

部分翻訳

**European Union  
Risk Assessment Report  
2,4-DINITROTOLUENE**

**CAS No: 121-14-2**

*2008*

**欧州連合  
リスク評価書(2008年9月最終承認版)  
2,4-ジニトロトルエン**

**2,4-DINITROTOLUENE**

CAS No: 121-14-2

EINECS No: 204-450-0

**RISK ASSESSMENT**

*Final report, February 2008*

SPAIN

*FINAL APPROVED VERSION*

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2016年1月

本部分翻訳文書は、2,4-dinitrotoluene (CAS No: 121-14-2)に関する EU Risk Assessment Report, (2008)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)関係」を翻訳したものである。原文(評価書全文)は、  
<http://echa.europa.eu/documents/10162/b1176fd0-799d-4c08-a908-755a1c82181f>  
を参照のこと。

#### 4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量(濃度)-反応(影響)関係

##### 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

データは得られていない。

###### 経皮

データは得られていない。

###### 経口

2,4-ジニトロトルエン(2,4-DNT)を経口投与した場合のトキシコキネティクスについては、実験動物、特にラットを用いて実施されたいくつかの試験により検討されている。それらの試験の多くは、研究目的で実施されたものである。したがって、それらの試験手法は必ずしも OECD ガイドライン 417 に厳密に準拠したものではなく、その要項に記載されたパラメータの一部しか検討していない試験もある。ここに示すデータは、査読者による査読が実施されている雑誌に発表された試験から得られたものか、もしくは本書の目的に適合すると判断された試験から得られたものである。それらの試験では、若干の不一致も明らかに認められるが、同様の結果が得られている。したがって、以下に示すデータは、リスク評価に適していると判断される。

## ラット

Mori, Naruse and Kozuka(1977)は、純粋な 2,4-DNT を用いて、その分布と排泄を調べている。3匹の雄の Wistar ラットに、 $^3\text{H}$ -2,4-DNT が、サラダ油を媒体として、50 mg/kg 体重の用量で経口投与された。尿と糞便が別々に、7 日間にわたって毎日採取された。組織分布を調べるために、ラットを、2,4-DNT 投与の 7 日後に屠殺し、全身の臓器を採取した。ただし、脂肪については腎臓周囲の脂肪蓄積部位から採取したものを、筋肉組織については後肢の大腿骨部位から採取したものを、皮膚組織は背中から採取したものを、試料として用いた。投与された放射活性の約 21%が、第 1 日目の糞便に排泄された。第 2 日目および第 3 日目の糞便に排泄された放射活性量は、それぞれ 4%および 1%であった。投与された放射活性の約 13.5%が第 1 日目の尿に排泄されたが、第 2 日目以降は、放射活性の排泄は痕跡程度となった。合計では、投与された放射活性の約 46%が、7 日間の間に糞便および尿中に排泄された。投与後 7 日目の時点で脂肪組織、皮膚および肝臓に残存していた放射活性は、それぞれ 1.5%、0.6%および 0.4%であった。他の組織に残存していた放射活性は、無視できる量であった。組織に残存していた放射活性の割合は示されていないが、データに基づくと、投与された量のわずか半分程度であると思われる。

Lee *et al* (1975, 1978)は、2,4-DNT(純度 98%)のトキシコキネティクスに関する試験を実施している。各試行につき 3 匹ずつの雌の CD ラットに、ピーナツ油に懸濁された  $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT が、65 mg/kg 体重の用量で、胃内挿管により単回投与された。糞便と尿が別々に採取され、また呼吸中の  $\text{CO}_2$  も採取された。各試行の終了時点で、ラットの骨格筋を採取し、その重量を測定し、その一部を典型的な試料として放射活性測定に供した。また、胃腸管を内容物を含めて採取し、その重量を測定した。胃腸管と糞便のホモジネートを作製し、それを濾過した。濾出物と濾過残渣から試料を採取し、放射活性測定に供した。2,4-DNT は良く吸収されていた。吸収は、実質的に 24 時間で完了していた。24 時間の時点では、回収された放射活性は、平均で、投与量の 88.5%であった。内訳は、平均で、尿中に 75.9%、糞便中に 9.1%、胃腸管に 2.8%、骨格筋(体重の 40%を占めると仮定して)および肝臓に 0.3%、全血(体重の 7%を占めると仮定して)に 0.1%、そして、腎臓、脳および肺に 0.1%未満であった。吸収された放射活性の大半は、尿中に排泄された。血漿中の放射活性に対する組織中の放射活性の比を求めることより、様々な組織における放射活性の保持状態が示された。すなわち、投与後 24 時間の時点では、放射活性は、肝臓に高濃度に認められ(放射活性比:18.1)、腎臓(放射活性比:7.4)や肺(放射活性比:6.1)では中等度に認められ、骨格筋や脳では 1 より大きな放射活性比で認められた。別の 3 匹のラットに、 $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT を連続 5 日間投与し、単回投与の場合の 24 時間後の時点における組織中の放射活性量と、連続投与の場合の最終投与から 24 時間後の時点における組織中の放射活性量とを比較した。いずれの組織についても、5 日間投与を受けた場合の方が、単回投与の場合よりも 2

～4.8 倍高い放射活性を有していた。2,4-DNT は十分に代謝され、親化合物は尿中には検出されなかった。4 時間尿試料と 24 時間尿試料の放射活性分析では、両方の尿試料で 1 個の大きなピークが現れ、また 24 時間尿試料でのみ、1 個の小さなピークが現れた。代謝産物の同定は、24 時間尿試料についてのみ行われた。その結果を Table 4.1.2.1.1-1 に示した。

Table 4.1.2.1.1-1: Metabolites of 2,4-DNT in rat urine collected for 24 hours after oral administration of a single dose of 2,4-DNT (Ring- $^{14}\text{C}$ ) (Lee *et al* 1975, 1978)

Metabolites	Conjugates		
	Free	Glucuronide	Sulphate
2,4-DNT (I)	0	0	0
4-amino-2-nitrotoluene (II)	0.4	1.2	0.9
2-amino-4-nitrotoluene (III)	0	0.1	0.6
2,4-diaminotoluene (IV)	1.3	5.9	4.3
2,4-dinitrobenzyl alcohol (V)	3.2	27.1	2.9
2,4-/4,2-aminonitrobenzyl alcohols (VI/VII)	2.2	22.5	0.7
2,4-diaminobenzyl alcohol (VIII)	0.9	1.7	3.4
2,4-dinitrobenzoic acid (XIII)	8.0	0.2	0
All identified	16	58.7	12.9
Unidentified	12.5		

Percent of  $^{14}\text{C}$ -radioactivity in urine (n = 3 females)

2,4-DNT は十分に代謝を受け、親化合物は尿中には検出されなかった。24 時間尿中に検出された主要な代謝産物は、2,4-ジニトロベンジルアルコールおよび 2,4-/4,2-アミノニトロベンジルアルコールのグルクロン酸抱合体であった (Table 4.1.2.1.1-1 参照)。したがって、2,4-DNT の代謝は 2 相性であると考えられる。その第 1 相目では、ニトロ基の還元やメチル基の酸化が起こる。1 個もしくは両方のニトロ基が、肝ミクロソームや他の組織に存在するニトロ還元系によって、アミンに還元されると考えられる。メチル基は、肝ミクロソームの酸化系によって、ベンジルアルコールに酸化されると考えられる。このベンジルアルコールは、さらに酸化を受ける場合がある。すなわち、アルコール脱水素酵素によるベンズアルデヒドへの酸化、さらにはアルデヒド脱水素酵素による安息香酸への酸化である。こうして生じた酸化的代謝産物および還元的代謝産物は、第 2 相の代謝、すなわち、抱合体を受けると考えられ、その結果グルクロン酸抱合体、硫酸化物もしくは他の化合物を生成して、そうした後に排出されると考えられる。

2,4-DNT は肝臓に高濃度に分布し、肝臓では代謝による生体内変化および胆汁排泄が生じることから、Lee *et al.* (1978) は、以下の試験を実施して、2,4-DNT の胆汁排泄を調べた。3 匹の雌の CD ラットが試験に用いられた。被験動物は、試験前の 1 晩絶食状態とされた。エーテル麻酔下で、腹部の正中に切り込みを入れ、そこを介して PE-10 プラスチック管を

総胆管に装着した。その切込みを閉じた後、ラットには、ピーナツ油に懸濁された  $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT が、65 mg/kg 体重の用量で、胃内挿管により単回投与された。胆汁を所定の時点 (0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、23 および 24 時間) で採取し、胆汁の重量を測定した。ラットの尾端を切断する方法で、少量 (200  $\mu\text{L}$ ) の血液試料を定期的に採取し、得た血液試料にヘパリン処理を施した。24 時間の時点で、ラットをエーテルで麻酔した。血液を、腹大動脈から採取した。胃腸管を、内容物を含んだまま全長にわたり取り出し、尿の混入が無いように集められた糞便と一緒にした。胆汁、血液、血漿および胃腸管における放射活性を、液体シンチレーション分光光度計で測定した。経口投与から 15 分以内に、胆汁中に放射活性が現れた。胆汁中の放射活性は、時間の経過とともに増加し、2 時間以内に最大に達した。その後、胆汁中への放射活性の排泄は減少した。血液中の放射活性濃度は、胆汁中に排泄される放射活性と相関していた。24 時間の時点では、胆汁中に排泄された放射活性の合計は、投与された量の 10.9% に達していた。胃腸管とその内容物および糞便から回収された放射活性は、平均で、投与された量の 7.6% であった。

Mori, Naruse and Kozuka (1977) は、純粋な 2,4-DNT を用いて、その吸収と排泄を詳細に調べている。吸収・分布を調べた試験では、24 匹の雄の Wistar ラットに、サラダ油を媒体として、 $^3\text{H}$ -2,4-DNT が、22.2 mg/kg 体重の用量で経口投与された。血液試料が、所定の間隔で、頸動脈より採取された。採血の後、ラットは麻酔により屠殺され、肝臓、胃腸管、および小腸ならびに大腸内容物が採取された。尿および糞便への排泄を調べた試験では、3 匹の雄の Wistar ラットに、サラダ油を媒体として、 $^3\text{H}$ -2,4-DNT が、22.2 mg/kg 体重の用量で経口投与された。尿および糞便は、0~3 時間、3~6 時間、6~9 時間および 9~24 時間のものが採取された。胆汁への排泄を調べた試験では、3 匹の雄ラットに、エーテル麻酔の下で胆管への挿管が施された後、サラダ油を媒体として、 $^3\text{H}$ -2,4-DNT が、21.6 mg/kg 体重の用量で経口投与された。胆汁の試料を 1 時間毎に 24 時間採取した。血液、肝臓および消化器官内容物における放射活性、ならびに胆汁、糞便および尿に排泄される放射活性について、それらの経時変化を観察した。投与後 0.5 時間の時点では、血液、胆汁および尿において放射活性が検出された。血中の放射活性は、6 時間の時点でピークに達し、9 時間目までにかけて徐々に減少し、136 時間の時点では、6 時間の時点の約 33% となり、これより半減期は約 22 時間と判断された。肝臓では、放射活性は、投与後 6 時間の時点でピークに達し、血中濃度の挙動と平行していた。胃および小腸内容物における放射活性は、投与後 6 時間の時点までに急速に減少していた。胆汁への排泄率は、投与の 6 時間後から着実に増加し、9~10 時間後にピークに達し、投与した放射活性の約 10% が、24 時間以内に胆汁中に排泄された。また、かなりの放射活性が、6~9 時間に採取された糞便中に排泄されていた。胆汁中への排泄結果に基づくと、糞便中への排泄のピークは、胆汁中への排泄パターンに依存して現れていると思われた。尿中への放射活性排泄量は、糞便中への排泄量よりも急激に増加し、最初の 6 時間以内に、投与した放射活性の約 60% が尿中に

排泄された。これらのデータから、消化器からの  $^3\text{H}$ -2,4-DNT の吸収率は比較的遅く、また、糞便中に排泄される放射活性の起源は、胆汁中に排泄される放射活性であることが示唆される。

Ellis *et al.*(1979)は、2,4-DNT をラットに 3、9 ないしは 20 ヶ月間混餌投与して、 $^{14}\text{C}$  で標識した 2,4-DNT の代謝を調べた。各群雌雄 6 匹ずつのラットに、0 もしくは 34/45 mg/kg 体重/日(雄/雌)の用量で、3 ヶ月間(各用量雌雄 3 匹ずつ)または 9 ヶ月間(各用量雌雄 3 匹ずつ)2,4-DNT の混餌投与が行われた。さらに別の各群雌雄 3 匹ずつのラットに、0 もしくは 3.9/5.1 mg/kg 体重/日(雄/雌)の用量で、20 ヶ月間 2,4-DNT の混餌投与が行われた。その後、それぞれの被験動物に、ピーナツ油を媒体として、 $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT が胃内挿管により投与された。雄には 57 mg/kg 体重が、雌には 65 mg/kg 体重が単回投与された。投与後すぐに、それぞれの被験動物は、尿と糞便を別個に回収できるように、代謝ケージに入れられた。24 時間後の時点で、腹大動脈より採血が行われた。様々な組織が採取され、それらの重量が測定され、また放射活性分析のための処理が施された。 $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT の胃内挿管投与が行われる前に 3、6 ないしは 20 ヶ月間 2,4-DNT を混餌投与されていたラットにおける代謝の結果は、事前に混餌投与が行われなかったラットにおける代謝の結果と同様であった。経口投与された被験物質は良く吸収され、大部分の放射活性は 24 時間以内に尿中に排泄された(投与された放射活性の 42.2~87.8%)。胃腸管や糞便にも放射活性が検出された(それぞれ投与された放射活性の 4.2~15.9%および 2.8~20.7%)。組織中への残留は、非常に少量であり、そのなかでは肝臓(代謝と胆汁排泄が行われる器官)と腎臓(尿中排泄が行われる器官)において、最も高い 2,4-DNT 由来の放射活性が検出された。24 時間後の時点までに回収された放射活性は、混餌投与を受けていない雌の対照群(1 群)で 66%であり、混餌投与を受けた他の群では 90%を超えていた。無処置の尿試料もしくは加水分解を施した尿試料の抽出物について薄層クロマトグラフィーを行い、代謝産物の同定を行った。2,4-DNT は広範に代謝されていた(Table 4.1.2.1.1-2 参照)。

## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

Table 4.1.2.1.1-2: Metabolites collected in urine of 24 hours after a single oral dose of <sup>14</sup>C-2,4-DNT (Ellis *et al.*, 1979)

Metabolites	Males <sup>b</sup>				Females <sup>b</sup>			
	Fresh		Hydrolysed <sup>c</sup>		Fresh		Hydrolysed <sup>c</sup>	
	Control	Test	Control	Test	Control	Test	Control	Test
<i>Three months<sup>a</sup></i>								
2,4-DNT	0.02	0.01	1.3	0.8	0	0	0.2	0.4
2,4-/4,2-aminonitrotoluenes	0.5	0.3	3.2	3.0	0.1	0.1	5.9	6.4
2,4-dinitrobenzyl alcohol	1.1	4.8	19.3	20.0	3.1	4.9	18.1	16.7
Aminonitro/diamino benzyl alcohols	1.4	2.1	25.1	26.8	1.6	0.6	23.8	26.0
2,4-diaminotoluene	4.9	4.5	7.8	7.1	5.3	2.8	7.6	6.4
Conjugate and others	92.1	88.3	39.1	40.1	89.9	91.5	42.6	42
<i>Nine months<sup>a</sup></i>								
2,4-DNT	< 0.1	0.1	0.7	0.6	0.1	< 0.1	0.7	0.4
2,4-/4,2-aminonitrotoluenes	0.3	1.2	7.4	11.6	0.3	0.1	5.2	2.5
2,4-dinitrobenzyl alcohol	13.0	16.7	28.7	38.3	7.6	2.6	35.5	13.5
Aminonitro/diamino benzyl alcohols	0.9	0.9	8.2	8.4	0.2	0.8	10.2	11.4
2,4-diaminotoluene	0.1	0.4	2.2	2.2	0.5	1.2	3.4	4.5
2,4-dinitrobenzoic acid	25.2	22.6	3.1	4.0	31.1	28.0	3.2	4.0
Conjugate and others	60.5	58.1	49.6	34.8	60.3	67.2	41.9	63.7
<i>Twenty months<sup>a</sup></i>								
2,4-DNT	< 0.1	0	0.4	0.3	< 0.1	< 0.1	0.6	1.0
2,4-/4,2-aminonitrotoluenes	0.3	0.2	6.5	5.6	0.1	0.2	7.2	4.0
2,4-dinitrobenzyl alcohol	9.3	2.0	15.2	13.2	8.3	2.6	14.8	15.0
Aminonitro/diamino benzyl alcohols	0.6	1.7	3.3	3.7	0.3	1.4	4.1	2.8
2,4-diaminotoluene	0.1	0.1	1.6	0.9	0.1	0.1	1.2	1.4
2,4-dinitrobenzoic acid	17.7	12.5	9.7	9.9	18.4	21.1	16.2	16.0
Conjugate and others	72	83.5	63.3	66.4	71.8	74.6	55.9	59.8

<sup>a</sup> 3 and 9 months (34/45 mg/kg b.w./day for ♂/♀); 20 months (3.9/5.1 mg/kg b.w./day ♂/♀). <sup>b</sup> Results expressed as percent of total radioactivity in urine (n = 3 rats). <sup>c</sup> Hydrolyzed by equal volume of 5 N HCl for 1 h in 100°C water bath.

2,4-DNT そのものは、ごくわずかな量しか排泄されてこなかった。主要な代謝産物は、ジニトロベンジルアルコール、アミノニトロベンジルアルコールおよびジアミノベンジルアルコールで、側鎖の酸化やニトロ基の還元を反映したものとなっていた。これらの主要代謝産物のほとんどが、その後、排泄される前に抱合化を受けていた。試験データは、群間差や性差、および混餌投与期間による差が大きいことを示している。

Rickert and Long (1980) は、雌雄の Fischer-344 ラットを用い、2,4-DNT とその代謝産物の組織分布を調べた。コーン油を媒体として、<sup>14</sup>C-2,4-DNT が単回経口投与された。雄への投与用量は 10、35 ないしは 100 mg/kg 体重であり、雌への投与用量は 100 mg/kg 体重であった。投与後 1、2、3、4、6、8、10、12、16、20、24、36、48、60 ないしは 72 時間の時点でラットを屠殺し、血液を採取した。遠心分離により血漿を得て、さらに肝臓、腎臓、肺、脾臓、脂肪および脳を採取して、後日の解析のために凍結した。雄では、血漿、赤血球、肝臓および腎臓における放射活性の最高濃度は、投与用量に比例して増加した。肝臓や腎

臓における放射活性濃度は、血漿や赤血球における放射活性濃度よりも 5~10 倍高かった。その他の組織における放射活性濃度は、血漿における放射活性濃度よりも低かった。種々の組織における総放射活性の終末相半減期は、10 mg/kg 体重群や 35 mg/kg 体重群では同等であったが、血漿、赤血球、肝臓および腎臓における同半減期は、100 mg/kg 体重群では短縮していた。雄と雌で明確な差が認められたのは、赤血球における放射活性の保持量と肝臓における放射活性濃度だけであった。前者は雌の方が多く、後者は雌では雄の半分に過ぎなかった。また、雄の腎臓では 2,4-DNT の最高濃度は 4~8 時間後に現れ、雌で投与 1 時間後に現れた最高濃度の 3~10 倍であった。雌雄両方で、組織中に、親化合物、2,4-ジニトロ安息香酸および 2-アミノ-4-ニトロ安息香酸が含まれていることが判明したが、2,4-ジアミノトルエンの存在を示す証拠は得られなかった。特異的な分析により検出された 2,4-DNT とその代謝産物のナノモル当量と、放射活性の測定により検出された代謝産物のナノモル当量との間の差は、雌では雄の 2~5 倍であった。これらのデータにより、2,4-DNT の分布および排泄は、用量依存的に変化することが示唆される。また、雌では、2,4-DNT の未同定代謝産物への代謝が、雄よりも広範に生じること、および 2,4-DNT の肝臓がん誘発性は、2,4-DNT が 2,4-ジアミノトルエンに変換されることにより生じるものではないことが示唆される。

Mori, Naruse and Kozuka(1980)は、4 ヶ月間標準飼料で飼育した雄の Wistar ラット(10 匹、対照群)と、同期間 2,4-DNT を 5%含む標準飼料で飼育した雄の Wistar ラット(10 匹、混餌投与群)に、<sup>3</sup>H-2,4-DNT を 50 mg/kg 体重の用量で単回経口投与し、その分布と排泄を調べた。尿と糞便が、別々に、7 日間にわたって毎日採取された。その後、ラットは屠殺され、全臓器が採取された。対照群のラットでは、糞便中に排泄された放射活性の方が、尿中に排泄された放射活性よりも高かった。この結果は、2,4-DNT を混餌投与された群のラットとは正反対であった。2,4-DNT の混餌投与により <sup>3</sup>H-2,4-DNT の分布様式が変わることはなく、放射活性が高かったのは、両群とも、肝臓、皮膚および脂肪組織であった。しかし、混餌投与群のラットにおける放射活性は、対照群のラットにおける放射活性よりも低かったことから、2,4-DNT を 5%含む飼料の 4 ヶ月間摂取により、この処置を受けたラットの臓器では、2,4-DNT が飽和状態となることが示唆される。

Mori, Naruse and Kozuka(1981)は、2,4-DNT を反復投与したラットにおいて、いくつかの尿中代謝産物を同定している。純粋な 2,4-DNT をサラダ油に溶解し、雄の Wistar ラット 30 匹のそれぞれに、25 mg/kg 体重/日の用量で 6 日間経口投与した。最初の投与後の 7 日間、尿を毎日採取した。薄層クロマトグラフィーにより、9 種類の 2,4-DNT 代謝産物が、尿中に検出された。UV 分析データおよび質量分析データを基準試料のものと比較することによって、これらの代謝産物は以下の様に同定された。2-アミノ-4-ニトロトルエン(2A4NT, M-I)、4-アミノ-2-ニトロトルエン(4A2NT, M-II)、2,4-ジアミノトルエン(2,4-DAT, M-III)、



2,4-ジニトロベンジルアルコール(2,4-DNB, M-IV)、2-アミノ-4-ニトロベンジルアルコール(2A4NB, M-V)、4-アミノ-2-ニトロベンジルアルコール(4A2NB, M-VI)、2-ニトロ-4-アセチルアミノトルエン(2N4AAT, M-VII)、2-アミノ-4-アセチルアミノトルエン(2A4AAT, M-VIII)、および 2-アミノ-4-アセチルアミノ安息香酸(2A4AAB, M-IX)。これらの結果から、ラットにおける 2,4-DNT の主要な代謝反応は、ニトロ基 1 個のアミノ基への還元およびメチル基の CH<sub>2</sub>OH 基への酸化であり、4 位のアミノ基の N アセチル化や CH<sub>2</sub>OH 基の COOH 基への酸化は、二次的な反応であることが示唆される。さらに、2-アミノ-4-アセチルアミノ安息香酸が最終代謝産物であることが判明した。

Rickert and Long(1981)は、雌雄の Fischer 344 ラットに 2,4-DNT を様々な用量で投与し、その代謝と排泄を調べた。コーン油を媒体として、10、35 ないしは 100 mg/kg 体重の <sup>14</sup>C-2,4-DNT が、各ラットに単回投与された。尿中および糞便中の放射活性が測定された。雌雄のいずれにおいても、また、どの用量においても、2,4-DNT の主要な排泄経路は尿中であつた。尿中への排泄は投与 24 時間後の時点ではほぼ終了し、糞便中への排泄は投与 48 時間後の時点ではほぼ終了した。35 mg/kg 体重投与群では、尿中の放射活性は、雌の方が雄よりも有意に多かったが、糞便中の放射活性は、雌の方が雄よりも少なかった。一方、10 もしくは 100 mg/kg 体重投与群では、排泄に関して雌雄の間に有意な差は認められなかった。尿中代謝産物の HPLC 解析結果では、早期に溶出する物質のピークが 4 つ認められた。それらは雌雄両方の試料に存在し、4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロ安息香酸、2,4-ジニトロ安息香酸、2-アミノ-4-ニトロ安息香酸および 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドと同定された。これら 4 つの化合物が、尿中に排泄された放射活性の 85%を上回る割合を占めていた。尿中の 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドの割合は、10 もしくは 35 mg/kg 体重群においては、雄と比べて雌の方が有意に高かった。雌雄両方において、2,4-DNT 代謝産物の尿中排泄は、用量依存的に推移した。ただし、雄では、10 もしくは 35 mg/kg 体重群と比べ 100 mg/kg 体重群の方が、2,4-ジニトロ安息香酸の排泄が少なかった。また、雌では、10 もしくは 35 mg/kg 体重群と比べて 100 mg/kg 体重群の方が、2,4-ジニトロ安息香酸および 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドの排泄が少なかった。唯一認められた有意な性差は、10 もしくは 35 mg/kg 体重群において、雌の方が 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドの排泄が多かったことであつた。

Rickert *et al.*(1981)は、DNT の前投与の役割および 2,4-DNT の分布や毒性に対する腸内細菌叢の影響を調べた。通常飼育の Fischer-344 ラットを用意して、DNT(2,4-DNT 75.8%、2,6-DNT 19.5%および他の異性体 4%)を 30 日間混餌投与した。また、別途無菌飼育の Fischer-344 ラットを用意した。各群の雌雄に、コーン油を媒体として、<sup>14</sup>C-2,4-DNT が 35 mg/kg 体重の用量で単回投与され、<sup>14</sup>C-2,4-DNT の代謝、排泄および肝臓への共有結合が調べられた。尿および糞便は 48 時間採取された。最後に尿を採取した直後に、被験動物を

屠殺し、共有結合した総放射活性を測定するために肝臓を摘出した。無菌飼育されたラットでは、48 時間で尿中および糞便中に排泄された放射活性の割合は、通常飼育のラットよりも少なかった。DNT(35 mg/kg 体重/日)を 30 日間混餌投与しても、雌雄いずれにおいても、2,4-DNT の排泄に変化を生じることはなかった。2,4-DNT(親化合物)は尿中には検出されなかった。通常飼育されたラットの尿中には 4 つの主要な代謝産物が検出され、それらは、4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロ安息香酸(投与された総放射活性の 13~14%)、2,4-ジニトロ安息香酸(投与された総放射活性の 10~16%)、2-アミノ-4-ニトロ安息香酸(投与された総放射活性の 2~3%)および 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニド(投与された総放射活性の 16~24%)と同定された。これらの代謝産物は、無菌飼育されたラットの尿中にも存在していたが、無菌飼育されたラットでは、通常飼育されたラットと比べて、4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロ安息香酸の排泄量はかなり少なく(投与された総放射活性の 1~2%)、また、2-アミノ-4-ニトロ安息香酸もかなり低量であった(投与された総放射活性の 0.3~0.4%)。2,4-DNT の 4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロ安息香酸や 2-アミノ-4-ニトロ安息香酸としての排泄半減期は、2,4-ジニトロ安息香酸や 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドとしての排泄半減期よりもやや長かった(後者が 5 時間であったのに対して前者は 6~7 時間)が、性別や前処理によると考えられる有意差は認められなかった。無菌飼育された雌では、4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロ安息香酸や 2-アミノ-4-ニトロ安息香酸としての 2,4-DNT の排泄半減期が、通常飼育された雌と比べて有意に長かった(後者では 6.5 および 6 時間であったのに対して前者では 13 および 14 時間)。無菌飼育された雄では、4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロ安息香酸、2,4-ジニトロ安息香酸および 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドとしての 2,4-DNT の排泄半減期が、通常飼育された雄と比べて長かった(後者では 6.5、5 および 5 時間であったのに対して前者では 18.5、14 および 16 時間)。無菌飼育された雄における 2-アミノ-4-ニトロ安息香酸の排泄は非常に遅く、またばらつきも大きかったため、その半減期を決定することはできなかった。肝臓の  $^{14}\text{C}$  濃度は、通常飼育されたラットにおいて、無菌飼育されたラットよりも有意に高かった。肝臓への共有結合量は、無菌飼育されたラットでは 50%にまで減少していた。肝臓の  $^{14}\text{C}$  濃度は、通常飼育された雄および無菌飼育された雄において、通常飼育あるいは無菌飼育された雌のどちらよりも高値であった。肝臓への共有結合量に関しては、通常飼育の場合は雌よりも雄の方が多かったが、無菌飼育の場合は性差は認められなかった。これらのデータから、2,4-DNT の投与後に還元反応で生じる尿中代謝産物の出現および共有結合に与る物質の出現に対し、腸内細菌叢が大きな役割を果たしていることが示唆される。

Rickert, Schnell and Long(1983)は、ラットに  $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT を投与して、2,4-DNT の腸内分布を調べ、また、肝臓の DNA、RNA およびタンパク質との共有結合の時間的推移と程度を検討した。雄の Fischer-344 ラットに、コーン油を媒体として、10 ないしは 35 mg/kg 体重の  $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT が、強制経口投与された。いずれの群からも、投与の 1、2、4、8、12、24、

48、96、192 および 384 時間後に屠殺されるラットが供出された。肝臓が摘出され、重量測定とホモジネートの調製が行われた。ホモジネートは、DNA が豊富な画分、RNA が豊富な画分およびタンパク質が豊富な画分へと分離され、共有結合した  $^{14}\text{C}$  の量が測定された。小腸の標本および盲腸内容物を検査し、2,4-DNT 代謝産物の総放射活性を調べた。放射活性は、小腸の開始部から 1/4 までの部分からは、速やかに消失していた。最初に検査が行われた時点(1 時間後)では、多量の放射活性が、小腸の上流 1/4 の部分から 1/2 の部分に検出された。小腸の開始部から 1/4 までの部分および小腸の上流 1/4 の部分から 1/2 の部分から放射活性が消失すると、続く残り半分の小腸の部分および盲腸内容物に放射活性が出現し始め、それらの部分では、それぞれ 4~8 時間後および 8 時間後に放射活性が最大に達した。投与後 24 時間を超えた時点の小腸試料には、非常にわずかな放射活性しか含まれていなかった。肝臓では、最初の放射活性のピークが 1~2 時間後に現れたが、この時点では、共有結合量は多いものではなかった。小腸に 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドが出現した後、肝臓に総放射活性の第 2 のピークが現れた(8~12 時間後)。この第 2 のピークの出現後、第 16 日まで徐々に放射活性が低下して行った。ただし、小腸中の 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドは、肝臓における共有結合が最大になる前に低値となった。12 時間後の時点では、DNA、RNA およびタンパク質との共有結合量が多くなり、この状態は投与 96 時間の時点まで持続した。これらの高分子化合物への共有結合量は、用量と比例していた。共有結合量には、これらの高分子化合物間で差は認められなかった。共有結合の終末相半減期は、RNA およびタンパク質で 2.9~5 日、DNA で 5.1~7.9 日であった。これらのデータから、2,4-DNT の活性化には、2,4-ジニトロベンジルアルコールへの酸化、グルクロン酸抱合、胆汁への排泄、脱抱合化、および腸内細菌叢によるさらなる代謝とそれに続く再吸収が必要であることが示唆される。

Medisnky and Dent(1983)は、2,4-DNT の胆汁排泄および腸管循環を検討した。雌雄の Fischer-344 ラットの総胆管に、肝臓側から回腸側まで継ぎ目のないカニューレを装着した。24 時間後、 $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT を、雄には 35、63 ないしは 100 mg/kg 体重の用量で、雌には 35 mg/kg 体重の用量で、強制経口投与した。投与の直前に、カニューレを切断し、腹腔内に外科的に埋設した容器に胆汁を採取した。尿は、6、12、18、24 および 36 時間の時点で回収した。胆汁も、適切な時間間隔で回収した(毎時~6 時間毎)。最後に排泄物を採取した後、被験動物を屠殺し、肝臓を摘出してホモジネートを作製し、肝臓の高分子化合物に共有結合した  $^{14}\text{C}$  の量を測定した。雄では、胆汁中への  $^{14}\text{C}$  の排泄は用量に依存して直線的に増加し、投与した放射活性の約 25%が 24 時間以内に胆汁中に排泄された。35 mg/kg 体重を投与された雌では、胆汁中への排泄は、投与した放射活性の 18%に留まった。胆汁中に検出された放射活性の 90%が、2,4-ジニトロベンジルアルコールのグルクロン酸抱合体のものであることが確認された。 $^{14}\text{C}$  の胆汁への排泄は、雄では 24 時間後までに、雌では 12 時間後までに、実質的に終了した。胆汁への排泄率には、35 mg/kg 体重を投与された雌

雄を比べてみても、また各用量の雄を比べてみても有意差はなく、排泄半減期は 3.3~5.3 時間であった。尿中に排泄された放射活性代謝産物は、90%以上が、最初の 24 時間に回収された尿中に検出された。対照群のラットでは、投与された放射活性の 60~90%が尿中に排泄されたのに対し、胆汁が採取されたラットでは、尿中排泄は 20~60%であった。また、雌の方が雄よりも  $^{14}\text{C}$  の尿中排泄が多く、この所見は小腸への胆汁分泌の有無とは無関係であった。雄においても雌においても、投与された 2,4-DNT のほとんどは、尿中に排泄される際には、酸化により生じた代謝産物、すなわち 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドおよび 2,4-ジニトロ安息香酸に転換されていた。36 時間後の時点では、肝臓において検出された放射活性は 0.02~0.05%だけであった。この放射活性の 20~60%は、肝臓の高分子化合物と共有結合していた。 $^{14}\text{C}$  の量は、胆汁が回収されていたラットの方が、対照群のラットよりも少なかった。さらに、胆管カニューレを装着されていたラットでも対照群のラットでも、肝臓で共有結合していた  $^{14}\text{C}$  の量は、雌よりも雄の方が多かった。これらの結果から、胆汁は、2,4-DNT 代謝産物の重要な排泄経路であり、胆汁中に排泄される代謝産物は消化管から再吸収される可能性があることが示唆される。

Shoji *et al.* (1985)は、2,4-DNT を経口投与した場合の尿中代謝産物を、HPLC を用いて定量した。5 匹の雄の Wistar ラットに、サラダ油を媒体として、 $^3\text{H}$ -2,4-DNT が、75 mg/kg 体重の用量で経口投与された。尿は 24 時間にわたり採取された。その結果、最も多量に排泄されたのは、2,4-ジニトロ安息香酸であった(投与量の 5.91%)。それ以外は、多い順に 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニド(投与量の 3.15%)、2-アミノ-4-アセチルアミノ安息香酸(投与量の 1.85%)、2,4-ジニトロベンジルアルコール(投与量の 0.83%)、4-アミノ-2-ニトロ(2-アミノ-4-ニトロ)ベンジルアルコールグルクロニド(投与量の 0.45%)、4-アミノ-2-ニトロ(2-アミノ-4-ニトロ)ベンジルアルコール(投与量の 0.16%)、および 4-アミノ-2-ニトロトルエン(投与量の 0.03%)であった。これらの結果から、2,4-DNT は主としてメチル基の酸化により代謝され、アルコール性代謝産物の場合はさらにグルクロン酸抱合を受けると考えられる。この試験では、強力な変異原性物質である 2,4-ジニトロベンズアルデヒドは検出されなかった。

2,4-DNT の代謝をより良く理解するために、Sayama *et al.* (1989)は、ラットにおける 2,4-DNT、2,4-ジニトロベンジルアルコールおよび 2,4-ジニトロベンズアルデヒドの胆汁中代謝産物について、HPLC による解析を行った。雄の Wistar ラットが用いられ、エーテル麻酔が施された。ポリエチレンチューブが総胆管に挿入され、所定の位置に縫い付けられた。腹壁および皮膚は縫合により閉じられた。サラダ油を媒体として、2,4-DNT(40 mg/kg 体重)、2,4-ジニトロベンジルアルコール(40 mg/kg 体重)ないしは 2,4-ジニトロベンズアルデヒド(40 mg/kg 体重)が、ラットに経口投与された。胆汁は 24 時間にわたり採取された。2,4-DNT の主要な胆汁中代謝産物は、2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニド(投与

量の 11.8%)であった。その他の代謝産物は、2,4-ジニトロベンジルアルコール(0.13%)、2,4-ジニトロベンズアルデヒド(0.27%)、2-アセチルアミノ-4-ニトロトルエン(0.05%)、4-アミノ-2-ニトロ(2-アミノ-4-ニトロ)ベンジルアルコール硫酸化物(投与量の 1.5%)、2,4-ジニトロ安息香酸(4.4%)、2,4-ジアセチルアミノ安息香酸(0.08%)および 2-アミノ-4-ニトロ安息香酸(0.7%)であった。2,4-ジニトロベンジルアルコールを投与されたラットの胆汁中には、2,4-ジニトロベンジルアルコール(0.2%)、2,4-ジニトロベンズアルデヒド(1.1%)、2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニド(21.4%)、および 4-アミノ-2-ニトロ(2-アミノ-4-ニトロ)ベンジルアルコール硫酸化物(6.2%)が排泄された。2,4-ジニトロベンズアルデヒドを投与されたラットの胆汁中には、2,4-ジニトロベンズアルデヒド(1.6%)、2,4-ジニトロベンジルアルコール(0.04%)、2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニド(21%)、4-アミノ-2-ニトロ(2-アミノ-4-ニトロ)ベンジルアルコール硫酸化物(4.1%)、2,4-ジニトロ安息香酸(7.7%)および 2,4-ジアセチルアミノ安息香酸(0.2%)が排泄された。これらの結果から、2,4-DNT、2,4-ジニトロベンジルアルコールおよび 2,4-ジニトロベンズアルデヒドから生じる共通の胆汁代謝産物は、2,4-ジニトロベンジルアルコール、そのグルクロン酸抱合体、および 2,4-ジニトロベンズアルデヒドであることが示され、また、2,4-DNT の代謝において、2,4-ジニトロベンズアルデヒドの腸肝循環が生じていることが示唆される。

Mori *et al.* (1996)は、Wistar ラットに 2,4-DNT を投与し、尿中の 2,4-ジニトロベンジルアルコールを、HPLC により直接的に測定しようとした。HPLC の標準化合物としては、2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドカリウムおよび 2,4-ジニトロベンジルアルコール硫酸ピリジニウムが用いられた。未同定の代謝産物を含む他の代謝産物についても、標準化合物を用いて HPLC により分析した。6 匹のラットに、サラダ油を媒体として 2,4-DNT が経口投与された(75 mg/kg 体重)。被験物質投与後の尿を、24 時間にわたって採取した。抱合体として、2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドが検出され、その量は投与量の約 10.7%に相当していた。2,4-ジニトロベンジルアルコール硫酸ピリジニウムに相当するピークは、尿中には出現してこなかった。既知の代謝産物としては、4-アミノ-2-ニトロトルエン(0.04%)、2,4-ジニトロベンジルアルコール(0.25%)、2,4-ジニトロ安息香酸(6.9%)および 4-アセチルアミノ-2-アミノ安息香酸(3.4%)が検出された。その他に検出されたのは、2-アミノ-4-ニトロ安息香酸(0.71%)、4-アミノ-2-ニトロ安息香酸(0.52%)および 4-アセチルアミノ-2-ニトロ安息香酸(3.9%)であった。

## マウス

Lee *et al.*(1978) は、CD-1 および B6C3F1 系統の雌のアルビノマウスを用い、2,4-DNT(純度 98%)のトキシコキネティクスに関する試験を実施している。各群 4~5 匹ずつのマウスに、ピーナツ油を媒体として、<sup>14</sup>C-2,4-DNT(34 mg/kg 体重)が胃内挿管により投与された。糞便と尿が別々に採取され、また呼気中の CO<sub>2</sub> も採取された。試験終了時に、それぞれの

被験動物を、エーテルもしくはペントバルビタールナトリウムで麻酔した。大動脈から採血を行った。また、種々の組織および糞便を摘出し、重量を測定して、10 倍容量の 2N NaOH 溶液で消化した。血液試料は、 $H_2O_2$  を加えて脱色させた。組織および糞便の消化物、血液、血漿および尿を分取し、中和および可溶化処理を施し、シンチレーション溶液に入れて、液体シンチレーション分光光度計による計測に供した。投与 24 時間後の時点で回収された放射活性は、CD-1 系統では投与量の 94.8%、B6C3F1 系統では同 92%であった。放射活性は主に糞便に回収され、その割合は CD-1 系統では 81% B6C3F1 系統では 84%であった (Table 4.1.2.1.1-3 参照)。経口投与ではあまり吸収されなかったため、あるいは、速やかに吸収、代謝および胆汁排泄が起こったが、代謝産物の吸収は起こらなかったために、このような結果が導かれたと考えられる。呼気中には放射活性は検出されなかった。血漿中の放射活性に対する組織中の放射活性の比率から、投与後 24 時間の時点では、肝臓(比率 6.3)、腎臓(比率 3.4)、肺(比率 1.9)および脾臓(比率 1.7)に保持されていることが示された。

Table 4.1.2.1.1-3: Distribution and excretion of radioactivity in two mice strains 24 h after oral administration of a single dose of 2,4-DNT (Ring-UL- $^{14}C$ ) (Lee et al., 1978)

	% of administered dose	
	CD-1 (n = 4)	B6C3F1 (n = 5)
Gastrointestinal tract plus contents	2.1	0.6
Faeces	81.0	84.0
Whole blood (based on 7% of the b.w.)	0.1	< 0.1
Urine	11.3	7.2
Spleen	< 0.1	< 0.1
Liver	0.2	0.1
Kidney	< 0.1	< 0.1
Brain	< 0.1	< 0.1
Lung	< 0.1	< 0.1
Skeletal muscle (based on 40% of the b.w)	0.1	< 0.1
Recovery	94.8	92.0

吸収された 2,4-DNT は広範に代謝され、尿中に排泄された親化合物はごくわずかであった。尿中に検出された主要な代謝産物は、2,4-ジニトロベンジルアルコールおよび 2,4-/4,2-アミノニトロベンジルアルコールのグルクロン酸抱合物であった (Table 4.1.2.1.1-4 参照)。したがって、主要な代謝経路はベンジルアルコールへの酸化とアミノニトロベンジルアルコールへの還元であり、これらのアルコールはグルクロン酸抱合を受けて排泄されると考えられる。他の経路としては、1 個もしくは 2 個のニトロ基のアミンへの還元、安息香酸への酸化、および硫酸化物もしくは遊離化合物としての排泄などが考えられる。

Table 4.1.2.1.1-4: Metabolites of 2,4-DNT in mouse urine collected for 24 hours after oral administration of a single dose of 2,4-DNT (Ring-UL-<sup>14</sup>C) (Lee et al., 1978)

Metabolites	Free	Conjugates	
		Glucuronide	Sulphate
2,4-DNT (I)	0.3	0	0
4-amino-2-nitrotoluene (II)	1.0	1.2	10.3
2-amino-4-nitrotoluene (III)	0.1	7.3	2.1
2,4-diaminotoluene (IV)	0.1	3.1	2.0
2,4-dinitrobenzyl alcohol (V)	0.3	19.6	2.7
2,4-/4,2-aminonitrobenzyl alcohols (VI/VII)	0.1	24.5	0.5
2,4-diaminobenzyl alcohol (VIII)	0.2	1.4	0
2,4-dinitrobenzoic acid (XIII)	3.8	0.1	0
All identified	5.8	57.0	17.5
Unidentified	19.6		

Percent of <sup>14</sup>C-radioactivity in urine (n = 4 CD-1 females)

Schut *et al.* (1985) は、A/J マウスに、トリカプリリンを媒体として、<sup>3</sup>H-2,4-DNT を 100 mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与し、2,4-DNT の代謝と排泄を調べた。マウスを 4 匹ずつ、30 分から 8 時間までの所定の時点で屠殺し、内容物を含む膀胱および内容物を含む大腸を摘出した。投与後 1 時間までの所定の期間は、マウスを個別にガラス容器に収容し、排泄されたすべての尿を、数回蒸留水ですすいで回収し、それらのすすぎ液を、その後膀胱の内容物と一緒にした。それ以降 (> 1 時間) の期間は、マウスを代謝ケージに収容し、尿と糞便を別々に回収した。各尿試料から適量を分取し、放射活性の定量に供した。各マウスから回収した糞便および大腸内容物は、混合、均質化した後分取して、放射活性の定量に供した。代謝産物を分析するため、各時点の尿を合わせて、酢酸エチル-アセトン溶液による抽出を施した。経口投与から 4 時間の時点では、尿中に排泄された放射活性は 28.5% だけであったが、8 時間の時点では 66% に増加した。糞便を介した排泄はごくわずかであった (投与用量の 2.1% 未満)。経口投与から 0.5~4 時間にかけての尿中代謝産物は、5.5~6.8% が非抱合体であり、20.5~28.2% がグルクロン酸抱合体画分に検出された。未変化の 2,4-DNT は尿中に検出されず、最も多量に同定された中性代謝産物は、2,4-ジニトロベンジルアルコールであった。2,4-ジアミノトルエン、2-アミノ-4-ニトロベンジルアルコール、2-(N アセチル)アミノ-4-ニトロトルエン、4-アミノ-2-ニトロトルエンおよび 2-アミノ-4-ニトロトルエンも、少量存在していた。ほとんど全ての場合で未同定代謝産物が大半を占めており、それらの中にはクロマトグラフィー分析においてカルボン酸の性質を示すものも存在した。

## ウサギ

Lee *et al.* (1978) は、2 羽の雌の New Zealand ウサギを用い、2,4-DNT (純度 98%) のトキシコ

キネティクスに関する試験を実施している。各被験動物に対し、ピーナツ油に懸濁された<sup>14</sup>C-2,4-DNTが、急性LD<sub>50</sub>の約10%の用量で、胃内挿管により単回投与された。糞便と尿が別々に採取され、また呼気中のCO<sub>2</sub>も採取された。試験終了時に、それぞれのウサギを、エーテルもしくはペントバルビタールナトリウムで麻酔した。大動脈から採血を行った。また、種々の組織および糞便を摘出し、重量を測定して、10倍容量の2N NaOH溶液で消化した。血液試料は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えて脱色させた。組織および糞便の消化物、血液、血漿および尿を分取し、中和および可溶化処理を施し、シンチレーション溶液に入れて、液体シンチレーション分光光度計による計測に供した。2,4-DNTは良く吸収されていた。24時間の時点では、回収された放射活性は、平均で、投与量の89.8%であった。内訳は、平均で、尿中に75.2%、胃腸管および内容物に10.9%、糞便中に3.1%、骨格筋(体重の40%を占めると仮定して)に0.2%、全血(体重の7%を占めると仮定して)に0.1%、肝臓に0.3%未満、そして、脾臓、腎臓、脳および肺にそれぞれ0.1%未満であった。吸収された放射活性の大半は、尿中に排泄された。呼気中には放射活性は検出されなかった。血漿中の放射活性に対する組織中の放射活性の比により、様々な組織における放射活性の保持状態が示された。すなわち、投与後24時間の時点では、放射活性は、肝臓に高濃度に認められ(比:8.7)、腎臓(比:7)、肺(比:2.2)および脾臓(比:1.3)がそれに続き、骨格筋や脳では比は1より小さかった。吸収された2,4-DNTは広範に代謝され、尿中に排泄される親化合物はごくわずかであった。24時間尿中に検出された主要な代謝産物は、2,4-ジニトロベンジルアルコールのグルクロン酸抱合物であった(Table 4.1.2.1.1-5 参照)。したがって、主要な代謝経路はベンジルアルコールへの酸化であり、その後ベンジルアルコールはグルクロン酸抱合を受けて排泄されると考えられる。他の経路は、親化合物のアミノニトロトルエンへの還元であり、この還元産物はその後グルクロン酸抱合もしくは硫酸化を受けると考えられる。またベンジルアルコールの安息香酸への酸化も生じると考えられる。

Table 4.1.2.1.1-5: Metabolites of 2,4-DNT in rabbit urine collected for 24 hours after oral administration of a single dose of 2,4-DNT (Ring-UL-<sup>14</sup>C) (Lee et al., 1978)

Metabolites	Free	Conjugates	
		Glucuronide	Sulphate
2,4-DNT (I)	0.3	0	0
4-amino-2-nitrotoluene (II)	0.4	0.5	7.9
2-amino-4-nitrotoluene (III)	0.6	4.2	1.8
2,4-diaminotoluene (IV)	0.9	4.0	0.7
2,4-dinitrobenzyl alcohol (V)	0.5	40.3	3.0
2,4-/4,2-aminonitrobenzyl alcohols (VI/VII)	0.3	9.4	0.5
2,4-diaminobenzyl alcohol (VIII)	1.0	5.9	0.6
2,4-dinitrobenzoic acid (XIII)	7.5	2.0	0
All identified	11.4	66.4	14.5
Unidentified	7.9		

Percent of <sup>14</sup>C-radioactivity in urine (n = 2 females)



イヌ

Lee *et al.* (1978) は、2 匹の雌のビーグル犬を用い、2,4-DNT (純度 96%) のトキシコキネティクスに関する試験を実施している。各被験動物に対し、ピーナツ油に懸濁された  $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT が、急性  $\text{LD}_{50}$  の約 10% の用量で、胃内挿管により単回投与された。糞便と尿が別々に採取され、また呼気中の  $\text{CO}_2$  も採取された。試験終了時に、それぞれのイヌを、エーテルもしくはペントバルビタールナトリウムで麻酔した。大動脈から採血を行った。また、種々の組織および糞便を摘出し、重量を測定して、10 倍容量の 2M NaOH 溶液で消化した。血液試料は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を加えて脱色させた。組織および糞便の消化物、血液、血漿および尿を分取し、中和および可溶化処理を施し、シンチレーション溶液に入れて、液体シンチレーション分光光度計による計測に供した。2,4-DNT は良く吸収されていた。24 時間の時点では、回収された放射活性は、平均で、投与量の 97.3% であった。内訳は、平均で、尿中に 76.4%、胃腸管および内容物中に 8.6%、糞便中に 8.7%、骨格筋 (体重の 40% を占めると仮定して) に 1.6%、肝臓に 1.1%、全血 (体重の 7% を占めると仮定して) に 0.6%、腎臓に 0.2%、そして脾臓、脳および肺にそれぞれ 0.1% 未満であった。吸収された放射活性の大半は、尿中に排泄された。呼気中には放射活性は検出されなかった。血漿中の放射活性に対する組織中の放射活性の比により、様々な組織における放射活性の保持状態が示された。すなわち、投与後 24 時間の時点では、放射活性は、肝臓に高濃度に認められ (比:6.9)、腎臓 (比:4.9)、肺 (比:1.7) および脾臓 (比:1.1) がそれに続き、骨格筋や脳では比は 1 より小さかった。吸収された 2,4-DNT は広範に代謝され、尿中に排泄された親化合物はごくわずかであった。24 時間尿中に検出された主要な代謝産物は、2,4-ジニトロベンジルアルコールおよび 2,4-/4,2-アミノニトロベンジルアルコールのグルクロン酸抱合物であった (Table 4.1.2.1.1-6 参照)。主要な代謝経路はベンジルアルコールへの酸化とアミノニトロベンジルアルコールへの還元であり、これらのアルコールはグルクロン酸抱合を受けて排泄されると考えられる。他の経路としては、ベンジルアルコールの安息香酸への酸化と、小規模であるが、親化合物のアミノニトロトルエンへの還元が考えられ、その後グルクロン酸抱合もしくは硫酸抱合が生じるものと考えられる。

Table 4.1.2.1.1-6: Metabolites of 2,4-DNT in dog urine collected for 24 hours after oral administration of a single dose of 2,4-DNT (Ring-UL-<sup>14</sup>C) (Lee et al., 1978)

Metabolites	Free	Conjugates	
		Glucuronide	Sulphate
2,4-DNT (I)	0.2	0.5	0
4-amino-2-nitrotoluene (II)	0.1	4.6	3.7
2-amino-4-nitrotoluene (III)	0.2	2.9	0.4
2,4-diaminotoluene (IV)	0.2	4.8	0.4
2,4-dinitrobenzyl alcohol (V)	0.1	33.1	1.6
2,4-/4,2-aminonitrobenzyl alcohols (VI/VII)	0.4	17.9	0.2
2,4-diaminobenzyl alcohol (VIII)	0.5	1.4	1.5
2,4-dinitrobenzoic acid (XIII)	5.7	1.0	0
All identified	7.4	66.2	7.8
Unidentified	18.6		

Percent of <sup>14</sup>C-radioactivity in urine (n = 2 females)

## サル

Lee et al. (1978) は、2匹の雌のアカゲザルを用い、2,4-DNT (純度 98%) のトキシコキネティクスに関する試験を実施している。各被験動物に対し、ピーナツ油に懸濁された <sup>14</sup>C-2,4-DNT が、急性 LD<sub>50</sub> の約 10% の用量で、胃内挿管により単回投与された。糞便と尿が別々に採取され、また呼気中の CO<sub>2</sub> も採取された。試験終了時に、それぞれのサルを、エーテルもしくはペントバルビタールナトリウムで麻酔した。大動脈から採血を行った。また、種々の組織および糞便を摘出し、重量を測定して、10 倍容量の 2N NaOH 溶液で消化した。血液試料は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えて脱色させた。組織および糞便の消化物、血液、血漿および尿を分取し、中和および可溶化処理を施し、シンチレーション溶液に入れて、液体シンチレーション分光光度計による計測に供した。2,4-DNT は良く吸収されていた。24 時間の時点では、回収された放射活性は、平均で、投与量の 93% であった。内訳は、平均で、尿中に 81.3%、胃腸管および内容物中に 4.7%、糞便中に 4.8%、骨格筋(体重の 40% を占めると仮定して)に 1.2%、肝臓に 0.7%、全血(体重の 7% を占めると仮定して)に 0.3%、そして腎臓、脾臓、脳および肺にそれぞれ 0.1% 未満であった。吸収された放射活性の大半は、尿中に排泄された。呼気中には放射活性は検出されなかった。血漿中の放射活性に対する組織中の放射活性の比率により、様々な組織における放射活性の保持状態が示された。すなわち、投与後 24 時間の時点では、放射活性は、肝臓に高濃度に認められ(比率:17.8)、腎臓(比率:7)、脾臓(比率:2.6)および肺(比率:1.9)、骨格筋(比率:1.5)および脳(比率:1.3)がそれに続いた。吸収された 2,4-DNT は、広範に代謝された。尿中に検出された主要な代謝産物は、2,4-ジニトロベンジルアルコールおよび 2,4-アミノニトロベンジルアルコールのグルクロン酸抱合物であった (Table 4.1.2.1.1-7 参照)。主要な代謝経路はベンジルアルコールへの酸化とアミノニトロベンジルアルコールへの還元であると考えられ、また、これらのアルコール

ルはその後グルクロン酸抱合を受けて排泄されると考えられる。他の経路としては、ベンジルアルコールの安息香酸への酸化と、小規模であるが、親化合物のアミノニトロトルエンへの還元が考えられ、その後グルクロン酸抱合もしくは硫酸抱合が生じるものと考えられる。

Table 4.1.2.1.1-7: Metabolites of 2,4-DNT in monkey urine collected for 24 hours after oral administration of a single dose of 2,4-DNT (Ring-UL-<sup>14</sup>C) (Lee et al., 1978)

Metabolites	Free	Conjugates	
		Glucuronide	Sulphate
2,4-DNT (I)	0.4	2.2	0
4-amino-2-nitrotoluene (II)	1.0	0.7	0.4
2-amino-4-nitrotoluene (III)	0.3	6.8	1.6
2,4-diaminotoluene (IV)	0.4	3.3	1.1
2,4-dinitrobenzyl alcohol (V)	1.5	21.5	2.3
2,4-/4,2-aminonitrobenzyl alcohols (VI/VII)	0	17.9	0.2
2,4-diaminobenzyl alcohol (VIII)	0.5	1.3	1.4
2,4-dinitrobenzoic acid (XIII)	4.5	0.4	0
All identified	8.2	54.1	6.9
Unidentified	30.7		

Percent of <sup>14</sup>C-radioactivity in urine (n = 2 females)

### 腹腔内投与

### マウス

Schut *et al.*(1982)は、A/J マウスに、トリカプリリンを媒体として、<sup>3</sup>H-2,4-DNT を 1、10 ないしは 100 mg/kg 体重の用量で腹腔内投与し、2,4-DNT の組織分布と排泄を調べた。0.25、0.5、0.75、1、2、3 および 4 時間の時点で、1 用量群につき 4 匹ずつをジエチルエーテルで麻酔し、頸静脈から採血した。0.5 時間までのこの処置の間に動物が排尿した場合は、そのつど尿を回収した。0.5 時間以降 4 時間までの期間は、被験動物を個別に容器に収容し、尿の回収は、動物の屠殺時に行った。採血後、即座に腹腔を開き、吸収されなかった被験物質を注意深く吸い取った。膀胱(内容物を含む)を切除して、尿試料に加え、その後肝臓、腎臓、脂肪組織、小腸および大腸を摘出し、重量測定および消化処置を行った。2,4-DNT を再分離する試験も行われ、それらの試験でも上記と同様にマウスへの投与および処置が実施された。肝臓、肺および小腸が摘出され、重量測定とホモジネート作製が行われた。ホモジネートおよび血液試料を分取し、ジエチルエーテルによる抽出に供した。抽出の直前に、回収の指標とするため、2,4-DNT(1 試料当たり 200 µg)および <sup>14</sup>C-2,4-DNT (1 試料当たり 10,000 dpm)を加えた。抽出物を蒸散により濃縮し、残渣を薄層クロマトグラフィーに供した。4 時間の時点の試料を分析したところ、1、10 および 100 mg/kg 体重群

のそれぞれで、体液や組織中に、合計で投与量の 69.4、74.8 および 81.7%が認められた。尿が主要な排泄経路であり、被験物質投与群の全てにおいて、速やかな排泄が特に最初の 1 時間に認められ、4 時間後の時点では、投与量の 52.5、60.1 および 70% (1、10 および 100 mg/kg 体重群)が尿中に検出された。この期間に糞便中に排泄された量は、尿中に排泄された量とくらべてごく少量であった。血中の放射活性濃度は、投与用量に比例していたが、時間の経過とともに、特に投与後の最初の 1 時間の間に減少していった。2 時間未満の時点では、肝臓における放射活性濃度は血中濃度の 2~4 倍であったが、2 時間を超えると肝臓における濃度と血中濃度は同等になった。腎臓においても同様の推移が認められたが、投与後最長で 3 時間の時点まで血中濃度より高濃度に維持されていた。放射活性の終末相半減期には、用量依存性は認められず、肝臓での値は 1.1~1.7 時間、腎臓での値は 0.9~1.4 時間であった。投与後 4 時間後の 2,4-DNT の組織分布を調べた結果からは、被験物質投与群のいずれにおいても、特に取り込み量や保持量が多い組織は認められなかった。全ての被験物質投与群で、2,4-DNT は肝臓や小腸で速やかかつ広範に代謝される(実質的に投与の 1 時間後に完了する)ことが、分析に供した組織において少量の 2,4-DNT (1 組織あたりの  $^3\text{H}$  は総量の 13%未満)しか再分離されてこなかったことから確認された。血液や肺には、未変化 2,4-DNT がより高濃度で含まれており、ほとんどの場合 2,4-DNT の代謝はこれら 2 つの組織で同程度であったことから、肺は 2,4-DNT 代謝が活発に行われる部位とは考えられなかった。

Schut *et al.* (1985) は、A/J マウスに、トリカプリリンを媒体として、 $^3\text{H}$ -2,4-DNT を 100 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、2,4-DNT の代謝と排泄を調べた。マウスを 4 匹ずつ、30 分から 8 時間までの所定の時点で屠殺し、内容物を含む膀胱および内容物を含む大腸を摘出した。投与後 1 時間までの所定の期間は、マウスを個別にガラス容器に収容し、排泄されたすべての尿を、数回蒸留水ですすいで回収し、それらのすすぎ液を、その後膀胱の内容物と一緒にした。それ以降 (> 1 時間) の期間は、マウスを代謝ケージに収容し、尿と糞便を別々に回収した。各尿試料から適量を分取し、放射活性の定量に供した。各マウスから回収した糞便および大腸内容物は、混合、均質化した後に分取して、放射活性の定量に供した。代謝産物を分析するため、各時点の尿を合わせて、酢酸エチル-アセトン溶液による抽出を施した。腹腔内投与後の排泄は速やかで、4 時間以内に投与量の 70% が尿中に出現した。糞便を介する排泄はごくわずかであった(投与量の 2.1%未満)。腹腔内投与から 0.5~4 時間にかけての尿中代謝産物は、3.6~8.8% が非抱合体であり、2.4~8.8% がグルクロン酸抱合体画分に検出された。未変化の 2,4-DNT は尿中に検出されず、最も多量に同定された中性代謝産物は、2,4-ジニトロベンジルアルコールであった。2,4-ジアミノトルエン、2-アミノ-4-ニトロベンジルアルコール、2-(N アセチル)アミノ-4-ニトロトルエン、4-アミノ-2-ニトロトルエンおよび 2-アミノ-4-ニトロトルエンも、少量存在していた。ほとんど全ての場合で、未同定代謝産物が大半を占めており、それらの中には、クロマトグラ

フィー分析においてカルボン酸の性質を示すものも存在した。

### In vitro 試験

2,4-DNT の *in vitro* での代謝に関しては、多くの情報が得られている。最も有用な情報は、主にラットから得た肝細胞内画分を用いて実施された試験のデータである。また、ラットの肝細胞や肝臓を用いた系や、げっ歯類の腸内細菌叢を用いた系などで実施された試験からも、データが得られている。さらに、酵母による代謝のデータも、この項に含めて記載する。

### ラット

#### a) 肝細胞内画分

Kozuka *et al.* (1978) は、エタノールに溶解した  $^3\text{H}$ -2,4-DNT (2.5  $\mu\text{mol}$ ) が、Wistar ラットから得た肝ホモジネートと嫌気性条件下でインキュベートすることによって、2-アミノ-4-ニトロトルエン(被験物質濃度の 23%) および 4-アミノ-2-ニトロトルエン(被験物質濃度の 50%) に代謝されることを示した。

Lee *et al.* (1978) は、雄および雌の CD ラットの肝ホモジネートを用い、2,4-DNT の *in vitro* における代謝を、好気性および嫌気性条件下で検討した。雌雄 4 匹ずつの CD ラットを屠殺して、肝臓を摘出して重量を測定した。肝臓は、ホモジネートにして、10,000 g で 30 分間の遠心分離に供した。インキュベーション溶液には、以下の成分が含まれていた。5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、5 mM グルコース-6-リン酸、0.8 mM リン酸ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、1 mM  $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT (0.1  $\mu\text{g/mL}$ )、1.0 mL の 0.2 M tris-HCl (pH 7.4) および 10,000 g で遠心分離した肝ホモジネートの上澄み画分 0.5 mL。最終的な容量は 2.5 mL であった。代謝反応は 1 時間行わせた。好気性条件下での反応と嫌気性条件下での反応とが検討され、代謝産物の分析・定量が、適切な方法に準拠して実施された。好気性条件下では、雌雄いずれにおいても、主要な代謝産物は 2,4-ジニトロベンジルアルコールであった。雌よりも雄の方が、2,4-ジニトロベンジルアルコールを多く生成した (Table 4.1.2.1.1-8 参照)。嫌気性条件下では、2,4-ジニトロベンジルアルコールの量は減少し、2,4-/4,2-アミノニトロトルエンの量が増加した。雌よりも雄の方が、これらアミノニトロトルエンを多く生成した (Table 4.1.2.1.1-8 参照)。嫌気性条件下であっても、雌においては 2,4-ジニトロベンジルアルコールの生成量が 2,4-/4,2-アミノニトロトルエンよりも多く、雄ではこのような所見は認められなかった。雄ラットをフェノバルビタールや SKF 525-A で前処理した場合は、異なる代謝産物パターンが示された。フェノバルビタールで前処理した場合は、ジニトロベンジル

アルコールの生成量が増加した。対照的に、SKF 525-A で前処理した場合は、ジニトロベンジルアルコールの生成量は減少した。これらの所見から、2,4-DNT は肝ミクロソームの混合機能オキシダーゼ系により、ジニトロベンジルアルコールへと代謝されることが示唆される。この試験は、Experientia に公表された (Short, Dacre and Lee, 1979)。

Table 4.1.2.1.1-8: Aerobic and anaerobic metabolism of 2,4-DNT (ring-UL-14C) by liver homogenate of rats (Lee et al., 1978)

Compounds	Metabolic activity (nmol/mg protein)			
	Aerobic		Anaerobic	
	Male	Female	Male	Female
2,4-dinitrobenzyl alcohol	11.1	8.0	4.6	6.1
Aminonitrotoluenes	1.8	1.3	30.4	3.1
2,4-DNT	129	123	105	123
Others	3.8	1.8	4.2	1.8

Dent *et al.* (1981) は、Fischer 344 ラットから得た肝ミクロソームを用い、2,4-DNT の代謝を検討した。100  $\mu$ M の  $^{14}$ C-2,4-DNT を、66 mM tris HCl (pH 7.4) の中で、肝ミクロソームと 1 時間インキュベートした。NADP、グルコース-6-リン酸および 1 unit/mL のグルコース-6-リン酸脱水素酵素からなる、NADPH 生成系も加えられた。酸素が補給されるインキュベート系の場合、主要な代謝産物は 2,4-ジニトロベンジルアルコールであり、4-アミノ-2-ニトロトルエンも検出された。酸素が補給されないインキュベート系の場合、2,4-ジニトロベンジルアルコールと 4-アミノ-2-ニトロトルエンの産出量は同等であった。嫌気性条件下では、主要な代謝産物は、2-アミノ-4-ニトロトルエンであり、4-アミノ-2-ニトロトルエンや他の未同定の代謝産物も存在していたが、2,4-ジニトロベンジルアルコールは検出されなかった。

Decat *et al.* (1982) は、Fischer 344 ラットから得た肝細胞内画分を用い、2,4-DNT の代謝を検討した。ミクロソーム画分または細胞質画分を、DMSO に溶解した 200 nmol の  $^{14}$ C-2,4-DNT とインキュベートした。反応系の最終的なタンパク質濃度は、2 mg/mL であった。酸素が補給されたミクロソーム培養系の場合、主要な代謝産物は 2,4-ジニトロベンジルアルコールであり、4-アミノ-2-ニトロトルエンも検出された。酸素が補給されないミクロソーム培養系の場合、2,4-ジニトロベンジルアルコールと 4-アミノ-2-ニトロトルエンの産出量は同等であった。嫌気性条件下では、主要な代謝産物は、2-アミノ-4-ニトロトルエンであり、4-アミノ-2-ニトロトルエンや他の未同定の代謝産物も存在していたが、2,4-ジニトロベンジルアルコールは検出されなかった。細胞質画分を用いた培養系で最も多く現れた代謝産物は 4-アミノ-2-ニトロトルエンで、2-アミノ-4-トルエンがそれに続いた。2-(N アセチル)アミノ-4-ニトロトルエンも検出されたが、2,4-ジニトロベンジルアルコールは存在しなかった。ラットをフェノバルビタールないしはアロクロール 1254 で前処置した場合に

は、2,4-DNT から 2,4-ジニトロベンジルアルコールへの代謝が 6~7 倍となった。このことから、2,4-DNT の 2,4-ジニトロベンジルアルコールへの酸化的代謝は、チトクロム P-450 依存性の混合機能オキシダーゼを介して生じていることが示唆される。

Mori *et al.* (1984b) は、ラットの肝臓のミクロソーム画分および細胞質画分を用い、窒素雰囲気下での 2,4-DNT の代謝を調べ、2,4-ジアミノトルエンがラットの肝臓において 2,4-DNT の代謝産物として生成されるか否かを検討し、また、その還元反応に寄与している酵素がどのようなものであるかを調べた。薄層クロマトグラフィーおよび HPLC の結果から、ミクロソーム画分により生成される代謝産物は、2-アミノ-4-ニトロトルエンおよび 4-アミノ-2-ニトロトルエンであることが示された。ミクロソーム画分によるこの還元活性は、一酸化炭素および一級アミン(アニリン、ノクチルアミンおよび 2,4-ジクロロ-6-フェニルフェノキシエチルアミン)により阻害されたことから、チトクロム P450 を介するものと考えられた。対照的に、細胞質画分の場合は、2,4-DNT は、2-アミノ-4-ニトロトルエンおよび 4-アミノ-2-ニトロトルエンを経て、2,4-ジアミノトルエンまで代謝された。この還元活性の最も多くの部分を担っているのは、還元反応がアロプリノールにより阻害されたことから、細胞質内のキサンチンオキシダーゼであると考えられた。これらのことから、細胞質内キサンチンオキシダーゼによる 2,4-DNT の 2,4-ジアミノトルエンへの還元は、2,4-DNT による肝臓がん誘発において、一定の役割を果たしている可能性があることが示唆される。

Shoji *et al.* (1987) は、雄の Sprague-Dawley ラットから得たミクロソーム画分および細胞質画分を用いて、2,4-DNT、2,4-ジニトロベンジルアルコールおよび 2,4-ジニトロベンズアルデヒドの代謝を検討した。この試験の目的は、強力な変異原物質である 2,4-ジニトロベンズアルデヒドが 2,4-ジニトロ安息香酸の酸化において生成してくるかどうかを調べ、また、2,4-DNT の 2,4-ジニトロベンジルアルコール、2,4-ジニトロベンズアルデヒドおよび 2,4-ジニトロ安息香酸への酸化に関与する酵素の性質を明らかにすることであった。HPLC で得られたデータによると、ミクロソーム画分および細胞質画分とのインキュベートで生成された主要な代謝産物は、2,4-DNT の場合は 2,4-ジニトロベンジルアルコール、2,4-ジニトロベンジルアルコールの場合は 2,4-ジニトロベンズアルデヒドおよび 2,4-ジニトロ安息香酸、そして 2,4-ジニトロベンズアルデヒドの場合は 2,4-ジニトロベンジルアルコールであった。これらの結果は、2,4-ジニトロベンズアルデヒドは、2,4-ジニトロベンジルアルコールが 2,4-ジニトロ安息香酸に酸化される過程において中間体として生成することを示している。さらに、2,4-DNT、2,4-ジニトロベンジルアルコールないしは 2,4-ジニトロベンズアルデヒドを、ミクロソーム画分および細胞質画分と、酸素に空気、窒素ないしは様々な濃度の一酸化炭素を加えた条件下で、補酵素 (NAD(P) および NAD(P)H) や阻害物質 (SKF-525A、DMSO、抱水クロラル、アロプリノール、ピラゾールおよび *o*-フェナントロリン) と共にインキュベートした試験も実施され、以下のことが示唆されている。a) 2,4-DNT の 2,4-ジ

ニトロベンジルアルコールへの酸化には、ミクロソームのチトクロム P450 が介在している。b) 2,4-ジニトロベンジルアルコールから 2,4-ジニトロベンズアルデヒドへの酸化には、主としてチトクロム P450 と NAD 依存性アルコール脱水素酵素が介在している。c) 2,4-ジニトロベンズアルデヒドから 2,4-ジニトロ安息香酸への酸化と 2,4-ジニトロベンズアルデヒドから 2,4-ジニトロベンジルアルコールへの還元には、それぞれ NAD(P)依存性のアルデヒド脱水素酵素および NAD(P)H 依存性のアルデヒド還元酵素が介在している。上述の結果は、2,4-DNT は、ラットの肝臓において段階的に、2,4-ジニトロベンジルアルコール、2,4-ジニトロベンズアルデヒドおよび 2,4-ジニトロ安息香酸に代謝されていくことを示しており、また、2,4-ベンジルアルコールの 2,4-ジニトロベンズアルデヒドへの酸化は 2,4-DNT の代謝活性化を意味するものであることを示唆し、さらに、ミクロソームのチトクロム P450 およびアルコール脱水素酵素が 2,4-DNT の代謝活性化に重要な役割を果たしている可能性があることを示唆するものである。

Mori *et al.* (1989) は、雄の Wistar ラットおよび雄の Sprague-Dawley ラットから調製した肝ミクロソーム画分および肝細胞質画分を用いて、NAD(P)または NAD(P)H の存在下で、2,4-DNT、2,4-ジニトロベンジルアルコールおよび 2,4-ジニトロベンズアルデヒドの代謝を検討した。代謝産物は、2,4-DNT の場合は 2,4-ジニトロベンジルアルコール、2,4-ジニトロベンジルアルコールの場合は 2,4-ジニトロベンズアルデヒドおよび 2,4-ジニトロ安息香酸、そして 2,4-ジニトロベンズアルデヒドの場合は 2,4-ジニトロベンジルアルコールであった。したがって、2,4-ジニトロベンズアルデヒドは 2,4-ジニトロベンジルアルコールが 2,4-ジニトロ安息香酸に酸化される過程における中間体であり、2,4-ジニトロベンジルアルコールの 2,4-ベンズアルデヒドへの酸化および 2,4-ベンズアルデヒドの 2,4-ジニトロベンジルアルコールへの還元は可逆的であると結論付けられる。2,4-ベンズアルデヒドの 2,4-ジニトロベンジルアルコールへの還元活性は、両方の種類のラットで調べられた全ての反応の中で最も高く、この還元活性は Sprague-Dawley ラットよりも Wistar ラットの方が高かった。

#### b) 分離肝細胞および摘出肝

Bond and Rickert (1981) は、Fischer 344 ラット (前処理無し、もしくはフェノバルビタールナトリウム、3-メチルコラントレンまたはアロクロール 1254 で前処理) から新しく分離した初代肝細胞を用いて、2,4-DNT の代謝を調べた。培養試験管に、 $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT (100  $\mu\text{M}$ ) と 2 mL の肝細胞懸濁液を入れ、ハンクス液 (pH 7.4) を十分量加えて 5 mL の反応系とした。2,4-DNT に関する動態学的検討は、25~200  $\mu\text{M}$  の濃度にわたって実施された。DMSO に溶解した 7,8-ベンゾフラボンや SKF 525-A を用い、酸化的代謝に対する修飾因子の影響も検討された。対照試料として、加熱により不活化した細胞が用いられた。HPLC により検出された主要な代謝産物は、2,4-ジニトロベンジルアルコールであり、この化合物が生成し



た代謝産物全体の 75~80%を占めた。2,4-ジニトロベンジルアルコールの生成に関する見かけ上の  $K_m$  および  $V_{max}$  は、それぞれ 58  $\mu\text{mol}$  および 25.5 nmoles (細胞  $10^6$  個当たり 30 分間につき)。2,4-ジニトロベンジルアルコールの生成は、アロクロール 1254 で前処理したラットでは 6 倍に、フェノバルビタールナトリウムや 3-メチルコラントレンで前処理したラットでは 3.5 倍に増高していた。SFK 525-A または 7,8-ベンゾフラボンが加えられた *in vitro* 系では、いずれの場合も 2,4-ジニトロベンジルアルコールの生成が阻害された。低酸素濃度(窒素中 15、10 または 5%)下で肝細胞とインキュベートした場合は、空気中の場合よりも、2,4-DNT が還元的代謝を受ける割合が高まった(最大 5 倍)。それらの場合、2,4-DNT の酸化的代謝は、付随的に低減した。ラットの盲腸では 2,4-DNT が主として 2-アミノ-4-ニトロトルエンや 4-アミノ-2-ニトロトルエンに代謝されるが、肝細胞では、それらがそれぞれ 2-(N-アセチル)アミノ-4-ニトロトルエンおよび 4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロトルエンに代謝されるのが観察された。これらの化合物がさらに 2,4-ジアミノトルエンなどに代謝される様子は認められなかった。2,4-ジアミノトルエンを肝細胞とインキュベートしても、代謝産物は検出されなかった。これらの結果から、肝臓による 2,4-DNT の還元的代謝は、2,4-DNT の代謝の全体像からすると、おそらくそれほど大きな役割を果たしていないことが示唆される。

Bond *et al.* (1981) は、雌雄の Fischer-344 ラットから肝臓を灌流標本として摘出し、2,4-DNT の代謝や胆汁排泄における性差を調べた。ラットはメトキシフルランで麻酔され、腹部の正中線を切開された。胆管に PE-10 チューブが挿管された。肝臓の門脈にも挿管が行われ、胸部大動脈は切断された。そして肝臓には、酸素が加えられ、かつ栄養が強化されたハンクス-ヘンゼライト液が送り込まれた。肝臓を摘出して肝臓灌流用チャンバーに移し、ハンクス-ヘンゼライト液による灌流(循環)を行った。ビリルビン灌流液に加え、最初の胆汁流を模した。いずれの肝臓も、30 分間灌流してから  $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT の添加(20 または 70  $\mu\text{mol}$  [訳注: $\mu\text{M}$  と思われる])が行われた。その後は、胆汁流が肝臓 1 グラム当たり 0.4  $\mu\text{L}$ /分以上であった肝臓のみを用いた。 $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT を添加してから 5、20、15、30、45、60、90 および 120 分の時点で、灌流液貯留容器から灌流液を分取した。胆汁回収を、 $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT が灌流液に加えられてから最初の 1 時間までは 15 分置きに行い、その後 2 時間までは 30 分置きに行った。雌雄いずれの肝臓も、2,4-DNT (またはその代謝産物) を酸化し、還元し、アセチル化し、そして抱合化する能力を示した。雌雄いずれにおいても、2,4-DNT が 2,4-ジニトロベンジルアルコールへと酸化され、その後 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドへとグルクロン酸抱合されるのが、主要な代謝経路であった。生成した 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドの量は、灌流液中に最初に存在した総 2,4-DNT 濃度の 10~30%に相当していた。20  $\mu\text{M}$  の 2,4-DNT で灌流が行われた場合、胆汁中への 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドの排泄量は、雌(172 nmol)よりも雄(392 nmol)で多かった。一方、同じ 2,4-DNT 濃度において、雌の肝臓から得た灌流液には、雄

の肝臓から得た灌流液の 3 倍を超える 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドが含まれていた。これらのデータから、2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドが胆汁中へ移送される速度は、雌の方が雄よりも緩慢であることが示唆された。70  $\mu\text{M}$  の 2,4-DNT で灌流が行われた場合、2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドの胆汁中への排泄量および灌流液中の量は、雌雄で同等であった。70  $\mu\text{M}$  の 2,4-DNT で灌流が行われた場合は、胆汁中への 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドの排泄が、雌の肝臓では飽和しなかったが、雄の肝臓では飽和したと考えられた。結論としては、2,4-DNT の *in vitro* 代謝における雌雄間の大きな差は、ジニトロベンジルアルコールグルクロニドの胆汁中への排泄に認められ、雄の方が雌よりも排泄量が多いというものであった。

### c)腸内細菌叢

Guest *et al.*(1982)は、雌雄の Fischer 344 ラットから得た腸内細菌叢を用い、2,4-DNT の代謝を検討した。ラットから得た盲腸内容物を、嫌気性条件下または好気性条件下で、 $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT と、1~240 分間インキュベートした。2,4-DNT は、酸素の存在下では代謝されなかった。嫌気性条件下では、2,4-DNT は、急速に代謝された。雄から盲腸内細菌叢を得て、3 段階の 2,4-DNT 濃度(25, 100 または 500  $\mu\text{M}$ )で予備試験が行われているが、その場合の生成代謝産物のパターンは、基質濃度依存性を示した。また、最小濃度の場合、2,4-DNT は 10 分以内に全て消費されたが、高濃度側 2 群での 10 分の時点における代謝速度は、基質濃度依存性を示していなかった。これに基づいて、それ以降の試験は 100  $\mu\text{M}$  で実施することとなった。2,4-DNT(100  $\mu\text{M}$ )を雄から得た盲腸内細菌叢とインキュベートした場合、2,4-DNT は 20 分後までに完全に消費された。20 分の時点における 2,4-DNT の消失速度は、細菌叢 1 g 当たり、約 9.9  $\mu\text{mol}/\text{分}$ であった。最初に出現した代謝産物は 2-ニトロ-4-ニトロソトルエンおよび 4-ニトロ-2-ニトロソトルエンで、これらは 20~30 分の間に最大濃度に達した。ニトロソ化合物の濃度が減少すると、2-アミノ-4-ニトロトルエンおよび 4-アミノ-2-ニトロトルエンの濃度が増加し、60 分までに最高濃度に達した。アミノニトロ化合物の濃度が減少すると、ジアミノトルエンの濃度が増加した。盲腸内細菌叢を 2-アミノ-4-ニトロトルエンないしは 4-アミノ-2-ニトロトルエンとインキュベートした場合は、検出された代謝産物は 2,4-ジアミノトルエンだけであった。それら 2 種類のアミノニトロ化合物の内、2-アミノ-4-ニトロトルエンの方がより急速に 2,4-ジアミノトルエンへと代謝された。生成された 2,4-ジアミノトルエンの量は、消失したそれぞれの基質の総量に達していなかった。2,4-ジアミノトルエンを盲腸内細菌叢に加えた場合、2 時間のインキュベーション期間の間にその 60%が失われた。代謝経路に性差は認められなかった。ニトロソ化合物のアミノ化合物への還元およびアミノ化合物のジアミノ化合物への還元には、分離不能であったヒドロキシルアミノ化合物が中間体として介在していることが予想される。結論として、腸内細菌叢は、2,4-DNT の還元的代謝の主要な部位となっており、

2,4-DNT が発がん性を発揮する上で重要な役割を果たしている可能性が示された。

Dent *et al.* (1981) は、雄の Fischer 344 ラットから得た盲腸内細菌叢を用い、2,4-DNT の代謝を検討した。<sup>14</sup>C-2,4-DNT を、100 μM の濃度で、50 mg の盲腸内容物と、好気性条件ないしは嫌気性条件でインキュベートした。空気雰囲気下では、盲腸内細菌叢は、2,4-DNT を代謝しなかった。一方、嫌気性条件下では、盲腸内細菌叢は、急速に 2,4-DNT を還元した。2-ニトロソニトロトルエンと 4-ニトロソニトロトルエンの両方が検出された。盲腸内細菌叢は、4 位のニトロ基を 2 位のニトロ基よりも早く還元した。インキュベート開始から 10 分の時点では、4-ニトロソ化合物の量は、2-ニトロソ化合物の量の 2 倍であった。インキュベート開始から 60 分の時点では、4-アミノ-2-ニトロトルエンが 2-アミノ-4-ニトロトルエンの 4 倍以上存在しており、また 2,4-ジアミノトルエンも相当量検出された。盲腸内細菌叢における代謝の経時変化から、2,4-ジアミノトルエンは、アミノニトロトルエンがさらに還元されて生じることが示された。未標識の 2-アミノ-4-ニトロトルエンないしは 4-アミノ-2-ニトロトルエンを盲腸内細菌叢に加えて嫌気性条件下でインキュベートした場合、どちらのアミノニトロトルエンも基質となってジアミノトルエンを生成させた。これらの結果から、盲腸内細菌叢は、順序付けられた還元段階を踏んで 2,4-DNT を代謝することが示された。ニトロソ-ニトロソトルエンからアミノニトロトルエンへの還元にも、アミノニトロトルエンからジアミノトルエンへの還元にも、ヒドロキシアミン中間体の生成が関与していることが予想された。ただし、予想されるその様な中間体は、分離することはできなかった。

Mori *et al.* (1985) も、雄の Wistar ラットを用いて、2,4-DNT の腸内細菌叢による代謝を検討した。この試験は、好気性条件下ないしは嫌気性条件下で、25、50 ないしは 100 μM の濃度の 2,4-DNT と、ラットの盲腸内容物から得た細菌叢を用いて実施された。2,4-DNT は、酸素の存在下では、ラットの盲腸内細菌叢による代謝を受けなかった。一方、嫌気性条件下では、2,4-DNT は、2-ヒドロキシルアミノ-4-ニトロトルエンおよび 4-ヒドロキシルアミノ-2-ニトロトルエンを経て、2-アミノ-4-ニトロトルエンおよび 4-アミノ-2-ニトロトルエンに還元された。これら 2 種類のアミノニトロトルエンは、さらに 2,4-ジアミノトルエンに還元された。これらのデータから、ラットの腸内細菌叢が 2,4-DNT の還元的代謝を触媒している可能性が強く示され、2,4-DNT の 2,4-ジアミノトルエンへの還元が 2,4-DNT が発がん性を発揮する上で重要な役割を担っていることが示唆された。

## マウス

### a) 肝細胞内画分や他の画分

Lee *et al.* (1978) は、雄および雌の CD-1 マウスの肝ホモジネートを用い、2,4-DNT の *in*

*in vitro* における代謝を、好気性および嫌気性条件下で検討した。雌雄 4 匹ずつの CD-1 マウスを屠殺して、肝臓を摘出して重量を測定した。肝臓は、ホモジネートにして、10,000 g で 30 分間の遠心分離に供した。インキュベート溶液には、以下の成分が含まれていた。5 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM グルコース-6-リン酸、0.8 mM リン酸ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、1 mM <sup>14</sup>C-2,4-DNT (0.1 µg/mL)、1.0 mL の 0.2 M tris-HCl (pH 7.4) および 10,000 g で遠心分離した肝ホモジネートの上澄み画分 0.5 mL。最終的な容量は 2.5 mL であった。インキュベートは 1 時間実施された。容認される手法に則って、好気性条件下ないしは嫌気性条件下でインキュベートが実施され、代謝産物を含む分析物の定量が実施された。好気性条件下では、雌雄いずれにおいても、主要な代謝産物は 2,4-ジニトロベンジルアルコールであった。雄よりも雌の方が、2,4-ジニトロベンジルアルコールを多く産出した (Table 4.1.2.1.1-9 参照)。嫌気性条件下では、2,4-ジニトロベンジルアルコールの量は減少し、2,4-/4,2-アミノニトロトルエンの量が増加した。雌よりも雄の方が、これらアミノニトロトルエンを多く産出した (Table 4.1.2.1.1-9 参照)。嫌気性条件下であっても、雌においては 2,4-ジニトロベンジルアルコールの産出量が 2,4-/4,2-アミノニトロトルエンよりも多かったが、雄ではそのような所見は認められなかった。この試験は、Short, Dacre and Lee (1979) により、Experientia に公表された。

Table 4.1.2.1.1-9: Aerobic and anaerobic metabolism of 2,4-DNT (ring-UL-<sup>14</sup>C) by livers of mice (Lee *et al.*, 1978)

Compounds	Metabolic activity (nmol/mg protein)			
	Aerobic		Anaerobic	
	Male	Female	Male	Female
2,4-dinitrobenzyl alcohol	11.0	16.6	8.4	13
Aminonitrotoluenes	4.0	1.3	10	5
2,4-DNT	107	120	103	120
Others	3.9	3.4	3.8	3.1

Schut *et al.* (1985) は、A/J マウスから得た肝ミクロソームおよび肺ミクロソームを用い、2,4-DNT の代謝を検討した。肝ミクロソームの場合も肺ミクロソームの場合も、代謝産物として得られたのは主として 2,4-ジニトロベンジルアルコールであり、それよりも少量の代謝産物として、4-アミノ-2-ニトロトルエンおよび 2-アミノ-4-ニトロトルエンが、酸素および NAD(P)H の存在に依存して得られた。マウスを 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシンで前処理していた場合には、これら 3 種類の代謝産物の生成量は全て増加した。

#### b) 腸内細菌叢

Guest *et al.* (1982) は、雄の Swiss-Webster マウスから得た腸内細菌叢を用い、2,4-DNT の代謝を検討した。<sup>14</sup>C-2,4-DNT (100 µM) を、マウスから得た 50 mg の盲腸内容物と、好気性

条件ないしは嫌気性条件で、1~240 分の期間インキュベートした。2,4-DNT は、酸素の存在下では代謝されなかった。嫌気性条件下では、盲腸内細菌叢は、2,4-DNT を還元して代謝産物を生成した。20 分の時点における 2,4-DNT の消失速度は、細菌叢 1 g 当たり、25  $\mu\text{mol}/\text{分}$ であった。20 分間のインキュベートにおいて同定された代謝産物は、4-ニトロ-2-ニトロソトルエン、2-ニトロ-4-ニトロソトルエン、2-アミノ-4-ニトロトルエンおよび 4-アミノ-2-ニトロトルエンであった。60 分間のインキュベートでは、ジアミノトルエンが検出された。要約すると、段階を踏んだ還元的代謝が認められた。2 位および 4 位のニトロ基が、GC-MS によって同定されるニトロソ中間体化合物を経て、アミノ基に還元された。ニトロソ化合物のアミノ化合物への還元には、分離することができなかつたヒドロキシルアミノ化合物が中間体として介在していることが予想される。アミノニトロ化合物は、その後ジアミノトルエンに還元されたが、この段階に関わる中間体は分離できなかった。結論として、腸内細菌叢は、2,4-DNT の還元的代謝の重要部分となっており、2,4-DNT が発がん性を発揮する上で重要な役割を果たしている可能性が示された。

Schut *et al.* (1985)は、A/J マウスから得た小腸および大腸の移植物もしくは盲腸内容物を用いて、2,4-DNT の代謝を検討した。小腸および大腸の移植物もしくは盲腸内容物により、2,4-DNT を好氣的に代謝させた場合は、2,4-ジニトロベンジルアルコール、2-アミノ-4-ニトロトルエン、4-アミノ-2-ニトロトルエンおよび 4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロトルエンが生成した。還元代謝産物である 2-アミノ-4-ニトロトルエン、4-アミノ-2-ニトロトルエンおよび 4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロトルエンの生成量は、肝ミクロソーム系や肺ミクロソーム系の場合より多く、小腸および盲腸内容物によるそれらの化合物の生成は、嫌気性条件下では 7 倍に増加した。一方、2,4-ジニトロベンジルアルコールの生成は検出されなかつた。

## ウサギ

### a)肝細胞内画分

Lee *et al.* (1978)は、雄および雌の New Zealand アルビノウサギの肝ホモジネートを用い、2,4-DNT の *in vitro* における代謝を、好気性および嫌気性条件下で検討した。雌雄 4 羽ずつのウサギを屠殺して、肝臓を摘出して重量を測定した。肝臓をホモジネートにして、10,000 g で 30 分間の遠心分離に供した。インキュベーション溶液には、以下の成分が含まれていた。5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、5 mM グルコース-6-リン酸、0.8 mM リン酸ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、1 mM  $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT(0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、1.0 mL の 0.2 M tris-HCl(pH 7.4)および 10,000 g で遠心分離した肝ホモジネートの上澄み画分 0.5 mL。最終的な容量は 2.5 mL であった。インキュベーションは 1 時間実施された。好気性条件下ないしは嫌気性条件下でインキュベーションが実施され、適切な手法に則って、代謝産物の分析・定量が実施された。好気性

条件下では、2,4-DNT の代謝に性差は認められず、雌雄いずれにおいても主要な代謝産物は 2,4-ジニトロベンジルアルコールであった (Table 4.1.2.1.1.-10 参照)。嫌気性条件下では、2,4-ジニトロベンジルアルコールの量は減少し、2,4-/4,2-アミノニトロトルエンの量が増加した。雌よりも雄の方が、これらアミノニトロトルエンを多く生成した (Table 4.1.2.1.1-10 参照)。嫌気性条件下であっても、雌においては 2,4-ジニトロベンジルアルコールが、2,4-/4,2-アミノニトロトルエンのほぼ 2 倍生成された。この試験は、Short, Dacre and Lee (1979) により、Experientia に公表された。

Table 4.1.2.1.1-10: Aerobic and anaerobic metabolism of 2,4-DNT (ring-UL-<sup>14</sup>C) by livers of rabbits (Lee *et al.*, 1978)

Compounds	Metabolic activity (nmol/mg protein)			
	Aerobic		Anaerobic	
	Male	Female	Male	Female
2,4-dinitrobenzyl alcohol	21.5	28.8	16.8	24.4
Aminonitrotoluenes	7.6	8.3	20.3	13.7
2,4-DNT	123	124	116	124
Others	5.4	6.4	5.1	5.2

## イヌ

### a) 肝細胞内画分

Lee *et al.* (1978) は、雄および雌のビーグル犬の肝ホモジネートを用い、2,4-DNT の *in vitro* における代謝を、好気性および嫌気性条件下で検討した。雌雄 4 匹ずつを屠殺して、肝臓を摘出して重量を測定した。肝臓は、ホモジネートにして、10,000 g で 30 分間の遠心分離に供した。インキュベート溶液には、以下の成分が含まれていた。5 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM グルコース-6-リン酸、0.8 mM リン酸ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、1 mM <sup>14</sup>C-2,4-DNT (0.1 µg/mL)、1.0 mL の 0.2 M tris-HCl (pH 7.4) および 10,000 g で遠心分離した肝ホモジネートの上澄み画分 0.5 mL。最終的な容量は 2.5 mL であった。インキュベートは 1 時間実施された。好気性条件下ないしは嫌気性条件下でインキュベートが実施され、認容される手法に則って、代謝産物の分析・定量が実施された。好気性条件下では、2,4-DNT の代謝に性差は認められず、雌雄いずれにおいても主要な代謝産物は 2,4-ジニトロベンジルアルコールであった (Table 4.1.2.1.1.-11 参照)。嫌気性条件下では、2,4-ジニトロベンジルアルコールの量は減少し、2,4-/4,2-アミノニトロトルエンの量が増加した。雌よりも雄の方が、これらアミノニトロトルエンを多く生成した (Table 4.1.2.1.1-11 参照)。嫌気性条件下では、雄は 2,4-ジニトロベンジルアルコールと 2,4-/4,2-アミノニトロトルエンを同等量生成したが、雌では 2,4-ジニトロベンジルアルコールの生成量は、2,4-/4,2-アミノニトロトルエンの 10 倍であった。この試験は、Short, Dacre and Lee (1979) により、Experientia に公表された。

Table 4.1.2.1.1-11: Aerobic and anaerobic metabolism of 2,4-DNT (ring-UL-<sup>14</sup>C) by livers of dogs (Lee et al., 1978)

Compounds	Metabolic activity (nmol/mg protein)			
	Aerobic		Anaerobic	
	Male	Female	Male	Female
2,4-dinitrobenzyl alcohol	17.1	14	8.6	11.4
Aminonitrotoluenes	0.7	0.6	8	1.1
2,4-DNT	116	126	117	128
Others	1.5	1.6	1.1	1.2

## サル

### a) 肝細胞内画分

Lee *et al.* (1978)は、雄および雌のアカゲザルの肝ホモジネートを用い、2,4-DNTの *in vitro* における代謝を、好気性および嫌気性条件下で検討した。3匹の雄および1匹の雌を屠殺して、肝臓を摘出して重量を測定した。肝臓は、ホモジネートにして、10,000 gで30分間の遠心分離に供した。インキュベート溶液には、以下の成分が含まれていた。5 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM グルコース-6-リン酸、0.8 mM リン酸ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、1 mM <sup>14</sup>C-2,4-DNT (0.1 µg/mL)、1.0 mLの0.2 M tris-HCl (pH 7.4) および10,000 gで遠心分離した肝ホモジネートの上澄み画分 0.5 mL。最終的な容量は2.5 mLであった。インキュベートは1時間実施された。好気性条件下ないしは嫌気性条件下でインキュベートが実施され、適切な手法に則って、代謝産物の分析・定量が実施された。好気性条件下では、2,4-DNTの代謝に性差は認められず、雌雄のいずれにおいても2,4-ジニトロベンジルアルコールの量が、2,4-/4,2-アミノニトロトルエンの量をわずかに上回った (Table 4.1.2.1.1.-12 参照)。嫌気性条件下でも、雌では同様の結果が得られた。しかし、雄では、2,4-ジニトロベンジルアルコールと比べて、2,4-/4,2-アミノニトロトルエンの方が明らかに多く生成された (Table 4.1.2.1.1.-12 参照)。嫌気性条件下では、雄における2,4-DNTの代謝経路は、2,4-ジニトロベンジルアルコールへの酸化よりも2,4-/4,2-アミノニトロトルエンへの還元の方が優勢であると考えられた。この試験は、Short, Dacre and Lee (1979)により、Experientia に公表された。

Table 4.1.2.1.1-12: Aerobic and anaerobic metabolism of 2,4-DNT (ring-UL-<sup>14</sup>C) by livers of monkeys (Lee et al., 1978)

Compounds	Metabolic activity (nmol/mg protein)			
	Aerobic		Anaerobic	
	Male	Female	Male	Female
2,4-dinitrobenzyl alcohol	20.1	25	13.4	26.8
Aminonitrotoluenes	15.8	17.3	55.8	22.1
2,4-DNT	128	84	89.3	78
Others	7.2	10.6	13.9	9.8

### 酵母

Kozuka *et al.* (1978)は、ロドトルラ・グルティニス (*Rhodotorula glutinis*) の 2,4-DNT 代謝能力を調べ(酵母細胞の懸濁液にエタノールを媒体とした 1%溶液 2 mL を添加)、当該酵母が、2-アミノ-4-ニトロトルエン(添加濃度の 2%)、4-アミノ-2-ニトロトルエン(添加濃度の 14%)、および未同定のヒドロキシルアミン化合物 2 種類へと代謝することを示した。

### 他の情報

#### a) トキシコキネティクスに特化していない 2,4-DNT の試験

以下に示す試験は、トキシコキネティクスに特化したものではないが、代謝についての関連情報を提供するものであり、そのため本セクションに含まれる。

Lee *et al.* (1978)は、薬物を代謝する酵素に対する 2,4-DNT の影響を調べる試験を実施している。これらの酵素の活性は、*in vivo* ではゾキサゾラミンによる麻痺時間を指標として、*in vitro* では肝臓のニトロアニソール O-デメチラーゼ活性を指標として分析した。雄の CD ラットに、2,4-DNT を 0.7% 含む飼料が 2 週間投与された(145 mg/kg 体重/日)。陽性対照群のラットには、50 mg/kg 体重のフェノバルビタールナトリウムが、1 日 2 回で 3 日間投与された。陰性対照群のラットには、前処置は何も施されなかった。それらのラットに対し、ゾキサゾラミンが 45 mg/kg 体重の用量で腹腔内投与された。正向反射の消失を指標として麻痺時間を測定した。前処置が施されなかったラットと比較すると、フェノバルビタールによる前処置により、ゾキサゾラミン麻痺時間は短縮されたが、一方、2,4-DNT による前処置では、麻痺時間への有意な影響は生じなかった。肝臓によるニトロアニソールの代謝は、*in vitro* 系で測定された。ラットを屠殺して、肝臓を摘出して重量を測定した。肝臓をホモジネートにして、9,000 g で 30 分間の遠心分離に供した。インキュベート溶液には、以下の成分が含まれていた。MgCl<sub>2</sub> 15 μmole、グルコース-6-リン酸 15 μmole、p-ニトロアニソール 3 μmole、9,000 g で遠心分離した肝ホモジネートの上澄み画分 0.5 mL、1 0.5 M



リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.8)0.5 mL。インキュベートは 20 分間実施された。生成物は、420 nm の波長を用いて、分光光度計により測定された。適切な手法に則って、p-ニトロアニソールおよびタンパク質の定量が行われた。2,4-DNT を 0.7%含む飼料を 2 週間投与しても、*in vitro* において肝臓がニトロアニソールをニトロフェノールに転換する能力に、変化は認められなかった。要約すると、雄ラットに 2,4-DNT を 0.7%含む飼料を 2 週間投与しても、ゾキサゾラミンの *in vivo* 代謝に関わる肝酵素に影響を与えることはなく、また、*in vitro* におけるニトロアニソール O-デメチラーゼ活性にも影響は及ばなかった。この試験は、*Experientia* に短報として公表された (Short and Lee, 1980)。

Mori, Naruse and Kozuka(1980)は、2,4-DNT の混餌投与が還元酵素活性に及ぼす影響を調べた。対照群のラットおよび 20 日間の前処置を受けたラットから肝ホモジネートを調製し、嫌気性条件下で  $^3\text{H}$ -2,4-DNT とインキュベートした。2-アミノ-4-ニトロトルエンおよび 4-アミノ-2-ニトロトルエンを、2,4-DNT の還元代謝物の指標とした。その結果、 $^3\text{H}$ -2-アミノ-4-ニトロトルエン、 $^3\text{H}$ -4-アミノ-2-ニトロトルエンおよび  $^3\text{H}$ -2,4-DNT の量は、対照群のラットではそれぞれ 22、50 および 27%であったのに対し、前処置を受けていたラットではそれぞれ 12.5、30 および 56%であった。これらの結果から、前処置を受けていたラットの肝臓における還元酵素活性は、対照群のラットの肝臓における活性よりもかなり低いことが示された。

Decad *et al.* (1982)は、2,4-DNT が生体異物代謝酵素や肝臓の代謝に及ぼす影響、および 2,4-DNT のミクロソームタンパク質への共有結合性について、*in vitro* で調べている。雄の Fischer 344 ラットを 4 群用いた。a)群のラットにはコーン油を媒体として、2,4-DNT が 14、35 ないしは 70 mg/kg 体重の用量で、5 日間連続で強制経口投与された。b)群のラットにはフェノバルビタールナトリウムが、80 mg/kg 体重/日の用量で 3 日間腹腔内投与された。c)群のラットには、コーン油を媒体として、アロクロール 1254 が、屠殺の 5 日前に、単回腹腔内投与された。d)群は対照群であり、この群のラットには生理食塩水ないしはコーン油が腹腔内投与された。調製した新鮮なミクロソームにおいて、ピフェニル 4-ヒドロキシラーゼ、NADPH チトクロム *c* 還元酵素、アリール炭化水素ヒドロキシラーゼおよび *p*-ニトロ安息香酸還元酵素の測定が行われた。また調製した新鮮なサイトゾルにおいて、メチルレッドアゾ還元酵素活性が測定された。チトクロム P450、チトクロム *b*<sub>5</sub> およびミクロソーム中の総ヘム濃度が、48 時間以内に測定された。2,4-DNT の代謝を調べるに当たっては、対照群のラットないしは前処置を受けていたラットからミクロソームないしはサイトゾルを得て、DMSO を媒体として 200 nmol の  $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT を加え、最終タンパク質濃度を 2 mg/mL として、インキュベートを行った。インキュベートは好気性条件ないしは嫌気性条件で実施された。ミクロソームタンパクに結合した放射活性は、総量分析法により測定された。2,4-DNT での前処置により、肝サイトゾル中の酸素に感受性を示さないアゾ還元

酵素活性が上昇し、ミクロソームのニトロ還元酵素活性が低下した。体重に対する肝臓重量比、ならびに肝チトクロム P450 および  $b_5$  が、わずかだが有意に上昇したが、この上昇は、ミクロソームのビフェニル 4-ヒドロキシラーゼやアリアル炭化水素ヒドロキシラーゼ活性の変化を伴うものではなかった。*In vitro* でのミクロソームによる 2,4-DNT の代謝は、酸素圧により異なる様相を示していた。好気性条件下では、2,4-ジニトロベンジルアルコールが主要な代謝産物であったが、嫌気性条件下では、2,4-ジニトロベンジルアルコールは検出されず、2-アミノ-4-ニトロトルエンおよび 4-アミノ-2-ニトロトルエンが主要な代謝産物であった。ラットをフェノバルビタールないしはアロクロール 1254 で前処置した場合には、2,4-DNT から 2,4-ジニトロベンジルアルコールへの代謝が 6~7 倍となった。このことから、2,4-DNT の 2,4-ジニトロベンジルアルコールへの酸化代謝は、チトクロム P-450 依存性の混合機能オキシダーゼを介して生じていることが示唆される。共有結合を調べた結果から、1 mg のミクロソームタンパク質に 1 時間あたりに結合した 2,4-DNT 由来の放射活性は、最大でわずか 7 pmol であることが示された。共有結合量は、フェノバルビタールやアロクロール 1254 で前処置したラットから得られたミクロソームでは、1 nmol まで上昇していた。結論として、2,4-DNT で処置しても、肝臓のいくつかの生体異物代謝酵素には、活性への影響はほとんど及ぼされなかった。また、2,4-DNT は肝臓から調製した *in vitro* 試料により容易に代謝されたが、この *in vitro* 経路は酸素圧に依存して変化した。さらに、この *in vitro* 代謝によって産生されるのはほとんどが極性代謝産物であり、これらは、あまりミクロソームの高分子と結合することはなかった。

Rowland and Mallet(1983)は、カラギーナンとペクチンを飼料中に投与して、腸内細菌叢による 2,4-DNT の代謝活性に対する影響を調べた。通常腸内細菌叢を有する雄の Sprague-Dawley ラットに、対照の精製飼料もしくは同じ精製飼料に 50 g/kg の濃度でペクチンないしはイオタカラギーナンを加えたものを、50 日間自由に摂食させた。その後ラットを屠殺し、盲腸内容物を嫌気性リン酸緩衝液に懸濁した。盲腸の細菌のニトロ還元酵素活性を、2,4-DNT を基質として用いて測定した。ペクチンもカラギーナンも、盲腸内容物の重量を増加させ、さらに、ペクチンは、盲腸内の細菌数も増加させた。対照的に、カラギーナンは、盲腸内の細菌数を減少させた。カラギーナンは、2,4-DNT が還元される割合を有意に減少させた。これらの結果から、微生物による 2,4-DNT の還元は、与えられる飼料により影響を受ける可能性があることが示された。

Kedderis, Dyroff and Rickert(1984)は、硫酸転移酵素阻害剤である 2,6-ジクロロ-4-ニトロフェノールとペンタクロロフェノールを用い、*in vivo* で 2,4-DNT が生物学的活性化を受ける際に、硫酸エステル形成がどのような役割を果たしているかを調べた。雄の Fischer 344 ラットに、上記のいずれかの硫酸転移酵素阻害剤(40  $\mu\text{mol/kg}$  体重)を腹腔内投与し、その 45 分後に、コーン油を媒体として  $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT または  $^3\text{H}$ -2,4-DNT を 28 mg/kg 体重の用量で

経口投与した。その 12 時間後にラットを屠殺した。肝臓を摘出し、細分化して、分析に供するまで保存した。各肝臓の一部をホモジネートにし、共有結合した放射活性を、総量分析法により測定した。硫酸転移酵素阻害剤により、2,4-DNT の肝臓高分子への共有結合総量は、33%減少した。これらの結果から、DNA や RNA やタンパク質に共有結合する反応性代謝産物へと 2,4-DNT が生物学的転換されるに当たり、硫酸化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

Mitchell and Burrows(1995)は、HI4IIE ヘパトーマ細胞を 2,4-DNT に曝露した際の代謝反応を、ポリ塩化炭化水素化合物で P450 モノオキシゲナーゼを予め誘導した場合と誘導しなかった場合とで検討した。2,3,4,7,8-ペンタクロロジベンゾフラン(PCDBF)は、広範な濃度域で、HI4IIE ヘパトーマ培養細胞に実質的に細胞毒性影響を示すことなく、チトクロム P450(1A1)依存性アリール炭化水素ヒドロキシラーゼ(AHH)活性を誘導した。2,4-DNT 自体がそうした活性を誘導することはなかったが、2,4-DNT は PCDBF で誘導をかけた培養物に適用された場合、その代謝がかなり変化した。誘導のない対照と比べて、誘導をかけた培養物においては、4-アミノ-2-ニトロトルエンおよび 2-アミノ-4-ニトロトルエンの産生が大きく増強され、放射標識された 2,4-DNT は、より極性の高い代謝産物への転換が進んだ。

#### b)2,6-DNT のトキシコキネティクス試験

Hawkins *et al.*(1991)は、雄の F344 ラットに 2,6-ジニトロトルエンを経口、経皮および吸入により投与し、トキシコキネティクスを検討した。被験動物 9 匹に、1、7 ないしは 25 mg/kg 体重の  $^{14}\text{C}$ -2,6-ジニトロトルエン(媒体:ポリエチレングリコール)が、経口投与もしくは経皮適用(剃毛された背部皮膚の 10 cm<sup>2</sup>の領域に 6 時間閉塞適用)された。さらに別の 9 匹が、5 または 10.5 mg/m<sup>3</sup>の濃度の  $^{14}\text{C}$ -2,6-ジニトロトルエン蒸気に 6 時間曝露された。実質的な吸入用量は 1.6 または 7 mg/kg 体重に相当していた。各群の 3 匹ずつを被験物質投与開始の 6、30 および 54 時間後に屠殺し、体内における放射活性の分布を調べた。また、尿中および糞便中の放射活性も測定した。経口投与の場合、投与用量に関係なく、70~75%が尿中に、約 20%が糞便中に排泄され、投与用量の 5%が体内組織に残留した(消化管は除く)。したがって、吸収率は投与用量の 70~80%であった。経皮適用の場合、投与用量に関係なく、3~5%が尿中に、約 1%が糞便に排泄され、0.3~1.1%が体内組織に検出された。したがって、皮膚を介して取り込まれたのは、投与用量の 5~7%だけであった。吸入曝露の場合は、回収された放射活性の 51%は尿中に、25%は糞便中に排泄されたものであり、24~33%が体内(皮膚および被毛を含む)に残留していたものであった。ただし、著者は、皮膚や被毛に多くの放射活性が保持されていたのは、吸入曝露中の汚染によるものであると考えている。組織中の放射活性の相対分布は、投与経路、用量および吸収率に非

依存的であった。放射活性濃度が高かったのは、腎臓(6 時間後屠殺の場合)および肝臓(54 時間後屠殺の場合)であり、低かったのは、肺、脾臓、血漿および全血であった。精巢は、放射活性濃度が最も低かった。吸入曝露の場合でも、同等用量を経口投与もしくは経皮適用した場合と比べて、肺における放射活性は高くはなかった。このことは、呼吸器系からの吸収が迅速であることを示唆している。投与方法に関係なく、肝臓に検出された放射活性の約 60~70%は、非抽出性であることが明らかにされており、したがって、それらは高分子と共有結合を形成していると判断される。この試験の結果は、2,6-ジニトロトルエンの主要な吸収経路は消化管と呼吸器系であり、経皮吸収はあまり大きな役割を果たしていないことを示している。

#### 4.1.2.1.2 ヒトにおけるデータ

##### In vivo 試験

ヒトにおけるデータは、工業用の DNT に曝露された従業員について実施された、3 件の調査から得られている。

Turner *et al.* (1985) は、ある DNT 製造工場では工業用 DNT (2,4-DNT 約 80%、2,6-DNT 約 20%) に曝露された従業員の尿を調べ、2,4-DNT の代謝産物の同定を行った。2,4-DNT の代謝産物は、2,4-ジニトロ安息香酸、2-アミノ-4-ニトロ安息香酸、2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドおよび 2-(N-アセチル)アミノ-4-ニトロ安息香酸であった。また、尿中には未変化の 2,4-DNT も含まれていた。最も多く認められた代謝産物は 2,4-ジニトロ安息香酸と 2-アミノ-4-ニトロ安息香酸で、これらを合わせると、DNT 由来の代謝産物の 74~86% を占めていた。これらの代謝産物の排泄は、シフト制勤務の終了時近くに最大となったが、次の勤務日の開始時には、非常にわずかになったか、あるいは検出不能な濃度まで低下した。これらの代謝産物の排泄半減期は、0.8~4.5 時間であった。2,4-ジニトロ安息香酸および 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドは、酸化的代謝により生じる代謝産物や還元的代謝により生じる代謝産物のいずれよりも、半減期が短い傾向を示した。得られたデータをまとめると、ヒトにおける DNT の尿中代謝産物は、ラットにおけるものと定性的には同様であるが、排泄されるそれぞれの代謝産物の相対量には相違が存在する。

Levine *et al.* (1985) は、ある DNT 製造工場では工業用 DNT (2,4-DNT 76.4%、2,6-DNT 18.8%、他の異性体 4.8%の混合物) に曝露された従業員 17 名の集団を調査した。これらの従業員それぞれの作業域空気試料を調べたところ、濃度は 0.6~5.9 mg/10 m<sup>3</sup> (0.06~0.59 mg/m<sup>3</sup>) であった。2,4-DNT からの代謝産物は、2,4-ジニトロ安息香酸、2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニド、2-アミノ-4-ニトロ安息香酸、2-(N-アセチル)アミノ-4-ニトロ安息香酸、

および痕跡量の 4-アミノ-2-ニトロ安息香酸と 4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロ安息香酸であった。これらの代謝産物は、ラットで検出されたものと定性的には同様であるが、排泄されるそれぞれの代謝産物の相対量には相違がある。おそらく、代謝産物パターンには性差も存在する。3名の女性従業員では、14名の男性従業員と比べて、相対的に 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドの排泄が多かった(全ての代謝産物中女性では 33.3%であったのに対し男性では 9.5%)。吸入された空気中存在した DNT の量から予測されるよりも多くの代謝産物が、尿中に含まれていたことから、経皮吸収が生じていたことが強く示唆される。排泄率のピークは、勤務日の終了時に向けて現れるか、あるいはそのすぐ後に現れる傾向を示した。この調査における 1 日当たりの最大吸収用量の概算値から、各従業員は 0.24~1.00 mg/kg 体重の曝露を受けていたことが示された。

Woollen *et al.* (1985) は、火薬製造工場では工業用 DNT に曝露された従業員を対象に、尿中代謝産物を曝露の指標として用いて、2 件の生物学的モニタリングを実施した。尿中に検出された主要な 2,4-DNT 代謝産物は、2,4-ジニトロ安息香酸であり、この代謝産物は曝露が生じてから数時間以内に出現してきた。これよりも少ない量で、2-アミノ-4-ニトロ安息香酸、4-アミノ-2-ニトロ安息香酸、および 4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロ安息香酸も検出された。しかし、著者は、4-アミノ-2-ニトロ安息香酸は、試料の保存および移動中に 2,4-ジニトロ安息香酸が還元されることによって人為的に生じたのではないかと考えている。2,4-DNT も痕跡濃度で検出されたが、2,4-ジニトロベンジルアルコールは検出されなかった。1 件目のモニタリングでは、28名の従業員(男性 20名女性 8名)の尿試料中に 2,4-ジニトロ安息香酸が存在するかどうかを調べた。尿中の代謝産物の濃度は、勤務の週初めの仕事開始前では、非常に低い(< 1 mg/L)か検出不能であったが、勤務後の試料における濃度は、1 週間の平均で  $17 \pm 9.8$  mg/L であった。値には、従業員間で大きなばらつきがあり、また個人においてもその日その日でかなりのばらつきがみられた。しかし、2,4-ジニトロ安息香酸の排泄には、男女差は認められなかった。2,4-ジニトロ安息香酸の排泄半減期は、2~5 時間であった。ただし、数日後にもまだ痕跡量が検出されており、動態学的に緩慢なコンパートメントが存在することがうかがえる。DNT の空気中濃度は常に最大許容濃度より低かったことから、皮膚を介した吸収が主要な経路として考えられる。2 件目のモニタリングでは、5 名の従業員に対して 2 日間にかけて、またそれに続く非勤務の 2 日間にかけて、集中的に尿試料採取が実施された。これらの尿試料の分析結果から、2,4-ジニトロ安息香酸の排泄率は、勤務時間中には極めて早く上昇し、DNT が吸収と代謝の両方を受けていることが示された。排泄率の最高値は、通常はシフト制勤務時間の終了時近辺で記録された。

### In vitro 試験

ヒトの腸内細菌叢による 2,4-DNT の代謝を調べた 2 件の試験から、データが得られている。

Guest *et al.* (1982) は、ヒトの腸内細菌叢による 2,4-DNT の代謝を検討した。ボランティアから回腸内容物および糞便を集めて調製し、<sup>14</sup>C-2,4-DNT (100 μM) と 1~240 分間インキュベートした。2,4-DNT は、酸素の存在下では代謝されなかった。嫌気性条件下では、腸内細菌叢は、2,4-DNT を還元して代謝産物を生成した。20 分後の 2,4-DNT の消失率は、2 つの糞便試料では、1 g 当たり 1.5 および 9 μmol/分であり、1 つだけ得られた回腸試料では、1 g 当たり 1.5 μmol/分であった。20 分間のインキュベート物において同定された代謝産物は、4-ニトロ-2-ニトロソトルエン、2-ニトロ-4-ニトロソトルエン、2-アミノ-4-ニトロトルエンおよび 4-アミノ-2-ニトロトルエンであった。ヒトの試料では 240 分間までのインキュベートでは、ジアミノトルエンは検出されなかった。要約すると、段階を踏んだ還元的代謝が認められた。2 位および 4 位のニトロ基が、GC-MS によって同定されるニトロソ中間体化合物を経て、アミノ基に還元された。ニトロソ化合物のアミノ化合物への還元には、分離不能であったヒドロキシルアミノ化合物が中間体として介在していることが予想される。アミノニトロ化合物は、その後ジアミノトルエンに還元されるが、この段階に関わる中間体は分離できなかった。結論として、腸内細菌叢は、2,4-DNT の還元的代謝の重要部位となっており、2,4-DNT が発がん性を発揮する上で重要な役割を果たしている可能性が示された。

Mori *et al.* (1984a) は、ヒトの腸から分離した大腸菌 (*Escherichia coli*) の W3110 株と <sup>3</sup>H-2,4-DNT を好気性条件下でインキュベートし、生成された代謝産物の同定を行った。薄層ガスクロマトグラフィーや液体シンチレーション測定により得られたデータから、大腸菌は、主要な 2 つの代謝産物、すなわち 4-アミノ-2-ニトロトルエンおよび 2-アミノ-4-ニトロトルエンと、それらより少量の 2 つの代謝産物、すなわち 4-ヒドロキシルアミノ-2-ニトロトルエンおよび 2-ヒドロキシルアミノ-4-ニトロトルエンを産生したことが示された。代謝産物のなかでモノアミノニトロトルエン類は、加えた基質を基準にすると、18.8% (4-アミノ-2-ニトロトルエン) および 10.2% (2-アミノ-4-ニトロトルエン) を占めていた。インキュベート系に最初に現れる代謝産物は、4-ヒドロキシルアミノ-2-ニトロトルエンおよび 2-ヒドロキシルアミノ-4-ニトロトルエンであり、これらはおよそ 8 時間の時点で最大濃度に達した。これらのヒドロキシルアミノニトロトルエンの濃度が低下すると、それ呼応して 4-アミノ-2-ニトロトルエンおよび 2-アミノ-4-ニトロトルエンの濃度が上昇し、これらの濃度はおよそ 24 時間の時点で最大に達した。この所見から、2,4-DNT は、大腸菌によって、ヒドロキシルアミノニトロトルエンを経て、モノアミノニトロトルエンに還元されることが示された。

## 他の情報

以下に示す試験は、トキシコキネティクスに特化したものではないが、2,4-DNT の生体内

活性化に関する重要な情報を提供するものであり、そのため本セクションに含められる。

Jones *et al.* (2004)は、DNT-ヘモグロビン付加体を定量することにより DNT への曝露で生じるリスクを推定することができるかどうかを判断するために、生物試料中のヘモグロビン付加体を測定する方法を開発した。

ヘモグロビン付加体は、トリニトロトルエン(TNT)製造工場に勤務する中国人従業員の血液試料で測定された。TNT 製造に付随して、TNT よりもはるかに揮発性の高いニトロトルエン(NT)および DNT といった中間体化合物への、高濃度での曝露が生ずる。この工場は中国にあり、TNT の合成では、NT のニトロ化、およびそれに続く DNT のニトロ化が、硫酸および硝酸を用いて連続バッチ処理で行われていた。従業員は、職務内容および勤務場所に基づいて、以下のように群分けされた。グループリーダー、NT タンク担当者、DNT タンク担当者、TNT タンク担当者、化学分析室員、梱包部への TNT 運搬員、梱包員、管理室員、廃酸処理員、排水処理員、および非曝露対照従業員。合計で 160 個の血液試料が集められた。そのうち 99 個は曝露を受けた従業員から、61 個は非曝露対照従業員から集められた(同じ工場の従業員だが、年齢等の整合は取れていない)。試料提供者は全員が、問診票記載を行い、健康状態のチェックを受けた。

従業員において検出された付加体が 2,4-DNT 曝露の結果生じたものであることを裏付けるために、トリカプリリンを媒体として 0.5 mmol/kg 体重の 2,4-DNT を雌の Wistar ラット 3 匹に強制経口投与し、これらについても血液中のヘモグロビン付加体を測定した。被験動物は 24 時間後に屠殺された。

分離したヘモグロビンを分取(ヒトヘモグロビン 100 mg またはラットヘモグロビン 20 mg)し、0.1 M NaOH で加水分解し、2,4-DNT 関連の重水素化標準物質の存在下で抽出を行った。標準物質は、2-アミノ-4-ニトロトルエン、2-(N-アセチル)アミノ-4-アミノトルエン、4-アミノ-2-ニトロトルエン、4-(N-アセチル)アミノ-2-アミノトルエン、2,4-ジアミノトルエンおよび 2,4-DNT であった。一度抽出を終えたら、遊離したアリアルアミン化合物を *p*-フルオロフェニルアラニンで誘導体化合物とした。ラットのヘモグロビン試料については、付加体形成に与っていないアリアルアミン化合物の割合を測定するために、中性 pH で再び抽出を行った。抽出された化合物を GC-MS-NCI-SIM を用いて分析し、標準物質の校正線と対比して定量化した。回帰直線は、いずれも  $R^2 > 0.98$  を満たしていた。

ヘモグロビン付加体は、曝露を受けた従業員でも、同じ工場で働く対照従業員でも検出されたが、曝露群における全ての付加体の平均値は、同工場の対照群の値と比べて、分散分析によっても Mann-Whitney 検定( $p < 0.0001$ )によっても、有意に高かった。分析室管理者の試料からは DNT 由来の付加体は検出されなかったことから、工場の環境が汚染されて

いるものと考えられた。総じて、付加体量は、従業員において、次の順序で減少した。分析室員 > TNT タンク担当者 > NT タンク担当者 > DNT タンク担当者 > グループリーダー > 管理室員 > 梱包担当者 > 工場管理者。廃酸処理員、排水処理員および TNT 運搬員の群については、試料数が少なかったため ( $n < 5$ )、統計学的分析は行われなかった。DNT 関連物質それぞれのヘモグロビン付加体の相対的な量は、上述のように群分けした従業員の間で、密接に平行した推移を示した。曝露を受けた従業員における、2,4-DNT への曝露により生じたヘモグロビン付加体の量は、ヘモグロビン 1 g 当たり合計で  $71 \pm 68.9$  pmol であった。4-アミノ-2-ニトロトルエン付加体が主要であり、従業員の 99% に検出された。少量の 2,4-ジアミノトルエンも、場合によっては同等量の 4-(N-アセチル)アミノ-2-アミノトルエンとともに検出された。オルト位が還元を受けたアミノニトロトルエン(すなわち 2-アミノ-4-ニトロトルエン)およびアセチル化されたアミンである 2-(N-アセチル)アミノ-4-アミノトルエンは、単一カラムイオンクロマトグラフィーの手法では、曝露を受けた従業員の試料からは検出されなかった。

ラットでは、中性条件下で加水分解した場合に検出されたアミン化合物の量は、塩基性条件下で加水分解した場合に検出された量の 0.7~7% の範囲であった。この結果は、塩基性条件下で加水分解したヘモグロビンからの抽出物に検出された付加体の 93% を超える画分が、ヘモグロビンのシステイン残基とアミンの間の硫酸アミド結合の開裂により、直接的に生じたものであることを裏付けている。2,4-DNT を投与されたラットから採取したヘモグロビンを塩基性条件下で加水分解することにより、3 種類のアミン化合物が得られた。内訳はそれぞれヘモグロビン 1 g 当たり、4-アミノ-2-ニトロトルエンが 16.3 nmol、2,4-ジアミノトルエンが 4.3 nmol、4-(N-アセチル)アミノ-2-アミノトルエンが 0.51 nmol であった。2-アミノ-4-ニトロトルエンおよび 2-(N-アセチル)アミノ-4-アミノトルエンの付加体は、検出されなかった。

全般的に、より酸化されにくいアリアルアミンの方が、より大量にヘモグロビンと結合した。2,4-DNT の 4 位にあるニトロ基の様に、ベンゼン環と同一平面上にあるニトロ基は、オルト位にあるニトロ基よりも還元され易く、還元によりメチル基[訳注:アミノ基と思われる]となり、その平面上から押し出た形にされる。このことは、ヒトとラットの両方で 4-アミノ-2-ニトロトルエンの付加体が多量に検出されたことと整合している。

中国人従業員においてもラットにおいても、2,4-DNT への曝露により、同様のヘモグロビン付加体が検出されている。ただし、4-アミノ-2-ニトロトルエンの 2,4-ジアミノトルエンに対する比は、ヒトでは 24 であったのに対し、ラットでは 4 であった。量的に見て、ラットにおける 4-アミノ-2-ニトロトルエンは、ヒトにおけるほど多いものではない。この差は、2 つのニトロ基の同時還元化が、ヒトにおいてはラットにおけるほど起きなかったことを示している。



過去に、DNT に曝露された労働者の健康状態が調査されている。調査において最も一般的であった主訴は、DNT がメトヘモグロビンを誘発する能力を有することに関連するものがほとんどであった。メトヘモグロビンは、二次的に非特異的な健康への影響を誘発した。この調査では、各従業員について、無気力、眠気、不眠、頭痛、めまい、悪心などの、DNT への曝露に結び付けられる健康への有害影響に関する検査を実施している。ロジスティック回帰分析を用いて、健康への影響とヘモグロビン付加体量との対比が行われた。無気力状態となるオッズは、4-アミノ-2-ニトロトルエンのヘモグロビン付加体の量が log 単位で 1 増加すると、3.2 倍増高した〔95%信頼区間(CI) = 1.8-5.8〕。同様のオッズ比(OR)が、眠気(3.1, CI = 1.4-6.9)、悪心(2.4, CI = 1.3-4.3)およびめまい(5.5, CI = 1.3-24.2)でも確認された。これらの結果から、DNT-ヘモグロビン付加体の定量は、毒性についての有効なバイオマーカーとなり、着目している DNT への曝露に関連したリスクを推定するのに用いることができることが示唆された。

#### 4.1.2.1.3 トキシコキネティクス、代謝および分布の要約

##### 吸収

DNT 製造施設の従業員の尿中代謝産物の分析に基づいて(Turner *et al.*, 1985; Levine *et al.*, 1985; Woollen *et al.*, 1985)情報が得られており、2,4-DNT がヒトにおいて吸収されることが示されている。工業用 DNT への職業曝露を取り扱った 2 件の調査では、DNT 製造施設の載積担当者および操作担当者における 2,4-DNT の尿中代謝産物の量が、吸入濃度から予測される量よりも多かった(Levine *et al.*, 1985; Woollen *et al.*, 1985)。このことから、ヒトでは経皮吸収が 2,4-DNT の重要な侵入経路になり得ることが示唆された。

2,4-DNT を経口投与した場合のトキシコキネティクスに関する試験は、実験動物を用いて何件か実施されている。これらの試験のデータに基づき、また、毒性試験で観察された全身性の影響(反復投与毒性に相当する項を参照)を考慮して、経口吸収率が判定された。

放射性標識した 2,4-DNT を単回経口投与した場合、排泄データから、ラット、ウサギ、イヌおよびサルでは良く吸収されるが、2 系統のマウスでは吸収が悪いことが示された(Lee *et al.*, 1975, 1978)。24 時間後の時点までに回収された放射活性は、ラットでの 88.5%からイヌでの 97%までの範囲であった。マウスでは、多くの放射活性は糞便中に排泄された(投与用量の約 80%)が、尿中に回収された量はわずかで、CD-1 マウスで 11%、B6C3F1 マウスで 7%であった。残りの動物種は、放射活性の多くを尿中に排泄し(75~81%)、糞便への排泄はわずか 3~9%であった。呼気中には放射活性は検出されなかった。マウスでは、経口投与ではあまり吸収されなかったため、あるいは、速やかに吸収、代謝および胆汁排

泄が起こったが、代謝産物の吸収は起こらなかったために、糞便中への放射活性排泄が多かったと考えられる。全ての動物種において、尿中に様々な代謝産物が検出されたが、親化合物は不検出であったか検出されても非常にわずかであった。このことは、2,4-DNT は一旦吸収されると、広範に代謝されることを示している。供試された 5 種類の動物で、尿中代謝産物の現れ方が同様であったことから、マウスでも代謝や胆管系を介した 2,4-DNT の排泄に、大きな相違があるとは考えにくい。さらに、2,4-DNT は、ラットやイヌに対してよりもマウスに対しての方が明らかに毒性が低い。この毒性の相違は、マウスにおいて消化管を介する吸収が悪いことと整合している。ただし、Schut *et al.* (1985)は、A/J マウスにおいて、放射標識 2,4-DNT を単回投与したところ、放射活性の多くが尿中に排泄(8 時間までに投与用量の 66%)され、糞便を介する排泄はわずか(<2.1%)であることを報告しており、前述の系統のマウスより吸収が多いことを示している。したがって、これらのマウスのデータから、マウスにおける吸収率は、系統依存的であり得ることが示唆される。

経口吸収率を判定するのに最も重要な情報は、ラットを用いて実施された 5 件の試験から得られている。これらの試験では、2,4-DNT が単回投与後速やかに吸収されること、吸収が 24 時間以内に完了すること、血中の放射活性黄土は 6 時間後に最大となり、9 時間後までにかけて徐々に減少し、血漿半減期は約 22 時間であること、尿が 2,4-DNT の主要な排泄経路であるが、胆汁も関与していること、胆汁中に排泄された代謝産物は、腸管で吸収され得ること(腸肝循環)、そして、性差、投与用量による差または投与期間による差はあまり大きくないことが示された(Lee *et al.*, 1978; Mori, Naruse and Kozuka, 1977; Medisnky and Dent, 1983; Rickert, Schnell and Long, 1983; Ellis *et al.*, 1979)。

この情報に基づくと、ラットにおける 24 時間以内の経口吸収は 100%と考えられ、他の動物種で実施された試験に関して外挿を行うと、ウサギ、イヌおよびサルでも 100%とみなされる。ヒトについては、もっとも保護的な場合を考えて、2,4-DNT の経口吸収は、やはり 100%とみなされる。

吸入曝露経路に関しては、データが得られていない。したがって、経口吸収のデータに基づいて、最も保護的な吸収条件(すなわち 100%)を、動物にもヒトにも当てはめることとする。

経皮曝露経路に関しては、データが得られていない。したがって、2,4-DNT の物理化学的性質(MW= 182.15, log  $P_{ow}$  = 1.98)と経口吸収データに基づき、経皮吸収について、デフォルト値の 100%を、動物にもヒトにも当てはめることとする。

ただし、2,6-DNT については、経口および吸入経路による吸収はともに 100%近くであり、経皮適用の場合の吸収は 5~7%と考えられている(Hawkins *et al.*, 1991)。異性体同士である

2,4-DNT および 2,6-DNT は、分子量が同一であり、ほぼ同等の物理化学的性質を示す。なかでも、水溶解性(2,4-DNT: 166 mg/L、2,6-DNT: 145 mg/L)、蒸気圧(2,4-DNT: 0.00016 hPa、2,6-DNT: 0.00032 hPa)、および log Kow(2,4-DNT: 1.98、2,6-DNT: 2.1)が近似している。したがって、2,6-DNT の経皮吸収の値から外挿して 2,4-DNT の値を得るのは適切であると思われる。

さらに、米国環境保護庁のコンピュータ、モデル Dermwin v1.42 により、これら 2 つの異性体の皮膚透過率に関し、ほとんど同じ値が算出された。このモデルに 2,4-DNT および 2,6-DNT の溶解性および log Kow を入力すると、15 分間経皮吸収量は、1 回の曝露当たり、2,4-DNT で 0.00016 mg/cm<sup>2</sup>、2,6-DNT で 0.00017 mg/cm<sup>2</sup>であった。

したがって、2,4-DNT の皮膚透過率として、10%という値は許容される。このことは、経皮急性毒性試験で得られた所見からも支持される。その試験では、被験動物は全て 2500 mg/kg 体重の経皮適用を受けたが、特に毒性の徴候を示すこと無く、適用後 14 日間の観察期間を生残した

### 分布および蓄積

実験動物を 2,4-DNT に吸入もしくは経皮曝露して分布を検討した試験の情報は得られていない。ただし、2,4-DNT およびその代謝産物の分布は、実験動物に経口投与して実施した組織分布試験および毒性試験の結果に基づいて、判断することができる。

放射標識した 2,4-DNT を種々の動物に単回経口投与し、24 時間後、血液を含む組織中の放射活性を測定したところ、回収された放射活性はわずかであり、イヌで投与用量の 3.6%、サルで 2.3%およびげっ歯類とウサギで 1%未満であった。全ての動物種で、肝臓(代謝および胆汁排泄を行う臓器)における放射活性は高値であった。血漿の放射活性に対する肝臓の放射活性の比は、ラットでは 18.1、サルでは 17.8、ウサギでは 8.7、イヌでは 6.9、マウスでは 6.3 であった。放射活性濃度は腎臓(尿排泄臓器)でも高く、肺および脾臓では血漿の放射活性に対する比が 1 より大きかった。さらに、ラットやサルの骨格筋や脳も、血漿よりも高い放射活性を有していた(Lee *et al.*, 1975, 1978)。

ラットを用いて行われたさらに別の試験では、2,4-DNT を 3 段階の用量で投与した場合、ラットの血漿、赤血球、肝臓および腎臓における放射活性の最大濃度が、投与用量に比例して現れることが示された(Rickert and Long, 1980)。また、放射標識被験物質を 5 日間毎日経口投与した場合には、全てのラットの組織で、単回投与の場合より 2~4.8 の放射活性が含まれていることが示された(Lee *et al.*, 1975, 1978)。放射標識 2,4-DNT を単回経口投与して定性的組織分布パターンを検討した試験では、2,4-DNT を 3、9、20 日間(Ellis *et al.*,

1979)もしくは4ヵ月間(Mori, Naruse and Kozuka, 1980)混餌投与して前処置した場合と前処置しなかった場合とで同様の結果が得られた。また、組織中に回収された放射活性は、前処置を受けたラットの方が、前処置を受けなかったラットよりも低く、2,4-DNTで前処置を受けたラットの臓器で飽和状態になっていたことが示唆された(Mori, Naruse and Kozuka, 1980)。放射標識 2,4-DNT を単回経口投与されたラットで見られた明らかな性差は、以下の点だけである。雌の赤血球における高い放射活性の保持、雌の肝臓における放射活性濃度が雄における放射活性濃度の半分しかなかったこと、および雄の腎臓における 2,4-DNT の最高濃度は雌の 3~10 倍で、投与後 4~8 時間で現れたが、雌の腎臓における最高濃度は投与後 1 時間で現れた(Rickert and Long, 1980)。雄ラットでは、肝臓の放射活性濃度は 2 相性に増加し、第 1 のピークは単回経口投与の 1~2 時間後に、第 2 のピークは 8~12 時間後に現れた。第 2 のピークの後、16 日目までにかけて徐々に減少していったが、これは腸肝循環によるものと考えられた(Rickert, Schnell and Long, 1983)。

実験動物では、2,4-DNT は、血液、神経系、肝臓、腎臓、精巣など、様々な臓器および組織に有害影響を及ぼした。皮下組織や乳腺に、がんも認められた。

したがって、得られた分布データおよび毒性データに基づくと、吸収された 2,4-DNT およびその代謝産物は、全ての動物種において、放射活性が高かったのは肝臓や腎臓であるなど、同様のパターンで広範に分布していた。ただし、2,4-DNT は広範に代謝され良く排泄されるため、これらの臓器に蓄積することが確実であるとするには証拠は不十分である。

毒物動態学的試験から得られた情報を考慮すると、異なる経路(動物では経口、ヒトでは吸入および経皮)であっても、動物とヒトとで曝露による標的臓器は共通であることがある程度示唆されている様に思われる。血液学および神経学的影響に関しては、ヒトと動物との間で毒性影響に相関関係が認められている。しかし、動物で観察されたその他の毒性影響が人間でも生じるかどうかを断定的に述べるには、得られたデータは不十分である。さらに、ヒトと動物では、代謝が定性的に同等であることも言及されている。

結論として、全身的影響に関連する組織分布パターンが、投与経路に依らず同じであるとみなせることから、動物への経口投与で見られた 2,4-DNT の分布パターンが、ヒトや動物が経皮または吸入曝露された場合にも当てはまると考えられる。

#### 代謝および排泄

2,4-DNT の代謝および排泄は、実験動物を用いた経口投与試験で検討されている。

排泄経路は、ラット、ウサギ、イヌおよびサルで同じであり、主に尿を介して排泄が行わ

れる。標識 2,4-DNT の単回経口投与から 24 時間までに、投与用量の 75~81%の放射活性が尿中に回収され、これより少ない量(3~9%)が糞便中に排泄され、呼気中には放射活性は検出されなかった(Lee *et al.*, 1978)。マウスに関しては、系統間で差が認められた。CD-1 系および B6C3F1 系のマウスでは、標識化合物の単回経口投与後、最初の 24 時間以内に、放射活性の多く(投与用量の 80%)が糞便中に、わずか 10%が尿中に排泄された(Lee *et al.*, 1978)。一方 A/J 系のマウスでは、2,4-DNT の単回経口投与後、主要な排泄経路は尿であり、8 時間後までに 66%が尿中に排泄され、糞便中への排泄量は投与用量の 2%に満たなかった(Schut *et al.*, 1983)。マウスにおける排泄パターンの相違は、系統に依存した吸収の違いにより説明できるものと思われる。

2,4-DNT は一度吸収されると広範に代謝され、親化合物は尿中に検出されたとしてもごくわずかであった。2,4-DNT の代謝や排泄に関する情報の多くは、ラットで実施された試験に由来している。しかし、試験した全ての動物について、同様の 2,4-DNT 代謝パターンが提示されている(Lee *et al.*, 1975, 1978)ことから、ラットで得られたデータは、全ての動物種の典型としてみなすことができる。

ラットの尿中からは、いくつかの代謝産物が同定されている(Lee *et al.*, 1975, 1978; Mori, Naruse and Kozuka, 1981)。主要な尿中代謝産物は、2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドであり、35 mg/kg 体重の 2,4-DNT を単回投与した場合、雌は雄よりも、この代謝産物を、投与用量に対する割合で、より多く排泄した(Rickert and Long, 1981)。他には、2,4-ジニトロ安息香酸、4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロ安息香酸、2-アミノ-4-ニトロ安息香酸、4-(N-アセチル)アミノ-2-アミノ安息香酸、4-アミノ-2-ニトロ安息香酸、2,4-ジニトロベンジルアルコールおよび 4-アミノ-2-ニトロトルエンが検出された(Shoji *et al.*, 1985; Mori *et al.*, 1996)。代謝産物の内容は、標識化合物の単回経口投与の場合でも、2,4-DNT の混餌投与の場合でも変化はなく、用量群間の比較でも、雌雄の比較でも、また、飼育期間が異なる群の間での比較でも大きな差は認められなかった(Ellis *et al.*, 1979; Rickert *et al.*, 1981)。

胆汁も、2,4-DNT およびその代謝産物の重要な排泄経路である。ラットでは、標識化合物を単回経口投与した場合、尿中への放射活性排泄量が、糞便中への排泄量よりも急激に増加し、最初の 6 時間以内に、投与した放射活性の約 60%が尿中に排泄された。胆汁への排泄率は、投与の 6 時間後から着実に増加し、9~10 時間後にピークに達し、投与した放射活性の約 10%が、24 時間以内に胆汁中に排泄された。また、かなりの放射活性が、6~9 時間に採取された糞便中に排泄されていた。したがって、糞便中に排泄された放射活性のほとんどが、胆汁中に排泄された放射活性を起源としており、消化器官からの吸収速度は比較的遅いということが出来る(Mori, Naruse and Kozuka, 1977)。

ラットの胆汁中に検出された 2,4-DNT の主要な代謝産物は、2,4-ジニトロベンジルアルコ

ールグルクロニドであり、雄では雌の約 3 倍、この代謝産物が排泄された (Bond *et al.*, 1981)。さらに、2,4-ジニトロ安息香酸、4-アミノ-2-ニトロ(2-アミノ-4-ニトロ)ベンジルアルコール硫酸塩、2-アミノ-4-ニトロ安息香酸、2,4-ジニトロベンズアルデヒド、2,4-ジニトロベンジルアルコール、2,4-ジアセチルアミノ安息香酸および 2-アセチルアミノ-4-ニトロトルエンも検出された (Sayama *et al.*, 1989)。

肝臓における 2,4-DNT の生体内変換については、2 つの経路が提唱されている。主経路は、チトクロム P450 を介した 2,4-DNT の酸化の上に成り立つ経路で、2,4-ジニトロベンジルアルコールが生成される。2,4-ジニトロベンジルアルコールは、さらに、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼにより広範に抱合化され、尿や胆汁を介して容易に排泄される 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドを生成する。少量の 2,4-ジニトロベンジルアルコールは、アルコール脱水素酵素によりさらに酸化を受け、2,4-ジニトロベンズアルデヒドに転換され得る。2,4-ジニトロベンズアルデヒドは、アルデヒド脱水素酵素により再酸化を受けて 2,4-ジニトロ安息香酸となる。この時、2,4-ジニトロ安息香酸のニトロ基は 2 つとも、ニトロレダクターゼにより還元されて、2-アミノ-4-ニトロ安息香酸および 4-アミノ-2-ニトロ安息香酸となり得る。これらの化合物はいずれも、N-アセチルトランスフェラーゼによりさらなる生体内変換を受けて、2-(N-アセチル)アミノ-4-ニトロ安息香酸および 4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロ安息香酸になり得る。副経路は、ニトロレダクターゼによる 2,4-DNT の還元の上に成り立つ経路である。メチル基の酸化を受けなかった少量の 2,4-DNT は、2 位と 4 位でニトロレダクターゼによる還元を受け、2-アミノ-4-ニトロトルエンもしくは 4-アミノ-2-ニトロトルエンになり得る。これらの化合物は、最終的に N-アセチルトランスフェラーゼによるアセチル化を受けて、2-(N-アセチル)アミノ-4-ニトロトルエンおよび 4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロトルエンになり得る。

2,4-DNT のニトロ基は 2 つとも、*in vitro* で腸内細菌叢の還元を受け、対応するアミノ化合物に転換される。これらの還元は、2 段階の過程を経て進展する。まず、ニトロ基は、ニトロソ型に還元され、これがさらにアミノ基へと、中間物質のヒドロキシル誘導体を経て還元される。2,4-DNT が完全に還元されてできる代謝産物は、強力な変異原性物質である 2,4-ジアミノトルエンである。しかし、2-アミノ-4-ニトロトルエンや 2-ニトロ-4-アミノトルエンが、肝臓や腸内細菌による生体内変換における共通の代謝産物であるにもかかわらず、2,4-ジアミノトルエンは、2,4-DNT を投与された動物の体内においても、灌流肝臓を用いた *in vitro* 試験においても検出されていない。このことから、2,4-DNT は、2,4-ジアミノトルエンとは異なる化合物を介して肝発がん性を誘発することが示唆される。

動物の全身における 2,4-DNT の生体内変換について、提唱される経路を Figure 1 に示した。

経口投与の後、2,4-DNT は肝臓で 2,4-ジニトロベンジルアルコールに酸化され、これは第

II 相の反応を受けてグルクロン酸に抱合される。こうして形成されたグルクロン酸抱合体は、尿または胆汁を介して排泄され得る。胆汁中に排泄された抱合体は、腸で吸収されるが、そこでグルクロン酸はグルクロニダーゼにより加水分解を受け、再び 2,4-ジニトロベンジルアルコールが生じる。このベンジルアルコールは腸内で 4 位の還元を受け、4-アミノ-2-ニトロベンジルアルコールとなり、再び肝臓に運ばれる。肝臓に入ると、4-アミノ-2-ニトロベンジルアルコールは、ヒドロキシルキの部分で硫酸による抱合を受け得る。この硫酸抱合体は不安定で、すぐに求電子性化学種へと分解するが、この化学種は、DNA との共有結合形成能が高い。肝臓に再び運ばれた 4-アミノ-2-ニトロベンジルアルコールの別の生体内転換経路としては、アミノ基の酸化による 4-ヒドロキシルアミノ-2-ニトロベンジルアルコールへの転換が考えられる。この化合物は第 II 相の反応、特に硫酸抱合の標的になり得る。この反応で生じた分子はやはり非常に不安定で、DNA との共有結合形成能のある他の求電子性化学種へと自然発生的に変化する。

ヘモグロビンのアリアルアミン付加体がヒトでもラットでも検出されている[4-アミノ-2-ニトロトルエンが多く、その他に少量の 2,4-ジアミノトルエンおよび 4-(N-アセチル)アミノ-2-アミノトルエン]ことに基づくと、*para* 位のニトロ基の還元は、2,4-DNT の生体内活性化における重要な要因であると考えられる (Jones *et al.*, 2005)。

2,4-DNT の生体内活性化に硫酸抱合化が関与していることは、明確に証明されている。すなわち、ラットに硫酸転移酵素阻害剤で前処置を施すと、肝臓の DNA への 2,4-DNT やその代謝産物の結合が明確に阻害されることが示されている。

強力な変異原性物質である 2,4-ジニトロベンズアルデヒドは、2,4-DNT を投与されたラットの尿中には検出されなかったが、胆汁中には存在しており、2,4-DNT の代謝において現れ得る中間物質であることが示された。2,4-ジニトロベンジルアルコールの 2,4-ジニトロベンズアルデヒドへの酸化は、2,4-ジニトロベンジルアルコールとそのグルクロン酸抱合体が 2,4-ジニトロベンズアルデヒドの代謝産物として認められていることから、可逆的なものであると考えられる。これらの所見から、2,4-ジニトロベンズアルデヒドの腸肝循環の可能性が示唆され、2,4-ジニトロベンジルアルコールの 2,4-ジニトロベンズアルデヒドへの酸化は 2,4-DNT の代謝活性化を意味するものであることが示唆される (Sayama *et al.* 1989)。

腸内細菌は、2,4-DNT の *in vivo* 代謝において重要である。通常飼育のラットの尿中には、4 種類の主要な代謝産物が検出された。それらは 2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニド、2,4-ジニトロ安息香酸、4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロ安息香酸および 2-アミノ-4-ニトロ安息香酸であり、無菌飼育したラットの尿中にも存在していた。しかし、無菌飼育したラットでは、4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロ安息香酸および 2-アミノ-4-ニトロ安息香酸の尿中排泄量は、通常飼育したラットと比較すると、大幅に少なかった。さらに、肝

## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

臓の高分子に共有結合した放射標識物質の量も、無菌飼育したラットでは、通常飼育したラットよりも少なかった(Rickert *et al.* 1981)。胆管にカニューレを装着したラットでは、胆汁を採取したことで、やはりこれらの代謝産物の尿中排泄量が顕著に減少した(Medinsky and Dent, 1983)。

これらの所見から、2,4-DNT の代謝における肝臓と腸内細菌叢の関係は、複雑であることが示されている。腸内細菌叢は、胆汁内代謝産物のさらなる代謝が行われる重要な部位であると考えられ、また、腸内細菌叢による代謝は、肝臓の高分子に共有結合する代謝産物が生成する上で、必須の過程であると思われる。



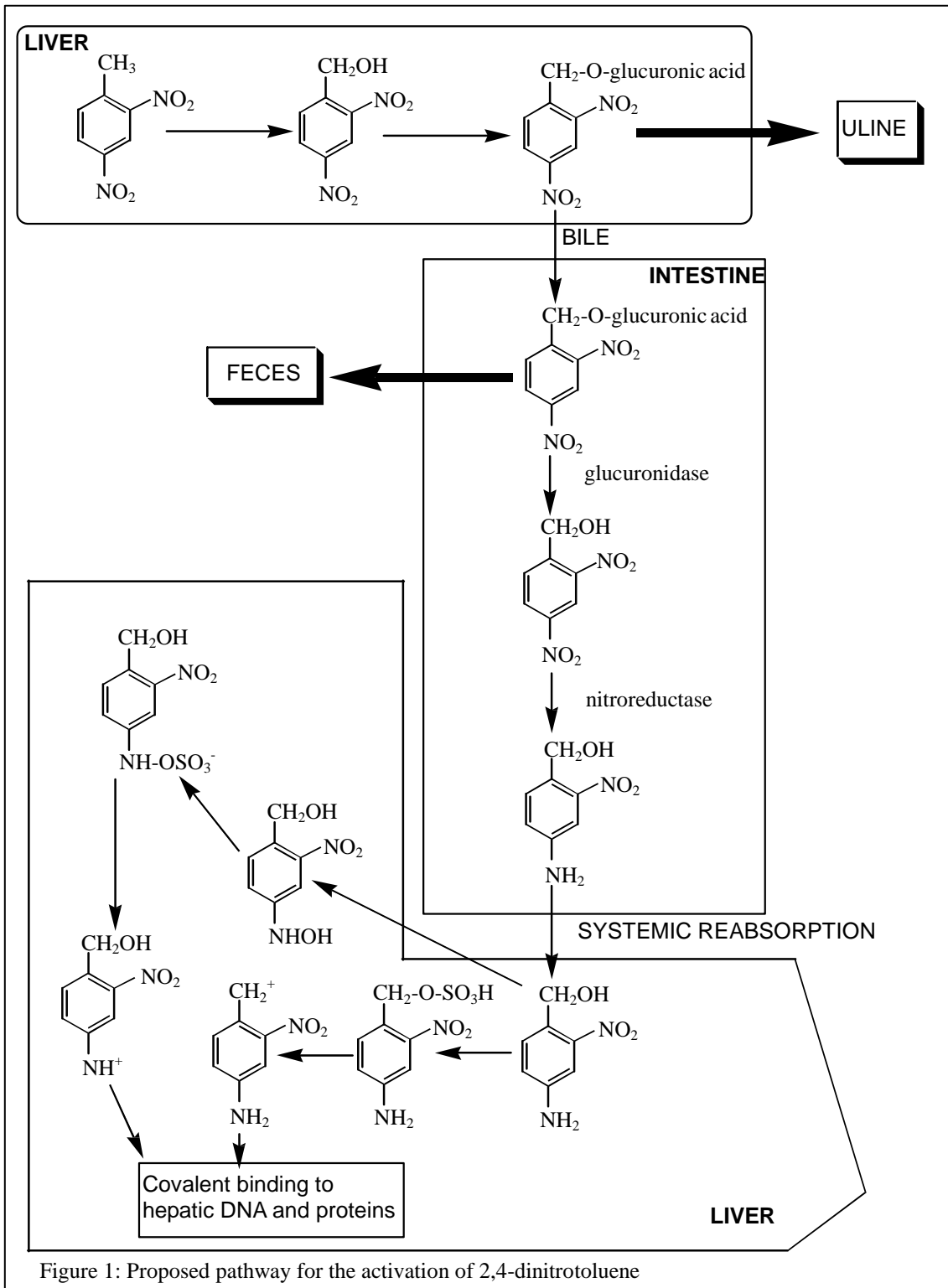


Figure 1: Proposed pathway for the activation of 2,4-dinitrotoluene

盲腸内細菌叢による定性的代謝パターンには、性差や動物種差は特に認められず、また 2,4-DNT の還元的代謝速度にも大きな差は認められなかったことから、2,4-DNT による発

がん性に対する感受性の性差や種差の発現には、盲腸内細菌叢は主要な役割を果たしていないことが示唆される。実際、マウスの盲腸内細菌叢は、2,4-DNT を最も急速に還元したが、マウスは、2,4-DNT の肝臓がん誘発作用に対して、ラットよりも感受性が明らかに低かった。

ラットでは、2,4-DNT の代謝に性差が認められた。10 ないしは 35 mg/kg 体重の用量を経口投与した場合、雌では尿中排泄が優勢であったが、雄では胆汁中への排泄が最も重要な経路であった (Rickert and Long, 1981)。この様に排泄経路に優先順位があることで、雄の尿が、2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドを、雌の尿よりも少ない量しか含まないことの説明がつく。雌においてグルクロニド抱合体の尿中排泄と胆汁排泄に量的な差があることが、2,4-DNT の肝臓がん誘発作用に対するラットの感受性に性差が見られることの理由である可能性がある。尿中排泄量が増えれば、腸内細菌叢が発がん性物質への代謝に利用できるグルクロニドの量が減るものと考えられる。2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドの尿中排泄の性差は、高用量の 2,4-DNT を投与した場合には消失した。このことから、2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドの胆汁中への移動が雄では飽和に達し、雌では飽和しなかったことが示唆される。

工業用 DNT に吸入もしくは経皮曝露された従業員における 2,4-DNT の代謝や排泄が、尿中代謝産物を分析することにより調べられている。

従業員の尿から検出された 2,4-DNT の主要代謝産物は、2,4-ジニトロ安息香酸、それより少ない量の 2-アミノ-4-ニトロ安息香酸、2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニド、2-(N-アセチル)アミノ-4-ニトロ安息香酸、および痕跡量の 4-アミノ-2-ニトロ安息香酸と 4-(N-アセチル)アミノ-2-ニトロ安息香酸であった。また、尿中には未変化の 2,4-DNT も含まれていた。

ラットの場合と同様、女性の被験者は、尿中代謝産物に占めるジニトロベンジルアルコールグルクロニドの割合が、男性被験者よりも高かった (Levine *et al.*, 1985)。

還元により生じた代謝産物が出現していたことから、ヒトの肝酵素が 2,4-DNT のニトロ基を還元する能力を有しているか、もしくは 2,4-DNT (またはその代謝産物) が還元能を有する腸内細菌叢にたどり着いていることが示唆される。後者の場合はその後代謝産物は再吸収されて尿中に排泄される。後者の推論を支持するように、2,4-DNT をヒトの胃とインキュベートして産生される代謝産物は、ラットやマウスから得られた同様の試料で産生される代謝産物と同じであったことが報告されている (Guest *et al.*, 1982)。

曝露を受けた従業員における 2,4-DNT 代謝産物の尿中排泄半減期は、0.8~4.5 時間であっ

た。2,4-ジニトロ安息香酸および2,4-ジニトロベンジルアルコールグルクロニドは、酸化代謝により生じる代謝産物や還元的代謝により生じる代謝産物のいずれよりも、半減期が短い傾向を示した(Turner *et al.*, 1985)。2,4-ジニトロ安息香酸の排泄率の最高値は、シフト制勤務時間の終了時近辺で記録された。2,4-ジニトロ安息香酸の尿中排泄半減期は、2～5時間と算出された。この推算値は、2相性の排泄の初期相に対応しているものと考えられる。なぜなら、曝露後の3日後になっても、尿中には2,4-ジニトロ安息香酸の存在が検出できているからである(Woolen *et al.*, 1985)。これらのデータから、ヒトにおいて、腸肝循環が起きていることが支持される。

要約すると、2,4-DNTの代謝および排泄は、ヒトとラットでは定性的に同様であると思われる。ただし、ヒトの尿においては、ニトロ基が還元された代謝産物の割合は、酸化された代謝産物の割合と比べて低かった。この差は、動物種差というよりも、実際の曝露経路(ヒトでは吸入および経皮、ラットでは経口)に起因するものではないかと考えられる。

2,4-DNT またはその代謝産物が、胎盤を通過するかもしくは母乳中に排泄されるかについては、試験のデータが得られていない。したがって、胎仔が子宮内で曝露されるかどうか、乳児が授乳中に曝露を受けるかどうかについては判断を下すことができない。2,4-DNT やその代謝産物が、母体組織に保持されて後になって妊娠期や授乳期に可動化されるかどうかについても、データは示されていない。ただし、2,4-DNT やその代謝産物は、オクタノール-水分配係数が低く、保持される可能性は低そうである。

#### 4.1.2.2 急性毒性

##### 4.1.2.2.1 動物試験

###### In vivo 試験

急性毒性試験が、ラット、マウスおよびネコで実施されている。これらについて、Table 4.1.2.2.1-1 および Table 4.1.2.2.1-2 にまとめた。

Table 4.1.2.2.1-1: Summary of acute toxicity of 2,4-DNT in rodents

Route	Species	Dose	LD <sub>50</sub> (mg/kg b.w.)	Comments	Ref.
Dermal	5 Wistar rats per sex	2500 mg/kg b.w.	> 2500	purity not reported Limit test	Löser 1982
Oral (gavage)	♂ CD rats	Not given	568 (434 – 705) <sup>a</sup>	purity = 98%; 2,6-DNT impurity = 2% Vehicle: peanut oil	Lee <i>et al.</i> , 1975
	♀ CD rats	Not given	650 (520 – 743) <sup>a</sup>	purity = 98%; 2,6-DNT impurity = 2% Vehicle: peanut oil	
	♂ rats	Not given	270 (180 – 400) <sup>a</sup>	purity not reported	Vernot <i>et al.</i> , 1977
	10 ♂ Wistar rats/dose	125, 200, 315, 500, 800 and 1000 mg/kg b.w.	400 (305 – 520)	purity not reported Vehicle: sesame oil	Hoechst 1977a
	10 ♀ Wistar rats/dose	200, 315, 500, 800 and 1000 mg/kg b.w.	474 (376 – 586)	purity not reported Vehicle: sesame oil	Hoechst 1977b
	5 rats per sex and group	100, 500, 800, 1500 and 2000 mg/kg b.w.	893 (620 – 1190)	purity not reported Vehicle: lutrol	Löser 1981
	♂ albino Swiss mice	Not given	1,954 (1,848 – 2,178) <sup>a</sup>	purity = 98%; 2,6-DNT impurity = 2% Vehicle: peanut oil	Lee <i>et al.</i> , 1975
	♀ albino Swiss mice	Not given	1,340 (1,205 – 1,500) <sup>a</sup>	purity = 98%; 2,6-DNT impurity = 2% Vehicle: peanut oil	
	Mice	Not given	1,630 (1,180 – 2,240) <sup>a</sup>	Method not reported.	Vernot <i>et al.</i> , 1977

<sup>a</sup> 95% confidence limits

Table 4.1.2.2.1-2: Summary of acute toxicity of 2,4-DNT in cats

Route	Species	Dose	Comments	Ref.
Oral (gavage)	Cats	10 and 50 mg/kg bw in lutrol	At 50 mg/kg bw: 1/1 died (renal insufficiency) ↑ Methaemoglobin (42%) within 7 hours after treatment, but decreased to basal levels after 48 hours. ↑ Heinz-bodies within 48 hours after treatment (55%).	Löser and Schmidt, 1984
Intraperitoneal	Cats	10, 20, 30, 40 mg/kg bw in poppy oil	1/2 cats at 40 mg/kg bw died dose-related increased methaemoglobinaemia level (7-82%) within 5 h after treatment, but decreased within 24h after treatment	Bredow <i>et al.</i> , 1942

### 吸入

急性吸入試験のデータは、得られていない。

### 経皮

### ラット

Löser, 1982

雌雄 5 匹ずつの Wistar ラットに、2,4-DNT (純粋 2,4-DNT、量的純度は記載されていない) が、2500 mg/kg 体重の用量で経皮適用された。被験動物は全て (10/10 匹)、毒性の徴候を示すことも無く、適用後の 14 日間の観察期間を生残した。この試験は、GLP に準拠していない。

### 経口

ガイドラインに沿って実施された試験のデータは得られていない。Lee *et al.* (1975) の試験は、実質的に、現行の試験ガイドラインに準じている。

ラットLee *et al.*, 1975

この毒性試験に用いられた 2,4-DNT 溶液は、ピーナツ油に 2,4-DNT (2,4-DNT の純度 98%、不純物 2,6-DNT が 2%) を飽和させて調製し、最終濃度はそれから化学的分析を行って測定した。2,4-DNT 調製物は強制経口投与された。試験した用量に関する情報は得られておらず、具体的な影響が認められたのは様々な試験用量のどこであったのかについても情報が得られていない。各用量に割り当てられた動物の数や性別は、示されていない。被験動物は、遅延型の死亡が起こるかおよび毒性徴候が現れるかどうか、14 日間観察された。CD ラットの急性経口 LD<sub>50</sub> (95%信頼区間) は、雄が 568 (434~705) mg/kg 体重、雌が 650 (520~743) mg/kg 体重であった。ほとんどの場合、認められた毒性徴候は中枢神経系の抑制だけであり、これから運動失調、呼吸抑制および死亡が数時間以内に生じた。死亡は、通常最初の 24 時間以内に起こり、それ以外の死亡例は無かった。生残動物は、48 時間以内に完全に回復した。死亡した動物には、投与に起因するとできるような肉眼病理所見は認められなかった。

Vernot *et al.*, 1977

雄ラットにおける 2,4-DNT の単回経口 LD<sub>50</sub> (95%信頼区間) は、270 (180~400) mg/kg 体重であった。これ以上詳しい情報は、得られていない。

## Hoechst, 1977a

各用量群 10 匹ずつの雄の Wistar ラットに、ゴマ油を媒体として、2,4-DNT (純度の報告無し) が、125、200、315、500、800 ないしは 1000 mg/kg 体重の用量で投与された。投与後の観察期間は 14 日間であった。雄の Wistar ラットにおける LD<sub>50</sub> (95%信頼区間) は、400 (305~520) mg/kg 体重であった。

Table 4.1.2.2.1-3: Mortality of male rats treated with 2,4-DNT (Hoechst, 1977a)

Dose (mg/kg)	Deaths <sup>a</sup>
125	0/10
200	2/10
315	2/10
500	8/9
800	7/10
1000	10/10

<sup>a</sup> Number of deaths / number of animals tested

## Hoechst, 1977b

各用量群 10 匹ずつの雌の Wistar ラットに、ゴマ油を媒体として、2,4-DNT(純度の報告無し)が、200、315、500、800 ないしは 1000 mg/kg 体重の用量で投与された。投与後の観察期間は 14 日間であった。雌の Wistar ラットにおける LD<sub>50</sub>(95%信頼区間)は、474(376～586) mg/kg 体重であった。

Table 4.1.2.2.1-4: Mortality of female rats treated with 2,4-DNT (Hoechst, 1977b)

Dose (mg/kg)	Deaths <sup>a</sup>
200	2/10
315	2/10
500	6/10
800	8/10
1000	10/10

<sup>a</sup> Number of deaths / number of animals tested

## Löser, 1981

各用量群雌雄 5 匹ずつのラットに、ルトロールを媒体として、2,4-DNT(純度の報告無し)が、100、500、800、1500 ないしは 2000 mg/kg 体重の用量で投与された。投与後の観察期間は 14 日間であった。ラットにおける LD<sub>50</sub>(95%信頼区間)は、893(620～1190) mg/kg 体重であった。

Table 4.1.2.2.1-5: Mortality of rats treated with 2,4-DNT (Löser, 1981)

Dose (mg/kg)	Deaths <sup>a</sup>
100	0/10
500	2/10
800	4/10
1500	7/10
2000	10/10

<sup>a</sup> Number of deaths / number of animals tested

マウスLee *et al.*, 1975

この毒性試験に用いられた 2,4-DNT 溶液は、ピーナツ油に 2,4-DNT(2,4-DNT の純度 98%、不純物 2,6-DNT が 2%)を飽和させて調製し、最終濃度はそれから化学的分析を行って測定した。2,4-DNT 調製物は強制経口投与された。試験した用量に関する情報は得られておら

ず、具体的な影響が認められたのは様々な試験用量のどこであったのかについても情報が得られていない。各用量に割り当てられた動物の数や性別は、示されていない。被験動物は、遅延型の死亡が起こるかおよび毒性徴候が現れるかどうか、14日間観察された。アルビノ Swiss マウスの急性経口 LD<sub>50</sub>(95%信頼区間)は、雄が 1,954(1,848~2,178) mg/kg 体重、雌が 1,340(1,205~1,500) mg/kg 体重であった。ほとんどの場合、認められた毒性徴候は中枢神経系の抑制だけであり、これから運動失調、呼吸抑制および死亡が生じた。死亡は、通常最初の 24 時間以内に起こり、それ以外の死亡例は無かった。生残動物は、48 時間以内に完全に回復した。死亡した動物には、投与に起因するとできるような肉眼病理所見は認められなかった。

#### Vernot *et al.*, 1977

マウスにおける単回経口 LD<sub>50</sub>(95%信頼区間)は、1,630(1,180~2,240) mg/kg 体重であった。これ以上の詳細な情報は得られていない。

### ネコ

#### Löser *et al.*, 1984

2匹の雄ネコに、2,4-DNT(純度 99%)が、ルトロールを媒体として、10 または 50 mg/kg 体重の用量で強制経口投与された。高用量で毒性影響が認められた。メトヘモグロビンの数値が、投与後 7 時間以内に 42%まで増加したが、投与後 48 時間後には基準値まで減少した。しかし、投与後 48 時間以内にハインツ小体形成が認められている(55%)。また、高用量を投与されたネコ 1 匹が投与の 1 週間後に死亡したが、その死因は腎不全であった。

Table 4.1.2.2.1-6: Haematological data of male cats after single oral administration of 2,4-DNT (Löser *et al.*, 1984)

Parameter	Dose mg/kg b.w.	Time after treatment (hours)				
		0	3	7	24	48
Met-Hb	10	3	3	3	2	No data
(%)	50 †	2	39	42	10	3
Heinz bodies	10	9	7	9	7	No data
(%)	50	10	12	28	51	55

†: High-dose cat died 1 week after treatment.



## 腹腔内投与

## ネコ

Bredow and Jung, 1942

1 群 2 匹ずつのネコに、2,4-DNT(純度の情報無し)が、ケシ油を媒体として、20、30 ないしは 40 mg/kg 体重の用量で投与された。また、別のネコ 1 匹に、2,4-DNT が、ケシ油を媒体として、10 mg/kg 体重の用量で投与された。投与後数時間以内に、メトヘモグロビンの数値が用量依存的に上昇し、10、20、30、40 mg/kg 体重群でそれぞれ 7% (n = 1)、36% (n = 2)、53% (n = 2)、77% (n = 2) と測定されたが、投与の 24 時間後までには減少していた。被験動物において、ハインツ小体形成は認められなかった。40 mg/kg 体重の 2,4-DNT を投与された 2 匹の内、1 匹が死亡した。

Table 4.1.2.2.1-7: Haematological data of cats after single administration of 2,4-DNT by intraperitoneal injection (Bredow and Jung, 1942)

Cat identity	Dose of 2,4-DNT		Hb	MetHb	Methaemoglobin	Time of maximum toxicity
	(mg/kg bw)	(mol·10 <sup>-5</sup> /kg bw)	(eq·10 <sup>-4</sup> /kg bw)	(eq·10 <sup>-4</sup> /kg bw)	(% with respect to initial Hb value)	(hours)
40 <i>K m</i>	10	5.5	5.6	0.4	7	3
41 <i>K F</i>	20	11	2.6	1.0	40	6
42 <i>K n</i>	20	11	4.5	1.4	32	22
43 <i>K m</i>	30	16.5	4.6	2.3	50	2
44 <i>K l</i>	30	16.5	3.5	1.9	55	6
45 <i>K E</i>	40	22	7.5	5.3	71	6
46 <i>K D</i>	40	22	5.3	4.4	82	10 †

Hb: haemoglobin, eq: equivalent weight, †: dead animal

## 4.1.2.2.2 ヒトのデータ

データは得られていない。

## 4.1.2.2.3 急性毒性の要約

急性毒性試験のデータは、ラット、マウスおよびネコのものが得られている。

リスクの総合評価を行う上では、げっ歯類での経口投与試験から得られたある程度信頼性がある数値は、LD<sub>50</sub>だけである。文献中に報告されている LD<sub>50</sub> の範囲は、ラットでは 180～893 mg/kg 体重、マウスでは 1,340～1,954 mg/kg 体重である。したがって、2,4-DNT は、ラットにとっては有毒とされる境界線上の物質(T)であり、マウスにとっては有害物質(Xn)である。ただし、げっ歯類を用いた急性経口毒性試験の多くは、その質に難があり、被験物質の純度についての言及を欠いている。Lee *et al.* (1975) の試験は、実質的に、現行の試験ガイドラインに準じており、唯一純度(98%)についても報告がなされている。この試験における急性経口 LD<sub>50</sub>(95%信頼区間)は、雄の CD ラットでは 568(434～705) mg/kg 体重、雌の CD ラットでは 650(520～743) mg/kg 体重であり、雄のアルビノ Swiss マウスでは 1,954(1,848～2,178) mg/kg 体重、雌のアルビノ Swiss マウスでは 1,340(1,205～1,500) mg/kg 体重であった。これに基づけば、2,4-DNT は、ラットにおいてもマウスにおいても有害(Xn)に分類されるべきである。La and Froines (1992b) による試験の結果は、この分類を支持するものである。この試験では、375 mg/kg 体重の 2,4-DNT(純度 97～99%)がラットに強制経口投与されたが、死亡は認められていない(変異原性の項参照)。

経皮曝露に関しては、ラットの急性毒性試験 1 件のみからデータが得られている。2,4-DNT を 2500 mg/kg 体重適用された全てのラットが、その後 14 日間の観察期間を生残し、毒性徴候を示すことも無かった。この試験のデータに基づくと、2,4-DNT は経皮急性毒性に関して分類されるべきではない。さらに、ラットを用いて 2,6-DNT のトキシコキネティクスを調べたデータが得られているが、それによると皮膚を介して取り込まれる量は、適用用量の 5～7% である。2,4-DNT の経皮吸収に関するデータは得られていないが、2,6-DNT の経皮吸収データから 2,4-DNT の経皮吸収を類推することは、両異性体が等しい分子量を有することと、ほぼ等しい物理化学的性質を示すことから、適切であると考えられる。したがって、2,4-DNT の経皮吸収率は、10% と判断される。経口投与と経皮適用との間に認められたラットの急性毒性に関する差異は、吸収率の違いから説明付けられると考えられる。

吸入曝露に関しては、げっ歯類における急性毒性データは得られていない。しかし経口吸収率も吸入吸収率も 100% であると推定されることから、経口試験で得られたデータから急性吸入毒性を類推することは妥当であると考えられる。

したがって、2,4-DNT は、吸入曝露および経口投与による急性毒性に関し、有害(Xn; R20/22)と分類されることになる。

また、ネコを用いた急性毒性試験では、2,4-DNT(純度 99.9%)の単回経口投与により、50 mg/kg 体重の場合にはメトヘモグロビンとハイツ小体の両方の増加が認められたが、10 mg/kg 体重ではそうした所見は認められなかった。メトヘモグロビン値の上昇は、20～40

mg/kg 体重の 2,4-DNT を腹腔内投与した場合にも認められている。さらに、経口投与の場合も腹腔内投与の場合も、最高用量の投与を受けたネコ 2 匹の内、1 匹が死亡した。

ラット、マウスおよびイヌでは、2,4-DNT の経口反復投与により、メトヘモグロビン血症や溶血性貧血に関連した他の影響が引き起こされた。しかし、これらの影響は、ラットやマウスを用いて実施された急性毒性試験では報告されておらず、イヌについては急性毒性試験のデータが得られていない。

一般に、ラット、マウス、ウサギ、モルモットおよびサルは、ヒトやイヌよりも、メトヘモグロビン形成に対して有意に感受性が低いことが知られている。その一方で、ネコはメトヘモグロビン形成に対して、特に感受性が高いことが知られている。つまり、2,4-DNT はヒトに対する有害性を有するが、その有害性は、げっ歯類のデータに基づくと過小評価になってしまい、ネコのデータに基づくと過大評価になってしまう可能性がある。

保護的な出発点に立つと、有害性の特定、化学物質の分類と表記に関する委員会の提言およびリスクの総合評価を行うに際しては、ネコのデータを用いることが適切であると考えられる。

したがって、ネコのデータ (50 mg/kg 体重の経口投与により死亡例発生) に基づき、2,4-DNT は、経口急性毒性に関して、有毒に分類されると判断される。実験動物やヒトにおいて、経口でも吸入でも吸収率は 100% と推定されることから、経口毒性データから吸入毒性を類推することは妥当であると思われ、吸入に関しても、2,4-DNT は有毒に分類されると考えられる。最後に、経皮吸収は、げっ歯類において 10% と推定されることを考慮し、またその値が実験動物やヒトへも外挿されることを考慮すると、2,4-DNT は、経皮適用においては、境界線上の毒性物質であると判断される。

結論的には、吸入、経皮および経口の経路について、急性毒性に関し、2,4-DNT を有毒(T; R23/24/25)と分類するのが妥当であると思われる。また、NOAEL としては、ネコの経口毒性試験から得られた 10 mg/kg 体重を、急性毒性に関するリスクの総合評価の出発点として用いることが妥当であると考えられる。

#### 4.1.2.3 刺激性

急性の皮膚刺激性試験および眼刺激性試験の実施データを、Table 4.1.2.3-1 にまとめた。

Table 4.1.2.3-1: Summary of acute toxicity (irritation) of 2,4-DNT in experimental animals

Exposure	Species	Protocol	Effect	References
Dermal	New Zealand rabbits (n = 6)	Application of the 2,4-DNT (2,4-DNT purity = 98) on intact and abraded skin as a 50% pasta with peanut oil. Responses scored at 24 and 72 hours	Not irritating	Lee <i>et al.</i> , 1975
Ocular	New Zealand rabbits (n = 6)	Application of the 2,4-DNT (2,4-DNT purity = 98) as a 50% pasta with peanut oil. Responses scored at 24 and 72 hours	Not irritating	Lee <i>et al.</i> , 1975

#### 4.1.2.3.1 皮膚

##### 動物試験

Lee *et al.*, 1975

修正ドレイズ法により、皮膚刺激性試験が実施されている。New Zealand ウサギ(1群6匹)を用い、被験物質投与群および対照群とも、無傷の皮膚部位と擦過処置を施した皮膚部位で試験を行った。2,4-DNT をピーナツ油で濃度 50%のペースト状にして適用し、被験動物全てにおいて紅斑や浮腫の徴候を検査し、それらの反応を 24 および 72 時間後にスコア付けした。2,4-DNT の純度は 98%で、不純物として 2,6-DNT が 2%含まれていた。試験デザインおよび報告内容の両方に、いくつかの難点が存在していた。2,4-DNT は室温では液状であるので、好ましくはその純粋な状態で試験に用いられるべきであった。報告内容に関しては、それぞれのウサギのスコアの記載や、そうした影響がいつ頃消失したかについての記載を欠いていた。それでも、動物試験を減らすことを重んじると、この試験は、リスク評価の目的に適うものとして容認されるべきと考えられた。対照と比較して、2,4-DNT の一次刺激スコアは、0.25 であった。

##### ヒトのデータ

データは、得られていない。

#### 4.1.2.3.2 眼

##### 動物試験

Lee *et al.*, 1975

New Zealand ウサギに 2,4-DNT を適用し、眼の刺激症状を検査し、それらの反応を 24 および 72 時間後にスコア付けした。2,4-DNT の純度は 98% で、不純物として 2,6-DNT が 2% 含まれていた。試験デザインおよび報告内容の両方に、いくつか不十分な点が存在していた。2,4-DNT は室温では液状であるので、好ましくはその純粋な状態で試験に用いられるべきであった。報告内容に関しては、それぞれのウサギのスコアの記載を欠いていた。それでも、動物試験を減らすことを重んじると、この試験は、リスク評価の目的に適うものとして容認されるべきと考えられた。New Zealand ウサギでは、一次眼刺激性は認められなかった。

##### ヒトのデータ

データは、得られていない。

#### 4.1.2.3.3 気道

データは、得られていない。

#### 4.1.2.3.4 刺激性の要約

2,4-DNT の皮膚および眼刺激性に関する情報は、動物において、ピーナツ油を媒体とした 50% 調製物を用いて実施されたものからしか得られていない。これらの試験では、2,4-DNT は軽度の皮膚刺激性を示すが、眼刺激性を示さないことが明らかとなった。Lee *et al.* (1975) の試験の内容は、皮膚および眼刺激に関する EU の基準を満たしていない。しかし、その試験の結果は、2,4-DNT が皮膚や眼に対する刺激性を示さないと結論付けることを容認するものと判断される。

#### 4.1.2.4 腐食性

眼や皮膚に対する刺激性のデータに基づくと、2,4-DNTは腐食性物質に分類されない。

#### 4.1.2.5 感作性

##### 4.1.2.5.1 動物試験

###### 皮膚

###### *In vivo* 試験

Lee *et al.*, 1975

モルモットマキシミゼーションテストが実施されているが、2,4-DNT (2,4-DNT 98%、2,6-DNT 2%)で処置された10匹のいずれにも、皮膚感作は認められていない(試験法や試験結果に関してこれ以上の情報は得られない)。この試験は、情報が得られている唯一の試験であり、リスク評価の目的に適うものと判断された。報告内容に難点があるが、この試験は適切に実施されているものとみなされた。加えて、さらなる動物試験を求めないという点からも、この試験はリスク評価の目的に適うものとして容認されるべきと考えられた。

###### *In vitro* 試験

データは、得られていない。

###### 気道

データは、得られていない。

##### 4.1.2.5.2 ヒトのデータ

データは、得られていない。

#### 4.1.2.5.3 感作性の要約

モルモットマキシミゼーションテストでは、2,4-DNT で処置されたモルモットに、皮膚感作は認められなかった。したがって、EU の基準に基づき、2,4-DNT は感作性物質には分類されない。

#### 4.1.2.6 反復投与毒性

##### 4.1.2.6.1 動物試験

##### In vivo 試験

##### 亜急性毒性試験

##### 吸入

データは、得られていない。

##### 経皮

データは、得られていない。

##### 経口

2,4-DNT の亜急性経口毒性が、ラット、マウスおよびイヌで調べられている。

##### ラット

McGown *et al.*, 1983

1 ヶ月齢の Sprague-Dawley ラット(対照群を除き各群雌雄 5 匹ずつ、対照群の雌は体の構造に欠陥が見られた 1 匹を除いたため 4 匹のみ)に、2,4-DNT(純度 97%、2,6-DNT が 2%と特定されていない物質が 1%混入)が、0、900、1200、1900 ないしは 3000 ppm の濃度で、14 日間混餌投与された(投与用量は、雄で 0、96、125、183 ないしは 260 mg/kg 体重/日、雌で 0、99、124、191 ないしは 254 mg/kg 体重/日に相当)。この試験の目的は、2,4-DNT がラットに及ぼす組織学的、血液生化学的および血液学的影響ならびに尿パラメータへの影響に関し、予備的なデータを得ることであった。この試験は GLP に準拠しており、曝露条件の逸脱が

あった(28日間ではなくて14日間の曝露であった)ことと回復期間を設けた群が含まれていないことを除いて、実質的に OECD ガイドライン 407 に沿って実施されている。肉眼的な毒性の所見は認められなかったが、2,4-DNT の混餌投与により、体重増加率の低減が用量依存的に生じた。この低減は、おそらく用量依存的な飼料消費量の減少に起因するものと考えられた。血液学的パラメータや尿パラメータには、2,4-DNT に関連した影響は認められなかった(尿試料は、異物混入があったため、pH および比重の測定だけが有効であるとみなされた)。血液生化学的検査に関しては、2,4-DNT により、血清コレステロール値と血糖値の用量依存的な増加が引き起こされた(前者は被験物質を投与された雌雄いずれの群においても有意、後者は高用量群の雌だけにおいて有意)。また、用量依存的ではないが、アラニンアミノトランスフェラーゼ値の上昇(雄の全ての用量群で有意)とアルブミン/グロブリン比の上昇(雌の 124 および 254 mg/kg 体重/日群で有意)も認められた。組織病理学的所見としては、雌雄両方において、低用量群から尿細管上皮細胞に硝子滴変性が認められ、この所見は、用量-反応関係を示すものではなかったが、雄の方が程度が強かった。さらに、2,4-DNT は、96 mg/kg 体重/日以上以上の群の雄において、精巣の退行性変性を伴った精子減少症を誘発した。この精巣の変化の程度は、用量依存的であった。NOAEL は、例えば精子減少症などのいくつかの影響が最低用量群でも観察されているため、決定することはできない。

#### Lee et al., 1978

各用量群雌雄 8 匹ずつの CD ラットの健康な離乳仔に、2,4-DNT が 0、700、2000 ないしは 7000 ppm の濃度で 4 週間混餌投与された。これらの濃度は、雄では 0、38、102 ないしは 191 mg/kg 体重/日に、雌では 0、38、118 ないしは 145 mg/kg 体重/日に相当していた。4 週間目の終わりに、各用量群雌雄 4 匹ずつを屠殺して剖検した。残りの各用量群雌雄 4 匹ずつについては、4 週間で被験物質投与を中止した。これらのラットは、さらに 4 週間の観察に供した後、安楽死させて剖検し、有害影響が可逆性であるかどうかの検討を行った。この試験は、実質的に OECD ガイドライン 407 に沿って実施されているが、被験動物数(5 匹のところは 4 匹)および回復期間(14 日のところが 28 日)には逸脱がある。

死亡は、高用量群のみで認められた。また、高用量群の雌雄の死亡率は同じ(2/8 匹)であった。数匹のラットで、後肢が開脚して硬直性歩様を示すという症状が発現した(この件についてより詳細な情報は得られていない)。対照群の動物は、観察期間の経過に沿って、体重増加を示した。対照的に、2,4-DNT を投与された群では、飼料消費量および体重が、用量が増えるほど低下した。4 週間の回復期間後、高用量群のラットの体重は、雌雄とも有意に増加していた。

血液学的検査の主要な所見としては、高用量群の雌雄で、赤血球数の減少が認められ(雄



では対照群の  $7.1 \times 10^6$  個/mm<sup>3</sup> に対して  $6.5 \times 10^6$  個/mm<sup>3</sup> で  $p < 0.05$  で有意、雌では対照群の  $7.8 \times 10^6$  個/mm<sup>3</sup> に対して  $5.6 \times 10^6$  個/mm<sup>3</sup> で  $p < 0.05$  で有意)、代償性に網状赤血球増加も生じていた(雄では対照群の 1.2% に対して 4.2% で  $p < 0.05$  で有意、雌では対照群の 1.6% に対して 6.1% で  $p < 0.05$  で有意)。4 週間の回復期間後では、高用量群の雄で、網状赤血球症を伴う貧血が認められた(赤血球数は対照群の  $8.1 \times 10^6$  個/mm<sup>3</sup> に対して  $6.2 \times 10^6$  個/mm<sup>3</sup> で  $p < 0.05$  で有意、網状赤血球は対照群の 1.2% に対して 5.5% で  $p < 0.05$  で有意)。血液学的検査に関しては、8 週目に屠殺された雌のデータが得られなかった。組織の顕微鏡学的検査に関して、著者は、中用量群と低用量群とは同等の所見が示されていると思われたため、後者の切片を精査したと述べているが、結果は報告されていない。

高用量群の雄では、中等度の精巣萎縮と精子形成障害が認められた(対照群で 0/4 匹であったのに対し 4/4 匹)。これらの影響は、非可逆的であった。雌雄にかかわらず、被験物質投与を受けた全ての群において、脾臓に軽度から重度のヘモジデリン沈着が認められたが、明らかな組織損傷を伴うものではなかった。この影響は、非可逆的であった(Tables 4.1.2.6.1-1,2)。

Table 4.1.2.6.1-1: Splenic haemosiderosis frequency and severity of male rats treated with 2,4-DNT for 4 weeks (Lee et al., 1978)

Group	Haemosiderosis	Dose (mg/kg bw/day)		
		0	102	191
4-week	Frequency	0%	75%	75%
	Mild to moderate	0/4	3/4	3/4
	Severe to very severe	0/4	0/4	0/4
4-week stop dose	Frequency	0%	25%	100%
	Mild to moderate	0/4	1/4	2/4
	Severe to very severe	0/4	0/4	2/4

Table 4.1.2.6.1-2: Haemosiderosis frequency and severity in the spleen of female rats treated with 2,4-DNT for 4 weeks (Lee et al., 1978)

Group	Haemosiderosis	Dose (mg/kg bw/day)		
		0	118	145
4-week	Frequency	0%	50%	50%
	Mild to moderate	0/4	1/4	1/2
	Severe to very severe	0/4	1/4	0/2
4-week stop dose	Frequency	25%	100%	100%
	Mild to moderate	1/4	2/4	2/2
	Severe to very severe	0/4	2/4	0/2

すべての用量において、脾臓へのヘモジデリン沈着が認められたため、NOAEL を導出す

ることはできなかった。この影響は非可逆的であった。したがって、LOAEL は 38 mg/kg 体重/日と考えられる。

## マウス

### Lee et al., 1978

各用量群雌雄 8 匹ずつの健康な若齢アルビノ Swiss マウスに、0、700、2000 ないしは 7000 ppm の濃度で 4 週間混餌投与が行われた。各濃度は、雄では 0、46、132 ないしは 332 mg/kg 体重/日に、雌では 0、53、142 ないしは 434 mg/kg 体重/日に相当していた。観察期間は全体で 8 週間であった。4 週間の終わりに、各用量群雌雄 4 匹ずつを屠殺して剖検した。残りの各用量群雌雄 4 匹ずつについては、4 週間で被験物質投与を中止した。これらのマウスは、さらに 4 週間の観察に供した後、安楽死させて剖検し、有害影響が可逆性であるかどうかの検討を行った。この試験は、実質的に OECD ガイドライン 407 に沿って実施されているが、被験動物数(5 匹のところは 4 匹)および回復期間 (14 日のところが 28 日)には逸脱がある。

高用量群の雄 1 匹が回復期間中に死亡したのを除き、32 匹全てのマウスが試験期間を生残した。高用量群の雄および雌の平均体重は、対照群の値よりも低かった。これは高用量群の雌雄のマウスにおける摂餌量が、対照群のマウスより少なかったためである。2,4-DNT の投与を中止して 4 週間すると、高用量群の雌雄の体重は健常値に回復していた。2,4-DNT に起因すると考えられる組織病理学的影響は、高用量群のマウスの 2/4 匹(対照群 0/4 匹)に認められた、精巣における軽度の精子形成障害だけであった。この影響は、4 週間の回復期間を経たマウスでは認められなくなっていた。

高用量群で認められた軽度の精子形成障害に基づくと、NOAEL は、雄における 132 mg/kg 体重/日であると考えられる。

## イヌ

### Lee et al., 1978

各群雌雄 2 匹ずつのビーグル犬に、0、1、5 ないしは 25 mg/kg 体重/日の用量で、硬質ゼラチンカプセルに入れられた 2,4-DNT(純度 98.5~99%)が、4 週間投与された。観察期間は全体で 8 週間であった。試験デザインは以下の通りであった。連続投与を 4 週間行った時点で、各用量群雌雄 1 匹ずつを屠殺して剖検した。各群の残りの雌雄 1 匹ずつについては、4 週間終了時に投与を中止して、8 週間経過後に屠殺し、有害影響の可逆性の検討に供し

た。

高用量群の雄 2 匹は、第 22 日目ないしは第 24 日目に死亡した。一方、高用量群の雌 2 匹は、4 週間の被験物質投与期間を生残した。これを受けて、高用量群の雌 2 匹に対する被験物質投与期間を延長することとなり、そうしたところ、これらの雌 2 匹は、連続投与の第 36 日目ないしは第 48 日目に死亡した。これらの結果から、雄の方が雌よりも、2,4-DNT の毒性に対する感受性が高いことが示された。

この亜急性毒性試験は、別の亜慢性毒性(13 週間)試験と同時に実施されていた。この 13 週間試験のイヌの方は、4 週間の投与期間を生残し、2,4-DNT の毒性に対する感受性の個体差が大きいことが示された。そうした理由から、生残したイヌを、亜急性毒性試験に流用する事となった。すなわち、高用量で 4 週間の投与を受けた雌雄のイヌ 1 匹ずつに、8 ヶ月間の回復期間が与えられた。

この試験は、前段落に記載した特記事項を除いて、OECD ガイドライン 407 に沿って実施された。

高用量(25 mg/kg 体重/日)で投与を受けていたビーグル犬の体重は、4 週間の時点もしくは死亡した時点において、そのイヌの最初の体重より軽くなっていた。これは、投与期間の経過と共に飼料摂取量が漸減したためである。

高用量で投与を受けた全てのイヌにおいて、後肢およびその近辺の黄色い汚れ、歯肉の褪色化(青みを帯びていた場合も有り)、神経筋協調不全、麻痺が認められた。神経筋に関して最初に発現した影響は、後肢の硬直および運動失調であった。この影響が強くなるにつれて、被験動物は立てなくなっていく。硬直は、後肢から胴体、前肢、頸および頭へと、前部に向かって進行して行った。さらに、高用量群の雌 1 匹が、一次的に失明状態となった。回復期間後、イヌの様子は、時々体がフラフラする以外は正常になっていた。

25 mg/kg 体重/日の用量で 2,4-DNT の投与を受けていたイヌは、赤血球数の減少(対照群が  $6.48 \times 10^6/\text{mm}^3$  個であったのに対し  $5.07 \times 10^6/\text{mm}^3$  個、 $p < 0.05$  で有意)と、ヘモグロビン含量の減少(対照群が 15.8%であったのに対し 12.7%、 $p < 0.05$  で有意)を示した。さらに、網状赤血球数の増加が、用量依存性に認められた(対照群と比較すると被験物質投与群全てで有意に増加。0、1、5、25 mg/kg 体重/日の順に、0.86%、1.26%、1.40%、1.53%)。さらに高用量で 2,4-DNT の投与を受けていたイヌでは、ハインツ小体が検出された(対照群で 0%であったのに対し 4.1%)。4 週間の回復期間の後では、高用量群の雌におけるハインツ小体検出率は 0.4%になっていた。2,4-DNT を高用量で投与されていたイヌでは、軽度の精子形成障害が認められたが、この影響は可逆的なものであった。

網状赤血球の増加に基づくと、LOAELは、1 mg/kg 体重/日であると考えられる。

### 亜慢性毒性試験

#### 吸入

データは、得られていない。

#### 経皮

データは、得られていない。

#### 経口

以下に示す試験は、様々な哺乳類について、2,4-DNT を亜慢性経口投与した場合の影響を調べるために実施されたものである。Lee *et al.* (1978)は、最長 13 週間の 2,4-DNT の経口投与による影響を、イヌ、ラットおよびマウスについて一緒に合わせて報告しているが、本報告書では、各動物種における 2,4-DNT の影響を、別々に記載した。

### ラット

Lee *et al.*, 1978, 1985

各用量群雌雄 8 匹ずつの CD ラットの健康な離乳仔に、2,4-DNT(純度 98%超)が 0、700、2000 ないしは 7000 ppm の濃度で混餌投与された。これらの濃度は、雄では 0、38、93 ないしは 266 mg/kg 体重/日に、雌では 0、38、108 ないしは 145 mg/kg 体重/日に相当していた。13 週間経過後、各用量群の雌雄 4 匹ずつを屠殺して剖検した。残りの各用量群雌雄 4 匹ずつについては、13 週間で被験物質投与を中止した。これらのラットは、さらに 4 週間の観察に供した後、安楽死させて剖検し、認められた有害影響が可逆性であるかどうかを調べた。この試験は、実質的に OECD ガイドライン 408 に沿って実施されているが、被験動物数(各用量群とも 10 匹のところは 4 匹、サテライト群も 5 匹のところは 4 匹)および回復期間(14 日のところは 28 日)には逸脱がある。それでも、この試験は、NOAEL を決定するのに適切であると考えられた。

266 mg/kg 体重/日で 2,4-DNT の投与を受けていた雄 8 匹のうち 6 匹が、所定の剖検の日時の前(投与開始の 6~13 週間後)に死亡した。93 mg/kg 体重/日で投与を受けていた雄 1 匹が、4 週間の回復期間の第 1 週目に死亡した。145 mg/kg 体重/日で 2,4-DNT の投与を受けていた 8 匹の雌全部が、試験の最初の 3 週間間に死亡した(それらの雌のほとんどで、血液検

査や組織学的検査のための試料が得られていない)。4週間試験における雌ラットの死亡率は、13週間試験の同時点における雌の死亡率よりも低いことから、2,4-DNTの毒性に対する感受性の個体差が大きいことが言及されている。体重に関しては、雄でも雌でも用量依存的な減少が、飼料摂取量の減少と共に認められている。回復期間の間は、体重に群間差が認められるままであった。神経筋への影響に関しては、266 mg/kg 体重/日で 2,4-DNT の投与を受けていた雄および 145 mg/kg 体重/日で投与を受けていた雌で、後肢の開脚および硬直が認められた。

網状赤血球の用量依存的な増加が、雄において、中用量から認められた(対照群で 0.7%であったのに対し 2.1%、 $p < 0.05$  で有意)。高用量群の雄では、赤血球数の減少(対照群で  $7.8 \times 10^6$  個であったのに対し  $3.9 \times 10^6$  個、 $p < 0.05$  で有意)、ヘモグロビン含量の減少(対照群で 17.6%であったのに対し 12.3%  $p < 0.05$  で有意)、および網状赤血球の割合の上昇(対照群で 0.7%であったのに対し 3.0%、 $p < 0.05$  で有意)が認められたが、これらの影響は可逆的であった。雌ではこうした有害影響は、認められなかった。組織の顕微鏡学的検査に関しては、著者は、中用量群と低用量群とでは同等の所見が示されていると思われたため、後者の切片を精査したと述べているが、結果は報告されていない。被験物質投与を受けた動物では、脾臓に軽度から非常に重度のヘモジデリン沈着を示すものが認められたが、明らかな組織損傷を伴うものではなかった。この影響は非可逆的であった。ヘモジデリン沈着は、対照群の雌でも認められた。

Table 4.1.2.6.1-3: Haemosiderosis frequency and severity in the spleen of male rats treated with 2,4-DNT for 13 weeks (Lee et al., 1978, 1985)

Group	Haemosiderosis	Dose (mg/kg bw/day)		
		0	93	266
13-week	Frequency	50%	100%	100%
	Mild to moderate	2/4	1/4	1/2
	Severe to very severe	0/4	3/4	1/2
13-week stop dose	Frequency	0%	100%	100%
	Mild to moderate	0/4	1/3	1/1
	Severe to very severe	0/4	2/3	0/1

Table 4.1.2.6.1-4: Haemosiderosis frequency and severity in the spleen of female rats treated with 2,4-DNT for 13 weeks (Lee et al., 1978, 1985)

Group	Haemosiderosis	Dose (mg/kg bw/day)		
		0	108	145
13-week	Frequency	100%	100%	—
	Mild to moderate	3/4	2/4	—
	Severe to very severe	1/4	2/4	—
13-week stop dose	Frequency	100%	50	—
	Mild to moderate	4/4	1/4	—
	Severe to very severe	0/4	1/4	—

神経毒性に関しては、高用量で 13 週間投与を受けた雄(1/1 匹)において、大脳に軽度の神経膠症が認められた。さらに、高用量の投与を受け回復期間が与えられた雄(1/1 匹)と、中用量の投与を受け回復期間が与えられた雄(1/3 匹)において、大脳に軽度の神経膠症および脱髄が認められた。93 mg/kg 体重/日で 2,4-DNT の投与を受けていた雄は、重度の精子形成低下を示し、266 mg/kg 体重で投与を受けていた雄は、精子形成障害を示していた。2,4-DNT の投与を受けていたラットにおける組織病変は、回復期間後も持続していた。また、精巣の変性が顕著に進行していた。

雄の脾臓で認められたヘモジデリン沈着に基づくと、LOAEL は、34 mg/kg 体重/日であると考えられる。

#### Kozuka et al., 1979

20 匹の雄の Wistar STD ラットに、5000 ppm の濃度で、2,4-DNT が 6 ヶ月間混餌投与された。1 級の 2,4-DNT を、カラムクロマトグラフィーでさらに精製して用いた。だが、最終的な純度は報告されていない。飼料消費量から算出した 2,4-DNT の 1 日当たりの平均摂取量は、試験期間前半の 3 ヶ月は約 66 mg、後半の 3 ヶ月は約 75 mg であった。体重で修正した 2,4-DNT の用量は、207 mg/kg 体重/日と算出された。対照群のラット 23 匹には、標準飼料が与えられた。この試験の内容は、専門家による審査のある雑誌に公表されており、リスク評価に適切なものであると考えられた。

被験物質投与群の死亡率(60%、n = 12)は、対照群の値(4%、n = 1)よりも高かった。被験物質投与群の体重は漸減し(6 ヶ月で 41%減少)、そのため 2,4-DNT 投与期間が進むにつれて、2,4-DNT の用量が増加するかたちとなった。被験物質投与群のラットでは、相対臓器重量の増加が、肝臓(体重 100 g 当たり対照群で 4.0 g あったのに対して 7.7 g、p < 0.01 で有意)、脾臓(体重 100 g 当たり対照群で 0.123 g あったのに対して 0.234 g、p < 0.01 で有意)、および腎臓(体重 100 g 当たり対照群で 0.68 g あったのに対して 1.18 g、p < 0.01 で有意)で認め

られた。投与を受けたラットでは、円背姿勢や協調失調によるぎくしゃくした動きが認められ、メトヘモグロビン、トリグリセリド、血糖値、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (GOT)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、アルカリホスファターゼおよび酸ホスファターゼが上昇した。反対に、アルブミン、アルブミン/グロブリン比および *p*-ニトロ安息香酸還元酵素は低減した。試験した唯一の用量である 66 mg/kg 体重/日 [訳注：207 mg/kg 体重/日のまちがい] で、精巣の萎縮と精子減少症が観察された (体重 100 g 当たりの精巣重量は対照群で 0.668 g あったのに対して 0.383 g、 $p < 0.01$  で有意)。

## マウス

Lee *et al.*, 1978; Hong *et al.*, 1985

各用量群雌雄 8 匹ずつの健康な若齢アルビノ Swiss マウスに、0、700、2000 ないしは 7000 ppm の濃度で 13 週間 2,4-DNT の混餌投与が行われた。各濃度は、雄では 0、47、137 ないしは 413 mg/kg 体重/日に、雌では 0、52、147 ないしは 468 mg/kg 体重/日に相当していた。観察期間は 17 週間であった。13 週間経過後、各用量群の雌雄 4 匹ずつを屠殺して剖検した。残りの各用量群雌雄 4 匹ずつについては、13 週間で被験物質投与を中止した。これらのラットは、さらに 4 週間の観察に供した後、安楽死させて剖検し、認められた有害影響が可逆性であるかどうかを調べた。この試験は、実質的に OECD ガイドライン 408 に沿って実施されているが、被験動物数 (各用量群とも 10 匹のところは 4 匹、サテライト群も 5 匹のところは 4 匹) および回復期間 (14 日のところが 28 日) には逸脱がある。それでも、この試験は、NOAEL を決定するのに適切であると考えられた。

対照群の雄の死亡数は 0/8 匹であったのに対し、高用量で投与を受けた雄 8 匹のうち 2 匹が、投与開始後 5~10 週間の間に死亡した。また、対照群の雌の死亡数は 0/8 匹であったのに対し、高用量で投与を受けた雌 8 匹のうち 1 匹が、投与開始後 7 週間目に死亡した。マウスのいずれにも、明らかな病的症状は認められなかった。

高用量で投与を受けた雄および雌は、飼料消費量と体重の減少を示した。高用量群では、ヘモグロビン含量の減少 (雄では対照群が 14% であったのに対し 10.6% で  $p < 0.05$  で有意、雌では対照群が 15.5% であったのに対し 14.2% で  $p < 0.05$  で有意)、および網状赤血球の割合の上昇 (雄では対照群が 1.25% であったのに対し 5.32%、雌では対照群が 1.39% であったのに対し 2.19%) が認められた。ただし、4 週間の回復期間後には、生残マウスは完全な回復を示した。

低用量群の雄 1 匹が、11 週目に死亡した。しかし、低用量群では、血液分析パラメータに変化は認められず、臓器重量の増減も示されず、投与に関連した病変も生じていないこと

から、この死亡例は、投与とは無関係であると考えられた。

上記の結果から、NOAEL は、雄についても雌についても 137 mg/kg 体重/日と判定された。

## イヌ

Lee *et al.*, 1978; Ellis *et al.*, 1985

各群雌雄 2 匹ずつのビーグル犬に、0、1、5 ないしは 25 mg/kg 体重/日の用量で、硬質ゼラチンカプセルに入れられた 2,4-DNT(純度 98.5~99%)が、13 週間投与された。観察期間は全体で 17 週間であった。試験デザインは以下の通りであった。連続投与を 13 週間行った時点で、各用量群雌雄 1 匹ずつを安楽死させて剖検した。各群の残りの雌雄 1 匹ずつについては、13 週間終了時に投与を中止して、17 週間経過後に安楽死させ、有害影響の可逆性の検討に供した。

この試験は、OECD ガイドライン 409 に沿って実施されているが、被験動物数(4 匹のところ)が 2 匹)および次段落に示した特記事項に関する逸脱がある。

4 週間試験では高用量群で死亡例が認められたため、高用量群の雌雄 1 匹ずつについては被験物質投与を 4 週間後に中止し、その後それらの被験動物を 8 ヶ月間回復させた。高用量群のもう一方の雄は 13 週間の投与まで生残し、高用量群のもう一方の雌も 13 週間の被験物質投与に耐え、4 週間の回復期間が与えられ、有害影響の可逆性の検討に供された。

25 mg/kg 体重/日で投与を受けたイヌでは、食欲低下による有意な体重減少、後肢やその周辺に黄色の汚れ、歯肉の褪色化(青みを帯びていた場合も有り)、協調運動失調、筋硬直、および硬直性麻痺が認められた。5 mg/kg 体重/日群からメトヘモグロビンが検出されるようになり(対照群で 0%であったのに対し 1.9%)、また、25 mg/kg 体重/日群では、ハインツ小体の出現(対照群で 0%であったのに対し 4.9%)を伴うヘモグロビン含量の減少(対照群で 16.7%であったのに対し 7.4%)および重度の精子形成障害が認められた。高用量群の雄の中樞神経系では、小脳の脱髄、神経膠症および浮腫が認められた。高用量群の雌では、4 週間の回復期間後に、大脳と視神経の両方に脱髄が認められた。

メトヘモグロビンの上昇に基づき、NOAEL は、1 mg/kg 体重/日と判断された。



## 慢性毒性試験

### 吸入

データは、得られていない。

### 経皮

データは、得られていない。

### 経口

以下に示す試験は、様々な哺乳類について、2,4-DNT を長期にわたり経口投与した場合の影響を調べるために実施されたものである。Ellis *et al.* (1979)は、24 ヶ月間の 2,4-DNT の経口投与による影響を、イヌ、ラットおよびマウスについて一緒に合わせて報告しているが、本報告書では、各動物種における 2,4-DNT の影響を、別々に記載した。

### ラット

Ellis *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1985

各群雌雄 38 匹ずつの CD ラットの健康な離乳仔に、2,4-DNT (純度 98%、2,6-DNT を 2% 含む)が、0、15、100 ないしは 700 ppm の濃度で、12 ヶ月間 (各群雌雄 4 匹ずつ) もしくは 24 ヶ月間 (各群雌雄 26 匹ずつ) 混餌投与された。観察期間は、12 ヶ月投与の場合は 13 ヶ月間、24 ヶ月投与の場合は 25 ヶ月間であった。数匹のラットが、早期死亡したラットと交換に加えられた (詳細な情報は得られていない)。

この試験の目的は、2,4-DNT の長期投与による慢性影響を特定することであった。この試験は、各用量ごとの動物数以外は、実質的に OECD のガイドライン 452 に沿って実施されており、NOAEL の設定に適していると判断された。この試験で得られた発がん性に関する所見は、「4.1.2.8 発がん性」の項の「4.1.2.8.4 発がん性の要約」の欄にも記載されている。

12 ヶ月の時点における生残率は、いずれの群でも同等で、ほぼ 100%であった。高用量群における死亡率は、15 ヶ月目以降、他群よりも高くなった。高用量群のラットは、20 ヶ月終了時点で約 50%が死亡し、23 ヶ月終了前に 1 匹の雌を除いて全例が死亡した。対照群、低用量群および中用量群の死亡率は、観察期間の 22~23 ヶ月目の間の時点で 50%に達した。主として死因は、下垂体腫瘍、潰瘍を皮下腫瘍および栄養失調の 3 つであった。影響を受けたラットでは、嗜眠や被毛の粗剛化が認められた。また、体の後四半部が、橙色~

EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

黄色に汚れていた。何匹かのラットは過度な興奮状態を示し、他の数匹では、片側性の運動失調もしくは後四半部または全身の麻痺、眼や鼻の周囲の涙滴による色素の痂皮、および持続的な体重減少が認められた。

血液学的データに関しては、赤血球、網状赤血球、ヘマトクリット、ヘモグロビンの各値に、高用量もしくは中用量群の雄および雌において、12 または 18 ヶ月間の時点で、対照群の値と比べ、有意な差が認められた (Tables 4.1.2.6.1-5,6)。

Table 4.1.2.6.1-5: Haematological data <sup>a</sup> of male CD rats during feeding of 2,4-DNT (Ellis *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1985)

<b>2,4-DNT (mg/kg/day)</b>	<b>Erythrocytes (10<sup>6</sup> / mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Reticulocytes (%)</b>	<b>Hematocrit (vol %)</b>	<b>Haemoglobin (g %)</b>
12 months				
Control	7.5 ± 0.2	0.9 ± 0.2	51.8 ± 0.9	16.0 ± 0.2
0.57	7.10 ± 0.07	1.0 ± 0.2	50.4 ± 0.7	15.0 ± 0.2
3.9	6.7 ± 0.2 <sup>c</sup>	1.4 ± 0.3	48.2 ± 0.9	15.1 ± 0.3
34	6.2 ± 0.3 <sup>c</sup>	1.6 ± 0.3	46.4 ± 1.3 <sup>c</sup>	14.3 ± 0.5 <sup>c</sup>
18 months				
Control	7.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	49.4 ± 0.6	15.2 ± 0.2
0.57	7.4 ± 0.1	0.8 ± 0.2	48.8 ± 0.7	15.4 ± 0.2
3.9	6.8 ± 0.3	0.7 ± 0.2	47.0 ± 0.8	14.5 ± 0.3
34	6.1 ± 0.3 <sup>c</sup>	1.3 ± 0.3 <sup>c</sup>	45.2 ± 1.6 <sup>c</sup>	12.9 ± 0.5 <sup>c</sup>
24 months				
Control	6.3 ± 0.4	0.72 ± 0.04	44 ± 2	13.6 ± 0.8
0.57	6.0 ± 0.4	1.4 ± 0.2	43 ± 2	13.8 ± 0.9
3.9	5.7 ± 0.5	5 ± 2	44 ± 3	13.3 ± 0.8
34 <sup>b</sup>	—	—	—	—

Data represent mean value ± SD. <sup>a</sup> Other clinical variables were not altered and are omitted from the table.

<sup>b</sup> No survival at 24 months. <sup>c</sup> Significantly different from the respective controls (Dunnett's multiple comparison procedure, p < 0.05).

Table 4.1.2.6.1-6: Haematological data <sup>a</sup> of female CD rats during feeding of 2,4-DNT (Ellis et al., 1979; Lee et al., 1985)

2,4-DNT (mg/kg/day)	Erythrocytes (10 <sup>6</sup> / mm <sup>3</sup> )	Reticulocytes (%)	Hematocrit (vol %)	Haemoglobin (g %)
12 months				
Control	6.5 ± 0.3	1.1 ± 0.2	47 ± 1	14.2 ± 0.5
0.71	6.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1	47 ± 1	13.8 ± 0.4
5.1	6.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	47.8 ± 0.6	14.8 ± 0.2
45	5.6 ± 0.1 <sup>c</sup>	1.5 ± 0.2	43.0 ± 0.9 <sup>c</sup>	13.1 ± 0.3
18 months				
Control	6.9 ± 0.3	0.8 ± 0.1	45 ± 2	13.9 ± 0.4
0.71	6.4 ± 0.2	1.0 ± 0.2	45 ± 1	12.8 ± 0.1
5.1	6.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	46 ± 2	13.8 ± 0.4
45	5.6 ± 0.3 <sup>c</sup>	2.2 ± 0.4 <sup>c</sup>	40 ± 2	12.0 ± 0.5 <sup>c</sup>
24 months				
Control	6.0 ± 0.5	1.3 ± 0.3	43 ± 2	14.2 ± 0.7
0.71	6.1 ± 0.2	1.4 ± 0.2	43 ± 1	14.1 ± 0.5
5.1	5.4 ± 0.6	3 ± 1	41 ± 3	13 ± 1
45 <sup>b</sup>	0.9	9.5	33	9.4

Data represent mean value ± SD. <sup>a</sup> Other clinical variables were not altered and are omitted from the table.

<sup>b</sup> Only one female. <sup>c</sup> Significantly different from the respective controls (Dunnett's multiple comparison procedure,  $p < 0.05$ ).

回復期間後は、12 ヶ月間高用量の投与を受けた雌において赤血球数が少なかった(対照群で  $7.0 \times 10^6$  個/mm<sup>3</sup>であったのに対し  $6.3 \times 10^6$  個/mm<sup>3</sup>、 $p < 0.05$  で有意)ことを除き、上述した貧血に関連する影響は、認められなくなっていた。

12 ヶ月以降に高用量群で認められた投与に関連した主な組織病理学的所見は、肝臓における過形成性病巣、腫瘍性結節および 12 ヶ月投与の後 1 ヶ月回復期間が設けられた雌の 1 匹に認められたがん、精巣における精細管の重度の萎縮(対照群では認められなかったのに対し、2 匹の雄では精子形成障害を伴って認められた)、および、メトヘモグロビン血症のため二次的に鉄が蓄積して生じたと思われる過度の色素沈着(脾臓)であった(Tables 4.1.2.6.1-7,8)。

肝臓の病変に関しては、過形成病変が、低用量で 12 ヶ月の投与を受け、回復期間を設けられなかった群と設けられた群の両方の雄で認められた(それぞれ 4/4 匹および 3/4 匹)。すなわち、低用量群の雄の 8 匹中 7 匹(88%)に軽度の過形成病変が認められており、これに対し対照群では疑わしい程度の病変が 7 匹中 2 匹(29%以下)に認められた。さらに、それらの肝病変は、2,4-DNT の投与期間が長くなるとともに、また用量が多くなるとともに、腫瘍性結節や肝細胞がんに進展した。24 ヶ月の時点では、過形成病変の数や重症度は、対照群の雄と低用量群の雄(24 ヶ月の投与を受け、回復期間が設けられなかった群と設けられた群)とで同等であった。12 ヶ月投与と 24 ヶ月投与の両方の結果に基づくと、肝臓における過形成病変は、対照群の雄よりも低用量群の雄で早くから顕著であり、当該病変は、

## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

2,4-DNT 投与に関連したものであると考えられる。したがって、軽度の過形成病変の存在は、リスク評価の基準となる影響とみなされる。

Table 4.1.2.6.1-7: Incidence of lesions in rats fed 2,4-DNT for 12 months (Ellis et al., 1979; Lee et al., 1985).

		Dose (mg/kg b.w./day)							
		Males				Females			
		0	0.57	3.9	34	0	0.71	5.1	45
<i>Liver</i>									
Hyperplastic foci	Mild	2 <sup>?</sup> /4 <sup>a</sup>	4/4	3/4	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4
	Marked to severe	0/4	0/4	0/4	2/4	0/4	0/4	0/4	3/4
Neoplastic nodule		0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4	4/4
Hepatocellular carcinoma		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>Testes</i>									
Atrophy of seminiferous tubules		0/4	0/4	0/4	4/4 <sup>b</sup>				
<i>Spleen</i>									
Excessive pigmentation		0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4	3/4

<sup>?</sup> Questionable. <sup>a</sup> Number of rats affected / number of rats examined <sup>b</sup> Atrophy of seminiferous tubules was severe.

Table 4.1.2.6.1-8: Incidence of lesions in rats fed 2,4-DNT for 12 months and allowed to recover for 1 month (Ellis et al., 1979; Lee et al., 1985).

		Dose (mg/kg b.w./day)							
		Males				Females			
		0	0.57	3.9	34	0	0.71	5.1	45
<i>Liver</i>									
Hyperplastic foci	Mild	0/3 <sup>a</sup>	3/4	3/4	1/3	0/4	1/4	1/4	2/4
	Marked to severe	0/3	0/4	0/4	2/3	0/4	0/4	0/4	3/4
Neoplastic nodule		0/3	1/4	0/4	2/3	0/4	0/4	0/4	3/4
Hepatocellular carcinoma		0/3	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
<i>Testes</i>									
Atrophy of seminiferous tubules		0/3	0/4	0/4	2/3 <sup>b</sup>				
<i>Spleen</i>									
Excessive pigmentation		0/3	0/4	0/4	2/3	0/4	2/4	0/4	4/4

<sup>a</sup> Number of rats affected / number of rats examined <sup>b</sup> Atrophy of seminiferous tubules was severe.

精細管の萎縮は、高用量を投与された雄では、回復期間が設けられなかった群と設けられた群の両方で重度であったが、対照群では精巣にその様な病変は見られず、2,4-DNT 投与に関連したものと考えられた。所定の屠殺日時前に切迫屠殺した雄における精細管の萎縮の発生率および重症度は、既に低用量群から対照群の値よりも高かった (Table 4.1.2.6.1-9)。すなわち、2,4-DNT の投与用量と精細管萎縮との間に、用量-反応関係が認められた。さらに、12 ヶ月よりも長く低用量での投与を受けていた雄の群は、対照群と比べて、精細管萎縮の発生率が高かった (Table 4.1.2.6.1-10)。以上のことから、精細管の萎縮は、リスク評価の基準となる影響とみなされる。

Table 4.1.2.6.1-9: Severity and incidence of the atrophy of seminiferous tubules in male rats dying at unscheduled times (Ellis et al., 1979; Lee et al., 1985).

		Dose (mg/kg b.w./day)			
		0	0.57	3.9	34
Severity	Mild	1 <sup>a</sup>	1	–	–
	Moderate	1	–	–	1
	Marked	–	–	–	1
	Severe	–	2	4	23
N		13	16	13	30
Incidence of severe atrophy of seminiferous tubules		0	0.13	0.31	0.77

<sup>a</sup> Number of rats with degeneration of seminiferous tubules. N, total number of rats dying at unscheduled times.

12 ヶ月よりも長く (Table 4.1.2.6.1-10) 高用量を投与されていた群では、肝臓における重度の過形成病巣を伴った肝細胞がんの発生率の上昇(雄では  $p > 0.05$ 、雌では  $p < 0.05$  で有意)、雌における乳腺腫瘍の発生率の上昇、および雄における皮膚腫瘍の発生率の上昇が認められた。

Table 4.1.2.6.1-10: Incidence of lesions in rats fed 2,4-DNT for more than 12 months (Ellis et al., 1979; Lee et al., 1985).

	Dose (mg/kg b.w./day)							
	Males				Females			
	0	0.57	3.9	34	0	0.71	5.1	45
Hyperplastic foci (Percentage)	9/25 <sup>a</sup> (36%)	10/28 (36%)	9/19 (47%)	16/29 (55%)	7/23 (32%)	18/35 (51%)	19/27 (70%)	13/34 (38%)
Hepatocellular neoplastic nodule <sup>b</sup> (Percentage)	1/25 (4%)	2/28 (7%)	1/19 (5%)	2/29 (7%)	0/23 (0%)	3/35 (9%)	2/27 (7%)	6/34 (18%)
Hepatocellular carcinoma <sup>b,c</sup> (Percentage)	1/25 (4%)	0/28 (0%)	1/19 (5%)	6/29 (21%)	0/23 (0%)	0/35 (0%)	1/27 (4%)	18/34 (53%)
Testicular atrophy (Percentage)	4/25 (16%)	8/28 (29%)	6/18 (33%)	25/29 (86%)				
Mammary gland tumours <sup>c,d</sup> (Percentage)	0/25 (0%)	0/28 (0%)	0/19 (0%)	2/30 (7%)	11/23 (48%)	12/35 (34%)	17/27 (63%)	33/35 (94%)
Skin tumours <sup>c,e</sup> (Percentage)	2/25 (8%)	4/28 (14%)	3/19 (16%)	17/30 (57%)	1/22 (5%)	3/35 (9%)	0/27 (0%)	6/35 (17%)
Pituitary adenoma <sup>c</sup> (Percentage)	9/22 (41%)	14/23 (61%)	7/14 (50%)	2/20 (10%)	18/23 (78%)	24/30 (80%)	20/24 (83%)	7/23 (30)

<sup>a</sup> Number of rats affected / number of rats examined. The results of rats fed 2,4-DNT for more than 12 months did not include all animals due to some rats that died at night and autolysis hindered examination. To increase the numbers available for calculating incidence, the authors included all rats fed the same dosage which were intended for a metabolism study and a few females intended for a three-generation study but not mated and continued on feed (further details not available).

<sup>b</sup> Classification of liver tumour by Squire was followed.

<sup>c</sup> Number of animals examined denotes the number of living when the first tumour was observed

<sup>d</sup> Including benign and malignant tumours from epithelial or mesenchymal cells.

<sup>e</sup> Including epidermal epithelial and subcutaneous mesenchymal tumours.

これらの知見に基づくと、高用量では、12 ヶ月の投与で顕著な毒性が示されると考えられる。投与に関連した変化のいくつかは、中用量で投与を受けたラットでも認められたが、この試験で用いられた動物数が少ないため、それらを有害性影響とみなすには、質的に難がある。しかし、肝臓病変と精巣病変は、12 ヶ月を超える投与により、その発生率や重症度が增高しており、低濃度の場合でも認められていることから、慢性毒性に関する安全側に考慮した LOAEL は、0.57 mg/kg 体重/日(雄)および 0.71 mg/kg 体重/日(雌)と判断される。

## マウス

Ellis *et al.*, 1979; Hong *et al.*, 1985

各群雌雄 58 匹ずつの CD-1 マウスの健康な離乳仔に、2,4-DNT(純度 98%、2,6-DNT を 2% 含む)が、0、100、700 ないしは 5000 ppm の濃度で、12 ヶ月間(各群雌雄 4 匹ずつ)もしくは 24 ヶ月間(各群雌雄 46 匹ずつ)混餌投与された。観察期間は、12 ヶ月投与の場合は 13 ヶ月間、24 ヶ月投与の場合は 25 ヶ月間であった。数匹のマウスが、早期死亡したマウスに代え加えられた(詳細な情報は得られていない)。

この試験の目的は、2,4-DNT の長期投与による慢性影響を特定することであった。この試験は、実質的に OECD のガイドライン 452 に沿って実施されており、NOAEL の設定に適していると判断された。この試験で得られた発がん性に関する所見は、「4.1.2.8 発がん性」の項の「4.1.2.8.4 発がん性の要約」の欄にも記載されている。

高用量群のマウスの約 50%が、10 ヶ月終了時まで死亡し、高用量群の全てのマウスが、雄は 18 ヶ月終了時より前に、雌は 21 ヶ月終了時前に死亡した。対照群、低用量群および中用量群の死亡率は、観察期間中の 19~21 ヶ月の間の時期に、50%に達した。高用量群のマウスは、他群のマウスと比べて低体重であった。被験物質の投与に関連してこの試験の最初の 1 ヶ月に顕著に認められた影響は、高用量群の飼料摂取が他群よりも少なかった(雄では  $p > 0.05$ 、雌では  $p < 0.05$  で有意)ことである。ただし、この試験が進むにつれて、平均飼料消費量は、いずれの群についても有意差は見られなくなった。このことから、最初の 1 ヶ月より後には、高用量群の数匹の生残マウスで飼料消費量が比較的多くなり、全体の平均を上昇させるのに寄与したものと考えられた。

12 ヶ月間高用量で投与を受けたマウスは全て、円背姿勢となり、活動性が相対的に低下し、時には冷えているかのように肢を体に押し込んで毛を逆立ててじっとしているのが観察された。刺激を与えると、マウスは過活動となり、肢が硬直した異様な足取りでケージの中を走り回った。時折、マウスの眼は落ち窪み、黒ずんで見えた。尿に由来すると思われる赤~橙色の汚れが、体の後四半部に認められた。

## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

所定の屠殺日時より前に切迫屠殺した高用量群のマウスでは、対照群と比べると、赤血球数やヘモグロビン含量が低下し、メトヘモグロビンやハイツ小体が増加しているのが確認された。さらに、Tables 4.1.2.6.1-11,12 に示した様に、ハイツ小体、網状赤血球およびメトヘモグロビンの各数値は、12 ヶ月間高用量で投与を受けていた雌雄両方で、対照群の値よりも有意に高かった ( $p < 0.05$ )。これらの影響は、可逆的であった。

Table 4.1.2.6.1-11: Haematological data of male CD-1 mice during feeding of 2,4-DNT (Ellis *et al.*, 1979; Hong *et al.*, 1985)

2,4-DNT (mg/kg/day)	Heinz bodies (%)	Reticulocytes (%)	Haemoglobin (g %)	Methaemoglobin (%)
12 months				
Control	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.2	13.5 ± 0.6	0.0 ± 0.0
13.3	0.0 ± 0.0	1.06 ± 0.08	13.0 ± 0.6	0.0 ± 0.0
96.9	0.0 ± 0.0	1.9 ± 0.1	13.6 ± 0.7	0.0 ± 0.0
885	8 ± 3	4.1 ± 0.8 <sup>b</sup>	11.5 ± 0.5	4 ± 2 <sup>b</sup>
24 months				
Control	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.4	12 ± 1	0.0 ± 0.0
13.3	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.3	12.8 ± 0.4	1 ± 1
96.9	0.0 ± 0.0	2.0 ± 0.7	11.7 ± 0.9	0.0 ± 0.0
885 <sup>a</sup>	—	—	—	—

Data represent mean value ± SD. <sup>a</sup>No survival of the high-dose male at 24 months. <sup>b</sup>Significantly different from the respective controls (Dunnett's multiple comparison procedure,  $p < 0.05$ ).

Table 4.1.2.6.1-12: Haematological data of female CD-1 mice during feeding of 2,4-DNT (Ellis *et al.*, 1979; Hong *et al.*, 1985)

2,4-DNT (mg/kg/day)	Heinz bodies (%)	Reticulocytes (%)	Haemoglobin (g %)	Methaemoglobin (%)
12 months				
Control	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.2	12.5 ± 0.3	0.0 ± 0.0
13.3	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.2	13.1 ± 0.7	0.0 ± 0.0
96.9	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1	13.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0
885	6 ± 3	3.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	11.8 ± 0.3	3 ± 2 <sup>b</sup>
24 months				
Control	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1	13.9 ± 0.4	0.0 ± 0.0
13.3	0.0 ± 0.0	1.4 ± 0.3	13.4 ± 0.5	0.0 ± 0.0
96.9	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.1	14.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0
885 <sup>a</sup>	—	—	—	—

Data represent mean value ± SD. <sup>a</sup>No survival of the high-dose female at 24 months. <sup>b</sup>Significantly different from the respective controls (Dunnett's multiple comparison procedure,  $p < 0.05$ ).

12 ヶ月間の投与以降、高用量群のマウスは、肝臓の相対重量増加を示した。雄では、精巣重量が低下した。肝臓と精巣におけるこうした変化の傾向は、両方とも、1 ヶ月間の回復

期間後にも続いて認められた。

組織病理学的検査では、肝臓、腎臓および性腺に、被験物質投与に関連した病変が認められた。12 ヶ月間の投与の場合、高用量群のマウスは、腎症、腎腫瘍(雄)、肝細胞形成異常、および精巣または卵巣の萎縮を示した。12 ヶ月を超えて投与が行われた場合、肝細胞形成異常は、雄では低用量群から認められ、雌では高用量群で認められた。また、腎臓では、低用量群から雌雄両方において中毒性腎症の発生率が上昇し、雄では腎臓腫瘍の発生率も上昇した。中用量群から精巣萎縮が認められたこと、および高用量群で非機能性卵胞を伴う卵巣萎縮が認められたことも報告されている。高用量群の雄では腫瘍発生率が低かったが、これはおそらく、被験動物が病変が腫瘍化する前に死亡したためと考えられる。したがって、雄の方が雌よりも感受性が高いと考えられる。

全身的な異常色素沈着が、12 ヶ月間高用量で投与を行っていた雌雄のマウスで認められ、これは回復期間後も続いていた。さらに、この影響は、12 ヶ月を超えて投与が行われた場合では、低用量群から雌雄で認められた。このような色素の広範な蓄積は、鉄の蓄積によるもの、すなわちメトヘモグロビン血症から二次的に生じたものであると考えられる。

Table 4.1.2.6.1-13: Incidence of lesions in mice fed 2,4-DNT for 12 months (Ellis et al., 1979; Hong et al., 1985).

	Dose (mg/kg b.w./day)							
	Males				Females			
	0	13.3	96.1	885	0	13.7	93.8	911
Hepatocellular dysplasia	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4	4/4
Hepatocellular carcinoma	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4	¼
Toxic nephropathy	1/4	0/4	2/4	3/4	1/4	2/4	1/4	2/4
Kidney carcinoma	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Testicular or ovarian atrophy	0/4	0/4	1/4	4/4	1/4	0/4	0/4	2-3/4
Generalized abnormal pigmentation	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4	4/4

<sup>a</sup> Number of mice affected / number of mice examined



## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

Table 4.1.2.6.1-14: Incidence of lesions in mice fed 2,4-DNT for 12 months and allowed to recover for 1 month (Ellis et al., 1979; Hong et al., 1985).

	Dose (mg/kg b.w./day)							
	Males				Females			
	0	13.3	96.1	885	0	13.7	93.8	911
Hepatocellular dysplasia	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4	3/4
Hepatocellular carcinoma	0/4	0/4	0/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Toxic nephropathy	1/4	1/4	0/4	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Kidney adenoma	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Testicular or ovarian atrophy	0/4	1/4	0/4	3/4	0/4	0/4	0/4	3/4
Generalized abnormal pigmentation	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4	4/4

<sup>a</sup> Number of mice affected / number of mice examined

Table 4.1.2.6.1-15: Incidence of lesions in mice fed 2,4-DNT for more than 12 months (Ellis et al., 1979; Hong et al., 1985)

	Dose (mg/kg b.w./day)							
	Males				Females			
	0	13.3	96.9	885	0	13.7	93.8	911
Hepatocellular dysplasia (Percentage)	2/33 (6%)	14/33 (42%)	12/28 (43%)	40/40 (100%)	5/31 (16%)	3/29 (10%)	5/31 (16%)	29/33 (88%)
Hepatocellular carcinoma (Percentage)	7/33 (21%)	9/33 (27%)	8/28 (29%)	5/40 (13%)	2/31 (6%)	1/29 (3%)	3/31 (10%)	1/33 (3%)
Toxic nephropathy (Percentage)	0/33 (0%)	3/33 (9%)	3/28 (11%)	32/40 (80%)	0/31 (0%)	3/29 (10%)	2/31 (6%)	10/32 (31%)
Kidney tumours (Percentage)	0/33 (0%)	5/33 (15%)	16/28 (57%)	3/40 (8%)	0/31 (0%)	0/29 (0%)	0/31 (0%)	1/32 (3%)
Testicular or ovarian atrophy (Percentage)	7/32 (22%)	4/33 (12%)	11/28 (39%)	34/39 (87%)	1/28 (4%)	2/23 (9%)	0/27 (0%)	15/24 (63%)
Generalized abnormal pigmentation (Percentage)	0/33 (0%)	2/33 (6%)	4/29 (14%)	38/40 (95%)	0/31 (0%)	4/29 (14%)	8/31 (26%)	27/33 (82%)

<sup>a</sup> Number of mice affected / number of mice examined

慢性毒性に関する LOAEL は、腎臓および肝臓における病変形成に基づき、13.3 mg/kg 体重/日 (雄) および 13.7 mg/kg 体重/日 (雌) であると判断された。

## イヌ

Ellis et al., 1979; Ellis et al., 1985

各群雌雄 6 匹ずつのビーグル犬に、0、0.2、1.5 ないしは 10 mg/kg 体重/日の用量で、硬質

ゼラチンカプセルに入れられた 2,4-DNT(純度 98%、2,6-DNT を 2%含む)が、12 ヶ月間もしくは 24 ヶ月間混餌投与された。観察期間は、12 ヶ月投与の場合は 12 ヶ月間(各群雌雄 1 匹ずつ)もしくは 13 ヶ月間(各群雌雄 1 匹ずつ)、24 ヶ月投与の場合は 24 ヶ月間(各群雌雄 2 匹ずつ)もしくは 25 ヶ月間(各群雌雄 2 匹ずつ)であった。

この試験は、実質的に OECD のガイドライン 452 に沿って実施されており、NOAEL の設定に適していると判断された。

高用量群の雄 3 匹は、神経毒性症状(強調運動失調および麻痺)を呈したため、投与期間の第 8、18 および 19 週の間切迫屠殺した。さらに同群の雄 1 匹が、被験物質投与関連の無い原因で死亡した。したがって、高用量群の雄は 2 匹しか生残しなかった。これらの 2 匹には、24 ヶ月間の投与が行われ、そのうちの 1 匹は投与終了の時点で剖検され、もう 1 匹には回復期間が設けられた。そのため、高用量群の雄には、12 ヶ月で剖検に供されたものや 12 ヶ月投与後に回復期間が設けられたものはいなかった。投与期間の 22 ヶ月目の間に、中用量群の雌が 1 匹死亡した。2,4-DNT に対する感受性には、大きな個体差が認められた。また、雄の方が雌よりも感受性が高かった。

2,4-DNT を低用量で投与されたイヌの体重は、対照群よりも高値を示し、中用量群や高用量群の体重は対照群よりも低値であった。2,4-DNT を中用量で投与されたイヌが、最も低体重であった。平均飼料消費量には、有意な群間差は認められなかった。

後肢における神経毒性症状および口唇や舌の繊細な動きの調節に関する神経毒性症状が、高用量群の全例(8~20 週)および中用量群の雄 1 例(66 週後)で認められた。これらの神経毒性症状は、中用量群の雄では 1 週間以内に消失し、高用量群のイヌでは、生残例において、体重減少を伴って間欠的に発現した。影響が見られたイヌは餌を食べることも水を飲むこともできなくなったため、重度の協調運動失調を示したイヌに対しては、その体重を増やすために、やわらかい飼料が用いられた。著者は、重度の麻痺が生じたイヌでも、非経口的栄養補給(「高カロリー輸液療法」)が講じられれば、回復は可能であったであろうと述べている。被験動物が神経毒性を最初に示した時点における累積投与用量が各用量群でほぼ一定であったため、神経毒性影響には蓄積効果があると思われた(Table 4.1.2.6.1-16)。

Table 4.1.2.6.1-16: Time to first neurotoxic symptoms and accumulated dose of 2,4/DNT in dogs (Ellis *et al.*, 1979, 1985)

<i>Daily dose(mg/kg)</i>	<i>Days to cause symptoms</i>	<i>Accumulated dose (mg/kg)</i>
25	12	300
10	52	520
5	> 91	> 455
1.5	465	697.5

The daily doses of 5 and 25 mg/kg b.w./day were tested in the 13-week dog study.

12 ヶ月の時点での 2,4-DNT による血液学的影響 (Tables 4.1.2.6.1-17,18) としては、網状赤血球およびハインツ小体出現率の増加が高用量群の雌雄で認められ、それらの値は対照群と比べて有意に ( $p < 0.05$ ) 高値であった。さらに、雌の赤血球数およびヘモグロビン含量は、中用量群以上において、対照群と比べて有意に ( $p < 0.05$ ) 低下していた。24 ヶ月間の投与を受けたイヌでは、ハインツ小体のが検出されなかった (Tables 4.1.2.6.1-17,18) が、これは 2,4-DNT に対する適応反応が生じたためと思われた。回復期間が設けられたイヌでは、12 ヶ月間投与の場合でも 24 ヶ月投与の場合でも、貧血からの回復が示されハインツ小体は検出されなくなり、また赤血球数や網状赤血球出現率も、高用量群であっても対照群と変わらなくなっていた。

Table 4.1.2.6.1-17: Haematological data of male beagle dogs during feeding of 2,4-DNT (Ellis *et al.*, 1979, 1985).

2,4-DNT (mg/kg/day)	Heinz bodies (%)	Reticulocytes (%)	Haemoglobin (g %)	Methaemoglobin (%)
12 months				
Control	0 ± 0	∩?	6.0 ± 0.2	15.1 ± 0.4
0.2	0 ± 0	0.7 ± 0.1	5.3 ± 0.2	14.1 ± 0.2
1.5	0 ± 0	0.7 ± 0.1	5.7 ± 0.2	14.4 ± 0.4
10	0.5 ± 0.4	1.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.2	14 ± 1
24 months				
Control	0 ± 0	0.7 ± 0.1	5.9 ± 0.2	15.5 ± 0.6
0.2	0 ± 0	0.8 ± 0.2	6.1 ± 0.3	14.9 ± 0.6
1.5	0 ± 0	0.6 ± 0.2	5.9 ± 0.2	14.7 ± 0.6
10	0 ± 0	0.49 ± 0.05	6.7 ± 0.5	16.3 ± 0.8

<sup>a</sup> Significantly different from control dogs (Dunnett's multiple comparison procedure). Entries are ± mean standard error.

Table 4.1.2.6.1-18: Haematological data of female beagle dogs during feeding of 2,4-DNT (Ellis *et al.*, 1979, 1985).

2,4-DNT (mg/kg/day)	Heinz bodies (%)	Reticulocytes (%)	Haemoglobin (g %)	Methaemoglobin (%)
12 months				
Control	0 ± 0	0.4 ± 0.4	5.9 ± 0.3	15.1 ± 0.4
0.2	0 ± 0	0.84 ± 0.07 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.1	15.1 ± 0.4
1.5	0 ± 0	0.45 ± 0.06	4.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	13.7 ± 0.5 <sup>a</sup>
10	0.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	12.9 ± 0.2 <sup>a</sup>
24 months				
Control	0 ± 0	0.4 ± 0.1	6.32 ± 0.06	16.4 ± 0.3
0.2	0 ± 0	0.25 ± 0.02	5.8 ± 0.2	14.2 ± 0.6
1.5	0 ± 0	0.34 ± 0.03	5.7 ± 0.2	14.9 ± 0.2
10	0 ± 0	0.6 ± 0.1	6.6 ± 0.4	16 ± 1

<sup>a</sup>Significantly different from control dogs (Dunnett's multiple comparison procedure).

Entries are ± mean standard error.

麻痺を示したことから、切迫屠殺(投与投与期間の第 8、18 および 19 週目)された雄 3 匹では、剖検の結果、小脳において、広範な空胞化、肥大、有糸分裂像を示す内皮細胞および限局的な神経膠症が認められ、また小脳および脳幹において、多少の血管周囲出血が認められた。高用量群の全てのイヌに生じた強調運動失調、歩行失調および麻痺は、おそらくこれらの病変によるものと考えられた。麻痺は、切迫屠殺に使用されたバルビタールが過剰量となり始めた際に治まった。

12 ヶ月の投与後には、高用量群の雌の肝臓における組織病変として、軽度の胆管過形成と色素沈着が認められた。1 ヶ月の回復期間が設けられた群については、低用量群の雌で、軽度の胆管過形成が認められ、中用量群および高用量群の雌では、色素沈着が肝臓(軽度)および腎臓(軽度~中等度)で認められた。

投与 24 ヶ月の時点における組織病理学的検査においても、被験物質に関連した病変が確認された。この時点で組織病理学的検査に供された高用量群のイヌは、雌 2 匹と雄 1 匹であった。高用量群のこれら 3 匹のイヌ全部と低用量群の雌 1 匹で、肝臓に軽度の胆管過形成および褐色の色素を有するクッパー細胞の集塊が認められた。胆嚢の上皮の嚢胞性過形成が、高用量群のイヌ全て(雌で軽度、雄で中等度)、中用量群の雄 1 匹(軽度)および対照群の雌 1 匹(軽度)で生じていた。胆嚢の上皮の褐色色素沈着が、高用量群の雌 2 匹および中用量群のイヌ 3 匹(雌 2 匹、雄 1 匹)で認められ、また腎臓における上皮の褐色色素沈着が、高用量群の雌 2 匹で認められた。過剰な色素は、高用量群の 2 匹(雄 1 匹および雌 1 匹)の脾臓でも検出された。これらの色素沈着は、メトヘモグロビン血症からの二次的影響により、鉄が蓄積したためと考えられる。2,4-DNT の投与を 2 年間受け、1 ヶ月の回復期間が設けられたイヌでは、被験物質に関連した病変は、2 年間の投与を受けて試験期間

が終了となったイヌにおいて見られたものと同様であった。腫瘍の発生は認められなかったが、これはおそらく投与期間が比較的短かったためと考えられる。

慢性毒性に関する NOAEL は、神経毒性(強調運動失調および麻痺)に基づいて、雌雄とも、0.2 mg/kg 体重/日とされた。

#### 4.1.2.6.2 ヒトにおけるデータ

Levine *et al.*, 1986

弾薬製造施設 2 ヶ所について、そこで DNT に曝露されながら 1 ヶ月以上働いていた男性 156 人のコホートおよび男性 301 人のコホートを対象に、1940～50 年代から 1980 年までの追跡調査が実施された。施設における精製 2,4-DNT は、少なくとも 98% の 2,4-DNT と約 1% の 2,6-DNT を含んでいた。米国の白人男性の死亡率を用い、予想死亡数に対する実際の死亡数の比を、標準化死亡比(SMR)として算出した。統計学的有意性は、自由度 1 の  $X^2$  解析により検討した。統計的検出力は、Beaumont and Breslow の方法で推算した。

米国の白人男性の死亡率を標準として用いた場合、推定死亡者数は 127 人であったが、2 つの施設を合わせると 164 人の死亡が確認された。全ての死因に関する両施設を合わせた SMR は 1.29 で有意に高く ( $p = 0.001$ )、調査の始めから 15 年経過後ではさらに高値を示した (SMR 1.4,  $p = 0.00007$ )。全ての死因を合わせた死亡率が上昇しているのは、循環器系の疾患による死亡 (87 例, SMR 1.40,  $p = 0.02$ )、ならびに不慮の事故、中毒および暴力による死亡 (28 例, SMR 1.91,  $p = 0.0007$ ) が増加していたことが大きな要因と考えられた。不慮の事故、中毒および暴力による死亡が増加していたのは、Radford の施設だけであった。これらの死亡例の全てが、施設での雇用を終えてから発生したものであった。全ての死因を合わせた死亡率 (Joiet の施設および Radford の施設でそれぞれ、SMR 1.25 および 1.33, 95% 信頼区間 0.85～1.77 および 1.09～1.54) および循環器系疾患による死亡率 (それぞれ、SMR 1.26 および 1.43, 95% 信頼区間 0.65～2.34 および 1.12～1.79) は、両施設において過剰であった。循環器系疾患による死亡が大幅な過剰を示しているのは、鬱血性心不全、心不全および動脈硬化症などの、虚血系心疾患 (64 例) および循環器系の後遺疾患 (13 例) が多く見られたためである。しかし、Joiet や Radford の施設の周囲で生涯のほとんどの間生活していた人々では、虚血性心不全による死亡率が、米国人全体における値よりも高値であった。地域の経験値を標準として用い、実際の死亡者数と推定死亡者数で計算を行っても、虚血性心疾患による死亡率は、両施設とも高い状態のままであった (Joiet および Radford でそれぞれ、SMR 1.33 および 1.38, 95% 信頼区間 0.53～2.75 および 0.96～1.93)。両施設を合わせた場合の SMR は 1.37 ( $p = 0.05$ ) であった。さらに、有意ではなく示唆的な所見であるが、

心疾患と曝露期間および曝露強度との間に関連性が認められた。働いていた人たちの曝露量が測定されていないため、全身に吸収された 2,4-DNT の用量に関する情報が得られていないことに留意する必要がある。

この調査からは、DNT の製造や処理に携わっていた労働者において心疾患による死亡率が過剰であったという結果が得られた。ただし、この試験の質は低い。

#### Stayner *et al.*, 1992

DNT に曝露された 4989 人の労働者と曝露されていない 5136 人の労働者を対象として、後向きコホート死亡率調査が実施され、DNT への曝露と心血管系疾患および虚血性心疾患 (IHD) による死亡率との間の関連性が調べられた。

調査対象の集団は、1949 年の 1 月 1 日から 1980 年の 1 月 21 日までに、Radford (米国バージニア州) にある米国陸軍軍需工場で 5 ヶ月以上働いていた、あるいは働いている白人の男性労働者で構成されていた。情報源は、当該工場、社会保障庁、米国国税庁、郵便局、運転免許・車両登録センターないしは州の人口統計局に雇われていた、全ての労働者の個人記録であった。1 回以上行われたそれぞれの業務について、DNT への曝露の可能性に関する評価を行い、調査対象集団を、おそらく DNT への曝露を受けたと考えられる労働者 ( $n = 4989$ ) とおそらく DNT へ曝露されていないと考えられる労働者 ( $n = 5136$ ) の 2 群に分別した。改良された生命表分析プログラムを用い、全米の白人男性における、原因別、5 歳ごとの群別、および暦でみた場合の 5 年ごとの群別の死亡率を掛け合わせ、推定死亡者数を算出した。標準化死亡比 (SMR) は、実際の死亡者数を推定死亡者数で除算することにより算出した。精密な統計学的 (両側) 検定とそれに関連する 95% 信頼区間 (95% CI) の算出は、ポワソン分布に基づいて行われた。標準化率比 (SRR) は、重み付け係数として、年齢と、調査対象集団全体における罹患患者数と年数の積の暦時間分布を用い、直接的に算出した。

曝露を受けていたコホート群では、脳血管系疾患での死亡は 36 例、虚血性心疾患での死亡は 253 例であったが、曝露を受けていなかったコホート群では、それぞれ 70 例および 423 例であった。したがって、脳血管系疾患ないしは虚血性心疾患での実際の死亡者数と推定死亡者数とには、米国人全体を参照群とした場合でも、非曝露群を参照群とした場合でも有意差は無かったことになる (脳血管系疾患および虚血性心疾患で  $SMR = 0.95$ 、 $SRR = 0.89$  および  $SMR = 0.98$ 、 $SRR = 0.99$ 。95% 信頼区間の情報は得られなかった)。また、年齢層で見ても、暦上の年月で見ても、虚血性心疾患または脳血管系疾患による死亡率には、一貫性のある傾向は認められなかった。曝露を受けていたコホート群と受けていなかったコホート群の両方とも、米国人全体と比較した場合、精神疾患や人格障害による死亡が過

剰という結果が得られたが、これは主としてアルコール依存症と暴力によるものであった。

DNT への曝露量の測定は行われなかった。したがって、曝露を受けた労働者における、多量の 2,4-DNT を吸収した人の割合は不明である。また、調査対象者の死因とは別の臨床データは得られておらず、そのため、彼らが 2,4-DNT への曝露に関連した有害影響を示していたかどうか不明である。したがって、リスク評価を行う上では、この調査の意義は小さい。

#### Jones *et al.*, 2005

過去に、DNT に曝露された労働者の健康状態が調査されている。調査において最も一般的であった主訴は、DNT がメトヘモグロビンを誘発する能力を有することに由来するものがほとんどであった。メトヘモグロビンは、二次的に頭痛、めまい、悪心、眠気など、非特異的な健康への影響を誘発した。この調査では、各従業員について、無気力、眠気、不眠、頭痛、めまい、悪心などの、DNT への曝露に結び付けられる健康への有害影響に関する検査を実施している。ロジスティック回帰分析を用いて、健康への影響とヘモグロビン付加体量との比較が行われた。無気力状態となるオッズは、4-アミノ-2-ニトロトルエンのヘモグロビン付加体の量が log 単位で 1 増加すると、3.2 倍増高した〔95%信頼区間(CI) = 1.8–5.8〕。同様のオッズ比(OR)が、眠気(3.1, CI = 1.4–6.9)、悪心(2.4, CI = 1.3–4.3)およびめまい(5.5, CI = 1.3–24.2)でも確認された。これらの結果から、DNT-ヘモグロビン付加体の定量は、毒性についての有効なバイオマーカーとなり、着目している DNT への曝露に関連したリスクを推定するのに用いることができることが示唆された。

#### 4.1.2.6.3 反復投与毒性の要約

##### ヒトにおけるデータ

DNT に曝露された労働者において最も一般的であった有害影響は、DNT がメトヘモグロビンを誘発する能力を有することに由来しており、メトヘモグロビンは、二次的に頭痛、めまい、悪心、眠気など、非特異的な健康への影響を誘発した(Jones *et al.*, 2005)。

ヒトを対象とした 2 件の調査では、DNT に曝露された労働者において、虚血性心疾患と循環器系の後遺疾患が多かったために、死亡率が過剰であったことが示されている。ただし、DNT への曝露量の測定は実施されていない。したがって、曝露を受けた労働者における、多量の 2,4-DNT を吸収した人の割合は不明であり、リスク評価を行う上では、これらの調査の意義は小さい。

## 動物試験

反復投与毒性の 4.1.2.6.1.動物試験の項で、亜急性毒性試験、亜慢性毒性試験および慢性毒性の欄で述べた知見に基づき、リスク評価を行う上で重要な数値が、ラット、マウスおよびイヌに関し、以下の様に得られている。

### 亜急性毒性試験

#### ラット

28 日間試験において脾臓で認められたヘモジデリン沈着に基づくと、LOAEL は、38 mg/kg 体重/日と考えられる (Table 4.1.2.6.3-1)。

#### マウス

4 週間試験で認められた軽度の精子形成障害に基づくと、NOAEL は、雄における 132 mg/kg 体重/日であると考えられる (Table 4.1.2.6.3-1)。

#### イヌ

雄の方が雌よりも、2,4-DNT の毒性に対する感受性が高かった。さらに、2,4-DNT による影響に対する感受性には、大きな個体差が認められた。4 週間試験で認められた網状赤血球の増加に基づくと、LOAEL は、1 mg/kg 体重/日であると考えられる (Table 4.1.2.6.3-1)。

### 亜慢性毒性試験

#### ラット

13 週間試験において認められた雄の肝臓におけるヘモジデリン沈着に基づくと、LOAEL は、34 mg/kg 体重/日であると考えられる (Table 4.1.2.6.3-2)。

#### マウス

13 週間試験で死亡例が認められたことに基づくと、NOAEL は、雄における 137 mg/kg 体重/日であると考えられる (Table 4.1.2.6.3-2)。



## イヌ

13 週間試験でメトヘモグロビンの増加が認められたことに基づくと、NOAEL は、1 mg/kg 体重/日であると考えられる。雄の方が雌よりも、2,4-DNT の毒性に対する感受性が高いことが示されている。さらに、2,4-DNT による影響に対する感受性には、大きな個体差が認められている (Table 4.1.2.6.3-2)。

亜急性試験および亜慢性試験においては、重要とされる影響は、被験物質により誘発される溶血性貧血であった。低酸素症の臨床症状、ヘモグロビンや赤血球の減少、メトヘモグロビンやハインツ小体および網状赤血球の増加、および脾臓でのヘモジデリン沈着が被験動物で認められたことから、2,4-DNT の毒性の標的臓器は、血液であると考えられた。長期試験においては、溶血性貧血に関連した影響も認められた。

すなわち、適応能力を超えたことを示す変化が認められており、したがって、溶血性貧血に由来する二次的影響は、リスク評価において重要であると考えられた。

亜急性および亜慢性毒性試験から得られた LOAEL 値および NOAEL 値に基づくと、ビーグル犬は、2,4-DNT の毒性に対して最も感受性が高い動物種であると思われた。したがって、亜慢性および亜急性毒性試験の両方に関して妥当と考えられる LOAEL は、イヌを用いた試験では 4 週間試験でも 13 週間試験でも大きな個体差が認められたことから、4 週間試験で網状赤血球の増加が認められたことに基づいて得られた 1 mg/kg 体重/日とされる。

## 慢性毒性試験

### ラット

ラットを用いた 24 ヶ月試験からは、リスクの総合評価に重要な影響として、肝臓における過形成病巣の出現および精細管の萎縮が表出した。肝病変に関しては、軽度の過形成病巣が、低用量で 12 ヶ月間投与を受けていた雄および低用量で 12 ヶ月間投与を受けた後回復期間を設けられた雄の両方で観察された (4/4 匹および 3/4 匹)。すなわち、低用量群の雄の 8 匹中 7 匹 (88%) に軽度の過形成性病変が認められており、これに対し対照群では疑わしい程度の病変が 7 匹中 2 匹 (29%以下) に認められた。さらに、それらの肝病変は、2,4-DNT の投与期間が長くなるとともに、また用量が多くなるとともに、腫瘍性結節や肝細胞がんに進展した。24 ヶ月の時点では、過形成病変の数や重症度には、対照群の雄と低用量群の雄との間で差異は認められなかった。12 ヶ月投与と 24 ヶ月投与の両方の結果に基づくと、肝臓における過形成病変は、対照群の雄よりも低用量群の雄で早くから顕著であり、当該病変は、2,4-DNT 投与に関連したものであると考えられる。精細管の萎縮は、高用量

を投与された雄では、回復期間が設けられなかった群でも設けられた群でも重度であったが、対照群では精巢にその様な病変は見られず、2,4-DNT 投与に関連したものと考えられた。所定の屠殺日時前に切迫屠殺した雄における精細管の萎縮の発生率および重症度は、既に低用量群から対照群の値よりも高かった (Table 4.1.2.6.1-5) [訳注: Table 4.1.2.6.1-9 と思われる]。すなわち、2,4-DNT の投与用量と精細管萎縮との間に、用量-反応関係が認められた。

さらに、12 ヶ月よりも長く低用量での投与を受けていた雄の群は、対照群と比べて、精細管萎縮の発生率が高かった (Table 4.1.2.6.1-6) [訳注: Table 4.1.2.6.1-10 と思われる]。

したがって、24 ヶ月試験で認められた肝臓における過形成病巣の発生率上昇および精細管萎縮に基づき、CD ラットの雄および雌における LOAEL は、それぞれ 0.57 mg/kg 体重/日および 0.71 mg/kg 体重/日であると考えられる (Table 4.1.2.6.3-3)。

## マウス

24 ヶ月試験で認められた腎臓(雄および雌)と肝臓(雄)の病変に基づき、CD-1 マウスの雄および雌における LOAEL は、13 mg/kg 体重/日であると考えられる (Table 4.1.2.6.3-3)。

## イヌ

24 ヶ月試験で認められた神経毒性(強調運動失調および麻痺)に基づくと、ビーグル犬の雄および雌における 2,4-DNT の NOAEL は、0.2 mg/kg 体重/日であると考えられる (Table 4.1.2.6.3-3)。

毒性試験から得られた LOAEL 値および NOAEL 値に基づくと、ビーグル犬およびラットは、2,4-DNT の毒性に対する感受性が高い動物種であると思われた。しかし、24 ヶ月までの投与期間で行われたラットでの試験の方が、イヌでの 24 ヶ月間試験よりも、反復投与毒性によるリスクの総合評価には、適切であると考えられた。したがって、ラットを用いた 24 ヶ月試験から、リスクの総合評価に重要な影響として、肝臓における過形成病巣の出現および精細管の萎縮が採り上げられる。

以上より、リスクの総合評価に適切と考えられる LOAEL は、ラットを用いた 24 ヶ月試験で得られた 0.57 mg/kg 体重/日である。

Table 4.1.2.6.3-1: Sub-acute toxicity studies

Species and sex	Protocol	Results and comments	References
♂, ♀ Sprague-Dawley rats	Groups of 5 rats/sex/dose were administered 0, 96, 125, 183 or 260 (♂) and 99, 124, 191 or 254 mg/kg b.w./day (♀) in the diet for 14 days. purity = 97%; contaminants 2% of 2,6-DNT and unspecified 1%	From 96(♂) and 99(♀) mg/kg b.w./day it was observed: ↓ b.w. with ↓ food consumption (♂,♀) ↑ Blood cholesterol (♂,♀) ↑ Blood alanine aminotransferase (♂) Hyaline droplet formation (♂, ♀) Oligospermia with degenerative changes in the testes (♂)	McGown <i>et al.</i> , 1983
♂, ♀ CD rats	Groups of 8 rats/sex/dose were fed diets containing 0, 38, 102 or 191 (♂) and 0, 38, 118 or 145 mg/kg b.w./day (♀) for 4 weeks over an 8-week observation period. Purity > 98%.	Mortality at 191(♂, 2/8) and 145(♀, 2/8) mg/kg b.w./day Neuromuscular toxicity at 191(♂) and 145(♀) mg/kg b.w./day ↓ b.w. with ↓ food consumption from 38 mg/kg b.w./day (♂,♀) ↓ erythrocyte with ↑ reticulocytes at 191(♂) mg/kg b.w./day at 8 weeks Haemosiderosis from 38 mg/kg b.w./day (♂,♀) Aspermatogenesis at 191 mg/kg b.w./day (♂) Tissue lesions were irreversible LOAEL = 38 mg/kg b.w./day	Lee <i>et al.</i> , 1978
♂, ♀ albino Swiss mice	Groups of 8 mice/sex/dose were fed 0, 46, 132 or 332 (♂) and 0, 53, 142 or 434 mg/kg b.w./day (♀) for 4 weeks over an 8-week observation period. Purity 98.5 – 99%	Mortality at 332(♂, 1/8) mg/kg b.w./day ↓ b.w. with ↓ food consumption at 332 (♂) and 434 (♀) mg/kg b.w./day Mild aspermatogenesis (reversible) at 332 (♂) mg/kg b.w./day NOAEL = 132 mg/kg b.w./day	Lee <i>et al.</i> , 1978
♂, ♀ beagle dogs	Groups of 2 dogs/sex/dose were treated with 0, 1, 5 or 25 mg/kg b.w./day (purity 98.5 - 99%) for 4 weeks over a 8-week observation period	At 25 mg/kg b.w./day it was observed: ↑ Mortality and ♂ more sensitive than ♀ Neuromuscular toxicity (♂, ♀) ↓ b.w. with ↓ food consumption at 25 mg/kg b.w./day (♂, ♀) ↓ erythrocyte and ↓ haemoglobin with ↑ reticulocytes and ↑ Heinz bodies (♂, ♀) Haematological effects were reversible Aspermatogenesis ↑ reticulocytes from 1 mg/kg b.w./day LOAEL = 1 mg/kg b.w./day	Lee <i>et al.</i> , 1978

↑,↓ Either increase or decrease statistically significant when compared with controls (p < 0.05).

Table 4.1.2.6.3-2: Sub-chronic studies

Species and sex	Protocol	Results and comments	References
♂, ♀ CD rats	Groups of 8 rats/sex/dose were fed diets containing to 0, 34, 93 or 266 (♂) and 0, 38, 108 or 145 mg/kg b.w./day (♀) for 13 weeks over a 17-week observation period. Purity > 98%	<p>↑ Mortality with ↑ interindividual susceptibility and ♀ more sensitive than ♂ at 266(♂, 6/8) and 145(♀, 8/8) mg/kg b.w./day. One ♂ died at 93 mg/kg b.w./day (week 15)</p> <p>Neuromuscular toxicity at 266(♂) and 145(♀) mg/kg b.w./day</p> <p>↓ b.w. with ↓ food consumption from 34(♂) and 38(♀) mg/kg b.w./day</p> <p>↓ erythrocyte and ↓ haemoglobin with ↑ reticulocytes at 266(♂) mg/kg b.w./day and ↑ reticulocytes at 93 (♂) mg/kg b.w./day</p> <p>Haematological effects were reversible</p> <p>Haemosiderosis from 34 (♂)mg/kg b.w./day</p> <p>Gliososis and demyelination from 93 (♂)mg/kg b.w./day</p> <p>↓ spermatogenesis from 93 (♂) mg/kg b.w./day</p> <p>Aspermatogenesis at 266 (♂) mg/kg b.w./day</p> <p>The tissue lesions were irreversible</p> <p>LOAEL = 34 mg/kg b.w./day</p>	Lee <i>et al.</i> , 1978, 1985
♂ Wistar rats	One group of 20 rats was fed 207 mg/kg b.w./day in the diet for 6 months and another group of 23 rats was fed standard diet Pure 2,4-DNT	<p>↑ Mortality (12/20 vs. 1/23 in controls) Neuromuscular toxicity</p> <p>↓ b.w.</p> <p>↑ methaemoglobin</p> <p>Altered biochemical parameters: triglyceride, blood glucose, albumin, A/G ratio, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, alkaline P-ase, acid P-ase and <i>p</i>-nitrobenzoic acid reductase</p> <p>Aspermatogenesis</p>	Kozuka <i>et al.</i> , 1979
♂, ♀ albino Swiss mice	Groups of 8 mice/sex/dose were fed 0, 47, 137 or 413 (♂) and 0, 52, 147 or 468 mg/kg b.w./day (♀) for 13 weeks over a 17-week observation period. Purity 98.5 - 99%	<p>Treatment-related mortality at 413 (♂, 2/8) and 468 (♀, 1/8) mg/kg b.w./day</p> <p>↓ b.w. with ↓ food consumption at 413 (♂) and 468 (♀) mg/kg b.w./day</p> <p>↓ haemoglobin (♂, ♀) with ↑ reticulocytes(♂) at 413 (♂) and 468 (♀) mg/kg b.w./day</p> <p>Haematological effects were reversible</p> <p>NOAEL = 137 mg/kg b.w./day</p>	Lee <i>et al.</i> , 1978, Hong <i>et al.</i> , 1985

Species and sex	Protocol	Results and comments	References
♂, ♀ beagle dogs	Groups of 2 dogs/sex/dose were treated with 0, 1, 5 or 25 mg/kg b.w./day for 13 weeks over a 17-week observation period Purity 98.5% - 99%	At 25 mg/kg b.w./day it was observed: ↑ Mortality with ↑ interindividual susceptibility at 25 mg/kg b.w./day and ♂ more sensitive than ♀ ↓ b.w. with ↓ food consumption at 25 mg/kg b.w./day (♂, ♀) Neuromuscular toxicity at 25 mg/kg b.w./day (♂, ♀) ↑ Methaemoglobin from 5 mg/kg b.w./day and ↓ haemoglobin with Heinz bodies at 25 mg/kg b.w./day (♂, ♀) Haematological effects were reversible Aspermatogenesis at 25 mg/kg b.w./day (♂) Mild cerebellar demyelination, gliosis and oedema (♂) and mild demyelination in both the cerebrum and optic nerve (♀) at 25 mg/kg b.w./day Tissue lesions were irreversible NOAEL = 1 mg/kg b.w./day	Lee <i>et al.</i> , 1978 Ellis <i>et al.</i> , 1985

↑, ↓ Either increase or decrease statistically significant when compared with controls (p < 0.05).

Table 4.1.2.6.3-3: Chronic toxicity studies

Species and sex	Protocol	Results and comments	References
♂, ♀ CD rats	38 rats/sex/dose were fed diets containing to 0, 0.57, 3.9 or 34 (♂) and 0, 0.71, 5.1 or 45 mg/kg b.w./day (♀) for either 12 months (4 rats/sex/dose) over a 13-month observation period (4 rats/sex/dose), or 24 months (26 rats/sex/dose) over a 25-month observation period (4 rats/sex/dose). Purity > 98%. A few extra rodents were added to replace early losses (no further details available)	<p>↓ survival vs. controls at 34 (♂) and 45(♀) mg/kg b.w./day  ↓ terminal body weight at 34 (♂) and 45(♀) mg/kg b.w./day  Neuromuscular toxicity (straddling gait, ♂, ♀) at 34 (♂) and 45(♀) mg/kg b.w./day</p> <p>↓ erythrocytes from 3.9(♂) mg/kg b.w./day for 12 months  ↓ erythrocytes (♂, ♀) and ↓ haemoglobin (♂) at 34 (♂) and 45(♀) mg/kg b.w./day for 12 months  ↓ erythrocytes and ↓ haemoglobin with ↑ reticulocytes at 34 (♂) and 45(♀) mg/kg b.w./day for 18 months  ~↑ reticulocytes (♂, 4.85% vs. 0.72% in controls and ♀, 3.02% vs. 1.34% in controls), at 3.9(♂) and 5.1(♀) mg/kg b.w./day for 24 months  Haematological effects were reversible.</p> <p>Hyperplastic foci in the liver from 0.57(♂)mg/kg b.w./day for 12 months  Severe hyperplastic foci in the liver at 34 (♂) and 45(♀) mg/kg b.w./day from 12 months  Severe atrophy of seminiferous tubules in testes at 34(♂) mg/kg b.w./day for 12 months.  Dose-response relationship for atrophy of testes (♂) and 2,4-DNT for more than 12 months (16%, 29%, 33% and 86% for 0, 0.57, 3.9 or 34 mg/kg b.w./day, respectively)  Excessive pigmentation in the spleen at 34(♂) and 45(♀) mg/kg b.w./day for 12 months  Tissue lesions were irreversible  LOAEL = 0.57(♂) and 0.71(♀) mg/kg b.w./day</p>	Lee <i>et al.</i> , 1985, Ellis <i>et al.</i> , 1979

Species and sex	Protocol	Results and comments	References
♂, ♀ CD-1 mice	Groups of 58 mice/sex/dose were treated with 0, 13.3, 96.9 and 885(♂), and 0, 13.7, 93.8, and 911(♀) mg/kg b.w./day for either 12 months (4 mice/sex/dose) over a 13-month observation period (4 mice/sex/dose), or 24 months (46 mice/sex/dose) over a 25-month observation period (4 mice/sex/dose). Purity > 98%. A few extra rodents were added to replace early losses (no further details available)	<p>↓ survival when compared with controls (<math>p &lt; 0.05</math>) at 885(♂) and 911(♀)mg/kg b.w./day for 24 months</p> <p>↓ b.w. when compared with controls (<math>p &lt; 0.05</math>) at 885(♂) and 911(♀) mg/kg b.w./day for 24 months</p> <p>Neuromuscular toxicity at 885(♂) and 911(♀) mg/kg b.w./day</p> <p>↑ Heinz bodies, reticulocytes and met haemoglobin (<math>p &lt; 0.05</math>) at 885(♂) and 911(♀) mg/kg b.w./day for 12 months</p> <p>↑ Heinz bodies at 96.9 (♂) and 93.8 (♀) mg/kg b.w./day for 12 months and allowed to recover 1 month</p> <p>After the 1-month recovery period, mice partially recovered from the anaemia</p> <p>♂ were more affected than ♀</p> <p>Hepatocellular dysplasia from 13.3(♂) and 911(♀) mg/kg b.w./day for more than 12 months</p> <p>Toxic nephropathy from 13.3(♂) and 13.7(♀) mg/kg b.w./day for more than 12 months</p> <p>Testicular atrophy from 96.9(♂) mg/kg b.w./day</p> <p>Non-functional follicles at 911(♀) mg/kg b.w./day</p> <p>Generalized abnormal pigmentation from 13.3(♂) and 13.7(♀) mg/kg b.w./day for more than 12 months</p> <p>Tissue lesions were irreversible</p> <p>LOAEL = 13.3(♂) and 13.7(♀) mg/kg b.w./day</p>	Ellis <i>et al.</i> , 1979; Hong <i>et al.</i> , 1985

Species and sex	Protocol	Results and comments	References
♂, ♀ Beagle dogs	Groups of 6 dogs/sex/dose were treated with 0, 0.2, 1.5 or 10 mg/Kg b.w./day in hard capsules for either 12 months (1dog/sex/dose) over a 13-month observation period (1dog/sex/dose), or 24 months 2dogs/sex/dose) over a 25-month observation period (2dogs/sex/dose) Purity 98% 2,4-DNT and 2% 2,6-DNT	<p>↓ survival at 10(♂) mg/kg b.w./day  ↑ interindividual susceptibility  ♂ were more affected than ♀  Neurotoxic symptoms (incoordination and paralysis) from 1.5(♂, week 66) and at 10(♂,♀ after weeks 8 to 22) mg/kg b.w./day  ↑ reticulocytes and ↑ Heinz bodies at 10 mg/kg b.w./day (♂,♀) for 12 months  ↓ erythrocytes and ↓ haemoglobin from 1.5(♀)mg/kg b.w./day for 12 months  Haematological toxic effects were reversible  Vacuolization, hypertrophy, endothelial mitosis, and focal gliosis in the cerebellum at 10(♂) mg/kg b.w./day  Perivascular haemorrhage in the cerebellum and brain stem at 10(♂) mg/kg b.w./day  Bile duct hyperplasia and pigment deposits in the liver at 10(♀) mg/kg b.w./day for 12 months  After 24-month exposure period:  The high-dose group at 24th month comprised 2 ♀ and 1 ♂  Bile duct hyperplasia and clusters of brown pigment-laden Kupffer cells in the liver at 10 (♂,♀) mg/kg b.w./day (3/3)  NOAEL = 0.2 mg/kg b.w./day</p>	Hong <i>et al.</i> , 1985 Ellis <i>et al.</i> , 1979

↑,↓ Either increase or decrease statistically significant when compared with controls ( $p < 0.05$ ); ~↑, no significant increase



#### 4.1.2.7 変異原性

2,4-DNT の遺伝毒性については、*in vitro* 試験および *in vivo* 試験からいくつもデータが得られており、それらの試験のほとんどが、現行のガイドラインに準拠して実施されている。研究目的で実施された試験もあり、それらにおいては、試験プロトコルが OECD ガイドラインに沿うようにデザインされていない。いずれにしても、ここに示すデータは、専門家による査読が実施されている雑誌に発表された試験から得られたものか、もしくは本書の目的にかなうと判断された試験から得られたものである。したがって、それらのデータは、リスク評価の目的に適合していると判断される。

様々な論文をコメント付きで表にまとめて記載し、最後に全体的な評価を記述した。さらに、2,4-DNT 代謝産物を用いて実施された遺伝毒性試験も、それらの記載に含めて評価した。

##### 4.1.2.7.1 *In vitro* 試験

###### 2,4-DNT を被験物質とした細菌を用いた試験

Table 4.1.2.7.1-1 に概要を示した。

###### **遺伝子突然変異**

Cotruvo *et al.* (1977) は、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の TA98、TA100、TA1535、TA1536、TA1537 および TA1538 株を用いて、水の中でオゾン酸化を行う前と行った後における 2,4-DNT の変異原性を調べている。試験は、懸濁法およびプレート法により、代謝活性系(ラット肝ホモジネート)の存在下および非存在下で実施された。2,4-DNT とオゾンの反応は短時間(20 分間)であったが、ガスクロマトグラフィーの結果からは、新規の生成物は検出されなかった。最高濃度(0.08 µg/plate)の場合でも、2,4-DNT は、オゾン酸化の前および後の両方において、変異原性を示すことはなかった。

Ellis *et al.* (1978) は、ネズミチフス菌 TA1535、TA1537、TA98 および TA100 株を用いて、Ames のプレート法による試験を行い、2,4-DNT の変異原性を判定した。試験は、2,4-DNT (純度 98% 以上)の濃度を 10、30、100、300 ないしは 1000 µg/plate とし、代謝活性系の存在下および非存在下で実施された。2,4-DNT は、TA1538 株において、代謝活性系の存在下(1000 µg/plate)および非存在下(10 µg/plate)の両方で変異原性を示し、TA100 株においては、代謝活性系が無しの場合に、300 µg/plate 以上の濃度で変異原性を示した。細胞毒性は、TA1537 株および TA1538 株において、代謝活性系無しの場合に、1000 µg/plate の濃度で認

められた。

Couch *et al.* (1981)は、DMSO に溶解された 2,4-DNT(純度 99.98%以上)の変異原性を、ネズミチフス菌を用いた 3 種類の試験により検討した。1 つ目は、TA1535、TA1537、TA1538、TA98 および TA100 株を用いた Ames テストであった(Ames *et al.* 1975 に記載のプレート法)。2 つ目は、TA1538 および TA98 株を用いた定量的復帰突然変異試験であった(Skopek *et al.*, 1978 に記載の懸濁法)。3 つ目は、TM677 株を用い、8-アザグアニンに対する抵抗性をマーカーとして行われた前進突然変異試験であった(Skopek *et al.*, 1978 に記載の懸濁法)。いずれの試験においても、アロクロール処置を施した雄の F-344 ラットの肝臓から得られた S9 が用いられた。Ames テストでは、TA98 および TA1538 株において、plate 当たりの復帰突然変異株の数が、2,4-DNT の濃度に依存的に増加した。ただし、データが報告されているのは、細胞毒性が示されなかった最も高濃度(200 µg/plate)の場合についてだけである。また、S9 存在下では、変異原性は認められなかった。懸濁法を用いた試験では、細胞毒性に関し、生残細胞数が溶媒対照の 10%未満であった場合の濃度や処置が報告されていない。定量的復帰突然変異試験では、いずれの菌株でも、50、100、250 および 500 µg/mL での 2,4-DNT 処置により、S9 存在下および非存在下で、突然変異体画分の増加が濃度依存的に認められた。ただし、懸濁法によるこの試験では、2,4-DNT の変異原性に対する感受性が最も高かったのは TA98 株であったため、この菌株で得られた結果しか示されていない。2,4-DNT はまた、S9 の存在下および非存在下において、TM677 株の 8-アザグアニン抵抗細胞画分を、濃度依存的に増加させた。ただし、データが報告されているのは 500 µg/mL の濃度についてのみである。

Tokiwa *et al.* (1981)は、ネズミチフス菌 TA1535、TA1537、TA1538、TA98 および TA100 株を用いて、Ames テスト(Ames *et al.*, 1975 に記載のプレート法)を行い、2,4-DNT の変異原性を調べた。S9 は、アロクロール 1254 で処置したラットの肝臓から調製した。2,4-DNT は、TA1535 株に対しては変異原性を示さなかったが、残りの菌株に対しては変異原性を示した。しかし、TA100 および TA98 株についてのデータしか示されていない。変異原活性は、プレートに撒かれた 2,4-DNT の単位重量(µg)当たりの復帰変異体の数で表されていた。TA100 および TA98 株での結果に基づいて、2,4-DNT は弱い変異原性物質であると判断される(TA100 では、S9 の存在下において 500 µg で、非存在下において 1000 µg で変異原性が認められた。また TA98 では、S9 の非存在下において 500 µg で変異原性が認められた)。

Mori *et al.* (1982)は、代謝活性系の非存在下で、ネズミチフス菌の TA98 および TA100 株を用いて Ames テスト(Ames, Lee and Durston, 1973 に記載のプレート法)を行い、2,4-DNT(純度 99%超)の変異原性を調べている。2,4-DNT の濃度は、100、200 および 300 µg/plate であった。溶媒対照は、DMSO であった。陽性対照は、2-ニトロフルオレン(2NF)および 4-ニ

トロキノリン 1-オキシド(4NQO)であった。2,4-DNT は、両方の菌株において、plate 当たりの復帰変異体数を濃度依存的に増加させたが、それらの増加は、自然に復帰変異する数の 3 倍未満に過ぎなかった。したがって、2,4-DNT は弱い変異原性物質であると判断された。

Spanggord *et al.*(1982)は、ネズミチフス菌 TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100 および TA100NR3(ニトロ還元酵素欠損)株を用いて、Ames テスト(Ames *et al.*, 1975 に記載のプレート法)を行い、2,4-DNT の変異原性を調べた。S9 は、アロクロール 1254 で処置した Sprague-Dawley ラットの肝臓から調製した。陰性対照および陽性対照も同時に供試された。2,4-DNT の濃度は 10~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の範囲で、少なくとも 5 段階設定された。2,4-DNT は、TA100 株に対し S9 非存在下で、TA100NR3 株に対し S9 存在下で変異原性を示した。変異誘発能(TA100 株における 2,4-DNT 1  $\mu\text{g}$  当たりの突然復帰体数)は、0.28 であった。

Yahagi *et al.*(1975)に記載のプレインキュベーション法を用いて、2,4-DNT(純度 99%)の変異原性を調べる Ames テストが実施されている。ネズミチフス菌の TA1535、TA1537、TA98 および TA100 株が用いられた。肝 S9 は、アロクロール 1254 による誘導処置を受けた雄の Sprague-Dawley ラットおよび Syrian ハムスターから調製した。2,4-DNT は、いずれの菌株についても、3、100、333、1000 および 3333  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の濃度で、S9 の存在下および非存在下で試験された。同時に、溶媒(DMSO)対照および陽性対照も、全ての菌株について S9 の存在下および非存在下で試験された。1 設定濃度につき 3 枚のプレートが用いられ、最初の試行が終了してから 1 週間以上空けて試行を繰り返した。試験結果は Haworth *et al.*(1983)により報告されている。TA100 株において、plate 当たりの復帰変異株の数が濃度依存的に増加した(ラットもしくはハムスターの S9 の存在下および非存在下)ため、2,4-DNT は変異原性物質であると考えられた。試験における最高濃度(3333  $\mu\text{g}/\text{plate}$ )では、どの菌株に対しても細胞毒性が示された。

Dunkel *et al.*(1985)は、4 カ所の試験施設で Ames *et al.*(1975)に記載のプレート法を用いて実施された、2,4-DNT(純度 99%超)の変異原性試験について報告している。ネズミチフス菌の TA98、TA100、TA1537 および TA1538 株、ならびに大腸菌(*Escherichia coli*)の WP2 *uvrA* 株が用いられた。肝 S9 は、誘導処置を受けていない、あるいはアロクロール 1254 による誘導処置を受けた雄の Fischer 344 ラット、B6C3F1 マウスおよび Syrian ハムスターから調製した。いずれの試験施設においても、2,4-DNT の濃度範囲は 0.3~10000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で、菌株と代謝活性系の各組み合わせにつき、少なくとも 6 段階の濃度が設定された。各設定濃度につき、3 枚のプレートが用いられ、陽性対照物質および陰性対照物質についても同時に試験が行われた。2,4-DNT は、大腸菌には変異原性を示さなかったが、ネズミチフス菌に対しては変異原性を示した(TA100、TA98 および TA1538 株)。2,4-DNT の TA100 株に対する変異原性は、全ての試験施設で、また、全ての代謝活性系の組み合わせで確認され

た。2,4-DNT の TA98 株に対する変異原性は、2つの試験施設において、ほぼ全ての代謝活性系の組み合わせ(ハムスターS9 存在下を除く)で確認された。さらに、1つの試験施設では S9 非存在下で、別の試験施設ではマウスの S9 存在下で、TA1538 において陽性が示された。細胞毒性は、いずれの試験施設においても、最高濃度から数えて 1 段階以上の濃度で認められた。

Mori *et al.*(1985b)は、は、ネズミチフス菌 TA98 および TA100 株を用いて、Ames テスト (Ames, McCann and Yamasaki, 1975 に記載のプレート法)を行い、2,4-DNT(99%を超える純度)の変異原性を調べた。肝 S9 は、フェノバルビタールナトリウム(PB)および 5,6-ベンゾフラボン(BF)で前処置した雄の Sprague-Dawley ラットから調製した。溶媒対照は DMSO であった。陽性対照は、2NF、4NQO およびベンツピレン(BP)であった。2,4-DNT の濃度は、250、500、750、1000、1250 および 1500  $\mu\text{g}/\text{plate}$  であった。2,4-DNT は、S9 の存在下および非存在下で、両方の菌株に対して変異原性を示した。両方の菌株とも、S9 が存在した場合、突然変異反応が増高した。しかし、TA98 においても TA100 においても、プレート当たりの復帰変異数は自然に誘発される数の 3 倍に満たなかったことから、2,4-DNT は弱い変異原性しか示さないと思われた。細胞毒性は、どちらの菌株の場合も、1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上で認められた。

Furukawa, Kawai and Kawai(1985)は、ネズミチフス菌の TA98 株を用い、Yahagi が示したプレインキュベーション法により、代謝活性系の非存在下で試験を行い、2,4-DNT の変異原性を判定した。2,4-DNT は、0.02、0.2、2、20 ないしは 200  $\mu\text{g}/\text{plate}$  での試験において、変異原性を示さなかった。

Ashby(1986)は、独立して行われた 2 件の変異原性試験の結果を報告している。いずれにおいても純粋な 2,4-DNT が用いられ、ネズミチフス菌 TA100 株に対する変異原性が調べられた。1 件目の試験は、溶媒はアセトンで、2,4-DNT の濃度は 8、40、200、100 ないしは 500  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で、詳細不明な代謝活性系(S9)の存在下および非存在下で実施された。2 件目の試験は、溶媒は DMSO で、2,4-DNT の濃度は 100、200、500、1000、2000 ないしは 4000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で、S9 は非存在下で実施された。2,4-DNT は、両方の試験において、S9 の存在下もしくは非存在下のいずれかで変異原性を示した。細胞毒性は最高濃度において認められた(1 件目の試験では 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、2 件目の試験では 1000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上)。

Kawai *et al.*(1987)は、プレインキュベーション法により、S9 の存在下および非存在下で、ネズミチフス菌 TA100 および TA98 株に対する 2,4-DNT の変異原性を調べた。2,4-DNT は、S9 の存在下または非存在下のいずれかで、TA100 株に対して弱い変異原性を示した。細胞毒性は、2500  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で認められた。

Dellarco and Prival(1989)は、異なる 3 つの手法を用いて、ネズミチフス菌(TA98 および TA100 株)における 2,4-DNT(純度 97%)の変異原性を評価した。1 つ目は、ラットの S9 を用いた標準的なプレート法によるもの、2 つ目は、ハムスターもしくはラットの S9 の存在下で行われ、フラビンモノヌクレオチド(FMN)が加えられた改良プレインキュベーション法によるもの、3 つ目は、ハムスターS9 の存在下で行われたが、FMN は加えないプレインキュベーション法によるものであった。いずれの手法においても、陰性対照および陽性対照が同時に供試された。*p*-ジオキサンを溶媒として用い、2,4-DNT の濃度を 0.1、0.3、1 ないしは 3  $\mu\text{moles/plate}$  として試験が行われた。S9 は、アロクロール 1254 で誘導処置を受けたハムスターまたはラットの肝臓から調製した。2,4-DNT は、改良プレインキュベーション法の場合、ハムスターS9 の存在下で FMN に依存性の明確な変異原性を、TA98 株に対して示したが、TA100 株に対しては示さなかった。この結果から、2,4-DNT の変異原性を最も良く検出するには、細胞外でのニトロ基還元が必要であることが示唆される。

Einistö *et al.*(1991)は 4~5 段階の濃度設定で、2,4-DNT の変異原性を、代謝活性系非存在下でプレインキュベーション法により評価した。サルモネラ菌の TA98、TA98NR(ニトロ還元酵素欠損)、TA98/1.8-DNP<sub>6</sub>(*O*-アセチルトランスフェラーゼ欠損)、YG1021(ニトロ還元酵素過剰産生)および YG1024(*O*-アセチルトランスフェラーゼ過剰産生)株が用いられた。2,4-DNT の変異原性を検出する感度が最も高いのは、ニトロ還元酵素過剰産生株で、その次に高いのは、*O*-アセチルトランスフェラーゼ過剰産生株と考えられた。ニトロ還元酵素欠損株と *O*-アセチルトランスフェラーゼ欠損株はいずれも、TA98 株と比べて感受性が低かった。

Sayama *et al.*(1998)は、は、ネズミチフス菌 TA98、TA100、YG1021、YG1024、YG1026、YG1029、YG1041 および YG1042 株を用いて、Ames テスト(Ames, McCann and Yamasaki, 1975 に記載のプレート法)を行い、2,4-DNT(99%を超える純度)の変異原性を調べた。溶媒として DMSO を用い、2,4-DNT の濃度は 5~7 段階(0~5  $\mu\text{mole}$ )として、S9 の非存在下で試験が行われた。YG1021、YG1024 および YG1041 株は TA98 株から、YG1026、YG1029 および YG1042 株は TA100 株から作られた菌株である。これらの菌株は、ニトロ還元酵素および *O*-アセチルトランスフェラーゼのいずれかの活性が高いか(前者 YG1021 および YG1026、後者 YG1024 および YG1029)、あるいは両方の活性が高い(YG1041 および YG1042)。2,4-DNT は、TA98 に対しては変異原性を示さなかったが、残りの菌株 YG1021(復帰変異体数 125 個/ $\mu\text{mol}$ )、YG1024(759 個/ $\mu\text{mol}$ )、YG1041(3657 個/ $\mu\text{mol}$ )、TA100(234 個/ $\mu\text{mol}$ )、YG1026(230 個/ $\mu\text{mol}$ )、YG1029(920 個/ $\mu\text{mol}$ )および YG1042(6439 個/ $\mu\text{mol}$ )に対しては、変異原性を示した。YG1041 および YG1042 株で最も強い変異原活性が見られており、2,4-DNT がその変異原性を発揮するには、高水準のニトロ還元酵素活性および *O*-アセチルトランスフェラーゼ活性が必要であることが示唆される。

## DNA 損傷

Nakamura *et al.* (1987)は、ネズミチフス菌 TA1535/pSK1002 株の *umu* 遺伝子発現( $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が背景レベルの 2 倍以上となることに基づく)を 2,4-DNT が誘発する能力について、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンで前処理したラットの肝臓から得られた S9 の存在下および非存在下で検討した。この試験は、Oda *et al.* (1985)に記載されたアッセイ法に準拠して行われた。溶媒として DMSO が用いられたが、2,4-DNT は、最高濃度(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )でも、この *umu* テストにおいて遺伝毒性を示さなかった。

Oda *et al.* (1992)は、様々な種類の変異原性ニトロアレン化合物(2,4-DNT を含む)の遺伝毒性活性を検出するために、*umu* テスト用の新しい試験株(ネズミチフス菌 NM1011 株, ニトロ還元酵素活性が高い)を開発した。この菌株を用いて、Oda *et al.* (1985)に記載されたアッセイ法に準拠した試験が行われた。得られた結果を、ネズミチフス菌 TA1535/pSK1002 株または NM1000 株(ニトロ還元酵素欠損株)で得られた結果と比較した。試験では、2,4-DNT の濃度は 6.25、12.5、25 ないしは 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で、代謝活性系は用いられなかった。2,4-DNT による *umuC* 遺伝子発現の誘発は、NM1011 株では TA1535/pSK1002 株の 2.63 倍であった。2,4-DNT は、NM1000 株では、*umuC* 遺伝子発現を誘発しなかった。

Oda *et al.* (1993)は、様々な種類の変異原性ニトロアレン化合物(2,4-DNT を含む)の遺伝毒性活性を検出するために、*umu* テスト用の新しい試験株を開発した。その菌株は、ネズミチフス菌 NM3009 株で、高い *O*-アセチルトランスフェラーゼ(OAT)活性と高いニトロ還元酵素(NR)活性を有する。この菌株を用いて、Oda *et al.* (1985, 1992)に記載された手法に準拠した試験が行われた。NM3009 の感度を、親株の TA1535/pSK1002 株、NR を過剰発現する NM1011 株、NR が欠損している NM1000 株、OAT を過剰発現する NM2009 株および OAT が欠損している NM2000 株の感度と比較した。2,4-DNT による *umuC* 遺伝子発現誘発に対する感度は、NM3009 > NM2009 > NM1011 > TA1535/pSK1002 > NM2000 の順であった。2,4-DNT は、NM1000 株においては *umuC* 遺伝子発現を誘発しなかった。

Öztürk and Durusoy(1999)は、2,4-DNT の遺伝毒性を、*umu* テストおよび標準 SOS クロモテストを行って検討した。*umu* テストは、ネズミチフス菌の NM2009 および NM3009 株を用い、Oda *et al.* (1993)に記載の手法に準拠して実施された。SOS クロモテストは、Quillardet and Hofnung(1985)が推奨する方法に従い、大腸菌の PQ37 株を用いて、S9 の存在下および非存在下で実施された。S9 は、メチルコラントレン(MC)およびフェノバルビタール(PB)で前処置した雄の Sprague-Dawley ラットの肝臓から調製した。2,4-DNT (95%を超える純度)を DMSO に溶解し、SOS クロモテストでは濃度を 0.1、1、10 ないしは 100  $\mu\text{g}/\text{アッセイ}$  とし、*umu* テストでは濃度を 0.1、1、2.5、10、12.5、25 ないしは 100  $\mu\text{g}/\text{アッセイ}$  とした。2,4-DNT は、NM3009 株では弱い陽性を示したが、NM2009 株では陰性であった。ま

## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

た、SOS クロモテストにおいても陰性を示した。どちらのテストにおいても、最高濃度では、細胞毒性が認められた。

Table 4.1.2.7.1-1: Bacterial genotoxicity studies with 2,4-DNT

Test	System	Dosage	Results	Comments	Reference
Reverse mutation (suspension and plate incorporation method, $\pm$ S9)	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1536, TA1537, TA1538 S9 from rat liver.	Up to 0.08 $\mu$ g/plate	Negative	Purity not given. 2,4-DNT tested before and after ozonation. No detailed information.	Cotruvo, 1977
Reverse mutation (plate incorporation method, $\pm$ S9)	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100. S9 from rat liver	10, 30, 100, 300, 1000 $\mu$ g/plate	Positive in both TA100 ( $\pm$ S9) and TA1538 ( $\pm$ S9). $\downarrow$ mutagenicity to TA1538 (+S9)	$\geq$ 98% purity Cytotoxicity at 1000 $\mu$ g/plate in both TA1537 and TA1538 (-S9).	Ellis <i>et al.</i> , 1978
Reverse mutation (plate incorporation method, $\pm$ S9)	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100. S9 from liver of Arochlor-induced male F-344 rats.	Up to 200 $\mu$ g/plate	Positive in both TA98 (-S9) and TA1538 (-S9)	$\geq$ 99.98% purity. No cytotoxicity	Couch <i>et al.</i> , 1981
Quantitative reverse mutation (suspension method, $\pm$ S9)	<i>S. typhimurium</i> TA1538, TA98. S9 from liver of Arochlor-induced male F-344 rats.	50, 100, 250, 500 $\mu$ g/mL	Positive in both TA98 ( $\pm$ S9) and TA1538 ( $\pm$ S9). TA98 (the most sensitive strain)	$\geq$ 99.98% purity. Survival $\leq$ 10% at higher than 500 $\mu$ g/mL	
Forward mutation (suspension method, $\pm$ S9)	<i>S. typhimurium</i> TM677. S9 from liver of Arochlor-induced male F-344 rats.	Up to 500 $\mu$ g/mL	Positive in TM677 ( $\pm$ S9)	$\geq$ 99.98% purity Survival $\leq$ 10% at higher than 500 $\mu$ g/mL	
Reverse mutation (plate incorporation method, $\pm$ S9)	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1536, TA1537, TA1538, TA98, TA100. S9 from liver of Arochlor-induced rats.	Unspecified	Weak positive in TA100 ( $\pm$ S9) and TA98 (-S9). Positive also in TA1536, TA1537 and TA1538 (data not shown).	Purity not given. Mutagenicity at 500 $\mu$ g/plate in TA98; at 1000 $\mu$ g/plate (-S9) or at 500 $\mu$ g/plate (+S9) in TA100.	Tokiwa <i>et al.</i> , 1981
Reverse mutation (plate incorporation method, -S9)	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100	100, 200, 300 $\mu$ g/plate	Weak positive in both TA98 and TA100	> 99% purity No data on cytotoxicity	Mori <i>et al.</i> , 1982

## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

Test	System	Dosage	Results	Comments	Reference
Reverse mutation (plate incorporation method, $\pm$ S9)	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100, TA100NR3 S9 from liver of Arochlor-induced Sprague-Dawley rats	10-5000 $\mu$ g/plate	Positive in TA100 (-S9) and TA100NR3 (+S9)	Purity not given TA100NR3 is NR-deficient	Spanggord <i>et al.</i> , 1982
Reverse mutation (preincubation method, $\pm$ S9)	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA98, TA100. S9 from liver of Arochlor-induced male Sprague-Dawley rats and Syrian hamsters	33, 100, 333, 1000, 3333 $\mu$ g/plate	Positive in TA100 ( $\pm$ S9 from rat or hamster)	99% purity Cytotoxicity at 3333 $\mu$ g/plate in all strains.	Haworth <i>et al.</i> , 1983
Reverse mutation (plate incorporation method, $\pm$ S9)	<i>S. typhimurium</i> TA1537, TA1538, TA98, TA100. <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> S9 from liver of either untreated or Arochlor-treated male Fischer 344 rats, B6C3F1 mice and Syrian hamster	Four laboratories tested the following concentration range 62.5-2000 $\mu$ g/plate 0.3-10000 $\mu$ g/plate 10-3333.3 $\mu$ g/plate 10-6666 $\mu$ g/plate	Positive in TA100 ( $\pm$ S9 from rat, mouse and hamster), TA98 ( $\pm$ S9 from rat and mouse) and TA1538 ( $\pm$ S9 from mouse)	> 99% purity Cytotoxicity at the high dose levels tested in each laboratory (one or more than one concentration)	Dunkel <i>et al.</i> , 1985
Reverse mutation (plate incorporation method, $\pm$ S9)	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100. S9 from liver of PB and BF pre-treated male Sprague-Dawley rats	250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 $\mu$ g/plate	Weak positive in both TA98 and TA100 ( $\pm$ S9). Mutagenicity increased with S9.	> 99% purity Cytotoxicity from 1250 $\mu$ g/plate in both strains.	Mori <i>et al.</i> , 1985b
Reverse mutation (preincubation method, -S9)	<i>S. typhimurium</i> TA98	0.02, 0.2, 2, 20, 200 $\mu$ g/plate	Negative	Purity not given.	Furukawa <i>et al.</i> , 1985
Reverse mutation (plate incorporation method, $\pm$ S9)	<i>S. typhimurium</i> TA100	8, 40, 200, 1000, 5000 $\mu$ g/plate (1 <sup>st</sup> exp., $\pm$ S9); 100, 200, 500, 1000, 2000, 4000 $\mu$ g/plate (2 <sup>nd</sup> exp., -S9)	Positive ( $\pm$ S9), in both experiments	High purity. Cytotoxicity at 5000 or from 1000 $\mu$ g/plate in the 1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> exp., respectively.	Ashby, 1986.
Reverse mutation (preincubation method, $\pm$ S9)	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100	Up to 2500 $\mu$ g/plate	Positive ( $\pm$ S9) in TA100	Purity not given Cytotoxicity at 2500 $\mu$ g/plate	Kawai <i>et al.</i> , 1987



## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

Test	System	Dosage	Results	Comments	Reference
Reverse mutation with S9: 1) plate incorporation, 2) modified preincubation (+FMN), or 3) preincubation (-FMN) tests	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100 S9 from liver of Arochlor-induced rats (1 and 2) or hamsters (2 and 3)	0.1, 0.3, 1, 3 µmoles/plate	Positive in TA98 in the modified preincubation test (+S9 of hamster)	97% purity Cytotoxicity at 3 µmoles/plate in the modified preincubation test (+S9 of hamster)	Dellarco and Prival, 1989
Reverse mutation (preincubation method, -S9)	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA98NR TA98/1.8-DNP <sub>6</sub> , YG1021, YG1024	4 or 5 unspecified concentrations	Positive. Highest activity in both YG1021 and YG1024	Purity not given YG1021 (↑ NR) YG1024 (↑ OAT)	Einistö <i>et al.</i> , 1991
Reverse mutation (plate incorporation method, -S9)	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, YG1021, YG1024, YG1026, YG1029, YG1041 and YG1042 strains	0-5 µmoles	Positive except in TA98, being the highest mutagenic activity observed in YG1041 and YG1042.	> 99% purity YG1041 and YG1042 strains have high levels of NR and OAT activities	Sayama <i>et al.</i> , 1998
DNA damage ( <i>umu</i> test, ±S9)	<i>S. typhimurium</i> TA1535/pSK1002 S9 from liver of PB and BF pre-treated rats	Up to 100 µg/mL	Negative	Purity not given.	Nakamura <i>et al.</i> , 1987
DNA damage ( <i>umu</i> test, -S9)	<i>S. typhimurium</i> NM1011, NM1000, TA1535/pSK1002	6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL	Positive in both NM1011 and TA1535/pSK1002 Highest activity in NM1011	Purity not given NM1011 has a high level of NR	Oda <i>et al.</i> 1992
DNA damage ( <i>umu</i> test, -S9)	<i>S. typhimurium</i> TA1535/pSK1002, NM1000, NM1011, NM2000, NM2009, NM3009	Unspecified	Positive except in NM1000, being the highest mutagenic activity observed in NM3009	Purity not given NM3009 has high levels of NR and OAT activities	Oda <i>et al.</i> , 1993
DNA damage ( <i>umu</i> test, -S9)	<i>S. typhimurium</i> NM2009, NM3009	0.1, 1, 2.5, 10, 12.5, 25, 100 µg/assay	Weak positive in NM3009	> 95% purity Cytotoxicity at 100 µg/assay	Öztürk and Durusoy, 1999
DNA damage (SOS chromotest, ±S9)	<i>E. coli</i> PQ37 S9 from liver of MC and PB pre-treated Sprague-Dawley rats	0.1, 1, 10, 100 µg/assay	Negative	> 95% purity Cytotoxicity at 100 µg/assay	

## 2,4-DNT の代謝産物を被験物質とした細菌を用いた試験

## 遺伝子突然変異

Mori *et al.* (1982) は、2,4-DNT の尿中代謝産物についての変異原性試験を行っている。変

異原性が調べられた尿中代謝産物は、2,4-ジニトロベンジルアルコール(2,4-DNB)、2-アミノ-4-ニトロベンジルアルコール(2A4NB)、4-アミノ-2-ニトロベンジルアルコール(4A2NB)、2-ニトロ-4-アセチルアミノトルエン(2N4AAT)、2-アミノ-4-アセチルアミノトルエン(2A4AAT)、2-アミノ-4-アセチルアミノ安息香酸(2A4AABA)、2,4-ジニトロ安息香酸(2,4-DNBA)、および 2,4-ジアミノトルエン(2,4-DAT)であり、純度は 99%より高かった。また、2,4-DNT の代謝産物ではないかと思われる 2,4-ジニトロベンズアルデヒド(2,4-DNA1)の変異原性も、純度 97%のものを用いて調べられた。変異原性試験は、Ames, Lee and Durston の方法(プレート法)に準拠して、ネズミチフス菌の TA98 および TA100 株を用いて、代謝活性系の非存在下で実施された。溶媒対照は DMSO であった。陽性対照は、2NF および 4NQO であった。いずれの化合物も、試験濃度範囲は 5~1000 $\mu$ g/plate であった。2,4-DAT、2N4AAT、2A4AAT、2A4AABA および 2,4-DNB には、変異原性は認められなかった。強度の低かったものから順に、2 種類のアミノニトロトルエン(2A4NT、4A2NT)、2 種類のアミノニトロベンジルアルコール(2A4NB、4A2NB)およびジニトロベンジルアルコール(2,4-DNB)は、両菌株対して変異原性を示したが、これらは mM レベルの濃度で陽性を示す弱い変異原物質であった。これとは対照的に、2,4-ジニトロベンズアルデヒド(2,4-DNA1)は、両菌株に対し、 $\mu$ M レベルの濃度でも変異原性を示した。2,4-DNB および 2,4-DNBA は 2,4-DNT の主要な代謝産物であることから、2,4-DNA1 が、2,4-DNB から 2,4-DNBA への酸化において中間代謝物となっている可能性が強く示唆される。したがって、2,4-DNT から 2,4-DNA1 への代謝的変換が、2,4-DNT の肝がん誘発性と相関している可能性が考えられる。

Mori *et al.* (1982) はさらに、2,4-DNT の尿中代謝産物について、Ames テスト (Ames, McCann and Yamasaki, 1975 に記載のプレート法) を、ネズミチフス菌の TA98 および TA100 株を用いて実施している。被験物質は、2-アミノ 4-ニトロトルエン(2A4NT)、2,4-ジニトロベンジルアルコール(2,4-DNB)、2-アミノ-4-ニトロベンジルアルコール(2A4NB)、4-アミノ-2-ニトロベンジルアルコール(4A2NB)、2-ニトロ-4-アセチルアミノトルエン(2N4AAT)、2-アミノ-4-アセチルアミノトルエン(2A4AAT)、2-アミノ-4-アセチルアミノ安息香酸(2A4AABA)、2,4-ジニトロ安息香酸(2,4-DNBA)、および 2,4-ジアミノトルエン(2,4-DAT)であり、純度は 99%より高かった。また、2,4-DNB の 2,4-DNBA への酸化における中間化合物ではないかと思われる 2,4-ジニトロベンズアルデヒド(2,4-DNA1)についても、純度 98%のものを用いて試験が行われた。肝 S9 は、フェノバルビタールナトリウム(PB)および 5,6-ベンゾフラボン(BF)で前処置した雄の Sprague-Dawley ラットから調製した。溶媒対照は DMSO であった。陽性対照は、2NF、4NQO およびベンツピレン(BP)であった。いずれの化合物も、試験濃度範囲は 0~2000  $\mu$ g/plate であった。2A4NT、4A2NT、2N4AAT、2A4AABA および 2,4-DNBA には、変異原性は認められなかった。一方、強度の低かった順に、2A4AAT、2A4NB、4A2NB、2,4-DAT、2,4-DNB および 2,4-DNA1 は、2,4-DNT よりも強い変異原性を示した。2A4AAT、2A4NB および 4A2NB は、mM レベル

の濃度で陽性反応を示す弱い変異原物質であったが、2,4-DAT、2,4-DNB および 2,4-DNAI は、 $\mu\text{M}$  レベルの濃度で陽性反応を示す変異原物質であった。2A4AAT が TA98 株でのみ変異原性を示した以外は、ほとんどの化合物が、両菌株に対して、S9 の存在下および非存在下で変異原性を示した。ただし、2A4AAT および 2,4-DAT は、S9 の存在下においてのみ変異原性を示した。これらの結果から、2,4-DNT が代謝的変換を受けて 2,4-DNB、2,4-DNAI および既知の発がん性物質である 2,4-DAT を生成することが、2,4-DNT によるがん誘発に寄与している可能性が示唆される。

Sayama *et al.* (1998) は、細菌が 2,4-DNT を代謝して生成する物質を対象にして、ネズミチフス菌の TA98、TA100、YG1021、YG1024、YG1026、YG1029、YG1041 および YG1042 株を用い、Ames テスト (Ames, McCann and Yamasaki, 1975 に記載のプレート法) を実施している。被験物質は、2-ヒドロキシルアミノ-4-ニトロトルエン (2HA4NT)、4-ヒドロキシルアミノ-2-ニトロトルエン (4HA2NT)、2-アミノ-4-ニトロトルエン (2A4NT)、4-アミノ-2-ニトロトルエン (4A2NT)、2,2'-ジメチル-5,5'-ジニトロアゾキシベンゼン (2,2'-DM-5,5'-DNAOB) および 4,4'-ジメチル-3,3'-ジニトロアゾキシベンゼン (4,4'-DM-3,3'-DNAOB) であり、純度は 99% を超えていた。溶媒として DMSO を用い、濃度は 5~7 段階 (0~5  $\mu\text{mole}$ ) として、S9 の非存在下でテストが行われた。TA98 および TA100 株では、変異原活性は全く検出されなかった。2,2'-DM-5,5'-DNAOB は 1 菌株 (YG1041) に対し、4,4'-DM-3,3'-DNAOB は 3 菌株 (YG1041、YG1026、YG1042) に対し、2HA4NT と 4HA2NT はいずれも 5 菌株 (YG1024、YG1026、YG1029、YG1041 および YG1042) に対し、2A4NT と 4A2NT はいずれも 6 菌株 (YG1021、YG1024、YG1026、YG1029、YG1041 および YG1042) に対し変異原性を示した。これらの化合物による変異原活性が最も強く現れたのは、YG1041 株および YG1042 株であった。相対的な変異原活性は、YG1041 株については  $4A2NT < 2A4NT < 2,4-DNT < 4HA2NT < 2,2'-DM-5,5'-DNAOB = 2HA4NT \ll 4,4'-DM-3,3'-DNAOB$  の順であり、YG1042 株については  $4A2NT < 2A4NT < 2,4-DNT < 4HA2NT = 4,4'-DM-3,3'-DNAOB < 2HA4NT$  の順であった。したがって、ヒドロキシルアミノニトロトルエンの還元もしくはジメチルジニトロアゾキシベンゼンの還元によりアミノヒドロキシルアミノジメチルアゾキシベンゼンやアミノヒドロキシルアミノジメチルアゾベンゼンが生成し、これらが細菌における 2,4-DNT の変異原性を担う活性代謝産物になっているものと考えられる。

#### 2,4-DNT を被験物質とした酵母を用いた試験

##### DNA 損傷

Cotrivo *et al.* (1977) は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の D3 株を用いた有糸分裂組み換え試験法により、水の中でオゾン酸化を行う前と行った後における 2,4-DNT (純度不明) の遺伝毒性を調べている。試験は、代謝活性系 (ラット肝ホモジネート) の存在下および非

存在下で実施された。2,4-DNT とオゾンの反応は短時間(20 分間)であったが、ガスクロマトグラフィーの結果からは、新規の生成物は検出されなかった。最高濃度(0.004%)の場合でも、オゾン酸化の前には 2,4-DNT による遺伝毒性や細胞毒性は認められなかった。同濃度で、オゾン酸化の後では有糸分裂組み換え体の数の増加が認められたが、この反応は濃度依存性ではなかった。

#### 2,4-DNT を被験物質とした哺乳類細胞を用いた試験

Table 4.1.2.7.1-2 に概要を示した。

#### **遺伝子突然変異**

Lee *et al.*(1978)は、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1)を用い、2,4-DNT(純度 98.5~99%)が単一遺伝子に突然変異を引き起こす能力を調べた。試験濃度は、Puck and Kao(1967)の方法で得られた細胞生存曲線に基づいて選択された。得られた情報は、1%の細胞が生存する濃度(193 µg/mL)および5%の細胞が生存する濃度(155 µg/mL)では、突然変異は生じなかったということだけである。

Couch *et al.*(1979)は、Hsie *et al.*(1975)によって記載され、後に O'Neill *et al.*(1977)によって改良が加えられた方法に則って、CHO/HGPRT 突然変異誘発試験を実施している。2,4-DNT(純度 99.98%)を DMSO に溶解し、アロクロールで誘導処置した雄の Fischer-344 ラットの肝臓から得られた S9 の存在下で、好気性条件下ないしは嫌気性条件下で試験が行われた。嫌気性条件(低酸素分圧)は、Mallet and coworkers(1977)の方法により達成された。また、アロクロールで誘導処置した雄の Fischer-344 ラットから初代培養肝細胞を得て、それも好氣的インキュベーション条件下における活性系として用いた。アロクロール誘導 S9 が好気性条件下で活性系として用いられた場合には、2,4-DNT は 2 mM の濃度まで細胞毒性も変異原性反応も示さず、それを超える濃度(6 mM まで)では細胞の生存率は低減したが変異原性は示されなかった。嫌気性条件下では、2,4-DNT の濃度が 0.6 mM の場合でも細胞の生存率が減少(約 30%)し、生残細胞中の 6-チオグアニン抵抗性獲得画分が増加(約  $40 \times 10^6$ )した。また 2,4-DNT の濃度が 0.8 mM の場合では、細胞生存率は 10%未満となり、変異原性は認められなかった。嫌氣的インキュベーション(2.5 時間)と好氣的インキュベーション(2.5 時間)の両方を行った場合には、突然変異誘発の結果は、嫌氣的インキュベーションのみが行われた場合と同等であった。アロクロール誘導肝細胞が活性系として用いられた場合には、最高濃度(100 µM)においては、細胞の生存率が低下(12.5%よりは多いが 25%未満)し、生残細胞中の 6-チオグアニン抵抗性獲得画分が増加(約  $30 \times 10^6$ )した。ただし、2,4-DNT による突然変異誘発頻度は、嫌気性条件で S9 の存在下の場合に得られた結果と同様に、比較的低いものであった。

Abernethy and Couch(1982)は、2,4-DNT(純度 99.98%以上)の変異原性を、媒体として DMSO を使用し、CHO-K1 株化細胞を用いた CHO/HGPRT 系において評価した。突然変異誘発頻度の測定は、Hsie *et al.* (1975)および O'Neill *et al.* (1977)が記載した方法に則って行われた。アロクロールで誘導処置した雄の Fischer-344 ラットの肝臓から得た S9 mix の存在下および非存在下で細胞を処置した。3 mM までの濃度で試験が行われたが、2,4-DNT は、S9 mix の存在下および非存在下にいずれにおいても、CHO 細胞の *hgprt* 遺伝子座に突然変異を誘発しなかった。細胞の生存率が 50%まで減るのに必要な濃度は、1.8 mM(S9 非存在下)および 2.5 mM(S9 存在下)であった。

Styles and Cross(1983)は、1.6~1000 µg/mL の濃度範囲で、2,4-DNT(純粋)の P388 マウスリンフォーマ遺伝子突然変異試験(TK +/-)を実施している。指数関数的増加を示している細胞を、S9(詳細不明)の存在下および非存在下で 2,4-DNT に曝露し、最適な発現時間のインキュベーションを行った後選択剤に曝露し、その後、突然変異率および細胞生存率の測定を行った。S9 の非存在下で 2,4-DNT に曝露した場合には、細胞生存率が濃度依存的に低下し、突然変異頻度が統計学的に有意に増加した。S9 存在下の場合には、濃度依存的な細胞毒性が認められ、また濃度依存的に突然変異頻度も増加したが、この増加は統計学的に有意ではなかった。

### 染色体異常

Loveday *et al.* (1989)は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)株化細胞を用い、2,4-DNT(純度 99%)が遺伝子異常を引き起こす能力を調べた。培養条件や処置条件は、Galloway *et al.* (1985)に記載の手順に基づいたものであった。2,4-DNT の濃度は 100, 300 ないしは 1000 µg/mL で、溶媒として DMSO が用いられ、Arochlor 1254 で誘導処置された雄の Sprague-Dawley ラットの肝臓から得られた S9 mix の存在下(処置時間 2 時間)および非存在下(処置時間 8 時間)で試験が行われた。染色体異常の測定までの総時間は、活性系の非存在下の場合は 10 時間、存在下の場合は 12 時間とされ、いずれの場合においても血清を含む培地で 10 時間の培養が行われるように設定された。2,4-DNT は、S9 の存在下または非存在下のいずれかにおいても、染色体異常を引き起こさなかった。

Huang *et al.* (1996a, 1996b)は、ヒトの末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験により、2,4-DNT の遺伝毒性を評価した。健康な男性ドナーから採血して 48 時間インキュベーション後に、DMSO に溶解した 2,4-DNT(純度不明)をその全血試料に加えた。この処置の後さらに 24 時間のインキュベーションを行った。1 培養系につき、良く広がった分裂中期細胞 100 個を観察し、染色体異常を有する細胞の数を測定した。異常を有する細胞の割合(異常を有する細胞の数/観察した分裂中期細胞の数)は、2,4-DNT の濃度が 0.0005、0.002、0.010 および 0.050 mmol/L の場合、それぞれ 16.5%、24.6%、51.0%および 73.2%であり、いずれの場合

も溶媒対照(1.8%)よりも高かった。

JETOC (1996)が、2,4-DNT の変異原性に関するデータを報告している。2,4-DNT(純度不明)を DMSO に溶解して、CHL 細胞を用いた染色体異常試験を行った。2,4-DNT の濃度は、0.05、0.1、0.2、0.3 ないしは 0.4 mg/mL(S9 を使用しない 24 および 48 時間の長時間処置)、または 0.5、1、2、3 ないしは 4 mg/mL(S9 存在下または非存在下で行われた正確な時間が不明の短時間処置)であった。用いられた S9 の詳細は不明である。2,4-DNT は、短時間処置の場合、2 および 3 mg/mL の濃度で、S9 存在下および非存在下において染色体の構造異常を誘発した。4 mg/mL では分裂中期像は認められなかった。長時間処置の場合には 2,4-DNT による染色体異常の誘発は認められず、細胞毒性が、24 時間の場合と 48 時間の場合のそれぞれで、0.4 mg/mL および 0.3 mg/mL で認められた。

### DNA 損傷

Loveday *et al.* (1989)は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)株化細胞を用い、2,4-DNT(純度 99%)が姉妹染色分体交換(SCE)を引き起こす能力を調べた。培養条件や処置条件は、Galloway *et al.* (1985)に記載の手順に基づいたものであった。2,4-DNT の溶媒として DMSO が用いられ、アロクロール 1254 で誘導処置された雄の Sprague-Dawley ラットの肝臓から得られた S9 mix の存在下(BrdUrd 添加までの処置時間 2 時間)および非存在下(BrdUrd 添加までの処置時間 2 時間および添加後 24 時間)で試験が行われた。SCE の観察までの総時間は、活性系の存在下および非存在下のいずれにおいても約 26 時間であった。S9 の非存在下では、2,4-DNT の濃度は 10、30 および 100  $\mu\text{g/mL}$  であった。S9 の存在下では、2,4-DNT の濃度は、100、300 および 1000  $\mu\text{g/mL}$ (1 回目の試行)または 840、1010 および 1260  $\mu\text{g/mL}$ (2 回目の試行)であった。2,4-DNT は、S9 mix の存在下で、わずかだが再現性のある SCE 増加を誘発した。1 回目の試行では、陽性傾向が確認され、また 1000  $\mu\text{g/mL}$  において、19% に SCE が認められた。この濃度では沈殿物が観察された。2 回目の試行では、1010  $\mu\text{g/mL}$  および 1260  $\mu\text{g/mL}$  において、それぞれ 20% および 23% に SCE が認められた。これらの濃度では沈殿物が観察された。S9 mix 非存在下の場合には、最高濃度において細胞回収時間を遅らせた(30.50 時間)が、SCE の増加は認められなかった。そのすぐ下の濃度では、M2 期細胞が少なく、測定不能であった。

Bermudez, Tillery and Butterworth (1979)は、Williams (1977)が記載した手法に則って、雄の Fischer 344 ラットから得た初代培養肝細胞を用いて不定期 DNA 合成(UDS)試験を行い、純粋 2,4-DNT の DNA 損傷誘発能を調べた。第 1 段階の試験では、2,4-DNT を DMSO に溶解し、広い濃度範囲( $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-7} \text{ M}$ )で毒性が調べられた。急性毒性が確認されなかった濃度でのみ、UDS の測定が行われた。 $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  および  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  は毒性濃度ではないと判断(細胞の形態から)されたが、2,4-DNT は有意な反応(核 1 つ当たりの平均正味粒子数が

5 を超えるなど)を引き起こさなかった。

Working and Butterworth (1984)は、精原細胞を用いて UDS 試験を行い、2,4-DNT が DNA 損傷を引き起こす能力を判定した。精原細胞は、雄の Fischer 344 ラットの精巣をトリプシン消化して細胞を分離し、<sup>3</sup>H-チミジンの存在下で 18 時間培養することにより調製した。DMSO が溶媒として用いられ、2,4-DNT(99%を超える純度)の濃度は、10、100 および 1000  $\mu$ M であった。精原細胞であることの確認は、標準的な形態学的基準(LeBlond and Clermont, 1952)によって行い、核内粒子数は、パキテン期の中～後期にある精母細胞および有糸分裂を終えた円形の精子細胞において計測した。2,4-DNT は、パキテン期の精母細胞または円形精子細胞のいずれにおいても、UDS を誘発しなかった。毒性については、1000  $\mu$ M において、トリパンブルー染色により、95%を超える細胞が生育不能と判定された。

Butterworth *et al.* (1989)は、外科手術の廃棄物から得たヒトの初代培養肝細胞を用い、UDS 試験を行って、2,4-DNT の遺伝毒性を調べた。2 人の患者から、明らかに健全で病理学的検査に不要な部位を少量得て、氷冷生理食塩水に入れて試験施設に移送した(患者 1 は、30 歳の女性で良性と思われる腫瘍 2 つを外科的に除去するために入院した患者であり、患者 2 は、肝肉腫を除去する外科手術を受けた 6 歳の女儿)。DNA の複製を測定するのに十分な生育能力を有するヒト肝細胞が、コラゲナーゼ灌流法により適切に調製された。得られた細胞を、2 時間(患者 1)または 1.5 時間(患者 2)かけてコラーゲン基質に付着させ、その後 <sup>3</sup>H-チミジンおよび 2,4-DNT と 18 時間インキュベートした。2,4-DNT(純度 99.98%)の濃度は 0.01、0.1 および 1 mM で、DMSO が溶媒として用いられた。UDS を、オートラジオグラフィにより定量した。2,4-DNT は、ヒト肝細胞において、UDS を誘発しなかった。細胞毒性は、1 mM で認められた(患者 2)。2,4-DNT の UDS 試験は、ラットの初代培養肝細胞でも実施されているが、やはり陰性という結果が得られている(Bermudez, Tillery and Butterworth, 1979 のデータから引用)。2,4-DNT に遺伝毒性活性が見られなかったことは、活性化のためには肝臓での代謝に加えて腸内細菌叢による還元が必要であるという推論と整合している。

Sina *et al.* (1983)は、生体異物により誘発される DNA 損傷(一本鎖切断)および細胞毒性を同時に測定できる、アルカリ溶出/ラット肝細胞試験を開発した。肝細胞は、誘導処置を受けていないラットからコラゲナーゼ灌流法により分離し、0.03、0.3、1 ないしは 3 mM の 2,4-DNT に 3 時間曝露し、回収して分析した。細胞毒性は、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼの放出あるいはトリパンブルー染色に基づいて評価した。DNA は、蛍光定量法により分析した。細胞の生存率が対照の水準とくらべ 30%を超えて減少していた場合、生物学的に有意な細胞毒性が示されたと判断した。また、同時に供試された対照と比べて溶出速度が 3 倍以上であった場合、DNA 損傷陽性とみなした。その結果、2,4-DNT

EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

は、細胞毒性(生存率が対照の 58%)が示された 3 mM で、DNA 損傷(溶出速度が対照の 5.1 ~7.0 倍に増加)を誘発した。細胞毒性が示された濃度で見られた DNA の一本鎖切断は、1 つ目には、化学物質が高分子(DNA)のある部位を直接的に攻撃したことによると考えられ、2 つ目には、過度の細胞複製、細胞分解または細胞内の分解酵素放出の結果生じた可能性が考えられる。

Table 4.1.2.7.1-2: *In vitro* mammalian cell genotoxicity studies with 2,4-DNT

Test	System	Dosage	Results	Comments	Reference
Gene mutation (HGPRT +/-, - metabolic activation)	Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells	Unspecified	Negative at 155 and 193 µg/ml	98.5-99% purity. 5% and 1% survival at 155 and 193 µg/ml, respectively	Lee <i>et al.</i> (1978)
Gene mutation (HGPRT +/-, + metabolic activation)	Chinese hamster ovary (CHO) cells. S9 from liver of Arochlor-induced male F-344 rats (aerobic, anaerobic, or anaerobic + aerobic incubation)	Up to 6 mM (aerobic incubation) Up to 0.8 mM (anaerobic incubation)	Negative (aerobic incubation) Positive at 0.6 mM (anaerobic, anaerobic + aerobic incubation)	99.98% purity ↓ Survival at 6 mM (aerobic incubation) 30% and < 10% survival at 0.6 and 0.8 mM, respectively (anaerobic incubation)	Couch <i>et al.</i> (1979)
	Chinese hamster ovary (CHO) cells. Arochlor-induced male F-344 rat primary hepatocytes (aerobic incubation)	Up to 100 µM	Positive at 100 µM	99.98% purity <25% but >12.5% survival at 100 µM.	
Gene mutation (HGPRT +/-, ±S9)	Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. S9 from liver of Arochlor-induced male F-344 rats	Up to 3 mM	Negative (±S9)	≥ 99.98% purity 50% survival at 1.8 mM (-S9) or 2.5 mM (+S9)	Abernethy and Couch (1982)
Gene mutation (TK +/-, ±S9)	P388 mouse lymphoma cells	1.6-1000 µg/ml	Positive (-S9) in a concentration dependent manner	High purity. Concentration-related toxicity (±S9)	Styles and Cross (1983)
Chromosome aberration (±S9)	Chinese hamster ovary (CHO) cells. S9 from Arochlor 1254-induced male Sprague-Dawley rats.	100, 300, 1000 µg/ml Treatments were 8 h (-S9) and 2 h (+S9)	Negative	99% purity	Loveday <i>et al.</i> (1989)
Chromosome aberration (-S9)	Human peripheral lymphocytes	0.0005, 0.002, 0.0010, 0.050 mmol/L 24 h treatment.	Positive from the low concentration tested	Purity not given	Huang <i>et al.</i> (1996a, 1996b)



## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

Test	System	Dosage	Results	Comments	Reference
Chromosome aberration ( $\pm S9$ )	CHL cells	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/mL (24 and 48 h treatment, -S9) 0.5, 1, 2, 3, 4 mg/mL (short-term treatment, $\pm S9$ )	Positive in short-term treatment from 2 mg/mL ( $\pm S9$ )	Purity not given Toxicity at 4 mg/mL in short-term treatment ( $\pm S9$ ), at 0.4 or 0.3 mg/mL after treatment for 24 or 48 h (-S9)	JETOC (1996)
DNA damage (SCEs, $\pm S9$ )	Chinese hamster ovary (CHO) cells	10, 30 and 100 $\mu\text{g/ml}$ (-S9) 100, 300, 1000 $\mu\text{g/ml}$ (1 <sup>st</sup> exp) and 840, 1010, 1260 $\mu\text{g/ml}$ (2 <sup>nd</sup> exp) (+S9)	Positive (+S9)	99% purity Precipitation at $\geq 1000 \mu\text{g/ml}$ . Cytotoxicity at concentrations higher than 100 $\mu\text{g/ml}$ (-S9)	Loveday <i>et al.</i> (1989)
DNA damage (UDS, -S9)	Male Fischer -344 rat hepatocytes	$1 \times 10^{-3}$ and $1 \times 10^{-4}$ M	Negative	High purity. Cytotoxicity at concentrations $> 1 \times 10^{-3}$ M	Bermudez, Tillery and Butterworth (1979)
DNA damage (UDS, -S9)	Male Fischer -344 rat spermatocytes and spermatids	10, 100, 1000 $\mu\text{M}$	Negative in both spermatocytes and spermatids	$> 99\%$ purity Cytotoxicity at 1000 $\mu\text{M}$	Working and Butterworth (1984)
DNA damage (UDS, -S9)	Human hepatocytes from discarded surgical material of two patients	0.01, 0.1 and 1 mM	Negative	99.98% purity Cytotoxicity at 1mM in one patient	Butterworth <i>et al.</i> (1989)
DNA damage (alkaline elution, -S9)	Rat hepatocytes	0.03, 0.3, 1 and 3 mM	Positive (DNA single strand breaks) at 3 mM	Purity not given. Cytotoxicity at 3 mM	Sina <i>et al.</i> (1983)

4.1.2.7.2 *In vivo* 試験体細胞を用いた試験2,4-DNT を被験物質とした哺乳類細胞を用いた試験

Table 4.1.2.7.2-1 に概要を示した。

遺伝子突然変異

データは、得られていない。

### 染色体異常

Lee *et al.* (1978)は、2,4-DNTによる細胞遺伝学的影響を調べるために、2,4-DNT(純度 98.5 ~99%)を 93 mg/kg 体重/day の用量で雄の CD ラットに混餌投与し、リンパ球と腎臓の細胞の培養物を得て、分析を行った。混餌投与の 5 および 19 週目の終わりに、尾静脈から採血し、リンパ球を Moorhead *et al.* (1960)の方法に準じて培養した。混餌投与の 5 および 13 週目の終わりに、剖検に供された被験動物の腎臓組織を取り出し、Fernandes (1958)のトリプシン処理法により培養を行った。両培養物において、200 個の細胞についての倍数性検査を行い、最高 50 個の分裂中期細胞を対象に、ネガ写真を用いて形態学的異常を検査した。対照群には 4 匹が用いられ、被験物質が投与された各群には少なくとも 3 匹が用いられた。リンパ球の培養物では、染色体数の分布や 4 倍体の出現数において、2,4-DNT 投与による有意な変化は何も認められなかった。しかし、混餌投与 5 週間後に得た試料では、染色分体切断数やギャップの出現数が増加していた。ただし、この影響は、混餌投与 19 週後でも、統計学的に有意になることはなかった。腎臓組織の培養物では、4 倍体の出現数が、混餌投与 13 週後の試料において有意ではないが増加し、染色分体切断数やギャップの出現数は、混餌投与 5 および 13 週後の試料において有意に増加していた。染色分体切断数やギャップの出現数は、混餌投与期間の経過とともに増加した。

Ellis *et al.* (1979)は、2,4-DNT(純度 98%)の変異原性を調べるため、イヌとラットに慢性的投与を行い、それらから得た組織培養物を細胞遺伝学的に分析した。投与 24 ヶ月目の終わりに、剖検に供された被験動物の大腿骨骨髓を採取し、Eggen (1969)の方法で試料とした。また、剖検に供された被験動物の腎臓組織を取り出し、Fernandes (1958)のトリプシン処理法により培養を行った。染色体の分析は、Moorhead and Nowell (1964)の方法に準拠して実施された。倍数性を 200 個の細胞について調べ、また、最高 50 個の分裂中期細胞を対象に、ネガ写真を用いて形態学的異常を検査した。用いられたイヌはビーグル犬で、硬質ゼラチンカプセルに入れられた 2,4-DNT(10 mg/kg 体重/day)が投与された。そして腎臓についても骨髓についても、被験物質投与群および対照群の各群につき、少なくとも 3 匹から試料を入手した。被験物質が投与されたイヌから得た腎臓組織培養物は、4 倍体出現数がわずかに増加していたが、この増加は有意ではなく、骨髓培養物は正常であった。また、2,4-DNT は、染色体に何ら形態学的異常を誘発しなかった。ラットとしては CD ラットが用いられ、2,4-DNT が、中用量群には 100 ppm(雄で 3.9、雌で 5.1 mg/kg 体重/日に相当)、高用量群には 700 ppm(雄で 34、雌で 45 mg/kg 体重/日に相当)の濃度で混餌投与された。中用量群の骨髓試料は 5 匹から、同群の腎臓試料は 6 匹から、高用量群の試料は両方とも 1 匹から、対照群の試料は両方とも 3 匹から入手した。中用量群のラットから得られた腎臓組織培養物では、4 倍体の出現頻度が有意に増加していたが、その頻度(1.50)は対照群(0.50)と比較してもそれほど大きく増加してはいなかった。また、中用量および高用

量群の骨髓試料では、このような影響は示されなかった。ラットの骨髓培養物および腎臓組織培養物では、染色体の形態学的異常は特に認められなかった。これらの組織培養物における細胞毒性については報告されていないが、2,4-DNT のトキシコキネティクスおよび毒性データに基づくと、被験物質は、これらの標的組織に達していたものと思われる。

### DNA 損傷

Mirsalis and Butterworth(1982)は、ラットに *in vivo* で 2,4-DNT を投与し、肝細胞における不定期 DNA 合成(UDS)の誘発を検定した。雄の Fischer 344 ラット 3 匹に、コーン油を媒体として 100 mg/kg 体重の 2,4-DNT が強制経口投与された。投与の 12 時間後に肝臓の灌流により肝細胞を分離し、<sup>3</sup>H-チミジンを含む培養液で培養した。UDS は、定量的オートラジオグラフィにより核 1 個当たりの正味粒子数(NG)として測定し、NG が 5 以上の細胞を修復状態にあるものと定義した。2,4-DNT は、対照群(NG =  $-3.4 \pm 0.2$ ; 修復状態の細胞の割合 =  $2 \pm 1\%$ )と比べても、弱い反応(NG =  $1.5 \pm 0.3$ ; 修復状態の細胞の割合 =  $33 \pm 1\%$ )しか引き起こさなかった。

Mirsalis *et al.*(1982)は、*in vivo* 不定期 DNA 合成(UDS)法により、ラットの肝細胞における 2,4-DNT の遺伝毒性誘発能を検定した。雄の Fischer 344 ラット(各用量群 3 匹ずつ)に、2,4-DNT(99.9%を超える純度)が、コーン油を媒体として、50 ないしは 200 mg/kg 体重の用量で、強制経口投与された。投与の 12 時間後に、肝臓の灌流により肝細胞を分離し、<sup>3</sup>H-チミジンを含む培養液で培養した。UDS は、定量的オートラジオグラフィにより核 1 個当たりの正味粒子数(NG)として測定し、NG が 5 以上の細胞を修復状態にあるものと定義した。この UDS 試験では、2,4-DNT により遺伝毒性が示された。すなわち、NG 値は、対照群で  $-4.4 \pm 0.5$  であったのに対し、50 mg/kg 体重群では  $0.8 \pm 1.3$ 、200 mg/kg 体重群では  $21.1 \pm 3.9$  であった。また、修復状態の細胞の割合は、対照群で  $3 \pm 1\%$ であったのに対し、50 mg/kg 体重群では  $25 \pm 6\%$ 、200 mg/kg 体重群では  $83 \pm 3\%$ であった。

### DNA との共有結合

Rickert *et al.*(1983)は、<sup>14</sup>C-2,4-DNT を投与して、肝臓の DNA、RNA およびタンパク質との共有結合の時間的推移と程度を検討した。雄の Fischer 344 ラットに、コーン油を媒体として <sup>14</sup>C-2,4-DNT が 10 ないしは 35 mg/kg 体重の用量で強制経口投与された。いずれの群からも、投与の 1、2、4、8、12、24、48、96、192 および 384 時間後にラットが供出され、屠殺が行われた。肝臓が摘出され、重量測定とホモジネートの調製が行われた。肝ホモジネートを 3 mL(組織 1 g に相当)分取し、DNA、RNA およびタンパク質の画分に分別した。これらの高分子化合物への共有結合量は、用量と比例していた。共有結合量には、これらの高分子化合物間で差は認められなかった。共有結合体の出現および消失の時間推移は、

投与用量に関係なく同様であった。投与後 8 時間までは、共有結合体はほとんど存在しなかった。共有結合量は、12~24 時間の間に最大となり、その後ゆっくりと低下していった。共有結合の終末相半減期は、RNA およびタンパク質で 2.9~5 日、DNA で 5.1~7.9 日であった。

Kedderis, Dyroff and Rickert(1984)は、硫酸転移酵素阻害剤である 2,6-ジクロロ-4-ニトロフェノールとペンタクロロフェノールを用い、*in vivo* で 2,4-DNT が生物学的活性化を受ける際に、硫酸エステル形成がどのような役割を果たしているかを調べた。雄の Fischer 344 ラットに、上記のいずれかの硫酸転移酵素阻害剤(40  $\mu\text{mol/kg}$  体重)を腹腔内投与し、その 45 分後に、コーン油を媒体として  $^{14}\text{C}$ -2,4-DNT または  $^3\text{H}$ -2,4-DNT を 28 mg/kg 体重の用量で経口投与した。その 12 時間後にラットを屠殺した。肝臓を摘出し、細分化して分析に供するまで保存した。各肝臓の一部をホモジネートにし、共有結合した放射活性を、総量分析法により測定した。硫酸転移酵素阻害剤により、2,4-DNT の肝臓高分子への共有結合総量は、33%減少した。ヒドロキシルアパタイトを用いたクロマトグラフィーにより肝 DNA を精製したところ、共有結合量は DNA 1 mg 当たり 45 pmol 相当であることが示された。2,4-DNT の DNA への結合は、2,6-ジクロロ-4-ニトロフェノールにより 84%を上回る割合で低下し、一方ペンタクロロフェノールでは 33%低下した。これらの結果から、DNA に共有結合する反応性代謝産物へと 2,4-DNT が生物学的転換されるに当たり、硫酸化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

La and Froines(1992a)は、2,4-DNT が *in vivo* で DNA 付加体形成を誘発する能力について検討している。各群 3 匹ずつの雄の Fischer 344 ラットに、4.1、41、123、410、1230 ないしは 2046  $\mu\text{mol/kg}$  体重の用量で、DMSO を媒体として、2,4-DNT(純度 97~99%)が単回腹腔内投与された。ラットを 18 時間後に屠殺し、肝臓から DNA を単離し、 $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法および薄層クロマトグラフィーにより、形成された付加体を測定した。DNA 付加体は、4.1  $\mu\text{mol/kg}$  体重の段階から認められた。付加体の出現には、用量-反応関係が認められた。2,4-DNT により生じたスポットが 3 つ確認された。付加体形成の程度は、総ヌクレオチドに対する付加体を形成したヌクレオチドの割合(すなわち相対付加体標識量、relative adduct labelling, RAL)で報告されている。2,4-DNT の投与用量が 410  $\mu\text{mol/kg}$  体重の場合、RAL ( $10^7$ ヌクレオチド当たり)は、 $7.6 \pm 1.7$ (付加体 1)、 $1.0 \pm 0.2$ (付加体 2)および  $1.0 \pm 0.4$ (付加体 3)であった。

La and Froines(1992b)は、2,4-DNT が *in vivo* で DNA 付加体を形成する能力について調べている。Fischer 344 ラットに、2,4-DNT(純度 97~99%)が、DMSO を媒体として、150 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与された。その 18 時間後にラットを屠殺した。雄ラットからは肝臓、腎臓および肺を、雌ラットからは乳腺を分離した。これらの臓器から DNA を単離し、 $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法および薄層クロマトグラフィーにより、形成された付加体を測

定した。データは、被験動物 3 匹についての平均値 ± 標準偏差で示されている。2,4-DNT が肝 DNA に結合するのが認められ、オートラジオグラフィーでは付加体のスポットが 3 ヶ所生じているのが認められた。付加体 1 は、一番高い放射活性強度を示し、総放射活性の約 85% を占めていた。付加体 2 および 3 は、それぞれ 10% および 5% を占めていた。2,4-DNT は、腎臓、肺、乳腺でも DNA との結合を示した。肝臓以外の部位での DNA 付加体形成は、パターンは肝臓と同じであったが、形成量は明らかに少なかった。2,4-DNT の投与用量と DNA 付加体形成量との間の関係を検証するために、ラットに 2,4-DNT が 0.75～375 mg/kg 体重の範囲の様々な濃度で腹腔内投与された。濃度の関数として付加体形成量が増加したことが示された。2,4-DNT による付加体が、0.75 mg/kg 体重から 225 mg/kg 体重の間で 200 倍増加した。さらに、強制経口投与と腹腔内投与とで、付加体形成に定性的および定量的な差がみられるかどうか比較が行われた。雄の Fischer 344 ラット 3 匹に 150 mg/kg 体重の 2,4-DNT を投与した場合、強制経口投与と腹腔内投与との間で差は認められなかった。これら 2 つの投与方法において、オートラジオグラフィーでも同じ結果が描かれ、付加体形成量にも有意な差は認められなかった。肝 DNA 付加体の形成・除去の動態を調べるために、雄の Fischer 344 ラットに 50 mg/kg 体重の 2,4-DNT を腹腔内投与し、それらのラットを様々な時点(6 時間～14 日後)で屠殺して、分析を行った。肝 DNA 付加体が最も多量になったのは、投与の 20～24 時間後であった。付加体はその後、時間の経過とともにゆっくりと減少して行った。DNA 付加体の減少は、2 相性の動態を示しているように思われた。すなわち、最初の 72 時間までは急速な減少がみられ、その後減少率は緩慢になった。かなりの量の付加体が、時間が経っても保持されていることが判明した。2 週間後、2,4-DNT により生じた付加体の検出量は、最大時の 42% であった。毒性に関しては、2,4-DNT を投与(最高 375 mg/kg 体重)されたラットにおいて、投与経路に関わらず、投与の結果死亡した例は認められていない。2,4-DNT を 50 mg/kg 体重の用量で投与されたラットから肝臓の切片が作製されたが、壊死の徴候は認められなかった。

Table 4.1.2.7.2-1: In vivo somatic mammalian cell genotoxicity studies with 2,4-DNT

Test	System	Dosage	Results	Comments	Reference
Chromosome aberration (CA)	Lymphocytes of CD male rats	93 mg/kg/day in feed for 5 and 19 weeks	Positive after 19 weeks for structural CA (↑chromatid breaks)	98.5-99% purity	Lee <i>et al.</i> (1978)
	Kidney cultures of CD male rats	93 mg/kg/day in feed for 5 and 13 weeks	Positive for structural CA (↑ chromatid breaks) after both 5 and 13 weeks.	98.5-99% purity The chromatid breaks increased with the duration of treatment	
Chromosome aberration (CA)	Kidney and bone marrow cultures from chronically treated Beagle dogs	10 mg/kg/day in hard gelatine capsules	Negative in both cultures	98% purity	Ellis <i>et al.</i> (1979)

## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

Test	System	Dosage	Results	Comments	Reference
Chromosome aberration (CA)	Kidney and bone marrow cultures from chronically treated CD rats	3.9 or 34 mg/kg/day in feed (♂); 5.1 or 45 mg/kg/day in feed (♀)	Negative in both cultures	98% purity A significant ↑ in tetraploid was observed only at the low dose in kidney cultures	Ellis <i>et al.</i> (1979)
DNA damage (UDS)	Hepatocytes of Fischer-344 rats	100 mg/kg by gavage (rats killed 12 h after dosing)	Weak positive	98% purity	Mirsalis and Butterworth (1982)
DNA damage (UDS)	Hepatocytes of male Fischer-344 rats	50 and 200 mg/kg by gavage (rats killed 12 h after dosing)	Positive in a dose-dependent manner	> 99.9% purity	Mirsalis <i>et al.</i> (1982)
DNA covalent binding	Liver of male Fischer-344 rats	10 and 35 mg/kg by gavage (rats killed 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96, 192 and 384 h after dosing)	Positive	High purity Covalent binding peaked between 12 and 24 h	Rickert <i>et al.</i> (1983)
DNA covalent binding	Liver of male Fischer-344 rats	28 mg/kg, oral (rats killed 12 h after dosing)	Positive	> 98% purity Inhibitors of sulfotransferases decreased the covalent binding	Kedderis, Dyroff and Rickert (1984)
DNA covalent binding	Liver of male Fischer-344 rats	4.1, 41, 123, 410, 1230 and 2046 µmol/kg i.p. (rats killed 18 h after dosing)	Positive from 4.1 µmol/kg in a dose-dependent manner	97-99% purity 3 adducts	La & Froines (1992a)
DNA covalent binding	Liver, kidney, lung (♂) and mammary glands (♀) of Fischer-344 rats	150 mg/kg i.p. (rats killed 18 h after dosing)	Positive	97-99% purity 3 adducts in all cases (in liver higher yield than in extrahepatic sites)	La & Froines (1992b)
	Liver of male Fischer-344 rats	From 0.75 to 375 mg/kg i.p. (rats killed 18 h after dosing)	Positive in a dose-dependent manner	97-99% purity	
	Liver of male Fischer-344 rats	150 mg/kg i.p. or by gavage (rats killed 18 h after dosing)	Positive	97-99% purity No differences between the two administration routes	

## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

Test	System	Dosage	Results	Comments	Reference
	Liver of male Fischer-344 rats	50 mg/kg i.p. (rats killed from 6 hours to 14 days after dosing)	Positive	97-99% purity Maximum hepatic adduct levels at 20-24 hours; 42% of maximum levels after 2 weeks.	

### 2,4-DNT 代謝産物を被験物質とした哺乳類細胞を用いた試験

#### DNA との共有結合

La and Froines (1992a) は、2,4-DNT の 3 種類の尿中代謝産物について、*in vivo* で DNA 付加体を形成する能力を検証している。3 匹の Fischer 344 ラットに、2,4-ジアミノトルエン、2-アミノ-4-ニトロトルエンもしくは 4-アミノ-2-ニトロトルエン(純度は 97~99%と報告されている)が、DMSO を媒体として、410  $\mu\text{mol/kg}$  体重の用量で単回腹腔内投与された。ラットを 18 時間後に屠殺し、肝臓から DNA を単離し、 $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法および薄層クロマトグラフィーにより、形成された付加体を測定した。それら 3 種類の尿中代謝産物により、2,4-DNT により生じたのと同じ、付加体の 3 つのスポットが生じた。付加体形成の程度は、総ヌクレオチドに対する付加体を形成したヌクレオチドの割合(すなわち相対付加体標識量、relative adduct labelling, RAL)で報告されている。2,4-ジアミノトルエンの場合、RAL(総ヌクレオチド当量、 $\times 10^7$ )は、 $17.5 \pm 4.2$ (付加体 1)、 $1.5 \pm 0.4$ (付加体 2)および  $2.1 \pm 0.4$ (付加体 3)であった。2-アミノ-4-ニトロトルエンの場合、RAL(総ヌクレオチド当量、 $\times 10^7$ )は、 $7.7 \pm 1.3$ (付加体 1)、 $0.9 \pm 0.1$ (付加体 2)および  $1.1 \pm 0.2$ (付加体 3)であった。4-アミノ-2-ニトロトルエンの場合、RAL(総ヌクレオチド当量、 $\times 10^7$ )は、 $8.7 \pm 2.3$ (付加体 1)、 $0.8 \pm 0.1$ (付加体 2)および  $1.3 \pm 0.3$ (付加体 3)であった。2,4-ジアミノトルエンで生成された付加体の量は、ニトロ基が置換された他の 2 種類の化合物でそれぞれ生成された付加体の量よりも有意に多かった。2-アミノ-4-ニトロトルエンや 4-アミノ-2-ニトロトルエンで生成された付加体の量は、2,4-DNT で生成される付加体の量と同等であった。

### 生殖細胞を用いた試験

#### 2,4-DNT を被験物質とした昆虫における試験

#### 遺伝子突然変異

Woodruff *et al.* (1985) は、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において 2,4-DNT が伴性劣性致死 (SLRL) 突然変異を誘発する能力を調べている。Canton-S 系統の雄の

成虫に、2,4-DNT(純度 99%)が、混餌投与もしくは注射により投与された。混餌投与の場合は、雄の成虫を、0.2~0.5 mL の溶液(2,4-DNT をエタノールに 10%の濃度で溶解)を浸したグラスファイバーディスクを保持するガラス製セルバイアルに入れて、3 日間飼育した。試験濃度は 1000 および 10000 ppm であった。注射の場合は、雄の成虫に、0.2~0.3  $\mu$ L の新規に調製した溶液(2,4-DNT をエタノールに 10%の濃度で溶解し、その後 0.7%NaCl 溶液で希釈)が注射された。試験濃度は 200 および 10000 ppm で、雄の成虫には、交配の前に 24~48 時間の回復期間が設けられた。この SLRL テストは、標準的な *Basc* 交配法を使って、Wurgler *et al.*(1977)に記載の手法に準拠して実施された。野生型の各雄を、*Basc* 系統の新規の雌 3 匹と、それぞれ 3 回の胎卵期間(2、2 および 2 日間)交配させた。*Basc/+*の雄または *Basc/±*の雌 20 匹以上の中に野生型の雄が生育してこなかった場合、致死変異があったとみなした。致死性を確認するため、追試験が実施された。追試験では、多数の子孫の中に F<sub>2</sub> または F<sub>3</sub> の野生型雄が数匹生残していた場合には、野生型雄の数が *Basc/+*雄 および *Basc/±*雌の総数の 5%に満たなければ、致死変異があったとみなした。2,4-DNT は、10000 ppm が注射で投与された場合には SLRL 突然変異を誘発したが、混餌投与では致死突然変異を誘発することはなかった。

### 染色体異常

Woodruff *et al.*(1985)は、キイロショウジョウバエにおいて 2,4-DNT(純度 99%)が相互転座を引き起こす能力を調べている。Canton-S 系統の雄に、0.2~0.3  $\mu$ L の新規に調製した溶液(2,4-DNT をエタノールに 10%の濃度で溶解し、その後 0.7%NaCl 溶液で希釈)が注射された。試験濃度は 10000 ppm で、雄には、交配前に 24~48 時間の回復期間が設けられた。この相互転座試験は、T (2; 3)および T (Y; A)を指標として、標準的な交配法を使って、Valencia *et al.*に記載の手法に準拠して実施された。野生型の雄は、*bw; e* の遺伝子型を有する雌、もしくは *bw; st* の遺伝子型を有する雌との交配に供された。雌は、少なくとも 17~18 日の間に、3~4 日の間隔で継代された。合計 20 以上の子孫で交雑がみられた場合のみ、転座が起きたと判定された。転座を確認するため、追試験が実施された。T (Y; 2; 3)の出現は、2 ヲ所の転座と計数された。2,4-DNT は、相互転座を誘発しないと判断された。

### 2,4-DNT を被験物質とした哺乳類における試験

Table 4.1.2.7.2-2 に概要を示した。



## 染色体異常

### ラット

Lee *et al.* (1978)は、Charles River CD ラットを用いた優性致死試験により、2,4-DNT の変異原性作用を調べている。4 匹または 5 匹の雄からなる 3 群に、げっ歯類用の標準的な飼料または 2,4-DNT (98%を超える純度)を 0.02 %ないしは 0.2%含む飼料が与えられた。高用量群の雄における摂取量は、93 mg/kg 体重/日であった。13 週間混餌投与した後、各雄を雌 3 匹ずつと交配させた。妊娠 13 日目にそれぞれの雌を屠殺し、子宮の検査を行って、着床数、死亡および生存胎仔数、吸収胚数を測定した。データは、受胎指数(妊娠が確認された雌の数/交配が確認された雌の数 × 100)および生存着床指数(生存胎仔数/総着床数× 100)で示されている。対照群と比較すると、0.02%の 2,4-DNT を混餌投与されていたラットでは、受胎指数および生存着床指数が減少(それぞれ対照で  $92 \pm 8\%$ であったのに対し  $67 \pm 14\%$ 、対照で  $92 \pm 1\%$ であったのに対し  $62 \pm 24\%$ )していたが、統計学的に有意な減少ではなかった。0.2% (93 mg/kg 体重/日)の 2,4-DNT を混餌投与されていたラットでは、有意な減少が、受胎指数(対照が  $92 \pm 8\%$ であったのに対し  $20 \pm 13\%$ )および生存着床指数( $92 \pm 1\%$ であったのに対し  $0\%$ )の両方で認められた。

Ellis *et al.* (1979)は、Charles River CD ラットにおいて、優性致死突然変異試験を 4 件実施し、2,4-DNT の変異原性を調べている。1 件目の試験では、4 匹、4 匹および 5 匹の雄からなる 3 群に対し、2,4-DNT が 0、0.02 または 0.2%の濃度で 10 週間混餌投与された。2 件目の試験では、8 匹、9 匹、7 匹および 10 匹の雄からなる 4 群に対し、2,4-DNT が 0、0.0015、0.01 または 0.07%の濃度で 13 週間混餌投与された。3 件目の試験では、10 匹ずつのラットの群に 0、0.15 または 0.2%の濃度で、15 匹のラットの 1 群に 0.5%の濃度で、2,4-DNT が 13 週間混餌投与された。4 件目の試験では、雄ラット 24 匹からなる群に、2,4-DNT が 0、0.07、0.10 または 0.15%の濃度で 13 週間混餌投与された。最後の試験では、情報を最大限得るために、体重測定と飼料消費量の測定が行われた。いずれの試験においても、投与終了時に、それぞれの雄ラットを未交配の雌ラット 2 匹と交配させ、妊娠中期に雌を屠殺して、以下のデータを収集した。すなわち、投与を受けた雄のうち生殖能力が示された雄の数、交配に供された雌のうち妊娠に至った雌の数、妊娠雌 1 匹あたりの黄体数、および、妊娠雌 1 匹あたりの総着床数、着床後死胚数ならびに生存着床胚数であった。さらに、4 件目の試験では、交配後各群の雄 10 匹を屠殺して解剖し、生殖器官に形態学的変化が生じているかどうかを検査した。残りの雄ラットは、2,4-DNT を含まない通常飼料で 13 週間(回復期間)飼育し、前述と同様に剖検を行った。1 件目の試験では、対照群と比較すると、0.02%の 2,4-DNT を 10 週間混餌投与されていたラットで、受胎指数および生存着床指数が減少(それぞれ対照で  $92 \pm 8\%$ であったのに対し  $67 \pm 14\%$ 、対照で  $92 \pm 1\%$ であったのに対し  $62 \pm 24\%$ )していたが、統計学的に有意な減少ではなかった。0.2%の 2,4-DNT を混餌投

与されていたラットでは、有意な減少が、受胎指数(対照が  $92 \pm 8\%$ であったのに対し  $20 \pm 13\%$ )および生存着床指数( $92 \pm 1\%$ であったのに対し  $0\%$ )の両方で認められた。2件目の試験では、雌 1 匹当たりの生存着床胚数、死亡胎仔数、生存胎仔数および吸収胚数に、投与群と対照群とで有意差は認められなかった。3件目の試験では、高用量(2,4-DNT の 0.5%混餌投与)群の 15 匹のうち、13 週間の混餌投与期間を生残したのは 3 匹だけで、交配に至ったのは 1 匹もおらず、機能的に不妊であった。中用量(2,4-DNT の 0.2%混餌投与)群および低用量(2,4-DNT の 0.15%混餌投与)群では、交配は認められたものの生存胎仔は認められなかった。中用量群の雄が作った膣栓の 3 分の 2 および低用量群の雄が作った膣栓の 3 分の 1 には精子が見られず、不妊が示唆された。4 件目の試験では、2,4-DNT の用量に依存した、体重増加量の減少が認められた。飼料消費量にもかなりの減少が認められた。無精子膣栓の用量依存的な増加、および受胎能(妊娠)の用量依存的な減少が認められた。0.15%の 2,4-DNT を混餌投与されていた雄との交配に供された雌のうち、わずか 1 匹のみで、死亡胎仔が 1 匹だけ認められている。雌親 1 匹当たりの黄体数は、正常の範囲内であった。着床指数には影響があったものの、生存着床指数には影響が認められなかったことから、顕著な優性致死突然変異作用はないことが示された。0.07、0.1 ないしは 0.15%の 2,4-DNT を 13 週間混餌投与されていた雄のほぼ全匹で、精巣精細管の重度の萎縮または変性が確認され、また、精巣上体の管腔に検出された精子はごくわずかであるか全く無いことが確認された。13 週間の回復期間の後でも、これらの病変に回復の兆候は全く認められなかった。

Lane *et al.*(1985)は、Sprague Dawley ラットにおいて、2,4-DNT(純度不明、再結晶化されたもの)の生殖毒性や優性致死誘発能力を調べた。50 匹のラットが、無作為に 5 つの群に分配された。対照群には、Mazola 社製コーン油が 5 日間毎日経口投与された。陽性対照群には、コーン油を媒体として、トリエチレンメラミン(TEM)が単回経口投与された。他の 3 群には、コーン油を媒体として、2,4-DNT が 60、180 ないしは 240 mg/kg 体重/日の用量で、5 日間毎日経口投与された。2,4-DNT を最高用量で投与された群では、想定を超える死亡が生じ、結果を統計学的に評価することが難しくなってしまうため、他の群に 1 週間遅れて、240 mg/kg 体重/日の投与を受ける新しい群が設けられた。各雄を、毎週 5 日間、2 匹の雌と交配させた。雌ラットは、妊娠 14 日目に屠殺された。子宮と卵巣を検査し、生存着床胚、死亡着床胚および黄体を観察した。交配は、高用量群を除いて 7 週間続けられた。高用量群については、影響が可逆性である可能性を想定して、交配期間を 6 週間延長した。60 mg/kg 体重/日群では、生殖への有害影響も優性致死影響も生じず、軽度のチアノーゼ以外は毒性の徴候も認められなかった。180 mg/kg 体重/日群では、チアノーゼが生じたが、統計学的に有意な変化が認められたのは、着床前死亡指数(第 2 週目で対照群よりも高値)、交配指数(第 5 週目で対照群よりも低値)および黄体指数(第 5 週目で対照群よりも低値)の 3 項目だけであった。240 mg/kg 体重/日群では、投与後の週に、体重の減少、チ

アノーゼおよび死亡が生じた。この高用量を投与されていた群では、生殖能に対して多くの有害影響が認められ、最も顕著であったのは、第 1～6 週にかけての交配指数への影響であった。妊娠雌の数が少なく、これらの週の他のデータについて解釈を行うことが難しかったため、試験のこの部分を他の用量群よりも 6 週間延長することが決定された。試験の第 7 週以降、交配指数に対照群との有意差は見られなくなり、他のデータについてより容易に解釈を行うことができるようになった。第 7 週における着床指数、着床前死亡指数および胎仔指数は、有意に変化していた。その後は、第 8 および 9 週における着床前死亡指数のみに、対照群との統計学的有意差が認められた。第 13 週目には、生殖に関する全ての指数および優性致死指数に回復が見られ、それらの値は対照群の値と同等になった。したがって、2,4-DNT は優性致死突然変異は誘発しないが、生殖能力に対しては、240 mg/kg 体重/日の投与により、緩徐に回復し得るものであるが、有害影響を引き起こすと結論付けられる。陽性対照群では、陽性対照物質が引き起こすとされている典型的な優性致死影響が生じた。

## マウス

Lee *et al.* (1978) は、アルビノ Swiss マウスを用いた優性致死試験により、2,4-DNT (98% を超える純度) の変異原性作用を調べている。雄 4 匹には、げっ歯類用標準飼料が与えられ、雄 5 匹には、2,4-DNT が 0.2% の濃度 (137 mg/kg 体重/日) で 13 週間混餌投与され、さらに雄 3 匹には、2,4-DNT が 0.7% の濃度 (332 mg/kg 体重/日) で 4 週間混餌投与された。混餌投与の後、各雄を雌 3 匹ずつと交配させた。交配は膣栓の存在により確認され、雌には出産させた。データは、受胎指数 (妊娠が確認された雌の数/精子を有する膣栓が確認された雌の数 × 100) および生存着床指数 (生存胎仔数/総着床数 × 100) で示された。低用量の 2,4-DNT では、何も影響は生じなかった。高用量の 2,4-DNT では、受胎指数が減少したが、生存着床指数には影響は見られなかった。この受胎指数の減少は、雌の多くで全く着床が見られなかったことによるものであった。ただし、仔を出産した雌では、着床数と仔の数は正常であった。

Soares and Lock (1980) は、DBA/2J マウスを用いた優性致死試験により、2,4-DNT の変異原性作用を調べている。10～12 週齢のマウス 20 匹ずつの群を 2 つ設け、精製した 2,4-DNT を 250 mg/kg 体重の用量で、連続 2 日間、腹腔内投与 (IP) もしくは強制経口投与 (PO) した。また、10 匹のマウスからなる陽性対照群を 2 つ設け、125 mg/kg 体重のメタンスルホン酸エチル (PO) もしくは 0.15 mg/kg 体重のトリエチレンメラミン (IP) を、連続 2 日間投与した。さらに陰性対照群 (各群 5 匹ずつ) を設け、ハンクス平衡塩類溶液 (HBSS) を IP または PO により投与するか、あるいはコーン油を IP または PO により投与した。投与処置の 48 時間後、雄マウスを 12 週齢の雌の CD-1 マウス 3 匹と交配させた。雌マウスは 7 晩経過後、

別の3匹と交換した。この交配手順を、投与処置後、合計で7週間繰り返した。雌は、雄と番にされた最初の日から17日後に屠殺し、子宮内容を検査して、生存胎仔や着床後死亡についての観察を行った。着床数や着床後死亡の割合を統計学的に分析したが、250 mg/kg 体重の2,4-DNTをPOまたはIPで投与された群において、優性致死の増加が引き起こされたことを示す結果は得られなかった。陽性対照群では、着床総数の減少および着床後死亡の割合の上昇が、一貫して認められた。250 mg/kg 体重の2,4-DNTをPOまたはIPで投与されたマウスでは、一貫して受胎率の低下が認められ、この低下は、PO群では2、3および6週目において、PI群では2および4週目において有意であった。

Table 4.1.2.7.2-2: In vivo germinal mammalian cell genotoxicity studies with 2,4-DNT

Test	System	Dosage	Results	Comments	Reference
Dominant lethal	Charles River CD rats (males treated by feeding)	0.02 or 0.2% for 13 weeks. 93 mg/kg/day was the intake by the high level dose	A significant decrease of the implant viability index at 0.2% (no viable foetuses).	> 98% purity. The fertility index was significantly reduced at 0.2%, probably due to 2,4-DNT effect on spermatogenesis. Further testing is required to separate toxic effect from mutagenic effect.	Lee <i>et al.</i> , (1978)
Dominant lethal	Charles River CD rats (males treated by feeding)	0.02 or 0.2% for 10 weeks	A significant decrease of the implant viability index at 0.2% (no viable foetuses).	98% purity. The significant decreased fertility index at 0.2%, probably due to 2,4-DNT effect on spermatogenesis, casts doubt on the dominant lethal mutation effect.	Ellis <i>et al.</i> , (1979)
		0.0015, 0.01 or 0.07% for 13 weeks	No effects on implant viability	98% purity. No effects on fertility	
		0.15, 0.2 or 0.5% for 13 weeks	No viable foetuses from males fed 0.15 or 0.2%.	98% purity. Survived males fed 0.5% (3/15) did not mate; males fed 0.2 or 0.15% mated. ~2/3 and 1/3 of the plugs from males fed 0.2 and 0.15%, respectively, had no apparent sperm. These results indicate sterility.	

## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

Test	System	Dosage	Results	Comments	Reference
		0.07, 0.1 or 0.15% for 13 weeks with a recovery period of 13 weeks	Only one non-viable foetus in only one of the females mated to males fed 0.15%. Based on the lack of an effect on implant viability index, despite the drastic effect on implantation index, it is considered that 2,4-DNT did not induce dominant lethal mutations.	98% purity. A dose-related in both increased spermless vaginal plugs and decreased fertility. Atrophy or degeneration of testes seminiferous tubules and too few or no spermatozoa in nearly all males fed 2,4-DNT without recovery for those lesions.	
Dominant lethal	Sprague-Dawley rats (males treated orally). Mating lasted for 7 weeks except for the highest dose which was extended by 6 weeks to see the reversibility of effects.	60, 180 or 240 mg/kg/day for 5 days.	Negative for dominant lethal mutations.	Purity not given. Reproductive effects were observed among rats receiving 240 mg/kg/day, most noticeably the mating index of weeks 1-6, but these effects were slowly reversible.	Lane <i>et al.</i> (1985)
Dominant lethal	Albino Swiss mice (males treated by feeding)	0.2% (137 mg/kg/day) for 13 weeks or 0.7% (332 mg/kg/day) for 4 weeks.	Negative for dominant lethal mutations	> 98% purity. 0.7% 2,4-DNT greatly reduced the fertility index due to a majority of the females having no implants.	Lee <i>et al.</i> (1978)
Dominant lethal	DBA/2J mice (males treated i.p or by gavage). Mating lasted for 7 weeks.	250 mg/kg for 2 days	Negative for dominant lethal mutations	Purified 2,4-DNT. Decreases in fertility were significant in weeks 2, 3 and 6 (mice treated by gavage and weeks 2 and 4 (mice treated i.p.)	Soares and Lock (1980)

## 4.1.2.7.3 他の情報

Soares and Lock(1980)は、DBA/2J マウスを用いて、2,4-DNT が精子に異常を引き起こす能力を調べた。上述の優性致死試験の結果を受けて、精子への異常誘発性を調べる試験においては、以下の様な群設定が選択された。10～12 週齢のマウス 20 匹ずつの群を 2 つ設け、精製した 2,4-DNT を 250 mg/kg 体重の用量で、連続 2 日間、腹腔内投与(IP)もしくは強制

経口投与(PO)した。また、10匹のマウスからなる陽性対照群を2つ設け、0.15 mg/kg 体重のトリエチレンメラミン(TEM)を連続2日間(IP)投与した。さらに陰性対照群(各群5匹ずつ)を設け、ハンクス平衡塩類溶液(HBSS)をIPまたはPOにより投与するか、あるいはコーン油をIPまたはPOにより投与した。投与処置の48時間後、雄マウスを12週齢の雌のCD-1マウス3匹と交配させた。雌マウスは7晩経過後、別の3匹と交換した。この交配手順を、投与処置後、合計で7週間繰り返した。最後の交配期間が終了した後(すなわち投与処理8週間後)に、各用量群のマウス10匹の輸精管から精子を採取した。どの群のものか判らないように標本に符号を付し、形態学的に異常な精子の割合を計測した。形態学的に異常な精子の割合は、2,4-DNTの投与を受けたマウスにおいて、対照群の値と比べて有意な増加を示さなかった。TEMの投与を受けたマウスでは、異常な精子の割合の平均値が増加したが、この増加は有意なものではなかった。

#### 4.1.2.7.4 変異原性の要約

2,4-DNTの遺伝毒性は、遺伝子突然変異、染色体異常、DNA損傷、DNA付加体形成などを指標として、*in vitro* および *in vivo* 試験により、広範に検討されている。

細菌を用いた試験で得られたデータからは、2,4-DNTが、標準的な条件において、ネズミチフス菌に対し、ラット肝代謝活性系の存在下および非存在下のいずれにおいても、弱いが明らかに変異原性を示すことが示されている。活性化条件または細菌固有の代謝プロファイルに変更を加えた様々な試験では、より顕著に変異原性が示されている。例えば、2,4-DNTは、標準的なプレート法を用いた場合、ラット肝S9の存在下でも非存在下でもTA98に対して変異原性を示さなかったが、ハムスターS9を用いたプレインキュベーション変法においては、フラビンモノヌクレオチド依存性の明確な変異原性を示した。この結果から、2,4-DNTの変異原性を最も良く検出するには、細胞外でのニトロ基還元が必要であることが示唆される。代謝活性系が無い条件では、最も強い変異原性活性は、ニトロ還元酵素とO-アセチルトランスフェラーゼの両方の活性が親菌株(TA98株およびTA100株)より高くされた菌株(YG1041株およびYG1042株)で認められており、2,4-DNTが変異原性を示すには、両酵素の活性が高いことが求められることを示唆している。細菌が2,4-DNTを代謝して生成する物質を被験物質とした場合も、代謝活性系の非存在下で変異原活性がもっとも強く現れたのは、YG1041株およびYG1042株であった。相対的な変異原活性は、YG1041株については $4A2NT < 2A4NT < 2,4-DNT < 4HA2NT < 2,2'-DM-5,5'-DNAOB = 2HA4NT \ll 4,4'-DM-3,3'-DNAOB$ の順であり、YG1042株については $4A2NT < 2A4NT < 2,4-DNT < 4HA2NT = 4,4'-DM-3,3'-DNAOB < 2HA4NT$ の順であった。これらの知見から、ヒドロキシルアミノニトロトルエンの還元もしくはジメチルジニトロアゾキシベンゼンの

の還元によりアミノヒドロキシルアミノジメチルアゾキシベンゼンやアミノヒドロキシルアミノジメチルアゾベンゼンが生成し、これらが細菌における 2,4-DNT の変異原性を担う活性代謝産物になっているものと考えられる。DNA 損傷に関しては、2,4-DNT はネズミチフス菌 *umu* テストにおいて遺伝毒性を示している。突然変異試験では、最も感受性が高かった菌株は、ニトロ還元酵素と *O*-アセチルトランスフェラーゼの活性が高い NM3009 株であった。

2,4-DNT は、CHO/HGPRT 系においては、ラット肝 S9 が存在する通常の(好気性)試験条件下の場合、変異原性を示さなかった。しかし、CHO 細胞とラット肝 S9 が存在する嫌気性(低酸素分圧)条件下でインキュベートした場合、および代謝活性系としてラット肝初代培養細胞を用いた場合には、変異原性を示した。さらに、P388 マウスリンフォーマ/TK 系においては、直接作用による変異原性を示した。染色体異常誘発能に関しては、相反する結果が得られている。ある試験では、純度 99%の 2,4-DNT は、CHO 細胞に対し(S9 存在下および非存在下で)染色体異常誘発能を示していない。他方、別の試験 2 件では、用いられた 2,4-DNT の純度は不明だが、用いたヒトのリンパ球(S9 非存在下で)ならびに CHL 細胞(S9 存在下および非存在下で)において、染色体異常の誘発が認められている。DNA 損傷能に関しては、CHO 細胞を用いてラット肝 S9 の存在下で試験した場合、2,4-DNT は姉妹染色分体交換を誘発している。ラットの細胞(肝細胞、精母細胞および精子細胞)またはヒトの細胞(肝細胞)と 2,4-DNT をインキュベートして、不定期 DNA 合成試験が行われているが、陽性の証拠は得られていない。2,4-DNT に遺伝毒性活性が見られなかったことは、活性化のためには肝臓での代謝に加えて腸内細菌叢による還元が必要であるという推論と整合している。また、純度不明の 2,4-DNT を用いてラット肝細胞/アルカリ溶出試験が行われているが、細胞毒性が示された濃度で DNA 損傷(一本鎖切断)を引き起こすと報告されている。

硬質ゼラチンに入れられた 2,4-DNT(10 mg/kg 体重/日)を 2 年間投与されたイヌでは、骨髄や腎臓に染色体異常は認められなかった。雌雄のラットに最高 45 mg/kg 体重/日の用量で 2 年間 2,4-DNT を混餌投与した場合にも、骨髄および腎臓のいずれにおいても染色体異常の誘発は認められなかった。しかし、雄ラットに 93 mg/kg 体重/日の用量で 2,4-DNT を 19 週間混餌投与した場合には、リンパ球において染色体異常(染色分体切断)が誘発され、また、投与開始 5 および 13 週間後には、染色分体切断の有意な増数が認められた。染色分体切断の数は、投与期間の経過とともに増加した。DNA 損傷に関しては、雄ラットに 200 mg/kg 体重の 2,4-DNT を強制経口投与した場合に、不定期 DNA 合成の誘発が認められている。DNA との共有結合は、150 mg/kg 体重の 2,4-DNT を単回腹腔内投与されたラットの様々な臓器(肝臓、腎臓、肺および乳腺)で認められており、最も多く認められた臓器は肝臓であった。ラットに 2,4-DNT を強制経口投与した場合でも腹腔内投与した場合でも、肝臓

における DNA 共有結合量は同等であった。硫酸転移酵素阻害剤は、DNA との共有結合を減少させた。このことから、2,4-DNT が反応性の代謝産物に生体内変換されることにおいて、硫酸化が重要であることが示された。

キイロショウジョウバエを用いた試験では、2,4-DNT の注射により伴性劣性致死突然変異が誘発されたが、混餌投与では致死突然変異は誘発されず、注射の場合も転座は誘発されなかった。

雄ラットに 0.2% の濃度で 10 週間 (Lee *et al.*, 1978) もしくは 13 週間 (Ellis *et al.*, 1979 による 1 件目の試験) 混餌投与した場合には、生存着床指数の減少が認められ、変異原性を有することが示唆された。しかし、受胎指数の減少は、おそらく 2,4-DNT が精子形成に影響を及ぼしたことによるものと考えられ、変異原性を有するとする解釈に疑義が生じるところである。このため、Ellis *et al.* (1979) は追試を行い、受胎指数を減じることなく生存着床指数を減じる 2,4-DNT の投与濃度が存在するかどうかを確かめている。その追試の結果、生存着床指数と不妊には、密接な相関関係があることが示された。したがって、入手できたあらゆる情報を考慮すると、2,4-DNT は、ラットへの 5 日間強制経口投与あるいは 13 週間混餌投与では、優性致死突然変異を誘発しないと結論付けられる。2,4-DNT を 2 日間 (強制経口) または最長 13 週間 (混餌) 投与されたマウスでも、優性致死突然変異に関して陰性の結果が得られている。さらに、2,4-DNT はマウスにおいて、精子の異常を誘発しなかった。

証拠の重みづけから、2,4-DNT は *in vivo* で体細胞に対して変異原性を示すと結論付けられる。したがって、2,4-DNT は、カテゴリ-3 (Xn, R68) の変異原性物質に分類される。

化学物質をカテゴリ-3 に分類するという結論を導く根拠となった試験結果は、発がん活性の可能性を警告する性質のもののみなされる。このことを考慮すると、2,4-DNT の尿中代謝産物を用いた変異原性試験から得られた情報は、2,4-DNT のがん誘発機序を明らかにする上で有用であると考えられる。

2,4-DNT の尿中代謝産物の変異原性については、ネズミチフス菌/マイクロソームテストで検討されている。2A4AAT、2A4NB、4A2NB、2,4-DAT、2,4-DNB および 2,4-DNA1 は、2,4-DNT よりも強い変異原性を示し、ここに記載した順番が後の方ほど強度が高かった。これらの中で、2,4-DAT (S9 の存在下においてのみ変異原性を示した) は、ラットにおいて肝がん誘発性を示すことが明らかになっている。2,4-DNB および 2,4-DNBA は 2,4-DNT の主要な代謝産物であることから、2,4-DNA1 (2,4-DNT の代謝産物であると推測される) が、2,4-DNB から 2,4-DNBA への酸化において中間代謝物となっている可能性が強くと示唆される。したがって、2,4-DNT が代謝的変換を受けて 2,4-DNB、2,4-DNA1 および既知の発がん性物質である 2,4-DAT を生成することが、2,4-DNT によるがん誘発に寄与している可能性が示



唆される。

3種類の尿中代謝産物(2,4-DAT、2A4NTおよび4A2NT)が、*in vivo*でDNA付加体形成を誘発した。これらの物質からは、2,4-DNTから生成するのと同じ、3つの付加体が生成した。2,4-DATで生成した付加体の量は、ニトロ基が置換された他の2種類の化合物からそれぞれ生成した付加体の量よりも有意に多かった。2A4NTや4A2NTから生成した付加体の量は、2,4-DNTから生成した付加体の量と同等であった。2,4-DNTの生体内変換については、腸内細菌叢によるニトロ基の還元を含む、複雑な代謝経路が提唱されている。2A4NTおよび4A2NTは、2,4-DNTの還元における主要な中間化合物である。肝臓ではその後反応が進んで、DNAと結合する最終的な化学物質が生成される。上述の様に、4種類の化合物が同じ付加体を形成していることから、これらの付加体は、それらの化合物が他の共通の代謝中間物質に変換されることで生成されている可能性がある。2,4-DNTや2種類のアミノトルエン化合物から生成する付加体の量は比較的少なかったが、これは、それらの化合物から反応性の化学物質が生成するまでに複雑な代謝があることを反映している可能性がある。結論的には、得られた結果から、2,4-ジアミノトルエンと2,4-ジニトロトルエンの間でみられた発がん性の差は、一つにはDNA付加体形成の程度に量的な差があるということの説明付けできると考えられる。

#### 4.1.2.8 発がん性

##### 4.1.2.8.1 動物試験

###### In vivo 試験

###### 吸入

データは、得られていない

###### 経皮

データは、得られていない

###### 経口

発がん性については、Fisher 344 ラットや B6C3F1 マウスを用いて OECD ガイドライン 451 と同等の方法論を採用して行われた数少ない経口試験から、情報が得られている。

## ラット

### NCI(1978)の試験

雌雄 50 匹ずつのラットに、2,4-DNT(95%を超える純度)が、80 ppm の濃度(低用量群)で 18 ヶ月間混餌投与された。また、別の雌雄 50 匹ずつのラットに、標準飼料が 18 ヶ月間与えられた(低用量対照群)。80 ppm の混餌投与を受けていたラットが期待していたような体重低下を示さなかったため、51 週後に新たな雌雄 50 匹ずつの群を設け、2,4-DNT を 200 ppm の濃度で(高用量群)混餌投与し始め、また新たな対照群も設けた(高用量対照群、雌雄 25 匹ずつ)。高用量群も混餌投与期間は 18 ヶ月間であった。NCI の試験では、2,4-DNT の用量が飼料中濃度で報告されているため、生物学的パラメーターに関してデフォルトの参照値を用い、体重換算の推定用量を算出した(技術指針書、第 2 章、附属書 VI)。

$$D_{b.w.} = \frac{D_{diet} \cdot 0.040 \cdot W^{0.479}}{W}$$

$D_{b.w.}$  体重で換算した用量(mg/kg 体重/日)、 $D_{diet}$  飼料中濃度(ppm)、 $W$  体重(kg)

低用量は、雄で 4.7 mg/kg 体重/日、雌で 6.3 mg/kg 体重/日に、高用量は、雄で 34 mg/kg 体重/日、雌で 15.7 mg/kg 体重/日に相当していた。投与期間後も、ラットの観察は 26 週間続けられた。この発がん性試験は、OECD のガイドライン 451 に準拠して実施されている。

被験物質投与群の雌雄の生残率には、対応する対照群の値との有意差は認められなかった。体重に関しては、高用量群の雄では、対応する対照群の値よりも約 25%の低下が示され、高用量群の雌では対応する対照群の値よりも約 10%の低下が示された。

原発性の腫瘍の発生率が調べられた(Table 4.1.2.8.1-1)。対照群では外皮の腫瘍は認められなかったが、被験物質投与群の雄では、皮膚/皮下組織の線維腫の発生率が、用量依存的に有意に増加していた。以下の腫瘍が散発的に認められた。扁平上皮乳頭腫(低用量群の 1/49 匹)、基底細胞がん(低用量群の 1/49 匹)、線維肉腫(低用量群の 1/49 匹および高用量群の 2/49 匹)、および脂肪腫(高用量群の 3/49 匹)。低用量群および高用量群の雄では、肝細胞がんの発生率が、それぞれの対応する対照群よりもわずかに増加していた。ただし、この増加は統計学的に有意ではなかった。

Table 4.1.2.8.1-1: Incidence of primary tumours in male Fischer 344 rats treated with 2,4-DNT for 18 months over a 24-month observation period (NCI, 1978)

	Dose (mg/kg b.w./d)			
	Low dose		High dose	
	0	4.7	0	11.8
Hepatocellular carcinoma	0/45	3/49	0/25	3/48
Fibroma (Subcutaneous tissue or skin)	0/46	7/49 <sup>a</sup>	0/25	13/49 <sup>a</sup>
Lipoma (Subcutaneous tissue)	0/46	0/49	0/25	3/49
Islet-cell adenoma or carcinoma Pancreatic islets	1/45	3/45	2/25	3/48
Leukemia (hematopoietic system)	3/46	4/49	4/25	3/49
Adenoma NOS or basophil adenoma (Pituitary)	9/44	5/44	3/21	0/35
Pheochromocytoma (adrenal)	6/45	3/46	2/25	6/45
C-cell adenoma or C-cell carcinoma (Thyroid)	3/42	3/41	0/23	5/47
Interstitial-cell tumour (testes)	44/45	43/46	19/24	46/49

<sup>a</sup> Significantly different from controls (p < 0.05)

高用量群の雌では、乳腺線維腺腫の発生率が、対照群よりも有意に増高していた (Table 4.1.2.8.1-2)。低用量群および高用量群における肝細胞がんの発生率は、それぞれの対応する対照群と比較してみても、有意な増加を示していなかった。

Table 4.1.2.8.1-2: Incidence of primary tumours in female Fischer 344 rats treated with 2,4-DNT for 18 months over a 24-month observation period (NCI, 1978)

	Dose (mg/kg b.w./d)			
	Low dose		High dose	
	0	6.3	0	15.7
Hepatocellular carcinoma	1/47	0/49	0/23	1/50
Fibroma (Subcutaneous tissue or skin)	0/48	0/49	0/23	3/50
Fibroadenoma (mammary gland)	9/48	12/49	4/23	23/50 <sup>a</sup>
Leukemia (hematopoietic system)	2/48	2/49	2/23	4/50
Adenoma NOS or chromophobe adenoma (Pituitary)	19/46	22/45	8/21	14/40
Pheochromocytoma (adrenal)	2/47	2/49	2/23	0/50
C-cell adenoma or C-cell carcinoma (Thyroid)	2/45	2/45	3/21	6/48
Endometrial stromal polyp (uterus)	15/46	14/47	6/23	11/49

<sup>a</sup> Significantly different from controls (p < 0.05)

被験物質群と対照群との間で、非腫瘍性病変、変性病変、増殖性病変および炎症性病変に関しては、有意な差は認められなかった。

## マウス

### NCI(1978)の試験

雌雄 50 匹ずつの B6C3F1 マウスに、2,4-DNT(95%を超える純度)が、80 ppm の濃度(低用

量群)で18ヵ月間混餌投与された。また、別の雌雄50匹ずつのB6C3F1マウスに、標準飼料が18ヵ月間与えられた(低用量対照群)。80 ppmの混餌投与を受けていたマウスが期待していたような体重低下を示さなかったため、29週後に新たな群を設け、2,4-DNTを400 ppmの濃度で(高用量群)混餌投与し始め、また新たな対照群も設けた(高用量対照群、B6C3F1マウス雌雄50匹ずつ)。高用量群も混餌投与期間は18ヵ月間であった。

NCIの試験では、2,4-DNTの用量が飼料中濃度で報告されているため、生物学的パラメータに関してデフォルトの参照値を用い、体重換算の推定用量を算出した(技術指針書、第2章、附属書VI)。

$$D_{b.w.} = \frac{D_{diet} \cdot 0.064 \cdot W^{0.7242}}{W}$$

$D_{b.w.}$  体重で換算した用量(mg/kg 体重/日)、 $D_{diet}$  飼料中濃度(ppm)、 $W$  体重(kg)

低用量は、雄で12.0 mg/kg 体重/日、雌で12.9 mg/kg 体重/日に、高用量は、雄で60.2 mg/kg 体重/日、雌で64.5 mg/kg 体重/日に相当していた。投与期間後も、マウスの観察は13週間続けられた。この発がん性試験は、OECDガイドライン451に準拠して実施されている。

2,4-DNTの投与は、いずれの用量でも、観察期間期間中における雌雄のマウスの生残率に影響を及ぼさなかった。試験終了時の体重増加量は、それぞれの対照群(100%)と比較して、雄では低用量群で91%および高用量群で82%、雌では低用量群で89%および高用量群で76%であった。原発腫瘍の発生率には、被験物質投与群と対照群との間で有意な差は認められなかった。

この試験は、実質的にOECDのガイドライン451に沿って実施されており、リスク評価に適切なものであると判断された。

### 他の情報

この項の以下の記載は、OECDガイドライン(451または453)やGLPに準拠して実施されおらず、発がん性を調べるのには不適切であると考えられる試験についてのものである。

## ラット

### 経口

#### Graichen and Popp(1987)の試験

肝臓がん誘発能を判定する目的で、2,4-DNT(純度 99.9%)が、28 匹の雄の Fischer 344 ラットに 12 ヶ月間混餌投与(27 mg/kg 体重/日)された。混餌投与の 6 週間後と 6 ヶ月後に、4 匹から肝臓のミクロソームとサイトゾルの試料を調製した。12 ヶ月後、残りの 20 匹のラットから血液試料を採取して GGT および ALT を測定し、さらに肝臓と肺の組織学的検査を実施した。この試験は、専門家による査読が行われる雑誌に公表されている。

被験物質投与群の体重は、試験終了時、対照群よりも約 25%低下していた。さらに、6 ヶ月時と 12 ヶ月時において、被験物質投与群のラットの肝臓重量は有意に上昇していた。早期死亡例は認められなかった。12 ヶ月の時点で被験物質投与群のラット 1 匹が、肝臓の腫瘍性結節を有していたが、対照群では肝臓の腫瘍は全く検出されなかった。非腫瘍性病変に関しては、被験物質投与群のラットで、肝細胞変性と空胞化が認められた。肝臓ではさらに、被験物質投与群の 70%好酸性細胞病巣が、10%で好塩基性細胞病巣が観察されたが、対照群ではこれらの種類の病巣はどちらも認められなかった。肝臓のエポキシドオキシダーゼ(EH)活性の有意な増加が、被験物質投与群の 6 ヶ月時においてのみ認められた(対照群の活性値の約 200%、 $p < 0.05$ )。

この試験は、使用された動物の数が少なく、被験物質投与期間が短く、組織学的検査も不十分であるため、発がん性を評価するには質が低い。

#### Leonard, Lyght and Popp(1983)の試験

雄の CDF® (F344)/Cr1BR ラットに 2,4-DNT(純度 99.4%以上、75 mg/kg 体重)が単回投与され、肝臓の部分切除も合わせて行なわれた試験において、肝臓でのイニシエート-プロモート手法を用いて分析が行われたが、肝細胞に腫瘍のイニシエートは認められなかった。

#### Leonard, Adams and Popp(1986)の試験

ラット肝細胞イニシエート-プロモート手法を用いて、工業用 DNT の相対的な肝細胞病巣誘発性を測定した。CDF® (F344)/Cr1BR ラットの雄に、ジエチルニトロソアミンでのイニシエート処置(150 mg/kg 体重)を施した後、2,4-DNT(27 mg/kg 体重/日)が混餌投与された。混餌投与開始 6 週間後、GGT<sup>+</sup>病巣の数(1 cm<sup>3</sup> 当たり)および肝臓の部位の平均容量(右前葉、中葉および右後葉)が、2,4-DNT だけを混餌投与されたラットやフェノバルビタール(飼料

中濃度 500 ppm)だけを混餌投与されたラットと比べ、有意に増高していた。ジエチルニトロソアミンでイニシエート処置を受け 2,4-DNT を混餌投与されたラットでは、混餌投与開始 12 週間後においても、GGT<sup>+</sup>病巣の数と肝臓の部位(右前葉および右後葉)の平均容量の両方が、2,4-DNT だけを混餌投与されたラットやフェノバルビタールだけを混餌投与されたラットと比べ、有意に増高していた。さらに、ジエチルニトロソアミンでイニシエート処置されて 2,4-DNT を混餌投与されたラットの肝臓の中葉における病巣数は、ジエチルニトロソアミンでイニシエート処置された対照群のラットにおける数よりも多かった。ただし、その差は統計学的に有意ではなかった(1 cm<sup>3</sup> 当たり、イニシエート処置され対照群のラットでは 201 ± 154 個であったのに対しイニシエート処置の後 2,4-DNT を投与されたラットでは 536 ± 216 個)。これらの結果から、著者は、2,4-DNT で観察されたプロモート効果は、既知のプロモーターであるフェノバルビタールで得られる効果と同等であると判定した。

## マウス

### 経皮

#### Slaga *et al.* (1985) の試験

被験物質の純度は、98% (不純物 2-NT および 2,6-DNT) から 92~95% (不純物 2,6-DNT) にわたっていた。GLP 適合に関しては、データが得られていない。この腫瘍イニシエート試験では、TPA (12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート) をプロモータとして用いるイニシエート-プロモート法が実施された。Spencer マウスに 2,4-DNT を単回投与(局所または腹腔内)投与(1, 5 ないしは 10 mg/kg 体重)してイニシエートが行われた。このイニシエートの後、4 µg の TPA が、プロモート処置として、週 1 回で 30 週間投与された。被験化合物は、皮膚腫瘍イニシエータとしての効力を有していないことが判明した。しかし著者は、組織学的検査の結果から、2,4-DNT が皮膚腫瘍プロモート活性を有している可能性が示唆されると指摘している。その根拠は、5 または 10 mg/kg 体重の用量で 2,4-DNT が投与された場合に生じた増殖性反応や細胞の暗色化反応が、1 µg の TPA 投与で得られる最大の反応と同等であったことである。一方、Sencar マウスを用い、至適な発がんプロトコルに則って、2,4-DNT (1, 5 ないしは 10 mg/kg 体重) を週 1 回で 52 週間投与した試験では、皮膚腫瘍は誘発されなかった。各群に割り当てられた動物の数は示されていない。

## 経口

### Stoner *et al.* (1984) の試験

A 系統のマウスを用いて肺腫瘍に関する生物試験が行われている。A/J マウスに、2,4-DNT (92~95%、主要な不純物として 2,6-DNT を含有)が、50、125 ないしは 250 mg/kg 体重の用量で、週 2 回、12 週間経口投与されたが、肺腫瘍誘発性は陰性であった。

## 腹腔内

### Schut *et al.* (1982b) の試験

A 系統のマウスを用いて肺腫瘍に関する生物試験が行われている。雄の A/Jax マウス(各用量群 52 匹ずつ)に、2,4-DNT(99.4%を超える純度)が、25、62.5 ないしは 25 mg/kg 体重の用量で、週 3 回、8 週間腹腔内投与された。全ての被験動物は、最後の投与から 22 週間観察された。この生物試験では、2,4-DNT に反応して生じた肺腫瘍の平均数(マウス 1 匹当たり)に、対照群で観察された数値との有意差は認められなかった。

### Maronpot *et al.* (1983) の試験

Maronpot *et al.* (1983) は、A/Jax マウスを用いて、2,4-DNT の経口投与ないしは腹腔内投与による肺腫瘍の生物試験を行い、陰性結果を報告しているが、雌の A/St マウスを用いた試験では、陽性結果を報告している。

### Slaga *et al.* (1985) の試験

肺腫瘍に関する生物試験を行っている。各群 30 匹ずつの A 系統に、2,4-DNT を週 3 回、連続 8 週間腹腔内投与した。全ての被験動物について、最後の投与から 16 週間の経過観察を行った。2,4-DNT の用量設定は、1200、600 および 240 mg/kg 体重であった。このマウス肺腫瘍生物試験で設定された 2,4-DNT のいずれの用量においても、明確な陽性反応は示されなかった。

### Stoner *et al.* (1991) の試験

2,4-DNT を含めた主要な化学物質の発がん性を調べるために行われた、A 系統のマウスを用いた肺腫瘍に関する生物試験の結果を要約している。このレビューでは、2,4-DNT は陰性と判定されている。

### In vitro 試験

データは、得られていない。

#### 4.1.2.8.2 ヒトにおけるデータ

##### Stayner *et al.* (1993) の調査

ある軍需施設の DNT に曝露された 4,989 人の従業員と曝露されていない 7,436 人の従業員を対象として、後向きコホート調査が実施されている。この調査は、肝臓がんおよび胆管がんの両方のリスク増高に DNT への曝露が関与しているという仮説を検証するために行われた。調査対象の施設では、約 98% の 2,4-DNT と約 2% の 2,6-DNT を含む、精製された状態の DNT が用いられていた。調査対象者は、1949 年の 1 月 1 日から 1980 年の 1 月 21 までの間に、最低でも 5 ヶ月間、調査対象施設で働いていた従業員であった。DNT への曝露量についての定量的測定データは、得られなかった。その代わりに業務を 3 種類に分類した。すなわち、DNT におそらく曝露される作業に 1 日以上従事する必要のあるもの、曝露を受ける可能性があるもの、そして、全く DNT に曝露されないものである。曝露を受ける可能性があるに分類される業務に就いていた従業員は、この調査の対照からは除かれた。分析項目には、米国における割合を基にした標準化死亡比 (standardized mortality ratio, SMR)、曝露を受けた人のコホートと曝露を受けていない人のコホートとの間で直接比較して算出した標準化率比 (standardized rate ratio, SRR)、および 95% 信頼区間 (CI) が含まれていた。

DNT に曝露された従業員では、肝胆道がんでの死亡数 (6 例) が、曝露を受けなかった従業員での死亡数 (4 例) と比較して有意に多かった (SRR = 3.88, 95% CI = 1.04,  $p = 0.04$ )。間接比較においては、肝胆道がんに関する SMR は、米国人の集団と比較すると、2.67 であった (95% CI = 0.98-5.83,  $p = 0.052$ )。さらに、DNT への曝露期間と胆管がんによる死亡との間には、関連性は認められなかった。

この分析結果の意義は乏しい。肝胆道がんの例数は、DNT への曝露を受けたコホートにおいても曝露を受けていないコホートにおいても少なかった。曝露期間についても、おそらく DNT への曝露があったとされる業務に 5 年以上従事していたのは、コホートの人年のうちわずか 7% (6,430/98,673) であった。さらに、わずかな曝露しか受けていない従業員もおそらく曝露を受けていたとされる群に分類されており、これでは DNT 曝露に関連するリスクを低く見積もってしまう可能性がある。肝胆道がんのリスク要因に関しては、DNT への曝露を受けたコホートと受けなかったコホートとの間の直接比較で重大な相違は認めら



れず、さらに DNT への曝露を受けた従業員と参照集団との間の間接比較でも重大な相違は示されなかった。しかし、DNT への曝露を受けなかったコホートの方が、米国の全般的な集団よりも、曝露を受けたコホートとの同等性が高いと思われたため、SRR での比較の方が、間接的な標準化法よりも適切であると考えられた。DNT への曝露履歴があり、肝胆道がんを発症した人の医療記録からは、そのがんの発症を説明付けるリスク要因は明らかにならなかった。例外として、曝露履歴があつて肝臓がんを発症した人の中に、以前に輸血後肝炎と肝硬変を罹患していた人が 1 名おり、この場合は、そうした病歴が肝臓がんの発症に寄与した可能性がある。

この調査では、従業員が精製 2,4-DNT に曝露されると思われる職務に就いていたことと肝胆道がんの過剰とを関連付けている。しかし、曝露量の推定も測定も実施されていない。したがって、曝露を受けた従業員に占める、多量の 2,4-DNT を吸収した人の割合は不明であり、そのため、2,4-DNT への曝露と肝胆道がんとの間の関連性を確定するためには、証拠として不十分である。しかし、この調査では DNT に曝露された従業員において肝胆道がんによる死亡率が過剰であり、このことは、動物を DNT に曝露した試験で得られた知見と整合している。したがって、この調査は、DNT への職業曝露ががんを誘発する可能性があるという仮説にいくらか支持を与えている。

#### Brüning *et al.* (1999) の調査

1984～1997 年の間に、旧東ドイツ (GDR) の銅採掘工場の地下採掘工 500 人からなる群において、尿路上皮がんの症例が 6 件、腎細胞がんの症例が 14 件発生した。これらのがん 20 症例と代表的な標本 ( $n = 183$ ) について記述的調査を行い、工業用 DNT を含む火薬への曝露とがんの発生について論述を行った。それらのがんの症例と 183 人の採掘工からなる代表的標本とを、がんの登録簿、健康状態の記録、標準的な検診記録および各人への問診といった情報源を活用して綿密に調査した。さらに、喫煙歴、腎臓病罹患歴、および近親者における腎臓病罹患歴とがん罹患歴が記録された。曝露に関しては、1950 年代の初頭からは、Donarit という棒状の爆薬が排他的に使用されていたことが判っている。Donarit は、約 75% の 2,4-DNT および 20% の 2,6-DNT からなる工業用 DNT を、約 30% 含んでいた。鉱山の鉱石層はとても狭く、高さ 70 cm が標準的であったため、採掘工は、過酷な労働条件下で働き、DNT を含む爆薬を取り扱わなくてはならなかった。また、供給されていた Donarit は長い棒状の形でのみ製造されていたため、使用時にはそれを手で折って小さくするということが行われていた。この行為は普段から、皮膚をなんらかの形で保護することなく、素手で行われていた。DNT への曝露に関して定量的な測定データは得られなかった。その代わりに、曝露の状況を、その様式と業務上 DNT に接していた期間に基づいて分類した。採掘工は、2 つの経路により曝露を受けていた。すなわち、爆発後の煙の吸入と、

DNT を含有する爆薬棒の取り扱い、掘削孔への爆薬棒の設置および爆発物の積み下ろしの際の直接的な皮膚接触である (Table 4.1.2.8.2-1)。

Table 4.1.2.8.2-1: Scoring system for semiquantitative levels of exposure (Brüning *et al.*, 1999)

Exposure	Frequency of exposure	Points <sup>a</sup>
<i>Skin Contact</i>		
A	Occasionally	1
B	Regularly, ie, at least three times per week, for less than 4 hours each time	2
C	Regularly, ie, at least three times per week, for more than 4 hours each time	3
<i>Exposure due to inhalation</i>		
D	Occasionally	1
E	Regularly, ie, at least three times per week	2

<sup>a</sup>For every 10-year period started

これに基づいて、職務が 4 種類に分類された。すなわち、低曝露 (0~4 ポイント)、中曝露 (5~8 ポイント)、高曝露 (9~12 ポイント) および超高曝露 (13 ポイント以上) である。加えて、腫瘍を有していることが判明した患者の遺伝子型を、ポリメラーゼ連鎖反応法で調べた。そのために、ゲノム DNA をリンパ球から分離した。多型性グルタチオン転移酵素の GSTM1 と GSTT1、および N-アセチルトランスフェラーゼの NAT2 について、遺伝子型を決定した。文献には統計学的解析についての記載は無かった。著者が標準化死亡比や標準化罹患比 (SMR) を算出したかどうかを確認することはできなかった。

健康状態についての記録に保管されていて存在するものがあり、それらにより、以前に DNT に曝露されたことのある合計 500 人の採掘工の中に、腎細胞がんが 14 症例 (12 例は明細胞型、2 例は色素好性型) と、尿路上皮がんが 6 症例 (5 例は膀胱がん、1 例は腎盂の移行上皮がん) 見つかった。これら 20 例のがん患者の健康状態記録の中には、DNT への曝露に関連した臨床症状についての情報は見当たらなかった。DNT への曝露を受けていた人たちを代表する群の約 25% で、健康状態記録から、肝臓障害 (すなわち血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼおよび  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼの上昇)、貧血および呼吸障害の徴候が示唆された。DNT への曝露状況の区分に関しては、DNT 曝露歴があり腎がんを発症した 14 例について分類を行ったところ、183 人の採掘工からなる代表群における分類結果 (低曝露 23 人 12.6%、中曝露 78 人 42.6%、高曝露 52 人 28.4% および超高曝露 30 人 16.4%) と相同という結果が得られた。したがって、DNT への曝露と腎細胞がんとの間に関連性があるという結論には達しなかった。尿路上皮がんの症例は、高曝露群に集中していた (中曝露群 1 人、高曝露群 4 人 および超高曝露群 1 人)。ここで、超高曝露群での尿路上皮がんの症例は 1 件だけであること、および尿路上皮がんの 6 症例の全員が喫煙者であったことに留意する必要がある。多型性酵素

GSTM1、GSTT1 および NAT2 の遺伝子型に関しては、尿路上皮がんの 6 症例の全員が、アセチル化遅行表現型(NAT2)であることが判明した。2,4-DNT の生体内変換では、片方または両方のニトロ基が還元されてアミノトルエンやジアミノトルエンになる可能性がある。この点は重要である。なぜなら、芳香族アミンへの職業曝露によるヒトの膀胱がんの発生機序に関して、NAT2 によるアセチル化が解毒の 1 段階であると考えられるからである。GSTM1 と GSTT1 の遺伝子型の分布は、通常のドイツ人集団と同等であった。著者は、考察において、「腎細胞がんとう路上皮がんの標準化発生率は、旧東ドイツのがん登録簿によると、それぞれ 14.5 および 19.1 である」と述べている。さらに、「この調査におけるがん症例の検出率からすると、腎細胞がんのリスクとう路上皮がんのリスクは、それぞれ 4.5 倍および 14.3 倍に高まっていることになる」と述べている。しかし、彼らは、旧東ドイツの集団に基づく予想症例数、標準化死亡比(SMR)とその信頼区間、および統計学的検定での有意性に関して、算出を行ったのか、行ったのであればどのように算出したのかについて言及していない。さらに、検出されたがんの症例数が少ないため、この調査は限定的である。

この調査では、工業用 DNT に曝露された採掘工において、尿路上皮がんとう腎細胞がんの両方が過剰であったとしている。しかし、適切な統計学的分析を欠いているため、ヒトについて論じられている腎細胞がんおよび尿路上皮がんとう 2,4-DNT への曝露の関連性が、妥当なものであるかどうか疑義が残る。また、この調査で取り上げた例では、相当量の 2,6-DNT への曝露も生じている。したがって、2,4-DNT への曝露とう 2,4-DNT に関連したがん誘発との間に関連性を確立するには証拠が不十分である。だが、この調査で検出された腎細胞がんおよび尿路上皮がんは、マウスを 2,4-DNT に曝露した場合に見られたがんと同様であった。そのため、この調査は、2,4-DNT への職業曝露ががんを誘発する可能性があるという仮説にいくらか支持を与えている。

#### 4.1.2.8.3 発がん性の要約

##### ヒトのデータ

妥当性のある試験のデータは、得られていない。しかし、2 件の調査で DNT に曝露された従業員におけるがん死亡率の過剰が認められており、これらの知見が実験動物を DNT に曝露した試験から得られた知見と同等であることから、DNT への職業曝露ががんを誘発する可能性があるという仮説にいくらか支持が与えられている。これらの調査では、従業員が精製 2,4-DNT あるいは工業用 DNT に曝露されると思われる職務に就いていたことを、それぞれ肝胆道がんあるいは尿路上皮がんおよび腎細胞がんの過剰と関連付けて捉えている。

したがって、これらの調査は、DNT への職業曝露ががんを誘発する可能性があるという仮説をある程度支持している。

## ラット

ラットを用いた適切な 2 件の試験の情報 (Table 4.1.2.8.3-1) が得られており、それらのうち一方は、慢性毒性試験である。この慢性毒性試験のデータは、発がん性に関しても重要であるとみなされた。その慢性毒性試験 (Ellis *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1985) と発がん性試験 (NCI, 1979) の両方で、同等の発がん徴候 (雄における皮膚/皮下組織線維腫、雌における乳腺線維腺腫、雌雄両方における肝細胞がん) が認められている。したがって、陽性の関連性が示唆される。上述の慢性毒性試験で雌に腫瘍を生じた用量は、上述の発がん性試験における設定用量範囲に収まっていた。一方、上述の慢性毒性試験における高用量 (雄 34 mg/kg 体重/日、雌 45 mg/kg 体重/日) 群では、生残率が有意に低下し、高い毒性が示された。

雌に関しては、15.7 mg/kg 体重/日の投与を受けた Fischer 344 ラット (NCI, 1979) および 5.1 mg/kg 体重/日の投与を受けた CD ラット (Ellis *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1985) において、乳腺線維腺腫の発生率が、対照群よりも有意に高かった。

雄では、34 mg/kg 体重/日の投与を受けた CD ラット (Ellis *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1985) および 4.7 mg/kg 体重の投与を受けた Fischer 344 ラット (NCI, 1979) において、皮下組織または皮膚の線維腫の発生率が有意に上昇した。また、扁平上皮乳頭腫、基底細胞がん、線維肉腫および脂肪腫が、散発的に認められた (NCI, 1979)。

4.7 または 11.8 mg/kg 体重/日の用量で 18 ヶ月間投与を受けていた雄における肝細胞がんの発生率は、対照群の値よりも高かった ( $p > 0.05$ ) (NCI, 1979)。有意に過剰ではないが、同じがんが、34/35 mg/kg 体重/日の投与を受けた CD ラットで有意に高い発生率で発生している (Ellis *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1985) ため、ここに含める。この用量では、投与を受けたほとんどのラットにおいて、投与開始 12 ヶ月の時点で、肝臓に腫瘍性結節が認められた (Ellis *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1985)。

## マウス

マウスを用いた適切な 2 件の試験の情報が得られており、それらのうち一方は、慢性毒性試験 (Table 4.1.2.8.3-1) である。もう一方の試験では、発がん性影響は報告されていない (NCI, 1979)。慢性毒性試験のデータは、雄で腎臓の腫瘍が認められたことから、発がん性に関しても重要であるとみなされた (Ellis *et al.*, 1979; Hong *et al.*, 1985)。

## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

雄では、腎腫瘍(良性および悪性)の発生率が、13.3 または 96.9 mg/kg 体重/日の用量で 12 ヶ月を超えて投与されていた群で、有意に上昇していた。

また、885 mg/kg 体重/日を 12 ヶ月間投与されていた雄および 911 mg/kg 体重/日を 12 ヶ月間投与されていた雌で、肝臓にがんが検出された(それぞれ 1/4 匹ずつ)。さらに、885 mg/kg 体重/日を 12 ヶ月間投与され、その後 1 ヶ月間の回復期間が設けられた雄でも、肝臓にがんが検出された。対照群では肝臓にがんは認められていない。

要約すると、ラットやマウスで腫瘍発生率が上昇することを的確に示す証拠が得られている。さらに、2,4-DNT は *in vivo* において変異原性を示し、その根底にある機序は遺伝毒性であると思われる、遺伝毒性が発がんに寄与する重要な因子であると考えられた。したがって、EU の基準に基づき、2,4-ジニトロトルエンは、カテゴリー2 の発がん物質であるとみなされ、TR45(毒性が強い; がんを引き起こすおそれがある)に分類される。

Table 4.1.2.8.3-1: Summary of the relevant carcinogenicity data.

Species and sex	Protocol	Results and comments	References
♂, ♀ Fischer 344 rats	50 Fischer 344 rats / sex were treated with 0, 4.7 or 11.8(♂) and 0, 6.3 or 15.7(♀) mg/kg b.w./day for 18 months over a 24-month observation period  Purity > 95%	<p>↑ incidence of hepatocellular carcinoma (♂) at both 4.7 and 11.8 mg/kg b.w./day for 18 months (3/49, 6% vs. 0/45, 0%; and 3/48, 6% vs. 0/25, 0%; respectively)</p> <p>↑ incidence of mammary gland fibroadenoma (♀) at 15.7 mg/kg b.w./day for 18 months (p = 0.016)</p> <p>↑ incidence of tissue or skin fibroma (♂) at both 4.7 (p = 0.008) and 15.7 (p = 0.003) mg/kg b.w./day for 18 months; sporadic occurrence of squamous-cell papillomas, basal-cell carcinoma, fibrosarcomas, and lipomas</p>	NCI 1978
♂, ♀ CD rats	Chronic study  38 rats/sex/dose were fed diets containing 0, 0.57, 3.9 or 34 (♂) and 0, 0.71, 5.1 or 45 mg/kg b.w./day (♀) for either 12 months (4 rats/sex/dose) over a 13-month observation period (4 rats/sex/dose), or 24 months over a 25-month observation period (4 rats/sex/dose). Purity > 98%  A few extra rodents were added to replace early losses (no further details available)	<p>↑ hepatocellular carcinoma incidence at 34(♂) and 45(♀) mg/kg b.w./day for more than 12 months (6/29, 21% vs. 1/25, 4%; and 18/34, 53% vs. 0/23, 0%, p &lt; 0.05; respectively)</p> <p>↑ Mammary gland fibroadenoma incidence at both 5.1 (♀, 17/27, 63%) and 45 (♀, 33/35, 94%) mg/kg b.w./day for more than 12 months vs. controls (♀, 11/23, 48%)</p> <p>↑ Skin fibroma incidence at 34 (♂, 17/30, 57% vs. 2/25, 8%) mg/kg b.w./day for more than 12 months</p>	Lee <i>et al.</i> , 1979, 1985
♂, ♀ CD-1 mice	Chronic study  Groups of 58 mice/sex/dose were treated with 0, 13.3, 96.9 and 885(♂), and 0, 13.7, 93.8, and 911(♀) mg/kg b.w./day for either 12 months (4 mice/sex/dose) over a 13-month observation period (4 mice/sex/dose), or 24 months (46 mice/sex/dose) over a 25-month observation period (4 mice/sex/dose). Purity > 98%.  A few extra rodents were added to replace early losses (no further details available)	<p>Carcinoma in kidney at 885 (♂, 1/4) mg/kg b.w./day for 12 months vs. none in controls</p> <p>Adenoma in kidney at 885 (♂, 1/4) mg/kg b.w./day for 12 months and allowed to recover for 1 month vs. none in controls</p> <p>Carcinomas in liver at both 885 (♂, 1/4) and 911 (♀, 1/4) mg/kg b.w./day for 12 months, and at 885 (♂, 2/4) mg/kg b.w./day for 12 months and allowed to recover for 1 month vs. none in controls</p> <p>↑ incidence of renal tumour at 13.3(♂, 5/33, 15%) and 96.9(♂, 16/28, 57%) mg/kg b.w./day vs. controls (0/33, 0%) for more than 12 months</p> <p>Hepatocellular dysplasia from 13.3(♂) and 911(♀) mg/kg b.w./day for more than 12 months</p> <p>♂ more sensitive than ♀</p>	Ellis <i>et al.</i> , 1979; Hong <i>et al.</i> , 1985

#### 4.1.2.9 生殖毒性

##### 4.1.2.9.1 生殖能力への影響

#### 動物試験

概要を Table 4.1.2.9.1-3 および Table 4.1.2.9.1-4 に示した。

#### ラットにおける反復投与毒性試験：生殖能力の観察

ラットにおける反復投与試験 (Lee *et al* 1978, Ellis *et al* 1979, Kozuka *et al* 1979 and McGowan *et al* 1983) において、繁殖・生殖能力に関連した所見が報告されている。これらの試験の詳細は、反復投与毒性の項に記載されている。ここでは、それらの試験から得られた繁殖・生殖能力に関連するデータのみを示す。

##### Lee *et al.* (1978) の試験

2,4-DNT (98% を超える純度) が、雄には平均 0, 34, 93 ないしは 266 mg/kg 体重/日の用量で、雌には平均 0, 38, 108 ないしは 145 mg/kg 体重/日の用量で混餌投与された。4 週間後、266 mg/kg 体重/日群の雄では、精巣に中等度の萎縮と精子形成障害が認められた。13 週間後、266 mg/kg 体重/日群の雄では、精巣に極めて重度の萎縮と精子形成障害が認められた。93 mg/kg 体重/日群の雄でも、同様の病変が、中等度から極めて重度の段階にわたって認められた。中または高用量の 2,4-DNT が誘発した精巣病変は、投与を 4 週間中止しても、回復が見られなかった。雄の生殖器官への影響に関する NOAEL は、4 週間の経口投与を受けたラットの精巣で認められた萎縮と精子形成障害に基づき、34 mg/kg 体重/日と考えられた。

##### Ellis *et al.* (1979) の試験

この 24 ヶ月間試験では、CD ラット (各群雌雄 38 匹ずつ) に、平均で 0.57、3.9 ないしは 34 mg/kg 体重/日 (雄) または 0.71、5.1 ないしは 45 mg/kg 体重/日 (雌) の用量で混餌投与が行われた。12 ヶ月間 2,4-DNT の混餌投与を受けていた高用量 (34 mg/kg 体重/日) 群の雄 4 匹全くと、1 ヶ月間の回復期間が付与されていた高用量群の雄 3 匹中 2 匹は、ほぼ完全な精子形成障害と精巣重量の低下を伴った、極めて重度の精細管萎縮を示した。最高用量 (45 mg/kg 体重/日) を混餌投与されていた雌の両群とも、卵巣重量の低下を示していた。24 ヶ月後では、高用量群に生残ラットは 1 匹もいなかった。各用量群の 8 匹ずつから採血し、臨床生化学的検査を行い、またそれらの被験動物を屠殺して剖検を行った。各用量群の生残ラットで群を構成し、1 ヶ月間の回復期間を付与した。雄の 2 群 (0.57 および 3.9 mg/kg

体重/日投与群)は、精細管の萎縮を示していた。生残例だけでみると、0.57 および 3.9 mg/kg 体重/日群における影響を示した動物の数は、対照群の値と明確には相違していない。そのため、この所見は重要ではないとみなされる可能性がある。しかし、生残した動物および死亡した動物(反復投与毒性の項の表を参照)の累積数を考慮すると、影響を示した動物の数と影響の重症度は投与を受けた動物において明らかに増高しており、したがって、0.57 および 3.9 mg/kg 体重/日でみられた所見は重要とみなすべきである。雄の生殖能力に関しては、精細管の萎縮、精子形成の低減および高用量側における精巣重量の低下に基づいて、0.57 mg/kg 体重/日という LOAEL が設定できると考えられる。一方、雌の生殖能力に対しては、これらの用量の 2,4-DNT では有意な影響はもたらされなかった。

#### Kozuka *et al.* (1979) の試験

2,4-DNT が 347~395 mg/kg 体重/日の用量で混餌投与された Wistar ラットにおいて、精巣の相対重量の顕著の低下および精巣の萎縮が示された。

#### McGown *et al.* (1983) の試験

1 ヶ月齢の Sprague-Dawley ラット(対照群を除き各群雌雄 5 匹ずつ、対照群の雌は体の構造に欠陥が見られた 1 匹を除いたため 4 匹のみ)に、2,4-DNT(純度 97%、2,6-DNT が 2%と特定されていない物質が 1%混入)が、0、900、1200、1900 ないしは 3000 ppm の濃度で、14 日間混餌投与された(投与用量は、雄で 0、96、125、183 ないしは 260 mg/kg 体重/日、雌で 0、99、124、191 ないしは 254 mg/kg 体重/日に相当)。雄では低用量から用量依存的に、合胞体細胞の形成および精子細胞の巣状肉芽腫形成といった、精巣の退行性変性を伴った精子減少症が示された。この精巣の変化の程度は、用量依存的であった。最低用量でも、精子形成細胞層の厚さの減少が引き起こされた。雌の生殖器官には、組織病理学的変化は認められなかった。結論：精子形成細胞層の厚さの減少に基づいて、96 mg/kg 体重/日という LOAEL が導出される。雌の生殖器官には、いずれの用量においても、変化は何も認められなかった。

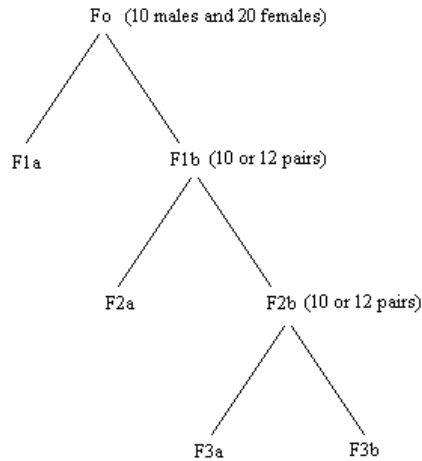
#### ラットにおける生殖能力試験

##### Ellis *et al.* (1979) Ellis *et al.* (1979) の試験

CD ラットにおいて、2,4-DNT(純度 98%)を用いて、多世代試験が実施されている。この試験は重要であるとみなされるため、ここで可能な限り詳細に報告する。原試験では、各被験動物ごとのデータが示されておらず、平均の結果のみが報告されているため、不十分な点が存在する。



試験デザインを下図に示す：



親世代(F<sub>0</sub>)として用いられた最初のラットについては、慢性毒性試験(慢性毒性の項の Ellis *et al.*, 1979 を参照)で用いられたラットと同時に試験が開始され、この慢性試験と同じ対照物質ないしは被験物質を含む飼料が投与された。飼料中の 2,4-DNT の濃度は、0.0015%、0.01%ないしは 0.7%であった。雄/雌の被験物質摂取量は、それぞれ 0.57/0.71(低用量)、3.9/5.1(中用量)および 34/45(高用量) mg/kg 体重/日であった。F<sub>0</sub> 世代においては、被験物質が 6 ヶ月間混餌投与された後、それぞれの用量群につき、10 匹の雄の CD ラットと 20 匹の雌の CD ラットが交配に供された。各雄は、同じ用量群の雌 2 匹と 14 日間一緒に飼育された。この交配で生まれた仔動物(F<sub>1a</sub>、第 1 次の出産)は、離乳時に処分された。F<sub>0</sub> ラットは再度交配に供された。この交配で生まれた各群の仔動物(F<sub>1b</sub>、第 2 次の出産)から、離乳時に雌雄各 20~24 匹を無作為に選択した。ここで F<sub>0</sub> の雌と余剰の仔動物を処分した。F<sub>0</sub> の雄は慢性試験のために残された。F<sub>1b</sub> 雄のそれぞれを、3 ヶ月齢時に 14 日間、同じ用量群の雌との交配に供した。F<sub>2a</sub> ラットは離乳時に処分し、F<sub>1b</sub> ラットは F<sub>2b</sub> ラットの離乳時に屠殺した。それから、F<sub>1b</sub> ラットについて行ったのと同様の手順により、F<sub>2b</sub> ラットを選択し、3 ヶ月齢時に交配に供した。F<sub>3b</sub> ラットが離乳した時点で試験は終了となった。この試験は、実質的に OECD ガイドライン 416 に準拠しており、適切なものであると判断された。

出産時、全ての仔動物について肉眼的身体異常を検査し、各妊娠例における生存および死亡仔動物数を記録した。出生後 0、4 および 21 日目に、生存率と体重が記録された。親動物の一般状態は、最初の交配時の体重で表した(Table 4.1.2.9.1-1)。

親世代の繁殖成績は、交尾率(雌雄のペア数に対する交尾に至ったペア数の割合)および各性別における繁殖率(交配に供されたその性別の動物数に対する仔動物を持つに至った動

物数の割合)で表した。

各妊娠例ごとの繁殖成績は、以下の変数を被験物質投与群の動物と対照群の動物とで比較して表した。一腹仔数、出生時体重、生存産仔指数(生存して産まれた仔動物の割合)、4日間生存率(出生後4日まで生残した仔動物の割合)、哺育率(出生後4日の時点で生存しており離乳まで生残した若齢仔動物の割合)、離乳時体重、性比(仔動物の総数に対する雄の数の割合)。

F<sub>1b</sub>世代の高用量群で4日間生存率が低下していたことと、F<sub>3b</sub>世代の低用量群および中用量群で離乳時に低体重が認められた(p < 0.05)ことを除き、群間で有意な差は示されなかった(Table 4.1.2.9.1-2)。

最初の交配時の平均体重は、高用量を与えられていた雌雄の両方で低値であった(Table 4.1.2.9.1-1)。高用量の2,4-DNTを与えられていたF<sub>0</sub>およびF<sub>1</sub>世代の体重は、それぞれの対照群の値と比較すると、雄では77%(F<sub>0</sub>)および75%(F<sub>1</sub>)、雌では77%(F<sub>0</sub>)および90%(F<sub>1</sub>)であった。

Table 4.1.2.9.1-2に、原試験で報告されていた数値データを提示した。

雄の生殖能力においても雌の生殖能力においても、投与に関連した明瞭な影響は認められなかった。ただし、F<sub>0</sub>世代では全ての群で、生殖能力が、雄と雌の両方で低下していた。これはそれらの動物が他より高齢であったためと解釈された。

しかし、高用量群については、親となったF<sub>2</sub>世代がおらず、F<sub>1</sub>世代でも交配に至った動物もわずかであったことから、繁殖成績に有害影響が及んだことが示唆された。繁殖へのこうした有害影響は、個々の妊娠例についての数値データから明確にされている(Table 4.1.2.9.1-2)。生存産仔指数、出生時体重、離乳時体重および性比には、投与に関連した明らかな影響は認められなかった。統計学的に有意ではなかったが、F<sub>1a</sub>やF<sub>1b</sub>では、平均一腹仔数が低減している様であった。この影響は、次世代が親になった際には引き継がれていなかった。

4日間生存率と哺育率も、F<sub>0</sub>世代の2回の出産の片方あるいは両方で低減していた。高用量の投与を受けていたF<sub>0</sub>雌から生まれた仔動物の4日間生存率を除くと、これらの影響は、投与に関連したものではないと考えられた。4日間生存率の低下は、雌親が出産中に死亡したり哺乳放棄したりした結果生じた。

F<sub>1a</sub>世代が出産される際のF<sub>0</sub>雌親の死亡率は、雌親への投与用量である0、0.71、5.1、45 mg/kg 体重/日の順で、1/10、4/13、3/10、4/11匹であった。F<sub>1b</sub>世代が出産される際のF<sub>0</sub>雌

## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

親の死亡率は、雌親への投与用量である 0、0.71、5.1、45 mg/kg 体重/日の順で、1/5、0/6、0/6、4/5 匹であった。これらの死亡例は、出産時間の延長、過剰な出血、および胎盤や胎仔性胎盤の停留が関連していた。何例かでは、胎盤が子宮に付着したままの状態であった。対照群でも出産時の死亡が生じていることから、これらの死亡例は、初めての交配時の雌親の年齢と関係している可能性がある。ただし、2,4-DNT は、この様な死亡例の増加を助長していた。

高用量群の F<sub>1b</sub> 世代の雌は、3 ヶ月齢で交配に供されたが、1 匹が交配時に乳腺腫瘍を有していたにもかかわらず、3 匹全てが対照群の雌親と同様に、仔動物を出産して哺育を遂行した。ただし、これらの雌親 3 匹は、2 回目の仔動物産出には至らなかった。腫瘍を有していた 1 匹は交配に失敗した。残りの 2 匹のうち 1 匹は、膣栓は認められたものの、膣塗抹標本に精子が認められなかった。残りの 1 匹は、仔動物を出産しなかった。

いずれの交配例でも、生まれた仔動物に異常は検出されなかった。出生時体重、分娩が正常であった場合の出産時生存率ならびに離乳時体重といったデータ、および催奇形性影響が認められなかったという所見から、胎盤経由あるいは母乳経由での 2,4-DNT の摂取は、ほとんど問題とならないことが示唆される。

要約すると、この 3 世代試験では、雄および雌の生殖能力に対して、投与用量に関連した影響は認められなかった。F<sub>0</sub> 世代では全ての群で、雄でも雌でも生殖能力が低下していた。これは、それらの動物が他より高齢であったためと解釈された。4 日間生存率と哺育率も、F<sub>0</sub> 世代の 2 回の出産の片方あるいは両方で低減していた。高用量の投与を受けていた F<sub>0</sub> 雌から生まれた仔動物の 4 日間生存率を除くと、これらの影響は、投与に関連したものではないと考えられた。4 日間生存率の低下は、雌親が出産中に死亡したり哺育放棄したりした結果生じた。しかし、高用量群については、親となった F<sub>2</sub> 世代がおらず、F<sub>1</sub> 世代で交配に至った動物もわずかであったことから、雄の生殖能力に有害影響が及んだことが示されている様に思われた。したがって、生殖能力への影響に関する NOAEL は、3.9 mg/kg 体重/日と考えられた。

EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

Table 4.1.2.9.1-1: Age, weight and fertility of three generations of rats given 2,4 DNT (Ellis et al., 1979)

2,4 DNT (mg/kg bw/ day) (male/female)	Generation	Age at first mating (months)	Mating Ratio	Pregnancy Ratio	Males		Females		Duration of gestation (days)
					Fertile Mated	Weight (g) at first mating	Fertile Mated	Weight (g) at first mating	
0/0	F <sub>0</sub>	8	30/40 <sup>a</sup>	17/30 <sup>b</sup>	7/10	612±12 <sup>c</sup>	13/22	333±7 <sup>c</sup>	23
	F <sub>1</sub>	3	38/38	38/38	15/13	475±9	19/19	276±3	22
	F <sub>2</sub>	3	39/40	38/39	20/20	438±11	20/20	265±5	22
0.57/0.71	F <sub>0</sub>	8	32/38	20/32	8/10	618±12	15/21	347±9	23
	F <sub>1</sub>	3	29/32	24/29	14/16	489±9	14/16	272±3	22
	F <sub>2</sub>	3	39/40	38/39	19/20	451±9	20/20	260±5	22
3.9/5.1	F <sub>0</sub>	8	29/38	17/29	7/10	593±18	12/20	311±5	23
	F <sub>1</sub>	3	39/40	36/39	19/20	469±6	20/20	267±4	22
	F <sub>2</sub>	3	38/40	38/38	20/20	456±9	20/20	264±5	22
34/45	F <sub>0</sub>	8	33/38	16/33	8/10	464±13 <sup>d</sup>	12/21	255±6 <sup>d</sup>	23
	F <sub>1</sub>	3	4/6	3/4	3/3	355±10 <sup>d</sup>	3/3	249±5	22

a=Number of copulations detected by vaginal smear to the number of male-female pairings.

b=Number of confirmed pregnancies to the number of copulations;

c=Mean±S.E;

d=Significantly different from the mean value of the respective control generation (Dunnett's multiple comparison procedure)

## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

Table 4.1.2.9.1-1: Age, weight and fertility of three generations of rats given 2,4 DNT (Ellis et al., 1979)

2,4 DNT (mg/kg bw/day) (male/female)	Litter N <sup>o</sup>	Litter Size	Live- born Index	Weight at birth	Viability Index	Lactation Index	Weight at weaning	Sex ratio males:total
0	F <sub>1a</sub>	6.9±1.1 (10) <sup>a</sup>	85±7	7.2±0.3	70±15	61±15	45±8 (7)	23:33
	F <sub>1b</sub>	12.7±1.8 (5)	91±5	7.0±0.5	100	91±6	55±7 (6)	13:35
	F <sub>2a</sub>	12.7±0.6 (19)	98±1	7.0±0.2	98±2	96±3	43±2 (19)	111:222
	F <sub>2b</sub>	14.0±0.3 (19)	96±2	7.2±0.1	98±1	92±6	42±1 (18)	122:253
	F <sub>3a</sub>	11.3±0.4 (23)	97±2	7.1±0.1	96±2	95±3	39±1 (23)	123:249
	F <sub>3b</sub>	12.2±0.6 (18)	99±1	6.4±0.1	94±2	94±3	40±1 (18)	93:216
0.57/0.71	F <sub>1a</sub>	6.8±1.0 (13)	83±9	7.1±0.2	69±13	91±6	53±2 (9)	28:56
	F <sub>1b</sub>	8.2±1.9 (6)	100	7.2±0.8	99±1	70±6	45±9 (6)	16:32
	F <sub>2a</sub>	13.9±0.4 (14)	97±1	6.6±0.1	99±1	95±3	41±1 (14)	92:178
	F <sub>2b</sub>	15.4±0.6 (10)	95±2	6.8±0.3	96±4	83±6	41±2 (10)	58:140
	F <sub>3a</sub>	12.2±0.6 (23)	95±2	7.1±0.2	96±1	93±2	36±1 (23)	95:266
	F <sub>3b</sub>	13.2±0.4 (19)	98±1	6.4±0.2	95±3	87±6	35±1 (18) <sup>b</sup>	93:242
3.9/5.1	F <sub>1a</sub>	4.9±1.1 (10)	89±10	7.4±0.1	60±16	61±18	38±10 (7)	22:35
	F <sub>1b</sub>	9.7±1.1 (6)	88±6	7.5±0.4	83±17	83±17	44±13 (6)	24:44
	F <sub>2a</sub>	13.8±0.4 (18)	99±1	6.9±0.2	94±6	95±5	42±1 (18)	119:245
	F <sub>2b</sub>	14.2±0.8 (18)	97±1	7.1±0.2	94±6	97±1	41±2 (17)	108:242
	F <sub>3a</sub>	12.6±0.5 (20)	98±2	6.9±0.1	94±2	87±5	35±1 (20)	105:243
	F <sub>3b</sub>	13.6±0.5 (20)	98±2	6.5±0.1	97±1	91±3	35±2 (20) <sup>b</sup>	123:265
34/45	F <sub>1a</sub>	4.5±1.1 (11)	94±4	7.5±0.4	64±15	90±10	53±6 (7)	14:29
	F <sub>1b</sub>	7.4±1.2 (5)	90±5	7.0±0.3	20±20 <sup>b</sup>	78	44 (1)	4:7
	F <sub>2a</sub>	11.0±1.0 (3)	100	6.4±0.2	89±11	100	35±1 (3)	19:29

a=Mean ± S.E. and in parentheses the number of litters included in the mean.

b=Significantly different from the mean value of the respective control litters (Turkey's omega procedure)

Lane *et al.* (1985) : 雄への 5 日間投与による生殖試験

50 匹の雄ラットが、無作為に 5 つの群に分配された。1 つの群に、10 mL/kg 体重の Mazola

社製コーン油が 5 日間経口投与された。別の 1 群に、コーン油を媒体として、トリエチレンメラミンが、0.5 mg/kg 体重の用量で単回経口投与された。残りの 3 群には、コーン油を媒体として、2,4-DNT(純度は示されていない、再結晶化物)が、60、180 ないしは 240 mg/kg 体重/日の用量で、連続 5 日間投与された。240 mg/kg 体重/日群では過剰な死亡例がみられ、結果を統計学的に評価するのが困難になったため、新たな群を他の群が 1 週間経過した時点で設け、240 mg/kg 体重/日の 2,4-DNT を投与した。それぞれの雄を毎週 5 日間、2 匹の雌との交配に供し、膣塗抹標本を採って精子の存在を顕微鏡学的に検査し、授精の有無を判定した。高用量群では、6 週目までに妊娠した雌の数が少なかったため、交配期間を 13 週までとした。他の群は交配期間は 6 週目までであった。高用量群において交配期間 13 週目までには妊娠した雌の数が増加したことから、2,4-DNT によるこの影響は、可逆的である可能性がある。雌ラットは妊娠 14 日目に屠殺し、生殖器系の検査を行った。2,4-DNT の投与を受けた群において認められた所見は以下の通りである。

60 mg/kg 体重/日群では、軽度のチアノーゼが認められただけで、2,4-DNT により生殖能力への有害影響は生じなかった。180 mg/kg 体重/日群では、交配指数[(妊娠した雌の総数/交配に供された雌の数)×100]がわずかに減少した可能性があるが、この影響は一時的なものであった。180 mg/kg 体重/日の 2,4-DNT でも、チアノーゼが生じている。240 mg/kg 体重/日群では、投与後第 1 週に、体重の減少、チアノーゼおよび死亡が生じた。この用量での交配指数と DF/LF 比(死亡胎仔総数/生存胎仔総数)への有害影響は甚大であった。第 7 週目の交配に関しては、着床指数(着床部位の総数/妊娠した雌の総数)、着床前損失指数[(黄体の総数 - 着床部位の総数)/妊娠した雌の総数]、および胎仔指数(生存胎仔の総数/妊娠した雌の総数)が有意に変化していた。これらの指数には、7 週目以前から対照群の値との相違が見られたが、11 週目になると、被験物質投与群のデータと対照群のデータとの間にほとんど差は無いように思われた。まとめると、60 mg/kg 体重/日では生殖能力に対する有害影響は生じることはなく、180 mg/kg 体重/日では交配指数および胎仔指数に中等度の可逆的な有害影響が生じ、240 mg/kg 体重/日の 2,4-DNT を 5 日間投与した場合には、ゆっくりと回復したが、ラットの生殖器系に重度の有害影響が生じた。結論：交配指数および胎仔指数に中等度の可逆的な有害影響が認められた(LOAEL = 180 mg/kg 体重/日)ことに基づいて、生殖能力への影響に関する NOAEL として 60 mg/kg 体重/日が導出される。

Bloch *et al.* (1988) : 雄の生殖能力-精子形成試験

この 3 週間試験では、30 匹の雄の Sprague-Dawley ラットに、2,4-DNT(純度 97%)が、0(対照)、1000 ppm(0.1%)ないしは 2000 ppm(0.2%)の濃度で混餌投与された。混餌投与の濃度は、それぞれ 26.2 mg/kg 体重/日および 51.7 mg/kg 体重/日の用量に相当していた。この推算は、技術指針書(TGD)の付属書 VI の記載に準拠して式  $F=0.040 \times W_{0.479}$  を用いて算出さ

れたデフォルトの飼料消費量に基づいて行われた(Wはこの試験の群の各時点での平均体重)。ラットは10匹ずつの群に無作為に分配された(ただし、0.2%群の1匹が、2,4-DNTの混餌投与期間中に、不明な理由により死亡した)。精子形成への影響および生殖ホルモン系への影響を評価するために、以下のパラメータが測定された。体重、精巣重量、精巣上体重量、形態学的な見地からの精巣の電子顕微鏡像、精巣上体尾部の精子貯蔵量、および血清中のLH、FSHならびにテストステロン濃度。

全てのラットの体重が、試験期間中増加したが、試験終了時には、26.2 または 51.7 mg/kg 体重/日の投与を受けていた動物の体重は低値であった。精巣重量には、投与終了時でも有意な有害影響は認められなかったが、51.7 mg/kg 体重/日を投与されていた動物では、精巣上体重量の減少が認められた。電子顕微鏡を用いた精巣の形態学的検査では、26.2 mg/kg 体重/日群で、局所の変化(セルトリ細胞の空胞変性や脂肪蓄積、多核性精子細胞の出現、基底膜の中等度の不整など)が示されたが、そうした損傷は限局的でばらつきも大きかった。51.7 mg/kg 体重/日群では、セルトリ細胞に、様々な大きさの空胞、膨化したミトコンドリアおよび膨張した小胞体が認められた。さらに、精母細胞や精子細胞に、重度の退行性変化が認められた。対照群では、セルトリ細胞の状態は正常であった。

総精子数の分析では、51.7 mg/kg 体重/日群において、63%まで減少していることが明らかとなった。この群ではさらに、LHが100%、FSHが25%増加しているのが認められたが、テストステロンへの影響は認められなかった。26.2 mg/kg 体重群/日では、精子濃度や血清中のホルモン濃度に、有意な影響は示されなかった。

これらの所見は、2,4-DNTが精子形成や生殖ホルモン系に有害影響を及ぼし得ることを示している。

結論：雄の生殖能力に関しては、SDラットを用いた3週間試験で認められた精巣の限局的な形態学的変化に基づき、26.2 mg/kg 体重/日というLOAELが導出される。これより1段階高い用量の51.7 mg/kg 体重/日では、精子濃度の減少、血清中のホルモン濃度の上昇、精母細胞や精子細胞における退行性変化、およびセルトリ細胞の異常が認められた。

#### マウスにおける反復投与毒性試験：生殖能力についての所見

マウスにおける反復投与試験(Lee *et al* 1978, Ellis *et al* 1979)において、繁殖・生殖能力に関連した所見が報告されている。これらの試験の詳細は、反復投与毒性の項に記載されている。ここでは、繁殖・生殖能力に関連したデータだけを示す。

Lee *et al.* (1978) の試験

47、137 ないしは 413 mg/kg 体重/日の用量で、2,4-DNT が混餌投与された。4 週間が経過した時点で、413 mg/kg 体重/日群の雄 2 匹に、軽度の精子形成抑制が認められた。13 週間後の時点では、2,4-DNT が誘発したとみられる病変は、精巣には存在しなかった。軽度の精子形成抑制に基づき、137 mg/kg 体重/日という NOAEL が導出される。

Ellis *et al.* (1979) の試験

この試験では、マウス(雌雄 58 匹ずつ)に、0、13.5、95 ないしは 900 mg/kg 体重/日の用量で、12 ヶ月間 2,4-DNT が混餌投与された。高用量群の雄 4 匹中 4 匹と中用量群の雄 4 匹中 1 匹に、精巣萎縮が認められた。900 mg/kg 体重/日群の雌では、4 匹中 2 匹に、軽度の卵巣萎縮が認められた。別の雄 4 匹および雌 4 匹からなる群には、被験物質投与を行わない 1 ヶ月間の回復期間が設けられたが、回復期間を設けられなかった群で認められたのと同様の病変が認められた。ただし多くの場合、より軽度であった。24 ヶ月投与後では、高用量群に生残マウスは 1 匹もいなかった。各用量群の 8 匹ずつから採血し、臨床生化学的検査を行い、またそれらの被験動物を屠殺して剖検を行った。精巣に、軽度の萎縮が認められた。雌マウスでは、生殖系に、投与に関連した病変は認められなかった。24 ヶ月間の投与を受けた各用量群の生残ラットで群を構成し、1 ヶ月間の回復期間を付与した。精巣に、軽度の萎縮が認められた。雌では、黄体の欠損を伴う非機能性卵胞を有する例が認められた。結論：95 mg/kg 体重/日群で軽度の精巣萎縮が認められたことに基づき、NOAEL は 13.5 mg/kg 体重/日と判断される。雌マウスでは、生殖系に、投与に関連した病変は認められなかった。

イヌにおける反復投与毒性試験：生殖能力についての所見

イヌにおける反復投与試験 (Lee *et al.* 1978) において、繁殖・生殖能力に関連した所見が報告されている。

Lee *et al.* (1978) の試験：1 ないしは 5 mg/kg 体重/日の用量での 13 週間投与では、有害影響はとくに誘発されなかった。25 mg/kg 体重/日を投与されたイヌでは、4 週間後の時点で精子形成の中等度の抑制が示され、この影響は、13 週間後の時点では重度となった。回復期間を設けると、組織学的所見は正常になった。結論：25 mg/kg 体重/日の用量で 4 週間後に中等度の精子形成抑制が、13 週間で重度の抑制が認められたことに基づき、それより 1 段階低い 5 mg/kg 体重/日が、NOAEL として導出される。



## EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

Table 4.1.2.9.1-3: Summary target effects and NOAEL-LOAEL of 2,4 DNT on male fertility

Species (Type study)	Exposure period/route (doses)	Target effect and NOAEL-LOAEL	Reference
CD rat. (Repeated)	Up to 13 weeks/ dietary (34, 93, 266 mg/kg/day)	Atrophy of the testis. Depression of spermatogenesis NOAEL=34 mg/kg/day	Lee <i>et al.</i> 1978
CD rat. (Repeated)	12-24 months/dietary (0.57, 3.9 or 34mg/kg/day)	Atrophy of seminiferous tubules. Depletion of spermatozoz in ductules. Decrease of the testis weight LOAEL=0.57 mg/kg/day (based on atrophy of seminiferous tubules at 12-24 months).	Ellis <i>et al.</i> 1979
Wistar- STD rat	6 months/dietary (347-395 mg/kg/day)	Decrease of testis weight and testicular atrophy.	Kozuka <i>et al.</i> , 1979
Sprague- Dawley rat (Repeated)	14 days/dietary (0, 96, 125, 183 or 260 mg/kg/day)	Testicular atrophy and oligospermia. Syncytial cell formation. Focal spermatic granuloma. Decreased thickness of spermatogenic cell layers LOAEL=96 mg/kg/day (based on decreased thickness of spermatogenic cell layers)	McGown <i>et al.</i> , 1983
S. D. rat (Male fertility spermatogenesi s)	3 weeks/dietary (26.2 or 51.7 mg/kg/day)	Focal alterations of the Sertoli cells, multinucleated spermatids in some tubules. Decrease in weight epididymes and epididymal sperm reserves, 25% increase in FSH levels and 50% LH levels LOAEL=26.2 mg/kg/day	Bloch <i>et al.</i> , 1988
S. D. rat (Male- Reproduction)	Males exposed 5 days by gavage before mating (60, 180, 240 mg/kg/day)	Decrease mating index on week 5, implantation sites and pregnant females. Increased dead foetuses. NOAEL=60 mg/kg/day	Lane <i>et al.</i> , 1985
CD rats (three generation reproduction study)	Since 6 months prior to F <sub>0</sub> mating. (0.57/0.71, 3.9/5.1, 34/45 mg/kg bw/day) (male/female).	No quantitative treatment related effect on fertility of both males and females. However, the absence of the F <sub>2</sub> parental generation for the group given the high dose and the few animals mated in the F <sub>1</sub> appears to indicate an adverse effect on male fertility. NOAEL=3.9 mg/kg/day	Ellis <i>et al.</i> , 1979
Alb. Sw. mouse (Repeated)	Up to 13 weeks/dietary (47, 137, 413 mg/kg/day)	Mild depression of spermatogenesis. NOAEL=137 mg/kg/day	Lee <i>et al.</i> , 1978
CD-1 mouse (Repeated)	12-24 months/dietary (13.5, 95, 900 mg/kg/day)	Testicular atrophy. Decrease of the testis weight. NOAEL=13.5 mg/kg/day	Ellis <i>et al.</i> , 1979
Beagle dog (Repeated)	Up to 13 weeks/capsule (1, 5, 25 mg/kg/day)	Decrease in spermatogenesis after 4 weeks NOAEL=5 mg/kg/day	Lee <i>et al.</i> , 1978

LOAEL=0.57 mg/kg/day (atrophy of seminiferous tubules, 12-24 months feeding in CD rats).

Table 4.1.2.9.1-4: Summary target effects and NOAEL-LOAEL of 2,4 DNT on female fertility

Species (Type study)	Exposure period/route (doses)	Target effect and NOAEL-LOAEL	Reference
CD rat (Repeated)	Up to 13 weeks/dietary (38, 108, 145 mg/kg/day)	Not effects	Lee <i>et al.</i> , 1978
CD rat (Repeated)	12-24 months/dietary (0.71, 5.1, 45 mg/kg/day)	Decrease of ovary weight at the highest dose tested	Ellis <i>et al.</i> , 1979
S. D. rat (Repeated)	14 days/dietary (99, 124, 191 or 254 mg/kg/day)	Not effects.	McGown <i>et al.</i> , 1983
CD rats (three generation reproduction study)	Since 6 months prior to F <sub>0</sub> mating. 0.57/0.71, 3.9/5.1, 34/45 mg/kg bw/day (male/female).	No quantitative treatment related effect on fertility of both males and females. However, the absence of the F <sub>2</sub> parental generation for the group given the high dose and the few animals mated in the F <sub>1</sub> appears to indicate an adverse effect on male fertility.	Ellis <i>et al.</i> , 1979
Alb Sw mouse (Repeated)	Up to 13 weeks/dieraty (52, 147, 468 mg/kg/day)	Not effects	Lee <i>et al.</i> , 1978
CD-1 mouse (Repeated)	12-24 months/dietary (13.5, 95, 900 mg/kg/day)	Decrease of ovary weight. Ovary atrophy. Non-functioning follicles with lacking of corpora lutea-NOAEL= 95 mg/kg/day (based on ovary atrophy)	Ellis <i>et al.</i> , 1979
Beagle dog (Repeated)	Up to 13 weeks/capsule (1, 5, 25 mg/kg/day)	Not effects	Lee <i>et al.</i> , 1978

NOAEL=95 mg/kg/day (ovary atrophy, 12-24 months feeding in CD mice).

#### 4.1.2.9.2 発生・発達毒性

##### 動物試験

Table 4.1.2.9.2-1 に概要を示した。

##### ラット

特に発生・発達毒性を調べることを目的とした試験の情報は得られていない。しかし、前述の3世代生殖試験(Ellis *et al.*, 1979)では、全ての仔動物について、出生時に肉眼的身体異常に関する検査を行ったと報告されている。いずれの交配例でも、生まれた仔動物に異常は検出されなかった。出生時体重、分娩が正常であった場合の出産時生存率ならびに離乳時体重といったデータ、および催奇形性影響が認められなかったという所見から、胎盤経由あるいは母乳経由での2,4-DNTの摂取は、ほとんど問題とならないことが示唆される。この試験では、2,4-DNTが混餌投与されたが、その摂取量は、雄で0.57、3.9ないしは34 mg/kg 体重/日、雌で0.71、5.1ないしは45 mg/kg 体重/日と推定される。

この試験では、4日間生存率も調べられていた。前述したように(4.1.2.9.1 生殖能力への影

響の項)、4日間生存率と哺育率は、F<sub>0</sub>世代の2回の出産の片方あるいは両方で低減していた。高用量の投与を受けていた雌から生まれた仔動物の4日間生存率を除くと、これらの影響は、投与に関連したものではないと考えられた。4日間生存率の低下は、雌親が出産中に死亡したり哺乳放棄したりした結果生じたものであり、F<sub>0</sub>世代の仔動物における4日間生存率の低下については、親動物が他よりも高齢であったためと解釈された。

試験した用量では、雄の34 mg/kg 体重/日や雌の45 mg/kg 体重/日を含め、発生・発達への影響は認められていない。ただし、内臓や骨格の異常を検討したかどうかは不明確である。

## マウス

Smith *et al.* (1983) および Harding *et al.* (1987) の試験

妊娠時期を合わせた CD-1 マウスの雌 50 匹(妊娠 7~14 日目)に、390 mg/kg 体重の 2,4-DNT が 1 日 1 回、連続 8 日間強制経口投与された。これらの雌マウスは、6~8 週齢であった。2,4-DNT の用量は、0、310、525、1250、2500 および 3500 mg/kg 体重/日の用量で実施された、最大耐量測定試験の結果に基づいて選択された。この試験は、OECD のガイドライン 414 に準じて実施されたが、プロトコルにいくつか大きな逸脱がある。例えば、1 用量しか試験されていないこと、コーン油を媒体として 10 mL/kg 体重の容量で投与されているが、これは推奨容量の 0.4 mL/kg 体重を超えていること、試験で用いた用量で雌の死亡率が 10% を超えており(34 匹の妊娠雌中 6 匹が死亡)、母体毒性が生じていること、などである。この試験では、母体毒性に関する NOAEL を確立することはできなかった。発生・発達に関する評価項目については報告されている(分娩 12 時間後、1 日後および 3 日後の生存率、一腹仔重量ならびに出生後パラメータ)が、内臓や骨格の異常については調べられていないか、少なくとも報告されていない。この試験の質は低いと判断される。

非妊娠マウスの数は、両群で同等であった(対照群で 16 匹、被験物質投与群で 16 匹)。したがって、交配期間の後、34 匹の雌が妊娠していたことになる(原著では特に言及していない)。

対照群の雌は試験期間を通じて全例が生残し、34 匹が妊娠した。この妊娠雌のうち 1 匹が 18 日目に除外された(理由は示されていない)ため、最終的な生存率の対照としては、33 匹の妊娠雌が考慮に入れられた。また、1 匹の雌親は生存仔を産出せず、2 匹の雌親は全胚吸収を示したため、最終剖検時には 30 匹の雌が生存仔を有していたことになる。しかし、原著(Smith *et al.*, 1983)では、総妊娠雌 34 例のうち、31 例が生存仔を有していたとして考慮対照とされているが、改訂報告書(Harding *et al.*, 1987)では、33 例のうち 30 例(90.9%)という最も適切なデータを報告しており、これらの数値は概数化すると、ともに

91%となる。

被験物質投与群では、高い死亡率が示された。被験物質投与群の交配が認められた雌 10 匹(うち 4 匹が妊娠)が、被験物質投与期間中に(強制経口投与の失敗によるものではなく)死亡した。別の 5 匹(うち 2 匹が妊娠)が被験物質投与後の観察期間中に死亡し、さらに 1 匹が試験最後の剖検に供されていない。したがって、仔動物の生存性を評価する剖検に供された生残雌親の数は、28 匹であった。これらの雌親のうち、23 匹は生存仔動物を有していたが、5 匹は全胚吸収を示していた。ここでも 1983 年の原著と 1987 年の改訂報告書との間に食い違いが認められる。前者では、生存妊娠例数/妊娠雌親数比を 23/34(68%)と報告しているが、後者ではより実際的な数値である 23/28(82%)を提示している。

1983 年の原著で報告されている生殖指数(生存仔動物を生じていた雌親の数を妊娠の形跡が認められた雌親の総数で割った比)は、後に出された改訂版(Harding *et al.*, 1987)に報告されている値と幾分食い違っている。1983 年の原著では、被験物質投与群の雌と対照群の雌との間で指数に有意差があるとされており、被験物質投与群では 23/34 で 68%、対照群では 31/34 で 91%、 $p = 0.01$  と報告されている。しかし、被験物質投与群の雌親で生存仔動物を設けた例数が明らかに少ないのは、主として母体毒性によるものであり、この指数の値の評価に当たっては、15 匹の雌親(うち 6 匹が妊娠)が投与期間中に死亡したことと、1 匹が剖検されていないことを考慮すべきである。したがって、被験物質投与群で生残した妊娠例数は、28 である。これらのうち、生存仔動物を設けた例数は 23 であり、そうすると、同じ試験について 1987 年に公表された報告書の作成者が示すものと同じとなる。つまり、23/38(82.1%)という比が導出され、対照群における 30/33(90.9%)という値と比較して、有意差は認められない( $p > 0.05$ )。本リスク評価書の作成者は、後者の考察に同意する。

他の出産前や出産後のいずれのパラメータについても、有意差は認められなかった。検討したパラメータは、開始時体重(7 日目)、出産前の母体重(18 日目)、出産 3 日後の母体重(生存仔動物を有したもの)、平均一腹仔体重、12 時間後の一腹当たりの生存仔数および死亡仔数、一腹当たりの出生 1~3 日の生存仔数一腹当たりの出生後 1 および 3 日後の重量であった。奇形の有無については、この試験では報告されていない。

重大な母体毒性を示すような高用量においても、有意な発生・発達毒性は認められなかった(Table 4.1.2.9.2-1 参照)。ただし、この試験は、発生・発達毒性を評価する目的には許容されないものと考えられる。試験した唯一の用量が比較的高用量で、その用量で母動物の死亡が認められているため、低用量の 2,4-DNT による発生・発達毒性を評価したり、この試験をそうした評価に用いたりすることができない。さらに、内臓や骨格の異常が検討されたかどうか不明確である。

Table 4.1.2.9.2-1: Effects of 2,4-DNT on developmental toxicity

Protocol	Result	Reference
Female CD-1 mice were administered 390 mg/kg/day (pure 2,4-DNT) by gavage for 8 days (gestation days 7-14)	Maternal mortality (6/34 pregnant dams and 9/16 in non pregnant, vs. 0/34 in controls) (Resorbed+stillborn) litters 5/28 vs. 3/33 in controls Reproduction index 23/28 (82%) in treated pregnant dams versus (no significant $p>0.05$ )  No differences in litter weight and viability after 12 h, 1 day and 3 days after partum. Treatment produced maternal mortality but showed no significant adverse effects on the evaluated developmental endpoints. No observations of abnormalities were reported in this study.	Smith <i>et al.</i> , 1983; Harding <i>et al.</i> , 1987
Abnormalities evaluation in offspring of the 3-generation reproductive study in rat testing to dose levels of 0.57/0.71, 3.9/5.1 and 34/45 mg/kg bw/day for males/females, respectively.	No abnormalities were detected in the offspring from any of the matings. Birth weights, postpartum survival when parturition was normal, weight at weaning and the lack of a teratogenic effect indicate that any 2,4-DNT received via the placenta or milk was of little consequence.	(Ellis <i>et al.</i> , 1979)

### 他の情報

Price *et al* (1985)の試験：ラットにおける DNT(工業用)の催奇形性の評価

雌の Fischer 344 ラットに、工業用 DNT が、妊娠 7 日目(精子が検出された日から 7 日後)から屠殺が行われた妊娠 20 日目まで、0、14、35、37.5、75、100 ないしは 150 mg/kg 体重/日の用量で、強制経口投与された (Table 4.1.2.9.2-2)。使用された工業用 DNT には、以下のように異性体が含まれていた。2,4-DNT(76%)、2,6-DNT(19%)、3,4-DNT(2.4%)、2,3-DNT(1.5%)、2,5-DNT(< 1%)および 3,5-DNT(< 1%)。DNT を投与する際の媒体としては工業用コーン油が用いられ、媒体対照群にはこのコーン油だけが投与された。滅菌蒸留水に水酸化尿素を懸濁し、陽性対照物質として用いた。DNT の用量は、妊娠時期を合わせた Fischer 344 ラットを用いた予備試験で、妊娠 9 日目から 12 日目にかけて投与しても、十分な耐容性が示された(75 および 150 mg/kg 体重/日、経口)というデータに基づいて設定した。妊娠雌への投与は 3 回試行されているが、予備試験の結果を受けて、1 回目の試行における DNT の用量は、0、35、75 ないしは 150 mg/kg 体重/日に設定された。しかし、150 mg/kg 体重/日の用量では、投与期間中の妊娠雌の死亡率が予想以上に高かった(妊娠 11~18 日目に 6/13 匹が死亡)。そのため、2 および 3 回目の試行では、妊娠雌に対し、14、37.5 ないしは 100 mg/kg 体重/日の用量で投与が行われた (Table 4.1.2.9.2-2)。

それぞれの雌親について、妊娠 20 日目に以下のパラメータが測定された。肝臓重量、脾

臓重量、黄体数、妊娠子宮重量、子宮の着床部の状態(着床後吸収胚数、死亡胎仔数、生存胎仔数)。肉眼で着床部位が確認できない子宮については、非常に早期に吸収された胚の着床痕を検出する染色ため、10%硫化アンモニウム溶液での処理を行った。生存胎仔を子宮から切り離し、以下の観察を行った。子宮における位置、体重、頭臀長、胎盤重量、性別および肉眼的な形態異常。雌親の血液試料および胎仔の血液試料(一腹ごとにまとめた)を採取し、メトヘモグロビン量の測定を行った。さらに、100 mg/kg 体重/日群については、各妊娠雌と一腹につき 1 匹ずつの雌雄の胎仔から血液試料を採取し、網状赤血球数を測定した。3 回目の試行では、100 mg/kg 体重/群に割り当てられた雌親と、同群の一腹につき 1 匹ずつの雌雄の胎仔から血液試料を得て、全血球計算が実施された。血液試料採取後、各腹の半分の胎仔を断頭し、頭部を固定保存して奇形の検査に供した。断頭された胎仔については内臓異常の検査が行われ、また肝臓や脾臓重量の測定が行われた。全ての胎仔(50%は断頭されたもの、50%は断頭されていないもの)の骨格を染色し、奇形の検査を行った。

この試験は、全体として OECD の試験ガイドライン 414 に沿って実施されており、リスク評価に適切なものであると判断された。

Table 4.1.2.9.2-2: Distribution of experimental subjects across dose groups and breeding dates in the teratologic evaluation of technical grade dinitrotoluene in Fischer 344 rats (Price et al., 1985)

	Treatment (mg/kg bw/day)							
	Vehicle	Hydroxyurea		Technical grade DNT				
		200	14	35	37.5	75	100	150
Total females treated	37	36	22	13	22	13	23	13
Deaths (n)	0	0	1	1	0	0	1	6
Deaths (%)	0	0	4.5	7.7	0	0	4.3	46.2
Assignment of surviving females for teratologic evaluation								
First breeding	9	9	0	7	0	7	0	6
Second breeding	7	6	6	0	6	0	6	0
Third breeding	6	7	7	0	7	0	7	0
Total females assigned	22	22	13	7	13	7	13	6
Pregnant (n)	20	20	10	7	12	6	12	5
Pregnant (%)	91	91	77	100	92	86	92	83

DNT を投与された(14、35、37.5、75、100 ないしは 150 mg/kg bw/day/日)群の雌親の死亡率は、4.5、7.7、0、0、4.3 および 46.2%であった。陽性対照群や媒体対照群では、死亡例は生じなかった。妊娠 20 日目の屠殺時には、100 mg/kg 体重/日群の雌親で、メトヘモグロビン量、網状赤血球数、赤血球サイズ、赤血球容積粒度分布幅および血小板数に統計学的に有意な上昇が認められた。また、赤血球数とヘマトクリット値には、統計学的に有意な低下が認められた。被験物質投与群の間で、妊娠期間中の母体重量の増加に有意な差が認められたが、媒体対照群との対比較では、体重増加に統計学的に有意な減少が認められたのは最高用量群だけであった(Table 4.1.2.9.2-3)。DNT を投与された全ての群にわたって、雌親の肝

EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

臓および脾臓の相対重量に投与に関連した増加が認められ、雌親の絶対体重増加量(妊娠子宮重量を差し引いたもの)に用量依存性の減少が認められた(Table 4.1.2.9.2-3)。胚吸収率、生存胎仔および死亡胎仔の割合については、雌親 1 匹当たりの影響を受けた着床例の百分率で表した場合、統計学的に有意な群間差は認められなかった。最高用量群では胎仔死亡率の顕著な増加が認められた(一腹当たりの胚吸収および後期胎仔死亡の割合は対照群で 16.8%であったのに対し最高用量群で 49.6%)が、統計学的に有意な相違には至っていなかった(Table 4.1.2.9.2-3)。

Table 4.1.2.9.2-3: Maternal and uterine status following exposure of Fisher 344 rats to technical grade DNT or vehicle on gestational days 7 through 20<sup>a</sup> (Price *et al.*, 1985)

	Dinitrotoluene (mg / kg bw/ day)						
	Vehicle	14	35	37.5	75	100	150
Pregnant dams							
Number sacrificed	20	10	7	12	6	12	5
Weight gain, gd 0-20 (g) <sup>b</sup>	61.8±3.6†	64.9±4.6	66.1±6.0	55.8±5.8	64.8±6.8	52.7±4.5	8.1±20.1**
Gravid uterine weight (g)	37.7±3.2	47.8±2.4	39.4±3.3	33.6±5.2	41.7±5.9	37.4±3.8	22.1±9.8
Absolute weight gain (g) <sup>c</sup>	24.1±2.1‡§	17.2±3.9*	26.7±4.3	22.2±2.1	23.1±2.3	15.2±1.9**	-14.0±13.4**
Liver weight (% b.w.)	4.09±0.08‡§	3.9±0.1*	4.12±0.09	3.96±0.09	4.6±0.1**	4.58±0.08**	4.8±0.4
Spleen weight (% b.w.)	0.20±0.003‡	0.185±0.007	0.22±0.011*	0.215±0.006*	0.245±0.010* *	0.32±0.027**	0.28±0.059*
% Resorptions <sup>d</sup>	16.8±5.4	2.3±1.5	4.1±4.1	14.6±5.2	11.0±9.3	12.7±5.4	49.6±22.3
% Dead fetuses <sup>d</sup>	0	2.4±1.6	0	0	1.3±1.3	0	3.6±3.6
% Live fetuses <sup>d</sup>	83.2±5.4	95.4±1.9	95.9±4.1	85.4±5.2	87.7±9.1	87.3±5.4	50.4±20.6

<sup>a</sup> Data are expressed as X± SE using dam or average litter values as the experimental unit. <sup>b</sup> Includes uterine weight.

<sup>c</sup> Weight gain during gestation minus gravid uterine weight. <sup>d</sup> Expressed as the percentage of total implants per dam gd gestation days.

\* p < 0.05 Mann-Whitney U test (two tailed), \*\* p < 0.01 Mann-Whitney U test (two tailed).

† p < 0.05 Kruskal-Wallis one-way ANOVA, ‡ p < 0.01 Kruskal-Wallis one-way ANOVA, § p < 0.01 Jonckheere's test.

胎仔の生育や形態学的発達に対しては、DNT 投与による統計学的に有意な影響は何も認められなかった(Tables 4.1.2.9.2-4 および Table 4.1.2.9.2-5)。

EURAR 2,4-DINITROTOLUENE

Table 4.1.2.9.2-4: Status of live foetuses from Fisher 344 rats following maternal exposure to technical grade DNT or vehicle on gestational days 7 through 20<sup>a</sup> (Price *et al.*, 1985)

	Vehicle	Dinitrotoluene (mg / kg bw/ day)					
		14	35	37.5	75	100	150
N° litters with live foetuses	20	10	7	12	6	12	3
Live litter size <sup>b</sup>	7.3±0.7	9.2±0.7	9.0±0.9	6.4±1.1	8.3±1.3	7.3±0.9	7.3±1.7
Male/live×100 (%)	48.8±5.0 <sup>c</sup>	53.0±6.3	46.4±4.5	44.4±8.0	52.7±4.9	43.0±5.9	57.4±22.8
b.w. (g)	3.21±0.05	3.39±0.07	3.29±0.07	3.34±0.06	3.29±0.13	3.17±0.08	3.14±0.18
Crown-rump length (cm)	3.55±0.03	3.51±0.07	3.57±0.07	3.58±0.07	3.53±0.05	3.46±0.07	3.53±0.15
Liver weight (% bw)	8.09±0.11‡	7.38±0.12	8.35±0.14	7.82±0.10	8.44±0.29	8.12±0.08	8.50±0.30
Spleen weight (% bw)	0.097±0.005 ‡	0.081±0.008	0.131±0.006 **	0.084±0.004	0.119±0.003 *	0.085±0.004	0.128±0.012
Placental weight (g)	0.494±0.022	0.539±0.054	0.440±0.009	0.536±0.046	0.453±0.018	0.510±0.028	0.458±0.057

<sup>a</sup> Data are expressed as X± SE using dam or average litter values as the experimental unit

<sup>b</sup> Live litter size was not analyzed statistically; for an evaluation of foetal viability see Table 4.1.2.9.2-3 “% live foetuses”

<sup>c</sup> Sex of one foetus was not recorded

\* p < 0.05 and \*\* p < 0.01 using Mann-Whitney U test (two tailed); ‡ p < 0.01 using Kruskal-Wallis one-way ANOVA

Table 4.1.2.9.2-5: Summary of malformations in Fisher 344 rat foetuses following maternal exposure to technical grade DNT, hydroxyurea or vehicle on gestational days 7 through 20 (Price *et al.*, 1985)

	Vehicle	hydroxyurea	Dinitrotoluene (mg / kg bw/ day)					
			14	35	37.5	75	100	150
External malformations								
Foetuses <sup>a</sup>	0/146	30/146	1/92	2/63	0/77	0/50	0/88	0/22
Litters <sup>b</sup>	0/20	9/19***	1/10	2/7	0/12	0/6	0/12	0/3
Visceral malformations								
Foetuses <sup>a</sup>	0/72	18/86	1/47	0/31	0/40	0/27	0/43	0/11
Litters <sup>b</sup>	0/20	5/19*	1/10	0/7	0/12	0/6	0/12	0/3
Skeletal malformations								
Foetuses <sup>a</sup>	4/146	23/144 <sup>d</sup>	3/92	0/63	1/77	0/50	4/88	0/22
Litters <sup>b</sup>	3/20	10/19*	3/10	0/7	1/12	0/6	2/12	0/3
Summary								
Total foetuses <sup>a</sup>	4/146	42/146 <sup>d</sup>	4/92	2/63	1/77	0/50	4/88	0/22
Total litters <sup>b</sup>	3/20	13/19**	4/10	2/7	1/12	0/6	2/12	0/3
Malformed foetuses per litter <sup>c</sup>	3.8±2.6	30.6±8.3**	4.1±1.7	3.2±8.8	0.8±0.8	0	5.8±4.3	0

<sup>a</sup> Malformed foetuses / total foetuses examined

<sup>b</sup> Litters with one or more malformed foetuses / total of litters examined

<sup>c</sup> N° of malformed foetuses in the litter / total N° of live foetuses in the litter · 100; Data are expressed as X SE using litter as the experimental unit

<sup>d</sup> Two malformed foetuses were preserved for archival reference and were not evaluated for skeletal malformations

\*\* p < 0.01 Mann-Whitney U test (two tailed)

\* p < 0.05 Fisher exact probability test (two tailed); \*\* p < 0.01 Fisher exact probability test (two tailed)

\*\*\* p < 0.001 Fisher exact probability test (two tailed)

結論として、DNTは、Fischer 344 ラットに経口投与しても、着床後のいずれの段階におい



ても、催奇形性影響を生ずることはなかった。出生前生存率の低下が認められたのは、DNT の投与用量が雌親の LD<sub>50</sub> に近かった場合だけであり、したがって、発生途中の受胎産物がどこかの段階で DNT の毒性影響に対して高感受性を示すという証拠は示されなかった。

#### 4.1.2.9.3 生殖能力への影響および発生毒性：ヒトにおけるデータ

工業用 DNT(2,4-DNT を 80%、2,6-DNT を 20%含む)とジアミノトルエン(2,4 異性体および 2,6 異性体を含む)の両方に曝露されていた男性労働者を対象として、生殖能力への影響を検討した 3 件の調査の情報が得られている。2,4-DNT のリスク評価におけるこれらの調査価値は、対象労働者が 2,6-DNT やジアミノトルエンといった他の化合物にも曝露されていることから、非常に乏しくなっている。DNT やジアミノトルエンの空气中濃度のデータは得られているものの、労働者それぞれの曝露量の測定は実施されていない。したがって、曝露を受けた労働者において、DNT やジアミノトルエンを多量に吸収した人がどのくらいの割合で存在したのかは不明である。ジアミノトルエンに曝露された実験動物では、生殖能力への影響と催奇形性影響の両方が示されている(EHC 74, 1987)ことに留意すべきである。

こうした理由から、それら 3 件の調査は、2,4-DNT のリスク評価には不適切であるとみなされる。しかしながら、以下にそれらの試験の概略を示しておく。

#### NIOSH(1980)の調査

米国国立安全衛生研究所(NIOSH)は、ジアミノトルエン類を製造する施設の労働者 44 人を対象に、生殖能力の健全性を評価した。調査では、3 群が考慮された(曝露を受けた者 9 名；最近 2 年間曝露を受けていない者 12 名；曝露を受けていない者 9 名)。曝露事例は、通常、ジアミノトルエンと DNT の両方への曝露のものであった。採取された空気試料における DNT の濃度は、米国労働安全衛生局(OSHA)が提唱する標準値の 1.5 mg/m<sup>3</sup> よりも低かった。生殖能力への影響に関しては、曝露を受けた労働者と対照と比較したところ、自然流産率の上昇(非曝露群で 4/23 名であったのに対し、曝露群で 6/18 名)、精子数の減少、および形態学的に大きいと分類される精子の比率の減少が認められた。対象者の数が少なく、また、ボランティアが無作為に選別されていないため、選択バイアスが生じている危険性がかなりある。この調査の質は低いと判断される。

#### Ahrenholz and Meyer (1982) の調査

NIOSH により、50 人の労働者を対象として、生殖能力の健全性の評価が行われた。この調査では、労働者が 3 群に分別された(曝露を受けた可能性がある者 15 名；最近 2 年間曝露を受けていない者 23 名；曝露を受けていない者 12 名)。曝露事例は、通常、ジアミノトルエンと DNT の両方への曝露のものであった。採取された空気試料における DNT の濃度は、OSHA が提唱する標準値の  $1.5 \text{ mg/m}^3$  よりも低かった。調査対象となった 50 名のボランティアのうち、41 名から精液試料が提示された。この医学的調査で得られた結果から、肝機能、腎機能、精子数および精子の形態に関し、曝露群と対照群との間に有意差が無いことが示された。生存出生件数に対する流産件数の比は、DNT 曝露群の方が比曝露群よりも高かった(非曝露群で 3/38 件であったのに対し、DNT 曝露群では 1/7 件)。ただし、少数事例に基づいているため、結果の妥当性は低い。また、ボランティアが無作為に選別されていないため、選択バイアスが生じている危険性がかなりある。この調査の質は低いと判断される。

#### Hamill *et al.* (1982) の調査

DNT やジアミノトルエンへの曝露の生殖能力に対する有害性を検討するための調査が、米国レイクチャールズの Olin 化学コンビナートにおいて、曝露を受けた労働者 84 名と曝露を受けていない労働者 119 名を対象に実施されている。情報源は、血液および精液分析、医学的検査、および生殖能力や受胎能力に関する問診であった。調べられたパラメータは、精巣容量、血清卵胞刺激ホルモン値、および精子数と精子の形態であった。採取された空気試料における DNT の濃度は、米国労働安全衛生局(OSHA)が提唱する標準値の  $1.5 \text{ mg/m}^3$  よりも低かった。曝露群と非曝露群との間に相違は認められなかった。著者は、DNT やジアミノトルエンへの曝露は生殖能力に影響を及ぼさないと結論付けている。この調査の質は低いと判断される。

#### 4.1.2.9.4 生殖毒性の要約

##### 反復投与毒性試験における生殖能力についての所見

##### 雄の生殖能力

雄の生殖能力に関しては、ラットに 12 ないしは 24 ヶ月間経口投与した場合に認められた精細管の萎縮、精子形成の低減および高用量側における精巣重量の低下に基づいて、 $0.57 \text{ mg/kg 体重/日}$  が LOAEL であると考えられる。

### 雌の生殖能力

雌の生殖能力に関しては、マウスに 12～24 ヶ月間混餌投与した場合に認められた卵巣の萎縮に基づき、95 mg/kg 体重/日という値が妥当な NOAEL であると考えられる (LOAEL は 900 mg/kg 体重/日)。

### 多世代試験に関する特記事項

3 世代試験では、生殖能力への投与に関連した影響は定量的に示唆されなかったが、高用量においては、F<sub>1b</sub> 世代で 4 日間生存率の低下 (統計学的に有意ではない) が見られ、特に親となった F<sub>2</sub> 世代が認められなかったことから、結論として、雄の生殖能力に有害影響が及んだことが示唆されたと考えられる。したがって、生殖能力の障害に関する NOAEL は、3.9 mg/kg 体重/日と考えられる。

### 発生毒性試験

マウスを用いた催奇形性試験 (Smith *et al.* 1983, Harding *et al.* 1987) では、妊娠雌親に器官形成期の 8 日間 (妊娠 7～14 日) 経口投与が行われ、390 mg/kg 体重の用量で投与を受けた妊娠雌親は、対照群と比較して高い死亡率を示した。催奇形性影響は、試験した用量では認められなかった。ただし、この試験は、発生・発達毒性を評価する目的には適合していないと考えられる。試験した唯一の用量が比較的高用量で、その用量で母動物の死亡が認められているため、低用量の 2,4-DNT による発生・発達毒性を評価したり、この試験をそうした評価に用いたりすることができない。さらに、内臓や骨格の異常が検討されたかどうかは不明確である。

ラットにおける 3 世代試験 (Ellis *et al.* 1979) では、いずれの交配例においても、生まれた仔動物に異常は検出されなかった。出生時体重、出産が正常であった場合の分娩時生存率ならびに離乳時体重といったデータ、および催奇形性影響が認められなかったという所見から、胎盤経路あるいは母乳経路での 2,4-DNT の摂取は、ほとんど問題とならないことが示唆される。ただし、内臓や骨格の異常を検討したかどうかは不明確である。

Fischer 344 ラットへの経口投与によって実施された催奇形性試験 (Price *et al.*, 1985) では、DNT (工業用) は、着床後のいずれの段階においても、催奇形性影響を示さなかった。出生前生存率の低下が認められたのは、DNT の投与用量が雌親の LD<sub>50</sub> に近かった場合だけであり、したがって、発生途中の受胎産物がどこかの段階で DNT の毒性影響に対して高感受性を示すという証拠は示されなかった。

### ヒトにおけるデータ

2,4-DNT へ曝露された労働者を対象に行われた調査からは、リスクの総合評価に適用できる確定的なデータを得ることはできなかった。

### 生殖-受胎および生殖-発生に関する分類

ラット、マウス、イヌ、そしてヒトにおいて観察された影響に基づくと、2,4-DNT は生殖能力を傷害する可能性がある」と結論付けられる。具体的には、精巣重量の減少、精巣上体重量の減少、精巣上体精子数の減少、セルトリ細胞の形態学的変化、FSH の上昇および LH の上昇が、複数の試験で報告されている。また、交配能力および雌を懐妊させる能力の低減も、5 日間の投与を受けた雄で認められており、雄が交配以前に投与を受けた場合に、胎仔死亡の増加も示されている。この所見は、多世代試験で高用量群に観察された早期死亡率の増加や親となった F<sub>2</sub> 世代の欠如が、雄の生殖能力の障害によって導かれた可能性があることを示唆している。全体として、2,4-DNT が雄の生殖(-受胎)能力を損傷することを示唆する一貫した情報が得られている。生殖能力に有害影響が及ぼされる用量では他の毒性影響も合わせて認められたが、生殖能力への影響は、そうした他の毒性影響の結果二次的に生じた非特異的なものではないと考えられる。したがって、EU の基準に基づき、2,4-ジニトロトルエンは、生殖に関し、カテゴリー3の有害物質(Xn, R62、有害; 生殖能力を損傷するおそれ有り)に分類されるべきであると判断される。ラットに 24 ヶ月間投与を行った試験で観察された精細管の萎縮に基づき、0.57 mg/kg 体重/日という LOEL が導出され、この値が生殖毒性(受胎毒性)に関するリスク評価の出発点とみなされる。発生毒性に関しては、DNT(工業用)で実施された催奇形性試験で得られたデータに基づくと、投与による発生への影響は、親動物の全身毒性により生じた二次的影響とみなされる。DNT のデータを 2,4-DNT に外挿することは、2,4-DNT が DNT(工業用)の主要な異性体であることから、正当化されるものと考えられる。したがって、EU の基準に基づき、発生に関しては、分類の必要性は生じない。