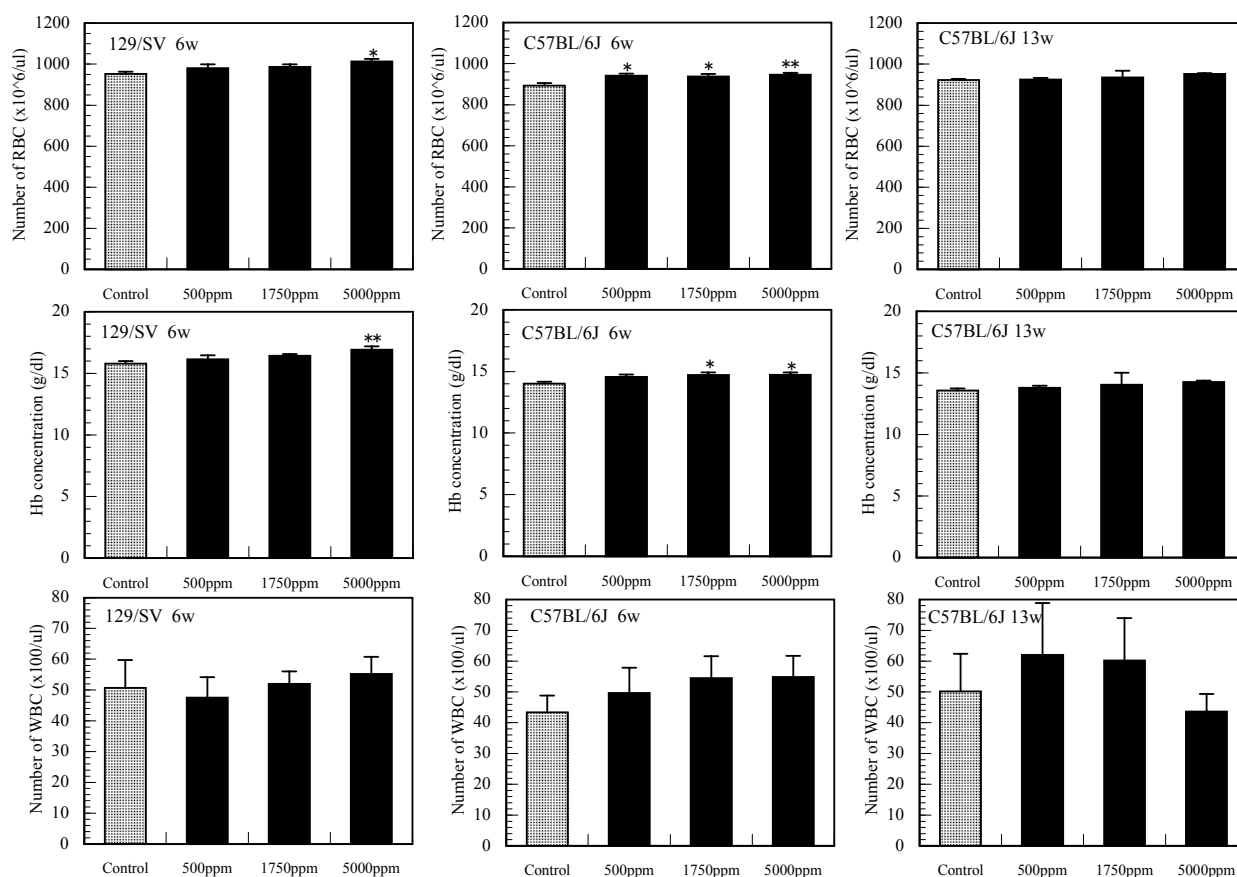


図 1. ETBE ばく露による 129/SV と C57BL/6J マウスの RBC 計測値, Hb 濃度及び WBC 計測値への影響

平均値±標準誤差（6 週間ばく露：n=6, 13 週間ばく露：n=5）。一元配置分散分析の結果、6 週間 ETBE ばく露は有意に C57BL/6J と 129/SV マウスの RBC 計測値と Hb 濃度に影響を与えた（すべて p<0.05）。

*: p<0.05, **: p<0.01 は対照群との差を示している。

Li *et al.* Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2011; 24(4): 837-47 より引用。

抗体を用いた。

(2) T細胞サブセット：FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識ラット抗マウス CD4 抗体と PE (phycoerythrin) 標識ラット抗マウス CD8a 抗体を用いた。

(3) B細胞：PerCP-Cy5.5 標識ラット抗マウス CD45R/B220 抗体を用いた。

(4) NK細胞：PE 標識マウス抗マウス NK1.1 (PK136) 抗体を用いた。

(5) マクロファージ：FITC 標識ラット抗マウス CD11b (Mac-1) 抗体を用いた。

(6) 赤血球芽細胞：PE 標識ラット抗マウス Ter-119 抗体を用いた。

以上の抗体は BD PharMingen (San Diego, CA) より購入した。

またマウスの体重、末梢血 Hb 濃度、赤血球数、白血球数及び血小板数も測定した。なお、本研究は労働安全衛生総合研究所動物実験倫理委員会のガイドラインに従って実施された。

4) 統計処理

SPSS 16.0J 解析ソフトを用いてデータの正規分布を

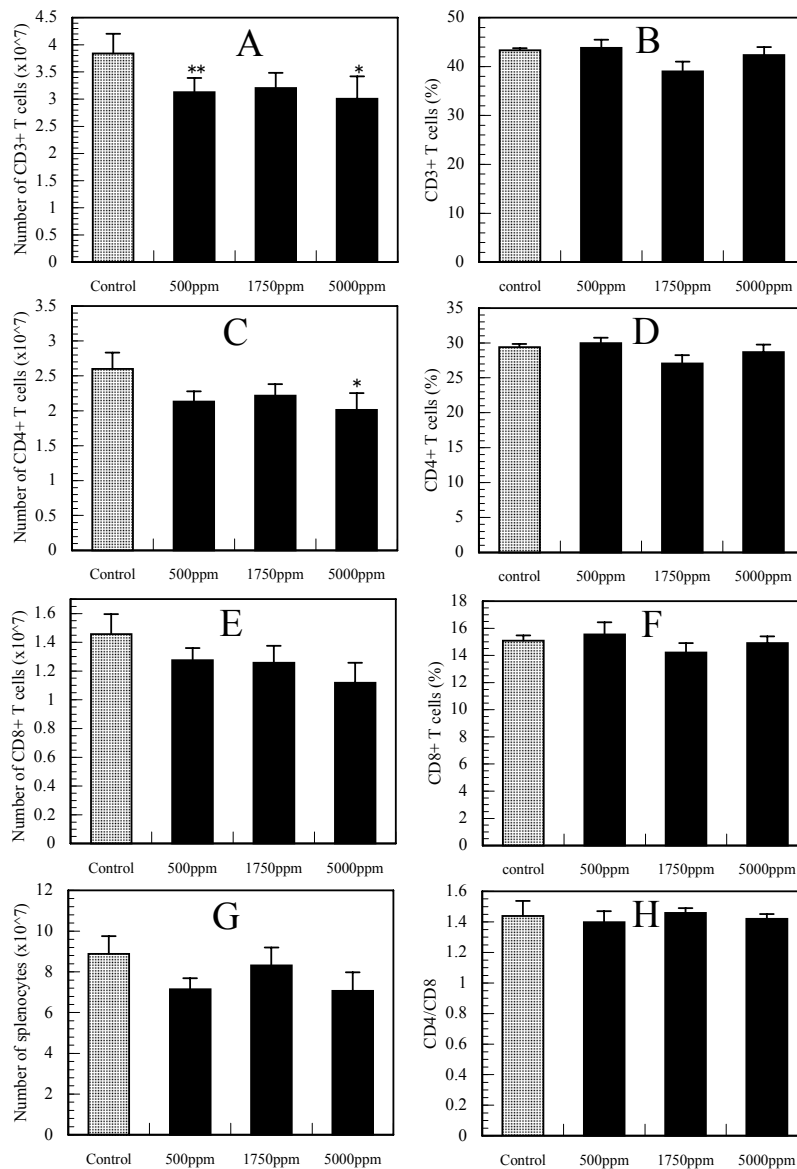


図 2. 6 週間 ETBE ばく露による 129/SV マウスの脾臓 CD3+ T 細胞数と陽性率 (A, B), CD4+ T 細胞数と陽性率 (C, D), CD8+ T 細胞数と陽性率 (E, F), 脾臓細胞総数 (G) 及び CD4+/CD8+ T 細胞比 (H) への影響
 平均値±標準誤差 (n=6)。一元配置分散分析の結果、ETBE ばく露は有意に 129/SV マウスの脾臓 CD3+ T 細胞数と CD4+ T 細胞数に影響を与えた (いずれも p<0.05)。

*: p<0.05, **: p<0.01 は対照群との差を示している。

Li *et al.* Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2011; 24(4): 837-47 より引用。

確認した後、分散分析及び Tukey-検定法を用いてデータを解析した。

3 結果

1) ETBE ばく露による体重及び脾臓重量への影響

6週間または13週間の ETBE ばく露はマウスの体重及び脾臓重量に影響を与えないことが判明した (データ未掲載)。

2) ETBE ばく露による血液学指標への影響

図1に示されたように、6週間 ETBE ばく露は有意に 129/SV 及び C57BL/6J マウスの赤血球数と Hb 濃度を増加させることが明らかとなった。13週間 ETBE ばく露において C57BL/6J マウスの赤血球数と Hb 濃度は増加傾向を示したが、統計学的な有意差は認められなかった。一方で、ETBE ばく露は白血球数と血小板数には影響を及ぼさなかった (データ未掲載)。

3) 6週間 ETBE ばく露による 129/SV と C57BL/6J マウスの脾臓細胞総数及び T 細胞への影響

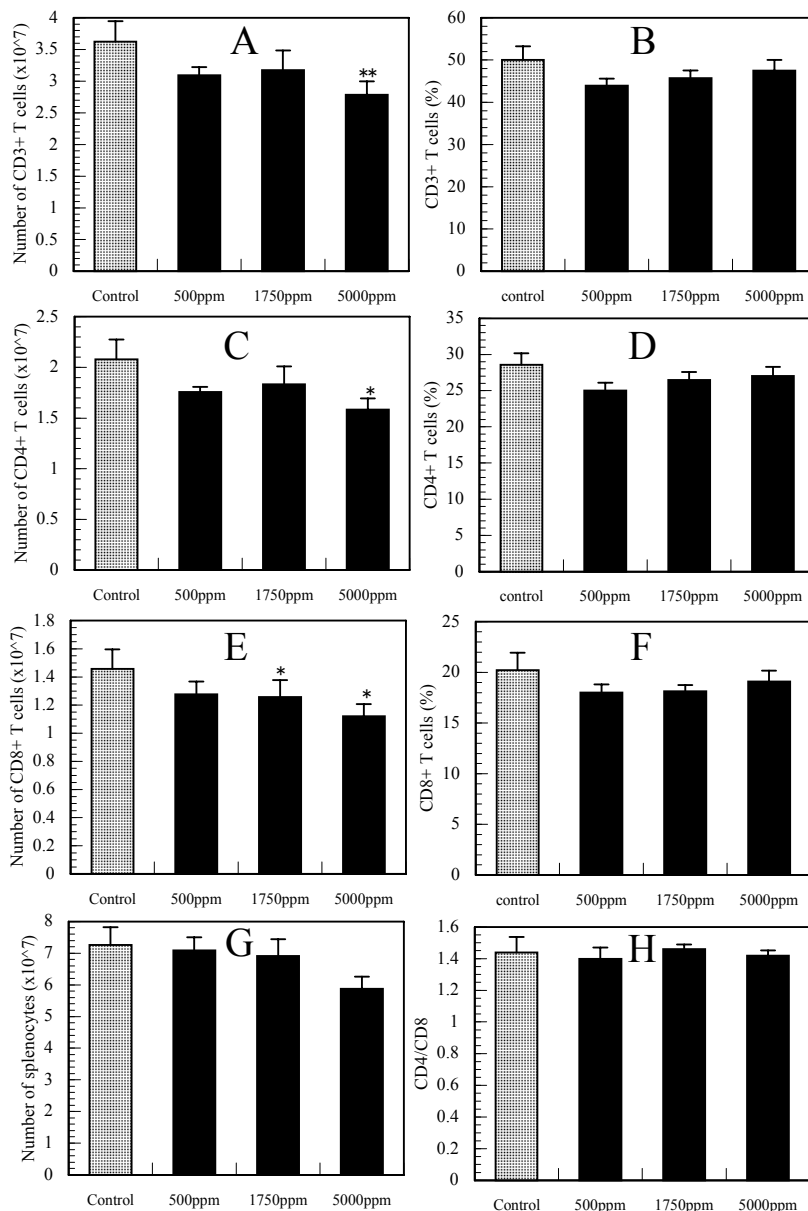


図3. 6週間 ETBE ばく露による C57BL/6J マウスの脾臓 CD3+ T 細胞数と陽性率 (A, B), CD4+ T 細胞数と陽性率 (C, D), CD8+ T 細胞数と陽性率 (E, F), 脾臓細胞総数 (G) 及び CD4+/CD8+ T 細胞比 (H) への影響

平均値±標準誤差 (n=6). 一元配置分散分析の結果, ETBE ばく露は有意に C57BL/6J マウスの脾臓 CD3+ T 細胞数, CD4+ T 細胞数と CD8+ T 細胞数に影響を与えた (いずれも p<0.05).

*: p<0.05, **: p<0.01 は対照群との差を示している。

Li *et al.* Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2011; 24(4): 837-47 より引用。

図2と3に示されたように、ETBEばく露は顕著にT細胞数を減少させたが(図2ACと図3ACE)、T細胞の陽性率(図2BDFと図3BDF)及びCD4+/CD8+ T細胞比(図2Hと3H)には影響を及ぼさなかった。5,000ppm群のCD3+, CD4+及びCD8+ T細胞数はそれぞれ有意に対照群より低かった。さらに129/SVマウスの500 ppm群のCD3+ T細胞数(図2A)及び57BL/6Jマウスの1,750 ppm群のCD8+ T細胞数(図3E)はそれぞれの対照群より有意に低下した。一方で6週間ETBEばく露は129/SVとC57BL/6Jマウスの脾臓細胞総数には影響を及ぼさなかった(図2Gと3G)。

4) 13週間ETBEばく露によるC57BL/6Jマウスの脾臓細胞総数及びT細胞への影響

図4に示されたように、13週間ETBEばく露は有意にCD3+(図4A)とCD4+ T細胞数(図4C), CD4+ T細胞陽性率(図4D)及びCD4+/CD8+ T細胞比(図4H)を減少させた。1,750 ppm及び5,000 ppm群のCD3+とCD4+ T細胞数, CD4+/CD8+ T細胞比及び5,000 ppm群のCD4+ T細胞陽性率は有意にそれぞれの対照群より低かった。さらに1,750 ppm及び5,000 ppm群のCD4+ T細胞数及び5,000 ppmばく露群のCD3+ T細胞

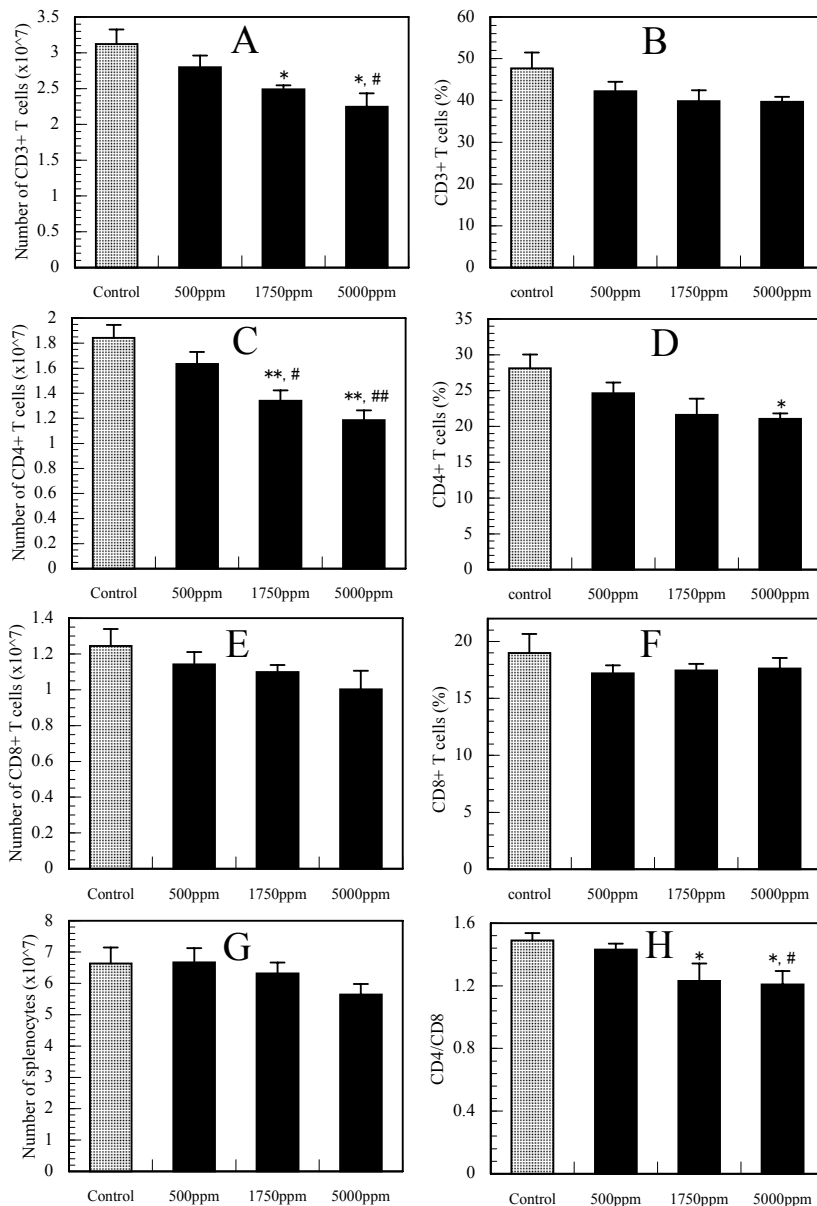


図4. 13週間ETBEばく露によるC57BL/6Jマウスの脾臓CD3+ T細胞数と陽性率(A, B), CD4+ T細胞数と陽性率(C, D), CD8+ T細胞数と陽性率(E, F), 脾臓細胞総数(G)及びCD4+/CD8+ T細胞比(H)への影響

平均値±標準誤差(n=5)。一元配置分散分析の結果、ETBEばく露は有意にC57BL/6Jマウスの脾臓CD3+ T細胞数, CD4+ T細胞数, CD4+ T細胞陽性率及びCD4+/CD8+ T細胞比に影響を与えた(いずれもp<0.05)。

*: p<0.05, **: p<0.01は対照群との差を示し, #: p<0.05, ##: p<0.01は500 ppm群との差を示している。

Li et al. Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2011; 24(4): 837-47より引用。

数及び CD4+/CD8+ T 細胞比はそれぞれ 500 ppm 群より有意に低下し, ETBE ばく露による CD4+ と CD3+ T 細胞への影響において量・反応関係が認められた. 一方で 13 週間 ETBE ばく露は C57BL/6J マウスの脾臓細胞総数には影響を及ぼさなかった (図 4G).

5) ETBE ばく露によるマウスの脾臓 B 細胞, NK 細胞及びマクロファージへの影響

図 5 に示したように 6 週間または 13 週間の ETBE ばく露は 129/SV または C57BL/6J マウスの脾臓 B 細胞, NK 細胞及びマクロファージに影響を与えないことが判明した.

4 考察

本研究は亜慢性 ETBE 吸入ばく露によるマウス脾臓リンパ球への影響を検討した. 1,750 ppm 以上の ETBE, 6 週間の吸入ばく露によってマウスの脾臓 CD3+, CD4+ 及び CD8+ T 細胞数が有意に減少することが明らかとなった. しかし, ETBE ばく露はマウスの脾臓 B 細胞, NK 細胞及びマクロファージに影響を与えなかったことから, ETBE が選択的に T 細胞に影響を与えることが示唆された. 129/SV マウスの CD3+ と CD4+ T 細胞に

おいて 6 週間 ETBE 吸入ばく露の LOAEL は 5,000 ppm であるが, 一方で C57BL/6J において CD8+ T 細胞では 6 週間 ETBE 吸入ばく露の LOAEL は 1,750 ppm であり, CD3+ と CD4+ T 細胞では 6 週間 ETBE 吸入ばく露の LOAEL は 5,000 ppm である.

ETBE のばく露期間による影響を検討するために, C57BL/6J を用いてさらに 13 週間吸入ばく露実験を行った. その結果, 13 週間ばく露によってもマウスの脾臓 CD3+, CD4+, CD8+ T 細胞数及び CD4+/CD8+ T 細胞比が有意に減少することが明らかとなった. 6 週間ばく露と同様に 13 週間 ETBE ばく露もマウスの脾臓 B 細胞, NK 細胞及びマクロファージに影響を与えなかった. 以上の結果より, ETBE が選択的に T 細胞に影響を与えることが再確認された. さらにマウスの脾臓 CD3+, CD4+ T 細胞数, CD4+ T 細胞陽性率及び CD4+/CD8+ T 細胞比において 13 週間ばく露が 6 週間ばく露よりも影響が強かったことから, ばく露期間もその毒性に影響を及ぼしていることが示唆された (図 3 と 4). C57BL/6J マウスの CD3+, CD4+ T 細胞及び CD4+/CD8+ T 細胞比における LOAEL は 1,750 ppm (7,315 mg/m³) であることが判明した. 我々は過去の研究では parachloronitrobenzene がマウス脾臓 T 細胞数と陽性

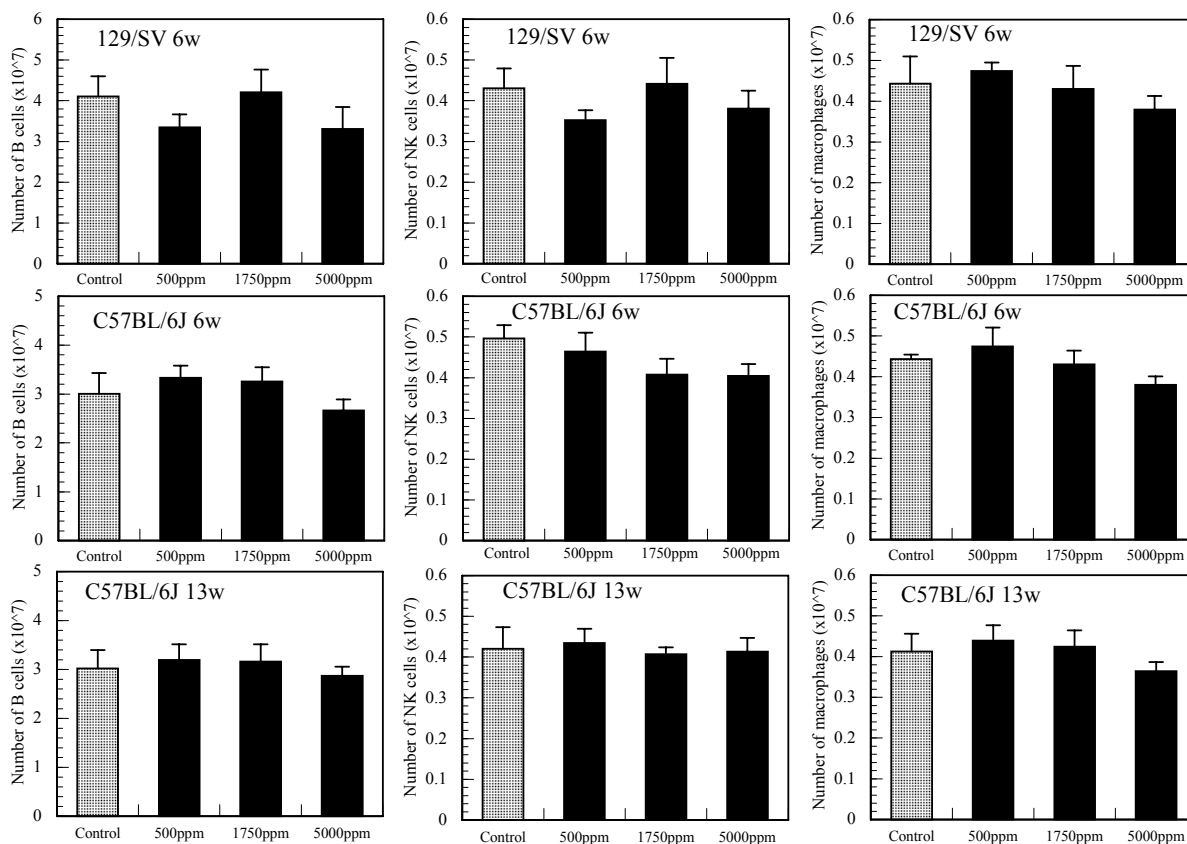


図 5. ETBE ばく露による 129/SV と C57BL/6J マウスの脾臓 B 細胞数, NK 細胞数及びマクロファージ数への影響
 平均値±標準誤差 (6 週間ばく露 : n=6, 13 週間ばく露 : n=5) .

Li *et al.* Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2011; 24(4): 837-47 より引用.

率を低下させることによって有意にマウスの CTL

(cytotoxic T lymphocytes) 活性を抑制することを報告した^{13,14)}。この結果から ETBE による T 細胞の減少は T 細胞の機能に影響を与えることも考えられる。

White ら¹⁰⁾の研究では、雌 Sprague-Dawley ラットが吸入でガソリンと ETBE との混合物 (2,000, 10,000 と 20,000 mg/m³) に 4 週間 (6 時間/日, 5 日/週) ばく露した後、脾臓抗体産生細胞 (AFC: antibody-forming cell) が有意に低下したことが明らかにされ、ガソリンと ETBE の混合ばく露は潜在的液性免疫毒性を有することが示唆された¹⁵⁾。しかし、この研究は ETBE 単独ばく露の免疫毒性を調べなかった。従って我々の研究は初めて ETBE 単独ばく露による免疫毒性を明らかにした。

一方でラットが 0, 250, 500, または 1,000mg ETBE/kg 体重/日に 28 日間経口ばく露しても AFC と脾臓細胞の T 細胞依存性 IgM 抗体産生に異常は生じなかった¹⁷⁾。これは恐らく異なるばく露期間及びばく露経路が異なる影響を生じたと推測される。

t-Butanol (TBA) は ETBE の主要な代謝物である¹⁶⁾。Yamaki と Yoshino¹¹⁾は TBA がラットマストセル RBL2H3 の脱顆粒を抑制することを報告したが、TBA による脾臓細胞及び他の免疫機能への影響に関する報告は見当たらない。従って ETBE による免疫毒性は ETBE 自身による影響か、それとも TBA による影響か、について不明であり、今後さらなる検討が必要である。

本研究では ETBE ばく露がマウスの体重、脾臓重量及び脾臓細胞数に影響を与えなかった。他の研究でもガソリンと ETBE の 4 週間混合吸入ばく露 (2,000, 10,000, と 20,000 mg/m³) はラットの体重、脾臓と胸腺の絶対・相対重量及び脾臓細胞数には影響を与えなかった¹⁷⁾。

Banton ら¹⁷⁾もラットに 0, 250, 500 と 1,000mg ETBE/kg BW/日を 28 日間連続経口投与しても体重、脾臓と胸腺の絶対・相対重量及び脾臓細胞数には影響を与えなかったと報告した。Medinsky ら⁶⁾も 13 週間 ETBE の吸入ばく露が CD-1 マウス及び Fischer-344 ラットの死亡率、体重及び脾臓重量に影響を与えなかったと報告している。

6 週間 ETBE ばく露は C57BL/6J と 129/SV マウスの RBC 計測値及び Hb 濃度を増加させたが、13 週間 ETBE ばく露は C57BL/6J マウスの RBC 計測値及び Hb 濃度に影響を及ぼさなかったことから、この反応は一時的、可逆的な影響と示唆された。一方で ETBE ばく露は末梢血の WBC 計測値と PLT 計測値には影響を与えなかった。Medinsky ら⁶⁾も 13 週間、1,750 ppm (7,315 mg/m³) ETBE の吸入ばく露が CD-1 マウスの Hb 濃度とヘマトクリット値を増加させたが、RBC 計測値と PLT 計測値には影響を与えなかったと報告した。

結論として本研究は、ETBE 単独ばく露による免疫毒性を初めて明らかにしたと共に、ETBE が選択的にマウス脾臓 T 細胞数を減少させることも判明した。また 6 週間と 13 週間ばく露における LOAEL は 1,750 ppm (7,315 mg/m³) である。

5 謝辞

本研究では動物実験において渡辺氏の協力を得たので、謝意を表する。本研究は労働安全衛生総合研究所のプロジェクト (P21-03) で実施された。

なお本研究は以下の雑誌で発表した。

Li Q, Kobayashi M, Inagaki H, Hirata Y, Hirata K, Shimizu T, Wang RS, Suda M, Kawamoto T, Nakajima T, Kawada T. Effects of subchronic inhalation exposure to ethyl tertiary butyl ether on splenocytes in mice. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2011; 24(4): 837-47.

参 考 文 献

- 1) EPA Toxicological Review for ethyl tertiary butyl ether, July 2009 (http://cfpub.epa.gov/ncea/iris_drafts/recordisplay.cfm?deid=199331)
- 2) van Wezel A, Puijker L, Vink C, Versteegh A, de Voogt P. Odour and flavour thresholds of gasoline additives (MTBE, ETBE and TAME) and their occurrence in Dutch drinking water collection areas. *Chemosphere.* 2009; 76: 672-676.
- 3) <http://www.enecho.meti.go.jp/topics/080401.pdf> (in Japanese)
- 4) McGregor D. Ethyl tertiary-butyl ether: a toxicological review. *Crit Rev Toxicol.* 2007; 37: 287-312.
- 5) Dorman DC, Struve MF, Wong BA, Morgan KT, Janszen DB, Gross EB, Bond JA. Neurotoxicological evaluation of ethyl tertiary-butyl ether following subchronic (90-day) inhalation in the Fischer 344 rat. *J. Appl. Toxicol.* 1997; 17: 235-42.
- 6) Medinsky MA, Wolf DC, Cattley RC, Wong B, Janszen DB, Farris GM, Wright GA, Bond JA. Effects of a thirteen-week inhalation exposure to ethyl tertiary butyl ether on fischer-344 rats and CD-1 mice. *Toxicol. Sci.* 1999; 51: 108-18.
- 7) Fujii S, Yabe K, Furukawa M, Matsuura M, Aoyama H. A one-generation reproductive toxicity study of ethyl tertiary butyl ether in rats. *Reprod. Toxicol.* 2010; 30: 414-21.
- 8) de Peyster A. Ethyl t-butyl ether: review of reproductive and developmental toxicity. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 2010; 89: 239-63.
- 9) de Peyster A, Stanard B, Westover C. Effect of ETBE on reproductive steroids in male rats and rat Leydig cell cultures. *Toxicol. Lett.* 2009;190: 74-80.
- 10) White KL, Peachee VL, Armstrong SR, Twerdok LE. Inhalation toxicity of gasoline & fuel oxygenate: immunotoxicity. *Toxicologist.* 2004; 78(S-1): 148.
- 11) Yamaki K, Yoshino S. Inhibition of IgE-induced mast cell activation by ethyl tertiary-butyl ether, a

- bioethanol-derived fuel oxygenate. *J Pharm Pharmacol.* 2009; 61:1243-1248.
- 12) Li Q, Kobayashi M, Inagaki H, Hirata Y, Sato S, Ishizaki M, Okamura A, Wang D, Nakajima T, Kamijima M, Kawada T. Effect of oral exposure to fenitrothion and 3-methyl-4-nitrophenol on splenic cell populations and histopathological alterations in spleen in Wistar rats. *Hum Exp Toxicol.* 2011;30(7):665-74.
- 13) Li Q, Minami M, Inagaki H. Acute and subchronic immunotoxicity of p-chloronitrobenzene in mice. I. Effect on natural killer, cytotoxic T-lymphocyte activities and mitogen-stimulated lymphocyte proliferation. *Toxicology.* 1998;127:223-32.
- 14) Li Q, Minami M, Hanaoka T, Yamamura Y. Acute immunotoxicity of p-chloronitrobenzene in mice: II. Effect of p-chloronitrobenzene on the immunophenotype of murine splenocytes determined by flow cytometry. *Toxicology.* 1999; 137: 35-45.
- 15) Huntingdon Life Sciences. Unpublished Report. Gasoline ETBE vapor condensate: a 13-week whole-body inhalation toxicity study in rats with neurotoxicity assessments and 4-week in vitro genotoxicity and immunotoxicity assessments. Huntingdon Life Sciences under contract for American Petroleum Institute (API), East Millstone, NJ. 2002: Study No. 00-6129: Sponsor No. 211-ETBE-S.
- 16) Amberg A, Rosner E, Dekant W. Biotransformation and kinetics of excretion of ethyl tert-butyl ether in rats and humans. *Toxicol Sci.* 2000;53: 194-201.
- 17) Banton MI, Peachee VL, White KL, Padgett EL. Oral subchronic immunotoxicity study of ethyl tertiary butyl ether in the rat. *J Immunotoxicol.* 2011;8(4):298-304.